

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991 年 3 月创刊

第 26 卷 第 11 期 2016 年 11 月 30 日出版

主管
中国科学技术协会

主办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主编
秦 川

编辑
《中国比较医学杂志》编辑部

出版
中国实验动物学会

发行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话: (010) 67779337
传真: (010) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
http://zgxydw.alljournal.ac.cn/
zghjyxzz/ch/index.aspx

广告经营许可证
京朝工商广字第 8131 号

照排
同方知网(北京)技术有限公司

印刷
北京市百善印刷厂

邮发代号
82-917

定价
每期 20.00 元, 全年 240 元

中国标准连续出版物号
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

2016 年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库, 如不同意自己论文入网, 请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。

本刊电子版出版发行合作伙伴: 中邮阅读网: www.183read.com

本期执行主编 贺争鸣

本期责任编辑 周文君

目 次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

- 生长激素基因在西藏小型猪不同生长阶段
和不同组织器官中的表达 田雨光, 王玉珏, 岳敏(1)
- presenilin-1/presenilin-2 双基因敲除小鼠的寿命观察
..... 唐红, 唐晓琴, 邓飞, 等(6)
- Bcl-2 抑制剂对黄芪注射液减轻缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元凋
亡的影响 董雅洁, 高维娟, 钱涛, 等(11)
- 不同时长的束缚应激致雌雄大鼠的抑郁样行为改变
..... 张北月, 卢聪, 董黎明, 等(18)
- 丹酚酸 A 对心肌缺血再灌注损伤大鼠
心率变异性 and 心肌损伤的影响 ... 王木兰, 潘永明, 金敏, 等(24)
- miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经损伤中的保护作用与机制
..... 叶蓓, 李曼, 程翔, 等(31)
- 急性肺水肿大鼠肺组织中 IL-6, SOD 和 MDA 的变化
..... 王娟, 贾合磊, 吉红亮, 等(38)
- 加味丹参饮体外诱导骨髓间充质干细胞
向心肌样细胞分化的实验研究 韩析言(43)
- siRNA 沉默 Bmi-1 基因表达对宫颈癌细胞增殖的影响
..... 张冬丽, 王伟, 张红霞(49)
- miR-34a 通过靶向调控 Notch1 表达影响乳腺癌细胞的增殖
..... 高砚春(55)
- miR-34a 通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞的生物学行为
..... 王雷(61)
- 血管活性肠肽调控 CD4 + CD25 + Treg/Th17 平衡对实验性自身免疫性
脑脊髓炎防治作用的影响 杨元, 袁正洲, 吕志宇, 等(66)
- 自发性高血压大鼠心肌组织 microRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达的改
变及意义 郑婧(72)

技术方法

- 新型实验大鼠尾静脉穿刺用途四联固定器的设计及其效用评价
..... 鲍礼智, 郭志福, 沈明, 等(77)
- 血液样本处理方式对 Wistar 大鼠血液生化指标检测结果的影响
..... 朱科燕, 蔡月琴, 徐孝平, 等(80)

综述与专论

- 果蝇模型与心脏衰老遗传机制 胡永艳, 孔申申(85)
- Fkbp51 与应激相关疾病的研究进展 ... 张玲玲, 邱彬, 杨志伟, 等(90)
- 广告 (封二, 封三, 封底)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 11 November 30 2016

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences

Editing

Editorial Board of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010) 67779337
Fax: (010) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbyxzz/ch/index.aspx>

Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

Publishing

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010) 67779337
Fax: (010) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010) 67779337
Fax: (010) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

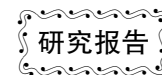
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Study on the expression of Growth Hormone gene in different tissues and different growth stages of Tibet-minipigs
..... *TIAN Yu-guang, WANG Yu-jue, YUE Min, et al.* (1)
- Investigation on life span of presenilin-1/presenilin-2 conditional double knockout mice
..... *TANG Hong, TANG Xiao-qin, DENG Fei, et al.* (6)
- The influence of Bcl-2 inhibitor on the alleviation action of astragalus injection on apoptosis of hippocamal neurons of rats induced by hypoxia /hypoglycemia and reoxygenation
..... *DONG Ya-jie, GAO Wei-juan, QIAN Tao, et al.* (11)
- Depressive-like behavior of male and female rats induced by restraint stress with different restraint duration
..... *ZHANG Bei-yue, LU Cong, DONG Li-ming, et al.* (18)
- Effects of salvianolic acid A on heart rate variability and myocardial injury in myocardial ischemia reperfusion injured rats
..... *WANG Mu-lan, PAN Yong-ming, JIN Min, et al.* (24)
- The mechanism and protective effect of miR-29c on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats
..... *YE Bei, LI Man, CHEN Jian-zhen, et al.* (31)
- Study on SOD, MDA and IL-6 in a rat model of acute pulmonary edema
..... *WANG Juan, JIA He-lei, JI Hong-liang, et al.* (38)
- Experimental study of Jiawei Danshen Yin on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myocardium-like cells in vitro
..... *HAN Xi-yan* (43)
- Effect of siRNA silencing Bmi-1 gene on cell proliferation of cervical cancer cells
..... *ZHANG Dong-li, WANG Wei, ZHANG Hong-xia* (49)
- Inhibitory effect of miR-34a on the proliferation of breast cancer cell by targeting Notch1
..... *GAO Yan-chun* (55)
- Effect of miR-34a on the biological behavior of breast cancer cell by Notch signal pathway
..... *WANG Lei* (61)
- The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the regulation of CD4 + CD25 + Treg/Th17 balance in the prevention and treatment of experimental autoimmune cerebrosplinal meningitis (EAE)
..... *YANG Yuan, YUAN Zheng-zhou, LV Zhi-yu, et al.* (66)
- Expression of micro RNA-97a and TGF- β 1 protein in myocardium of spontaneously hypertensive rats and its significance
..... *ZHENG Jing* (72)
- A four combined holder for tail vein puncture in conscious rats: design, construction and feasibility testing
..... *BAO Li-zhi, GUO Zhi-fu, SHEN Ming, et al.* (77)
- Effects of different sample process modes on blood biochemical indicator detection in Wistar rats
..... *ZHU Ke-yan, CAI Yue-qin, XU Xiao-ping, et al.* (80)
- Drosophila as a model to study genetics of cardiac aging
..... *HU Yong-yan, KONG Shen-shen* (85)
- Regulation of the response to stress-related disorders by *Fkbp51*
..... *ZHANG Ling-ling, QIU Bin, YANG Zhi-wei, et al.* (90)



生长激素基因在西藏小型猪不同生长阶段和不同组织器官中的表达

田雨光, 王玉珏, 岳 敏

(南方医科大学实验动物中心暨比较医学研究所, 广州 510515)

【摘要】 目的 对西藏小型猪生长激素基因在不同脏器和不同年龄阶段的表达水平进行测定。**方法** 采用 Real-time PCR 的方法, 以 GAPDH 为内参, 定量分析 0 岁(1 日龄)、0.1 岁(36 日龄)、0.25 岁(90 日龄)、0.5 岁(180 日龄)、1 岁(360 日龄)、2 岁(720 日龄)、3 岁(1080 日龄)的西藏小型猪的心、肝、脾、肺、肾、肌肉、皮肤组织中生长激素基因 mRNA 表达水平, 并且进行比较分析。**结果** 生长激素基因在各个年龄阶段的西藏小型猪的心、肝、脾、肺、肾、肌肉、皮肤中均有表达。在不同脏器的表达中, 生长激素基因在 0 岁、0.5 岁时皮肤中的表达量最高, 肌肉组织中的表达量最低。在 0.25 岁、1 岁时肺组织中表达量最高, 在 0.1 岁、3 岁时肝脏表达量最高; 在不同年龄阶段的表达中, 生长激素基因在 0.1 岁时表达达到峰值。**结论** 西藏小型猪的生长激素基因的表达呈现出明显的时空特异性。

【关键词】 西藏小型猪; 生长激素基因; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.001

Study on the expression of Growth Hormone gene in different tissues and different growth stages of Tibet-minipigs

TIAN Yu-guang, WANG Yu-jue, YUE Min

(Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To study the expression of Growth Hormone (*GH*) gene in different tissues and different growth stages of Tibet-minipigs. **Methods** The expression level of *GH* gene in heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, skin tissue of Tibet mini-pig was analyzed by Real-time PCR in 0 years old (1 days), 0.1 years old (36 days), 0.25 years old (90 days), 0.5 years old (180 days), 1 years old (360 days), 2 years old (720 days), and 3 years old (1080 days). **Results** The expressions of *GH* mRNA could be detected in various tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, skin) in different growth stages (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 years old) in Tibet mini-pigs. The *GH* gene was most highly expressed in skin in 0, 0.5 years old and most lowly expressed in muscle comparing with other tissues. Moreover, the *GH* gene was also most highly expressed in lung and liver in 0.25, 1 years old and 0.1, 3 years old, respectively. The expression level of *GH* gene reached the peak in 0.1 years old among different growth stages. **Conclusion** The expression of *GH* gene in Tibet mini-pig showed an obvious temporal and spatial specificity.

【Key words】 Tibet-minipigs; *GH* gene; Real-time PCR

【基金项目】 国家自然科学基金(801402625); 中国博士后自然科学基金(2014M550439); 广东省科技计划项目(2016A030303008); 南方医科大学 2015 科研助手项目(C1032246)。

【作者简介】 田雨光(1987-), 男, 理学博士, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: yuguang.tian@qq.com。

【通讯作者】 岳敏(1982-), 女, 医学博士, 实验师, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 343779791@qq.com。

生长激素 (*growth hormone, GH*) 是神经内分泌生长轴中调控动物生长发育的核心, 是一种具有广泛生理功能的生长调节素, 能影响几乎所有组织类型和细胞, 甚至包括免疫组织、脑组织及造血系统^[1]。猪的 *GH* 基因全长 2231 bp, 是由 190 个氨基酸残基组成的单链多肽^[2], 与牛的 90% 的氨基酸同源性, 但两者与人的 *GH* 同源只有 65%^[3]。猪的 *GH* 基因由 5 个外显子和 4 个内含子构成。外显子大小分别为 10、161、117、162 和 198 bp, 内含子大小分别为 242、210、197 和 278 bp, 编码前导肽的为 78 bp, 编码成熟区的为 570 bp, 猪 *GH* 基因已被定于 12 号染色体^[4-6]。不同种动物或同种不同个体之间的生长速度的显著差异与 *GH* 基因的结构和表达水平有着密切相关性^[7]。猪生长激素通过其受体 (*GHR*) 实现信号的传递, 猪 *GH* 只受一个因子即生长激素因子 I (*GHF-I*) 的调控, *GHF-I* 不仅维持 *GH* 基因的组织特异性表达, 而且使表达具有发育阶段性^[8]。对猪的 *GH* 基因在不同组织及年龄阶段的表达情况少有报道, 本文旨在探讨西藏小型猪 *GH* 基因表达的变化情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物及采样

选用 0 岁 (1 日龄)、0.1 岁 (36 日龄)、0.25 岁 (90 日龄)、0.5 岁 (180 日龄)、1 岁 (360 日龄)、2 岁 (720 日龄)、3 岁 (1080 日龄) 的西藏小型猪, 每个年龄段各 3 头, 共 21 头。西藏小型猪来自南方医科大学实验动物中心【SCXK (粤) 2011 - 0015】, 相同的饲养环境。在南方医科大学实验动物中心大动物实验室【SYXK (粤) 2011 - 0074】处死后, 立即取其心、肝、脾、肺、肾、肌肉、皮肤组织, 立即放入去除 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中, 迅速投入液氮中, 带回实验室备用。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂

DEPC 处理水: 1000 mL ddH₂O 中加入 0.1 mL DEPC, 于 37℃ 过夜温育后高压灭菌。TRIZOL Reagent, 购自 Invitrogen 公司。无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇, 购自广东省化学试剂工程技术研究开发中心。引物由 Invitrogen 广州分公司合成。PrimeScript RT-PCR Kit、SYBR Premix DimerEraser (Perfect Real Time) 购自 Takara 公司。

1.2.2 仪器

荧光定量 PCR 仪 (美国伯乐), 紫外分光光度计 (美国热电), 水平电泳仪 (美国伯乐), 凝胶成像系统 (杭州朗基科学仪器有限公司), 高温烤箱 (上海一恒科学仪器有限公司), 恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 各种组织总 RNA 的提取及质量测定

各种组织中总 RNA 用酚-氯仿一步法提取, 紫外分光光度计测定浓度。

1.3.2 反转录

使用 Takara SYBR Premix DimerEraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应体系为 20 μL: 包括 5 × PrimeScript Buffer 4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix 1 1 μL, Oligo Dt Primer (50 μmol/L) 1 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 1 μL, Total RNA 1 μg, 加 RNase free DH₂O 到 20 μL。反应液配制在冰上进行。反转录反应条件为: 37℃ 15 min (反转录反应), 85℃ 5 s (反转录酶的失活反应)。

1.3.3 引物设计及 PCR 扩增条件

根据 GenBank 上猪的 *GH* 基因 (X53325)、*GAPDH* 基因 (AF017079) 设计引物为 *GHF*: 5'-ATC ACATCCTCTTCGCATCTCTT-3'; *GHR*: 5'-TGAAATAA AAGCCCCGTCTCTCC-3'; *GAPDH*: 5'-TTGGCTACAGC AACAGGG-3'; *GAPDHR*: 5'-CTGGGATGGAACTGG AAGT-3'。以样品的 cDNA 第一链为模版, 扩增 *GH* 基因, 以 *GAPDH* 作为内参。于冰上避光加样操作, 混匀, 瞬时离心进行 PCR 扩增, 扩增体系为 20 μL, 包括: SsoFast EvaGreen supermix (1 ×) 10 μL; Forward primer (300 nmol/L) 1 μL; Reverse primer (300 nmol/L) 1 μL; RNase/DNase-free water 7 μL; cDNA template 1 μL。荧光定量 PCR 反应参数为: 95℃ 30 s, 40 个循环 (95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 30 s), 72℃ 10 min。

1.4 荧光定量数据处理及统计学分析

每个时间点 3 个样本, 每个样本设 3 个复孔。根据信噪情况的设定和调整基线和阈值, 通过获得的荧光曲线和 Ct 值判定结果。根据 *GAPDH* 作为参照物, 从而得出西藏小型猪 *GH* 在测定组织中的 mRNA 相对表达量。利用 SPSS13.0 统计学软件对数据进行重复测量数据的方差分析。

2 结果

2.1 组织样品中总 RNA 的提取效果鉴定

提取好西藏小型猪各个组织总 RNA 后, 采用琼

脂糖凝胶电泳分析鉴定,鉴定结果见图 1,18S 和 28S 条带清晰,结果说明 RNA 具有较好的完整性。总 RNA 能够达到要求,进而反转录为 cDNA。

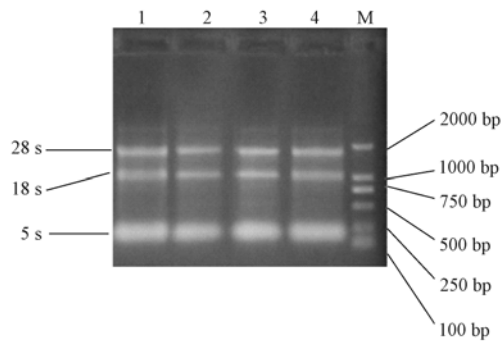


图 1 RNA 电泳图
Fig. 1 Detection of total RNA

2.2 西藏小型猪 GH 基因的实时荧光定量 PCR 检测分析

GH 基因的扩增曲线及融解曲线如图 2。扩增曲线标准,基线期、对数期和平台期三阶段分期明显,融解曲线均在一条直线上,图形为平滑的单峰曲线,且 T_m 温度附近无杂峰,表明引物特异性较好,没有因为引物二聚体及非特异性扩增而产生的杂带荧光干扰。说明实验结果可信度较高,能真实反应检测到的基因的表达水平。

2.3 GH 基因在不同脏器及不同年龄阶段的组织表达分析

以 GAPDH 为内参,根据组织内基因扩增的域值循环数(Ct 值),来计算 GH 基因的 mRNA 相对表达水平。从表 4 可以看出:在不同脏器的表达中,GH 基因在 0 岁、0.25 岁、0.5 岁、1 岁、2 岁表达量最低都是肌肉,在 0 岁、0.5 岁时在皮肤中

的表达量最高,在 0.25 岁、1 岁时在肺组织中表达量最高,在 0.1 岁、2 岁、3 岁时表达量最高的是肝脏。从图 3、表 5 中可以看出,在不同年龄阶段的表达中,GH 基因在 0.1 岁时达到峰值。所以西藏小型猪的生长激素基因的表达呈现出明显的时空特异性。

经统计学分析发现西藏小型猪 GH 基因在不同脏器中的表达有显著性差异($P < 0.05$),在不同年龄阶段的表达也均有显著性差异($P < 0.05$)。

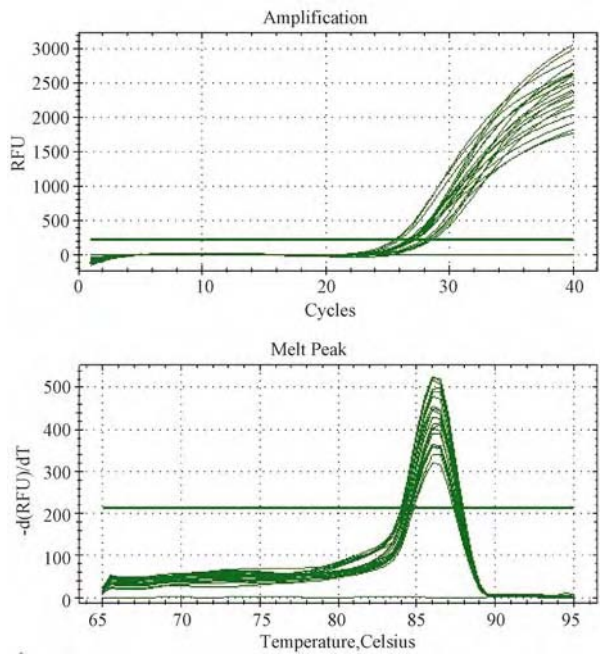


图 2 西藏小型猪 GH 基因片段实时定量扩增曲线和融解曲线

Fig. 2 Amplification plots and dissociation curves of Tibet mini-pig GH gene

表 4 西藏小型猪生长激素基因在不同脏器中的 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)
Tab. 4 GH mRNA of Tibet mini-pig relative expression in different organs

年龄(岁) Age	脏器 Organ							F 值	P 值
	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	肌肉 Musde	皮肤 Skin		
0	1.00 ± 0.00	1.74 ± 0.12	1.72 ± 0.12	1.82 ± 0.47	0.63 ± 0.06	0.18 ± 0.07	3.85 ± 0.16	767.738	0.000
0.1	1.00 ± 0.00	17.26 ± 2.19	0.41 ± 0.14	0.36 ± 0.17	0.18 ± 0.05	0.24 ± 0.12	0.79 ± 0.02	176.765	0.000
0.25	1.00 ± 0.00	4.68 ± 1.48	3.38 ± 0.76	26.44 ± 3.45	5.48 ± 0.71	0.19 ± 0.02	23.96 ± 0.65	163.926	0.000
0.5	1.00 ± 0.00	10.94 ± 1.24	1.93 ± 0.30	13.38 ± 0.87	1.22 ± 0.27	0.19 ± 0.08	21.10 ± 2.39	176.206	0.000
1	1.00 ± 0.00	3.44 ± 0.33	0.74 ± 0.20	5.43 ± 1.60	0.79 ± 0.32	0.13 ± 0.11	2.38 ± 0.29	28.974	0.000
2	1.00 ± 0.00	31.50 ± 10.00	2.41 ± 0.15	4.71 ± 0.18	2.45 ± 0.53	0.17 ± 0.07	1.76 ± 0.52	26.304	0.000
3	1.00 ± 0.00	33.46 ± 1.04	4.15 ± 0.65	13.34 ± 1.18	1.67 ± 0.24	5.77 ± 0.77	0.24 ± 0.09	775.818	0.000

表 5 西藏小型猪生长激素在不同年龄阶段中的 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 GH mRNA of Tibet mini-pig relative expression in different age stages

脏器 Organ	年龄(岁) Age							F 值	P 值
	0	0.1	0.25	0.5	1	2	3		
心 Heart	1.00 ± 0.00	13475.88 ± 357.15	67.02 ± 4.07	1.12 ± 0.40	3.04 ± 0.46	1.78 ± 0.46	1.00 ± 0.15	4274.093	0.000
肝 Liver	1.00 ± 0.00	52295.20 ± 5049.95	128.00 ± 10.18	6.88 ± 0.88	0.07 ± 0.05	23.00 ± 3.31	4.76 ± 0.87	321.569	0.000
脾 Spleen	1.00 ± 0.00	13834.52 ± 1013.02	74.02 ± 11.15	1.09 ± 0.15	2.85 ± 0.42	3.79 ± 0.63	6.88 ± 0.79	556.547	0.000
肺 Lung	1.00 ± 0.00	16447.32 ± 4540.45	17.64 ± 1.01	2.23 ± 0.55	0.68 ± 0.12	123.27 ± 36.54	2.79 ± 0.49	39.161	0.000
肾 Kidney	1.00 ± 0.00	4087.94 ± 542.95	6.29 ± 0.55	1.62 ± 0.35	0.82 ± 0.27	1.40 ± 0.14	11.23 ± 0.92	169.709	0.000
肌肉 Muscle	1.00 ± 0.00	82762.52 ± 7459.46	21.45 ± 2.32	1.40 ± 0.22	0.41 ± 0.10	2.65 ± 0.58	0.39 ± 0.12	369.248	0.000
皮肤 Skin	1.00 ± 0.00	2942.78 ± 724.15	457.99 ± 44.82	2.59 ± 0.51	0.53 ± 0.15	17.99 ± 2.82	0.02 ± 0.01	48.789	0.000

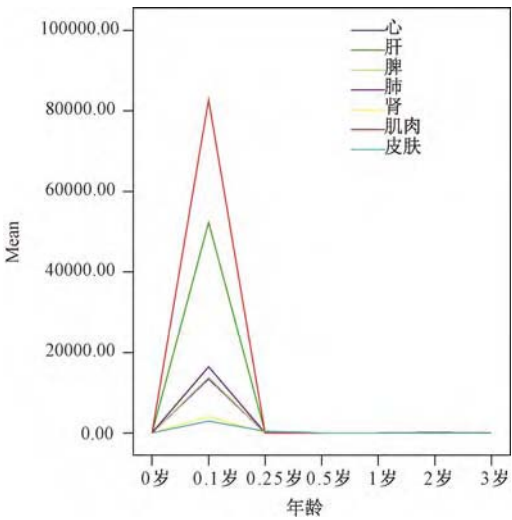


图 3 西藏小型猪生长激素基因 mRNA 在不同年龄阶段的相对表达趋势图

Fig. 3 GH mRNA of Tibet mini-pig relative expression tendency in different age stages

3 讨论

对于动物来说,不同品种、不同生长发育阶段及不同脏器,基因表达差异都较大。本研究通过实时荧光定量 PCR 测定了西藏小型猪的 GH 基因在不同年龄阶段不同组织中的表达分布情况。

2013 年单艳菊等^[9]采用实时荧光定量 PCR 方法研究生长速度不同的高邮鸭和金定鸭 13、17、21、25、27 胚龄和出雏后 7 日龄时垂体 GH 基因 mRNA 的表达水平。结果表明两个鸭种垂体 GH mRNA 表达水平均随着胚龄(或日龄)的增加而增加,而本文就西藏小型猪 GH 基因在不同年龄阶段中同一脏器

中的表达进行研究同样发现表达具有一定的规律, GH 基因在所有脏器中均在 0.1 岁时达到了峰值,后不断降低。2015 年闫云峰^[10]等利用荧光定量 PCR SYBR Green I 荧光染料法,对绵羊肠系膜淋巴结、心脏、肝脏、垂体、大脑、肾脏、骨骼肌、皮肤、脾脏、睾丸和脾脏 11 个组织中的 GH 基因的表达水平进行相对定量分析。结果表明, GH 基因在睾丸、肠系膜淋巴结和脾脏中的表达量显著高于心脏、肝脏、大脑、肾脏和骨骼肌,同样本文研究 GH 基因在同一年龄阶段不同脏器的表达中, GH 基因在 0 岁、0.25 岁、0.5 岁、1 岁、2 岁表达量最低都是肌肉,在 0 岁、0.5 岁时在皮肤中的表达量最高,在 0.25 岁、1 岁时在肺组织中表达量最高,在 0.1 岁、2 岁、3 岁时表达量最高的是肝脏。说明在同一年龄阶段,不同脏器表达量均不同。比较有特点是:在 0 岁、0.5 岁时表达量最高的是皮肤,最低的是肌肉;0.25 岁时表达量最高的是肺组织,最低的是肌肉。所以西藏小型猪的生长激素基因的表达呈现出明显的时空特异性。

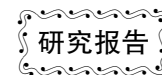
参考文献:

[1] 郑茂恩,潘登科,马月辉,等. 小型猪生长激素基因研究进展[J]. 实验动物科学,2007,24(6):107-110.
[2] Vize P D, Wells J R E. Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene[J]. Gene,1987,55(2-3):339-344.
[3] 刘德武,杨关福,张细权. 猪神经内分泌生长轴各因子及相关基因的研究进展[J]. 农业生物技术学报,2014,12(1):109-115.
[4] Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Thomsen P D, et al. Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome 12 pl. 2—>

- p1. 5 [J]. Anim Genet, 1993, 24(2): 129–131.
- [5] Larsen N J, Nielsen V H. Apa I and Cfo I polymorphisms in the porcine growth hormone gene [J]. Anim Genet, 1993, 24(1): 71.
- [6] 王玉珏, 岳敏, 顾阳, 等. 西藏小型猪 GH 基因部分序列的 SNP 分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(1): 50–54.
- [7] 杨晓静. 猪骨骼肌生长及肌纤维类型分布的分子机理研究 [D]. 南京, 南京农业大学, 2004.
- [8] Magri K A, Adano M, Leroith D, *et al.* The inhibition of insulin action and glucose metabolism by porcine growth hormone in porcine adipocytes is not the result of any decrease in insulin binding or insulin receptor kinase activity [J]. Biochem J, 1990, 226(1): 107–113.
- [9] 单艳菊, 束婧婷, 徐文娟, 等. 不同鸭种胚胎期和出雏早期生长轴 GH、GHR 和 IGF-I 基因 mRNA 差异表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 421–427.
- [10] 闫云峰, 杨华, 杨永林, 等. 萨福克羊 GH 和 IGF-I 基因组织表达水平的分析 [J]. 家畜生态学报, 2014, 35(4): 18–28.
- [修回日期] 2016–07–12

(下接第 48 页)

- [14] 洗绍祥, 杨忠奇, 秦佳佳, 等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化及黄芪甲苷的协同作用 (英文) [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10): 1861–1865.
- [15] 郑学峰. 5-氮胞苷诱导脐带间充质干细胞分化为心肌细胞表达 cTnI 的研究 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(23): 6264–6265.
- [16] 魏晋, 牟晓宁, 马跃, 等. 一种新的分化心肌细胞筛选策略: 稳定表达 α MHC-Bla ~ r-2A-EGFP-Rex-mCherry-2A-neo 融合基因的人胚胎干细胞系的建立及其向心肌细胞定向分化的鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(3): 276–282.
- [17] Chen XP, Lu SJ, Huang K, *et al.* Effects of Ang perfusion on transmural heterogeneous of Cx43 in acute myocardial ischemia reperfusion [J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(1): 96–99.
- [18] Xu M, Millard RW, Ashraf M. Role of GATA-4 in differentiation and survival of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 111: 217–241.
- [19] Gao XR, Tan YZ, Wang HJ. Overexpression of Csx/Nkx2. 5 and GATA-4 enhances the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation after myocardial infarction [J]. Circ J, 2011, 75(11): 2683–2691.
- [20] 张金平, 王慧娟, 史玉兰, 等. Nkx2-5 基因诱导 P19 细胞分化中心肌标志物的表达 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(12): 2658–2662.
- [21] Peterkin T, Gibson A, Patient R. GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation [J]. EMBO J, 2003, 22(16): 4260–4273.
- [22] Jamali M, Karamboulas C, Rogerson PJ, *et al.* BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis [J]. FEBS Lett, 2001, 509(1): 126–130.
- [修回日期] 2016–05–23



presenilin-1/presenilin-2 双基因敲除小鼠的寿命观察

唐 红¹, 唐晓琴¹, 邓 飞², 李 昕¹, 陈 波³, 唐明希¹, 阮思蓓¹

(1. 西南医科大学附属医院病理科, 四川 泸州 646000; 2. 南方医科大学深圳医院病理科, 广东 深圳 518102;
3. 西南医科大学神经解剖教研室, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察 Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠(dKO mice)的生存曲线,为进一步繁殖及使用该模型对阿尔茨海默病(AD)进行研究提供实验设计等提供参考。**方法** 将 dKO mice 雌性 50 只,雄性 30 只,及野生型同系小鼠雌、雄各 20 只分为 4 组,观察正常喂养情况下 4 组间小鼠 2 年以内各自的生存情况及寿命,绘制生存曲线进行生存分析。**结果** dKO mice 随着时间的延长,雌、雄性生存概率分别低于野生型雌、雄性小鼠,差异均有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.001$; $P < 0.001$, $P < 0.001$);dKO mice 雌、雄性之间的生存概率差异无统计学意义。**结论** 条件性敲除 presenilin-1 与 presenilin-2 双基因可能会缩短小鼠的寿命,其生存概率显著低于野生型小鼠,而 dKO mice 雌、雄性之间的生存概率则无统计学差异。本实验结果可为借助此模型的实验设计应用提供有益参考。

【关键词】 dKO mice;条件性基因敲除;小鼠;寿命

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0006-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.002

Investigation on life span of presenilin-1/presenilin-2 conditional double knockout mice

TANG Hong¹, TANG Xiao-qin¹, DENG Fei², LI Xin¹,
CHEN Bo³, TANG Ming-xi¹, RUAN Si-bei¹

(1. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, Chian;
2. Department of Pathology, the Affiliated Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Guangdong Shenzhen 518102, Chian;
3. Department of Anatomy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To analyze the survival curves of presenilin-1/presenilin-2 conditional double knockout mice (dKO mice), and provide a reference for further breeding of this strain of mice and studying the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Methods** dKO mice (50 females and 30 males) and wild-type controls (20 females and 20 males) were included in this study. The survival of all the mice was observed under the same condition of feeding and nutrition for two years. Life span of each mouse was calculated, survival curves were drawn, and their survival was analyzed. **Results** With the passing of time, the survival probability was decreased in dKO mice. The survival probabilities of female and male dKO mice were significantly worse than that of wild-type controls, respectively ($P < 0.001$, $P < 0.001$; $P < 0.001$, $P < 0.001$). No significant difference was observed between the males and females of dKO mice. **Conclusions** Double knockout presenilin-1 and presenilin-2 genes may shorten the life span of mice, but there is no significant gender difference between the males and females of dKO mice.

【基金项目】 四川省科技厅科技支撑计划(2012SZ0172);四川省教育厅重点项目(16ZA0196);西南医科大学-泸州市科技局联合资助项目(2015LZCYD-S06(6/11));西南医科大学重点项目(2015-YJ002);西南医科大学附属医院科研项目(15056,15087)。

【作者简介】 唐红,女,副教授。E-mail:136810735@qq.com;唐晓琴为共同第一作者。

【通讯作者】 阮思蓓(1988-),女,医师。研究方向:临床及实验病理学。E-mail:294834533@qq.com;唐明希,男,博士,副教授,硕士研究生导师。

【Key words】 dKO mice; Conditional knockout; Mice; Life span

早老素 1 (presenilin-1, PS1) 基因与早老素 2 (presenilin-2, PS2) 基因分别位于 14 号染色体和 1 号染色体上,其基因突变是引发家族型阿尔茨海默病(familial Alzheimer's disease, FAD)的重要原因之一^[1-3]。研究发现,PS1/PS2 双基因敲除小鼠(dKO mice)模型具有年龄依赖性的一系列类似阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的神经退行性病症,如神经元变性、坏死、胶质增生及后期的痴呆行为等^[3-5]。本研究通过观察 dKO mice 的生存曲线,以期对该模型的生存期有更进一步的了解,对实验动物选择、繁殖,以及应用本模型对 AD 研究的实验设计等提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

亲代小鼠(基因型为 *fPS1/fPS1*, *PS2* -/-, *Cre* +/-)由美国 Ya-Ping Tang 教授(Louisiana State University, USA)惠赠,品系为 B6CBAF1,利用 Cre/loxP 系统,即 Cre 的启动子 α 钙调蛋白激酶 II,来驱动 Cre 在整个前脑兴奋性神经元的特异性表达,但 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元并不表达 Cre,因此 PS1 在此神经元里并没被敲除,这种将前脑中的 PS1 基因进行特异性敲除称为条件性敲除,所得杂合子与基因打靶技术将 PS2 基因进行全身性敲除所得杂合子杂交而来^[5]。子代 dKO mice 的繁殖与基因型鉴定如我们报道所述^[6]。动物分组:基因型鉴定合格的实验组 dKO mice 雌性 50 只、雄性 30 只,对照组野生型同系小鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】)雌、雄各 20 只。

1.2 实验环境

实验动物饲养于西南医科大学实验动物中心 SPF 级屏障设施内【SYXK(川)2013-065】,每盒不超过 4 只,温度控制在(18~22)℃,湿度控制在 40%~60%,12 h/12 h 光照周期,全程喂饲成都达

硕实验动物有限公司生产的 SPF 级大小鼠生长繁殖饲料。鼠盒、垫料、饲料及饮水均经过高温高压灭菌处理,每周更换鼠盒及垫料 2 次,保证充足的饲料和饮水,饲养过程严格按照屏障设施 SOP 操作。

1.3 观察方法

dKO mice 和野生型小鼠按性别分笼饲养,生存时间以小鼠的出生时间为观察起点,观察每只小鼠自然衰老的过程及生存到 2 年时的死亡情况,记录出生日期及自然死亡日期,并绘制生存曲线。在规定实验的时间内仍然存活的数据为删失数据。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件处理数据,生存时间以中位生存时间表示,采用非参数估计法 Kaplan-Meier 法(K-M 法)进行生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线的比较

实验期间,雌性野生型小鼠有 4 只由于打架受伤等原因死亡,实验组有 45 只不明确原因死亡。对雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 1)所示。雌性 dKO mice 生存概率随着时间的延长逐渐降低,显著低于雌性野生型小鼠的生存概率($\chi^2 = 33.737$, $P < 0.001$)。两种小鼠的生存曲线如(图 1)所示。

2.2 雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线的比较

实验期间,雄性野生型小鼠有 3 只由于打架受伤等原因死亡。对雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 2)所示。经比较雌性 dKO mice 生存概率低于雄性野生型小鼠的生存概率,两种小鼠的生存时间存在显著差异($\chi^2 = 34.486$, $P < 0.001$)。两种小鼠的生存曲线如(图 2)所示。

表 1 雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠删失情况

Tab. 1 Case processing summary of female dKO mice and female wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♀	50	45	5	10.0%
对照组 ♀	20	4	16	80.0%
总计 Total	70	49	21	30.0%

表 2 雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠删失情况
Tab.2 Case processing summary of female dKO mice and male wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♀	50	45	5	10.0%
对照组 ♂	20	3	17	85.0%
总计 Total	70	48	22	31.4%

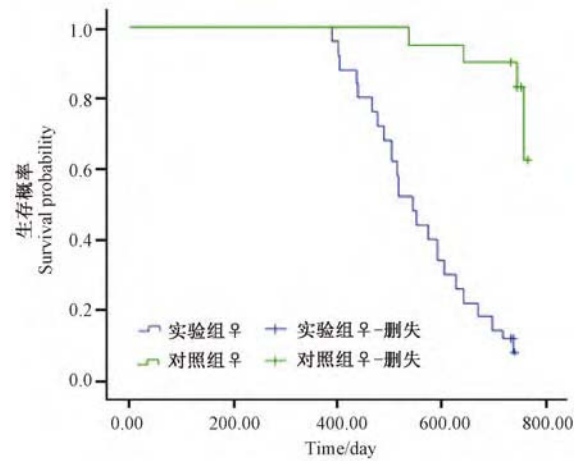


图 1 雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.1 Survival curves of female dKO mice and female wild-type mice

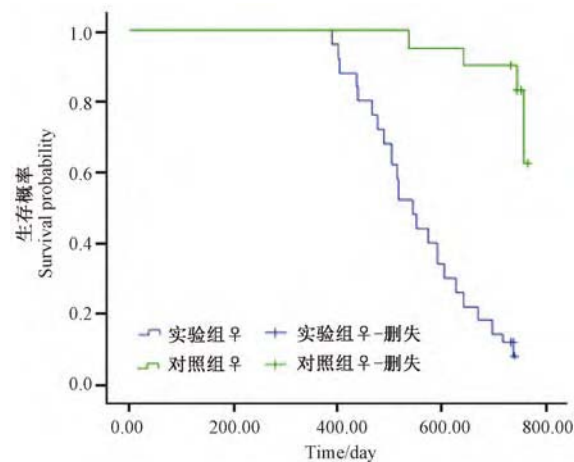


图 2 雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.2 Survival curves of female dKO mice and male wild-type mice

2.3 雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线的比较

实验期间,雄性 dKO mice 有 26 只不明确原因死亡。对雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 3)所示。经比较雄性 dKO mice 生存概率显著低于雌性野生型小鼠的生存概率($\chi^2 = 25.971, P < 0.001$),两种小鼠的生存曲线如(图 3)所示。

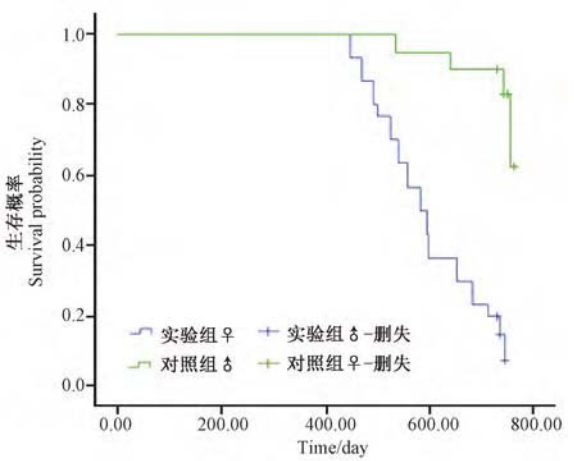


图 3 雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.3 Survival curves of male dKO mice and female wild-type mice

2.4 雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线的比较

对雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 4)所示。经比较雄性 dKO mice 生存概率低于雄性野生型小鼠的生存概率,两种小鼠的生存时间差异具有统计学意义($\chi^2 = 28.278, P < 0.001$)。两种小鼠的生存曲线如(图 4)所示。

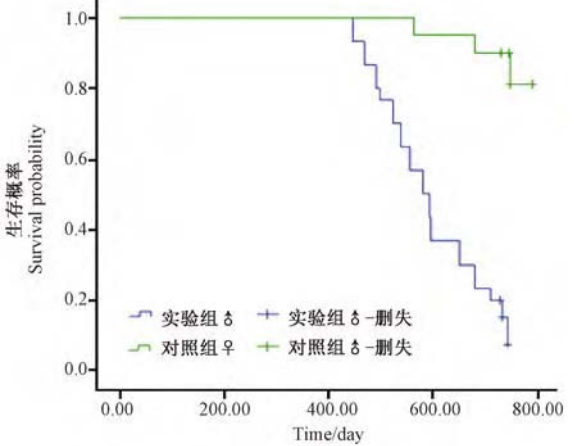


图 4 雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.4 Survival curves of male dKO mice and male wild-type mice

表 3 雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠删失情况
Tab.3 Case processing summary of male dKO mice and female wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♂	30	26	4	13.3%
对照组 ♀	20	4	16	80.0%
总计 Total	50	30	20	40.0%

表 4 雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠删失情况
Tab.4 Case processing summary of male dKO mice and male wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♂	30	26	4	13.3%
对照组 ♂	20	3	17	85.0%
总计 Total	50	29	21	42.0%

表 5 不同性别的 dKO mice 删失情况
Tab.5 Gender difference of case processing summary in the dKO mice

性别 Gender	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
雌性 ♀	50	45	5	10.0%
雄性 ♂	30	26	4	13.3%
总计 Total	80	71	9	11.3%

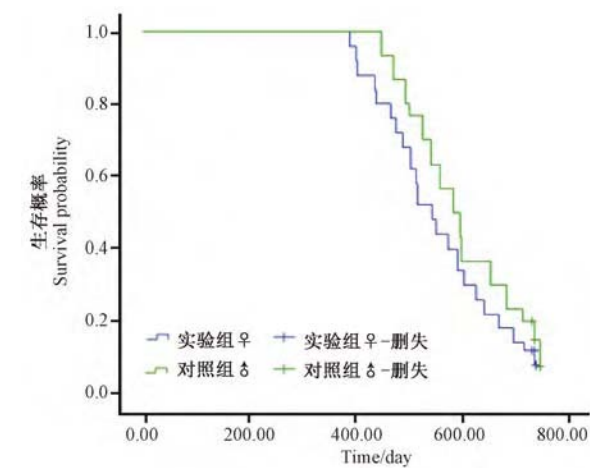


图 5 不同性别 dKO mice 生存曲线比较
Fig.5 Gender difference of survival curves in the dKO mice

2.5 dKO mice 不同性别的生存曲线比较

对不同性别的 dKO mice 生存情况进行比较,删失情况如(表 5)所示。雌性 dKO mice 中位生存时间为 542 d,雄性为 583 d,经比较不同性别之间 dKO mice 的生存曲线无统计学差异($\chi^2 = 1.892, P = 0.169$)。不同性别 dKO mice 的生存曲线如(图 5)所示。

3 讨论

在对 AD 进行研究过程中,由于人脑组织获得

的困难性决定了利用动物模型的重要性,尤其针对像 AD 等与年龄相关的神经退行性病变的研究更为重要。研究表明,敲除 PS1 基因的小鼠将出现严重的发育缺陷以及胚胎致死,而利用 Cre/loxP 系统将前脑中的 PS1 基因进行条件性敲除的小鼠可以存活和繁殖;而敲除 PS2 基因的小鼠仅表现出轻微的肺纤维化^[4-5]。本实验所用的亲代小鼠如 Feng R 等^[5]所述,将前脑中的 PS1 基因进行条件性敲除的小鼠与 PS2 基因敲除的小鼠杂交得到,该动物模型存活情况良好,虽然脑中缺乏 A β 的沉积,但表现出 AD 样神经退行性疾病的其他表型,如学习记忆能力下降、认知功能减退、大脑皮质与海马萎缩、侧脑室和第三脑室的扩大、大量神经元凋亡、以及神经元内 tau 蛋白高度磷酸化等^[3,6]。dKO mice 的成功繁殖与饲养是利用其作为研究 AD 动物模型的基础,对其寿命的了解是顺利进行 AD 研究,尤其对其晚期(≥ 18 月龄)的发病机制研究及药物干预等试验设计具有重要的参考价值。

基因敲除小鼠是把小鼠的一个或几个基因敲除后,培养出用于基础及临床实验的动物模型,从而更全面的模仿、认识以及研究人类疾病。在利用动物模型进行人类疾病研究的同时,对其生存、行为、代谢等研究也不容忽视^[7]。动物的寿命因种别、品系不同而长短不一,敲除不同的基因对小

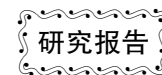
鼠寿命的影响也可能会不同。Su N 等^[8]发现条件性敲除成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 基因会导致小鼠的寿命缩短;Hellekant G 等^[9]通过对钙稳态调节蛋白 1 (CALHM1) 基因研究发现,敲除 CALHM1 基因的小鼠生存时间比野生型小鼠长近 1 年的时间;Kawai H 等^[10]研究发现敲除 GD3 合酶基因对小鼠的发育和寿命都没有影响。敲除双基因对小鼠的寿命也可能会有影响,如 Koval M 等^[11]发现敲除小鼠内皮细胞的连接蛋白 Cx40 和 Cx43 基因会导致小鼠肺自发性功能障碍和纤维化,使其寿命明显缩短。本实验通过观察 dKO mice 和野生型小鼠的生存状况,发现 dKO mice 中位生存时间雌性为 542 d,雄性为 583 d,随着时间的延长,雌、雄性 dKO mice 生存概率逐渐降低,均分别显著低于雌、雄性野生型小鼠的生存概率($P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$),而 dKO mice 不同性别之间的生存曲线无统计学差异。

可见,敲除 presenilin-1/-2 双基因可能会缩短小鼠的寿命,但对其不同性别间的影响无明显差别。此信息有助于我们利用此模型对 AD,尤其是对于大于 18 月龄的 dKO mice (晚期 AD) 动物实验的实验设计等具有重要的参考价值。当然,在自然状态下,雌、雄小鼠共同生活,有两性间的亲密接触、情感交流及相互依赖,还会发生交配、繁殖生育、哺乳等不同情况,而本实验中的 dKO mice 和野生型小鼠均按性别分笼饲养,与自然状态下有所不同,这些都有可能对小鼠,尤其对 dKO mice 的病情及寿命可能会有一定的影响。另外,我们的实验设计数量不是很多,这也有可能对实验结果产生一定影响。因此,在今后的工作中对于 dKO mice 的生存情况有待进一步观察与研究。

参考文献:

- [1] 黄少轩, 姜季宇, 白宏英. 阿尔茨海默病相关基因研究进展 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 04: 82-84.
- [2] Xia D, Watanabe H, Wu B, *et al.* Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease [J]. *Neuron*. 2015, 85(5): 967-981.
- [3] 薛小琳, 王霆, 孟博, 等. Presenilin-1/2 双基因条件性敲除小鼠作为阿尔兹海默病动物模型的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 13: 1530-1537.
- [4] Chen Q, Nakajima A, Choi SH, *et al.* Loss of presenilin function causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration in the mouse [J]. *J Neurosci Res*. 2008, 86(7): 1615-1625.
- [5] Feng R, Wang H, Wang J, *et al.* Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101(21): 8162-8167.
- [6] 张元, 郭庆喜, 刘勇, 等. Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 11: 2052-2054.
- [7] 石宏, 何伟, 王晓宇, 等. TRPV1 和 ASIC3 基因敲除小鼠的寿命观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 10: 78-81+89.
- [8] Su N, Xu X, Li C, *et al.* Generation of Fgfr3 conditional knockout mice [J]. *Int J Biol Sci*. 2010, 6(4): 327-332.
- [9] Hellekant G, Schmolling J, Marambaud P, *et al.* CALHM1 Deletion in Mice Affects Glossopharyngeal Taste Responses, Food Intake, Body Weight, and Life Span [J]. *Chem Senses*. 2015, 40(6): 373-379.
- [10] Kawai H, Allende ML, Wada R, *et al.* Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures [J]. *J Biol Chem*. 2001, 276(10): 6885-6888.
- [11] Koval M, Billaud M, Straub AC, *et al.* Spontaneous lung dysfunction and fibrosis in mice lacking connexin 40 and endothelial cell connexin 43 [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(6): 2536-2546.

[修回日期]2016-07-28



Bcl-2 抑制剂对黄芪注射液减轻缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元凋亡的影响

董雅洁¹, 高维娟², 钱涛³, 卢锴锋¹, 朱炎杰¹, 谢亚芹¹

(1. 承德医学院病理生理学教研室, 河北 承德 067000; 2. 河北中医学院, 石家庄 050200;
3. 河北省人民医院, 石家庄 050051)

【摘要】 目的 探讨黄芪注射液(AI)对 Bcl-2 抑制剂(TW-37)作用下的缺氧缺糖/复氧复糖(H/R)大鼠海马神经元凋亡的影响。**方法** 取原代培养 8 d 的胎鼠海马神经元, 随机分为 6 组: 正常对照组、H/R 组、AI 组、AI 溶剂对照组、Bcl-2 抑制剂(TW-37) + H/R 组、TW-37 + AI + H/R 组。除正常对照组外, 各组均进行缺氧缺糖 0.5 h, 再于复氧复糖后七个时间点(0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h、72 h、120 h)分别进行指标检测。采用 MTT 法检测细胞活性, western blot 法和 RT-PCR 法检测海马神经元 Caspase-3 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与正常对照组比, 除 0 h 外, H/R 组海马神经元活性明显降低($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白及 Caspase-3 mRNA 表达均明显增强($P < 0.05$); 与 H/R 组相比, 除 0 h 外, AI 组海马神经元活性明显增高($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达均明显降低($P < 0.05$); 而 AI 溶剂对照组、TW-37 + H/R 组及 TW-37 + AI + H/R 组则无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 黄芪注射液可通过激活 Bcl-2 抗凋亡机制增强 H/R 大鼠海马神经细胞活性、降低 Caspase-3 表达, Bcl-2 是黄芪注射液抑制 H/R 大鼠海马神经元凋亡的重要靶点之一。

【关键词】 黄芪注射液; Bcl-2 抑制剂; 缺氧缺糖/复氧复糖; 海马神经元; 细胞凋亡; Caspase-3

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0011-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.003

The influence of Bcl-2 inhibitor on the alleviation action of astragalus injection on apoptosis of hippocamal neurons of rats induced by hypoxia /hypoglycemia and reoxygenation

DONG Ya-jie¹, GAO Wei-juan², QIAN Tao³, LU Kai-feng¹,
ZHU Yan-jie¹, XIE Ya-qin¹

(1. Department of Pathophysiology, Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China;

2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

3. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

【Abstract】 Objective To observe the influence of Bcl-2 inhibitor (TW-37) on the alleviation action of astragalus injection (AI) on apoptosis of hippocamal neurons of rats induced by hypoxia /hypoglycemia and reoxygenation (H/R).

【基金项目】 河北省科技支撑计划项目(13272504D); 河北省普通高等学校高层次人才科学研究计划项目(GCC2014031); 河北省教育厅青年基金项目(Q2012002); 承德医学院自然科学研究计划项目(Q201506); 河北省高校重点学科建设项目资助(冀教高[2013]4号病理学与病理生理学)。

【作者简介】 董雅洁(1980-), 女, 硕士生, 研究方向: 脑血管病发病机制及中医药防治。Email: dyj9606@163.com。

【通讯作者】 高维娟(1966-), 女, 教授, 研究方向: 脑血管病发病机制及中医药防治。Email: gwj6088@163.com。

Methods The hippocampal neurons were isolated from fetal rat and cultured for eight days. The cells were randomly divided into six groups: normal control group, H/R group, AI group, AI solution group (sterile deionized water), TW-37 group, TW-37 with AI group. All groups were tested after 0 h, 0.5 h, 2 h, 6 h, 24 h, 72 h and 120 h since they were treated with hypoglycemia and reoxygenation after deprived of oxygen and glucose for 30 min except normal control group. The activity of hippocampal neurons were detected with MTT, The expression level of Caspase-3 was measured by western blotting, the expression of mRNA of Caspase-3 was tested by RT-PCR. **Results** Compared with normal control group, aside from 0 h group, the activity of neurons decreased obviously ($P < 0.05$), moreover, the protein and mRNA expressions of Caspase-3 were enhanced significantly ($P < 0.05$) in H/R groups. Compared with H/R group, the activity of neurons increased obviously in astragalus group ($P < 0.05$), and the expressions of Caspase-3 protein and the expression of Caspase-3 mRNA in the AI groups decreased significantly ($P < 0.05$) besides 0 h group; but there was no significant difference in both AI solution group, TW-37 + H/R and TW-37 + AI + H/R group ($P > 0.05$). **Conclusions** Astragalus injection to increase the neurons activity and decrease the expression level of Caspase-3 in hippocampal neurons of rat by activating the effect of anti-apoptosis of Bcl-2. Bcl-2 is one of the targets exerting the inhibitory action of astragalus injection on apoptosis of hippocampal neurons of rats induced by hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation.

【Key words】 Astragalus injection; Bcl-2 inhibitor; Hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation; Hippocampal neurons of rats; Apoptosis; Caspase-3

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 是临床缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 常见的病理生理过程, 程序性细胞凋亡是神经元发生损害的重要机制。Bcl-2 基因家族是线粒体信号转导通路中重要的调控基因之一, 其中抗凋亡相关基因 Bcl-2 与 CIRI 的发生密切相关^[1-2]。本课题组前期的实验研究证实, “补药之长” 黄芪的精纯制剂黄芪注射液 (astragalus injection, AI) 可抑制原代培养的缺氧缺糖/复氧复糖 (hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation, H/R) 大鼠胎鼠的海马神经元凋亡^[3-4], 并初步推断其抗凋亡作用与上调 Bcl-2 的表达有关^[5]。因此本实验选择特异性 Bcl-2 抑制剂 TW-37, 观察黄芪注射液对 Bcl-2 抑制剂预处理后的缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 表达改变, 明确其发挥脑保护作用的具体靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级新生 24 ~ 48 h SD 乳大鼠, 体重 8 ~ 10 g, 雌雄不限, 购于河北省实验动物中心【SCXK(冀)2013-1003】。动物实验于承德医学院屏障环境动物室进行【SYXK(冀)2013-0026】。

1.1.2 主要试剂 NSE 抗体 (AB53025), 英国 Abcam 公司; GFAP 抗体 (BA0056), 武汉 Boster 公司; Caspase-3 抗体 (SC56050), 美国 santa cruz 公司; Bcl-2 抑制剂 (TW-37), 美国 Selleck 公司; 免疫组化检测试剂盒 (SP9001), 北京 ZSGB-BIO 公司; BCA

蛋白浓度测定试剂盒 (P0012S), 上海 Beyotime 公司; Caspase-3 引物 F: 5'-ACTGGACTGTGGCAT TGAG-3', R: 5'-GAAACAATACATGGAATCTG-3' 和 β -actin 引物 F: 5'-CAT CCTGCGTCTGGACCT-3', R: 5'-TCAGGAGGAGCAATGATC TTG-3', 均由上海 Sangon Biotech 公司合成; RT-PCR 试剂盒 (RR001Q), 大连 Takara Bio 公司; 黄芪注射液 (批号 Z51021776), 成都地奥九泓制药厂。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱 (HERAcell 150i), 德国 Heraeus 公司; 全自动酶标仪 (Multiskan MK-3), 芬兰 Thermo Fisher 公司; 稳压稳流电泳仪 (DYY-6C), 北京 LIUYI 公司; RT-PCR 仪 (PTC-100), 美国 MJ Research 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元的分离与培养 无菌条件下, 取 24 h 新生 SD 大鼠, 浸于冰浴的 75% 乙醇 1 min 消毒, 用显微眼科镊钝性分离并夹取海马组织, 放入冰浴的盛有 D-Hanks 液的培养皿中, 剔除含有血管的软脑膜, 用体积分数为 0.125% 的胰酶的同时充分消化, 15 min 后添加马血清终止消化。根据海马组织量加入适量有血清种植培养液, 充分吹打, 制成细胞悬液, 用 200 目滤网过滤。经胎盘蓝计数后, 接种在经多聚赖氨酸包被的培养皿或培养瓶中, 放入 37℃ 恒温、5% CO₂, 饱和湿度培养箱中常规培养。8 d 后用 H/R 法建立脑缺血再灌注损伤模型。

1.2.2 免疫化学染色法检测海马神经元纯度 取经冷丙酮固定的海马神经元, 采用免疫组化 SP 法

检测神经元特异性烯醇化酶(NSE)及胶质纤维酸性蛋白 A(GFAP)表达,具体操作按照 ZSGB-BIO 免疫组化检测试剂盒说明书进行。分别加入一抗 NSE 多克隆抗体(1:50 稀释),GFAP 多克隆抗体(1:100 稀释)。对免疫组化阳性结果采用 MiVnt 图像分析系统进行半定量分析。阳性细胞计算方法:高倍镜下计算 3 个非连续视野阳性数。

1.2.3 实验分组及体外 H/R 模型的建立 将体外培养 8 d 的大鼠胎鼠海马神经元随机分为 6 组:正常对照组、H/R 组、AI 组、AI 溶剂对照组、TW-37 组、TW-37 + AI 组。除正常对照组外,其余各组用预热的无糖 Earle's 液替代原培养基,并将其置于 37℃、高纯氮气温箱中培养 0.5 h,随后用正常无血清培养液,在饱和湿度培养箱(37℃、5% CO₂)中常规培养^[6]。AI 组于缺氧缺糖前 10 min 加入 AI(终浓度为 0.5 g/L);AI 溶剂对照组换为等量无菌去离子水(pH7.4);TW-37 组加入 TW-37(终浓度为 400 nmol/L);TW-37 + AI 组缺氧缺糖前 15 min 加入 TW-37,5 min 后再加入等量 AI,直至细胞培养结束。各组均于复氧复糖七个不同时间点(0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h、72 h 和 120 h)分别进行海马神经元活性、Caspase-3 蛋白及其 mRNA 的表达的测定。

1.2.4 MTT 法检测海马神经元活性 用有血清培养基稀释后配成细胞悬液,以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板,各组均于复氧复糖后 0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h、72 h、120 h 后,在各孔中加入 10% 孔内培养液量的浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ L,37℃ 恒温孵育 4 h,弃去全部培养液,每孔加 200 μ L DMSO 使结晶迅速溶解,放入酶标仪中震荡 10 min,在 492 nm 处测定 OD 值。

1.2.4 Western blot 法检测海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达 收集裂解的神经细胞的胞质蛋白,具体操作步骤按试剂盒和仪器的说明书执行,并采用 BCA 法进行定量。蛋白上样量为 30 μ g,SDS-PAGE 分离胶体积分数 12%,PVDF 膜转膜,浸入 5% Milk-TBST 封闭液中封闭 2 h,加入兔抗 Caspase-3 单克隆抗体(1:500 稀释),4℃ 振摇过夜后,用 TBST 洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000 稀释),室温孵育 1 h。洗膜后,用化学发光法显影、定影。胶片扫描后,将显影条带输入 Quantity One 凝胶分析系统,进行定量分析。

1.2.5 RT-PCR 法检测海马神经元 Caspase-3 mRNA 表达的 采用 Trizol 一步法抽提神经细胞总

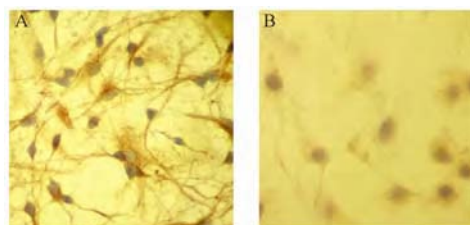
RNA,按 TaKaRa RNA PCR kit(AMV)说明逆转录为 cDNA。按照 PCR amplification kit 说明进行反应,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物,将经紫外透射仪采集的图象输入 Quantity one 凝胶分析系统,进行半定量分析,计算 Caspase-3 条带与 β -actin 条带的灰度比值,作为二者 mRNA 的相对表达水平。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS12.0 进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,Shapiro-Wilk 法检验数据符合正态分布,计量资料组间差异显著性用方差分析法检验,组间两两比较用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 海马神经元纯度

NSE 细胞免疫化学结果显示:体外无血清原代培养 8 d 的海马神经细胞,胞体饱满,成锥体状,边缘有光晕,突起较多,末端彼此相互连接形成复杂的神经网络。光镜下观察发现,NSE 表达阳性细胞为棕黄色,高倍镜下随机选择三个视野中统计阳性神经细胞的比率,计算海马神经细胞纯度为 $(94.69 \pm 0.93) \%$,GFAP 染色则为阴性,证明原代培养的海马神经细胞中胶质细胞较少(图 1)。



注:A:神经元特异性烯醇化酶;B:GFAP 胶质纤维酸性蛋白 A。

图 1 免疫化学染色法检测海马神经元 NSE 蛋白及 GFAP 蛋白的表达($\times 40$)

Note: A:NSE; B:GFAP.

Fig. 1 Expression of NSE in cultured hippocampal neurons and GFAP in cultured neuroglial cell detected by immunohistochemistry ($\times 40$)

2.2 黄芪注射液及 Bcl-2 抑制剂对 H/R 大鼠海马神经细胞活性的影响

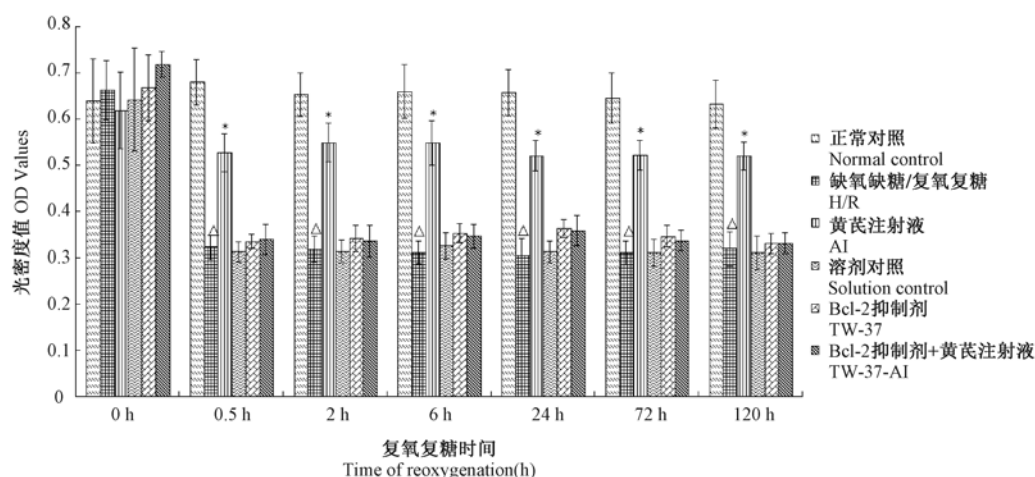
MTT 结果显示:与正常对照组相比,除 0 h 外,H/R 组海马神经元活性均显著降低($P < 0.05$);而与 H/R 组细胞相比,除 0 h 外,AI 组海马神经元活性明显升高($P < 0.05$),而 AI 溶剂对照组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组与之相比则无显著差异($P > 0.05$)(表 1,图 2)。

表 1 MTT 法检测 Bcl-2 抑制剂及黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)**Tab. 1** The effects of Bcl-2 inhibitor and astragalus injection on the activity in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by MTT

分组 Groups	光密度值 OD Values						
	0 h	0.5 h	2 h	6 h	24 h	72 h	120 h
正常对照 Normal control	0.64 ± 0.091	0.680 ± 0.050	0.654 ± 0.047	0.659 ± 0.059	0.657 ± 0.050	0.649 ± 0.055	0.633 ± 0.052
缺氧缺糖/ 复氧复糖 H/R	0.66 ± 0.064	0.323 ± 0.02 [△]	0.319 ± 0.02 [△]	0.311 ± 0.02 [△]	0.306 ± 0.03 [△]	0.311 ± 0.02 [△]	0.319 ± 0.03 [△]
黄芪注射液 AI	0.62 ± 0.083	0.527 ± 0.041 *	0.550 ± 0.043 *	0.549 ± 0.048 *	0.521 ± 0.034 *	0.522 ± 0.032 *	0.520 ± 0.031 *
溶剂对照 solution control	0.64 ± 0.112	0.313 ± 0.021	0.313 ± 0.024	0.326 ± 0.028	0.313 ± 0.023	0.310 ± 0.028	0.310 ± 0.035
Bcl-2 抑制剂 TW-37	0.67 ± 0.071	0.335 ± 0.015	0.341 ± 0.029	0.353 ± 0.021	0.363 ± 0.020	0.346 ± 0.023	0.331 ± 0.022
Bcl-2 抑制剂 + 黄芪注射液 TW-37 + AI	0.72 ± 0.028	0.339 ± 0.032	0.336 ± 0.034	0.346 ± 0.026	0.358 ± 0.034	0.336 ± 0.022	0.330 ± 0.023

注:与正常对照组比, [△] $P < 0.05$;与缺氧缺糖/复氧复糖组比, * $P < 0.05$ 。

Note: [△] $P < 0.05$ vs Normal control group; * $P < 0.05$ vs H/R group.



注:与正常对照组比, [△] $P < 0.05$;与缺氧缺糖/复氧复糖组比, * $P < 0.05$ 。

图 2 MTT 法检测 Bcl-2 抑制剂及黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Note: [△] $P < 0.05$ vs Normal control group; * $P < 0.05$ vs H/R group.

Fig. 2 The effects of Bcl-2 inhibitor and astragalus injection on the activity in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by MTT

2.3 黄芪注射液及 Bcl-2 抑制剂对 H/R 大鼠海马神经元 Caspase-3 蛋白表达的影响

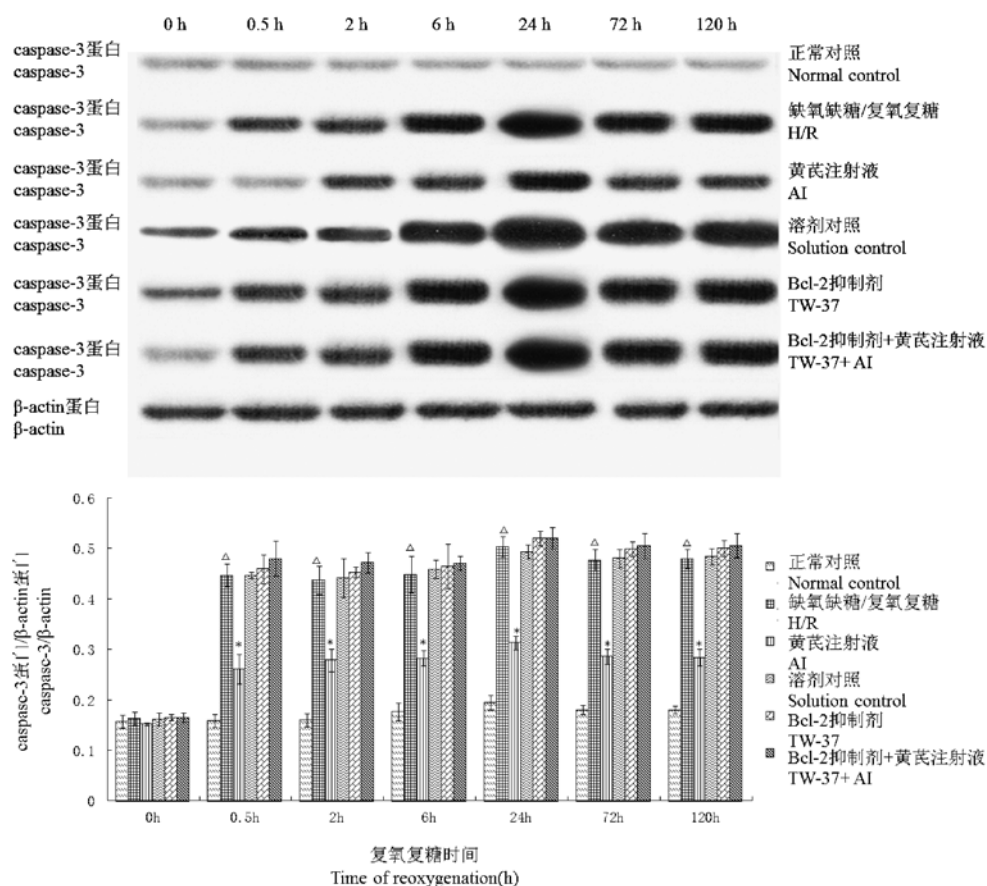
Western blot 结果显示:与正常对照组相比,除 0 h 外,其余各时间点 H/R 组海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达均显著增高 ($P < 0.05$),复氧复糖后 24 h 最高;与 H/R 组比,除 0 h 外,在其余各时间点 AI 组海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.05$),而 AI 溶剂组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达在各点与之相一致,无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 黄芪注射液及 Bcl-2 抑制剂对 H/R 大鼠海马神经元 Caspase-3 的 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示:与正常对照组比,除 0 h 外,其余各时间点 H/R 组海马神经元 Caspase-3 mRNA 的表达均显著增加 ($P < 0.05$),24h 最高;与 H/R 组比,除 0 h 外,在其余各时间点 AI 组 Caspase-3 的 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$),而 AI 溶剂组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组的海马神经元 Caspase-3 的 mRNA 的表达在各点与之无明显差别 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

缺血后再灌注过程中引起的神经元的损伤是造成 ICVD 的发病率、致死率逐年上升的重要病理



注:与正常对照组比, $\Delta P < 0.05$;与缺氧缺血/复氧复糖组比, * $P < 0.05$ 。

图3 Western blot 法检测 Bcl-2 抑制剂和黄芪注射液对缺血缺氧/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Note: $\Delta P < 0.05$ vs Normal control group; * $P < 0.05$ vs H/R group.

Fig. 3 The effect of Bcl-2 inhibitor and astragalus injection on the protein expression of Caspase-3 in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by Western blot

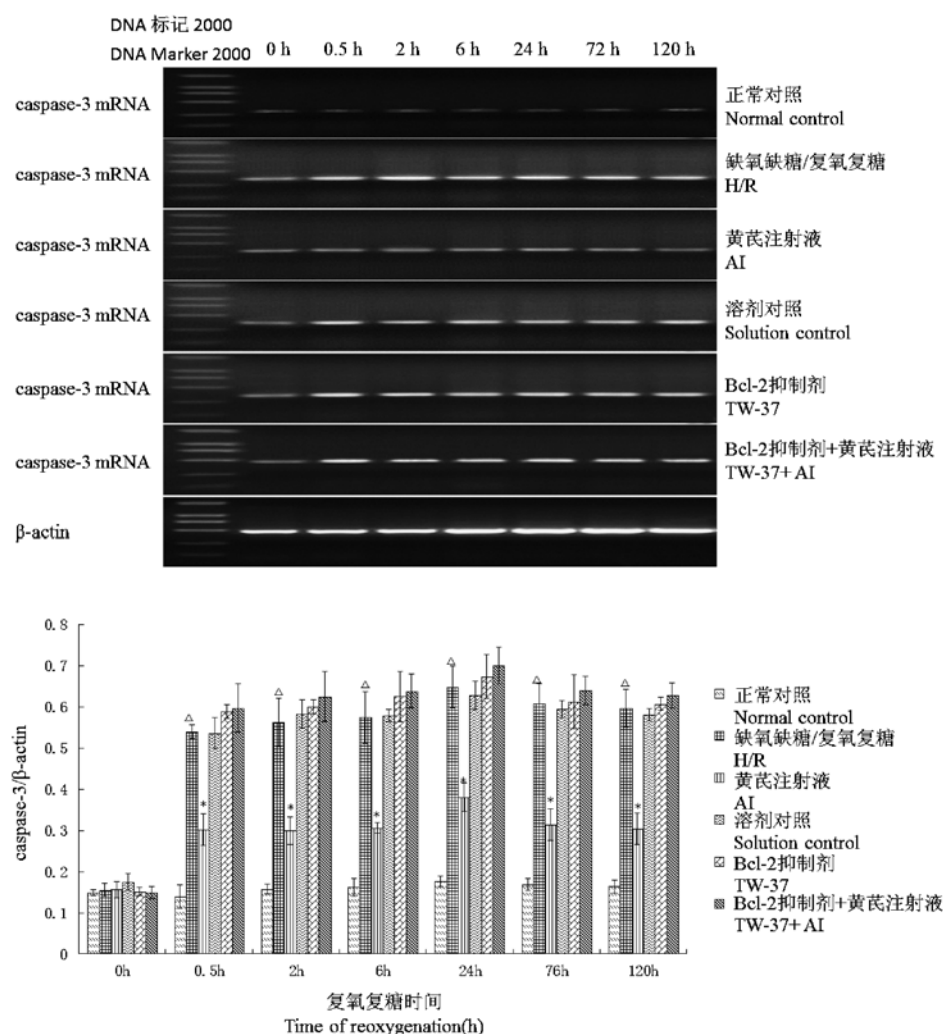
生理机制,而 H/R 是缺血再灌注损伤的一种最常见的表现形式^[7-8]。我们前期的研究表明,H/R 可通过激活 JNK 信号转导通路,上调 C-JUN 氨基末端激酶-3 (JNK3) 的表达,并引发其下游底物 Caspase-3 表达增加,进而诱发神经元凋亡^[4,9]。

Bcl-2 基因家族是 JNK 信号转导通路中重要的调控因素,作为代表的 Bcl-2 和 Bax 二者在功能上相互对立^[10]。定位于线粒体外膜上的 Bcl-2 含有抗凋亡蛋白所特有的结构域 BH4,决定其抗细胞凋亡功能的存在^[11];定位于胞浆中的 Bax 的结构中含有 BH1、BH2 和 BH3 三个结构域,可促进细胞的凋亡,两蛋白间的比例决定是否发生细胞凋亡^[12]。研究发现,当凋亡信号刺激后 Bax 可转位至线粒体膜上, Bax/Bax 同源二聚体形成增多, Bcl-2 抑制作用减弱,利于形成通透性 PT 孔道,释放出细胞色素 C 等促凋亡因子,即刻与凋亡酶激活因子 Apaf-1 及

dATP 结合,形成复合体,从而启动下游的 caspase 级联反应,激活关键效应蛋白酶 Caspase-3,进入凋亡进程^[13-15]。

抑制细胞凋亡是治疗缺血性脑损伤的有效途径之一,中药制剂对 CIRI 神经元凋亡干预作用的研究是目前研究的热点。黄芪注射液是从黄芪中提取的有效成分精制而成,包括多种皂苷、多糖、氨基酸和微量元素等,每毫升注射液中所含有效成分相当于含生药 2 g。大量研究发现,其在扩血管、清除氧自由基,增加微循环灌注、增强免疫功能以及抗血栓等方面具有一定的药理活性,可抑制神经元凋亡的发生,临床应用广泛^[16-17]。

本实验选取对缺血缺氧最为敏感的胎大鼠海马神经元进行体外原代培养,用 H/R 法模拟 CIRI,并用黄芪注射液和 Bcl-2 抑制剂干预海马神经元缺氧缺血/复氧复糖模型。实验结果显示:海马神经



注:与正常对照组比, $\Delta P < 0.05$;与缺氧缺血/复氧复糖组比, $* P < 0.05$ 。

图4 RT-PCR法检测 Bcl-2 抑制剂对缺氧缺血/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Note: $\Delta P < 0.05$ vs Normal control group; $* P < 0.05$ vs H/R group.

Fig. 4 The effect of Bcl-2 inhibitor and Astragalus injection on the mRNA expression of Caspase-3 in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by RT-PCR

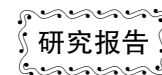
元经缺氧缺血/复氧复糖后,各个时间点的 OD 值明显减低,细胞活性明显下降, Caspase-3 蛋白及 mRNA 的表达均明显增加 ($P < 0.05$), 24 h 最高。这证明海马神经元在 H/R 条件下凋亡信号触发启动, Caspase-3 表达升高,进一步地诱导细胞凋亡,在 24h Caspase-3 的表达达到最高,分析原因可能是先通过下调 Bcl-2 的表达,封闭 Bax 形成孔道的活性减弱,进而活化 Caspase-3,促使细胞凋亡^[18-20]。在以后各时间点 Caspase-3 表达量平稳下降,推测可能是与磷酸化的 Caspase-3 半衰期密切相关^[21]。而与同时点 H/R 组相比, AI 组海马神经元活性显著升高 ($P < 0.05$), 而 Caspase-3 蛋白和 mRNA 的表达

均显著降低 ($P < 0.05$), AI 溶剂对照组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组与之相比却无显著差异 ($P > 0.05$), 则提示 Bcl-2 抑制剂可拮抗黄芪注射液提高 H/R 大鼠海马神经细胞活性、降低 Caspase-3 表达的作用,黄芪注射液是以 Bcl-2 为靶点来抑制 Caspase-3 表达,抑制细胞凋亡。且因为黄芪注射液可使海马神经元 Caspase-3 蛋白表达降低, Caspase-3 mRNA 的表达也相应的下调,说明黄芪注射液是在转录水平抑制 Caspase-3 的表达。因此,推测黄芪注射液是以 Bcl-2 为靶点来抑制 Caspase-3 表达,抑制细胞凋亡,这为缺血性脑血管病的靶向治疗提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Zhao J, Yu S, Zheng W, *et al.* Curcumin improves outcomes and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35 (3):374-379.
- [2] Burguillos MA, Hajji N, Englund E, *et al.* Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus Evidence in Parkinson's disease patients[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 41 (1):177-188.
- [3] 张雅丽,高维娟,闫凤霞,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖后复氧复糖大鼠海马神经细胞凋亡的研究[J]. *中国老年学杂志*,2009,29(7):793-796.
- [4] 闫凤霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 表达的作用[J]. *中国药理学通报*,2011,27(1):85-90.
- [5] 焦俊霞,高维娟,李玉明,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*,2011,27(5):905-910.
- [6] Bossenmeyer C, Chihab R, Muller S, *et al.* Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in cultured rat brain neurons[J]. *Brain Res*, 1998,787(1):107-116.
- [7] Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia[J]. *Folia Neuropathol*, 2011,49(2):78-87.
- [8] Li J, Qu Y, Chen D, *et al.* The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation [J]. *Neuroscience*,2013,252:346-358.
- [9] 叶冬青,高维娟,闫凤霞,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 JNK3 mRNA 的表达[J]. *中国病理生理杂志*,2009,25(9):1756-1761.
- [10] Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,2013,5(2):8719-8722.
- [11] Villeneuve C, Baricault L, Canelle L, *et al.* Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells [J]. *Mol Bio Cell*,2011,22 (7):999-1013.
- [12] Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The role of BH3-Only proteins in tumor cell development ,signaling, and treatment [J]. *Genes Cancer*,2011,2 (5):523-537.
- [13] Liu YQ, Liu YF, Ma XM, *et al.* Hydrogen-rich saline attenuates skin ischemia/reperfusion induced apoptosis via regulating Bax/Bcl-2 ratio and ASK-1/JNK pathway[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*,2015,68(7):147-156.
- [14] Raychaudhuri S, Skommer J, Henty K, *et al.* Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death[J]. *Apoptosis*,2010,15(4):401-411.
- [15] Zhao YX, Cui M, Chen SF, *et al.* Amelioration of ischemic mitochondrial injury and Bax-dependent outer membrane permeabilization by Mdivi-1 [J]. *CNS Neurosci Ther*,2014,20 (6):528-538.
- [16] 郭雪红. 黄芪注射液的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(21):3018-3021.
- [17] 严丽华,邵寅. 黄芪注射液的临床应用进展[J]. *中国药业*, 2013,22(5):126-128.
- [18] 王新高,童萼塘,孙圣刚. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠皮质神经细胞凋亡的影响[J]. *中国比较医学杂志*,2005,15 (6):363-367.
- [19] Scarfo L, Ghia P. Reprogramming cell death: BCL-2 family inhibition in hematological malignancies [J]. *Immunol Lett*, 2013, 155(1-2):36-39.
- [20] 曾兆禄,韩继超,薛云,等. 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国比较医学杂志*,2016, 26(2):62-66.
- [21] 李广明,李军,曹红,等. SB202190 减轻沙土鼠海马 CA1 区脑缺血再灌注损伤的作用与磷酸化 Caspase-3 含量变化的关系[J]. *中国药理学通报*,2005,21(8):1150-1151.

[修回日期]2016-06-28



不同长时的束缚应激致雌雄大鼠的抑郁样行为改变

张北月^{1,2}, 卢 聪¹, 董黎明¹, 徐 攀¹, 何怡然^{1,3}, 石晋丽², 刘新民^{1,3}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

【摘要】 目的 探讨不同束缚时长的慢性束缚应激对雌雄 SD 大鼠抑郁样行为的影响, 为慢性束缚应激模型中实验动物性别和实验时长的选择提供依据。**方法** 对 SD 大鼠(雌雄各半)每天束缚 10 h 和 14 h, 连续束缚 28 d 建立慢性束缚应激模型。采用体重监测、糖水偏爱实验、自主活动实验、新奇事物实验等实验方法, 观察不同束缚时长的慢性束缚应激对雌雄 SD 大鼠所致的抑郁样行为。**结果** 14 h/28 d CRS 组雌雄大鼠的运动时间和中央区活动时间减少、糖水偏爱指数降低、对新奇事物探索潜伏期增多、探索时间和次数减少, 这些实验结果与对照组相比均有显著差异。而 10 h/28 d CRS 组雌雄大鼠与对照组相比以上实验结果仅个别指标有显著性差异。在雌雄鼠比较中, 14 h/28 d CRS 雄性组的糖水偏爱指数显著减少, 对应的雌性大鼠却未显著减少。10 h/28 d CRS 雄性组在中央区运动时间比对照组少、对新事物探索潜伏期明显延长、探索时间缩短, 而对应雌性大鼠无显著性差异。**结论** 14 h/28 d CRS 雌雄鼠在糖水偏爱实验、自主活动实验、新奇事物实验均显著表现出抑郁样行为。而 10 h/28 d CRS 仅雄性组表现出一定的抑郁样行为的趋势。慢性束缚应激更易致雄性大鼠产生抑郁样行为。

【关键词】 慢性束缚应激; 抑郁样行为; 束缚时长; Sprague-Dawley 大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0018-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.004

Depressive-like behavior of male and female rats induced by restraint stress with different restraint duration

ZHANG Bei-yue^{1,2}, LU Cong¹, DONG Li-ming¹, XU Pan¹, HE Yi-ran^{1,3},
SHI Jin-li², LIU Xin-min¹

(1. Institute of medicinal plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of chronic restraint stress on the depressive-like behavior of male and female SD rats with different restraint duration. **Methods** Sprague-Dawley rats (male and female) were subjected to restraint stress 10 h/14 h daily for 28 days. After that, sucrose preference test, open-field test, novel object test, were performed for all the rats to observe the effects of different restraint duration of chronic restraint stress on the depressive-like behaviors in male and female SD rats. **Results** For the 14 h/28 d CRS group, including male and female rats, the movement time and central activity time were reduced, sugar consumption index were decreased, novelty exploration time and frequency were reduced, latency were increased, numbers of nose pokes were reduced, and these results were

【基金项目】 全军医学科技“十二五”科研项目(BWS11J052), 新疆科技厅支疆项目(201491174) 科技部国际科技合作专项(2011DFA32730)。

【作者简介】 张北月(1991-), 女, 硕士生, 研究方向: 神经药理, E-mail: 774156423@qq.com。

【通讯作者】 刘新民(1962-), 男, 博士生导师, 研究方向: 神经药理, E-mail: liuxinmin@hotmail.com。

significantly different compared with the control group. There were individual indicators that showed significantly difference for all the above-mentioned behavioral tests of the 10h/28 d CRS group. 14h/28 d CRS male group in syrup consumption index decreased significantly, the corresponding female rats did not significantly reduce. 10h/28 d CRS male group in the central motion time less than that of the control group, and latency was prolonged and exploration time was shortened, while the corresponding female rats had no significant difference. **Conclusion** 14 h/28 d CRS rats in the sucrose preference test, open-field test, novel object test were exhibited depressive-like behavior, but 10 h/28 d CRS male rats showed a trend of depressive-like behavior. Chronic restraint stress was more likely to lead to depressive-like behavior in male rats.

【Key words】 Chronic restraint stress; Depressive-like behavior; Restraint duration; Sprague-Dawley rats

抑郁症是一种常见的精神疾病,患者常表现出情绪低落、消极、悲观、内疚、注意力不集中、对事物失去兴趣、睡眠和饮食障碍等特点,严重者甚至会产生自杀的想法^[1]。据世界卫生组织报道,1990~2013 年期间,患有抑郁症和/或焦虑的人数上升了近 50%,目前全球约共有 3.5 亿名抑郁症患者。抑郁症是世界各地的首要致残原因,2030 年抑郁症将成为导致全球疾病负担的一个重大因素^[2]。抑郁症具有的高发病率、高复发率、高致残/死亡率等特点,严重威胁着人类的健康。如何利用动物模拟人类抑郁症状,对于研究抑郁症发病机制和抗抑郁药物至关重要。慢性应激在抑郁症发展中起着重要的作用^[3],通过动物对应激的反应建立抑郁动物模型是动物建模的原则之一^[4],本文即通过慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)的方法模拟抑郁样行为,并考察慢性束缚应激模型中不同的束缚时长和不同性别所致大鼠抑郁样行为的差异,以期为 CRS 模型中实验动物的性别和束缚时长的选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器

大鼠行为束缚器(自制)、大鼠自主活动实验实时检测系统(中国航天员中心和中国医学科学院药用植物研究所联合研制)。

1.1.2 实验动物

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠,80 只,雌雄各 40 只,体重:雌性 120~140 g,雄性 140~160 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:【SCXK(京)2012-0001】。动物饲养于中国医学科学院药用植物研究所的屏障环境【SYXK(京)2013-0023】,12 h 照明/12 h 黑暗(照明:8:00~20:00),饲养期间给予动物标准饲料和洁净饮水。本动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

大鼠随机各分为 4 组,每组雌雄大鼠各 10 只,分别为 10 h/28 d C(Control,对照组)、10 h/28 d CRS(chronic restraint stress, CRS,慢性束缚应激组)、14 h/28 d C、14 h/28 d CRS。

1.2.2 慢性束缚应激模型的建立^[5-6]

将 CRS 组大鼠置于聚酯透明材料所制的圆柱形束缚器内进行造模,随时观察动物行为状态。束缚器长度为 10~16 cm(可根据动物体积调节),内径为 6 cm,周身有多个直径为 1 cm 的通气孔。10h/28d CRS 组每天束缚 10 h(8:00~18:00),14 h/28 d CRS 组每天束缚 14 h(8:00~22:00)。束缚应激期间 C 组与 CRS 组均禁食禁水,束缚应激结束后 CRS 组大鼠撤除束缚器,各组都恢复饮食饮水。连续束缚应激 28 d。

1.2.3 体重检测

分别于第 8、15、22、29、36、43、50 d 称量大鼠的体重。

1.2.4 糖水偏爱实验^[7-8]

糖水偏爱实验分为训练期和测试期。训练期使动物适应糖水,测试期进行动物的糖水/纯水消耗实验,用糖水偏爱指数(糖水偏爱指数=糖水消耗/总液体消耗×100%)评价动物对糖水的偏爱程度。在束缚应激前先进行糖水偏爱基线测试,即进行 2 d 的糖水适应,再禁食禁水 1 d 后,检测每只大鼠在 1 h 内的糖水/纯水的消耗量,并计算其糖水偏爱指数。束缚应激 28 d 后,再做一次糖水偏爱实验,比较束缚应激前后大鼠的糖水偏爱指数的差异,以评价 CRS 各组动物的抑郁样行为表现。

1.2.5 自主活动实验^[9-10]

利用大鼠自主活动实验实时检测系统进行实验。自主活动测试箱为黑色不锈钢材料制成的圆柱形桶,测试箱顶部敞开。采用图像采集系统对测试大鼠的行为进行实时监测,再通过计算机系统对

大鼠的自主活动信息进行数据处理。检测时将大鼠面壁放入测试箱内,适应环境 3 min 后进行自主活动检测,检测时长为 10 min,检测时保持环境安静。

1.2.6 新奇事物实验^[11-12]

于自主活动实验次日将大鼠放入自主活动测试箱中测试。测试前在测试箱中央放入一个蓝色的圆柱体新奇事物。实验时将大鼠面向测试箱壁放入,并记录 10 min 内首次探索新奇事物的时间(即潜伏期,10 min 内无探索行为,则潜伏期时间记为 10 min)、探索次数以及探索时间。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件对实验数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用 *t*-test 方法,各組间比较采用单因素方差分析(ANOVA)的方法。

2 实验结果

2.1 慢性束缚应激对于大鼠体重的改变

表 1 慢性束缚应激对大鼠体重的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 The effect of chronic restraint on body weight of male and female rats

组别 Group	雄性 Male				雌性 Female			
	10h/28d C	10h/28d CRS	14h/28d C	14h/28d CRS	10h/28d C	10h/28d CRS	14h/28d C	14h/28d CRS
	10h/28d 对照组	10h/28d 束缚组	14h/28d 对照组	14h/28d 束缚组	10h/28d 对照组	10h/28d 束缚组	14h/28d 对照组	14h/28d 束缚组
第 8 天 Day-8	233 ± 9	220 ± 12	220 ± 8	215 ± 13	158 ± 5	155 ± 8	159 ± 1	158 ± 1
第 15 天 Day-15	264 ± 11	234 ± 14	259 ± 10	227 ± 15 **	200 ± 7	167 ± 9	194 ± 2	171 ± 1 *
第 22 天 Day-22	288 ± 12	244 ± 15	300 ± 15	230 ± 18 **	211 ± 8	187 ± 7	207 ± 2	180 ± 1 **
第 29 天 Day-29	333 ± 14	265 ± 13	321 ± 19	232 ± 20 **	222 ± 8	190 ± 4	215 ± 2	187 ± 1 **
第 36 天 Day-36	357 ± 14	289 ± 14	340 ± 23	229 ± 14 **	231 ± 5	195 ± 12	223 ± 3	168 ± 2 **
第 43 天 Day-43	361 ± 15	301 ± 16	350 ± 26	236 ± 19 **	237 ± 8	200 ± 11	227 ± 3	170 ± 13 **
第 50 天 Day-50	377 ± 17	311 ± 15	367 ± 29	256 ± 24 **	240 ± 4	203 ± 9	230 ± 4	194 ± 3 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 慢性束缚对大鼠糖水偏爱指数的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 The effect of chronic restraint on the sucrose consumption index of male and female rats

组别 Group	糖水偏爱指数 Sucrose consumption index(%)					
	雄性 Male			雌性 Female		
	第 1 天(基线) Day-1 (baseline)	第 29 天 Day-29	差值 Difference	第 1 天(基线) Day-1 (baseline)	第 29 天 Day-29	差值 Difference
10h/28d C 10h/28d 对照组	75.4 ± 16.8	77.4 ± 18.9	3.1 ± 8.4	78.9 ± 4.6	80.2 ± 5.2	5.1 ± 72.4
10h/28d CRS 10h/28d 束缚组	76.7 ± 20.1	75.0 ± 5.1	4.2 ± 4.2	80.1 ± 4.3	76.9 ± 6.8	3.9 ± 6.0
14h/28d C 14h/28d 对照组	77.1 ± 19.3	74.4 ± 20.2	2.3 ± 7.9	86.6 ± 2.4	84.7 ± 1.4	2.1 ± 5.0
14h/28d CRS 14h/28d 束缚组	73.1 ± 11.4	57.9 ± 3.9 ** &&	14.1 ± 5.3 **	81.4 ± 1.4	74.1 ± 2.6 &	9.2 ± 5.4 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与糖水基线比较, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the baseline, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

如表 1 所示,与对照组比较,从第 15 天开始,14 h/28 d CRS 组雌性和雄性大鼠的体重均显著下降($P < 0.01$)。而 10 h/28 d CRS 组雌雄性大鼠与对照组相比,体重无显著性差异。

2.2 慢性束缚应激对大鼠糖水偏爱指数的影响

如表 2 所示,第 1 天糖水基线测试表明 CRS 组雌雄性大鼠各组间的糖水偏爱指数无差异。与糖水基线比较,14 h/28 d CRS 雄性组糖水偏爱指数水平明显下降($P < 0.01$),而对照组无明显差异。与对照组相比,14 h/28 d CRS 雄性组的糖水偏爱指数及差值极显著低于对照组($P < 0.01$)。与糖水基线比较,14 h/28 d CRS 雌性组糖水偏爱指数水平明显下降($P < 0.05$),而对照组无明显差异。与对照组相比,14 h/28 d CRS 组的糖水偏爱指数差值极显著低于对照组($P < 0.01$)。10 h/28 d CRS 组雌雄性大鼠与自身糖水基线及对照组相比,均没有显著性差异。

2.3 慢性束缚应激对大鼠自主活动的影响

如表 3 所示,与对照组相比,14 h/28 d CRS 组雄性大鼠的运动路程、运动时间、中央运动时间均极显著减少(均 $P < 0.01$),静息时间显著增加($P < 0.05$)。同样,与对照组相比,14 h/28 d CRS 组雌性大鼠 CRS 组的运动路程、运动时间、中央运动时间以及外周运动时间均极显著减少(均 $P < 0.01$),静息时间显著增加($P < 0.01$)。10 h/28 d CRS 雄性组大鼠除在中央区运动时间比对照组少($P < 0.05$),其他指标无显著差异。10 h/28 d CRS 雌性组的模型和对照组相比各指标均无显著性差异。

2.4 慢性束缚应激对大鼠新奇事物探索行为的影响

如表 4 所示,14 h/28 d CRS 组的雌雄性大鼠与对照组相比,潜伏期显著升高($P < 0.01$),探索次数、探索时间明显下降($P < 0.01$)。14 h/28 d CRS 雌性组的探索时间明显比对应雄性组长($P < 0.05$),而 14 h/28 d C 雌性对照组的探索时间明显比对应的雄性组短($P < 0.05$)。10 h/28 d CRS 雄性组大鼠的潜伏期显著增长($P < 0.05$),探索时间明显减短($P < 0.05$)。10 h/28 d CRS 雌性组大鼠仅潜伏期显著增长($P < 0.05$),探索次数及探索时间和对照组相比则无明显变化。

表 3 慢性束缚对大鼠自主活动的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 The effect of chronic restraint on behavior of male and female rats in the open-field test

	组别 Group	运动路程 Movement distance (cm)	运动时间 Movement time (s)	静息时间 Resting time (s)	中央运动时间 Central movement time (s)	外周运动时间 Surrounding movement time (s)
雄性 Male	10h/28d C 10h/28d 对照组	5045 ± 558	289 ± 69	288 ± 97	11 ± 3	301 ± 114
	10h/28d CRS 10h/28d 束缚组	4876 ± 887	277 ± 89	269 ± 102	5 ± 7 *	276 ± 59
	14h/28d C 14h/28d 对照组	5658 ± 1302	334 ± 77	265 ± 77	35 ± 19	228 ± 56
	14h/28d CRS 14h/28d 束缚组	4073 ± 1086 **	247 ± 109 *	352 ± 109 *	8 ± 6 **	212 ± 100
	10h/28d C 10h/28d 对照组	5564 ± 343	298 ± 8	265 ± 53	33 ± 7	243 ± 11
	10h/28d CRS 10h/28d 束缚组	5876 ± 322	321 ± 25	288 ± 34	22 ± 6	255 ± 21
雌性 Female	14h/28d C 14h/28d 对照组	6061 ± 199	357 ± 10	242 ± 10	41 ± 5	240 ± 5
	14h/28d CRS 14h/28d 束缚组	4752 ± 205 **	273 ± 14 **	326 ± 14 **	17 ± 4 **	223 ± 5 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 慢性束缚应激对大鼠在新奇事物实验中探索行为的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab.4 The effect of chronic restraint on explore behavior of male and female rats in the novel object test.

组别 Group	雄性 Male				雌性 Female			
	10h/28d C 10h/28d 对照组	10h/28d CRS 10h/28d 束缚组	14h/28d C 14h/28d 对照组	14h/28d CRS 14h/28d 束缚组	10h/28d C 10h/28d 对照组	10h/28d CRS 10h/28d 束缚组	14h/28d C 14h/28d 对照组	14h/28d CRS 14h/28d 束缚组
潜伏期 Latency (s)	79.2 ± 97.1	285.2 ± 71.3 *	52.4 ± 74.6	293.3 ± 199.1 **	78.1 ± 33.2	132.9 ± 56.2 *	91.2 ± 37.3	102.2 ± 88.0 *
探索次数 Number of exploration (n)	11.3 ± 4.0	8.9 ± 3.1	12.3 ± 6.7	1.7 ± 1.7 **	5.5 ± 0.9	6.2 ± 3.1	8.5 ± 1.6	3.6 ± 0.9 **
探索时间 Explore time (s)	21.8 ± 11.1	8.1 ± 4.3 *	65.5 ± 56.3	5 ± 5.2 **	27.1 ± 10.2	20.6 ± 4.3	32.6 ± 7.1 #	16.84 ± 5.6 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与对应雄性组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the corresponding male group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3 讨论

慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)作为一种非损伤性刺激,能有效地引起典型的非特异性应激反应,且与人类身心性疾病的致病过程有相似性^[13-14],是目前应用最广泛的一种抑郁症动物模型^[15],对于抑郁症的病理生理研究具有重要意义。

研究报道,慢性应激抑郁模型会导致动物体重下降^[16-17],本研究中 14 h/28 d CRS 组雌雄大鼠与相应对照组比较体重显著下降,而 10 h/28 d CRS 组大鼠无显著性差异。空场最早由 Hall^[18]设计而用于研究大鼠的情绪反应。一般认为抑郁动物的活动度减少,在陌生的环境里会减少对中央区域的探索。实验中 14 h/28 d CRS 组雌雄大鼠运动路程和时间、中央区活动路程和时间等指标显著减少,表明其对新奇环境好感度降低,表现出抑郁症的特征。10 h/28 d CRS 仅雄性组在中央区运动时间减少。机体奖赏系统的阈值增加,快感缺失为抑郁症的一个主要的症状^[19],糖水偏爱实验则是目前使用最为广泛的一个用于评价快感缺失的动物行为学测试方法^[20],实验中 14 h/28 d CRS 组动物糖水偏爱指数显著降低表明其具有快感缺失的抑郁样行为,而 10 h/28 d CRS 组雌雄大鼠与自身糖水基线及对照组相比均无显著性差异。新奇事物实验是研究动物自发探索行为的一种方法。动物在已熟悉的空场环境中面临新奇事物时,产生既对新事物好奇又对新事物恐怖的矛盾冲突,出现接近-回避的冲突行为^[21]。一般认为,抑郁动物在新奇事物实验中的探索行为减少^[22],实验中 14 h/28 d CRS 组的雌雄性大鼠与对照组相比探索次数、探索时间明显下降,潜伏期时长显著增多,表明动物对新奇环境的探究能力下降,其对事物失去兴趣。10 h/28 d CRS 组仅雄性大鼠的潜伏期明显延长,探索时间缩短。

有文献报道慢性应激刺激更易致雄性大鼠产生抑郁样行为^[23-24],但也有文献认为雌性大鼠对慢性应激更敏感^[25],同时还有文献报道慢性应激对不同性别的大鼠所致的抑郁样行为没有差异^[26-27]。而这些研究结果的矛盾可能是由于实验中采用了不同的动物品系、应激手段和应激强度导致的,还需大量的实验研究以促使应激模型的标准化。在本实验雌雄鼠对比中,发现与对照组相比,14 h/28 d CRS 雄性组的糖水偏爱指数及差值极显著低于对

照组($P < 0.01$),而雌性组仅糖水偏爱指数差值极显著低于对照组($P < 0.01$)。10 h/28 d CRS 雄性组在中央区运动时间比对照组少($P < 0.05$),而对应雌性组各指标均无显著性差异。10 h/28 d CRS 组雄性大鼠的潜伏期显著延长($P < 0.05$),探索时间明显缩短($P < 0.05$),而对应的雌性组大鼠仅潜伏期显著延长($P < 0.05$)。这提示雄鼠可能对 CRS 更为敏感,更易表现出抑郁样行为。

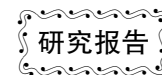
综上,10 h/28 d CRS 组雌雄大鼠与对照组相比,上述各实验的结果仅有少数指标表现出显著性差异,可能是由于束缚强度较弱,所以仅表现出一定的抑郁样行为的趋势。且 10 h/28 d CRS 组雌雄大鼠表现出一定的性别差异,雌性鼠对应激的耐受力更强,CRS 更易致雄性大鼠产生抑郁样行为。而 14 h/28 d CRS 组能显著表现出稳定的抑郁样行为,性别差异对其无影响。因此,采用连续 28 d、每天束缚 14 h 建立的抑郁症动物模型是一种更稳定、更有效的抑郁模型。

参考文献:

- [1] 郭雨欣,邢国刚. 抑郁症的生物学机制研究进展[J]. 中国神经精神病杂志, 2012, 38(1): 57.
- [2] J. P. Lépine, M. Briley, The increasing burden of depression [J]. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2011; 3-7.
- [3] Hill M N, Hellemans K G C, Verma P, *et al.* Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression [J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2012, 36(9): 2085-2117.
- [4] Yan H C, Cao X, Das M, *et al.* Behavioral animal models of depression [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2010, 26(4): 327-337.
- [5] Bowman R E, Ferguson D, Luine V N. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats [J]. *Neuroscience*, 2002, 113(2): 401-410.
- [6] Kim K S, Han P L. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression- like behavioral parameters [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2006, 83(3): 497-507.
- [7] Willner P, Towell A, Sampson D, *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [8] Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, *et al.* Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2012, 39(1): 112-119.

- [9] 王琼,买文丽,李翊华,等. 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散镇静作用验证[J]. 中草药,2009,40(11):1773-1779.
- [10] Chen G, Yang D, Yang Y, *et al.* Amino acid metabolic dysfunction revealed in the prefrontal cortex of a rat model of depression[J]. Behavioural Brain Research, 2015, 278:286-292.
- [11] 薛涛,邬丽莎,刘新民,等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展[J]. 中国实验动物学报,2015,23(03):321-326.
- [12] Bienkowski P, Koros E, Kostowski W. Novelty-seeking behaviour and operant oral ethanol self-administration in Wistar rats. [J]. Alcohol & Alcoholism, 2001, 36(6):525-528.
- [13] 迟强,许鹏,卢山,等. 慢性束缚应激动物模型生物学特性及相关机制研究进展[J]. 临床军医杂志,2013,12:1299-1301.
- [14] 唐已婷,陈家旭. 慢性束缚应激动物模型的研究进展(综述)[J]. 北京中医药大学学报,2002,01:25-28.
- [15] Liu L, Zhou X, Zhang Y, *et al.* The identification of metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the chronic restraint stress rat model of depression[J]. Behavioural brain research, 2016, 305:148-156.
- [16] Ding Q, Li H, Tian X, *et al.* Zinc and imipramine reverse the depression-like behavior in mice induced by chronic restraint stress [J]. Journal of Affective Disorders, 2016, 197:100-106.
- [17] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,等. 甘草苷对抑郁模型大鼠体重及行为学的影响[J]. 中国心理卫生杂志,2006,12:787-790.
- [18] Hall C S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality [J]. Journal of Comparative & Physiological Psychology, 1934, 18(3):385-403.
- [19] 党海霞. 穿梭计算机分析系统的建立和开心散改善抑郁症认知功能研究[D]. 北京:中国医学科学院药用植物研究所,2008.
- [20] Matthews K, Forbes N, Reid I C. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress[J]. Physiology & Behavior, 1995, 57(2):241-248.
- [21] Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, *et al.* Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation [J]. Behavioural Brain Research, 2001, 121(121):11-20.
- [22] Tatyana S, Rainer S, Dusan B, *et al.* Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration[J]. Neuropsychopharmacology Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2004, 29(11):2007-2017.
- [23] 汪丽佳. 涉及单胺递质代谢的抑郁症性差异及其自杀行为研究[D]. 重庆医科大学,2014.
- [24] Kikusui T, Nakamura K, Mori Y. A review of the behavioral and neurochemical consequences of early weaning in rodents [J]. Applied Animal Behaviour Science, 2008, 110(1):73-83.
- [25] 宋茜. mGluRs 在产前应激对子代大鼠抑郁样行为的作用及其调节机制研究[D]. 西北大学,2011.
- [26] 张丽,朱熊兆,白玫,等. 不同应激方式引发的抑郁大鼠行为特征比较[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2012,21(3):212-215.
- [27] 江雪华,张敏,陆大祥,等. 早期剥夺所致大鼠抑郁样行为与海马 BDNF mRNA 表达变化[J]. 心理学报,2010,42(6):695-703.

[修回日期]2016-07-06



丹酚酸 A 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心率变异性和心肌损伤的影响

王木兰¹, 潘永明², 金 敏¹, 徐孝平², 王德军², 马全鑫², 陈民利²

(1. 正大青春宝药业有限公司, 杭州 310023; 2. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察丹酚酸 A (salvianolic acid A, SAA) 对心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MI/RI) 大鼠心率变异性 (HRV) 和心肌损伤的影响。**方法** SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 即伪手术组、MI/RI 模型组、SAA 低、中、高 (0.5 mg/kg, 1 mg/kg 和 2 mg/kg) 剂量组和阳性对照 (2 mg/kg 地尔硫草) 组, 每组 10 只。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支法, 建立 MI/RI 大鼠模型, 分别于结扎前给予相应药物。期间观察并分析心电图 J 点和 HRV 变化, 同时再灌注结束后用伊文思蓝 (evans blue, EB) 和 2,3,5-氯化三苯基四氮唑蓝 (tetrazolium chloride, TTC) 双重染色法测定心肌梗死面积, 并测定血浆谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 及其同工酶 (CK-MB)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和一氧化氮 (NO) 含量。**结果** 与 MI/RI 模型组比, SAA 低、中、高剂量组和地尔硫草组均能显著降低再灌注期大鼠 $\Sigma-J$ 值和 J 点平均值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 减少心肌梗死面积和抑制 AST、CK-MB 和 CK 活性的升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 显著升高 RR 间期的标准差 (SDNN)、相邻 RR 间期差值平方和的均方根 (RMSSD)、HRV 三角函数 (tr. Ind) 和高频 (HFnu), 并降低低频 (LFnu) 和 LF/HF 比值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 还能显著升高 NO 含量和降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。**结论** 丹酚酸可增加 HRV, 减少心肌梗死面积, 其作用机制与丹酚酸 A 的抗氧化作用有关。

【关键词】 丹酚酸 A; 心肌缺血再灌注损伤; 心率变异性; 抗氧化; 大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0024-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.005

Effects of salvianolic acid A on heart rate variability and myocardial injury in myocardial ischemia reperfusion injured rats

WANG Mu-lan¹, PAN Yong-ming², JIN Min¹, XU Xiao-ping²,

WANG De-jun², MA Quan-xin², CHEN Min-li²

(1. Chiatai Qingchun Bao Pharmaceutical Co., Ltd. Hangzhou 310023;

2. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of Salvianolic acid A (SAA) on heart rate variability (HRV) and myocardial injury in myocardial ischemia reperfusion injured (MI/RI) rats. **Methods** Sixty SD rats were divided into 6 groups randomly ($n = 10$); the sham group, the MI/RI model group, high, middle and low-dose SAA group (2 mg/kg, 1 mg/kg and 0.5 mg/kg) and positive control group (2 mg/kg Diltiazem). The MI/RI model was made by ligating the left anterior descending branch of coronary artery in rats. Before ligation, the rats were intravenously administered with

[基金项目] 浙江省中医药管理局重点项目 (2015ZZ009); 浙江中医药大学比较医学创新团队 (XTD201301)。

[作者简介] 王木兰 (1983-), 女, 工程师, 研究方向: 中药药理。E-mail: qcbwml@163.com。

[通讯作者] 陈民利 (1963-), 女, 教授, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: cml1991@aliyun.com。

corresponding drugs. The changes of electrocardiogram of J point and HRV parameters were analyzed. At the end of reperfusion, the myocardial infarct size was measured by using Evans blue and tetrazolium chloride (TTC) double staining. The changes of plasma aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and its isoenzyme (CK-MB), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) content were also detected. **Results** Compared with MI/RI model group, SAA low, middle and high dose group and Diltiazem group were significantly reduced the total or average value of J point during reperfusion ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced myocardial infarct size and inhibited the rising of AST, CK-MB and CK activities ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased the standard deviation of RR intervals (SDNN), the root-mean-square of successive differences (RMSSD), HRV triangle index (tr. Ind) and high frequency (HFnu), reduced the low frequency (LFnu) and the ratio of LF/HF ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Moreover, SAA could significantly increase the content of NO and reduce the content of MDA ($P < 0.05$). **Conclusion** SAA could increase HRV and reduce myocardial infarction area in MI/RI rats, its mechanism of action maybe related with antioxidant effects.

【Key words】 Salvianolic acid A; Myocardial ischemia reperfusion injury; Heart rate variability; Anti-oxidation; Rats

缺血性心脏病是导致死亡和致残的主要原因,常与急性冠脉栓塞有关。临床上主要以溶栓或经皮冠脉介入治疗为主,但随后再灌注诱发的心脏功能障碍包括心肌顿抑、心律失常和细胞凋亡,常被称为心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MI/RI)^[1]。研究发现心脏植物神经功能失衡与心源性猝死发生密切相关,而心率变异性 (heart rate variability, HRV) 作为预测心血管事件和心源性猝死发生的一种无创性指标已被临床所证实^[2],能客观反映交感神经和迷走神经活性变化及其均衡性。丹酚酸 A (salvianolic acid A, SAA) 是丹参一种水溶性酚酸类化合物,具有显著的抗氧化、抗血栓、抗肝纤维化、抗心肌缺血和神经保护作用^[3]。已有研究表明,丹酚酸 A 对心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用^[4-5]。但丹酚酸 A 对 MI/RI 模型大鼠心电图和心率变异性的影响还尚未见报道。为此,本研究基于心电图观测和 HRV 分析技术,探讨丹酚酸 A 对 MI/RI 大鼠 HRV 和心肌损伤的影响,为丹酚酸 A 改善心脏植物性神经调控提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 300 ~ 350 g, 上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK (沪) 2012 - 0002】; 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障系统【SYXK (浙) 2013 - 0184】; 室温为 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 50% ~ 70%, 饲喂全价营养颗粒饲料, 自由饮水。

1.2 主要仪器及药物试剂

丹酚酸 A (SAA), 黄色冻干粉, 由正大青春宝药业有限公司提供; 注射用盐酸地尔硫草 (Diltiazem), 天津田边制药有限公司; 戊巴比妥钠, 上海西唐科技有限公司; 伊文思蓝 (Evans blue), 国药集团化学试剂有限公司; 红四氮唑 (TTC), 中国华东师范大学化工厂; 谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 试剂盒均由上海申能德赛诊断技术有限公司生产; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 试剂盒均由南京建成生物工程研究所生产。LC-V9 动物呼吸机, 上海奥尔科特生物科技有限公司; EMKA 无创生理信号遥测处理系统, 法国 EMKA 公司; 7020 全自动生化仪, 日本日立公司; DU-800 紫外/可见分光光度计, 美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 分组

60 只大鼠随机分为伪手术 (sham) 组, 心肌缺血再灌注损伤 (MI/RI) 模型组, SAA 高、中、低 (2、1、0.5 mg/kg) 剂量组, 阳性对照 (2 mg/kg Diltiazem) 组; 每组 10 只。

1.4 方法

1.4.1 大鼠 MI/RI 模型的制备

术前禁食 12 h, 以 3% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉 (1.5 mL/kg) 大鼠, 仰卧位固定于手术台, 用针形电极刺入四肢皮下, 无创生理信号遥测处理系统记录大鼠 II 导联心电图, 气管插管, 接 ALC-V9 呼吸机通气 (频率为 60 次/min, 呼吸比率为 2:1, 潮气量为 30 mL/kg)。于胸骨左侧第四肋间切口, 开胸暴露心脏, 在左心耳与肺动脉圆锥之间的左冠状动脉 (LAD) 起始下方 2 ~ 3 mm 处, 用 6-0 医用无损伤带线缝合针于左心耳下方进针, 将缝合线穿于自

制的冠脉阻断塑料管。然后分别尾静脉注射给予相应药物,MI/RI 模型组和伪手术组给予等体积 5% 葡萄糖氯化钠注射液,给药容量为 5 mL/kg。除伪手术组缝合线空置、不拉紧缝合线外,其它组给药 10 min 后拉紧缝合线,以塑料管球端压迫结扎 LAD 30 min 后,放松结扎线,再灌注 2 h。以左室前壁紫绀和同步心电图 II 导联 J 点(QRS 波群与 T 波交点)增高为结扎成功标志,以左室前壁由紫绀逐渐红润和 J 点降低 1/2 为再灌注成功标志。

1.4.2 心电图检测和 HRV 分析

用 EMKA 无创生理信号遥测处理系统,监测和记录各组大鼠 II 导联心电图,采样频率为 1 000 Hz。然后用 ECG-AUTO V3.2.0.2 分析软件,进行模块化分析大鼠在结扎前、缺血期、再灌注 5~120 min 时的心电图 J 点变化,计算在再灌注期 J 点总和($\Sigma - J$)、J 点平均值(Average of J point)、J 点的最低值(minimum of J point)和最大值(maximum of J point)。同时自动分析连续 RR 间期(RRI),并手工剔除异常的 RRI 后,行 HRV 分析,时域指标包括 RR 间期的标准差(SDNN),相邻 RR 间期差值平方和的均方根(RMSSD),HRV 三角指数(tr. Ind);按文献^[6]行 Hamming 快速分析 RR 间期功率谱,获取极低频波谱 VLF(0.003~0.04 Hz)、低频波谱 LF(0.04~1 Hz)、高频波谱 HF(1~3 Hz)和总功率(TP),并对 LF 和 HF 进行标准化,计算 $[LF_{nu} \text{ 或 } HF_{nu} = LF \text{ 或 } HF / (TP - VLF) \times 100]$ 和平衡指数 LF/HF。

1.4.3 生化指标测定

大鼠心肌缺血再灌注损伤 2 h 后,取腹主动脉肝素抗凝血,在 7020 生化分析仪上测定血浆 AST、LDH、CK 和 CK-MB 活性,并在 DU-800 紫外/可见分光光度计上测定血浆 SOD、MDA 和 NO 水平,所有检测均按试剂盒说明书进行。

1.4.4 伊文思蓝和 TTC 双重染色测定心肌梗死面积

按文献方法^[7],从大鼠右心室注射 5% 伊文思蓝 1 mL;2 min 后待大鼠巩膜蓝染后,立即从右心室注射 10% 氯化钾溶液使心脏停跳,迅速取出心脏,置入 2% 的琼脂糖 PBS 缓冲液 2 min 后,剔除右心室和心耳等组织,放入 -20℃ 冰箱中冷冻 20 min 后,将心肌每隔 2 mm 横断切成 5 片,置入 1% TTC 溶液中,37℃ 孵育 15 min。伊文思蓝染色区为非缺血区,TTC 染色区为红色的,表明缺血仍存活组织为危

险区(AAR),非 TTC 染色区为灰白色,表明为梗死区(IS),行数码拍照后,用 Image-J 图像分析软件进行面积分析,并计算梗死区(IS)占危险区(AAR)的百分比。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计,计量资料采用 $\bar{x} \pm SEM$ 表示,多组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,组间比较用 L-S-D 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 SAA 对 MI/RI 大鼠心电图 J 点的影响

与伪手术组比,MI/RI 模型大鼠心电图 J 点冠脉结扎后明显抬高($P < 0.01$),再灌注后 J 点有所降低,但各时间点仍显著高于伪手术组($P < 0.01$),同时再灌注期 $\Sigma - J$ 值和 J 点平均值均显著高于伪手术组($P < 0.01$)。与 MI/RI 模型组比,高、中、低剂量的 SAA 组和地尔硫草组大鼠再灌注期心电图 J 点曲线均低于 MI/RI 模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。地尔硫草组和 2 mg/kg SAA 组均能显著降低再灌注期大鼠 J 点最低值、 $\Sigma - J$ 值和 J 点平均值($P < 0.05$, $P < 0.01$);且 0.5 mg/kg 和 1 mg/kg SAA 组亦能显著降低再灌注期大鼠 $\Sigma - J$ 值和 J 点平均值($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 SAA 对 MI/RI 大鼠心肌梗死的影响

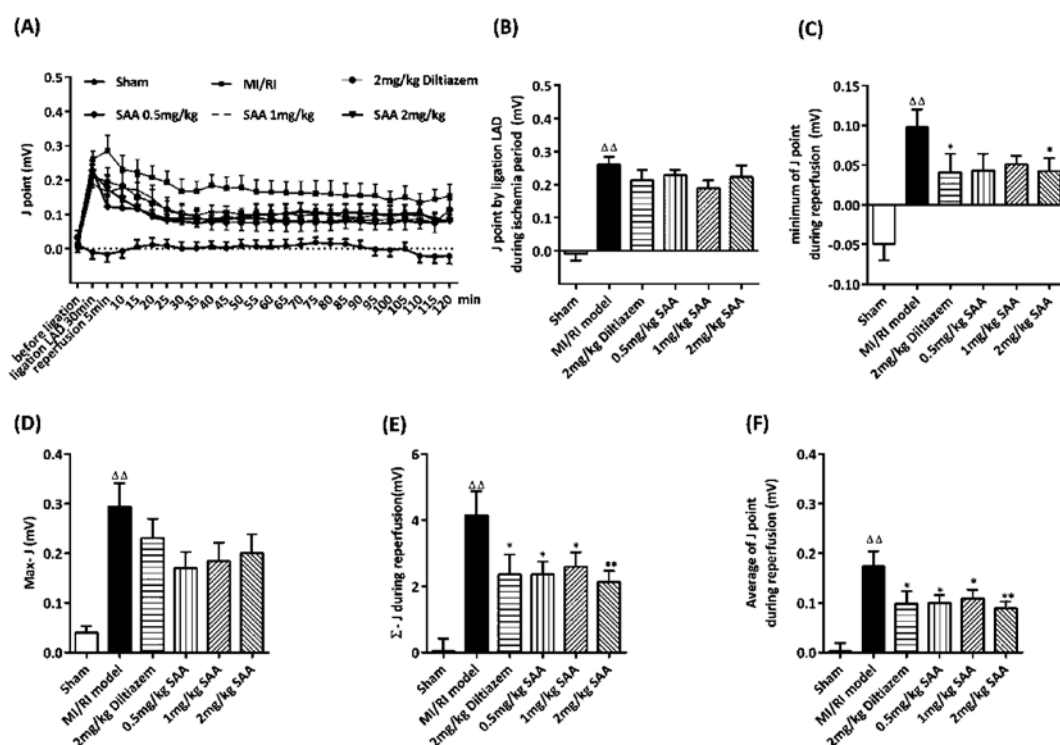
与伪手术组比,MI/RI 模型组大鼠 IS/AAR 显著升高($P < 0.01$);与 MI/RI 模型组比,1 mg/kg 和 2 mg/kg SAA 组和地尔硫草组 IS/AAR 均降低显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)(图 2)。

2.3 SAA 对 MI/RI 大鼠血浆心肌酶的影响

与伪手术组比,MI/RI 模型大鼠血浆 AST、LDH、CK-MB 和 CK 活性均显著升高($P < 0.01$);与 MI/RI 模型组比,0.5 mg/kg SAA 组血浆 CK 活性显著降低($P < 0.05$),1 mg/kg SAA 组亦能显著降低血浆 CK-MB 和 CK 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),2 mg/kg SAA 组和地尔硫草组亦能显著降低血浆 AST、CK-MB 和 CK 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$)(图 3)。

2.4 SAA 对 MI/RI 大鼠 HRV 的影响

与伪手术组比,MI/RI 模型大鼠 SDNN、RMSSD、tr. Ind、TP 和 HFnu 均出现明显降低($P < 0.05$),同时 LFnu 和 LF/HF 比值显著升高($P < 0.05$)。与 MI/RI 模型组比,地尔硫草组能显著升高 SDNN、RMSSD 和 HFnu($P < 0.05$),并能降低

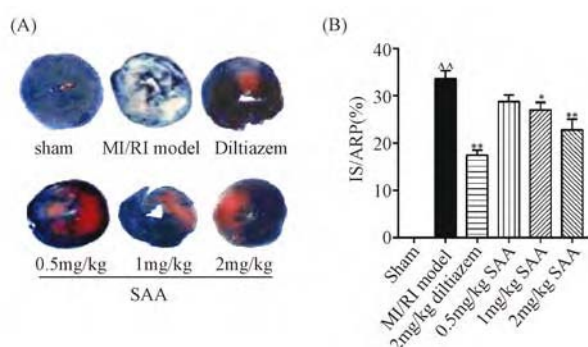


注:不同时间点 J 点(A),缺血期 J 点(B),再灌注期 J 点最低值(C)和 J 点最大值(D),再灌注期总 J 点(E)和 J 点平均值(F);与伪手术组比, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 MI/RI 模型组比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$ 。

图 1 SAA 对 MI/RI 大鼠心电图 J 点的影响

Note: J point at different time (A), J point during ischemia period (B), minimum of J point (C) and maximum of J point (D) during reperfusion, Σ -J point (E) and average of J point (F) during reperfusion. $\Delta\Delta P < 0.01$ vs sham group; $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ vs MI/RI model. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$.

Fig. 1 Effects of SAA on J point of electrocardiogram in myocardial ischemia-reperfusion injured rats



注:心肌伊文思蓝和 TTC 双重染色结果(A)和 IS/ARR(B);与伪手术组比, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 MI/RI 模型组比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$ 。

图 2 SAA 对 MI/RI 大鼠心肌梗死的影响

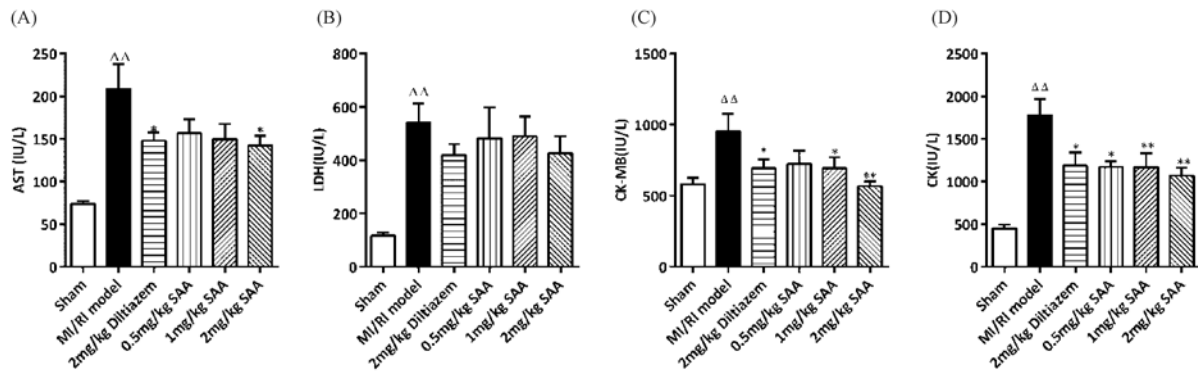
Note: The results of myocardial Evans blue and TTC double staining (A) and IS/ARR (B). $\Delta\Delta P < 0.01$ vs sham group; $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ vs MI/RI model. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$.

Fig. 2 Effects of SAA on myocardial ischemia in myocardial ischemia reperfusion injured rats

LFnu 和 LF/HF 比值 ($P < 0.05$);而 0.5 mg/kg、1 mg/kg 和 2 mg/kg SAA 组均能显著升高 SDNN 和 HFnu ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并能降低 LFnu 和 LF/HF 比值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);1 mg/kg SAA 组亦能显著升高 tr. Ind ($P < 0.05$),同时 2 mg/kg SAA 组还能显著升高 RMSSD 和 tr. Ind ($P < 0.05$, $P < 0.01$),但各给药组 RR 间期和 TP 均有升高趋势,但差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.5 SAA 对 MI/RI 大鼠 SOD、MDA 和 NO 含量的影响

与伪手术组,MI/RI 模型大鼠血浆 SOD 活性和 NO 含量均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$);与 MI/RI 模型组比,1 mg/kg SAA 组 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$),2 mg/kg SAA 组和地尔硫草组均能显著升高血浆 NO 含量和降低 MDA 含量 ($P < 0.05$) (图 5)。



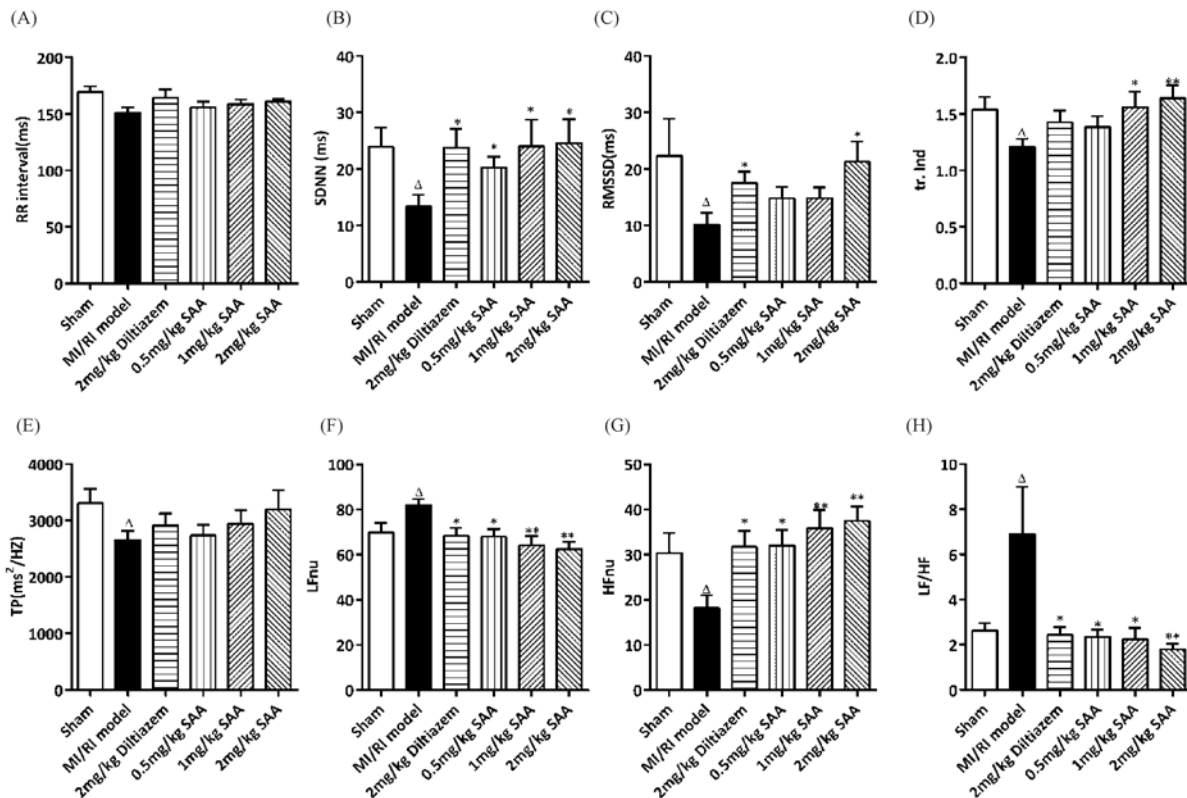
注:AST(A),LDH(B),CK-MB(C)和CK(D);与伪手术组比,^{△△} $P < 0.01$;与MI/RI模型组比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$ 。

图3 SAA对MI/RI大鼠血浆心肌酶的影响

Note: AST (A), LDH (B), CK-MB (C) and CK (D). ^{△△} $P < 0.01$ vs sham group;

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs MI/RI model. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$.

Fig. 3 Effects of SAA on serum myocardial enzyme indexes in myocardial ischemia reperfusion injured rats



注:RR 间期(A),SDNN(B),RMSSD(C),tr. Ind(D),TP(E),LFnu(F),HFnu(G)和LF/HF(H);

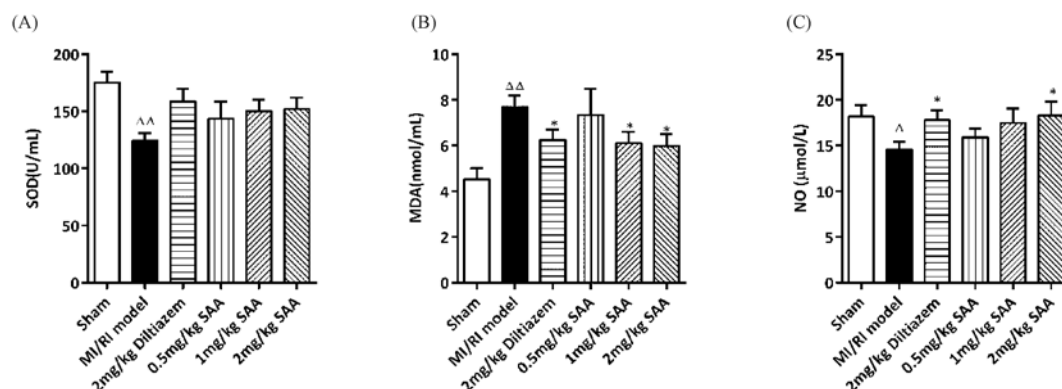
与伪手术组比,^{△△} $P < 0.01$;与MI/RI模型组比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$ 。

图4 SAA对MI/RI大鼠HRV的影响

Note: RR interval (A), SDNN (B), RMSSD (C), tr. Ind (D), TP (E), LFnu (F), HFnu (G) and LF/HF (H). ^{△△} $P < 0.01$ vs

sham group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs MI/RI model. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$.

Fig. 4 Effect of SAA on HRV in myocardial ischemia reperfusion injured rats



注: SOD (A), MDA (B) 和 NO (C); 与伪手术组比, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 MI/RI 模型组比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$ 。

图 5 SAA 对 MI/RI 大鼠 SOD、MDA 和 NO 水平的影响

Note: SOD (A), MDA (B) and NO (C). $\Delta\Delta P < 0.01$ vs sham group; $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ vs MI/RI model. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 10$.

Fig. 5 Effect of SAA on SOD, MDA and NO levels in myocardial ischemia reperfusion injured rats

3 讨论

众所周知,心电图在急性心肌缺血和心肌梗死诊断中具有特征性改变规律,具有特异性强、敏感性高、无创便捷和可重复性好等优点,故在临床诊断中具有不可或缺的重要地位。动物实验中心电图也常用于判断心肌缺血性疾病模型是否成功的观察指标之一。但因大鼠心电图 ST 段较短,几乎与 T 波融合在一起,一般以 J 点变化作为观察 ST 段抬高的程度^[8]。本研究发现,MI/RI 过程中大鼠缺血期心电图 QRS 波群振幅增高, J 点抬高和出现 T 波高耸,甚至出现与 R 波融合;但在再灌注期 J 点逐渐下降, T 波也逐渐恢复,并出现梗死性 Q 波,这与张旭东等报道一致^[8]。但再灌注期心电图 J 点的电位仍显著高于正常水平,表明再灌注过程中对心肌造成了一定程度的损伤。给予丹酚酸 A 和地尔硫草后均能降低再灌注期大鼠心电图 J 点、J 点最低值、 $\Sigma - J$ 和 J 点平均值,表明丹酚酸 A 能对抗 MI/RI 所致心电图 J 点的异常改变,丹酚酸 A 对心肌动作电位和兴奋性的改善具有一定的作用。

心肌缺血再灌注损伤可引起心肌细胞膜受损、细胞变性或坏死,使得细胞膜通透性增高,导致心肌细胞内的 AST、LDH、CK 等酶漏出并释放入血,故心肌受损程度与 CK、LDH 等酶呈正相关^[9]。另外,再灌注损伤时,由于大量的氧自由基产生和细胞膜脂质过氧化反应增强,进而影响心肌细胞膜的流动性,同时血管内皮细胞受损又可引起内源性 NO 合成减少,导致血中 SOD 活性和 NO 水平的下降, MDA 含量的升高,这些可能是导致心肌缺血损伤的

原因之一^[10]。本研究结果显示,丹酚酸 A 能明显抑制心肌缺血再灌注损伤所致血浆 AST、LDH、CK 和 CK-MB 活性的升高,并能明显提高血浆 NO 含量,降低血浆 MDA 含量,从而抑制心肌脂质过氧化,保护血管内皮和保护心肌的作用,这与减少心肌梗死面积的结果较为一致。

大量的研究表明,交感神经活性的增强和/或迷走神经活性的减弱,均会使 HRV 值降低,HRV 是预测心血管事件发生的重要指标。HRV 参数中 SDNN 可反映交感和迷走神经张力的变化,与 HRV 三角指数 tr. Ind 一样均可反映总的 HRV 变化; RMSSD 反映迷走神经张力,并与心率快速变化有关。频域分析中 HF 与迷走神经活性有关, LF 与交感神经活性有关,也有学者认为 LF 受交感神经和迷走神经的共同活动。TP 反映 HRV 的总和; LF/HF 比值反映了交感神经和迷走神经系统的均衡性^[2]。另外,氧化应激可加剧脂质过氧化反应,促进儿茶酚胺的释放,激活 NF- κ B/促炎因子通路,导致内皮细胞和神经元细胞坏死或凋亡等,使得心血管系统交感-副交感神经系统失衡,甚至可引起心肌梗死或心肌缺血。同时,心肌缺血又可进一步激发交感神经系统的兴奋性,导致血浆和心脏中儿茶酚胺持续增高,最终导致 HRV 降低,大大增加了心肌梗死、心脏性猝死的发生率^[11-12]。此外,临床显示冠心病病人存在低 HRV 和自主神经功能失调;而 HRV 的降低与心肌缺血缺氧对化学感受器、心室壁机械的刺激引发心脏自主神经调节失衡^[13]。同样本研究发现 MI/RI 模型大鼠 SDNN、tr. Ind、TP、RMSSD 和 HFnu 均降低显著, LFnu 和 LF/HF 比值

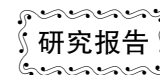
均明显升高,提示 MI/RI 模型大鼠出现明显 HRV 降低,主要表现在交感神经活性相对亢奋,迷走神经活性则显著抑制,这可能与氧化应激导致心脏植物神经系统失衡,促发心肌缺血有关。相反,丹酚酸具有较强的抗氧化和抑制 NF- κ B/促炎因子通路的激活^[14],给予丹酚酸 A 后能明显提高 SDNN、tr. Ind、RMSSD、HFnu,降低 LFnu 和 LF/HF 比值,并减慢心率,表明丹酚酸 A 通过抗氧化作用,抑制自由基产生和炎性因子释放,保护内皮细胞,同时扩张冠脉血管和降低心肌耗氧,提高迷走神经活性,从而改善心脏自主神经调控,减少心律失常的发生,这也可能是丹酚酸 A 抗心律失常发生的作用途径之一^[15]。

由此可见,丹酚酸可增加 MI/RI 大鼠的 HRV,减少心肌梗死面积,其作用机制与丹酚酸 A 的抗氧化作用有关。

参考文献:

- [1] Tang Y, Li S, Zhang P, *et al.* Soy Isoflavone protects myocardial ischemia/reperfusion injury through increasing endothelial nitric oxide synthase and decreasing oxidative stress in ovariectomized rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:5057405.
- [2] Zhang J, He S, Wang X, *et al.* Effect of trimetazidine on heart rate variability in elderly patients with acute coronary syndrome [J]. *Pak J Med Sci*, 2016, 32(1):75-78.
- [3] 张莉,张维库,赵莹,等. 丹酚酸 A 的研究与进展[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(9):2603-2609.
- [4] Xu T, Wu X, Chen Q, *et al.* The anti-apoptotic and cardioprotective effects of salvianolic acid a on rat cardiomyocytes following ischemia/reperfusion by DUSP-mediated regulation of the ERK1/2/JNK pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e102292.
- [5] Fan H, Yang L, Fu F, *et al.* Cardioprotective effects of salvianolic Acid a on myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo and in vitro [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012:508938.
- [6] 潘永明,刘瑞敏,吴蔚,等. 心率变异性分析评估不同因素致亚健康大鼠自主神经功能的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2012, 32(6):467-472.
- [7] 杨涛涛,肖颖,奚赛飞,等. 大鼠心肌梗死模型构建和评价方法的改良[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(2):46-51.
- [8] 张旭东,蒋伟哲,焦杨,等. 玉郎伞黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国新药与临床杂志*. 2008, 27(6):412-415.
- [9] Quan W, Yin Y, Xi M, *et al.* Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(1):85-91.
- [10] 邵莹,吴启南,周婧,等. 淡竹叶黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2):241-247.
- [11] 吴茂红,吕玲. 糖耐量异常对冠心病患者氧化应激和血管内皮功能、心率变异性的影响及阿卡波糖的干预作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(3):287-292.
- [12] 王燕琴,初而复,李欣,等. 注射用苦参碱对阿霉素致大鼠心脏重构的影响[J]. *药物评价研究*, 2016, 39(2):193-197.
- [13] 刘三运,王建明,朱志扬,等. 通痹舒心颗粒对 ACS 伴焦虑抑郁病人 hs-CRP、NT-proBNP 及心率变异性的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(2):124-128.
- [14] Huang J, Qin Y, Liu B, *et al.* In silico analysis and experimental validation of molecular mechanisms of salvianolic acid A-inhibited LPS-stimulated inflammation, in RAW264.7 macrophages [J]. *Cell Prolif*. 2013, 46(5):595-605.
- [15] 杨秀颖,强桂芬,张莉,等. 丹酚酸 A 对缺血/再灌注心肌的保护作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(8):1072-1076.

[修回日期] 2016-06-30



miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经 损伤中的保护作用与机制

叶 蓓¹, 李 曼², 程 翔¹, 陈建珍¹, 贺 芳¹, 张立光¹

(1. 苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009; 2. 山东大学齐鲁医院, 济南 250012)

【摘要】 目的 探讨 miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经损伤中的保护作用与机制研究。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, miR-29c NC 组, miR-29c inhibitor 组, 除假手术组外, 其余三组均采用栓线法建立大鼠大脑中动脉局灶缺血再灌注损伤模型, 并于术后 24 h 评价大鼠神经行为变化, 检测大鼠脑梗死体积, 缺血侧脑组织细胞凋亡情况, 脑组织中 miR-29c 表达量, 超氧化物歧化酶(SOD)活性, 丙二醛(MDA)含量, 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase 3), Caspase 8 及 Caspase 9 活性, 及 Bcl-2, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 与 cleaved caspase 9 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组, miR-29c NC 组中 miR-29c 表达量显著提高, 大鼠神经行为评分提高, 脑梗死体积增加, 细胞凋亡率提高, SOD 活性降低, MDA 含量, Caspase 3, Caspase 8 及 Caspase 9 活性上升, Bcl-2 表达量下调, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 表达量上调, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组及 miR-29c NC 组比较, miR-29c inhibitor 组 miR-29c 表达量显著降低, 大鼠神经行为评分降低, 脑梗死体积百分比减少, 细胞凋亡率降低, SOD 活性上升, MDA 含量, Caspase 3, Caspase 8 及 Caspase 9 活性降低, Bcl-2 表达量上调, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 表达量下调, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** miR-29c 对大鼠脑缺血再灌注神经损伤具有保护作用, 与提高抗氧化能力及调控细胞凋亡相关蛋白表达有关。

【关键词】 miR-29c; 脑缺血再灌注; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0031-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.006

The mechanism and protective effect of miR-29c on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

YE Bei¹, LI Man², CHEN Jian-zhen¹, HE Fang¹, ZHANG Liguang¹

(1. Suzhou Health College of Jiangsu, Jiangsu Soochow 215009, China;

2. Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

【Abstract】 Objective To explore protective effect of miR-29c on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.
Methods Forty eight SD rats were randomly divided into sham group, model group, miR-29c NC group and miR-29c inhibitor group. Except the sham operation group, the other three groups were established by using ligation of middle cerebral artery. Twenty four hours after the operation, neurological behavior score, cerebral infarction volume, cell apoptosis, the activity of superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA), cysteine aspartic acid

protease 3 (caspase 3), caspase 8, caspase 9, and the expression of miR-29c, Bcl-2, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9. **Results** Compared with sham group, neurological behavior score, cerebral infarction volume, cell apoptosis rate was increased, SOD th the expression of miR-29c, activity was decreased, the level of MDA, caspase 3, caspase 8 and caspase 9 activity was increased. The expression of Bcl-2 was down-regulated, the expression of Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9 expression was up-regulated in model group, miR-29c NC group. The differences were also statistically significant ($P < 0.01$). Compared with model group, miR-29c NC group, the expression of miR-29c, neurological behavior score, cerebral infarction volume percentage, cell apoptosis rate was decreased, SOD activity was increased, the level of MDA, caspase 3, caspase 8 and caspase 9 activity was decreased. The expression of Bcl-2 was up-regulated, the expression of Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9 expression was down-regulated in miR-29c inhibitor group. The differences were also statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-29c had a protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, which was related to improve the antioxidant capacity and regulation of apoptosis related protein expression.

【Key words】 miR-29c; cerebral ischemia-reperfusion; cell apoptosis

缺血性脑血管病的发病率,致残率及死亡率皆相当之高,且发病机制复杂。其可分为局灶性脑缺血及全脑缺血,前者指脑血管局部区域血流减少或被阻断,后者是指在临床上肺栓塞,休克,窒息所导致的。在缺血过程中,当血液恢复灌注后,会启动一系列内源性的损伤,加重脑缺血的损伤,而这一过程称之为脑缺血再灌注损伤^[1-2]。这一损伤过程涉及脑血管微环境及神经细胞释放大氧自由基等有害因子,损害细胞生物膜结构,损伤细胞线粒体功能,最终导致细胞凋亡。因此,通过清除氧自由基产物,抑制细胞凋亡将对于脑缺血再灌注损伤后神经细胞的保护具有重要作用^[2-3]。

miRNAs 是一类长度约为 18 - 25 nt 高度保守的小 RNA,能结合于其靶基因 3'-UTR 区域,进而抑制靶基因的翻译,从而参与细胞生长,增值,分化与凋亡的调控。以往对于 miRNA 的研究主要集中在肿瘤的发生及免疫疾病中,近些年也陆续有研究发现 miRNA 与缺血性脑血管病关系密切。如 Jeyaseelan 等^[4]研究显示在大鼠局灶性大脑中动脉栓塞(MCAO)模型中,发现有 106 个 miRNA 异常表达。另外 Dharap 等^[5]研究也表明 MCAO 大鼠中 miRNA 在各个检测点中异常表达。上述研究报道均说明 miRNA 与脑缺血再灌注损伤密切相关,但涉及的具体调控机制尚不明确。此外 miR-29c 是一个与胚胎神经系统的发育生长密切相关的 miRNA^[6]。Huang 等^[7]研究发现降低 miR-29c 的表达,能显著的抑制 MCAO 大鼠的脑梗死体积及细胞凋亡,但是其具体作用机制未知。所以本研究将以 miR-29c 为研究对象,探讨 miR-29c 在大鼠 MCAO 中的神经保护作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 动物

48 只雄性 SD 大鼠实验动物由山东大学实验动物中心提供【SCXK(鲁)2009-0001】,清洁级,(200 ± 20)g,室内温度控制在(23 ± 2)℃,大鼠自由饮食和饮水。实验所在实验室:山东大学齐鲁医院临床基础研究所【SYXK(鲁)2010-0038】。

1.2 主要试剂及仪器

BCA 法蛋白定量试剂盒,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自碧云天生物技术有限公司;兔抗 Bcl-2, Bax, Bak1,多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 活性检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;SOD 活力,MDA 含量试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;miR-29c inhibitor (UAACCGATTTCAAAUGGUGCUA)及 miR-29c NC (CAGTACUUUUGUGUAGUACAAA),购自上海吉玛生物技术有限公司。电泳仪,转印电泳仪,凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;酶标仪购自瑞士瑞士 TECAN 集团公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 分组及给药^[7]

将 48 只大鼠分为假手术组,模型组,miR-29c NC 组,miR-21 inhibitor 组。将 miR-29c inhibitor 及 miR-29c NC 溶解于人工脑脊液中,浓度为 20 μmol/L,进行侧脑室注射,注射速度为 1 μL/min,总共 5 μL。而假手术组及模型组用同样方式给予人工脑脊液,给药 24 h 后除假手术组外其余三组皆进行造模。

1.4 造模^[8-9]

参相关文献将制成大脑中动脉阻塞(MCAO)模

型,10%水合氯醛麻醉大鼠,使大鼠处于仰卧位,并正中切开大鼠颈部的皮肤,钝性的将两侧肌肉分离,并进一步分离出右颈总动脉(CCA),右颈内动脉(ICA)及右颈外动脉(ECA),备线并结扎ECA及CCA,并用动脉夹夹住ICA远端,同时在ECA近CCA处作一小切口,松开ICA的动脉夹,并将钝性的尼龙线缓慢插入ECA,插入深度约为18 mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血,最后消毒并缝合皮肤,另外外留尼龙线线头约1 cm。缺血2 h后,将尼龙线轻提,使线头略有阻力,血流再通,以实现再灌注22 h。假手术组仅仅分离ECA,CCA及ICA,但不结扎CCA。

1.5 神经行为学评分^[1]

于术后24 h,参考Zea Longa的5分制评分标准对各组大鼠进行神经功能评分。0分:没有出现神经损伤症状;1分:左侧前爪不能完全伸展;2分:向左侧转圈行走;3分:行走时向左侧倾倒;4分:不能够自发行走,同时意识丧失。

1.6 梗死体积测定

于术后24 h,将各组大鼠麻醉,并迅速断头取脑,将脑组织周围小脑,嗅球等去除。对全脑进行切片,厚度约2 mm,立即浸入2%氯化三苯基四氮唑(TCC),置于37℃温箱中避光染色30 min,染成红色的是正常的脑组织,染成白色的梗死的脑组织。最后在10%甲醛中固定,并拍照。用Image-Pro Plus 6.0软件进行分析计算脑梗死体积,并乘以脑片厚度2 mm,累计每只大鼠所有脑切片的脑梗死容积即得全脑梗死容积,并计算脑梗死体积百分比(brain infarct volume percentage, BIVP)。

1.7 RT-PCR 检测 miR-29c 表达

采用Trizol法抽提细胞总RNA,接着一步法RT-PCR逆转录,逆转录产物用于琼脂糖凝胶电泳。引物由上海生工生物工程有限公司合成,如下:miR-29c 5'-UAGCACCAUUUGAAAUGGUUA-3'。反转录体系为:总RNA模板2 μL(1 μg)、dNTP混合物2 μL、MgCl₂ 2 μL、加EDPC补充蒸馏水至25 μL。反应参数为:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环次数为40。

1.8 SOD 活性及 MDA 含量的检测

取缺血侧大脑组织进行匀浆,按照SOD活力,MDA含量试剂盒说明书进行检测。

1.9 流式细胞术检测缺血侧脑细胞凋亡情况

取缺血侧大脑组织进行匀浆,并用胰酶和胶原

酶进行消化,获得细胞悬液后,按照Annexin V-FITC流式细胞检测试剂盒进行检测,在1 h内进行流式细胞仪检测。

1.10 Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 活性的检测

取缺血侧大脑组织进行匀浆,按照Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9活性试剂盒说明书进行检测。

1.11 caspase 3, cleaved caspase 8, cleaved caspase 9, Bak1, Bax 及 Bcl-2 蛋白的检测

采用Western blot技术进行检测。取缺血侧大脑组织进行匀浆,并加入RIPA强裂解液,裂解,离心,收获蛋白。采用BCA试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基磺酸钠凝胶电泳,湿法转膜。一抗孵育,4℃过夜;二抗室温孵育1-2 h。在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.12 数据分析

所有数据均用SPSS 21.0统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间经 t 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 miR-29c 表达量的影响

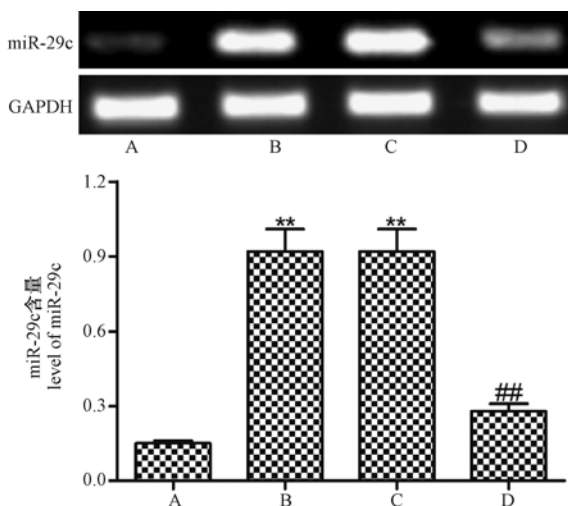
如图1所示,与假手术组比较,模型组及miR-29c NC组大鼠脑组织中miR-29c表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组大鼠脑组织中miR-29c表达量显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠神经行为评分的影响

如表1所示,与假手术组比较,模型组及miR-29c NC组大鼠神经行为评分均显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组大鼠神经行为评分显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑梗死体积的影响

如表1所示,与假手术组比较,模型组及miR-29c NC组大鼠脑梗死体积百分比均显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组大鼠脑梗死体积百分比显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A:假手术组;B:模型组;C:miR-29c NC组;
D:miR-29c inhibitor组。与假手术组比较,

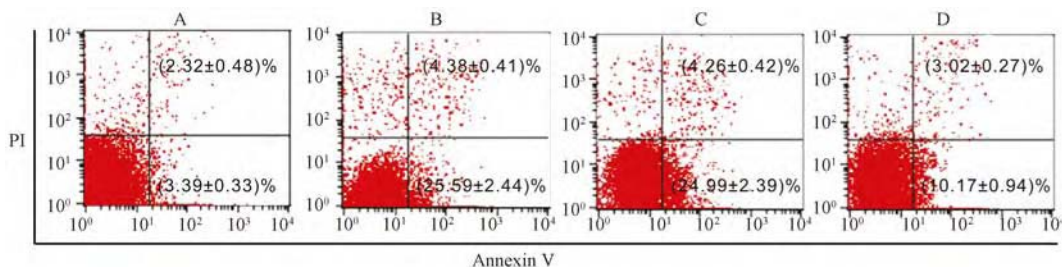
** $P < 0.01$;与模型组及 miR-29c NC组比较,## $P < 0.01$ 。

图1 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑组织中 miR-29c 表达量的影响

Note: A: sham operation group; B: model group; C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ## $P < 0.01$.

Fig.1 Effect of miR-29c inhibitor on expression of miR-29c in MCAO rats brain tissue

2.4 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑组织中



注:A:假手术组;B:模型组;C:miR-29c NC组;D:miR-29c inhibitor组。

图2 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑缺血侧细胞凋亡的影响

Note: A: sham operation group; B: model group; C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group.

Fig.2 Effect of miR-29c inhibitor on cerebral ischemic side cell apoptosis in MCAO rats

表1 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠神经行为评分及脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of miR-29c inhibitor on neurological behavior score and brain infarct volume percentage in MCAO rats

组别 Group	神经行为评分 Neurological behavior score	脑梗死体积百分比(%) Brain infarct volume percentage
假手术组 Sham operation group	—	—
模型组 Model group	$2.78 \pm 0.36^{**}$	$27.64 \pm 2.46^{**}$
miR-29c NC	$2.76 \pm 0.29^{**}$	$28.13 \pm 2.65^{**}$
miR-29c inhibitor	$1.36 \pm 0.14^{##}$	$21.88 \pm 1.92^{##}$

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组及 miR-29c 组比较,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ## $P < 0.01$.

SOD 活性,MDA 含量的影响

如表2所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC组脑组织中 SOD 活力降低,MDA 含量提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组脑组织中 SOD 活力提高,MDA 含量降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑缺血侧细胞凋亡的影响

流式细胞仪结果显示(见图2),假手术组细胞凋亡率为 1.95 ± 1.12 ,模型组及 miR-29c NC组细胞凋亡率显著提高,分别为 9.25 ± 0.83 、 8.95 ± 0.72 ,与假手术组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$);miR-29c inhibitor组细胞凋亡率为 5.42 ± 0.49 ,与模型组及 miR-29c NC组比较,显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑组织中 Caspase 3,Caspase 8及Caspase 9活性的影响

如表3所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC组脑组织中 Caspase 3,Caspase 8及Caspase 9活性提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组脑组织中 Caspase 3,Caspase 8及Caspase 9活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 SOD 活性,MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)**Tab.2** Effect of miR-29c inhibitor on activity of SOD and level of MDA in MCAO rats

组别 Group	SOD (U/mg)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)
假手术组 Sham operation group	8.27 $\pm$ 0.82	44.68 $\pm$ 4.32
模型组 Model group	2.43 $\pm$ 0.25 **	74.23 $\pm$ 6.24 **
miR-29c NC	2.40 $\pm$ 0.24 **	80.87 $\pm$ 7.76 **
miR-29c inhibitor	7.83 $\pm$ 0.79 ^{##}	58.48 $\pm$ 6.52 ^{##}

注:与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组及 miR-29c NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。Note: Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ^{##} $P < 0.01$.**表 3** miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Caspase 3, Caspase 8 及 Caspase 9 活性的影响($\bar{x} \pm s$)**Tab.3** Effect of miR-29c inhibitor on activity of Caspase 3, Caspase 8 and Caspase 9 in MCAO rats brain tissue

组别 Group	Caspase 3 (U/mg)	Caspase 8 (U/mg)	Caspase 9 (U/mg)
假手术组 Sham operation group	0.86 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.08	3.19 $\pm$ 0.32
模型组 Model group	7.54 $\pm$ 0.75 **	7.49 $\pm$ 0.73 **	11.36 $\pm$ 1.20 **
miR-29c NC	7.48 $\pm$ 0.63 ^{##}	7.46 $\pm$ 0.73 ^{##}	11.29 $\pm$ 1.28 ^{##}
miR-29c inhibitor	2.36 $\pm$ 0.37 ^{##}	2.48 $\pm$ 0.25 ^{##}	4.59 $\pm$ 0.46 ^{##}

注:与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组及 miR-29c NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。Note: Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ^{##} $P < 0.01$.

2.7 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达的影响

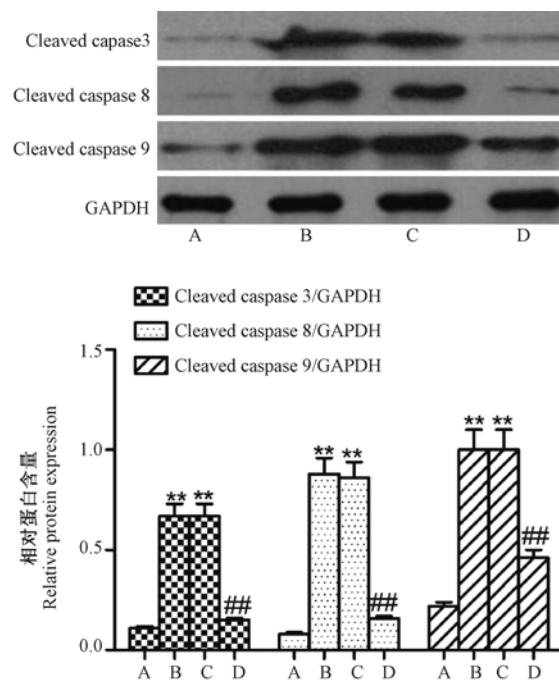
如图 3 所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC 组脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC 组比较,miR-29c inhibitor 组脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达量降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.8 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Bak1, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC 组脑组织中 Bak1, Bax 表达量显著提高, Bcl-2 表达量显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC 组比较,miR-29c inhibitor 组脑组织中 Bak1, Bax 表达量显著降低, Bcl-2 表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

脑缺血后再恢复血供的过程中,脑血管微环境中会产生大量的损害因子,如氧自由基,这些氧自由基会损伤脑组织细胞生物膜结构,损伤线粒体 DNA,损害细胞核 DNA,使细胞内蛋白质及 DNA 大



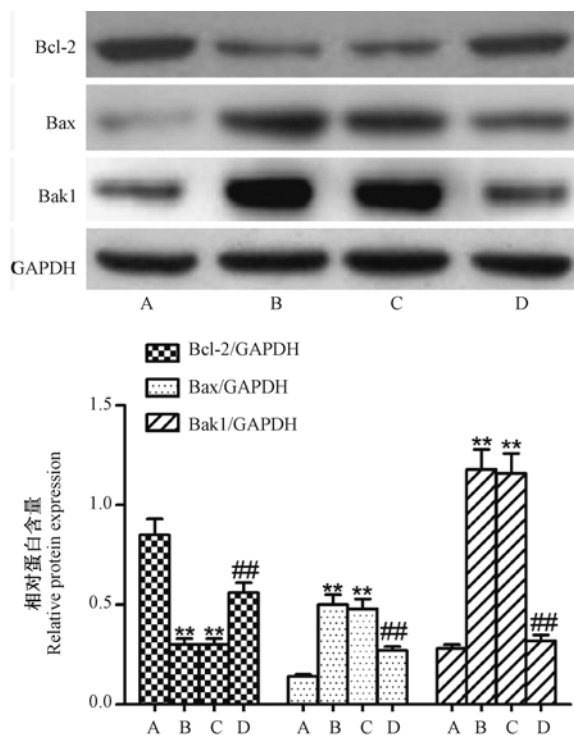
注: A: 假手术组; B: 模型组; C: miR-29c NC 组;

D: miR-29c inhibitor 组。与假手术组比较, ** $P < 0.01$;与模型组及 miR-29c NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$ **图 3** miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达的影响

Note: A: sham operation group; B: model group;

C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group.

Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;Compared with model group and miR-29c NC group, ^{##} $P < 0.01$ **Fig.3** Effect of miR-29c inhibitor on expression of cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9 protein in MCAO rats brain tissue



注:A:假手术组;B:模型组;C:miR-29c NC组;

D:miR-29c inhibitor组。与假手术组比较,** $P < 0.01$;

与模型组及 miR-29c NC 组比较,## $P < 0.01$ 。

图 4 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Bak1, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

Note: A: sham operation group; B: model group;

C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group.

Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;

Compared with model group and miR-29c NC group, ## $P < 0.01$

Fig. 4 Effect of miR-29c inhibitor on expression of Bak1, Bax and Bcl-2 protein in MCAO rats brain tissue

分子断裂,从而诱发神经细胞启动凋亡程序。所以发现一种有效的清除清除氧自由基,进而抵抗细胞损伤的物质将对脑缺血再灌注损伤后的神经保护具有重要作用^[2-3]。

miR-29c 是 miR-29 家族的一员,是 Lagos-Quintana 等在 2003 年研究神经细胞核糖核蛋白中发现的,并克隆获得的 miRNA。miR-29c 位于人类 1 号染色体,在大鼠胚胎及出生时尚未见表达,在出生 2 周后表达增高,说明该 miRNA 在神经细胞中的特异性存在与表达,并与胚胎神经的发育,生长,分化密切相关^[6]。另外 Shen 等^[10]研究显示 miR-29a, miR-29b 及 miR-29c 在缺血再灌注损伤中异常表达,表达量差异最大的 miRNA 是 miR-29c。Huang 等^[7]研究进一步表明往 MCAO 大鼠脑侧左室注射 miR-29c inhibitor 或者 miR-29c mimics,前者能够降

低脑梗死体积及细胞凋亡率,后者加重了脑缺血再灌注损伤。从而说明 miR-29c 与脑缺血再灌注损伤的关系密切。

本研究首先建立大鼠 MCAO 模型,并侧脑室注射 miR-29c inhibitor 进行干预,接着于术后 24 h 检测各组大鼠神经学行为评分,脑梗死体积及缺血侧脑组织细胞凋亡情况,结果表明 miR-29c inhibitor 能显著降低大鼠神经学行为评分,减小脑梗死体积,并抑制细胞凋亡,与 Huang 等^[7]研究结果一致。同时 MDA 是细胞膜脂质被活性氧化后的副产物,是细胞遭受氧化应激损伤的生物标志物。SOD 是细胞内主要的抗氧化酶,是清除氧自由基的主要物质,能抵抗氧自由基对细胞的损伤。所以本研究继续探讨 miR-29c 对 MCAO 大鼠脑组织中 MDA 含量及 SOD 活性的影响,结果表明 miR-29c inhibitor 能显著的提高 SOD 活性,降低 MDA 含量,从而说明 miR-29c inhibitor 能清除脑缺血再灌注损伤所产生的氧化应激产物,并提高抗氧化酶活性。

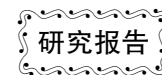
脑神经细胞的凋亡是细胞主动有序的自然死亡形式,其发生可能与组织中抗凋亡和促凋亡基因的表达失衡有关。其中 Bcl-2 家族是目前研究最为广泛的凋亡调控基因家族,Bcl-2 是最常见的抑制凋亡基因,能与促凋亡基因 Bax 形成异源二聚体,或者 Bax 自身能形成二聚体,从而调控细胞的凋亡。而 Bak1 也是 Bcl-2 家族促凋亡蛋白的一员,能与 Bax 形成复合物,从而维持线粒体膜的稳定性,当上游凋亡信号传递下来后,Bak1 能够介导线粒体膜孔开放,使得线粒体中的细胞色素 C 释放,并诱导 Caspase 信号级联反应,最终使得细胞凋亡。Caspase 正常情况下以无活性酶原形式存在于细胞内,激活主要通过以下 2 条信号通路^[11-13]:(1)内源性途径:细胞色素 C 从线粒体释放到胞质后与 dATP、凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1) 结合成复合物,激活 caspase 9,从而激活 caspase 3;(2)外源性途径:Fas 膜受体系统激活 caspase 8,从而直接激活 caspase 3,这条途径绕过了线粒体。当受到上游凋亡信号刺激时,Caspase 的起始因子 caspase 8 及 caspase 9 被其它激酶所剪切或者自身发生切割作用后被激活,从而传递凋亡级联信号,最终传递到 caspase 家族的执行因子 caspase 3,最终导致细胞凋亡^[11-13]。此外 Huang 等^[7]研究证实 Bak1 是 miR-29c 的下游靶蛋白之一。Tiao 等^[14]研究表明 miR-29c 能通过下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达,从而抑

制阻塞性黄疸导致的肝细胞凋亡。Wang 等^[15]研究表明 miR-29 inhibitor 通过抑制 Caspase 3 表达,从而减轻长时间低温循环导致的脑神经损伤。所以本研究继续探讨 miR-29c 对 MCAO 大鼠脑组织中 caspase 3, caspase 8, caspase 9 活性, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8, cleaved caspase 9 及 Bax, Bcl-2、Bak1 蛋白的表达,结果表明 miR-29c inhibitor 能显著的上调 Bcl-2 表达,并降低 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白的表达,说明 miR-29c inhibitor 能通过调控细胞凋亡相关蛋白表达,同时抑制细胞内源和外源促凋亡通路共同抑制 caspase 3 的激活,从而抑制脑缺血再灌注损伤所导致的脑细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 闵昱源,冯彩华,高子军,等. 梓醇对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(20): 3805-3808.
- [2] 王富明,徐虹,孙华. 脑缺血再灌注损伤治疗的实验研究进展[J]. 医学研究杂志, 2015(02): 12-15.
- [3] 王光胜,耿德勤. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 医学综述, 2011(24): 3753-3756.
- [4] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2008, 39(3): 959-966.
- [5] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(4): 675-687.
- [6] 黄昌发,刘小珊. 微 RNA miR-29 与人类疾病[J]. 生命的化学, 2010, 30(2): 250-255.
- [7] Huang LG, Li JP, Pang XM, et al. MicroRNA-29c Correlates with Neuroprotection Induced by FNS by Targeting Both Birc2 and Bak1 in Rat Brain after Stroke [J]. CNS Neurosci Ther, 2015, 21(6): 496-503.
- [8] 王荣亮,赵海苹,罗玫,等. 远程缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注损伤后 MIP-1 α 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(8): 24-29.
- [9] 曾兆禄,韩继超,薛云,等. 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 62-66.
- [10] Shen B, Zhou S, He Y, et al. Revealing the underlying mechanism of ischemia reperfusion injury using bioinformatics approach [J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 38(1): 99-108.
- [11] 刘晓婷,王延让,张明. 线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(2): 182-185.
- [12] 王力俭,田可川,吴伟伟,等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(10): 132-135.
- [13] 梁凯,曹秉振. 线粒体调控的细胞凋亡研究进展[J]. 生物工程与临床, 2014, 18(5): 501-505.
- [14] Tiao MM, Wang FS, Huang LT, et al. MicroRNA-29a protects against acute liver injury in a mouse model of obstructive jaundice via inhibition of the extrinsic apoptosis pathway [J]. Apoptosis, 2014, 19(1): 30-41.
- [15] Wang Y, Gu T, Shi E, et al. Inhibition of microRNA-29c protects the brain in a rat model of prolonged hypothermic circulatory arrest [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015, 150(3): 675-684.

[修回日期] 2016-07-12



急性肺水肿大鼠肺组织中 IL-6, SOD 和 MDA 的变化

王娟¹, 贾合磊¹, 吉红亮², 任冬冬¹, 卢长青¹

(1. 河南中医药大学第二临床医学院急诊科, 郑州 450002; 2. 郑州市郑荣医院普内科, 郑州 450002)

【摘要】 目的 探讨急性缺氧致大鼠急性肺水肿模型肺组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和白细胞介素-6(Interleukin 6, IL-6)的变化及其意义。**方法** 成年 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为 A 组(正常组)、B 组(急性肺水肿模型, 缺氧 24 h)、C 组(急性肺水肿模型, 缺氧 48 h)、D 组(急性肺水肿模型, 缺氧 72 h)和 E 组(急性肺水肿激素治疗组, 缺氧 72 h)。对 B、C、D、E 组大鼠腹腔内注射 6% 氯化氨建立急性肺水肿模型, E 组在注入 6% 氯化氨 30 min 后经尾静脉给药, 给予地塞米松 6.0 mg/kg。造模成功后的 24 h、48 h、72 h, 分别处死 4 组大鼠, 分离大鼠血浆, 摘取大鼠肺脏, 制备 10% 肺组织匀浆, 用 ELISA 检测肺组织中 MDA、SOD、IL-6 和血浆中 IL-6 的含量和活性。**结果** B、C、D 三组可见大鼠肺组织水肿明显, 湿重明显增加, 与 A 组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 组大鼠肺组织无明显充血水肿, 肺组织形态大致正常。B、C、D 大鼠模型肺组织充血水肿, 肺组织间质间隙、肺泡和细支气管内充满含有蛋白质的液体, 肺泡内有透明膜形成。且 D 组大鼠肺组织充血水肿最为明显。而 E 组大鼠全肺组织水肿普遍较轻, HE 染色显示 E 组大鼠肺组织肺泡融合, 间隔较小, 水肿液大多已吸收, 肺泡内散在少量嗜伊红液体。B 组与 A 组比较, 肺组织中 MDA、IL-6 升高, SOD 降低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 随着肺水肿时间的延长, C、D 组大鼠肺组织中 MDA 升高, SOD 降低, 血浆中的 IL-6 升高, 和 A 组相比变化明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。和 D 组相比, E 组大鼠肺组织中 MDA 降低, SOD 升高, 血浆中的 IL-6 降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 急性肺水肿的发生和氧化应激有关, 机体抗氧化能力降低、自由基增加是肺水肿发生的重要机制, 肺组织中 IL-6、SOD 和 MDA 含量对病情变化有指导意义。

【关键词】 急性肺水肿; 大鼠模型; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 白细胞介素-6

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0038-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.007

Study on SOD, MDA and IL-6 in a rat model of acute pulmonary edema

WANG Juan¹, JIA He-lei¹, JI Hong-liang², REN Dong-dong¹, LU Chang-qing¹

(1. Emergency department of Henan University of traditional Chinese medicine, Henan 450002, China;

2. Department of internal medicine, general hospital, Zheng Rong hospital, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective To investigate Interleukin 6 (IL-6), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in lung tissues of a rat acute pulmonary edema model induced by acute hypoxia. **Methods** 50 adult Wistar rats were randomly divided into group A (normal), B (acute pulmonary edema, hypoxia for 24 h), C (acute pulmonary edema, hypoxia for 48h), D (acute pulmonary edema, hypoxia for 72 h) and E (dexamethasone treatment, hypoxia for 72h). The model of acute pulmonary edema was established by intraperitoneal injection with 6% ammonium chloride. In group E, dexamethasone (6mg/kg) was injected in tail vein following intraperitoneal injection of 6% ammonium chloride. The rats were killed 24 (group B), 48 (C) and 72 hours (D&E) later. Plasma was isolated and lungs were removed. MDA, SOD in lung tissues and IL-6 in plasma were analyzed by ELISA. **Results** The wet weight of lung tissues were significantly increased in group B, C and D compared to group A ($P < 0.05$). The lung tissues of group A had no obvious congestion

[作者简介] 王娟(1975-), 女, 硕士生, 讲师研究方向: 心脑血管疾病及急危重症的救治。E-mail: m15138690803@163.com。

[通讯作者] 卢长青(1965-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 心血管病及急危重症的急救, 急性心梗的介入治疗。E-mail: lcq0217@163.com。

and edema, and the morphology of lung tissues was normal ($P > 0.05$). Pulmonary edema, interstitial spaces and alveolar filled fluid can be seen in group B, C, D and transparent membrane formed within alveoli. The lung tissue congestion and edema in group D were the most obvious ($P < 0.05$). The above changes obviously improved in group E. Compared with group A, MDA, IL-6 increased and SOD decreased in lung tissues of group C and D. Compared with group D, MDA was decreased and SOD was increased in lung tissues of group E and IL-6 was also decreased significantly in plasma ($P < 0.05$). **Conclusion** The occurrence of acute pulmonary edema related to oxidative stress and decreased antioxidant capacity. Increased free radical is an important mechanism of pulmonary edema. SOD, MDA and IL-6 in the lung tissue may be indexes for the prognosis.

【Key words】 Acute pulmonary edema; Rat model; Malondialdehyde (MDA); Superoxide dismutase (SOD); Interleukin 6 (IL-6)

急性肺水肿是急诊科、心内科及重症医学科的常见的急症之一,其临床表现为:突然出现的严重的呼吸困难,端坐呼吸,伴咳嗽,常咳出粉红色泡沫样痰,病人烦躁不安,口唇紫绀,大汗淋漓,心率增快,两肺布满湿罗音及哮鸣音,严重者还可引起晕厥及心脏骤停^[1]。由于急性肺水肿病程凶险,致死率高,因而急性肺水肿的发病机制和病程中的病理生理变化已成为近年来研究的热门领域之一^[2]。目前关于急性肺水肿的发病机制尚未完全清楚,但有研究显示,缺氧引起肺血管过度收缩、肺毛细血管通透性增加和肺泡对液体的清除能力降低是急性肺水肿发生的重要机制之一^[2]。利用模拟肺组织受损的动物模型,再现人体病理状态和病理生理过程,对于掌握急性肺水肿发生发展、疾病特征和寻求新的治疗途径显得尤为重要。

急性肺水肿的动物模型的建立,目前国内外已有了一定的研究^[3]。有研究显示,丙二醛(malondialdehyde, MDA),超氧化物歧化酶(superoxide Dismutase, SOD)和白介素-6(IL-6)的变化可能在缺氧引起的急性肺水肿中发挥了重要作用^[4],为明确三者其中的作用,我们建立了急性肺水肿的大鼠模型,重点研究了急性肺水肿大鼠肺组织中 IL-6, SOD 和 MDA 的变化,以明确缺氧在引发急性肺水肿中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

6% 氯化氨购自上海博湖生物科技有限公司, 10% 乌拉坦, BCA 法蛋白测定试剂盒购自武汉能仁医药化工有限公司, SOD、MDA 测定试剂盒, 大鼠 IL-6、ELISA 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司, 多功能酶标仪由美国 Sigma 公司生产。

1.2 实验动物及分组

成年 Wistar 大鼠 50 只, 雌雄不限, 体重为 (200 ± 20) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0006】。随机将 50 只大鼠分为 5 组, 即 A 组(正常组)、B 组(急性肺水肿模型缺氧 24 h)、C 组(急性肺水肿模型缺氧 48 h)、D 组(急性肺水肿模型缺氧 72 h)、E 组(急性肺水肿模型激素治疗组), 每组 10 只。

1.3 动物模型的建立和实验程序

无菌操作, 在河南中医药大学实验动物中心设施进行【SYXK(豫)2012-0017】。对 B, C, D 和 E 组的 50 只大鼠腹腔内分别注入 6% 氯化氨(雌鼠: $6 \sim 8$ mL/kg, 雄鼠: $9 \sim 12$ mL/kg, 购自上海博湖生物科技有限公司), 制作急性肺水肿大鼠模型^[3]。E 组在注入 6% 氯化氨 30 min 后经尾静脉给药, 给予地塞米松 6.0 mg/kg。所有大鼠均自由摄食及饮水, 取材前 24 h 禁食水。正常组同时饲养。由专人统一时间进行取材。B, C, D 和 E 组大鼠分别在氯化氨注入后的 24 h, 48 h, 72 h, 用 10% 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 肝素抗凝管腹主动脉采血, 4°C 离心, 3000 r/min, 离心 15 min, 分离血浆, 分装后 -70°C 冰箱保存待测; 分离并摘取大鼠肺脏, 留取左侧肺叶, 用于肺含水量的测定, 其余肺组织分装在 3 个冻存管中立刻放入液氮冷冻保存。取右侧肺叶, 按照说明书制备 10% 肺组织匀浆, 分别用于检测肺组织中 MDA、SOD、IL-6 的含量和活性。

1.4 大鼠肺组织含水率测定

取大鼠左肺用吸水纸吸干表面血迹, 迅速称重后放入烤箱内 60°C 烘烤 72 h, 至质量不再减轻, 并计算肺组织干质量。肺组织含水率用 $[(\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量} \times 100\%]$ 表示。

1.5 大鼠肺组织病理学检查

将 5 组大鼠肺组织标本 $4 \mu\text{m}$ 厚度连续石蜡切片, 并行脱蜡, 染色, 脱水, 透明, 对切片进行 PBS 冲

洗,最后加入 DAB 显色液,用苏木素复染色,并用中性树脂封片。封片完毕后将切片放置显微镜下观察大鼠肺组织是否有充血水肿及肺组织间质间隙、肺泡和细支气管情况等。

1.6 大鼠肺组织中的氧化应激指标测定

取右侧肺叶,按照说明书制备 10% 肺组织匀浆,检测 5 组大鼠肺组织中的 MDA 和 SOD 等氧化应激相关指标。试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,按说明书进行检测。

1.7 ELISA 法检测大鼠肺组织和血浆中的 IL-6 测定

应用 ELISA 法检测试剂盒检测 5 组大鼠血浆和肺组织中 IL-6 的含量,按说明书进行操作。

1.8 统计学分析

收集 5 组大鼠肺组织中 MDA, SOD 和 IL-6 含量变化,统计学处理数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,各组间差异比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织大体和病理学情况

处死 5 组大鼠模型,取出其肺组织,可见 A 组对照组大鼠肺组织均匀,无明显肺水肿表现,湿重无明显增加。B, C, D 三组可见大鼠肺组织水肿明显,湿重明显增加,与 A 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对 4 组大鼠模型肺组织行 HE 染色,显示 A 组大鼠肺组织无明显充血水肿,肺组织形态大致正常。B, C, D 大鼠模型肺组织充血水肿,肺组织间质间隙、肺泡和细支气管内充满含有蛋白质的液体,肺泡内有透明膜形成。且 D 组大鼠肺组织充血水肿最为明显(图 1-4)。而 E 组大鼠全肺组织水肿普遍较轻,未见明显渗出液。HE 染色显示 E 组大鼠肺组织肺间质水肿及炎症细胞浸润程度显著减轻,水肿液大多已吸收,肺泡内散在少量嗜伊红液体(图 5)。

2.2 各组大鼠肺组织中 MDA 和 SOD 的变化

比较 4 组大鼠在急性缺氧不同时间其肺组织中 MDA、SOD 的变化,并与 A 组做对比,研究结果显示, B 组大鼠与 A 组对照组比较,肺组织中 MDA 升高、SOD 降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),随着肺水肿时间的延长, C, D 组大鼠在缺氧 48 h 和 72 h 后肺组织中 MDA、SOD 和 A 组相比变化明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。经过激素治疗后, E 组和 D 组相比,肺组织中 MDA 降低、SOD 升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

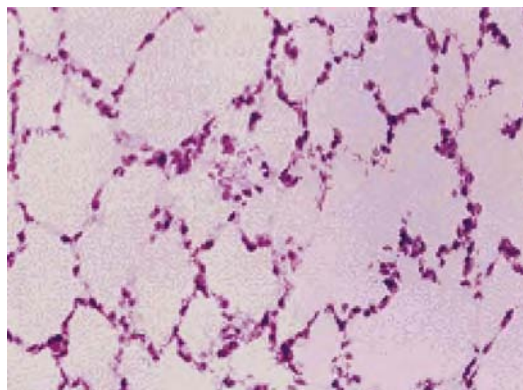


图 1 A 组大鼠模型肺组织:肺泡结构完整,肺泡壁无水肿(HE × 100)。

Fig. 1 Lung tissue of rats in group A: the alveolar structure was complete, and there was no edema in the alveolar wall (HE × 100).

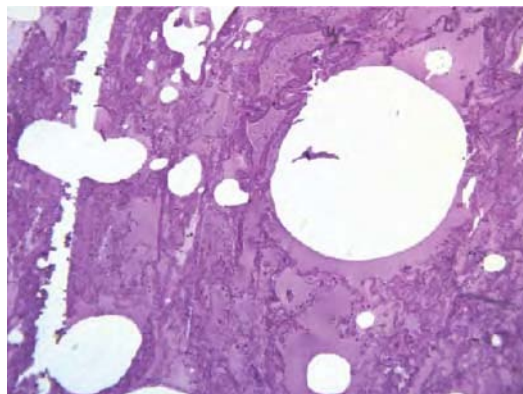


图 2 B 组大鼠模型肺组织:肺充血水肿,肺间质间隙、肺泡细支气管充满蛋白液体(HE × 40)。

Fig. 2 Lung tissue of rats in group B: pulmonary congestion and edema, interstitial spaces of lung, alveolar fluid (HE × 40).

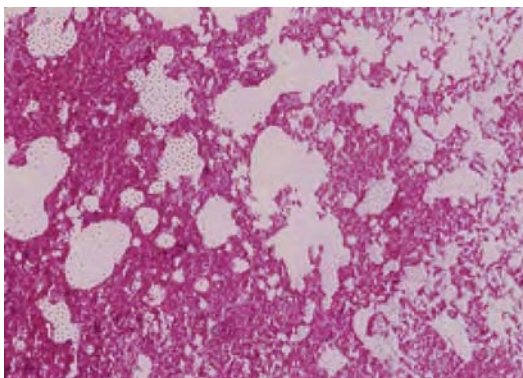


图 3 C 组大鼠模型肺组织:肺充血水肿,肺间质间隙、肺泡细支气管充满蛋白液体(HE × 10)。

Fig. 3 Lung tissue of rats in group C: Pulmonary congestion and edema, interstitial spaces of lung, alveolar fluid filled with protein (HE × 10).

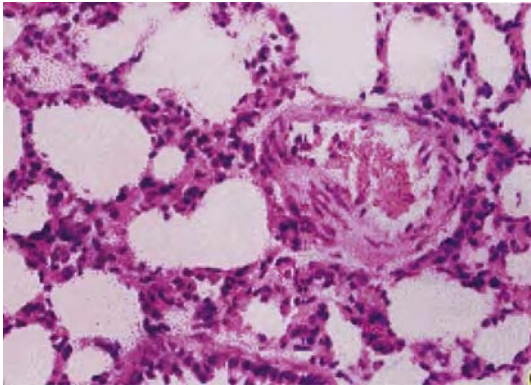


图 4 D 组大鼠模型肺组织:肺间质明显充血、水肿、增厚、炎症细胞浸润,肺泡腔内渗出物(HE ×20)。

Fig.4 Lung tissue of rats in group D:Obvious congestion, edema,thickening,inflammatory cell infiltration and alveolar effusion(HE ×20).

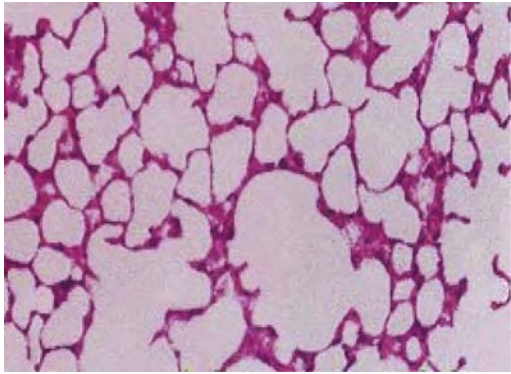


图 5 E 组大鼠模型肺组织:肺间质水肿及炎症细胞浸润程度显著减轻。

Fig.5 Lung tissue of rats in group E:The degree of edema and inflammatory cell infiltration in lung significantly reduced.

表 1 5 组大鼠肺组织中 SOD 和 MDA 的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Changes of SOD and MDA in lung tissue of rats

指标/组别 Index/ group	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D	E 组 Group E
SOD (103U/g)	3.64 ± 0.69	3.42 ± 0.61	2.82 ± 0.59 *	2.63 ± 0.55 *	3.25 ± 0.64 *
MDA (mmol/g)	1.06 ± 0.51	1.18 ± 0.63	1.48 ± 0.67 *	1.60 ± 0.79 *	1.22 ± 0.55 *

注: * C,D 组与 A 组相比变化明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。
Note: * Compared with group A, group C and D change significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

表 2 4 组大鼠肺组织和血浆中 IL-6 的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Changes of IL-6 in lung tissue and plasma of rats

指标/组别 Index/ group	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D	E 组 Group E
血浆 IL-6 (μg/L) IL-6 in plasma (μg/L)	107.48 ± 33.51	161.73 ± 40.26 *	182.84 ± 46.94 *	196.38 ± 55.26 *	145.18 ± 37.20 *
肺组织 IL-6 (μg/L) IL-6 in lung tissue (μg/L)	99.73 ± 32.16	119.37 ± 36.27	149.52 ± 44.12 *	164.53 ± 47.25 *	112.64 ± 35.03 *

注: * B,C,D 组血浆 IL-6 含量和 A 组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),C,D 组肺组织中 IL-6 含量和 A 组相比升高明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。
Note: * Compared with group A, IL-6 in plasma of group B,C,D were significantly higher, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group A IL-6 in lung tissue of group C,D were significantly higher, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

2.3 各组大鼠血浆和肺组织 IL-6 变化

比较 3 组大鼠在急性缺氧导致肺水肿不同时间其肺组织和血浆中 IL-6 的变化,并与 A 组进行比较。结果显示,B,C,D 组大鼠血浆中的 IL-6 和 A 组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),B 组大鼠与 A 组对照组比较,肺组织中 IL-6 有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),随着肺水肿时间的延长,C,D 组大鼠肺组织中的 IL-6 和 A 组相比升高明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。经过激素治疗后,E 组和 D 组相比,肺组织中 IL-6 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

急性肺水肿多发生于急性广泛性心肌梗死、急

性心肌炎等,严重高血压、主动脉瓣狭窄或二尖瓣狭窄,感染性心内膜炎、心脏外伤等一系列疾病,其发病迅速,往往会造成心肺功能衰竭,患者致死率高^[1,4]。近年来,急性肺水肿的发病率逐渐增高,对于急性肺水肿的患者,重视其的预防和治疗,可明显提高肺水肿患者的存活率,减少后遗症并发症,因而日益引起医学界的重视^[5]。

目前认为,急性缺氧造成的肺血管过度收缩、肺毛细血管通透性增加和肺泡对液体的清除能力降低是肺水肿发生的重要机制^[6]。有研究显示,急性缺氧可引起氧化应激,后者具有调节炎症反应、减少肺组织 NO 合成释放和降低肺 Na⁺ - K⁺ + ATP 酶活力等多种生物学作用^[7]。缺氧可改变氧自由基/一氧化氮平衡,能通过过氧化物的分解产物引

起细胞损伤。因此,测定氧化应激反应中的重要指标:抗氧化酶 SOD、脂质过氧化产物 MDA 及 IL-6 含量或活性可反映机体内脂质过氧化的程度,反映出细胞损伤的程度^[8]。

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,其具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基的首要物质。当机体自由基产生大幅激增时会很快引起氧化应激,并影响到蛋白质表达等调节、应答机制。在自由基的诱导及机体代偿应激下,细胞或机体会诱导性地增强抗氧化能力,一般会出现一过性 SOD 水平增高现象^[9]。急性肺水肿的患者由于氧化应激,肺组织中的 SOD 会明显升高。由于肺组织中的炎症反应和氧化应激,肺组织和血浆中的 IL-6 也会明显升高^[10]。MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一,它的产生还能加剧膜的损伤,因此,通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度,以间接测定膜系统受损程度以及动植物的抗逆性^[11]。这 3 种指标均可反映机体内过氧化的程度,反映出细胞损伤的程度。

在本研究中,我们比较了 3 组大鼠在急性缺氧不同时间其肺组织中 MDA、SOD 的变化,B 组大鼠肺组织中 MDA 升高、SOD 降低,随着肺水肿时间的延长,C、D 组大鼠在缺氧 48、72h 后肺组织中 MDA、SOD 的变化更加明显,同时,B、C、D 组大鼠血浆中的 IL-6 和 A 组相比明显升高,C、D 组大鼠肺组织中的 IL-6 和 A 组相比升高明显,差异有统计学意义。

为了观察肺水肿经治疗减轻后,MDA、SOD 和 IL-6 等指标的变化。我们设计了 E 组大鼠接受激素尾静脉注射治疗。结果表明,经糖皮质激素治疗后,和 D 组相比,E 组大鼠肺组织水肿普遍较轻,HE 染色显示肺组织肺泡融合,间隔较小,水肿液大多已吸收,肺泡内仅散在少量嗜伊红液体。大鼠肺组织和血浆中 MDA 和 IL-6 明显下降,SOD 升高,提示糖皮质激素对治疗急性肺水肿明显有效。可能的作用是改善毛细血管的通透性,减少渗出,随着肺水肿的改善,MDA 等分泌减少,同时因肺组织对 MDA 具清除作用,故 MDA 和 IL-6 明显下降。

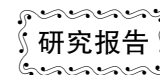
糖皮质激素-糖皮质激素受体(GC-GCR)为体内主要的抗炎因子,使多种炎症因子的表达受到抑制,起到抑制炎症反应的作用^[12]。实验结果显示,糖皮质激素可抑制刺激性气体所致肺水肿的炎症反应,抑制 IL-10、IL-6、IFN- α 等炎症因子,早期给予外源性糖皮质激素,可有效增加其与 GCR 的结合,发挥抗炎效果,减少炎症因子的释放^[13-14]。同时,糖皮质激素治疗对全血中 SOD 活力产生影响,因为在肺水肿时,SOD 因对抗缺氧产生的氧自由基以及

TXA₂、ET 等而消耗性减少,经激素治疗后炎症减轻,SOD 活力部分恢复,激素肺脏抗氧化能力增强^[15]。

综上所述,肺水肿大鼠肺组织抗氧化能力和相关抗氧化酶活力显著降低,而 MDA 却显著增加,血浆及肺组织 IL-6 水平亦显著增加,提示我们氧化应激诱导在急性肺水肿造成的肺组织损伤中可能起到了重要作用。本研究得出的结论提示我们同时检测肺组织和血浆中 MDA、SOD 和 IL-6 等的改变对急性肺水肿、病情评估、指导用药及预后提供重要指导,值得在临床工作中普及应用。

参考文献:

- [1] Smith WS, Matthay MA. Evidence for a hydrostatic mechanism in human neurogenic pulmonary edema[J]. Chest, 1997, 111: 1326 - 33.
- [2] Theodore J, Robin ED. Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema[J]. Lancet, 1975, 18(2): 749 - 751.
- [3] Minnear FL, Kite C, Hill LA, et al. Endothelial injury and pulmonary congestion characterize neurogenic pulmonary edema in rabbits[J]. J Appl Physiol, 1987, 63(1): 335 - 341.
- [4] Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats[J]. Crit Care Med, 2001, 29(6): 1222 - 1228.
- [5] Lionte C, Sorodoc L, Laba Y. Respiratory syndromes in acute poisoning[J]. Rev Med Chir Soc Med Natiasi, 2004, 108(3): 544 - 548.
- [6] Bur A, Wagner A, Roggla M, et al. Fatal pulmonary edema after nitric acid inhalation[J]. Resuscitation, 1997, 35(1): 33 - 36.
- [8] Prys-Roberts C. Principles of treatment of poisoning by higher oxides of nitrogen[J]. Br J Anaesth, 1967, 39(5): 432 - 439.
- [9] Parsons PE. Respiratory failure as a result of drugs, overdoses, and poisonings[J]. Clin Chest Med, 1994, 15(1): 93 - 102.
- [10] Theodore J, Robin ED. Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema[J]. Lancet, 1975, 18; 2(7938): 749 - 751.
- [11] 缪捷飞. 益气活血方对大鼠胸部照射肺组织 SOD 活性、MDA 及 HP 含量的影响[J]. 南通大学学报:医学版, 2010, 30(4): 255 - 257.
- [12] Drobinski G, Eugene M. Exploration Hemodynamique Cardiovasculaire[M]. 1982; Masson, Paris.
- [13] Elsayed NM, Gorbunov NV, Mayorga MA, et al. Significant pulmonary response to a brief high-level, nose-only nitrogen dioxide exposure: an interspecies dosimetry perspective [J]. Toxicol Appl Pharmacol. 2002, 184(6): 1 - 10.
- [14] 马钧. 急性呼吸窘迫综合征患者糖皮质激素合理使用方案及受体机制[J]. 中国危重病急救医学. 2003, 15(3): 680 - 682.
- [15] 徐仁宝. 大剂基激素作用的受体机制以及危重病人激素治疗的新策略[J]. 外科理论与实践, 2000, 5(2): 76 - 78.



加味丹参饮体外诱导骨髓间充质干细胞向 心肌样细胞分化的实验研究

韩析言

(上海市浦东新区东方医院, 上海 200120)

【摘要】 目的 探讨加味丹参饮体外诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells BMSCs)向心肌样细胞分化的实验研究。**方法** 采用贴壁法获取大鼠 BMSCs, 流式细胞术检测细胞表面抗原。MTT 法检测加味丹参饮对 BMSCs 最大无毒浓度, 用第 3 代细胞分组诱导: 正常对照组, 加味丹参饮组, 5-氮胞苷组, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组, 应用 western blot 检测各组细胞结合蛋白(Desmin), α -肌球蛋白重链(α -MHC), 心肌肌钙蛋白 T(cTnT) 蛋白表达, RT-PCR 法检测各组细胞 GATA-4, 缝隙连接蛋白 43(CX43)及 Nkx2-5 mRNA 表达。**结果** 大鼠 BMSCs 表面 CD90 阳性率高于 95%, CD34 及 CD45 阳性率低于 5%。加味丹参饮对 BMSCs 最大无毒浓度为 0.625 g/L。与正常对照组比较, 加味丹参饮组, 5-氮胞苷组, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量上调, GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量上调, GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 加味丹参饮能够诱导 BMSCs 向心肌样细胞转化, 与 5-氮胞苷联合给药具有协同作用。

【关键词】 加味丹参饮; 骨髓间充质干细胞; 心肌样细胞; 5-氮胞苷; 分化

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0043-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.008

Experimental study of Jiawei Danshen Yin on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myocardium-like cells in vitro

HAN Xi-yan

(The Oriental Hospital of Pudong, Shanghai 200120, China)

【Abstract】 Objective To explore experimental study of Jiawei Danshen Yin on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into myocardium-like cells in vitro. **Methods** Rat BMSCs were isolated by adherent method, and their surface antigen were detected by flow cytometry. The maximal non-toxic concentration of Jiawei Danshen Yin was measured by MTT method. The isolated and purified BMSCs were divided into four groups: normal control group, Jiawei Danshen Yin group, 5-azacitidine group, Jiawei Danshen Yin plus 5-azacitidine group. The expression of desmin, α -myosin heavy chain (α -MHC) and cardiac troponin T (cTnT) protein was detected by western blot. The expression of GATA-4, gap junction connexin 43 (CX43) and Nkx2-5 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The percentage of

CD90 positive cells in the rat BMSCs was higher than 95% , and the proportions of CD34 positive and CD45 positive cells was lower than 5% . The maximum toxic concentration of Jiawei Danshen Yin on BMSCs was 0.625 g/L. Compared with the normal control group, the expression of desmin, α -MHC and cardiac cTnT protein was up-regulated, the expression of GATA-4, CX43 and Nkx2-5 mRNA was up-regulated in Jiawei Danshen Yin group, 5-azacitidine group and Jiawei Danshen Yin plus 5-azacitidine group. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with Danshen Yin group or 5-azacitidine group, the expression of desmin, α -MHC and cardiac cTnT protein was up-regulated, the expression of GATA-4, CX43 and Nkx2-5 mRNA was up-regulated in Jiawei Danshen Yin plus 5-azacitidine group. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Jiawei Danshen Yin could induce BMSCs differentiation into myocardium-like cells, which had a synergistic effect with 5-azacitidine.

【Key words】 Jiawei Danshen Yin; Bone marrow mesenchymal stem cells; Myocardium-like cells; 5-azacitidine; differentiation

冠心病是危害人类健康的世界性问题,在治疗中所产生的心肌缺血再灌注,使得心肌损伤严重,心肌细胞数量减少,并最终发展为缺血性心力衰竭甚至死亡^[1-4]。近年来研究发现骨髓间充质干细胞(BMSCs),胚胎干细胞等外源性干细胞对于心肌、肝、肾等器官缺血再灌注损伤具有显著的治疗效果^[5-7]。其中 BMSCs 是一种来源于中胚层的间充质干细胞,1976 年由 Friedenstein 等发现,1991 年由 Caplan 正式命名。BMSCs 存在于骨髓、肝脏、脐带及胎盘等组织器官中,具有自我更新,多向分化潜能,亦具有低免疫源性,易获取、易扩增、易保存等特点,可以在不同诱导因子及环境下分化为心肌细胞,软骨细胞,成骨细胞,脂肪细胞,神经元细胞等多种组织细胞,可塑性极强^[5-7]。同时近年来研究还发现三七总皂苷,黄芪甲苷,加味丹参饮,淫羊藿苷等中医药能够与 BMSCs 共培养,从而提高 BMSCs 的诱导分化能力,并且二者在移植过程中发挥了减毒增效的作用^[5,7]。其中加味丹参饮是黄政德教授在清代陈念祖《时方歌括》中丹参饮药方中演化出来的,临床上已用于治疗血瘀证不稳定心绞痛,缺血性心肌病并等^[8-9],药理实验也表明加味丹参饮诱导的 BMSCs 移植能显著改善大鼠心肌缺血再灌注损伤(IRI)^[10-11]。而结合蛋白(Desmin), α -肌球蛋白重链(α -MHC),心肌肌钙蛋白 T(cTnT),GATA-4,缝隙连接蛋白 43(CX43)及 Nkx2-5 是心肌特异性蛋白,促进上述蛋白的表达,能一定程度上的恢复心肌细胞形态及数量。

1 材料和方法

1.1 实验动物

100 $\pm$ 20 g 的 SD 雄性大鼠 20 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012 -

0002】。所有大鼠均在同济大学附属东方医院动物实验室【SYXK(沪)2016 - 0001】清洁环境下饲养观察,适应性喂养 1 周后使用。

1.2 主要试剂及仪器

5-氮胞苷购自美国 sigma 公司;兔抗结合蛋白(Desmin), α -肌球蛋白重链(α -MHC)多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗心肌肌钙蛋白 T(cTnT)多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;FITC 标记 CD34,CD45,CD90 抗体购自加拿大 Cedarlane 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),胎牛血清,DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;BCA 试剂盒,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自碧云天生物技术有限公司;trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪购自北京六一仪器厂;ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;FACSCanto 流式细胞仪购自美国 BD 公司;Tecan Infinite F200/M200 型多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 公司。

1.3 大鼠骨髓来源的 MSCs 的分离、培养及纯化^[12-14]

将 SD 大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉后脱颈处死,75% 乙醇消毒体表,PBS 冲洗后置于超净台,取下胫骨和股骨,并剔除周围结缔组织,PBS 冲洗。组织钳剪掉胫骨和股骨的骨端,使骨髓腔暴露,利用 7 号针头穿刺,反复用含 DMEM 培养基冲洗骨髓腔,收集冲洗液,1500 r/min,离心 10 min,并用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬,以 1×10^6 /mL 密度接种于 50 cm² 培养瓶中,在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。48 h 首次换液,去除未贴壁细胞,以后每隔 3 d 换液,并每日于倒置显微镜下观察细胞生长状态及拍照。重复上述操作,当细胞生长密度达到 80% ~ 90% 的时候,进行 1:2 传代,传代到第

3 代。

1.4 BMSCs 表面抗原鉴定

取生长密度达到 80 ~ 90% 的第 3 代 BMSCs 细胞, 0.25% 胰酶消化后配制成单细胞悬液, 将 Falcon 管编号, 并按顺序加入 FITC 荧光标记的 CD34, CD45, CD90 单克隆抗体 20 μ L, 室温孵育 20 ~ 30 min, PBS 洗涤未标记抗体, 并离心, 最后 1 mL PBS 重悬细胞, 并用 4% 多聚甲醛固定, 在流式细胞仪上检测上述抗原表达。

1.5 加味丹参饮提取物的获取^[10]

加味丹参饮由丹参 20 g, 檀香 6 g, 川芎 6 g, 当归 6 g, 红花 6 g, 赤芍 10 g, 生地黄 12 g 组成。所有药材均由我院药剂科提供。将上述药材按比例称取 250 g, 并回流提取 2 次, 时间依次为 2 h, 1 h, 提取液于 37℃ 恒温水浴箱中浓缩, 并 1200 r/min, 离心 15 min, 同时于无菌条件下, 用 0.22 μ m 膜过滤, 收集滤液, 并用培养基调整生药浓度为 1 g/mL, 4℃ 冰箱保存备用。

1.6 MTT 法检测加味丹参饮对 BMSCs 的细胞毒性

取生长密度达到 80% ~ 90% 的第 3 代 BMSCs 细胞, 0.25% 胰酶消化后配制成单细胞悬液, 并以 5×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 实验组分别每孔加入 20 μ L (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019) g/L, 后加入含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 180 μ L, 另设细胞对照组, 只含细胞及 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 200 μ L, 同时设空白对照组, 不含细胞, 只有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 200 μ L。每个浓度设 4 个复孔。培养 48 h 后, 加入 50 μ L $1 \times$ MTT, 4 h 后弃上清液, 每孔加 150 μ L DMSO, 在 570 nm 波长处检测每孔的光密度 (OD 值), 细胞增殖抑制率 = (细胞对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / (细胞对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times$ 100%。

1.7 实验分组

将第 3 代的 BMSCs 诱导分组: 总共 4 组, 第 1 组为正常对照组 (只含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基), 第 2 组为加味丹参饮组 (加味丹参饮提取物最大无毒浓度), 第 3 组为 5-氮胞苷组 (5-氮胞苷 10 μ mol/L), 第 4 组为 (加味丹参饮提取物最大无毒浓度 + 5-氮胞苷 10 μ mol/L)。24 h 去除培养基, PBS 洗涤后, 按上述分组进行诱导培养, 72 h 后, 进

行 western blot 及 RT-PCR 实验。

1.8 Western blot

按“1.7”分组诱导细胞后, 收集细胞, 加入 RAPI 裂解液裂解细胞 30 min, 1200 r/min 离心 10 min, 收集的上清液即是蛋白样品。BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白煮沸变性 10 min, 定量, 上样, 进行 SDS 凝胶电泳 1 ~ 2 h, 湿法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次。次日加二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 并滴加 ECL 曝光液, 于凝胶成像系统曝光。用“Quantity one”软件分析各蛋白灰度值。

1.9 RT-PCR

按“1.7”分组诱导细胞后, 收集细胞, 参考 trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 并利用紫外分光光度计检测 RNA 纯度。采用一步法 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 接着扩增, 最后将获得的扩增产物用于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 并拍照。引物分别加入 25 μ L PCR 反应体系中, 反应条件为 94℃ 变性 45 s, 59℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 35 个循环。引物如下, GATA-4 上游引物: 5'-CCAACTGCCAGACTACCACC-3', 下游引物: 5'-CAAACCCAGCACCTTATCC-3'。CX-43 上游引物: 5'-CTATGTGATGCGAAAGGA-3', 下游引物: 5'-AGGAAACAGTCACCTGA-3'。Nkx2-5 上游引物: 5'-CCGAGCTCCAGGAGAAGGCGAGA-3', 下游引物: 5'-GCTCTAGAGGTCCTGTTGGGTCCGT-3'。GAPDH 上游引物: 5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3', 下游引物的: 5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。

1.10 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析, 并用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间经 *t* 检验显著性差异, 以 $P < 0.05$ 作为有显著性差异。

2 结果

2.1 BMSCs 形态学变化

原代细胞刚接种时呈圆形亮点, 悬于培养液中, 24 h 大部分贴壁。48 h 首次换液, 去除未贴壁细胞, 此时细胞形态不一, 有小突起, 呈多角形, 短梭形或者多边形。5 ~ 6 d 细胞增殖迅速, 大部分呈扁平状。10 ~ 12 d 细胞融合呈单层。传代到第 3 代, 细胞形态较为一致, 呈纺锤形, 并平行样或漩涡样生长 (如图 1 所示)。

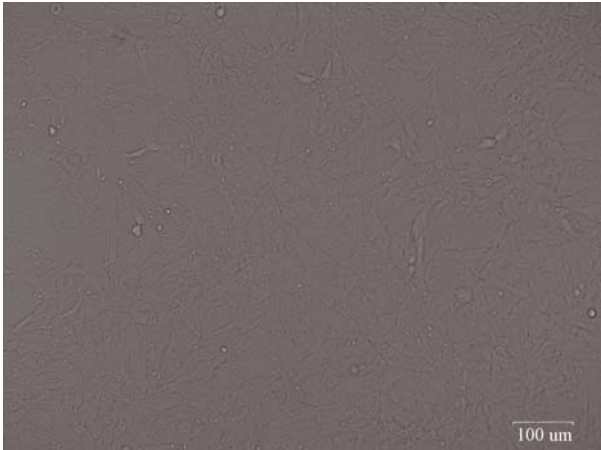


图 1 BMSCs 形态学 (第 3 代)
Fig. 1 The morphology of BMSCs (the third-passage)

2.2 BMSCs 表面抗原鉴定

如图 2 所示,经流式细胞术检测结果表明细胞表面抗原 CD90 阳性率高于 95%,CD34 及 CD45 阳性率低于 5%,从而说明本实验获得高纯度的

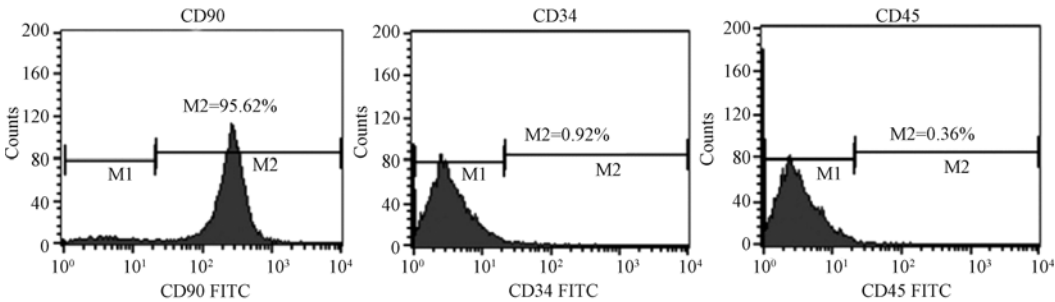


图 2 BMSCs 表面抗原鉴定
Fig. 2 Results of BMSCs surface antigen identification

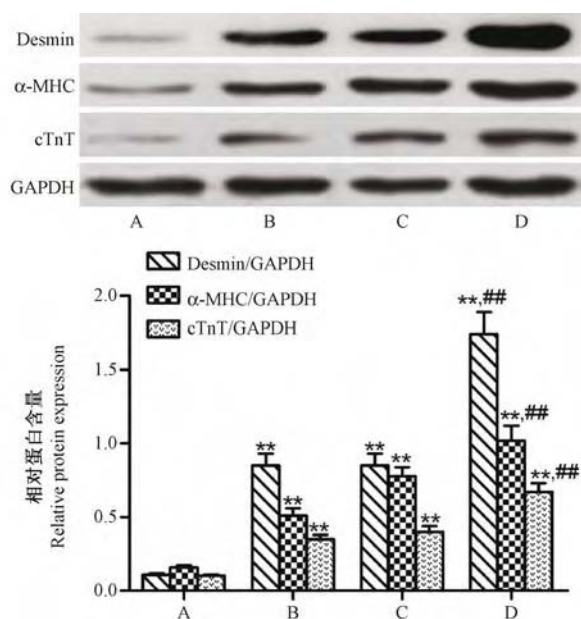
表 1 加味丹参饮对 BMSCs 的细胞毒性($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Cytotoxicity of BMSCs by Jiawei Danshen Yin ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度 (g/L) Drug dose (g/L)	OD 值 OD value	抑制率 (%) Inhibitory rate (%)
10	0.6429 ±	45.93
5	0.8024 ±0.0129	31.37
2.5	0.9347 ±0.0313	19.30
1.25	1.0463 ±0.0320	9.11
0.625	1.1632 ±0.03046	-1.55
0.312	1.2534 ±0.04727	-9.78
0.0156	1.2373 ±0.03962	-8.31
0.078	1.2042 ±0.0274	-5.29
0.039	1.1826 ±0.0195	-3.65
0.019	1.7305 ±0.03901	-3.32
细胞对照组 cell control group	1.1462 ±0.0296	0
空白对照孔 blank control group	0.0504 ±0.0049	-

BMSCs,能用于后续实验。
2.3 加味丹参饮对 BMSCs 的细胞毒性
如表 1 所示,当加味丹参饮提取物浓度高于 1.25 g/L,且随着药物浓度的增高,细胞增殖抑制率逐渐提高,而当加味丹参饮提取物浓度低于 0.625 g/L,且随着药物浓度降低,细胞增殖抑制率降低,且在此浓度时,细胞增值率为 -1.55%,即为加味丹参饮提取物对细胞无毒性最大浓度。
2.4 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白的表达

如图 3 所示,与正常组比较,加味丹参饮组,5-氮胞苷组及加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量显著提高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较,加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量显著提高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注: A: 正常对照组; B: 加味丹参饮组; C: 5-氮胞苷组; D: 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组。与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 3 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白的表达

Note: A: normal control group; B: Jiawei Danshen Yin group; C: 5-azacitidine group; D: Jiawei Danshen Yin + 5-azacitidine group. Compared with normal control group, ** $P < 0.01$; Compared with Jiawei Danshen Yin group or 5-azacitidine group, ## $P < 0.01$.

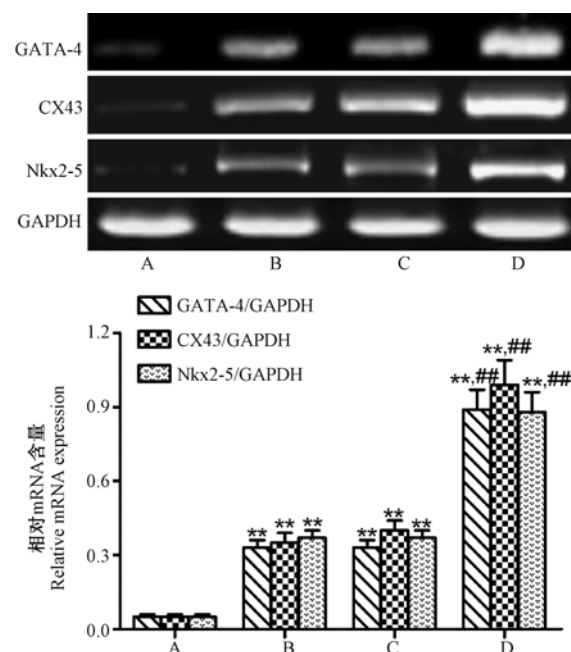
Fig. 3 Expression of Desmin, α -MHC and cTnT protein in BMSCs of each group

2.5 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 的表达

如图 4 所示, 与正常组比较, 加味丹参饮组, 5-氮胞苷组及加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤在中医学中归属于“胸痹心痛”“真心痛”等范畴。因此许多学者将中医药同 BMSCs 等干细胞相结合, 借助中药多靶点, 毒副作用小, 在 BMSCs 的增殖, 分化及移植过程中发挥减毒增效作用, 通过提高 BMSCs 体外存活率, 促进 BMSCs 增殖, 并诱导 BMSCs 定向分化, 减少 BMSC



注: A: 正常对照组; B: 加味丹参饮组; C: 5-氮胞苷组; D: 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组。与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 的表达

Note: A: normal control group; B: Jiawei Danshen Yin group; C: 5-azacitidine group; D: Jiawei Danshen Yin + 5-azacitidine group. Compared with normal control group, ** $P < 0.01$; Compared with Jiawei Danshen Yin group or 5-azacitidine group, ## $P < 0.01$.

Fig. 4 Expression of GATA-4, CX43 and Nkx2-5 mRNA in BMSCs of each group

移植过程中的毒副作用及不良反应^[5, 7]。中医药如三七总皂苷, 丹酚酸 B, 淫羊藿苷, 黄芪甲苷, 加味丹参饮在 BMSCs 定向分化为心肌细胞中起重要作用^[5-7]。其中加味丹参饮是黄政德教授结合自身经验, 并参考清代经典名方《时方歌括》中的丹参饮从而演化出来的, 其方主要包括丹参入血, 檀香行气化滞, 生地黄, 当归正濡养之本, 全方具有行气活血, 通络止痛之功效。临床上已证实加味丹参饮对血瘀证不稳定心绞痛具有显著改善作用^[8], 此外黄政德教授课题组还发现加味丹参饮能够联合动员大鼠骨髓干细胞, 从而提高心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌功能及治疗作用, 另外还发现加味丹参饮血清诱导的 BMSCs 移植对于心肌缺血再灌注大鼠具有显著的治疗作用, 与促进大鼠坏死心肌组织心肌特异性蛋白表达有关^[10-11]。从而说明加味丹参饮能够通过诱导 BMSCs 向心肌细胞分化, 进而恢复坏死

心肌细胞数量,达到心肌 IRI 治疗作用。

本研究首先通过贴壁法培养纯化大鼠 BMSCs,并通过流式细胞术检测 BMSCs 纯度,流式细胞术结果显示造血前体细胞标志抗原 CD34 及白细胞标志抗原 CD45 阳性率皆小于 5%,而 CD90 阳性率高于 95%,说明我们获得了高纯度的 BMSCs,可以用于后续的实验研究。我们采用 MTT 法检测不同浓度加味丹参饮[(10,5,2.5,1.25,0.625,0.312,0.156,0.078,0.039,0.019)g/L]对 BMSCs 的细胞毒性,结果表明 0.625 g/L 是加味丹参饮提取物对 BMSCs 的最大无毒性浓度,所以此浓度被我们用于后续研究。同时 5-氮胞苷是国内外通用的 BMSCs 定向诱导成心肌细胞的诱导剂,其是一种去甲基化合物,在一定剂量范围能显著的诱导 BMSCs,并移植到缺血心肌,从而提高 BMSCs 向心肌迁移及分化的能力^[15-17]。因此 5-氮胞苷被我们用来作为阳性对照。

Desmin, α -MHC, cTnT, CX43 是心肌特异性蛋白,其中 Desmin 是一种中间丝蛋白,是肌细胞中肌丝的主要成分,在肌纤维形态,细胞核与细胞膜连接,及肌小节信号间传递中起重要作用。 α -MHC 是肌球蛋白的重链,其表达水平是 BMSCs 等干细胞分化成心肌细胞的重要标志^[18]。cTnT 是心肌胶原纤维主要的收缩调节蛋白,能够调节粗、细肌丝的滑行,是检测心肌源性细胞的特异标志物。CX43 主要存在于心房及心室内,能够与桥粒,中间连接组成闰盘,当 CX43 呈阳性表达,说明心肌细胞具有闰盘结构,能够维持细胞间化学信号传递及信息交流,并能维持心肌细胞电生理活动,对心肌功能的发挥起重要作用^[19]。因此检测上述心肌特异性蛋白的表达,能一定程度上反映加味丹参饮诱导 BMSCs 分化成心肌细胞的能力,western blot 及 RT-PCR 结果表明与正常对照组比较,加味丹参饮组,5-氮胞苷组及加味丹参饮+5-氮胞苷组 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量显著上调, CX43 mRNA 表达量显著上调,且联合作用组优于单独给药组,说明加味丹参饮具有显著诱导 BMSCs 向心肌细胞分化的能力,且与 5-氮胞苷具有协调作用。

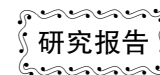
另外 GATA-4 是与心脏发育密切相关的转录因子,最早在心前期中胚层表达,后表达于心内膜和心肌中,对心肌细胞的发生分化起调节作用。有研究显示 GATA-4 阳性表达是胚胎干细胞向心肌细胞分化的启动因素,是心肌细胞发育的前提条件,是心肌前体细胞最早标志之一^[20]。Nkx-2.5 也是心

肌前体细胞的标志基因之一,与 GATA-4 之间存在相互调控作用,能共同调节心脏发育,心肌发生等过程^[21]。有研究证实外源性表达 Nkx2-5 基因能够诱导 P19 细胞向心肌细胞分化,同时上调 GATA-4, α -MHC, cTnT 等心肌特异性蛋白表达^[22]。因此本研究进一步通过 RT-PCR 检测 GATA-4 及 Nkx-25 mRNA 表达,结果证实加味丹参饮及 5-氮胞苷单独或者联合诱导皆能上调 GATA-4 及 Nkx-25 mRNA 表达。

参考文献:

- [1] 郭东梅,胡蓉.冠心病新的危险因素研究进展[J].重庆医学,2011,40(24):2462-2465.
- [2] 邱少波,梁燕.中药复方防治心肌缺血再灌注损伤作用机制研究进展[J].中国中医药信息杂志,2012,19(11):102-105.
- [3] 李宁,李应福,谢兴文,等.中药诱导骨髓间充质干细胞的定向分化:研究与进展[J].中国组织工程研究,2016,20(1):135-139.
- [4] 刘金峰,凌斌.骨髓间充质干细胞对心肌梗死治疗的研究进展[J].中国医学科学院学报,2015,37(1):108-112.
- [5] 王艳,王海萍,吕洋.中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化[J].中国组织工程研究,2014,18(1):155-160.
- [6] 唐梅森,黄政德,向忠军,等.加味丹参饮联合西药治疗冠心病心绞痛心血瘀阻证 68 例疗效观察[J].中医杂志,2015,56(5):395-397.
- [7] 杨春花,王庆高,何晓琳.加味丹参饮防治缺血心肌损伤研究概况[J].广西中医药大学学报,2013,16(4):73-75.
- [8] 吴若霞,汪云鑫,陈辉,等.加味丹参饮含药血清诱导 BMSCs 移植 IRI 大鼠对心肌 bFGF 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):238-242.
- [9] 李鑫辉,黄政德,葛金文,等.加味丹参饮对心肌 IRI 大鼠骨髓干细胞动员作用的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(6):723-725.
- [10] 王佳南,张晓刚,汤为学,等.大鼠骨髓间充质干细胞的原代培养条件[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(14):2740-2745.
- [11] Su X, Ling Y, Liu C, et al. Isolation, Culture, Differentiation, and Nuclear Reprogramming of Mongolian Sheep Fetal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells [J]. Cell Reprogram, 2015, 17(4): 288-296.
- [12] Liu HJ, Hu RY, Dai WJ, et al. Culture and Identification of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Enhanced Green Fluorescent Protein-transgenic Rats [J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2016, 38(1): 9-15.
- [13] Pirayei A, Soleimani M, Heidari MH, et al. Ultrastructural maturation of human bone marrow mesenchymal stem cells-derived cardiomyocytes under alternative induction of 5-azacytidine [J]. Cell Biol Int, 2015, 39(5): 519-530.

(上转第 5 页)



siRNA 沉默 Bmi-1 基因表达对宫颈癌细胞增殖的影响

张冬丽, 王 伟, 张红霞

(河南大学淮河医院妇产科, 河南 开封 475000)

【摘要】 目的 探讨 siRNA 沉默 B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 基因 (Bmi-1) 表达对宫颈癌细胞增殖的影响研究。**方法** 通过脂质体转染 siRNA Bmi-1 及阴性对照 (control) 到人宫颈癌 Hela 细胞, 采用 Realtime PCR 及 western blot 法检测细胞中 Bmi-1 的表达。MTT 法检测细胞活力, Annexin V-PI 流式双染及 Hoechst 染色检测细胞凋亡情况, 流式细胞术检测细胞周期, western blot 法检测细胞中 p16, p53, CyclinD1 及 Rb 的表达。**结果** 与 Control 组比较, siRNA Bmi-1 组细胞中 Bmi-1 蛋白及 mRNA 表达量皆显著降低 ($P < 0.01$), 同时细胞活力下降, 细胞凋亡率提高 ($P < 0.01$), 细胞周期阻滞在 G1 期 ($P < 0.01$), 细胞中 p16 表达量上调 ($P < 0.01$), p53 及 CyclinD1 表达量下调 ($P < 0.01$), Rb 磷酸化水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** Bmi-1 具有抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖的作用, 可能与调控细胞周期相关蛋白表达有关。

【关键词】 关键词 B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 基因 (Bmi-1); 宫颈癌 Hela 细胞; 增殖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0049-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.009

Effect of siRNA silencing Bmi-1 gene on cell proliferation of cervical cancer cells

ZHANG Dong-li, WANG Wei, ZHANG Hong-xia

(Department of Obstetrics and Gynecology of the Huaihe Hospital of Henan University, Henan Kaifeng, 475000, China)

【Abstract】 Objective To explore effect of siRNA silencing B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site (Bmi-1) gene expression on cell proliferation of cervical cancer cells. **Methods** Hela cells were transferred with control and siRNA Bmi-1. The expression of Bmi-1 in Hela cell was examined by Realtime PCR and western blot. The cell viability was detected by MTT. The cell apoptosis was examined by Annexin V-PI flow cytometry and Hoechst staining. Cell cycle was detected by flow cytometry. The expression of p16, p53, CyclinD1 and Rb was detected by western blot. **Results** Compared with control group, the expression of Bmi-1 protein and mRNA was down-regulated, the cell viability was decreased, cell apoptotic rate was increased, Cell cycle was arrested in the G1 phase, the expression of p16 was up-regulated, the expression of p53 and CyclinD1 down-regulated, the phosphorylation of Rb was inhibited in siRNA Bmi-1 group. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Bmi-1 inhibited Hela cell proliferation via regulation of expression of cell cycle related protein.

【Key words】 B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site (Bmi-1); Human cervical cancer Hela cells; Proliferation

[作者简介] 张冬丽 (1983 -), 女, 硕士生, 主治医师, E-mail: yjk20060701@163.com。

[通讯作者] 张红霞。

宫颈癌是常见妇科肿瘤,发病率居女性恶性肿瘤第二位,对女性身心健康造成严重危害,在我国,宫颈癌发病率及死亡率逐年上升,并呈现年轻化^[1-2]。宫颈癌发病机制复杂,是多种因素,多个阶段共同作用的结果。研究表明早婚早育,人乳头瘤病毒感染,遗传,环境,不健康性行为是导致宫颈癌发生的高危因素,除此之外,癌基因的激活与抑癌基因的失活也是宫颈癌发生的主要原因之一^[3]。B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 基因(B-cell specific moloney murine leukemia virus integration site, Bmi-1)是一种新近发现的被认为具有癌基因特性的基因,对于细胞衰老,永生化和细胞周期的调控具有重要作用^[4-6]。研究显示 Bmi-1 在多种肿瘤中皆呈现高表达状态,如乳腺癌,结肠癌,胃癌及肺癌等^[5, 7]。不无例外,国内外学者也在宫颈癌患者宫颈组织或者血浆中发现 Bmi-1 阳性表达皆高于正常宫颈组织,而且高表达的 Bmi-1 与临床分期,分化程度,肿瘤大小及淋巴结转移等密切相关,且证实 Bmi-1 是宫颈癌预后的独立影响因子^[8-11]。从而说明 Bmi-1 在宫颈癌中发挥着癌基因的作用,通过靶向 Bmi-1 可能可以作为宫颈癌治疗新的治疗方法。另外有研究证实下调宫颈癌 HeLa 细胞中 Bmi-1 表达,能显著的抑制肿瘤细胞克隆形成及小鼠体内成瘤^[12],但具体作用机制尚未见报道,所以本研究将在此基础上,利用 siRNA 干扰 HeLa 细胞中 Bmi-1 表达,进而探讨 Bmi-1 下调后,肿瘤细胞的增殖状况及相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

宫颈癌细胞 HeLa 购于中国科学院细胞库,目录号:TCHu187。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗 Bmi-1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);兔抗 p16, p53, CyclinD1, Rb, p-Rb, GAPDH 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Annexin V-PI 流式双染检测试剂盒, Hoechst 33258 染色试剂盒,细胞周期检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);siRNA Bmi-1 及 Control 订购于上海吉玛生物技术有限公司;四甲基偶氮唑盐(美国 Gibco 公司);胎牛血清, DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);Trizol 试剂盒,一步法 RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司)。迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪(北京六一仪

器厂);ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),AF6000 荧光显微镜(德国 Leica 公司),FACSCanto 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 siRNA Bmi-1 的转染

将宫颈癌细胞 HeLa 接种于 96、24 或 6 孔板,当细胞汇合度达到 50% 时,根据 Lipofectamine™2000 转染试剂盒将 siRNA Bmi-1 及 Control 转染到细胞中,转染 6 h 后,弃去转染液,并通过 Realtime PCR, western blot 检测转染效果。

1.4 Realtime PCR 检测 Bmi-1 mRNA 表达

采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA,接着一步法 RT-PCR 逆转录,最后 Realtime PCR 检测。引物由上海生工生物工程有限公司合成,如下:Bmi-1 上游引物:5'-GAGGGTACTTCATTGATGCCACAA-3',下游引物:5'-GCTGGTCTCCAGGTAACGAACAATA-3',长度 357 bp;GAPDH 上游引物:5'-GCACCGTC AAGGCTGAGAAC-3',下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGG-3',长度 402 bp。反转录体系为:总 RNA 模板 2 μ L(1 μ g)、dNTP 混合物 2 μ L、MgCl₂ 2 μ L、加 EDPC 补充蒸馏水至 25 μ L。反应参数为:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环次数为 40。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 mRNA 相对值。

1.5 MTT 法检测 HeLa 细胞活力

按“1.3”进行操作后,分别于 24、48、72、96 h 后,加入 MTT,继续培养 4 h 后吸弃培养液,每孔加入 DMSO,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 490 nm 处测 OD 值,以 OD 值表示细胞相对活力。

1.6 Annexin V-PI 流式双染检测 HeLa 细胞凋亡

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,避光染色 30 min 上机检测。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.7 Hoechst 染色检测 HeLa 细胞凋亡

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,后按照 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行操作,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 流式细胞术检测细胞周期

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,后按照细胞周期检测试剂盒说明书进行操作,在流式细胞仪中进行检测。

1.9 Western blot

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,加

入 RIPA 裂解液,裂解细胞,吸取上清液即可获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性并上样,进行 SDS 凝胶电泳 1~2 h,后湿法转膜 30~50 min。一抗 (Bmi-1, p16, p53, CyclinD1, Rb, p-Rb, GAPDH, 稀释度为 1:100) 孵育,4℃ 过夜;二抗室温孵育 1~2 h。在凝胶成像系统中曝光。并采用 “Quantity one” 软件分析各蛋白条带灰度值。

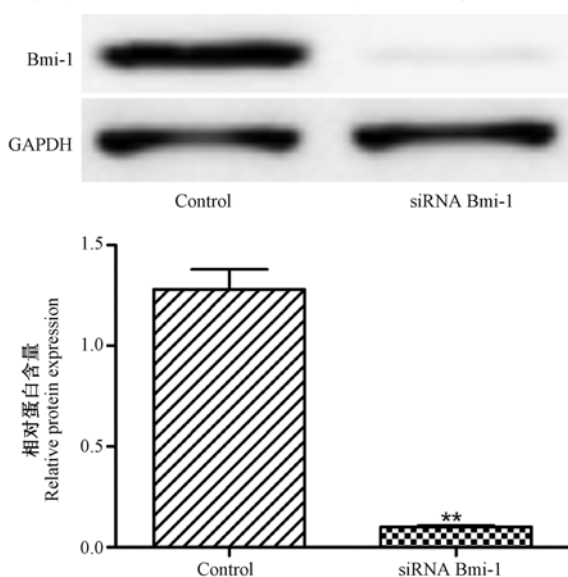
1.10 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 t 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA Bmi-1 转染效果的检测

如图 1 及图 2 所示,Control 组及 siRNA Bmi-1 组细胞中 Bmi-1 蛋白及 mRNA 表达量分别为 $[(1.23 \pm 0.12) \text{ vs } (0.13 \pm 0.01)]$ 及 $[(1.17 \pm 0.11) \text{ vs } (0.08 \pm 0.01)]$,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

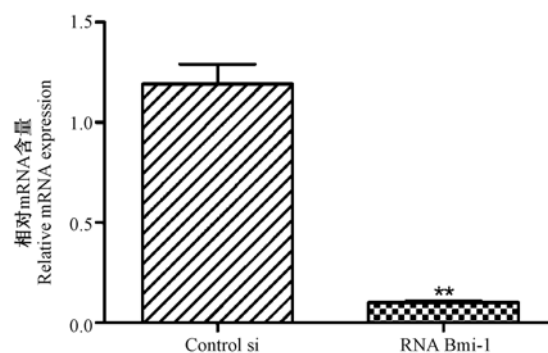
图 1 siRNA Bmi-1 转染后 Bmi-1 蛋白在 HeLa 细胞中的表达

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Expression of Bmi-1 protein in HeLa cells after transfection with siRNA Bmi-1

2.2 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞活力的影响

如图 3 所示,在作用 24、48、72、96 h 时,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组细胞活力显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。且在 48、72、96 h 时作用强度一致。

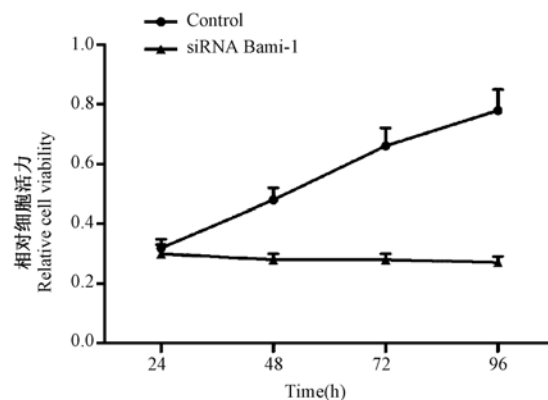


注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 siRNA Bmi-1 转染后 Bmi-1 mRNA 在 HeLa 细胞中的表达

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Expression of Bmi-1 protein in HeLa cells after transfection with siRNA Bmi-1



注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞活力的影响

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 Effect of siRNA Bmi-1 on HeLa cell viability

2.3 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞凋亡情况的影响

如图 4,图 5,表 2 所示,经流式双染及 Hoechst 染色发现,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组细胞凋亡率显著提高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

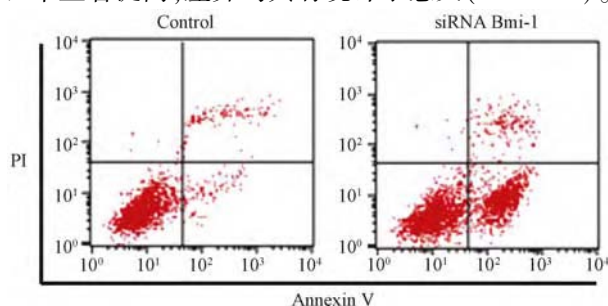


图 4 流式双染检测 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞凋亡的影响

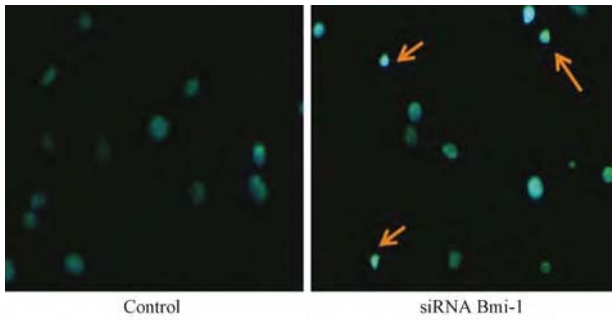
Fig. 4 Effect of siRNA Bmi-1 on HeLa cell apoptosis by flow cytometry double staining

表 1 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞凋亡情况的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of siRNA Bmi-1 on Hela cell apoptosis

组别 Group	流式细胞术检测结果(%) Results of flow cytometry (%)		Hoechst 染色结(%) Results of Hoechst staining (%)
	早期凋亡 Early apoptosis	晚期凋亡 Late apoptosis	
对照组 Control group	2. 26 ± 0. 16	4. 40 ± 0. 35	5. 98 ± 0. 52
siRNA Bmi-1 组 siRNA Bmi-1 group	5. 49 ± 0. 40 **	37. 82 ± 3. 73 **	39. 96 ± 4. 00 **

注:与 Control 组比较, ** $P < 0. 01$ 。
Note: Compared with control group, ** $P < 0. 01$.



注:→,细胞凋亡。

图 5 Hoechst 染色检测 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞凋亡的影响(× 20)

Note: →, cell apoptosis.

Fig.5 Effect of siRNA Bmi-1 on Hela cell apoptosis by Hoechst staining (× 20)

2.4 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞周期的影响

如图 6 所示,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组使细胞周期阻滞在 G1 期。

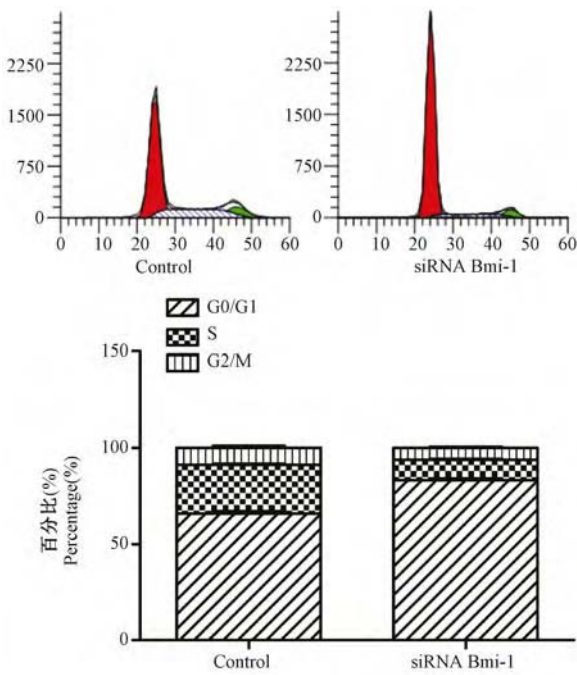
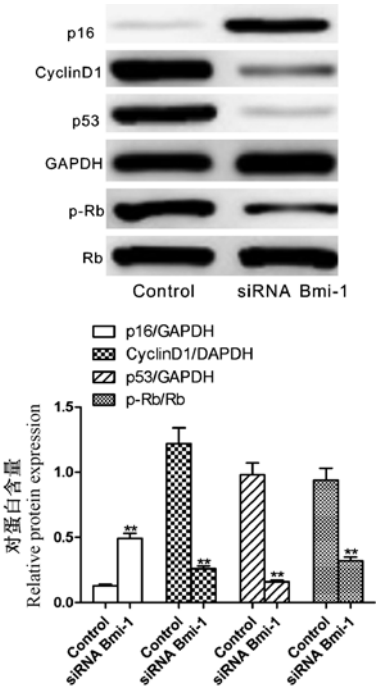


图 6 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞周期的影响

Fig.6 Effect of siRNA Bmi-1 on Hela cell cycle

2.5 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞周期相关蛋白表达的影响

如图 7 所示,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组细胞中 p16 表达量显著上调,CyclinD1 及 p53 表达量显著下调,Rb 磷酸化水平降低,差异均具有统计学意义($P < 0. 01$)。



注:与 Control 组比较, ** $P < 0. 01$ 。

图 7 siRNAB mi-1 对 Hela 细胞周期相关蛋白表达量的影响

Note: Compared with control group, ** $P < 0. 01$.

Fig.7 Effect of siRNA Bmi-1 on the expression of cell cycle related protein in Hela cell

3 讨论

宫颈癌同大多数肿瘤一样,是一种以细胞过度增殖及无限生长为特征的疾病,具体表现为肿瘤细胞增殖过度活跃,肿瘤组织生长异常迅速,进而恶性程度加剧,过程中最为主要的因素就是癌基因的

激活及抑癌基因的失活。Bmi-1 是 1991 年荷兰癌症中心在研究鼠淋巴瘤细胞中发现的一种核蛋白,属于多梳基因家族中的一员,并具有癌基因特性,因而被认为是一种原癌基因。Bmi-1 被认为可以通过多种途径参与细胞的自我更新,衰老及永生,其在多种肿瘤中高表达,并与肿瘤的发生,发展密切相关^[4-6]。近些年国内外研究发现 Bmi-1 与宫颈癌的发生,发展,转移,预后等一系列病理过程密切相关。如国内学者杨伟洪等^[8],桂影等^[9]发现宫颈癌患者宫颈组织中 Bmi-1 阳性率显著高于正常宫颈组织,且与临床分期,组织分化程度,淋巴结转移密切相关。国外 Tong 等^[10],Zhang 等^[11]研究证实宫颈癌患者宫颈组织及血浆中 Bmi-1 蛋白及 mRNA 表达量皆显著高于正常宫颈组织,且高表达的 Bmi-1 与临床分期,淋巴结转移,血管侵袭及人乳头瘤病毒感染密切相关,同时高表达的 Bmi-1 预示着宫颈癌患者预后差。上述研究提示了 Bmi-1 与宫颈癌的发生发展密切相关,在宫颈癌的形成及进展中起着癌基因的作用。此外 Zhang 等^[13]不仅证实了 152 例宫颈癌组织中 Bmi-1 高表达,阳性表达量高达 63.2%,高表达的 Bmi-1 与肿瘤大小,临床分期局部淋巴结转移密切相关。且通过 western blot 证实了 4 株宫颈癌细胞 (Hela, SiHa, Caski 及 C33A) 中 Bmi-1 表达高于正常宫颈上皮细胞。同时 Min 等^[12]研究表明 RNA 干扰介导的 Hela 细胞中 Bmi-1 表达量的下调,能显著的抑制 Hela 细胞生长,克隆形成,并抑制小鼠体内肿瘤形成。从而说明了 Bmi-1 作为宫颈癌的原癌基因,通过靶向下调其表达,能显著的抑制肿瘤的细胞增殖及进展。所以本研究在此基础上进一步探讨 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞增殖的影响及相关机制,首先通过 MTT 法,Annexin V-PI 流式双染及 Hoechst 染色证实 siRNA Bmi-1 能显著的降低 Hela 细胞活力,同时提高细胞凋亡率,说明下调 Hela 细胞中 Bmi-1 的表达,能显著的遏制肿瘤细胞的增殖,并诱导其凋亡,与 Min 等^[12]研究结果一致。

Bmi-1 作为一种癌基因,能通过调控其下游靶基因如 INK4a/ARF 的表达,从而抑制基因的转录。INK4a 是 Bmi-1 的负性调节位点,其编码 p16 INK4a (p16) 的表达,此蛋白是细胞周期依赖性蛋白抑制因子,当 Bmi-1 表达下调或者缺失时,通过上调 p16,能够抑制细胞周期蛋白 CyclinD1 与细胞周期素依赖蛋白激酶 4/6 (CDK4/6) 的结合,进而阻止

Rb 信号通路的激活,失去磷酸化形式的 Rb 能够与转录因子 E2F 结合,进而抑制基因转录,最终使得细胞周期停滞在 G1 期^[14]。另外 ARF 编码 p14 ARF 蛋白,此蛋白通过介导 MDM2,进而激活 p53。p53 不仅能够直接调节细胞凋亡相关蛋白表达从而影响细胞的增殖与凋亡,也能够通过调节细胞周期进而影响细胞的增殖状态。崔学江等^[15]研究表明 siRNA Bmi-1 对膀胱癌 EJ 细胞增殖的抑制作用,是通过上调 p16 及 p14 蛋白及 mRNA 表达实现的。刘霞等^[16]研究也表明 siRNA Bmi-1 能通过上调 p16 及端粒酶逆转录酶表达,从而抑制食管癌细胞株 EC9706 的增殖^[16]。Zheng 等^[17]研究表明 siRNA Bmi-1 能通过 p16/CyclinD1 信号通路抑制胰腺癌细胞增殖。但也有研究显示 siRNA Bmi-1 能显著的抑制肺腺癌细胞 SPC-A1 增殖,并使细胞周期阻滞在 G1 期,但此过程并不依赖于 p16 所介导的 CyclinD1 来实现的^[18]。我们的研究显示 siRNA Bmi-1 不仅能下调 p16 表达,还能显著的下调 CyclinD1 表达及 Rb 磷酸化水平,同时下调 p53 表达,最终使得细胞周期阻滞在 G1 期,此结论与大多数研究一致^[15-17, 19],从而说明 siRNA Bmi-1 能通过 p16/CyclinD1/Rb 及 p53 信号通路,从而遏制 Hela 细胞的增殖。

综上所述,siRNA Bmi-1 能显著的降低宫颈癌 Hela 细胞活力,抑制细胞增殖,并诱导细胞凋亡,可能与调节其下游信号通路 p16/CyclinD1/Rb 及 p53 有关。同时有文献也报道 Bmi-1 也可通过 PI3K/AKT 信号通路影响胰腺癌细胞的增殖^[20],且此信号通路是经典的抗凋亡通路,本课题组可以进一步探讨 Bmi-1 是否也可以通过此信号通路影响宫颈癌细胞的增殖,凋亡等生物学行为。

参考文献:

- [1] 王妍,何慧仪. 宫颈癌相关基因的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(16):1316-1320.
- [2] Larmour LI, Jobling TW, Gargett CE. A Review of Current Animal Models for the Study of Cervical Dysplasia and Cervical Carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2015, 25(8): 1345-1352.
- [3] 刘冬菊,姚宇,黄文革. 姜黄素抑制人宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠移植瘤的生长[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(2):7-10.
- [4] 莫利花,凌文,陈赛. BMI-1 基因与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国当代医药,2013,20(30):14-16.
- [5] 陈圣霖,陈念平. Bmi-1 基因与恶性肿瘤相关性研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(7):626-629.

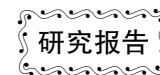
- [6] 杨晓霞,孙世仁. Bmi-1 基因研究进展[J]. 医学综述,2016,22(5):890-892.
- [7] Gavrilescu MM, Todosi AM, Anitei MG, *et al.* Expression of bmi-1 protein in cervical, breast and ovarian cancer [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2012, 116(4): 1112-1117.
- [8] 杨伟洪. Bmi-1、P 选择素在宫颈癌组织中的表达[J]. 白求恩医学杂志,2014,12(6):587-588.
- [9] 桂影,黄志红,王丽娟. 老年宫颈癌患者 Bmi-1 蛋白检测的临床意义[J]. 中国老年学杂志,2013,33(7):1656-1657.
- [10] Tong YQ, Liu B, Zheng HY, *et al.* Overexpression of BMI-1 is associated with poor prognosis in cervical cancer [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2012, 8(4): e55-e62.
- [11] Zhang X, Wang C, Wang L, *et al.* Detection of circulating Bmi-1 mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for uterine cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 131(1): 165-172.
- [12] Min L, Dong-Xiang S, Xiao-Tong G, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of Bmi-1 expression in human cervical cancer [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2011, 90(7): 737-745.
- [13] Zhang X, Wang CX, Zhu CB, *et al.* Overexpression of Bmi-1 in uterine cervical cancer: correlation with clinicopathology and prognosis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(9): 1597-1603.
- [14] 姚尧,邹扬. Bmi-1、p16 基因与实体瘤关系的研究进展[J]. 实用医学杂志,2009,25(18):3162-3164.
- [15] 崔学江,朱定军,韩金利,等. siRNA 干扰 BMI-1 基因对膀胱癌 EJ 细胞增殖的调控作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(8):1519-1524.
- [16] 刘霞,曹关义,程慧敏,等. Bmi-1-siRNA 对食管癌细胞株 EC9706 的影响[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(1):8-12.
- [17] Zheng X, Wang Y, Liu B, *et al.* Bmi-1-shRNA inhibits the proliferation of lung adenocarcinoma cells by blocking the G1/S phase through decreasing cyclin D1 and increasing p21/p27 levels [J]. Nucleic Acid Ther, 2014, 24(3): 210-216.
- [18] 王艺芳,刘奔,刘纯青,等. Bmi-1-siRNA 抑制肺腺癌 SPC-A1 细胞的增殖及其机制[J]. 中国癌症杂志,2014,24(5):333-341.
- [19] 郑翔宇,朱杰,王艺芳,等. Bmi-1-siRNA 对肺腺癌 A549 细胞体外增殖能力的影响[J]. 中国癌症杂志,2013,23(7):505-511.
- [20] Wang MC, Jiao M, Wu T, *et al.* Polycomb complex protein BMI-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer stem cells by activating PI3K/AKT signaling, an ex vivo, in vitro, and in vivo study [J]. Oncotarget, 2016, 7(8): 9586-9599.

[修回日期]2016-06-28

(下接第 71 页)

- [9] Castellani M L, Anogeianaki A, Felaco P, *et al.* IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4⁺ CD25⁺ Treg Cells [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(2): 131-135.
- [10] Cross AH, Stark JL. Humoral immunity in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunol Res, 2005(32):85-97.
- [11] Kennard S, Liu H, Lilly B. Transforming growth factor-beta (TGF-1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression[J]. J Biol Chem, 2008, 283(3):1324-33.
- [12] Delgado M, Robledo D, Rueda B, *et al.* Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4):1010-1019.
- [13] Youjin Lee, Amit Awasthi, Nir Yosef, *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells[J]. Nat Immunol, 2012, 13(10): 991-999.
- [14] Xie S, Li J, Wang JH, *et al.* IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to up regulate the expression of regulators of G-protein signaling 16 [J]. J Immunol, 2010, 184(5): 2289-2296.
- [15] Peron J P, Yang K, Chen M L, *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice[J]. J Neuroimmunol, 2010, 227(1-2): 10-17.
- [16] Haile Y, Simmen KC, Pasichnyk D, *et al.* Granule-derived granzyme B mediates the vulnerability of human neurons to T cell-induced neurotoxicity [J]. J Immunol, 2011, 187(9): 4861-72.
- [17] Han Y, Yang Y, Chen Z, *et al.* Human hepatocellular carcinoma-infiltrating CD4⁺ CD69⁺ Foxp3⁻ regulatory T cell suppresses T cell response via membrane-bound TGF-β1 [J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(5):539-50.
- [18] ka AgnieszBaranowska-Bik, Jan Kochanowski, Dorota Uchman, *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis[J]. Journal of Neuroimmunology, 2013, 263(8):159-161.
- [19] Yadav, M, Rosenbaum, J, Goetzl, E. J. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile[J]. J. Immunol, 2008, 180(2), 2772-2776.
- [20] Jimeno, R, Leceta, J, Martínez, C, *et al.* Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells [J]. Mol. Neurosci, 2014, 54(6): 512-525.

[修回日期]2016-07-28



miR-34a 通过靶向调控 Notch1 表达影响 乳腺癌细胞的增殖

高砚春

(川北医学院附属医院甲状腺乳腺外科, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨 miR-34a 通过靶向调控 Notch1 表达影响乳腺癌细胞的增殖。**方法** 乳腺癌细胞 MCF-7 转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC, RT-PCR 法检测细胞中 miR-34a 表达, MTT, 克隆形成实验, Hoechst 染色及流式细胞术分别检测 miR-34a mimics 对乳腺癌 MCF-7 细胞活力、克隆能力、凋亡情况及细胞周期的影响; 通过双荧光素酶报告基因实验, western blot 及 RT-PCR 检测 Notch1 是否是 miR-34a 的下游靶基因。**结果** 与 miR-34a NC 比较, miR-34a mimics 组中 miR-34a 表达量上调, 细胞活力降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率显著提高 ($P < 0.01$), 细胞克隆数目减少 ($P < 0.01$), 细胞周期阻滞在 G1 期 ($P < 0.01$), Notch1 蛋白及 mRNA 表达量都显著降低 ($P < 0.01$), 同时荧光素酶报告基因实验也证实 miR-34a mimics 能与报告基因结合。**结论** miR-34a mimics 能通过负性调控 Notch1 表达, 从而显著的抑制 MCF-7 乳腺癌细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。

【关键词】 miR-34a; Notch1; 乳腺癌细胞 MCF-7; 增殖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0055-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.010

Inhibitory effect of miR-34a on the proliferation of breast cancer cell by targeting Notch1

GAO Yan-chun

(Department of thyroid and breast surgery of the Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College,
Sichuan Nanchong, 637000, China)

【Abstract】 Objective To explore inhibitory effect of miR-34a on the proliferation of breast cancer cell MCF-7 by targeting Notch1. **Methods** MCF-7 cells were transferred with miR-34a mimics and miR-34a NC. The expression of miR-34a in MCF-7 cell was examined by RT-PCR. The cell viability was detected by MTT. The cell apoptosis was examined by Hoechst staining. Cell cycle was detected by flow cytometry. Western blot, RT-PCR and dual luciferase reporter gene assay was to detect whether Notch1 was a downstream target gene of miR-34a. **Results** Compared with miR-34a NC group, the expression of miR-34a was up-regulated, the cell viability was decreased, cell apoptotic rate was increased, cell cycle was arrested in the G1 phase, the expression of Notch1 protein and mRNA was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-34a mimics inhibited MCF-7 cell proliferation and induced cell apoptosis via targeting regulation expression of Notch1.

【Key words】 miR-34a; Notch1; breast cancer cell MCF-7; proliferation

乳腺癌是女性较容易患的恶性肿瘤之一,是导致女性癌症死亡的第二大原因,在我国及全世界范围内发病率都呈上升趋势。尽管近年来放疗、化疗以及生物治疗技术的不断发展,使得乳腺癌患者的预后及生存期获得了很大改善,但是乳腺癌复发率及难治率仍居高不下^[1]。因此寻找有效的诊断及治疗方法是乳腺癌研究一直以来的关注点。Notch 是 1917 年美国著名遗传学家 Thomas 在果蝇缺口翅膀中发现并命名的,并于 1980 年克隆成功。Notch 包括配体,受体及下游效应分子。其中受体包括 4 种,分别为 Notch1, Notch2, Notch3, Notch4。研究显示 Notch 信号通路在包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中高表达,特别是 Notch1^[2-3]。Notch1 在乳腺癌中高表达^[4],沉默 Notch1 表达能显著的抑制 MCF-7 细胞增殖,并诱导细胞凋亡^[5]。同时研究也表明 Notch1 的高表达与 miRNA 的异常表达密切相关^[6-8],从而提示 miRNA 可能通过调控 Notch1 表达从而影响肿瘤的增殖与凋亡等生物学行为。

miRNA 是一类高度保守的非编码内源性 RNA 分子,长度大约为 19-23 nt,能通过结合于其下游靶基因 3'端非编码区,从而调控靶基因的转录,进而影响细胞的生物学行为。研究表明 miR-34a 能与 Notch1 报告基因结合,从而影响结肠癌 SW480 细胞,膀胱癌细胞 T24 细胞的增殖作用^[7-8]。但对于在乳腺癌中 miR-34a 是否能够通过靶向 Notch1 表达从而影响 MCF-7 细胞的增殖还未见报道,所以本研究将对此展开研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人乳腺癌细胞 MCF-7 购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂

兔抗 Notch1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);四甲基偶氮唑盐(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L),BCA 试剂盒,Hoechst 33258 染色试剂盒,细胞周期检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);LipofectamineTM 2000,trizol 试剂盒,一步法 RT-PCR 试剂盒(大连宝生生物有限公司);野生型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Wt,突变型载体 pmir-RB-ReportTM

3' UTR-Mut,miR-34a mimics 及 miR-34a NC(广州市锐博生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器

迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪(北京六一仪器厂);ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);SMA2000 型微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

当 MCF-7 细胞汇合度达到 50% 左右时候,利用 LipofectamineTM 2000 脂质体转染试剂盒分别转染 miR34a NC、miR-34a mimics,6 h 以后换成含 10% 血清的 DMEM 培养基;37℃,CO₂培养箱培养 48 h。应用 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 的表达。

12.2 MTT 法检测细胞活力

将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后,加入 20 μL 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后,将上清液舍弃,并每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560 nm 处测 OD 值,OD 值即代表细胞活力。

1.2.3 集落形成实验

将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板,按“1.2.1”进行转染,48 h 后,用含 10% 甲醛和 0.1% 结晶紫染液固定染色,室温中放置 30 min。轻轻甩去染色液,用蒸馏水洗涤各孔,将培养板倒置于吸水纸上吸干水分,然后拍照分析。

1.2.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,后按照 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行操作,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 3 次,加入 Hoechst 33258 染色液避光染色 15 min,PBS 洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后,按细胞周期检测试剂盒说明书进行检测:用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,离心,并重悬,接着加入 5 μL 终浓度为 10 mg/mL 的 Rnase,37℃孵育 1 h,再加入 碘化丙啶染液,室温下避光染色 30 min,用流式细胞仪进行细胞周期检测分析。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 及 Notch1

mRNA 表达

参考 Trizol 试剂盒使用说明书提取总 RNA,并用微量紫外分光光度计检测 RNA 的纯度,通过一步法 RT-PCR 试剂盒将逆转录 RNA,并进行 PCR 扩增,最后将扩增产物用于 2% 的琼脂糖胶电泳。引物如下,Notch1 上游引物:5'-GTCAACGCCGTAGATGACCT-3',下游引物:5'-TCTCCTCCCTGTTGTTCTGC-3'; GAPDH 上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3',下游引物:5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。引物分别加入 25 μ L PCR 反应体系中,反应条件为 94℃ 变性 45 s,59℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环。

1.2.7 Western blot 检测细胞中 Notch1 蛋白表达

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染,48 h 收集细胞,加入细胞裂解液,裂解 30 min 后,4℃,10000 r/min 离心 10 min,吸取上清,即可获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,后湿法转膜 30 min。将膜浸入一抗溶液(兔抗 Notch1 多克隆抗体,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,稀释比例:1:100)孵育,4℃ 过夜;次日二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L),稀释比例:1:200)室温孵育 1 h。并在膜上滴加 ECL 曝光液,于凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.2.8 荧光素酶报告基因表达分析

miR-34a 及 Notch1 重组载体共转染到 MCF-7 细胞中。分组如下:miR-34a mimics + Wt Notch1, miR-34a NC + Wt Notch1, miR-34a mimics + Mut Notch1, miR-34a NC + Mut Notch1。应用双荧光素酶检测系统检测转染好的荧光素酶活性,计算公式:相对荧光值 = 萤火虫荧光素酶荧光值/海肾荧光素酶荧光值。

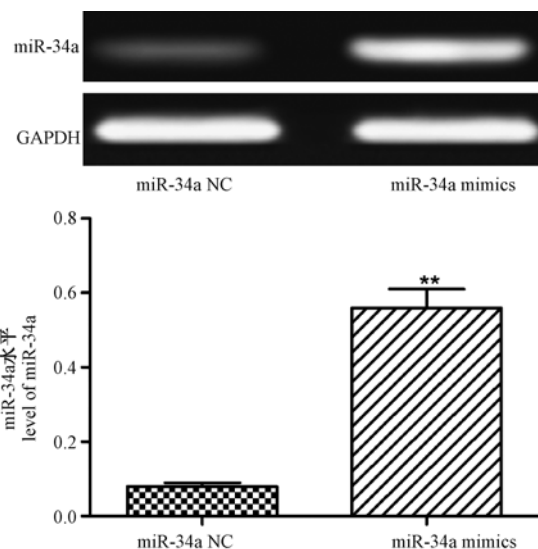
1.2.9 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析,至少重复三次并用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 t 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 miR-34a 转染效果的检测

如图 1 所示,与 miR-34a 组比较,miR-34a mimics 组中 miR-34a 表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

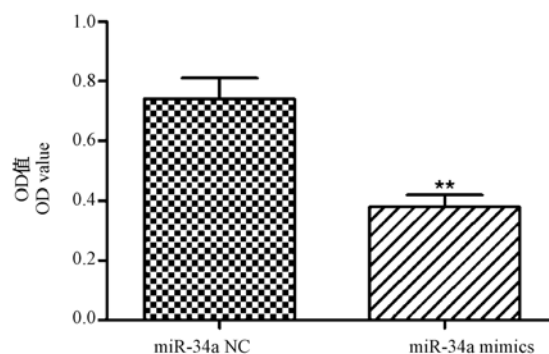
图 1 miR-34a 转染效果的检测

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Detection of transfection efficiency of miR-34a

2.2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力及克隆数目的影响

如图 2 MTT 结果所示,与 miR-34a NC 组比较,miR-34a mimics 组中细胞活力显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。如图 3 细胞克隆实验结果所示,与 miR-34a NC 组 (128.57 ± 10.69) 比较,miR-34a mimics 组 (34.59 ± 3.46) 中细胞克隆数目显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

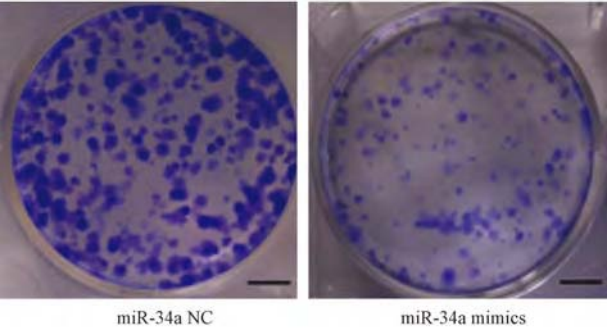
图 2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力的影响

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability

2.3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响

如图 4 流式细胞术结果所示,与 miR-34a NC 组比较,miR-34a mimics 组中细胞周期 G1 期显著延



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞克隆能力的影响

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig.3 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell clone viability

表 1 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability

组别 Group	G1 期 G1 phase	S 期 S phase	G2 期 G2 phase
miR-34a NC	68.58 $\pm$ 2.59	21.73 $\pm$ 2.04	9.69 $\pm$ 0.45
miR-34a mimics	81.47 $\pm$ 2.45 **	13.53 $\pm$ 1.46 **	5.00 $\pm$ 0.44 **

注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

2.4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响

如图 5 Hoechst 染色结果所示,与 miR-34a NC 组(3.56 ± 0.36)比较,miR-34a mimics 组(36.48 ± 3.65)细胞凋亡率显著提高,差异具统计学意义($P < 0.01$)。

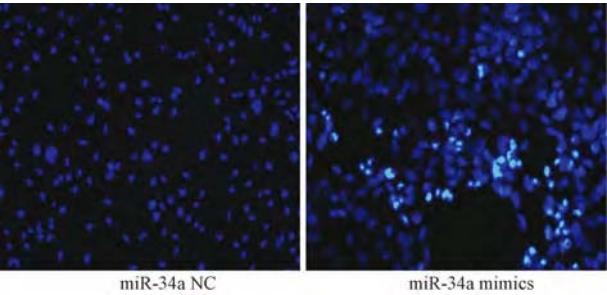


图 5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响 ($\times 20$)

Fig.5 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell apoptosis ($\times 20$)

2.4 荧光素酶报告基因表达分析

将 miR-34a mimics、miR-34a NC 及野生型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Wt、及突变型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Mut 转入 MCF-7 细胞中,结果发现,miR-34a mimics 与野生型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Wt 共转染组的荧

光信号强度明显弱于其它转染组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明 miR-34a mimics 能使细胞周期显著阻滞在 G1 期。

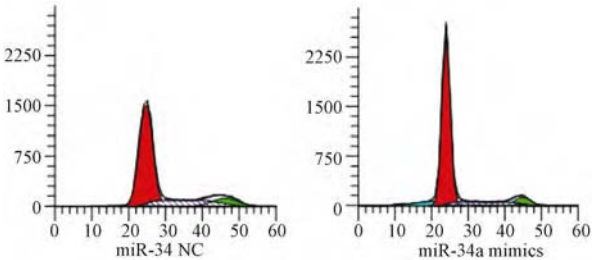
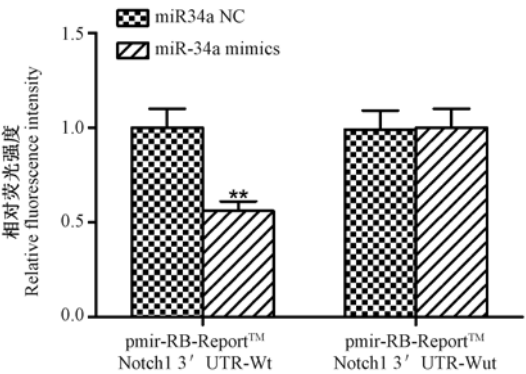


图 4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability

光信号强度明显弱于其它转染组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。而对于突变型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Mut 来说,各组间荧光强度无任何差别($P > 0.05$),说明 Notch1 是 miR-34a 下游靶基因(图 6)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

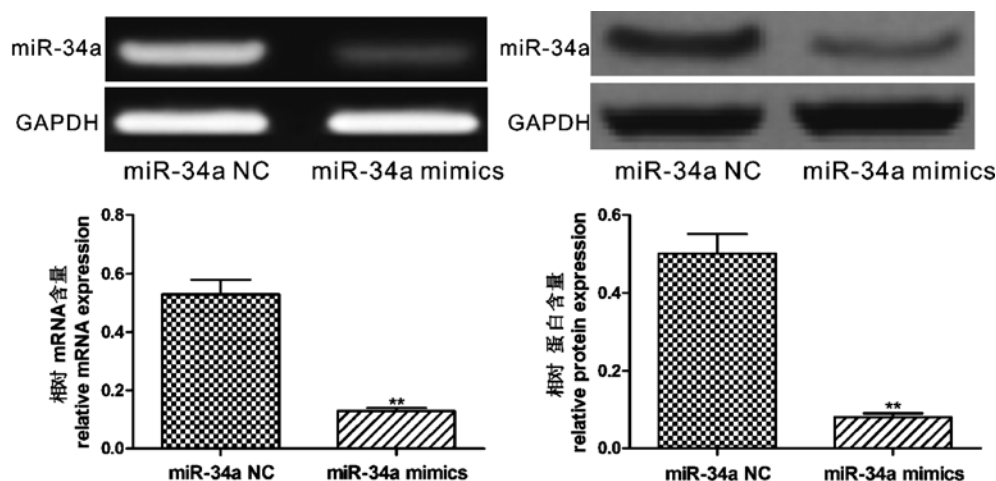
图 6 荧光素酶报告基因表达分析

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig.6 Luciferase reporter gene expression analysis

2.5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量的影响

如图 7 所示,与 miR-34a NC 组比较,miR-34a mimics 组中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 7 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量的影响

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig. 7 Effect of miR-34a mimics on the expression of Notch1 protein and mRNA MCF-7 cell

3 讨论

miRNA 具有癌基因或抑癌基因的作用,能够结合于靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,阻遏靶基因的翻译,从而抑制靶基因表达,并与肿瘤的发生发展密切相关,在肿瘤的增殖,凋亡,侵袭转移中起重要作用^[9-10]。miR-34 家族是一类高度保守的 miRNA,广泛存在于节肢动物及哺乳动物中,包括三个同源基因,即 miR-34a, miR-34b, miR-34c。其中 miR-34a 是 miR-34 基因突变的结果,染色体定位于 1p36.23,且能够广泛存在肺以外的所有正常组织中,而 miR-34b 及 miR-34c 是 miR-34 串联形成的,在肺以外的正常组织中表达量有限^[11]。研究认为 miR-34 家族是具有抑癌作用的 miRNA,miR-34 家族在包括乳腺癌在内的大多数肿瘤组织中低表达,特别是 miR-34a,miR-34a 的异常表达可作为乳腺癌患者患瘤风险,诊断,预后的标志^[11]。而且 miR-34a 表达量上调后对膀胱癌细胞,结肠癌细胞的增殖具有显著的影响^[7-8]。因此我们推测 miR-34a 对乳腺癌细胞的增殖凋亡等生物学行为也具有显著的影响作用,所以本研究在此推论上,首先通过脂质体转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC,RT-PCR 检测转染后 MCF-7 细胞中 miR-34a 的表达,结果表明 miR-34 mimics 转染成功,接着通过 MTT 法及克隆实验证实了 miR-34a mimics 能显著的降低 MCF-7 细胞活力及细胞克隆数目,说明 miR-34a mimics 对 MCF 细胞增殖具有显著的抑制作用。Hoechst 染色

结果也证实了结论,也与 Nie 等^[12],Zhao 等^[13]研究 miR-34a mimics 在食管鳞状细胞癌细胞,骨肉瘤细胞中的作用一致。另外肿瘤细胞的恶性增殖,说明了肿瘤细胞周期的紊乱及不可控,且大多数抗癌药物也通过调控细胞周期的变化来发挥其疗效的,所以本研究接着采用流式细胞术检测 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响,结果表明 miR-34a mimics 能延长 MCF-7 细胞周期,使细胞周期阻滞在 G1 期,并缩短 G2 和 M 期,从而阻断了细胞的有丝分裂及 DNA 复制,进一步的说明了 miR-34a mimics 对 MCF 细胞增殖的抑制作用,与 Ghawanmeh 等^[14]研究观点一致。

miRNA 对细胞生物学行为的调控作用基本都是基于其对下游靶基因的调控作用,miR-34a 也不例外。有学者通过生物软件预测发现 Notch1 可能是 miR-34a 的下游靶基因之一,且此基因与细胞增殖密切相关^[7,8]。Notch1 是 1991 年在人类 T 淋巴细胞白血病中被鉴定出来,并被证实与肿瘤的发生发展密切相关。Notch1 是由 RAM 结构区,6 个与细胞周期相关的重复区,2 个细胞核定位信号,富含谷氨酸区及 PEST 序列构成的。研究显示 Notch1 与肿瘤的生长,分化,凋亡密切相关^[15]。而且本研究的双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-34a mimics 能显著的与 Notch1 的 3' 端结合,接着 western blot 及 RT-PCR 也证实了较 miR-34a NC 比较,miR-34a mimics 组中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量均显著下调,从而说明了 Notch1 是 miR-34a 的下游靶基因,

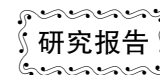
而且干扰 Notch1 表达能显著的抑制 MCF-7 增殖^[5],进而得出 miR-34a mimics 通过靶向下调 Notch1 表达,从而抑制 MCF 细胞的增殖。

综上所述,miR-34a mimics 能通过靶向负调控 Notch1 表达,诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡,并抑制细胞增殖,使细胞周期阻滞在 G1 期。此外研究还证实 p53 基因能与 miR-34a 启动子结合,从而激活 miR-34a 的转录,而在肿瘤组织中 p53 发生突变,导致 miR-34a 的转录受到抑制,呈低表达状态^[16]。而且另有大量研究表明 p53 与 Notch1 之间也存在着直接的联系^[17]。从而提示了 MCF-7 细胞中 miR-34a 对于 Notch1 的调控作用可能与 p53 信号通路有关,将是本课题组将来的研究方向。

参考文献:

- [1] Dubey A K, Gupta U, Jain S. Breast cancer statistics and prediction methodology: a systematic review and analysis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015,16(10):4237-4245.
- [2] Yun J, Espinoza I, Pannuti A, *et al.* p53 Modulates Notch Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells by Associating With the Notch Transcriptional Complex Via MAML1 [J]. J Cell Physiol, 2015,230(12):3115-3127.
- [3] D'Angelo R C, Ouzounova M, Davis A, *et al.* Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity [J]. Mol Cancer Ther, 2015,14(3):779-787.
- [4] Yuan X, Zhang M, Wu H, *et al.* Expression of Notch1 Correlates with Breast Cancer Progression and Prognosis [J]. PLoS One, 2015,10(6):e131689.
- [5] 毛俊,牟秋菊,李连宏,等. RNA 干扰 Notch1 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2012,28(1):11-14.
- [6] Zhang H D, Sun D W, Mao L, *et al.* MiR-139-5p inhibits the biological function of breast cancer cells by targeting Notch1 and mediates chemosensitivity to docetaxel [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015,465(4):702-713.
- [7] 张超,姚志勇,朱鸣阳,等. MicroRNA-34a 通过 Notch1 对膀胱肿瘤细胞株 T24 增殖的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2012,37(5):426-430.
- [8] 邵新宏,于游,张才全. miR-34a 靶向调控 NOTCH1 基因对 SW480 细胞增殖的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2012,34(22):2297-2301.
- [9] Kaboli P J, Rahmat A, Ismail P, *et al.* MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment [J]. Pharmacol Res, 2015, 97:104-121.
- [10] Rothschild S I. microRNA therapies in cancer [J]. Mol Cell Ther, 2014,2(1):1-8.
- [11] 巩雅宁,刘为青,董坚. miR-34a 对肿瘤发生发展调控作用的最近研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2013,42(6):6-9.
- [12] Nie J, Ge X, Geng Y, *et al.* miR-34a inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting Yin Yang-1 [J]. Oncol Rep, 2015,34(1):311-317.
- [13] Zhao H, Ma B, Wang Y, *et al.* miR-34a inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by repressing the expression of CD44 [J]. Oncol Rep, 2013,29(3):1027-1036.
- [14] Ghawanmeh T, Thunberg U, Castro J, *et al.* miR-34a expression, cell cycle arrest and cell death of malignant mesothelioma cells upon treatment with radiation, docetaxel or combination treatment [J]. Oncology, 2011,81(5-6):330-335.
- [15] Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, *et al.* Micro RNA 34a and Let-7a Expression in Human Breast Cancers is Associated with Apoptotic Expression Genes [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016,17(4):1887-1890.
- [16] Javeri A, Ghaffarpour M, Taha M F, *et al.* Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis [J]. Med Oncol, 2013,30(1):413.
- [17] Yun J, Espinoza I, Pannuti A, *et al.* p53 Modulates Notch Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells by Associating With the Notch Transcriptional Complex Via MAML1 [J]. J Cell Physiol, 2015,230(12):3115-3127.

[修回日期]2016-07-28



miR-34a 通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞的生物学行为

王雷

(河南大学附属淮河医院甲状腺乳腺外科, 河南 开封 475001)

【摘要】 目的 探讨 miR-34a 通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞的生物学行为。**方法** 乳腺癌细胞 MCF-7 分为 miR-34a 及 Control 组, 分别利用脂质体转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC, RT-PCR 法检测细胞中 miR-34a 表达, MTT、Hoechst 染色及 transwell 法分别检测细胞活力、凋亡及侵袭情况; western blot 检测细胞中 Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 蛋白表达情况。**结果** 与 Control 组比较, miR-34 mimics 组中 miR-34a 表达量上调, 细胞皱缩, 变圆变亮, 细胞活力降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率显著提高 ($P < 0.01$), 细胞侵袭数目减少 ($P < 0.01$), Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 蛋白表达量都显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** miR-34a mimics 通过抑制 Notch 信号通路进而诱导 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡并抑制其侵袭。

【关键词】 miR-34a; Notch 信号通路; 乳腺癌细胞 MCF-7; apoptosis; 侵袭

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0061-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.011

Effect of miR-34a on the biological behavior of breast cancer cell by Notch signal pathway

WANG Lei

Thyroid and breast surgery, Huaihe Hospital Affiliated to Henan University, Kaifeng, Henan, 475001 China

【Abstract】 Objective To explore effect of miR-34a on the biological behavior of breast cancer cell MCF-7 by Notch signal pathway. **Methods** The MCF-7 cells were divided into miR-34a and Control groups. The miR-34a mimics and miR-34a NC were transfected by liposome. The expression of miR-34a in MCF-7 cell was examined by RT-PCR. The cell viability was detected by MTT. The cell apoptosis was examined by Hoechst staining. The cell invasion was detected by transwell method. The expression of Notch1, Notch2, Dll1 and Jagged-1 was detected by western blot. **Results** Compared with Control group, the expression of miR-34a was up-regulated ($P < 0.01$), Cell shrinkage, rounded brighten, the cell viability was decreased ($P < 0.01$), cell apoptotic rate was increased ($P < 0.01$), cell invasion number was reduced ($P < 0.01$), the expression of Notch1, Notch2, Dll1 and Jagged-1 was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-34a mimics induced MCF-7 cell apoptosis and inhibited cell invasion via inhibition of Notch signal pathway.

【Key words】 miR-34a; Notch signal pathway; breast cancer cell MCF-7; apoptosis; invasion

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤之一, 其死亡率 均女性恶性肿瘤第二位, 且死亡率在全国甚至全世

界范围均呈上升趋势^[1-2]。近年来随着化疗、放疗及生物技术手段的普及,乳腺癌患者的预后得到很大改善,但其发病率及难治率还是居高不下,因此寻找有效的诊断及治疗方法一直是乳腺癌等肿瘤研究的重点^[3-4]。Notch 是美国著名遗传学家 Thomas 于 1917 年在果蝇的研究中发现并命名的,并于 1980 年克隆成功。Notch 信号通路包括 Notch 受体(Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), Dll-like 配体(Dll1, 3, 4)及 Jagged 配体(Jagged-1, Jagged-2)。研究已经表明 Notch 信号通路的异常表达与乳腺癌的发生发展密切相关,同时针对 Notch 信号通路的抑制剂或单克隆抗体已逐渐应用于乳腺癌的治疗中^[5-7]。

miRNA 是一类内源性非编码的 RNA 分子,长度约为 19-23 nt,能与下游靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区结合,进而调控靶基因的转录,最终影响细胞的生物学行为。研究已经表明 Notch1 是 miR-34a 的下游靶基因之一,miR-34a 能通过负性调控 Notch1 表达进而抑制结肠癌 SW480 细胞,膀胱癌细胞 T24 细胞的增殖^[8-9]。而 miR-34a 是否能够通过负性调控 Notch1 表达,同时调控 Notch 信号通路其它蛋白表达进而影响乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为还尚未见报道,因此本研究将探讨 miR-34a 对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为及 Notch 信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人乳腺癌细胞 MCF-7 购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂

兔抗 Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);四甲基偶氮唑盐(美国 Gibco 公司);胎牛血清,transwell 试剂盒(美国 Hyclone 公司);小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),BCA 试剂盒,Hoechst 33258 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司);LipofectamineTM2000,trizol 试剂盒,一步法 RT-PCR 试剂盒(大连宝生生物有限公司);miR-34a mimics 及 miR-34a NC(广州市锐博生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器

迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪(北京六

一仪器厂);ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);SMA2000 型微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

当 MCF-7 细胞汇合度达到 50% 左右时候,利用 LipofectamineTM2000 脂质体转染试剂盒分别转染 miR34a NC(Control)、miR-34a mimics,6 h 以后换成含 10% 血清的 DMEM 培养基;37℃,CO₂ 培养箱培养 48 h。应用 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 的表达。

1.2.2 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 表达

参考 trizol 试剂盒使用说明书提取总 RNA,并用微量紫外分光光度计检测 RNA 的纯度,通过一步法 RT-PCR 试剂盒将逆转录 RNA,并进行 PCR 扩增,最后将扩增产物用于 2% 的琼脂糖胶电泳。引物分别加入 25 μL PCR 反应体系中,反应条件为 94℃ 变性 45 s,59℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环。

1.2.3 MTT 法检测细胞活力

将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板,按“1.2.1”进行转染。分别培养 24、48、72、96 h 后,于倒置显微镜下拍照,接着加入 20 μL 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后,将上清液舍弃,并每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560 nm 处测 OD 值,OD 值即代表细胞活力。

1.2.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,后按照 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行操作,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 3 次,加入 Hoechst 33258 染色液避光染色 15 min,PBS 洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 transwell 法检测细胞侵袭能力

将基质胶均匀平铺于 Transwell 小室的微膜(8 μm)上,制成凝胶备用。将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后,将消化下来的细胞接种到 Transwell 上室,而下室加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,继续培养 24 h,取出 Transwell 小室,洗涤,下室用多聚甲醛固定,结晶紫染色,倒置光学显微镜下计数 5 个视野穿膜细胞个数,计算平均每个视野的细胞数,即表示细胞的侵袭能力。

每组实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测细胞中 Notch1 蛋白表达

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染,48 h 收集细胞,加入细胞裂解液,裂解 30 min 后,离心收集上清液,即可获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 1-2 h,后湿法转膜 30-50 min。将膜浸入一抗溶液(兔抗 Notch1、Notch2、Dll1 及 Jagged-1 多克隆抗体,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,稀释比例:1:100)孵育,4℃ 过夜;次日二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),稀释比例:1:200)室温孵育 1 h。并在膜上滴加化学曝光液,于凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.2.9 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析,至少重复三次,并用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 t 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 miR-34a 转染效果的检测

如图 1 所示,与对照组比较,miR-34a mimics 组中 miR-34a 表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

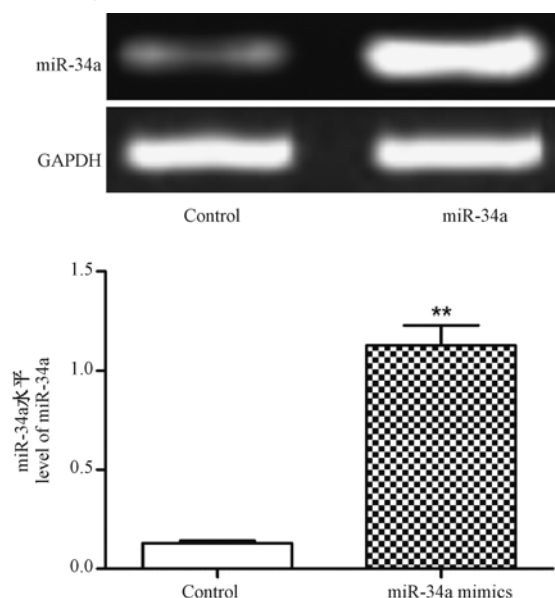


图 1 miR-34a 转染效果的检测,与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.1 Detection of transfection efficiency of miR-34a, compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$ 。

2.2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力的影响

如图 2 所示,在作用 24、48、72、96 h 时,与对照组比较,miR-34a mimics 组细胞活力显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。且在 48、72、96 h 时作用强度一致,因此选择 48 h 作为后续研究作用时间。同时在 48 h 倒置显微镜下观察到 miR-34a mimics 组较对照组细胞皱缩,变圆变亮(图 3)。

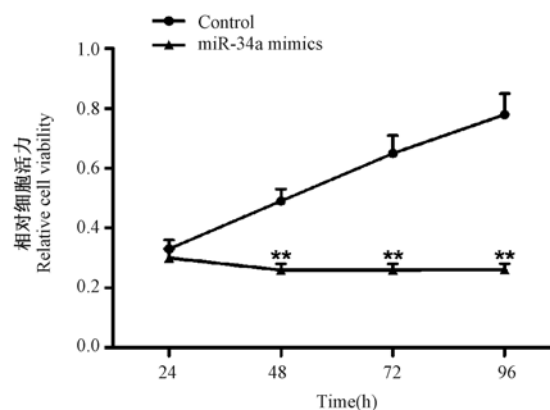


图 2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力的影响,与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.2 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability, compared with control group, ** $P < 0.01$ 。

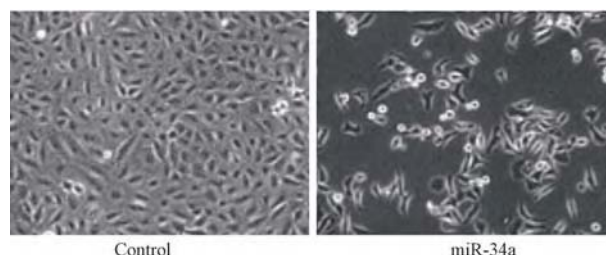


图 3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞形态的影响($\times 20$)

Fig.3 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell morphology($\times 20$)

2.3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响

如图 4, Hoechst 染色结果所示,与对照组(3.73 ± 0.37)比较,miR-34a mimics 组(39.98 ± 4.03)细胞凋亡率显著提高,差异具统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞迁移侵袭能力的影响

如图 5, transwell 染色结果所示,与对照组(128.42 ± 10.35)比较,miR-34a mimics 组(35.71 ± 3.58)细胞凋亡率显著提高,差异具统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch 信号通路的影响

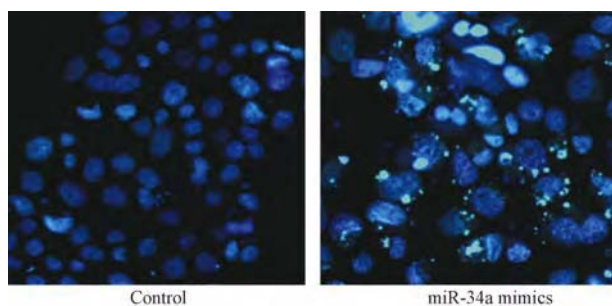


图 4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响 (×20)

Fig. 4 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell apoptosis (×20)

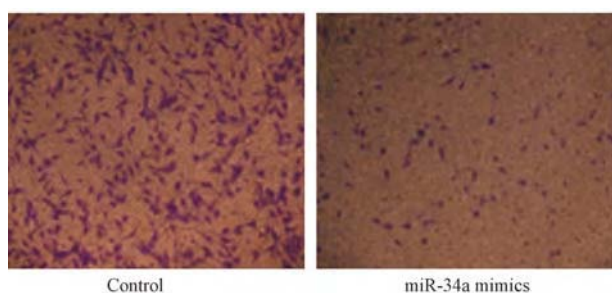


图 5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞迁移侵袭能力的影响 (×20)

Fig. 5 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell invasion viability (×20)

如图 6 所示,与对照组比较,miR-34a mimics 组中 Notch1、Notch2、Dll1 及 Jagged-1 表达量显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

自 1993 年 Ambros 和 Ruvkun 在秀丽线虫中第一次发现 miRNA,即 lin-4,科学家对于 miRNA 的研究已有二十几年时间了,总共发现了 6000 多种的 miRNA 分子,在人类基因上就发现了 600 多种的 miRNA。研究发现 miRNA 通过结合于其靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,通过调控靶基因的转录,参与多种肿瘤细胞的生长,增殖,凋亡,分化,迁移,侵袭及血管生成等生物学行为^[10-11]。miR-34a 是其中一类被认为具有抑癌基因作用的 miRNA,广泛存在于节肢动物及哺乳动物之中,包括三个同源基因,miR-34a, miR-34b, miR-34c。后两种 miRNA 除了表达于肺组织外,其它正常组织中几乎不表达,而 miR-34a 几乎表达于所有正常组织中,所以常作为 miR-34 家族典型 miRNA 进行研究探讨^[12]。研究表明 miR-34a 不仅仅在乳腺癌中低表达或缺失,

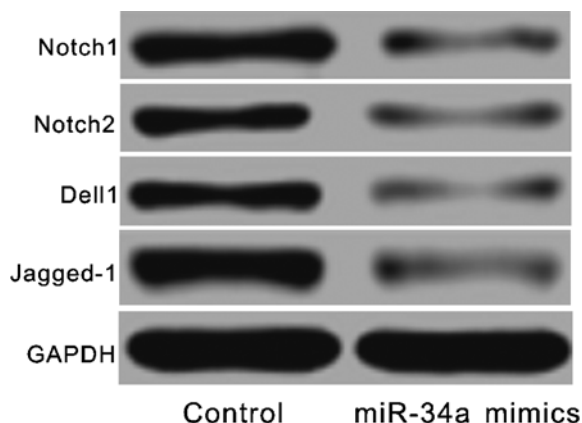


图 6 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch 信号通路的影响,与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Effect of miR-34a mimics on Notch signal pathway in MCF-7 cell, compared with control group, ** $P < 0.01$.

在肺癌,肝癌,卵巢癌,膀胱癌,结肠癌等组织中表达量均处于下调状态甚至缺失,所以 miR-34a 被认为是乳腺癌,卵巢癌等多种肿瘤发生发展及预后的有效检测指标^[13-15]。

1917 年美国著名遗传学家 Thomas 在研究果蝇功能时发现果蝇部分功能缺失导致果蝇翅膀边缘产生缺口,因此将造成此缺口的基因命名为 Notch,并于 1980 克隆成功。此信号通路包括 4 种受体 (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), 2 类配体,分别为 Delta-like 样配体 (Dll1, Dll3 及 Dll4) 及 Serrate 样配体 (Jagged-1, Jagged-2)。Notch 信号通路通过其受体配体结合并扩大信号传递,使相邻细胞间分子之间产生差异,最终决定了乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞的命运,在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用。研究显示在乳腺癌中 Notch 信号通路异常激活,而针对此信号通路的抑制剂如 γ -分泌酶抑制剂或者单克隆抗体联合化

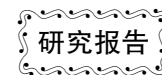
疗已在逐步的用于乳腺癌的治疗当中^[5-7]。

同时研究也显示 Notch 信号通路的受体之一 Notch1 是 miR-34a 的靶基因之一, miR-34a 过表达后能通过下调 Notch1 表达从而抑制膀胱癌细胞, 结肠癌细胞的增殖^[8-9]。此外 Li 等^[16]研究也表明 miR-34a 过表达不仅能下调 Notch1 表达, 也能下调 Notch2 表达, 同时还能调控细胞周期相关蛋白表达, 从而抑制神经胶质瘤细胞的增殖。Pang 等^[17-18]研究表明 miR-34a mimics 通过下调 Notch1, Dll1 及 Jagged-1 表达, 进而抑制绒毛膜癌细胞 BeWo 及 JEG-3 的增殖及侵袭, 并利用 siRNA Notch1 及 Dll1 单克隆抗体进一步验证了 miR-34a 对细胞增殖侵袭的抑制作用, 至少部分抑制作用是通过 Notch1 及 Dll1 实现的。所以本研究将在此基础上探讨 miR-34a 是否也能够通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞 MCF-7 增殖, 凋亡与侵袭。首先本研究利用脂质体转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC, 并采用 RT-PCR 证实了转染的成功。接着 MTT 法检测了 miR-34a mimics 在 24、48、72、96 h 对 MCF-7 细胞活力的影响, 结果表明随着作用时间的推移, miR-34a mimics 能显著的降低 MCF-7 细胞活力, 不过在 48、72、96 h 时候抑制程度趋向一致, 因此选为后续实验时间。接着采用 Hoechst 染色进一步验证了 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞的凋亡诱导作用, 与 miR-34a mimics 在其它肿瘤细胞中的作用效果一致^[8, 9]。另外 transwell 结果也显示 miR-34a mimics 能显著的抑制 MCF-7 细胞的侵袭能力。最后通过 western blot 检测 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch 信号通路的影响, 结果表明 miR-34a mimics 能显著的下调 Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 表达, 与 Pang 等^[17-18]研究结果一致, 从而提示 miR-34a mimics 能通过抑制 Notch 信号通路从而诱导 MCF-7 细胞凋亡, 并抑制细胞增殖及侵袭。

参考文献:

- [1] Casellas-Grau A, Vives J, Font A, *et al.* Positive psychological functioning in breast cancer: An integrative review[J]. *Breast*, 2016, 27:136-168.
- [2] Zavos A, Valachis A. Risk of chemotherapy-induced amenorrhea in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acta Oncol*, 2016, 55(6):664-670.
- [3] 刘海鸥, 张喜平. 乳腺癌新辅助化疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(4):653-656.
- [4] 王方. 乳腺癌分子靶向治疗研究进展[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2013, 20(3):280-282.
- [5] 刘兆国, 朱智杰, 周梁, 等. Notch 信号通路与肿瘤研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(8):1045-1048.
- [6] 赵春霞, 曹玉文, 付欣鸽, 等. Notch 信号通路相关基因与乳腺癌发生发展的研究新进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(10):2092-2095.
- [7] 郭璐, 张瑾. Notch 信号通路在乳腺癌干细胞中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(14):938-941.
- [8] 张超, 姚志勇, 朱鸣阳, 等. MicroRNA-34a 通过 Notch1 对膀胱肿瘤细胞株 T24 增殖的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(5):426-430.
- [9] 邵新宏, 于游, 张才全. miR-34a 靶向调控 NOTCH1 基因对 SW480 细胞增殖的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(22):2297-2301.
- [10] Kaboli P J, Rahmat A, Ismail P, *et al.* MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 97:104-121.
- [11] Rothschild S I. microRNA therapies in cancer[J]. *Mol Cell Ther*, 2014, 2(1):1-8.
- [12] 王洪一, 郭洪, 李娟, 等. miR-34a 的表达调控及其与肿瘤发生的关系[J]. *医学综述*, 2012, 18(7):1020-1023.
- [13] 巩雅宁, 刘为青, 董坚. miR-34a 对肿瘤发生发展调控作用的最近研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(6):6-9.
- [14] Ren F, Zhang X, Liang H, *et al.* Prognostic significance of MiR-34a in solid tumors: a systemic review and meta-analysis with 4030 patients[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10):17377-17391.
- [15] Wang J, Dan G, Zhao J, *et al.* The predictive effect of overexpressed miR-34a on good survival of cancer patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8:2709-2719.
- [16] Li Y, Guessous F, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19):7569-7576.
- [17] Pang R T, Leung C O, Lee C L, *et al.* MicroRNA-34a is a tumor suppressor in choriocarcinoma via regulation of Delta-like1[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1):25.
- [18] Pang R T, Leung C O, Ye T M, *et al.* MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(6):1037-1044.

[修回日期]2016-07-28



血管活性肠肽调控 CD4⁺ CD25⁺ Treg/Th17 平衡对实验性自身免疫性脑脊髓炎防治作用的影响

杨 元,袁正洲,吕志宇,张淑江,李晓红,李作孝

(西南医科大学附属医院神经内科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)调控 CD4⁺ CD25⁺ Treg/Th17 平衡对防治实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的影响。**方法** 60 只健康雌性 wistar 大鼠随机分成正常对照组、EAE 对照组、VIP 低剂量防治组和 VIP 高剂量防治组。利用髓鞘碱性蛋白(MBP) + 完全福氏佐剂(CFA)诱导建立 EAE 模型。自造模当日起,每隔一日分别对 VIP 低、高剂量防治组大鼠腹腔注射 VIP 4 nmol/kg(0.2 mL)、16 nmol/kg(0.8 mL),正常对照组及 EAE 对照组注射 0.8 mL 生理盐水,连续 10 d。观察大鼠发病情况;HE 染色观察脑组织基本病理改变;流式细胞仪检测脾组织 CD4⁺ CD25⁺ Treg、Th17 细胞比例;ELISA 法检测脑组织中 TGF-β1、IL-17A 因子含量变化。**结果** 与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量防治组大鼠发病潜伏期延长、进展期缩短、发病高峰期神经功能障碍评分(NDS)降低;HE 染色显示正常对照组大鼠脑组织中未见炎细胞浸润,VIP 各剂量防治组大鼠脑组织中炎细胞浸润程度较 EAE 组明显下降;与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脾组织中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞亚群比例升高,Th17 细胞亚群比例降低,且各组间存一定的量效关系;VIP 各剂量组大鼠脑组织中 TGF-β1 含量较 EAE 组明显升高,IL-17A 含量较 EAE 组明显降低,且各组间存在一定剂量依赖关系。**结论** VIP 通过上调 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例,促进 TGF-β1 因子分泌,同时下调 Th17 细胞比例,抑制 IL-17A 因子表达,从而减轻脑组织炎症细胞的浸润程度,发挥对 EAE 的防治作用。

【关键词】 血管活性肠肽;实验性自身免疫性脑脊髓炎;CD4⁺ CD25⁺ Treg/Th17;TGF-β1; IL-17A

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0066-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.012

The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the regulation of CD4 + CD25 + Treg/Th17 balance in the prevention and treatment of experimental autoimmune cerebrosplinal meningitis (EAE)

YANG Yuan, YUAN Zheng-zhou, LV Zhi-yu, ZHANG Shu-jiang, LI Xiao-hong, LI Zuo-xiao

(The department of Neurology. Affiliated Hospital of Southwest medical university, Sichuan Luzhou, 646000, China)

【Abstract】 Objective : To explore the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the regulation of CD4⁺ CD25⁺ Treg/Th17 balance in the prevention and treatment of experimental autoimmune cerebrosplinal meningitis (EAE). **Methods** 60 healthy female Wistar rats were randomly divided into normal control group, EAE control group, VIP low-dose group and VIP high-dose group. Used of myelin basic protein (MBP) + completely adjuvant (CFA) to establish EAE model. Since building on , the low and high-dose VIP groups were with intraperitoneal injection of every other day

[作者简介] 杨元,女,硕士,Email: lsh880801@163.com。

[通讯作者] 李作孝,男,教授,硕士生导师,Email: lzx3235@sina.com。

respectively VIP 4 nmol/kg (0.2 mL), 16 nmol/kg (0.8 mL), normal control group and EAE group with 0.8 mL saline, 10 days in a row. Record the incubation period, progression and the peak of neurological dysfunction score (NDS) changes of rats; the pathological changes in brain at the morbidity peak of rats; the proportion of CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 cells in spleen tissues with Flow cytometry; the cytokine levels of TGF- β 1, IL-17A in brain tissue. **Results** the incubation period were extended, the progression and the peak nerve dysfunction score were shortened in VIP each dose group; In normal control group, there was no inflammatory cell infiltration in the brain tissue. The degree of infiltration of inflammatory cells in the VIP control groups were significantly lower than that in the EAE group; Compared with the EAE control group, the proportion of CD4⁺CD25⁺Treg cells in the spleen tissue of VIP each dose group increased, the proportion of Th17 cells decreased, and being a dose-response relationship; The cytokine levels of TGF- β 1 in brain tissue were increased and the levels of IL-17A were reduced in VIP each dose group, being a dose-response relationship; **Conclusion** through up-regulating of CD4⁺CD25⁺Treg cells, promoting the secretion of TGF- β 1 factor and cutting the proportion of Th17 cells, inhibiting the expression of cytokines IL-17A, VIP reduced brain tissue inflammatory cell infiltration, and played a role in prevention and treatment of EAE.

【Key words】 Vasoactive intestinal peptide; Experimental autoimmune encephalomyelitis; CD4⁺CD25⁺Treg/Th17; TGF- β 1; IL-17A

多发性硬化(multiple Sclerosis, MS)作为一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)的自身免疫性疾病,其病因尚不明确,各种致病因素通过破坏 Th1/Th2 细胞免疫平衡,最终导致 CNS 炎细胞浸润、白质脱髓鞘、轴突变性等病理改变^[1]。随着对其动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)研究深入,越来越多的证据表明 Treg/Th17 细胞免疫失调及其分泌的 TGF- β 1、IL-17A 因子紊乱在该疾病发病过程中发挥着更为重要的作用^[2-4]。血管活性肠肽(VIP)是一种非胆碱能非肾上腺能神经递质,由 28 个氨基酸残基组成,属于胰高血糖素-胰泌素家族。VIP 通过与其受体(PACAP-1, PACAP-2 等)结合,诱导免疫细胞增殖、分化,调节 Treg 细胞介导的免疫耐受、抑制炎症因子(IL-17A、NO 等)的合成及分泌,发挥抗炎及免疫调节的作用^[5]。国内外有将 VIP 运用在自身免疫性疾病如类风湿关节炎(RA)的治疗报道^[6-7],但尚未阐明 VIP 在 MS 发病中对 Treg/Th17 细胞平衡的调控机制及对其分泌则细胞因子的具体作用,因此本实验通过探讨 VIP 对 EAE 大鼠脑组织 TGF- β 1、IL-17A 含量影响、脾组织中 Treg/Th17 细胞比例变化、脑组织炎细胞浸润程度的变化,为临床应用 VIP 治疗 MS 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验动物、药物及器材

健康雌性 wistar 大鼠 60 只(200 ~ 250 g, 6 ~ 8 周龄)、健康豚鼠 10 只(250 ~ 300g),均购买于西南医科大学实验动物中心动物【SCXK(川)2013-17】;动物使用许可证:SYXK(川)2013-181。血管

活性肠肽(北京博奥森生物技术有限公司);完全弗氏佐剂 CFA(美国 sigma 公司产品);PBS 磷酸盐缓冲液(PH:7.2-7.4)(上海科兴试剂有限公司);大鼠淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司);FITC 标记抗鼠 CD25 (CD25-FITC)流式抗体(北京博奥森生物技术有限公司);APC 标记抗鼠 CD4 (CD4-APC)流式抗体(北京博奥森生物技术有限公司);APC 标记抗鼠 IL-17(IL-17-APC)流式抗体(北京博奥森生物技术有限公司);TGF- β 1 ELISA、IL-17A ELISA 免疫试剂盒(广州雅怡生物科技有限公司),流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司),数显电热恒温水浴箱 HH. W21. 600S(上海跃进医疗器械厂)等。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫抗原的制备

断颈处死 10 只豚鼠后,在无菌条件下迅速分离出脊髓,去脊髓膜,称重后移入玻璃匀浆器,与等量的 0℃生理盐水混合后研磨成 50% 的全脊髓匀浆(WSCH)。将完全弗氏佐剂(CFA)与 WSCH 等体积混合,玻璃注射器抽打至油包水乳状,以滴在水面不散即为合格抗原。

1.2.2 实验动物分组、制模及药物干预

将 60 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 4 组(15 只/组):正常对照组、EAE 对照组、VIP 低剂量防治组、VIP 高剂量防治组。将免疫抗原注入 EAE 对照组、VIP 低、高剂量防治组大鼠双侧后肢足掌皮下(0.2 mL/100g)进行主动免疫,正常对照组给予等量生理盐水 + CFA。自造模当日起, VIP 低、高剂量防治组每隔一日分别腹腔注射 VIP4 nmol/kg (0.2 mL)、16

nmol/kg(0.8 mL),正常对照组及 EAE 对照组给予腹腔注射 0.8 mL NS,连续 10 d。

1.2.3 动态观察实验动物

自造模日起,每日早晨 10 时由同一观察者采用 Kono's 评分标准对大鼠进行神经功能障碍评分(NDS)。在发病高峰期(将连续 3 d 评分无加重、四肢瘫痪或死亡作为大鼠发病高峰期)处死 EAE 对照组,VIP 各剂量组大鼠。正常对照组未发病大鼠饲养 8 周后处死。处死各组大鼠后留取其脑组织、脾脏,分别进行 HE 染色、ELISA 检查、流式细胞检查。

1.2.4 检测脑组织中炎细胞浸润情况

脑组织经脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋后,取 10 μ m 厚度连续矢状位行石蜡切片,每间隔 100 μ m 取片 1 张。经烘干、脱蜡后行脑组织 HE 染色、观察 CNS 中炎性细胞浸润程度。

HE 染色后对脑组织炎细胞浸润进行评分:0 分:无炎症细胞浸润;1 分:炎症细胞散在分布;2 分:血管周围聚集浸润炎症细胞;3 分:炎细胞汇集为广泛血管套,部分迁移至邻近脑实质内。

1.2.5 检测脾组织 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞亚群比例

1.2.5.1 脾组织淋巴细胞悬液制备

(1) 在无菌条件下剖开 Wistar 大鼠腹腔、暴露脾脏,组织剪将其完整分离;

(2) 分离后的脾脏放入盛有 5 mL PBS 培养皿内,洗涤 3 次后吸至已消毒的 400 目筛网上,眼科剪迅速剪碎,在冰上用玻璃注射器内芯轻轻研磨得到脾细胞悬液,经筛网过滤后置于另一无菌培养皿内;

(3) 于一离心管内滴入脾细胞悬液,将等体积的大鼠淋巴细胞分离液滴入另一离心管内,用移液器将脾细胞悬液轻轻移入分离液的离心管,保持界面清楚;

(4) 在 24℃ 条件下离心(3000 r/min,30 min)后,分为三层,中层云雾状为淋巴细胞层,用移液器吸取出该层细胞;

(5) PBS 液洗涤离心(1500 r/min,5 min)后淋巴细胞 3 次;

(6) 用含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬淋巴细胞,吹打混匀后移入培养瓶,使用台盼蓝染色计数,保证活淋巴细胞数超过 95%。

1.2.5.2 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞亚群比例检测

(1)将脾细胞悬液浓度调整为 2×10^6 /mL;(2)取出 3 支 EP 管:标本检测管①、标本检测管②、对照管,各管吸入脾淋巴细胞悬液 1.5 mL;(3)从冰箱中将 APC 标记的抗鼠 CD4 流式抗体(CD4-APC)、FITC 标记抗鼠 CD25 流式抗体(CD25-FITC)APC 标记抗鼠 IL-17 流式抗体(IL-17-APC)取出恢复室温;(4)于标本检测管①中加入 1.5 μ L CD4-APC、1.5 μ L CD25-FITC;于标本检测管②中加入 1.5 μ L IL-17-APC;空白对照管内加入等量细胞悬液,分别震荡摇匀,闭光条件下置于 4℃ 冰箱内孵育 20 min;(5)于每个 EP 管内分别加入 1 mL PBS 溶液,离心(1500 r/min,8 min)后洗涤 2 次;(6)于每个 EP 管内分别加入 300 μ L PBS 溶液重悬,吹打混匀;(7)设定各通道间的荧光补偿后,通过前向及侧向散射光设定淋巴细胞群,在流式细胞仪上检测 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞亚群比例。

1.2.6 检测脑组织匀浆中 TGF- β 1、IL-17A 含量变化

采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测脑组织匀浆中 TGF- β 1、IL-17A 含量。

1.3 统计方法

计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组计量资料均数比较,当方差齐时用单因素方差分析,方差不齐时采 Kruskal-Wallis 检验;两两比较采 LSD 检验。SPSS17.0 软件包完成统计分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的发病情况

正常对照组大鼠未发病,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠均出现不同程度的临床症状:发病大鼠先后表现为食量下降,精神萎靡,后肢无力,尾部拖地。在免疫后第 14~17 天病情症状最为典型:大鼠出现双侧后肢无力拖地、行走画圈、爬行困难、自伤后肢、精神极度衰弱、抽搐。但与 EAE 对照组比较,VIP 低、高剂量组大鼠症状明显缓解,表现为发病潜伏期时间延长、进展期时间缩短、发病高峰期 NDS 降低(表 1)。

表 1 EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠发病潜伏期、进展期及高峰期神经功能障碍评分(NDS)的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The contrast on the incubation period, progress and the peak incidence neurological dysfunction scores in EAE control group and VIP each dose treatment groups

组别 (groups)	潜伏期(天) Incubation period(day)	进展期(天) Progress (day)	神经功能障碍评分 NDS(score)
EAE 对照组 EAE control group	10.34 ± 2.13	7.85 ± 1.65	4.16 ± 0.77
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	14.17 ± 1.67 [*]	6.20 ± 1.97 [*]	3.75 ± 0.98 ^Δ
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	20.73 ± 1.98 ^{★●}	3.99 ± 1.57 ^{★○}	2.59 ± 0.58 ^{★●}
F	37.48	28.54	18.95
P	<0.01	<0.05	<0.01

注:与 EAE 对照组比较, ^{*} $P < 0.01$ 、^Δ $P > 0.05$; 与 VIP 低剂量组比较, [●] $P < 0.01$ 、[○] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the EAE control group, ^{*} $P < 0.01$ 、^Δ $P > 0.05$; compared with the low dose group of VIP, [▲] $P < 0.01$ 、[○] $P < 0.05$ 。

表 2 EAE 对照组和 VIP 各剂量组 HE 染色病理评分($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 The HE staining pathological scores in EAE control group and VIP each dose group

组别 (Groups)	n	HE 染色病理评分(分) HE staining pathological scores(score)
EAE 对照组 EAE control group	15	2.75 ± 0.46
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	15	2.05 ± 0.56 [*]
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	15	0.84 ± 0.51 ^{★▲}
F		21.38
P		<0.01

注:与 EAE 对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 VIP 低剂量组比较, [▲] $P < 0.01$ 。

Note: compared with the EAE control group, ^{*} $P < 0.01$; compared with the low dose group of VIP, [▲] $P < 0.01$

2.2 各组大鼠脑组织病理变化

正常对照组大鼠未发病,于饲养 8 周后处死,其脑组织中未见 EAE 基本病理改变;EAE 对照组及 VIP 各剂量防治组大鼠于发病高峰期处死,其各组脑组织则出现了不同程度的炎细胞浸润;炎性细胞浸润在小血管周围,部分区域呈“袖套”状改变,脑白质可见髓鞘脱失等病理改变(表 2、图 1)。

2.3 各组大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞亚群比例

通过流式细胞术检测各组大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞亚群比例变化。由于四组数据方差齐,将各组脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞比例采用单因素方差分析。见表 3。

2.4 各组大鼠脑组织匀浆中 TGF-β1、IL-17A 含量变化

VIP 各剂量组大鼠脑组织中 TGF-β1 含量较 EAE 组明显升高,IL-17A 含量较 EAE 组明显降低,且各组间存在一定剂量依赖关系(表 4)。

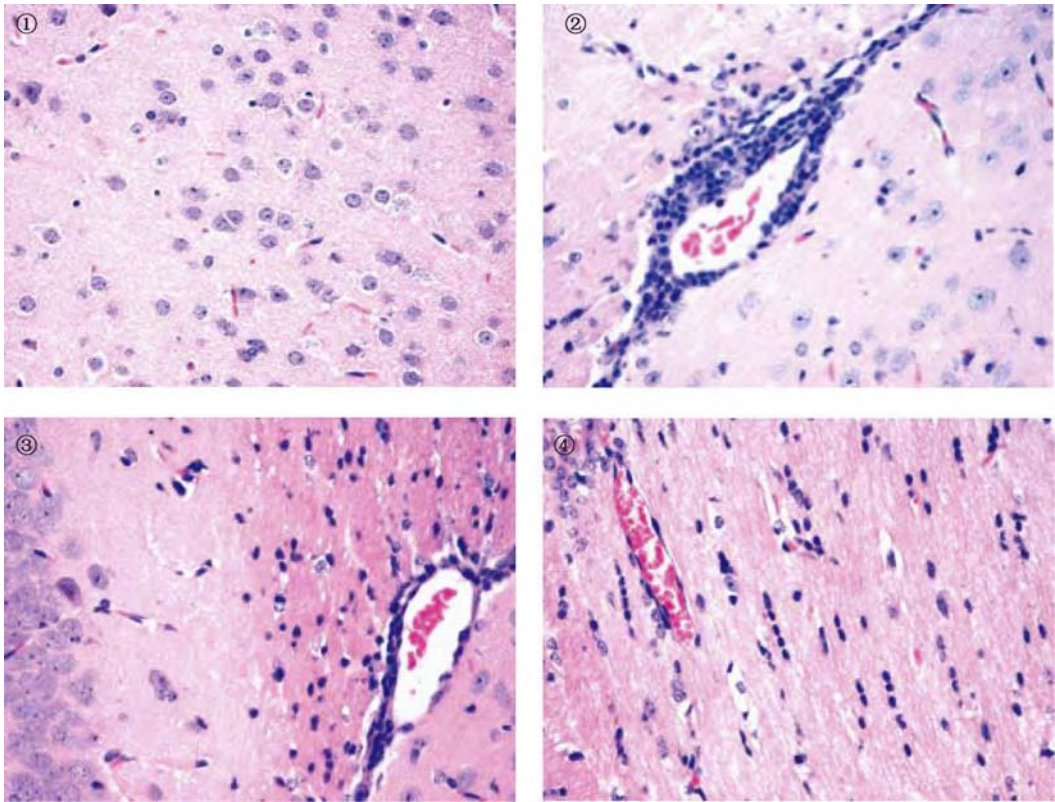
表 3 各剂量组大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg、Th17 细胞亚群比例($\bar{x} \pm s$, %)

Tab.3 The each group rats' CD4 + CD25 + Treg、Th17 ratio in spleen(, %)

组别(Groups)	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%)	Th17(%)
正常对照组 Normal control group	15	7.49 ± 1.24	0.61 ± 0.14
EAE 对照组 EAE control group	15	2.10 ± 0.62 [*]	2.50 ± 0.12 [*]
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	15	4.50 ± 0.69 ^{★○}	1.75 ± 0.24 ^{★●}
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	15	6.32 ± 0.82 ^{★●▲}	0.59 ± 0.13 ^{★●▲}
F		53.29	173.1
P		<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较, ^{*} $P < 0.01$ 、[★] $P < 0.05$; 与 EAE 对照组比较, [●] $P < 0.01$ 、[○] $P < 0.05$; 与 VIP 低剂量组比较, [▲] $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ^{*} $P < 0.01$ 、[★] $P < 0.05$; compared with the EAE control group, [●] $P < 0.01$ 、[○] $P < 0.05$; compared with the low dose group of VIP, [▲] $P < 0.01$ 。



①为正常对照组大鼠脑组织;②为对 EAE 对照组大鼠脑组织;③为 VIP 低剂量组大鼠脑组织;④VIP 高剂量组大鼠脑组织。
图 1 注:各组大鼠脑组织侧室旁(HE, ×40)

Note: ① brain tissues for normal control group rat; ② brain tissues for EAE control group rat;
③ brain tissue for VIP low dose group rats; ④brain tissue for VIP high dose group rats.

Fig. 1 The HE staining of brain tissue (periventricular) in each group rats(HE, ×40)

表 4 各组大鼠脑组织匀浆中 TGF-β1、IL-17A 含量变化($\bar{x} \pm s$)
Tab. 4 The content of TGF-β1、IL-17A in brain tissue of each group rats

组别(Groups)	n	TGF-β1 (pg/ml)	IL-17A (pg/ml)
正常对照组 normal control group	15	65.66 ± 3.22	22.84 ± 3.51
EAE 对照组 EAE control group	15	18.56 ± 4.19 *	78.26 ± 5.87 *
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	15	28.51 ± 3.14 *●	57.49 ± 4.85 *●
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	15	50.41 ± 2.98 *●▲	30.01 ± 5.59 *●▲
F		78.25	101.99
P		< 0.01	< 0.01

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$ 、 $^*P < 0.05$;与 EAE 对照组比较, ● $P < 0.01$;与 VIP 低剂量组比较, ▲ $P < 0.01$ 。
Note: compared with the normal control group, * $P < 0.01$ 、 $^*P < 0.05$; compared with the EAE control group, ● $P < 0.01$; compared with the low dose group of VIP, ▲ $P < 0.01$ 。

3 讨论

Treg 细胞主要分为两类^[8]:天然形成型(nTregs)与诱导生成型(iTregs)。作为 Tregs 中最为重要的一群,抗原激活的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞进入机体之后以多种方式参与免疫耐受。①接触

抑制机制^[9]:CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞通过表达细胞毒性 T 细胞关联蛋白 CTLA-4、神经毡蛋白(Nrp-1)、淋巴细胞活化基因 3(LAG-3)等表面分子与效应细胞结合,抑制其成熟、减少递呈抗原、破坏细胞周期导致效应细胞凋亡;②分泌抑制性细胞因子^[10]:CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞分泌高水平 TGF-

$\beta 1$ 、IL-10,可一定程度上抑制 Th1 细胞介导的免疫反应。进一步研究^[11]发现 TGF- $\beta 1$ 与受体(TGF- βR)结合后,通过磷酸化下游转录因子 Smad3,从而诱导 Foxp3 基因表达。同时 TGF- $\beta 1$ 通过抑制巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞等效应细胞增生活化,抑制粘附分子等表达等,增强吞噬细胞活性和抗原提呈细胞的免疫抑制反应,协同其他抗炎因子如 IL-10 发挥免疫抑制作用^[12]。

Th17 不同于 Th1、Th2 细胞,主要通过分泌一系列促炎因子 IL-17A、IL-21、IL-17F 等参与炎症过程^[13]。IL-17A 作为一种具强促炎作用的炎症细胞因子,通过作用于基因靶点产生急性反应蛋白、炎症趋化因子等物质,上调 MHC-II 抗原、集落共刺激因子、及 T 细胞刺激因子、促使活化 T 细胞^[14]。Peron, J. P 等^[15]在 EAE 小鼠模型中发现,由 Th17 细胞高分泌的 IL-17A、IL-22 可破坏血脑屏障、激活 CNS 炎性细胞,导致 CNS 炎细胞浸润及髓鞘脱失等改变。同时 Th17 细胞高表达颗粒酶 B、与 GX-C 等趋化因子结合可杀死神经元,加重 CNS 的炎症损害,加速 EAE 的髓鞘脱失的发生发展^[16]。

基于此,我们建立 EAE 模型,观察 VIP 否能在该模型体内通过调控 $CD4^+ CD25^+ Treg/Th17$ 细胞平衡及其分泌的细胞因子(TGF- $\beta 1$ 、IL-17A)水平,缓解 EAE 的病理改变及临床表现。

既往研究发现^[17],VIP 在体内外可激活 Treg 细胞,影响其分化,促进分泌负调控细胞因子 CTLA-4、IL-10 和 TGF- $\beta 1$ 的作用,同时在细胞水平上增强 Treg 细胞的抑制效率,维持免疫耐受。在过继转移实验中^[18],将分泌 VIP 的 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 细胞转移给 EAE 小鼠,能显著改善该疾病的发展进程。Yadav, M. 等^[19]研究表明在自身免疫炎症反应中,VIP 可有效的抑制 $CD4^+ T$ 细胞向 Th17 细胞分化,抑制 IL-17A 的分泌。Jimeno, R 等^[20]在进一步机制研究中表明 VIP 主要通过受体(VPACP-1)结合后抑制蛋白激酶 A 的活性,增加 cAMP 的途径,发挥对 Th17 细胞的抑制作用。

因此,在本实验中,通过 ELISA 法检测该两类细胞分泌最具代表性的细胞因子(TGF- $\beta 1$ 、IL-17A),同时探讨 VIP 在 EAE 疾病干预过程中对该细胞因子的影响。结果显示:与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 TGF- $\beta 1$ 含量均升高,且以高剂量组增高最明显,表明 VIP 可通过诱导 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 细胞活化及分化,促进抗炎因子 TGF- $\beta 1$ 分泌,从而改善 EAE 疾病进程;同时与

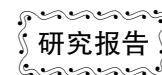
EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量明显降低,且高剂量组效果最明显,表明 VIP 在上调 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 细胞作用的同时可下调 Th17 细胞的功能,抑制炎症因子 IL-17A 的产生,进一步阻断 EAE 发病进程。

本实验除了检测 VIP 对大鼠脑组织内免疫抑制因子 TGF- $\beta 1$ 、炎症因子 IL-17A 的影响外,同时通过流式细胞仪技术检测了各组大鼠脾脏组织中 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 、Th17 细胞亚群比例,进一步观察 VIP 对 $CD4^+ CD25^+ Treg/Th17$ 平衡调控的影响。结果显示:与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脾脏组织中 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 细胞比例明显升高,Th17 细胞比例降低,且 VIP 高剂量组变化最为明显,差异具有显著性。进一步表明:在 EAE 模型中,VIP 可通过上调 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 比例、下调 Th17 比例,维持 $CD4^+ CD25^+ Treg/Th17$ 细胞平衡,同时升高 TGF- $\beta 1$ 因子含量,降低 IL-17A 因子水平,减轻炎症反应,维持中枢及外周免疫平衡,从而缓解 EAE 病理改变及临床表现。

参考文献:

- [1] Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases[J]. Annu Rev Pathol, 2012; 7(5):185-217.
- [2] Sharyn Tauro, Phuong Nguyen, Bofeng Li, et al. Diversification and senescence of Foxp3 + regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(5):1195-1207.
- [3] Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination[J]. J Neurol Sci, 2013, 333(1-2):76-87.
- [4] Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, et al. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases[J]. Ann. Rheum. Dis, 2013, 72 (Suppl 2), ii116-ii123.
- [5] Gomariz, R. P, Juarranz, Y, Abad, C, et al. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy[J]. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2006, 1070(1): 51-74.
- [6] Varun Sethi, Israel Rubinstein, Antonina Kuzmis, et al. Novel, Biocompatible, Disease Modifying Nanomedicine of VIP for Rheumatoid Arthritis[J]. Mol Pharm, 2013, 10(2): 728-738.
- [7] 张利群,沈建根. 重组血管活性肠肽基因质粒治疗大鼠胶原性关节炎的研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2006, 04: 403-410.
- [8] Peterson R A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(2): 186-204.

(上转第 54 页)



自发性高血压大鼠心肌组织 microRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达的改变及意义

郑 婧

(贵州医科大学附属医院, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 观察 Micro RNA-97a(miRNA-97a)与 TGF- β 1 蛋白在自发性高血压大鼠(SHR)心肌组织中的表达改变和关系。**方法** 取 8 只 8 周龄雄性自发性高血压大鼠为 SHR 组,8 只 8 周龄雄性 Wistar 大鼠为对照组,通过无创血压测量分析系统测大鼠尾动脉血压,8 周后股动脉放血处死大鼠,HE 染色观察大鼠心脏形态学改变,PCR 法检测大鼠心脏中 miRNA-97a 的表达,Western blot 检测 TGF- β 1、血管紧张素 II(Ang II)蛋白和 I 型胶原(Col-I)和 III 型胶原(Col-III)蛋白的表达水平。**结果** SHR 组的收缩压和舒张压明显升高,心肌 Cx43 和 PVCA 明显升高,TGF- β 1 蛋白,Coll-I 和 Coll-III 蛋白的表达水平明显升高,miRNA-97a 表达水平明显降低,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。PCR 结果显示,SHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平为对照组的 $(24.6 \pm 4.7)\%$,SHR 组心肌组织 miRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达水平呈负相关($r = -0.785, P < 0.01$)。**结论** SHR 心肌组织 miRNA-97a 表达下调,伴随 TGF- β 1 蛋白表达升高和胶原合成增加。miRNA-97a 与 TGF- β 1 可能参与 SHR 大鼠的心肌纤维化。

【关键词】 Micro RNA-97a; 转化生长因子 β 1; 自发性高血压大鼠; 心肌纤维化

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 11-0072-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.013

Expression of microRNA-97a and TGF- β 1 protein in myocardium of spontaneously hypertensive rats and its significance

ZHENG Jing

(Affiliated hospital of Guizhou medical university, Guiyang 550001, China)

【Abstract】 Objective To observe the changes of microRNA-97a and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) protein in the myocardium of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** 8 male spontaneously hypertensive (SHR) rats as SHR group, 8 male Wistar rats for control group, Arterial blood pressure was detected by a noninvasive blood pressure measurement and analysis system. 8 weeks after femoral artery, HE staining was used to observe the changes of morphology of the rat heart, the expression of miRNA-97a was checked by Real-time PCR method for detection of rat heart. Western blot was used to detect the TGF- β 1, angiotensin II (Ang II) protein and type I collagen (Col I) and type III collagen (Col III) protein expression level. **Results** In SHR group, systolic blood pressure and diastolic blood pressure increased significantly, TGF- β 1 protein and Col I and Col III protein expression levels increased significantly, miRNA-97a expression levels were significantly lower than that of control group ($P < 0.01$). Real-time PCR results

[基金项目] 贵州省科技合作计划项目资助(黔科合 LH 字(2015)7423)。

[作者简介] 郑婧, 博士, 讲师, E-mail: 843165396@qq.com。

[通讯作者] 郑婧。

showed that the level of miRNA-97a expression in SHR group was $(24.6 \pm 4.7)\%$ in control group, the expression level of miRNA-97a in SHR group was negatively correlated with the expression of TGF- β 1 ($r=0.785$, $P < 0.01$) in group.

Conclusion The level of miRNA-97a is down-regulated along with the up-regulation of TGF- β 1 protein expression and collagen synthesis in the myocardial tissues of SHR. miRNA-97a and TGF- β 1 may be involved in myocardial fibrosis in SHR.

【Key words】 MicroRNA-97a; Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1); Spontaneously hypertensive rats; Myocardial fibrosis

高血压、冠心病等疾病在心内科最常见^[1-2]。这两年有报道,微小核糖核酸(microRNA)可以通过对基因转录后控制基因表达调控方式^[3]。也有研究说明 miRNA 参与心肌纤维化和动脉硬化等病理过程^[4]。最近一段时间,有不少的医务工作者称 microRNA 的重要成员之一 miRNA-97a 与心肌重构关系密切,很有可能成为高血压、冠心病等疾病的

一个新的治疗靶点^[5-6]。目前为止,我们对于 miRNA-97a 在心血管重构中的作用及机制没有完全清楚。本次研究探讨了 SHR 大鼠心肌组织 microRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达的改变及意义。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

表 1 试剂和仪器

Tab.1 Reagent and instrument

试剂和仪器 Reagent and instrument	来源 Brand
RM2155 型超薄石蜡切片机	德国 LEICA 公司
miR-378inhibitor 和其分别对照剂	上海 GenePharma 有限公司
Image Pro plus 病理图像分析软件	美国 Media Cybernetics 公司
TGF- β 1 一抗、二抗(羊抗兔)	美国 Assay Biotechnology 公司
AllegraTM 64R 台式低温高速离心机	德国 Beckman 公司
10 × Annealing Buffer、蛋白裂解液和 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒	碧云天生物技术公司
ABI-7500 实时定量 PCR 仪	美国 ABI 公司
Trizol 和 Lipofectamine2000 转染试剂	Invitrogen 公司
PVDF 膜和蛋白发光液	Millipore 公司
无创大鼠血压心率测定仪(型号:ALC-NIBP)	上海奥科特生物科技有限公司
卡托普利片	中美上海施贵宝制药有限公司
DMEM 培养基和胎牛血清	Hyclone 公司

1.2 实验动物及血压测定

8 周龄雄性 SHR16 只和 Wistar 大鼠 8 只,均购自中山大学动物实验中心【SCXK(粤)2011-0034】,体质量 230 ± 15 g,所有大鼠均在贵州医科大学附属医院动物实验室【SYXK(黔)2012-0001】的清洁环境下饲养观察。将 SHR 大鼠随机分为 SHR 卡托普利组(SHR 干预组, $n=8$)、SHR 对照组($n=8$),Wistar 大鼠为正常对照组;分别给予 SHR 大鼠卡托普利(中美上海施贵宝制药有限公司)10 mg/(kg·d)和蒸馏水灌服,共持续 8 周。成功制作 SHR 干预组和 SHR 对照组大鼠模型。

1.3 大鼠心肌组织 Masson 染色和 SP 法观察 TGF- β 1 蛋白表达

采用免疫组织化学 SP 法,取出盖玻片上用于免疫组化的大鼠心肌组织,0.01mol/L PBS 漂洗 2 次,并予 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,并行脱蜡、水化,对部分切片进行 PBS 冲洗并加聚合物增

强剂和大鼠抗人 TGF- β 1 多克隆抗体等试剂,在室温下孵化,最后加入 DAB 显色液,用苏木素复染色,并用中性树脂封片。封片完毕后将切片放置显微镜下观察 TGF- β 1 在两组大鼠心肌细胞中的表达情况,阳性显色为棕黄色。另一部分石蜡切片常规脱蜡后行 Masson 胶原染色。每张切片任选 3 支小动脉,测量血管周围胶原面积比率(PVCA)。

1.4 Western Blot 检测 TGF- β 1、Col-I、Col-III 蛋白表达水平

提取大鼠心脏组织的总蛋白,在 100℃加热 10 min 以使蛋白质变性。电泳,蛋白转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加入 TGF- β 1、Col-I、Col-III 等一抗,4℃孵育过夜,选择 TGF- β 1、Col-I、Col-III 等酶标二抗和稀释浓度,孵育 1 h,洗膜后化学发光,拍照,分析显影条带。

1.5 Real-time PCR 检测 miRNA-97a 表达水平

根据其 mRNA 序列,设计引物。miRNA-97a 引

物:上游:5'-TAC CCT ACT ACC AAT ATT-3';下游:5'-CCT TTC CAT CTT CCT TCG ATT-3';产物长度:327 bp。Ang II 引物:上游:5'-ATCGGGACC AAT CAC ACT ACA -3';下游:5'-CGT CTC TTCCGG CTG CTT CAA-3';产物长度:216 bp。扩增产物 2%,琼脂糖凝胶电泳,凝胶分析系统测定各条带积分光密度值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对实时定量 PCR 结果进行分析,显示 miRNA-137、Ang II RNA 的表达。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计学软件行统计学分析,计

表 2 两组大鼠的资料与心肌胶原含量的变化(mean $\pm$ SD, $n=10$)

Tab. 2 Information and myocardial collagen changes of two groups

Group	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	LVWI (mg/g)	CVF (%)	PVCA
对照组	119.2 $\pm$ 8.5	77.4 $\pm$ 7.2	2.46 $\pm$ 0.36	2.94 $\pm$ 0.41	0.89 $\pm$ 0.15
SHR 组	194.5 $\pm$ 15.7 **	104.6 $\pm$ 9.5 **	3.16 $\pm$ 0.52 *	5.64 $\pm$ 0.66 **	1.41 $\pm$ 0.32 **

注:和对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 两组大鼠心肌组织 Masson 染色结果

SHR 组大鼠心肌细胞间可见大量蓝色胶原纤维沉积,细胞数量减少,体积增大,细胞排列紊乱,对照组大鼠可见红色心肌细胞间隙散在少量蓝色胶原纤维,细胞排列整齐紧密,数量,体积大致正常(图 1)。

2.3 免疫组织化学法检测大鼠心肌组织 TGF- β 1 蛋白表达

TGF- β 1 主要在成纤维细胞表达,分布在细胞膜、细胞质及细胞间隙,SHR 组心肌可见 TGF- β 1 大量表达,对照组心肌有仅有少量 TGF- β 1 表达(图 2)。SHR 组心肌 TGF- β 1 蛋白表达水平显著高于对照组(1.29 ± 0.22 vs 0.70 ± 0.11 , $P < 0.01$)。

2.4 Real-time PCR 检测大鼠心肌组织 miRNA-97a 表达

量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数显著性检验用方差分析及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠血压和心肌胶原含量的变化

与对照组比较,SHR 组大鼠的收缩压和舒张压明显升高,TGF- β 1 蛋白,Col- I 和 Col-III 蛋白的表达水平明显升高,miRNA-97a 表达水平明显降低($P < 0.01$)(表 2)。

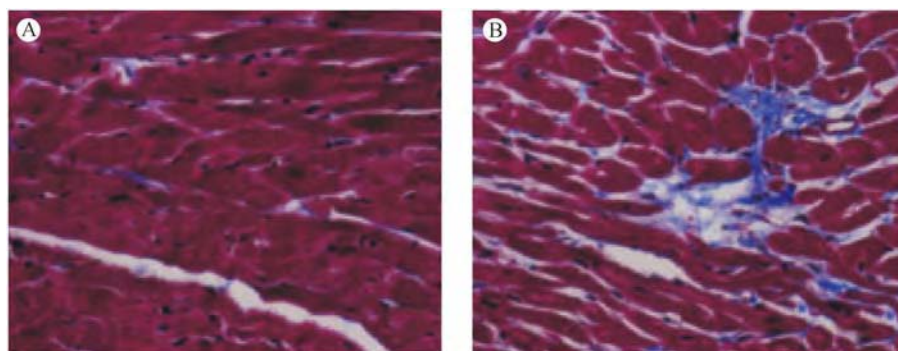
SSHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平为对照组的(24.6 ± 4.7)%,其 miRNA-97a 表达水平较对照组明显降低($P < 0.01$),

2.5 组间 TGF- β 1, Smad3 蛋白和 Col- I / Col-III 蛋白表达比较

SHR 对照组大鼠心脏表达 TGF- β 1/Smad3 蛋白和 Col- I / Col-III 蛋白均较正常对照组明显升高($P < 0.01$)(图 4)。

2.6 大鼠心肌组织 miRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达

水平相关性分析 Pearson 直线相关分析显示,SHR 组心肌组织 miRNA-97a 表达水平与 TGF- β 1 蛋白表达水平呈显著负相关($r = -0.785$, $P < 0.01$)。

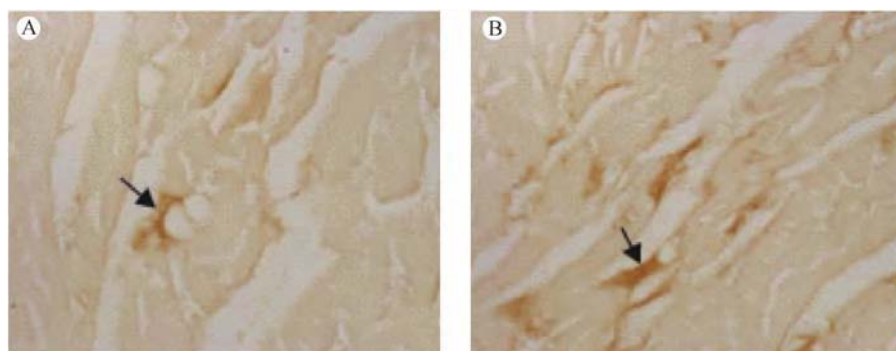


注:A:对照组;B:SHR 组。

图 1 大鼠心肌组织 Masson 染色结果($\times 40$)

Note: A. Control group; B. SHR group.

Fig. 1 Masson staining of myocardium ($\times 40$)



注:A:对照组;B:SHR组。

图2 大鼠心肌 TGF-β1 免疫组化染色(×40)

Note: A. Control group; B. SHR group.

Fig. 2 TGF-β1 immunohistochemical of myocardium

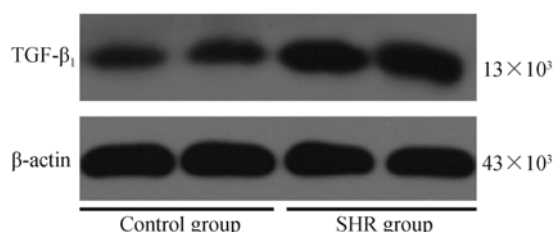
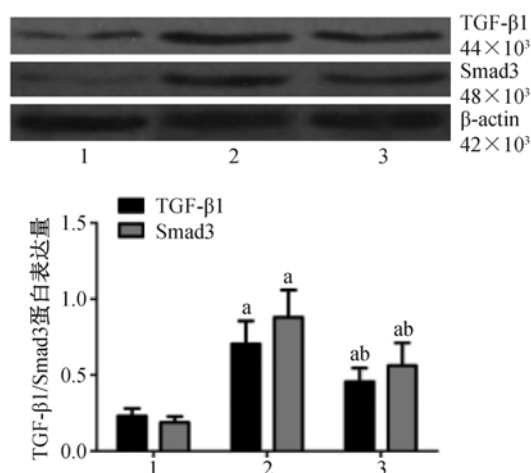


图3 大鼠心肌组织 TGF-β1 蛋白表达改变

Fig. 3 TGF-β1 expression changes of myocardium



注: 1. 正常对照组, 2. SHR 对照组, 3. SHR 干预组, SHR 对照组与正常对照组比较 $P < 0.05$ 。

图4 组间大鼠心脏 TGF-β1/Smad3 蛋白表达量

Note: 1. Control group, 2. SHR control group, 3. SHR group. Compared with control group $P < 0.05$.

Fig. 4 TGF-β1/Smad3 expression of myocardium in different groups

3 讨论

高血压是冠心病的一个独立危险因素^[7], 冠心病症状为胸腔中央发出疼痛, 而且可蔓延到手臂、

颌、颈、后背及胃部。冠心病发作的其他症状有气促、眩晕、寒颤、出汗、恶心及昏厥。严重的一些患者会因为心力衰竭而导致死亡^[8-9]。

据报道结果^[11-13]表明, miRNA-9 和 miRNA-97a 能影响心肌细胞的增殖与分化并且可以通过 TLX 和周期蛋白 D1 调控心肌细胞分化。这次实验是为了研究 miRNA-97a 在心肌重构中的影响, 让 miRNA-97a 成为高血压、冠心病等疾病的一个新的治疗靶点。

本研究发现, 大鼠心肌组织 miRNA-97a 表达: Real-time qPCR 结果显示, SHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平较对照组明显降低 ($P < 0.01$), SHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平为对照组的 (24.6 ± 4.7)%。大鼠心肌组织 miRNA-97a 与 TGF-β1 蛋白表达呈显著负相关 ($r = -0.785$, $P < 0.01$)。

同时, 在本研究中, 两组大鼠心肌组织 Masson 染色结果显示: SHR 组大鼠心肌细胞数量减少, 细胞排列紊乱, 体积增大, 可见大量蓝色胶原纤维。SHR 组大鼠收缩压和舒张压显著升高, 细胞肥大, 体积增大, 心肌细胞数量减少, 排列紊乱, 胞核变圆畸形。同时, SHR 对照组表达 TGF-β1 蛋白表达均上调, 表明 TGF-β1 在 Col-I 和 Col-III 表达中有了正性的调节作用。本研究两组大鼠血压和心肌胶原含量的变化显示, 和正常组相比, SHR 组的收缩压和舒张压明显升高, TGF-β1 蛋白, Col-I 和 Col-III 蛋白的表达水平明显升高, miRNA-97a 表达水平明显降低。

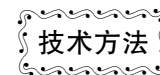
TGF-β1 是公认的促纤维化细胞因子, 能促进心肌纤维化^[14], 本研究显示, 特异低表达心脏 miRNA-97a 可促进 TGF-β1 蛋白合成, 导致细胞外基质 Col-I 和 Col-III 大量增生和过度积聚, 最终导

致心肌细胞肥大,纤维化,出现心肌病理性重构^[17]。由于在心肌重构过程中参与调控 TGF- β 1、AngII 表达的机制非常复杂,miRNA-97a 具体通过下调哪一种信号通路来抑制细胞的增殖,还需要我们进一步研究。

参考文献:

- [1] Pinto YM, Philipp T, Engler S, *et al.* Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor β 1 attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR (mRen2) 27 rat [J]. Hypertension, 2000, 36(5): 747-754.
- [2] Ziada AM. Additional salutary effects of the combination of exercise training and an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the left ventricular function of spontaneously hypertensive rats [J]. Hypertension, 2009, 27(6): 1309-316.
- [3] He JF, Luo YM, Wan XH, *et al.* Biogenesis of miRNA-137 and Its Role in Biogenesis, the Cell Cycle, and Apoptosis [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2011, 25(6): 404-408.
- [4] Weber KT, Brilla CG. Signals for the remodeling of the cardiac interstitium in systemic hypertension [J]. Cardiovasc Pharmacol, 1991, 17(Suppl 1): 14-19.
- [5] Weber KT, Brilla CG. Myocardial fibrosis and the rennin-angiotensin-aldosterone system [J]. Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20(Suppl 1): 14-19.
- [6] 刁雪红, 申锴, 等. 糖尿病小鼠心肌组织 microRNA 表达谱分析 [J]. 上海交通大学学报, 2010, 10(2): 1194-1198.
- [7] Wang YS, Wang HY, Liao YC, *et al.* MicroRNA-137 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation [J]. Cardiovascular Res, 2012, 95(4): 517-526.
- [8] Akiyama - Uchida Y, Ashizawa N, Chtwuy A, *et al.* Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts [J]. Hypertension, 2002, 40(2): 148-154.
- [9] Li JZ, Peng J, Wang CJ, *et al.* Calcitonin gene-related peptide suppresses isoprenaline-induced cardiomyocyte apoptosis through regulation of microRNA-1 and microRNA-133a expression [J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2011, 36(10): 964-971.
- [10] 王泽慧, 边云飞, 卫娜, 等. 大鼠 microRNA-145 慢病毒表达载体的构建及其对血管平滑肌细胞表型转化的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(5): 424-428.
- [11] Liu, Z. Q. Teng, A. L. McQuate, *et al.* An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA-195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation, PLoS One, 2013, 22(8): e51436.
- [12] C. Zhao, G. Sun, S. Li, *et al.* A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination, Nat. Struct. Mol. Biol. 2009, 16(5): 365-371.
- [13] C. Zhao, G. Sun, S. Li, *et al.* MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 1876-1881.
- [14] Van Rooij E, Sutherland LB. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(3): 18255-260.
- [15] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus [J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [16] Van Rooij E, Sutherland LB. Qi X, *et al.* Control of stress dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. Science, 2007, 316(5824): 575-579.
- [17] Zhu H, Yang Y, Wang Y, *et al.* MicroRNA-137 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1 [J]. Cardiovascular Res, 2011, 92(1): 75-84.

[修回日期]2016-07-20



新型实验大鼠尾静脉穿刺用途四联固定器的设计及其效用评价

鲍礼智, 郭志福, 沈 明, 李 然, 陈 挺, 余云华, 赵仙先, 郑 兴

(第二军医大学附属上海长海医院心血管内科, 上海 200433)

【摘要】 目的 改进清醒大鼠固定技术, 提高成组实验大鼠尾静脉穿刺效率。**方法** 采用聚苯乙烯、聚氯乙烯材料自制四联大鼠固定器。40 只成年雄性 SD 大鼠(262 ± 15 g)随机分成 A、B 两组, 每组 20 只, A 组使用自制四联固定器, B 组使用市售有机玻璃大鼠固定器。在清醒状态下由单人操作行尾静脉穿刺并注射生理盐水 200 μ L, 完成大鼠固定、尾静脉水浴加温、穿刺注射、压迫止血的全过程。观察并记录穿刺时间、总操作时间、大鼠躁动次数等指标。**结果** A 组一次穿刺成功率 80%, 穿刺时间(9.25 ± 3.70) s, 总操作时间(47.05 ± 4.65) s, 大鼠躁动次数(1.4 ± 0.8) 次; B 组一次穿刺成功率 85%, 穿刺时间(9.95 ± 4.38) s, 总操作时间(122.45 ± 7.71) s, 大鼠躁动次数(2.5 ± 1.2) 次。**结论** 自制四联大鼠固定器结构简单, 使用方便, 明显缩短尾静脉穿刺点操作时间, 提高了大鼠配合度及穿刺操作效率, 是一种安全有效的设计。

【关键词】 大鼠; 尾静脉穿刺; 固定装置; 方法

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0077-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.014

A four combined holder for tail vein puncture in conscious rats: design, construction and feasibility testing

BAO Li-zhi, GUO Zhi-fu, SHEN Ming, LI Ran, CHEN Ting, YU Yun-hua, ZHAO Xian-xian, ZHENG Xing.

(Department of Cardiology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To improve fixation methods and tail vein puncture efficiency in conscious rats group. **Methods** A new four combined holder was designed and made of materials of polystyrene and Polyvinyl chloride. SD rats were randomly divided into A group and B group, twenty rats in each group. Rats in group A fixed by a self-made four combined holder, and rats in group B fixed by common fixture made of organic glass which was commercially available. Then the tail vein injection experiment was conducted respectively by one people. **Results** It took (9.25 ± 3.70) seconds in group A and (9.95 ± 4.38) seconds in group B to finish the experiment from puncture to see blood return in syringe, and took (47.05 ± 4.65) seconds in group A and (122.45 ± 7.71) seconds in group B to finish the experiment from capture to finish the injection. Furthermore, it was observed (1.4 ± 0.8) times in group A and (2.5 ± 1.2) times in group B with agitation. **Conclusions** The new four combined rat holder has simple structure, being easy to use, which could significantly shorten the tail vein puncture time and improve the efficiency of the cooperation degree of rats and puncture operation.

【Key words】 Rat; Tail vein puncture; Fixtures; Method

[基金项目] 国家自然科学基金(81470517)。

[作者简介] 鲍礼智(1980-), 男, 博士生, 研究方向: 分子心脏病学研究。

[通讯作者] 郭志福(1978-), 男, 副教授, 研究方向: 心血管活性多肽研究, E-mail: guozhifu@126.com; 郑兴(1957-), 男, 教授, 研究方向: 分子心脏病学研究, E-mail: zhengxing57530@163.com。

在大鼠实验中,尾静脉穿刺采血或注射是常用的方法,具有损伤小、应激反应少、短期内可多次重复等优势。为了减少对实验数据的影响和方便实验人员的操作,一般需要保持大鼠的清醒状态并将其固定良好,将鼠尾引出后进行穿刺操作。目前市场上的大鼠固定器大多是有机玻璃或不锈钢材质制成,单体结构,固定位点较多,每次实验都要重复同样的固定操作,增加了操作人员的劳动强度,也浪费了实验时间。笔者根据大鼠自身习性,设计了一种简单易操作的新型四联固定装置,通过应用这种装置进行尾静脉穿刺操作,可以满足成组大鼠实验中快速、批量、安全、妥当的尾静脉穿刺要求,使操作步骤更加流畅。

1 材料和方法

1.1 大鼠固定装置的设计

本实验所涉及的大鼠固定装置,由固定盒、四个周径可调式纳鼠筒、固定件和加温瓶组成,固定盒采用聚丙烯泡沫材料,为上端开口的中空长方体结构(附带遮光作用的盖子);纳鼠筒为后端开口的中空结构,前段呈圆锥状设有多个圆形通气孔,后段呈圆柱状。纳鼠筒两两上下对齐,后端开口朝向一致地设置于固定盒内部,纳鼠筒后端与固定盒侧壁相抵、前端通过固定件可拆卸地固定在固定盒内部。固定盒的侧壁、对应成对纳鼠筒后端开口的中间位置设有鼠尾引出槽,仅将鼠尾暴露在固定盒外供实验者操作,既保证了安全,又排除了干扰,提高了穿刺效率。加温瓶设置于固定盒开有鼠尾引出槽的侧壁的外侧。固定盒开设鼠尾引出槽的侧壁上沿设置有若干凹槽,可以用于放置 1~2 mL 体积的注射药物容器,例如 EP 管。纳鼠筒外侧套有卡箍、通过卡箍的缩放调节纳鼠筒的大小。固定件

为两根通过螺纹连接的内套管和外套管,内套管一端固定在纳鼠筒的前端,外套管通过旋转伸缩与固定盒侧壁相抵。固定件还可以采用简单的合适大小的聚苯乙烯材料方块或压缩弹簧(图 1)。

1.2 大鼠尾静脉穿刺注射方法

1.2.1 实验对象及分组

10~12 周 SPF 级雄性成年 SD 大鼠 40 只,体重 260 ± 15 g,均购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】。所有操作均在第二军医大学实验动物中心小动物屏障实验室进行【SYXK(沪)2012-0003】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。适应性饲养 1 周后,随机分成 A、B 两组,每组 20 只,A 组使用上述自制四联固定器,B 组使用市售有机玻璃大鼠固定器(编号 YXGDJ,购自上海元象医疗器械有限公司)(图 2)。

1.2.2 穿刺及尾静脉注射步骤

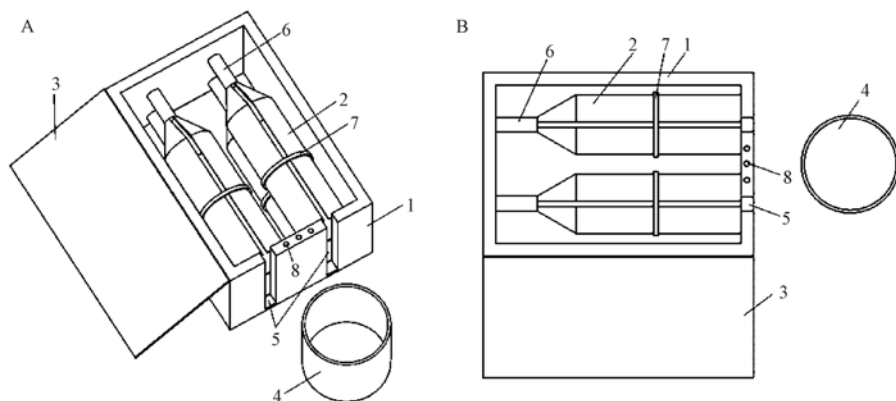
在大鼠清醒状态下实验人员单人操作,采用 29G 注射器(舒锐牌一次性使用无菌胰岛素注射器,美国 BD 公司生产)行尾静脉穿刺并注射生理盐水 200 μ L,完成大鼠固定、尾静脉 45℃ 水浴加温(30 s)、左侧尾静脉消毒穿刺注射、无菌纱布压迫止血(60 s)的全过程。

1.2.3 观察指标

穿刺时间:从针尖刺入皮肤到可见回血的时间;操作时间:从捕捉大鼠到放回鼠笼的时间;大鼠躁动次数:操作过程中大鼠出现尖叫、尾巴发生矢状面位移大于 2 cm 或冠状面轴向扭动大于 90 度的次数。

1.4 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计学软件,1 次穿刺成功率以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。穿刺时间、操作时间、躁动次数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。



注:1:固定盒;2:纳鼠筒;3:遮光盖;4:加温瓶;5:鼠尾引出槽;6:固定件;7:卡箍;8:EP管凹槽。

图1 四联固定器结构示意图

Note: 1: fixed-box; 2: rat-holding barrel; 3: shading cover; 4: warming bottle; 5: tail-crossing grooves; 6: fixed part; 7: lath dog; 8: nests of EP tubes.

Fig. 1 Sketch map of a four combined holder

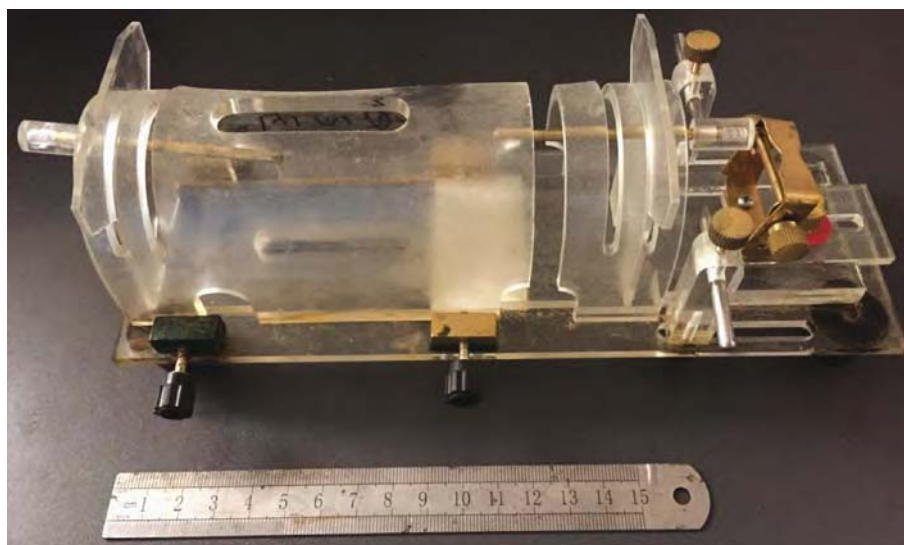


图 2 市售单体大鼠固定器

Fig. 2 Saled single fixture made of organic glass

2 结果

穿刺时间: A 组一次穿刺成功率 80%, 穿刺时间(9.25 ± 3.70)s, 总操作时间(47.05 ± 4.65)s, 大鼠躁动次数(1.4 ± 0.8)次; B 组一次穿刺成功率 85%, 穿刺时间(9.95 ± 4.38)s, 总操作时间(122.45 ± 7.71)s, 大鼠躁动次数(2.5 ± 1.2)次。一次穿刺成功率和穿刺时间两组间比较无显著统计学差异($P > 0.05$), 躁动次数和总操作时间 A 组明显低于 B 组, 统计学差异显著($P < 0.01$)。

3 讨论

大鼠尾静脉穿刺是动物实验中静脉注射给药和采血的常用方法^[1-3]。固定牢靠、配合良好、操作流畅是穿刺顺利的基本条件。目前市售及文献报道^[4-7]的大鼠固定器多为单体结构, 存在固定节点多、操作步骤繁琐等不足, 普遍重视固定牢靠而忽略实验者的操作体验。大鼠尾静脉主要有 3 条, 分别位于背侧和左右两侧^[8-9], 穿刺前水浴加温有利于提高穿刺成功率, 穿刺后局部压迫有利于保护血管。本研究自制的四联固定器, 纳鼠筒大小及松紧度通过卡箍来调节, 采用圆形设计便于穿刺时根据选取的静脉位置旋转微调, 避免操作中鼠尾拧扭, 使大鼠的体位更舒适, 更配合穿刺操作。四联结构有利于集中进行鼠尾加温、静脉穿刺, 穿刺结束可用无菌纱布覆盖穿刺部位并卡压在鼠尾引出槽中, 起到压迫止血、防止药物回渗等作用, 极大地缩短了操作时间, 简化了操作流程, 同时利用大鼠群居优势和喜暗特性, 采用四联结构和遮光设计, 进一步提升了大鼠的配合度, 从而更大程度减少固定及穿刺操作带来的应激反应^[10]。

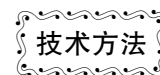
本实验以尾静脉注射为效用评价对象, 同样用于尾静脉穿刺采血亦十分便捷, 有文献报道单次最多可采集到 1.5 mL 血液^[3]。

总之, 通过对总操作时间及大鼠配合度的比较, 证实了自制尾静脉穿刺用途四联固定器的优化作用, 有利于降低穿刺注射的操作强度, 提高效率, 在动物实验操作中有较好的应用价值。

参考文献:

- [1] Furuhashi K, Onodera T. A simple technique for repeated blood collection from the tail vein of the rat[J]. J Toxicol Sci, 1983, 8(2): 161-163.
- [2] Omaye ST, Skala JH, Gretz MD, et al. Simple method for bleeding the unanaesthetized rat by tail venipuncture[J]. Lab Anim, 1987, 21(3): 261-264.
- [3] Lee G, Goossens KA. Sampling blood from the lateral tail vein of the rat[J]. J Vis Exp, 2015, (99): e52766.
- [4] 王巧. 一种简便实用的多功能大鼠固定器[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(7): 1532-1532.
- [5] 嵇承栋. 实验大鼠固定装置的设计及尾静脉注射的方法研究[J]. 中国基层医药, 2013, (22): 3371-3372.
- [6] 郭洁汝. 一种新型大鼠固定装置的制作与使用方法[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(8): 76-78.
- [7] 刘保新. 介绍一种简易的大鼠固定装置[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 75-76.
- [8] Krinke G. The laboratory rat[M]. San Diego, Calif.: Academic Press, 2000:491.
- [9] Staszky C, Bohnet W, Gasse H, et al. Blood vessels of the rat tail: a histological re-examination with respect to blood vessel puncture methods[J]. Lab Anim, 2003, 37(2): 121-125.
- [10] Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289(5): E823-828.

[修回日期]2016-07-10



血液样本处理方式对 Wistar 大鼠血液生化指标检测结果的影响

朱科燕, 蔡月琴, 徐孝平, 陈 诚, 马全鑫, 陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察血液样本处理方式对大鼠血液生化指标检测结果的影响。**方法** 取体重 180 ~ 220 g 的 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 禁食不禁水 12 h 后, 用 3% 戊巴比妥钠麻醉后取全血和肝素抗凝血各 3 mL。将每种血样分别置于 3 个 1.5 mL 的离心管和肝素抗凝管中各 1 mL, 并分别在室温放置 1 h、2 h、4 h 后进行离心, 测定血糖、血脂、蛋白、肝功能、肾功能、心肌酶等指标。**结果** 血液样本类型和采集后离心前的放置时间对 Wistar 大鼠的血清或血浆 TC、TG、TP、ALB、ALT、ALP、BUN 和 CREA 等指标均无明显影响 ($P > 0.05$)。但血浆的 GLU 值显著高于血清 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并随着采集后离心前放置时间的延长持续下降。血清 AST 和 CK、LDH 值则均显著高于血浆 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随采集后离心前放置的延长呈现持续显著的上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而采集后离心前放置时间对 Wistar 大鼠血浆 AST 和 CK、LDH 值均无明显影响 ($P > 0.05$)。**结论** 血液样本类型对血脂、蛋白和肾功能指标无明显影响, 但对 GLU、AST、CK、LDH 等检测结果有一定影响。采集后离心前的放置时间延长可导致血清血浆 GLU 下降, 血清 AST、CK、LDH 升高, 但对血浆 AST、CK、LDH 指标无明显影响。

【关键词】 Wistar 大鼠; 血清; 血浆; 血液生化指标

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0080-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.015

Effects of different sample process modes on blood biochemical indicator detection in Wistar rats

ZHU Ke-yan, CAI Yue-qin, XU Xiao-ping, CHEN Cheng, MA Quan-xin, CHEN Min-li

(Experimental Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of different sample process modes on blood biochemical indicator detection in Wistar rats. **Methods** 40 Wistar rats of specific pathogen free (SPF) level, weighing 180 ~ 220 g, were took with half males and half females. After 12 h fasting, rats were anaesthetized by 3% pentobarbital sodium, blood was collected and divided into two samples. One of the samples was for whole blood and another for anticoagulation, with 3 mL per serving. Each blood sample was put into three 1.5 mL centrifuge tubes and three heparin anticoagulative tubes with 1 mL per, and centrifuged after putting 1 h, 2 h and 4 h in room temperature for testing blood glucose, blood lipid, protein, myocardial enzymes, indexes of liver and renal function. **Results** The types of blood samples and the standing time after collection and before centrifugation had no significant effect on TC, TG, ALB, ALT, ALP, BUN and CREA in serum or in plasma of Wistar rats ($P > 0.05$). But the value of GLU in serum was significantly higher than that in plasma ($P < 0.05$, P

[基金项目] 浙江省教育厅科研项目 (Y201329481), 浙江中医药大学比较医学创新团队 (XTD201301)。

[作者简介] 朱科燕 (1982 -), 女, 研究方向为动物医学检验检测。

[通讯作者] 陈民利 (1963 -), 女, 教授, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: cmli991@aliyun.com。

<0.01). With the extension of storage time after collection and before centrifugation, the value of GLU continued to decline. The values of AST, CK, LDH in serum were significantly higher than that in plasma ($P < 0.05$, $P < 0.01$). With the extension of storage time after collection and before centrifugation, the value of AST, CK, LDH continued to increase. However, there was no significant effect on the values of AST, CK, LDH by placing different time after collection and before centrifugation ($P > 0.05$). **Conclusion** Types of blood samples had no significant effect on blood lipid, protein and indexes of renal function. However, detection value of GLU, AST, CK and LDH would be influenced on a certain degree. The extension of standing time after collection and before centrifugation resulted in plasma GLU decreasing and plasma AST, CK and LDH increasing, but has no obvious effect on the serum AST, CK and LDH.

【Key words】 Wistar rats; Serum; Plasm; Blood biochemical index

血液生化指标是实验动物最常用的生理学指标,不仅对动物正常生理状态的判定及其饲养有指导意义,而且也是食品、药品、以及化学物质等毒理学安全评价及人类疾病研究中探讨发病机制、选择动物的重要依据和指标。血液生化检测结果易受诸多因素的影响,如动物品种、来源、年龄、体重、饲养环境、检测试剂等^[1-4]。我们在动物实验研究中发现不同的血液样本处理方式对大鼠的生化指标检测有一定影响,为进一步证实这一现象,本文观察了 40 只 Wistar 大鼠的血浆和血清以及采集后不同放置时间对血样生化指标的影响,为生物医药研究中进行动物实验的生化指标检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养条件

体重 180 ~ 220 g 的 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,雌雄各半,购于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0002】。饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK(浙)2013-0184】,温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 50% ~ 60%,光照 12 h 明暗交替。

1.2 实验试剂与仪器

1.2.1 实验试剂:血糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)等检测试剂盒,批号分别为 07183/00001768、07129/00001506、07134/00001690、231068/50002194、022063/50002146、07167/00001867、07131/00001508、07186/00001857、07188/00001886、171035/50002289、19958/00001976、07146/00001670,由德国 DiaSys Diagnostics Systems 生产。

1.2.2 实验仪器:全自动生化分析仪(HITACHI 7020),冷冻高速离心机(BeckmanX-15R)。

1.3 方法

取体重为 180 ~ 220 g 的 Wistar 大鼠 40 只,雌雄各半,适应饲养一周后,禁食不禁水 12 h,用 3% 戊巴比妥钠麻醉后取血 6 mL,分为 2 份血样,一份为全血,置于 3 个 1.5 mL 的离心管中各 1 mL,用于分离血清;另一份为肝素抗凝血,置于 3 个 1.5 mL 的肝素抗凝管中各 1 mL,用于分离血浆。每份血样的 3 个管分别在室温($20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$)放置 1 h、2 h、4 h 后进行离心,日立 7020 全自动生化分析仪测定 GLU、TC、TG、TP、AL、ALT、AST、ALP、BUN、CREA、CK、LDH 等生化指标。其中,TP 为双缩脲法,ALB 为溴甲酚氯法,ALT、AST 为紫外连续监测法,ALP 为速率法,BUN 为谷氨酸脱氢酶法,CREA 为苦味酸法,GLU 为葡萄糖氧化酶法;TC、TG 为酶试剂法,CK 为 IFCC 连续监测法,LDH 为乳酸底物法。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

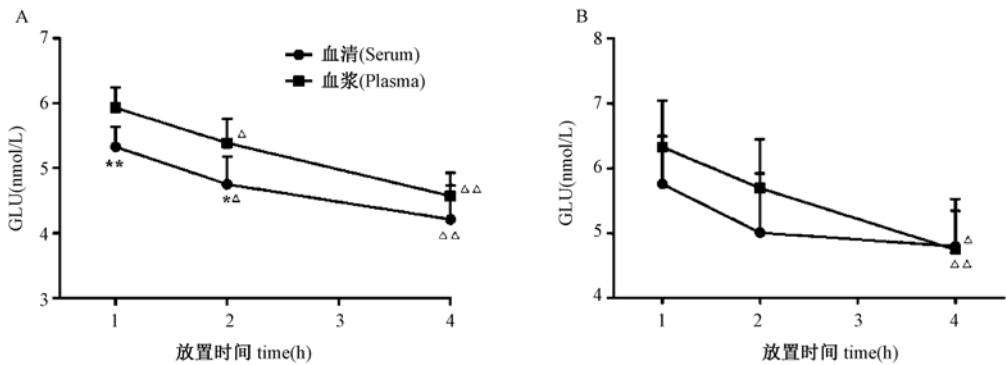
2.1 对血糖血脂和蛋白指标的影响

由表 1 可见,血液样本类型和采集后离心前的放置时间对雄性和雌性 Wistar 大鼠的血清或血浆 TC、TG、TP、ALB 等指标均无明显影响($P > 0.05$),但对血糖检测结果有不同程度的影响。从图 1A-B 可以看出,雌性 Wistar 和雄性 Wistar 大鼠的血浆的 GLU 值均高于血清 GLU 值,其中血样在采集后离心前放置 1 h、2 h 后,血浆 GLU 显著高于血清($P < 0.05$, $P < 0.01$)。且血清和血浆的 GLU 值均随着采集后离心前放置时间的延长而呈持续下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中,雄性 Wistar 大鼠的血浆的 GLU 值下降速度较快,血样在采集后离心前放置 4 h 后,降至血清 GLU 同一水平值。

表 1 血液样本处理方式对血糖血脂和蛋白指标的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of different sample process modes on blood glucose, lipid and protein

指标 Indexes	性别 Sex	采集后离心前放置 1h Standing 1h after collection and before centrifugation		采集后离心前放置 2h Standing 2h after collection and before centrifugation		采集后离心前放置 4h Standing 4h after collection and before centrifugation	
		血清 Serum	血浆 Plasma	血清 Serum	血浆 Plasma	血清 Serum	血浆 Plasma
GLU (mmol/L)	♀	5.33 ± 0.31**	5.93 ± 0.31	4.75 ± 0.42* [△]	5.39 ± 0.37 [△]	4.21 ± 0.53 ^{△△}	4.57 ± 0.36 ^{△△}
	♂	5.76 ± 0.74	6.33 ± 0.72	5.01 ± 0.91	5.70 ± 0.75	4.80 ± 0.73 [△]	4.75 ± 0.60 ^{△△}
TC (mmol/L)	♀	1.34 ± 0.08	1.32 ± 0.07	1.32 ± 0.08	1.34 ± 0.07	1.36 ± 0.07	1.38 ± 0.07
	♂	5.76 ± 0.74	6.33 ± 0.72	5.01 ± 0.91	5.70 ± 0.75	4.80 ± 0.73	4.75 ± 0.60
TG (mmol/L)	♀	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.25 ± 0.05
	♂	0.47 ± 0.12	0.45 ± 0.12	0.46 ± 0.12	0.44 ± 0.12	0.48 ± 0.13	0.38 ± 0.11
TP (g/L)	♀	51.62 ± 0.92	51.88 ± 0.81	51.06 ± 1.26	51.38 ± 0.79	51.43 ± 0.88	51.31 ± 0.87
	♂	52.02 ± 0.48	52.16 ± 0.52	51.10 ± 0.85	51.80 ± 0.64	52.35 ± 0.69	52.28 ± 0.31
ALB (g/L)	♀	28.87 ± 0.41	28.44 ± 0.69	28.68 ± 0.86	28.37 ± 0.43	28.84 ± 0.59	28.18 ± 0.50
	♂	27.99 ± 0.40	27.58 ± 0.34	27.47 ± 0.61	27.52 ± 0.24	28.08 ± 0.32	27.83 ± 0.33

注:血清与血浆比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与采集后离心前放置时间 1h 比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。
Note: Compared between serum and plasma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with samples standing 1h after collection and before centrifugation, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.



注:A:雌性大鼠,B:雄性大鼠。血清与血浆比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与采集后离心前放置时间 1h 比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图 1 血液样本处理方式对 GLU 的影响

Note: A: female rats, B: male rats. Compared between serum and plasma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with samples standing 1h after collection and before centrifugation, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

Fig.1 Effects of different sample process modes on GLU

2.2 对肾功能指标的影响

由表 2 可见,血液样本类型和采集后离心前放置时间对雄性和雌性 Wistar 大鼠的血清 ALT、ALP、BUN 和 CREA 等指标均无明显($P > 0.05$),但对 AST 有一定的影响。从图 2A-B 可以看出,雄性 Wistar 大鼠和雌性 Wistar 大鼠的血清 AST 均显著高于血浆 AST 水平($P < 0.01$),且随采集后离心前放置时间的延长,血清 AST 值持续明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$),而采集后离心前放置时间对 Wistar 血浆 AST 值无明显影响($P > 0.05$)。

2.3 对心肌酶指标的影响

由表 3 可见,血液样本类型和采集后离心前放置时间对雄性和雌性 Wistar 大鼠的血清 CK、LDH 值有明显影响。从图 3A-D 可以看出,采集后离心前放置时间 1 h、2 h、4 h 后,雌性 Wistar 和雄性 Wistar 大鼠的血清 CK、LDH 值均显著高于血浆 CK、LDH 值($P < 0.01$),且随采集后离心前放置的延长血清 CK、LDH 值呈现持续显著的上升($P < 0.01$),而采集后离心前放置时间对 Wistar 血浆 AST 值无明显影响($P > 0.05$)。

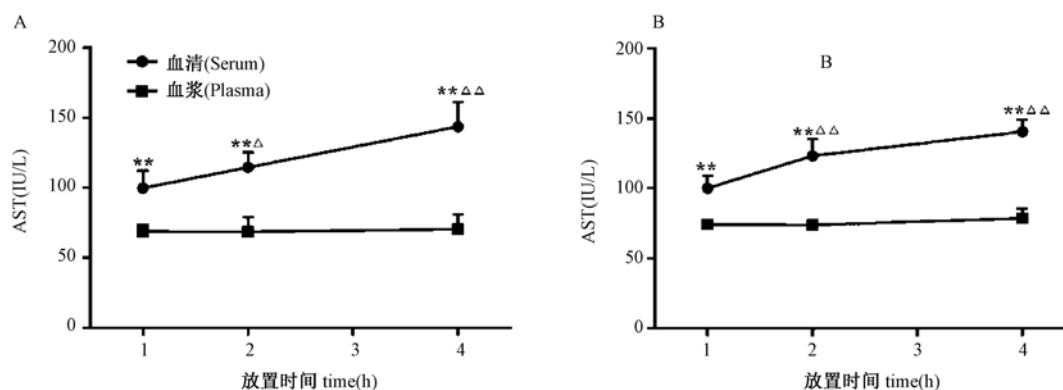
表 2 血液样本处理方式对肝肾功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of different sample process modes on indexes of liver and renal function

指标 Indexes	性别 Sex	采集后离心前放置 1h Standing 1h after collection and before centrifugation		采集后离心前放置 2h Standing 2h after collection and before centrifugation		采集后离心前放置 4h Standing 4h after collection and before centrifugation	
		血清 Serum	血浆 Plasma	血清 Serum	血浆 Plasma	血清 Serum	血浆 Plasma
ALT	♀	30.48 ± 4.17	28.92 ± 5.66	26.06 ± 4.36	24.98 ± 5.99	27.68 ± 3.88	26.76 ± 4.31
(IU/L)	♂	36.08 ± 3.33	34.12 ± 2.52	37.06 ± 2.95	32.78 ± 3.33	36.48 ± 2.80	36.46 ± 3.41
AST	♀	99.58 ± 12.47 **	68.96 ± 4.93	114.42 ± 10.70 ** △	68.78 ± 10.57	143.50 ± 17.58 ** △△	70.70 ± 10.73
(IU/L)	♂	99.96 ± 9.22 **	74.44 ± 3.52	123.16 ± 12.25 ** △△	74.02 ± 3.74	140.46 ± 8.71 ** △△	78.68 ± 7.28
ALP	♀	56.25 ± 3.91	53.76 ± 4.19	53.51 ± 4.23	52.79 ± 4.29	54.17 ± 4.35	52.70 ± 3.68
(IU/L)	♂	148.53 ± 16.75	141.50 ± 16.79	143.33 ± 15.84	138.41 ± 15.76	148.05 ± 16.98	142.11 ± 16.88
BUN	♀	7.23 ± 1.03	7.01 ± 0.93	7.24 ± 0.92	7.09 ± 0.94	7.30 ± 0.97	7.10 ± 0.92
(mmol/L)	♂	6.29 ± 0.30	6.12 ± 0.40	6.35 ± 0.41	6.20 ± 0.31	6.33 ± 0.47	6.19 ± 0.36
CREA	♀	51.35 ± 1.83	48.64 ± 0.53	50.30 ± 1.15	49.12 ± 1.70	52.06 ± 1.22	50.88 ± 2.27
(umol/L)	♂	47.35 ± 3.87	46.17 ± 4.69	46.29 ± 4.83	47.23 ± 4.32	48.41 ± 3.69	46.64 ± 3.16

注:血清与血浆比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与采集后离心前放置时间 1h 比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.

Note: Compared between serum and plasma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with samples standing 1h after collection and before centrifugation, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.



注:A:雌性大鼠,B:雄性大鼠。血清与血浆比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与采集后离心前放置时间 1h 比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

图 2 血液样本处理方式对 AST 的影响

Note: A: female rats, B: male rats. Compared between serum and plasma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with samples standing 1h after collection and before centrifugation, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.

Fig. 2 Effects of different sample process modes on AST

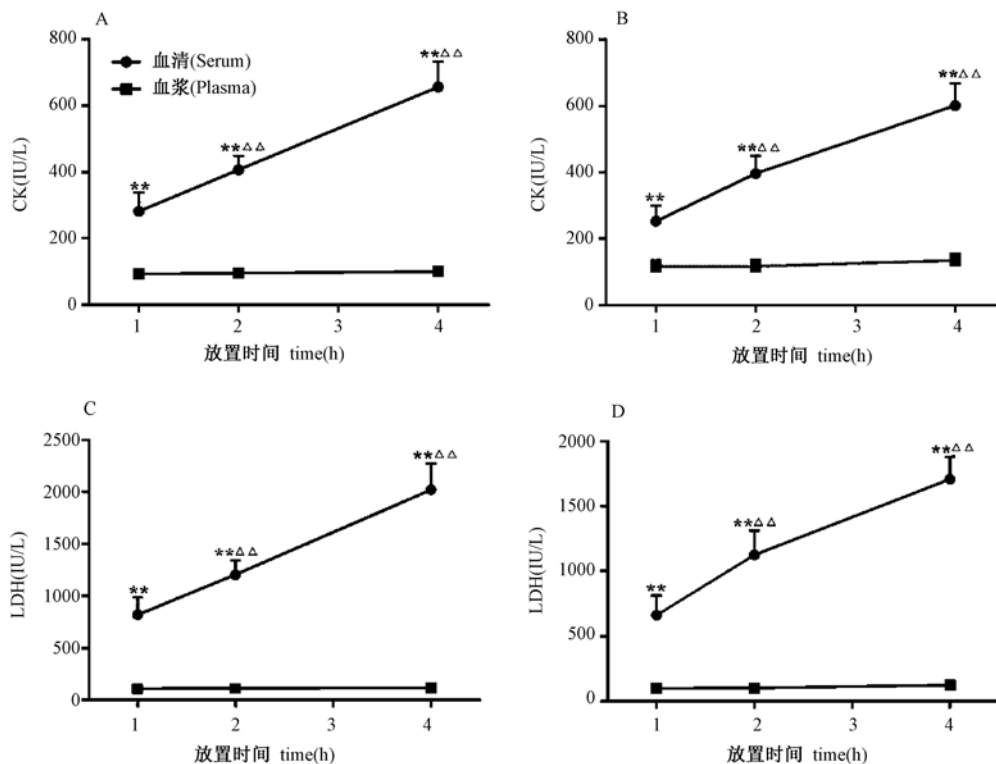
表 3 血液样本处理方式对心肌酶的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of different sample process modes on myocardial enzymes

指标 Indexes	性别 Sex	采集后离心前放置 1h Standing 1h after collection and before centrifugation		采集后离心前放置 2h Standing 2h after collection and before centrifugation		采集后离心前放置 4h Standing 4h after collection and before centrifugation	
		血清 Serum	血浆 Plasma	血清 Serum	血浆 Plasma	血清 Serum	血浆 Plasma
CK	♀	281.58 ± 56.25 **	93.79 ± 6.38	406.68 ± 43.07 ** △△	95.40 ± 7.62	656.41 ± 76.78 ** △△	101.28 ± 8.67
(IU/L)	♂	253.23 ± 46.96 **	116.39 ± 18.51	397.18 ± 53.67 ** △△	117.28 ± 19.94	601.68 ± 66.95 ** △△	134.09 ± 20.96
(IU/L)	♀	820.37 ± 168.24 **	109.15 ± 8.44	1205.93 ± 138.05 ** △△	110.92 ± 25.05	2021.07 ± 252.45 ** △△	118.14 ± 20.98
LDH	♂	662.79 ± 151.01 **	100.16 ± 10.75	1125.48 ± 184.96 ** △△	102.58 ± 13.08	1707.68 ± 174.02 ** △△	124.04 ± 11.17

注:血清与血浆比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与采集后离心前放置时间 1h 比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.

Note: Compared between serum and plasma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with samples standing 1h after collection and before centrifugation, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.



注:A,C:雌性大鼠,B,D:雄性大鼠。血清与血浆比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与采集后离心前放置时间1h比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图3 血液样本处理方式对CK、LDH的影响

Note: A: female rats, B: male rats. Compared between serum and plasma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;

compared with samples standing 1h after collection and before centrifugation, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Fig.3 Effects of different sample process modes on CK and LDH

3 讨论

血液生化指标是反映实验动物状态的重要并且敏感的指标,实验过程中发生的许多病变在病理组织与分子生物学指标变化未完全表现出来时,可能提前在血液学及生化指标中反映出来^[5]。因此,可以根据血液学及其生化指标的变化,来衡量受试药物对动物的影响程度,是动物实验中重要的基础数据。

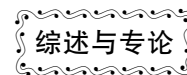
血糖、血脂、蛋白、肝功能、肾功能和心肌酶等指标是动物实验中常用的重要血液生化指标。我们在本次检测中发现,不同的血液样本处理方式对血脂、蛋白、肾功能的影响不大。不管在血清还是血浆样本中,室温放置不同的时间,TC、TG、TP、ALB、ALT、ALP、BUN和CREA含量均比较稳定,没有显著性差异,并且血清中与血浆中的含量也比较一致。随着血液样本放置时间的延长,白细胞降解、红细胞对能量的消耗及葡萄糖的酵解,都可以使血液中的葡萄糖分解,从而降低血液中葡萄糖的

浓度^[6]。在本次研究中,我们发现随着血液放置时间的延长,血清、血浆中的GLU含量持续降低,血浆中GLU显著高于血清,相对血清,血浆的GLU下降较快,这可能与血浆样本在离心前,抗凝全血中的白细胞和红细胞会消耗GLU有关。

不同的血液样本处理方式对酶类指标的影响较大,有文献表明,血液标本的保存时间过长,红细胞中的物质就会发生外渗透,使得血浆内外浓度分布不均,从而导致酶类的测定结果异常^[7]。有临床资料表明LDH只能存放于室温下,标本置于4℃时LDH反而不稳定,-20℃下过夜LDH₄、LDH₅将丧失全部活性^[8]。在血清中,随着血液放置时间的延长,AST、CK和LDH含量持续增加,与临床资料相一致^[9]。但是在血浆中,血浆中AST、CK和LDH含量均显著低于血清,不同时间组的AST、CK含量无显著性差异,说明血浆中这些酶的活性比较稳定。

总之,血液样本类型对血脂、蛋白和肾功能指标无明显影响,但对GLU、AST、CK、LDH等检测结

(上转第94页)



果蝇模型与心脏衰老遗传机制

胡永艳, 孔申申

(北京大学第一医院实验动物中心, 北京 100034)

【摘要】 人类随着年龄的增加, 心脏功能逐渐减退, 作为主要致死病因的心脏疾病随年龄增加而大幅升高。在老龄化人口不断上涨的今天, 深入地了解遗传因素和调节因子在心脏衰老过程中所扮演的角色显得尤为必要。果蝇的心脏像人类一样随着年龄而功能减退, 为了更好的利用果蝇心脏模型研究心脏衰老的遗传学机制, 为老年性心脏病基于分子靶向的诊断和治疗提供更准确的证据, 我们从比较医学的角度总结了果蝇在心脏衰老过程中的特征, 特别是遗传因素对其的影响, 涉及离子交换、营养敏感和收缩功能相关的基因。这些研究成果将为心脏衰老相关疾病的分子靶向诊断和靶向药物治疗提供理论依据, 促进心血管疾病精准医疗的快速发展。

【关键词】 果蝇; 心脏衰老; 遗传机制

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0085-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.016

Drosophila as a model to study genetics of cardiac aging

HU Yong-yan, KONG Shen-shen

(Laboratory animal facility, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

【Abstract】 With age, cardiac performance declines progressively and the risk of heart disease, a primary cause of mortality, rises dramatically. As the elderly population continues to increase, it is critical to gain a better understanding of the genetic influences and modulatory factors that impact cardiac aging. As for the human heart, Drosophila heart function also deteriorates with age. Here, In order to better utilize the Drosophila heart model for genetic mechanism studies of cardiac aging, and supply more reliable evidences for molecular-guided diagnostics and therapeutics of age-related heart disease, we sum up the characteristics of cardiac aging of Drosophila in comparative medicine and review genetic factors contributing to cardiac aging, including genes involved in ion exchange, nutrient sensing, and contractile function. These achievements will provide a theoretical basis for molecular guided diagnostics and targeted drug therapied for cardiac aging related diseases, and promote the rapid development of precision medicine of cardiovascular disease.

【Key words】 Drosophila; Cardiac aging; Genetic mechanisms

现代生物医药的发展已经进入精准医学时代, 人类基因及其变异对疾病表型和治疗反应的影响是靶向诊断和药物靶向治疗的工作基础之一, 通过对相关基因及其遗传变异的功能研究, 实现针对不同人群的精准医疗。对人类基因及其功能的研究是精准医疗发展的关键, 而模式动物是基因功能研

究的有力工具。

果蝇作为一种经典模式生物, 是遗传学研究的良好材料, 除了具有寿命短, 容易繁殖培养等特点外, 其优势还在于已经完成全基因组序列分析并积累了大量遗传学研究方法。通过相关遗传学方法和技术, 我们几乎可以在果蝇中对任何一个基因进

【基金项目】 北京大学第一医院科研基金。

【作者简介】 胡永艳(1986-), 女, 助理研究员, 研究方向: 心血管遗传学。E-mail: huuyg@163.com。

行特定时空的过表达及抑制表达或敲除,从而很方便地观察和分析一个基因在体内的生物学功能。从遗传的角度出发,尽管哺乳动物与果蝇亲缘关系较远,但果蝇与哺乳动物的多数信号传导通路相关基因都具有保守性,而往往一个基因在哺乳动物中会具有多个拷贝,但在果蝇中通常只有一个拷贝,这就为用果蝇作为模式生物研究哺乳动物基因的功能提供了可能和极大的便利。

人口老龄化使全球心血管疾病死亡人数不断增加^[1]。心脏衰老是老年心血管疾病发生的重要因素,其被认为是心脏功能的有害衰退。在哺乳动物中,心脏功能衰退伴随着许多与年龄相关的变化,如心肌细胞数量减少,左室肥大、纤维化和胶原蛋白的积累^[2-4]。心脏衰老导致老年人心血管死亡率和发病率增加。所以对心脏衰老机制的研究显得愈发重要。而随着遗传学和分子生物学的飞速发展,心脏衰老机制的研究获得很大进展。许多控制心脏发育的基因被证明在果蝇和哺乳动物中具有保守性。如第一个发现的果蝇 *tinman* 基因的脊椎动物同源基因 *Nkx2.5*,已被证明能够控制小鼠心脏发育^[5-7],成年果蝇心脏已经被用于研究心脏的功能和衰老^[8-9]。同时,果蝇具有开放的循环系统(图 1),有一个线性心管位于背中线的腹部,和一个向上延伸至头部的主动脉,三套内部瓣膜把腹部心脏分成前锥形腔和三个后腔室,四个心腔各包含一对外瓣膜,在舒张期允许血淋巴液进入心脏。由于果蝇使用导管系统直接向组织运输氧气,心脏功能不像脊椎动物那样和生存紧密联系,因此,果蝇能够承受比哺乳动物更严重的心脏生理机能的遗传改变,类似于脊椎动物心脏模型,也可以通过给予药物刺激来研究果蝇心脏衰老^[10-12]。这些发育特点和遗传优势,使得果蝇的这个模型非常适合心脏衰老的病理生理学和遗传学研究。本文将对果蝇模型在心脏衰老遗传机制方面的研究进行综述。

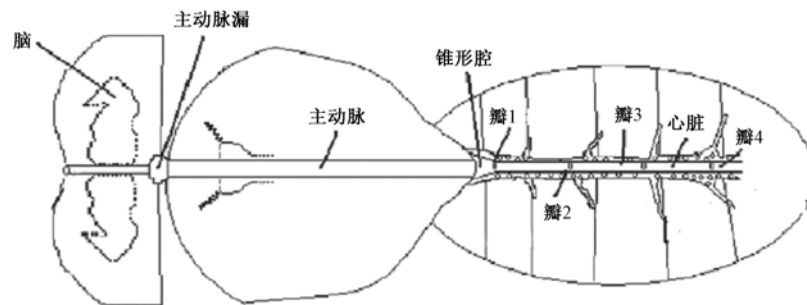


图 1 成年果蝇心脏示意图^[13]

Fig. 1 Heart diagram of adult drosophila

1 果蝇心脏衰老的比较医学特征

1.1 随年龄增长抵抗应激能力减弱

采用电起搏,高温和缺氧处理等方法观察应激下心脏的性能。电起搏方法研究表明果蝇心脏性能随着年龄的增长而衰退^[14]。且果蝇在青年时接受运动训练能够减少老年时心脏功能的下降^[15],这与在哺乳动物中观察到的趋势类似^[16]。以类似电子起搏方式或者通过提高环境温度给予刺激,果蝇心脏的最大心率随年龄下降^[17]。这些结果类似于在人类观察到的最大心率下降与年龄相关^[18]。缺氧处理下,青年和老年果蝇的心脏都暂时停止跳动,但能够在短时间内恢复。青年果蝇恢复的要更快一些^[10]。氧化应激是导致老年人心衰的常见致病机制,果蝇模型中同样发现抑制氧化应激相关的基因,如 JNK 信号通路,随着年龄的增长表达增加^[19]。且发现在果蝇心脏过表达 *MafS* 基因能够抵抗随年龄增加的心律失常和心动周期,而 *MafS* 基因是氧化应激应答转录因子 *Nrf2* 的果蝇同源基因^[20]。慢性应激刺激导致脊椎动物产生应激诱导的心脏肥大。研究表明果蝇在慢性刺激下也会导致异常的纤维形态和降低的终末舒张期心腔大小^[21]。

1.2 随年龄增长心律失常增加

研究发现 1 周龄果蝇心脏以相对稳定的速率节律性收缩。高速率跳动方式随年龄增加减弱,到 5~7 周时,大多数野生型表现出非节律的心脏收缩方式,包括频繁的心搏停止和颤动^[9]。果蝇心脏节律性随年龄增长的变化类似于老年人房颤和心脏衰竭发病率的增加^[22]。

1.3 随年龄增长肌纤维组织排列不紧密

果蝇心管有两种类型的肌纤维,它们具有不同的心肌纤维结构^[23-24];代表进行收缩工作的心肌层的螺旋形或横向的肌原纤维表达转录因子 *tinman*;

心管腹侧面纵向的肌原纤维^[25],其起源和具体功能尚未确定。在青年果蝇中这两种类型的肌原纤维表现出紧密有序的排列,可以观察到肌小节标志物如 α -actinin^[23]。而在老年果蝇中,螺旋形肌原纤维在一定程度上变得紊乱,肌原纤维间可见空隙且排列更不紧密^[24]。同样发现在老年犬心房中心肌纤维排列也不紧密^[26],这表明果蝇心脏年龄相关的心肌纤维结构中变化的起因与哺乳动物的心脏衰老相关。是否哺乳动物心脏衰老中的其他方面的结构重构,如纤维化和胶原蛋白的集聚^[27-28],也与老年果蝇的心脏功能异常相关,这是值得我们进一步研究的。

2 与果蝇心脏衰老相关基因

2.1 离子交换

尽管果蝇心脏体积较小,也适合分析青年和老年果蝇心脏的基因表达变化。例如,心脏性能年龄相关性降低与编码钾通道 α 亚单位的人类电压门控钾通道亚家族 Q1 (potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1, *KCNQ1*) 果蝇同系物及 ATP 敏感钾离子通道 (K_{ATP}) 亚单位 dSur 的心脏 RNA 水平年龄依赖性降低一致^[9]。在人类, *KCNQ1* 参与心肌复极化,这个通道功能的改变增加患心律失常和心源性猝死的风险^[29]。在果蝇,心脏 *KCNQ* 表达水平随着年龄的增长而减少, *KCNQ* 不足导致心脏功能受损,具体表现为年龄相关的心律失常不断增加,和起搏器诱导心脏功能障碍的高易感性。与人类一样,这些异常可以被解释为 *KCNQ* 异常导致的心脏动作电位复极化能力不足。老年野生果蝇中心脏特异 *KCNQ* 过表达抑制升高的心律失常水平,这表明通常发生的衰老心脏中减少的 *KCNQ* 表达导致心律失常发生率的增加^[9]。dSur 在 5 周龄果蝇心脏的表达也显著下降。心脏特异的 RNAi 调节的敲低或者 dSur 的药物处理提示 dSur 通过起搏应激和缺氧刺激诱导的机能障碍来保护心脏功能^[10],这哺乳动物 K_{ATP} 通道的作用相似^[30]。例如,将老年果蝇暴露于吡那地尔 (K_{ATP} 通道激活剂),能够减少它们对于起搏诱导障碍的敏感性^[10]。同时,这表明 dSur 活跃有助于年轻果蝇的心脏性能,然而它的活性随着年龄的增长而下降。

2.2 营养敏感

胰岛素-IGF 受体 (InR) 信号通路在调节寿命的过程中发挥着保守的作用。在酵母、秀丽隐杆线虫、果蝇和小鼠中系统地抑制这个通路已被证明能

够延长寿命^[31]。然而,它在各个器官中参与衰老过程的调控还有待研究。编码胰岛素受体或者其亚单位的基因变异能延长果蝇寿命,具体表现为 7 周龄变异果蝇和 1 周龄对照果蝇的心脏功能类似。通过心脏特异过表达 dPTEN (一种抑制 PI3 激酶的磷酸酶) 或者转录因子 dFoxO 这两种胰岛素信号转导通路负调控因子,致使胰岛素信号通路受损仅发生在心肌细胞中时,也能引起心脏功能的减弱。值得注意的是,心脏特异过表达 dPTEN 或 dFoxO 并不影响整体寿命^[14],这表明仅改变心脏性能不一定改变整体寿命以及胰岛素通路对心脏衰老的影响与其通路对寿命的系统影响是非耦合的。

营养敏感性雷帕霉素靶蛋白激酶 (TOR) 信号通路在心脏衰老中具有重要作用^[32-33],该通路相关基因表达降低能够延长寿命和延迟心脏衰老^[31]。在许多水平上, TOR 和胰岛素通路相互联系,提示这两个通路可能通过上位互作和对共同靶点的调节控制心脏衰老。

实验表明, d4eBP 作用于心脏组织这两个通路的下游。事实上,不管由 dFoxO 还是 dTOR 引起的心脏衰老表型皆能被 d4eBP/eif4E 抑制^[34]。因此,胰岛素或 TOR 信号通路下调引起的心脏衰老延迟,可能最终是由于 d4eBP 活动的增加。

2.3 收缩功能

直接参与形成收缩机制的结构蛋白变异与骨骼肌和心肌的不良表型相关^[35]。抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物连接细胞外机制和亚细胞膜骨架,其主要成分抗肌萎缩蛋白 (*dystrophin*, *Dys*) 基因变异能够导致肌肉萎缩症^[36]。 *Dys* 基因缺陷的果蝇具有心肌扩张表型,以及幼年果蝇心肌纤维组织的过早破坏^[37]。此外,肌纤维组织破坏在老年 *Dys* 突变果蝇中更为严重,具体表现为心肌肌原纤维间隙增大。这表明 *Dys* 在维持心肌生理完整性方面的必要性,且 *Dys* 缺陷也促进心脏结构衰老。此外,尽管年老的野生型果蝇心率通常是降低的, *Dys* 突变果蝇心率更快且不会因年龄的增加而减少。总之,观察到的 *Dys* 缺陷果蝇随年龄而产生的变化表明哺乳动物类营养不良心脏可能表现出相似的随年龄下降,同时也提示这些变化至少加速心脏衰老的某些方面。较之于 *Dys* 突变,在体外抑制肌球蛋白活性的肌球蛋白变异 (D45) 能够导致老年果蝇心率减慢^[38]。较之于野生对照,早在中年 (3 周龄) 时突变体果蝇即表现出心律不齐,且突变果蝇随年龄增加的心率失常事件增多。较之于野生型,尽管果蝇的心肌纤维结构正常, D45 突变果蝇的心管在各个年

龄段都明显扩张。这些变异也会导致心脏收缩性的降低,具体表现为测量缩短分数(fractional shortening, FS)。同人类相似,尽管在野生型果蝇 FS 通常随年龄增长而下降,但是在功能减退的肌球蛋白变异中这个参数没有随年龄增长下降。

人类心脏衰老的特征是心肌细胞数量的减少以及适度的左室肥大^[4],但是野生型果蝇的心脏中没有观察到这种情况。可能是由于果蝇心脏中只有 50 对有丝分裂后细胞沿着心管分布,心肌细胞的减少会导致迅速和严重的损害。事实上,这种表型只在严重突变体中出现,如成年果蝇 *tinman* 缺陷^[5]。另一方面,也应考虑到果蝇具有外骨骼(外角皮),这导致成年果蝇羽化后难以进行额外的全身和组织生长。因此,老年昆虫生长相关的心脏肥大(传统意义上的)可能不容易诱导或发现。

3 果蝇模型在心脏衰老研究中的应用

由于果蝇这种模式动物的生理、遗传特性以及研究心脏功能新技术的开发,研究人员发现了一些重要的调控心脏衰老新基因,并在哺乳动物进行更深层次的基因功能研究。衰老的果蝇心脏还可以用来确定相关基因在调控机体衰老尤其是心脏功能方面发挥的显著作用,相互作用模式,以及心脏功能不同方面相互连接形式。例如,当通过减弱胰岛素或 TOR 通路活动延缓心脏衰老的时候,dSur 和 KCNQ 的表达是否如常。能够改善老年果蝇心脏功能的 KCNQ 过表达也能够改善年龄相关的心肌纤维损坏^[8]。在果蝇心脏中进行的基因及其相互作用的研究将为进一步的基因功能研究并进行分子靶向诊断疾病提供重要的工作基础。同时,由于具有开放的循环系统,果蝇能够承受比哺乳动物更严重的心脏生理机能的遗传改变,可以通过给予药物刺激来研究果蝇心脏衰老,所以果蝇心脏非常适合检验候选新药延缓或治愈衰老相关心脏功能降低的能力。通过将药物添加于食物,并通过完整的和半完整的心脏模型监测其在果蝇生存中对心脏功能的影响,或者直接将药物添加于人造血淋巴,并记录灌注后离体果蝇心脏的跳动过程,在果蝇中能够简易地评估药物对心脏功能的潜在影响^[9,10,39]。这些给药方法以及开发出的研究心脏功能和衰老的新的分析手段是定量分析药物对心脏功能影响的有前景的方法。果蝇和哺乳动物之间的心脏功能具有保守性也表明,果蝇心脏模型可以用来在器官/组织水平初步筛选潜在致心律失常物质,为靶向药物治疗提供理论基础。

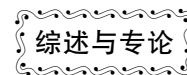
4 总结

综上所述,果蝇模型操作简便、基因同源性高,且果蝇心脏与哺乳动物类似,会随着年龄增长而功能衰退,这些都使得果蝇这个模型非常适合心脏衰老遗传机制研究。果蝇模型已在心脏衰老相关离子交换、营养敏感和收缩功能等相关基因研究方面取得巨大进展,对果蝇模型心脏衰老遗传机制的研究将为进一步心脏衰老相关疾病的分子靶向诊断和靶向药物治疗提供理论依据,促进心血管疾病精准医疗的快速发展。

参考文献:

- [1] Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, *et al.* Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality [J]. *N Engl J Med.* 2015, 372(14):1333–41.
- [2] Khan A S, Sane D C, Wannenburg T, *et al.* Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging cardiovascular system [J]. *Acta Paediatrica Supplement*, 2002, 54(1):25–35.
- [3] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation.* 2003, 107(2):346–54.
- [4] Olivetti G, Melissari M, Capasso J M, *et al.* Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. [J]. *Circulation Research*, 1991, 68(6):1560–1568.
- [5] Sun Z Y, Zhao Y F, Chen J, *et al.* Cardioblast-intrinsic Tinman activity controls proper diversification and differentiation of myocardial cells in *Drosophila* [J]. *Development*, 2006, 133(20):4073–83.
- [6] Bodmer R, T V V. Heart development in *Drosophila*, and vertebrates: Conservation of molecular mechanisms [J]. *Developmental Genetics*, 1998, 22(3):181–186.
- [7] Olson E N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. [J]. *Science*, 2006, 313(5795):1922–7.
- [8] Ocorr K, Perrin L, Lim H Y, *et al.* Genetic Control of Heart Function and Aging in *Drosophila* [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2007, 17(5):177–182.
- [9] Ocorr K, Reeves N L, Wessells R J, *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(10):3943–8.
- [10] Akasaka T, Klinedinst S, Ocorr K, *et al.* The ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(32):11999–2004.
- [11] Johnson E, Ringo J, Bray N, *et al.* Genetic and pharmacological

- identification of ion channels central to the *Drosophila* cardiac pacemaker. [J]. *Journal of Neurogenetics*, 1998, 12 (1): 1–24.
- [12] Johnson E, Ringo J, Dowse H. Modulation of *Drosophila* heartbeat by neurotransmitters [J]. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic & Environmental Physiology*, 1997, 167(2):89–97.
- [13] Piazza N, Wessells R J. *Drosophila* models of cardiac disease. [J]. *Progress in Molecular Biology & Translational Science*, 2011, 100:155–210.
- [14] A. Wessells, Pérez-Pomares J M. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells [J]. *Anatomical Record Part A Discoveries in Molecular Cellular & Evolutionary Biology*, 2004, 276(1):43–57.
- [15] Piazza N, Gosangi B, Devilla S, *et al.* Exercise-Training in Young *Drosophila melanogaster* Reduces Age-Related Decline in Mobility and Cardiac Performance [J]. *Plos One*, 2009, 4 (6): e5886.
- [16] Ascens ão A, Ferreira R, Magalhães J. Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria [J]. *International Journal of Cardiology*, 2007, 117(1):16–30.
- [17] Paternostro G, Vignola C, Bartsch D U, *et al.* Age-associated cardiac dysfunction in *Drosophila melanogaster*. [J]. *Circulation Research*, 2001, 88(10):1053–8.
- [18] Fleg J L, O'Connor F, Gerstenblith G, *et al.* Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women. [J]. *Journal of Applied Physiology*, 1995, 78 (3):890–900.
- [19] Monnier V, Ichétorres M, Rera M, *et al.* dJun and Vri/dNFIL3 are major regulators of cardiac aging in *Drosophila*. [J]. *Plos Genetics*, 2011, 8(11):e1003081–e1003081.
- [20] Mohammed Mahidur Rahman, Gerasimos P. Sykiotis, Mayuko Nishimura, *et al.* Declinin signal dependence of Nrf2 – MafS-regulated gene expression correlates with aging phenotypes [J]. *Aging Cell*, 2013, 12(4):554–562.
- [21] Yu L, Daniels J, Glaser A E, *et al.* Raf-mediated cardiac hypertrophy in adult *Drosophila*. [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2013, 6(4):964–976.
- [22] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises; Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003, 107(2):346–54.
- [23] Mery A, Taghli-Lamalle O, Clark K, *et al.* The *Drosophila* muscle LIM protein, Mlp84B, is essential for cardiac function. [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211 (Pt 1): 15–23.
- [24] Taghli – Lamalle O, Akasaka T, Hogg G, *et al.* Dystrophin deficiency in *Drosophila*, reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype [J]. *Aging Cell*, 2008, 7 (2): 237–249.
- [25] Molina M R, Cripps R M. Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila*, heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells [J]. *Mechanisms of Development*, 2001, 109(1): 51–59.
- [26] Anyukhovsky E P, Sosunov E A, Plotnikov A, *et al.* Cellular electrophysiologic properties of old canine atria provide a substrate for arrhythmogenesis. [J]. *Cardiovascular Research*, 2002, 54(2):462–469.
- [27] Everett T H, Olgin J E. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. [J]. *Heart Rhythm the Official Journal of the Heart Rhythm Society*, 2007, 4(3 Suppl):24–7.
- [28] Pellman J, Lyon R F. Extracellular matrix remodeling in atrial fibrosis: mechanisms and implications in atrial fibrillation. [J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2010, 48(3):461–467.
- [29] Jentsch T J. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2000, 1 (1):21–30.
- [30] Suzuki M, Sasaki N, Miki T, *et al.* Role of sarcolemmal K (ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109 (4):509–516.
- [31] Kenyon C J. The genetics of ageing. [J]. *Nature*, 2010, 464 (7288):504–12.
- [32] Zhao Z C, Yan C S, Maiese K. Cardiovascular disease and mTOR signaling. [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2011, 21(5):151–5.
- [33] Neill C O. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease [J]. *Experimental Gerontology*, 2013, 48(7):647–653.
- [34] Eroglu F, Yavuz LCeylan B G, Sevin G, *et al.* d4eBP, acts downstream of both dTOR and dFoxO to modulate cardiac functional aging in *Drosophila* [J]. *Aging Cell*, 2009, 8(5):542–552.
- [35] Spletter M L, Schnorrer F. Transcriptional regulation and alternative splicing cooperate in muscle fiber-type specification in flies and mammals [J]. *Advanced Materials Research*, 2014, 321(1):90–98.
- [36] Emery A E. The muscular dystrophies. [J]. *Lancet*, 2002, 359 (273):2367–2370.
- [37] Taghli – Lamalle O, Akasaka T, Hogg G, *et al.* Dystrophin deficiency in *Drosophila*, reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype [J]. *Aging Cell*, 2008, 7 (2): 237–249.
- [38] Cammarato A, Dambacher C M, Knowles A F, *et al.* Myosin Transducer Mutations Differentially Affect Motor Function, Myofibril Structure, and the Performance of Skeletal and Cardiac Muscles [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(2):553–62.
- [39] Akasaka T, Ocorr K. Drug discovery through functional screening in the *Drosophila* heart. *Methods Mol Biol*. 2009, 577:235–49.



Fkbp51 与应激相关疾病的研究进展

张玲玲,邱 彬,杨志伟,雍伟东

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 应激反应是对机体面对紧迫与危险时产生的一系列非特异性生理和心理应答反应的总称。下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴作为神经调节的中枢系统,在应激反应引起的一系列神经内分泌的改变中具有重要的调控作用。糖皮质激素受体(GR)是 HPA 轴维持稳态的重要调节因子。FKBP51 作为一种与 FK506 结合的共伴侣蛋白,对 GR 和 HPA 轴的功能具有负向调节作用,这一调节功能需要伴侣蛋白(热休克蛋白 Hsp90/70 等)和 FKBP52 的共同参与。近年来通过大规模人类基因组的研究发现,*Fkbp51* 在由应激引发的一系列精神和代谢紊乱疾病中具有重要的调节作用。本文将对 *Fkbp51* 在应激相关精神疾病以及物质代谢紊乱中的作用和影响进行综述。

【关键词】 *Fkbp51*;应激反应;HPA 轴;GR

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0090-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.017

Regulation of the response to stress-related disorders by *Fkbp51*

ZHANG Ling-ling, QIU Bin, YANG Zhi-wei, YONG Wei-dong

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Stress response is the process that our body produces a series of nonspecific physiological and psychological response when dealing with pressure and dangers. The hypothalamus - pituitary - adrenal (HPA) axis, as the central nervous system, plays a critical functional role in regulating stress response. Glucocorticoid receptor (GR) is an important regulatory factor for HPA axis's homeostasis, and its function needs to combine with heat shock protein (Hsp90/70) and co-chaperone proteins (FKBP51 or FKBP52). FKBP51, a FK506-binding protein, is a negative regulatory of GR and HPA axis function. In recent years, *Fkbp51* has been identified as a significant regulatory in the stress-related psychiatric and metabolic disorders. Here we will review the recent studies of *Fkbp51* on stress-related psychiatric and metabolic disorders.

【Key words】 *Fkbp51*; stress response; HPA axis; GR

1936 年,内分泌学家 Hans Selye 将机体面对紧迫与危险时产生的一系列非特异性生理与心理应答反应的总和称为应激反应(stress)^[1]。应激的基

本反应为一系列神经内分泌的改变,而其中最主要的变化就是下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenocortical, HPA)轴的异常亢奋^[2]。糖

【基金项目】国家重点基础研究发展(973)计划(2013CB945001);协和青年创新基金(3332015054)。

【作者简介】张玲玲,女,研究方向:基因与发育生物学。E-mail: 1152156788@qq.com。

【通讯作者】雍伟东,男,研究方向:生殖与发育生物学。Email: wyong@cnilas.org;杨志伟,男,研究方向:盐敏感性高血压。Email: zhw_yang@hotmail.com。

皮质激素受体 (glucocorticoid receptors, GR) 属于甾体激素受体超家族的成员之一,在体内广泛表达,并且介导糖皮质激素实现对机体行为和代谢等功能的调节,近年来的研究表明,GR 对机体由应激引发的各种精神及代谢紊乱疾病具有调控作用。GR 是 HPA 轴稳态维持的重要调节因子,其功能的发挥需要与伴侣蛋白(热休克蛋白 Hsp90/70 等)及共伴侣蛋白(FKBP51 或 FKBP52 等)结合形成复合物,HPA 功能受损时将引起多种精神和代谢性疾病的发生。其中 FKBP51 对 GR 和 HPA 的功能具有负性调节作用,而 *Fkbp51* 基因多态性也与应激相关的一系列精神和代谢紊乱调节相关。本文将对 *Fkbp51* 在应激相关精神疾病以及物质代谢紊乱疾病中的作用和影响进行综述。

1 HPA 轴与应激刺激

HPA 轴是神经内分泌系统的重要组成部分,参与调节机体许多重要活动,如消化、免疫、心境和情绪、以及能量储存和消耗,并且在人体的应激反应中发挥着核心作用。其生理机制为^[2]:当应激信号经过中枢神经到达下丘脑下部室旁核时,该信号作用于(1)室旁核内的神经元合成并释放促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH);(2)CRH 可以促进垂体前叶合成并分泌促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH);(3)ACTH 再促进肾上腺皮质合成和分泌以皮质醇为中心的糖皮质激素(glucocorticoid, GC);(4)GC 通过负反馈调节作用于海马中的 GR,减少 ACTH 的释放;(5)同时,GC 通过与垂体和肾上腺上分泌的 GR 相互作用,从而减少 ACTH 的释放并且阻断其兴奋的作用。HPA 通过一系列正负反馈调节,促使机体的各个组织发生相应的应激防御反应,使机体保持和恢复内环境的稳定。

2 HPA 轴在应激反应中的作用机制

在正常情况下,当机体受到强烈的外界刺激时,会发生相应的应激反应。按照应激假说,HPA 轴是调节应激反应的关键系统,被认为是很多精神疾病症状和体征发生的共同通路^[3]。有研究表明,抑郁症、PTSD 患者血浆中 GC 浓度升高,出现 HPA 轴功能紊乱^[4-8]。海马作为情绪整合和学习记忆的高级中枢,具有大量的 GR 表达,对 HPA 轴和应激刺激具有负性调节作用。但持续升高的 GC 与海马

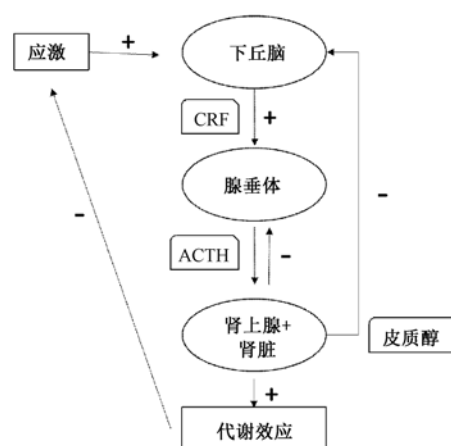


图1 下丘脑-垂体-肾上腺轴

Fig. 1 Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis

内的 GR 结合,将导致海马内 GR 数量和功能的降低,失去对 HPA 轴负性调节作用,引发 HPA 轴功能亢进,最终导致海马神经元的萎缩、凋亡及神经元再生减少等一系列神经可塑性损伤。海马组织的这一病理性改变,将引起学习、认知和情绪等意识功能的损伤,最终导致多种精神疾病的发生。

3 FKBP51 对 HPA 轴的调节作用

FKBP51 是一种 FK506 结合蛋白,广泛表达于各种组织中^[9],也被称为 FKBP5。FKBP5 具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶(PPIase)结构域和蛋白-蛋白相互作用的三十四肽重复(TPR)结构域。PPIase 结构域,也被称为 FK506 结合结构域,负责两个相互排斥的功能:当与 FK506 或雷帕霉素结合时,引起免疫抑制作用;当不与免疫抑制配体结合时,作为辅助分子伴侣蛋白通过 TPR 结构域,同细胞内其他分子伴侣蛋白(如热休克蛋白 90(HSP90))结合形成复合体,通过其异构酶活性发挥调节作用。作为共伴侣蛋白直接与伴侣蛋白(热休克蛋白 Hsp90/70 等)结合并参与激素-受体复合物的形成和调控。通过体外生化实验发现,FKBP51 参与 GR 复合体的形成,并将 GR 滞留于细胞质中,抑制 GR 的核转位及其转录活性。因此,FKBP51 在功能上对 GR 活性起到负调节作用^[10],并在 HPA 轴的调节和应激反应中发挥重要调节作用。FKBP51 不仅对机体糖脂代谢刺激具有重要的调节作用,并且与多种由应激刺激引发的精神疾病的发生相关,例如焦虑、抑郁、PTSD、成瘾等^[11]。

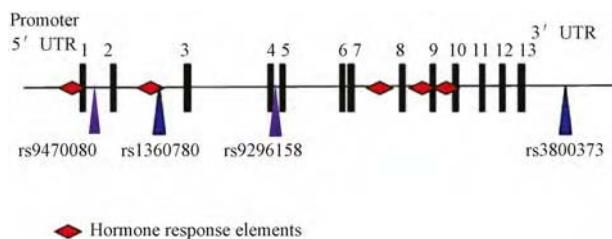


图 2 *Fkbp51* 基因多态性^[11]

Fig. 2 The polymorphism of *Fkbp51*

4 *Fkbp51* 单核苷酸多态性与 GR 的关系

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的 DNA 序列的多态性。SNP 是目前发现的第三代遗传标志。如果染色体上某个位点单个碱基的变化频率在特定人群中超过 1%, 这种基因组上的碱基变化可以被称为 SNP。在人类基因组水平, 平均每 1000 个碱基对就有一个 SNP。在个体基因组 DNA 中, 少数甚至个别碱基的多态性, 就可以导致特定基因相关病理过程的发生。因此, SNP 对于研究疾病的发病机制、临床早期的诊断、个体化治疗以及预后都有重要的意义^[12]。FKBP51 作为一种在 GR 分子复合物中与 Hsp90 结合的共伴侣蛋白, 影响着配体的结合、GR 的信息交换以及 GR 由细胞质到细胞核中的迁移。FKBP51 在功能上对 GR 起负向调节作用, 因此很多文章对 *Fkbp51* 基因的 SNPs 与 GR 之间的相关性进行研究。

Binder 等^[13]在对正常个体的研究中发现, *Fkbp51* 基因的 4 种功能性 SNPs (rs9296158, rs3800373, rs1360780 和 rs9470080) 与 GR 的抗性具有相关性。随后的分析进一步证明相同的 SNPs 可以增强 PTSD 病人体内 GC 的敏感性, 另外, 这些 SNPs 对于在儿童时期遭遇虐待后预测成人是否患 PTSD 具有一定的影响^[14]。同时有研究发现^[15], 携带 *Fkbp51* 基因 SNP rs9296158 等位基因 A 的 PTSD 病人, 表现为 GR 的超敏感性, 但是携带 GG 基因型的患者则具有更低血清皮质醇水平。另外在该研究中还发现, PTSD 的临床症状与特异性基因的表达相关, 这表明 PTSD 的内在表型是由功能性的 *Fkbp51* 基因 SNPs 决定的。

5 FKBP51 在应激相关精神疾病中的作用

FKBP51 通过影响 GR 活性参与 HPA 轴功能的调节。通过对基因组和疾病相关性的研究发现,

Fkbp51 基因的 SNPs 与人类多种精神疾病的发生具有高度相关性, 如 PTSD、抗抑郁应答、社会心理应激障碍、自杀行为等^[16]。

同时也发现, 精神类应激刺激可引起 *Fkbp51* 表达水平的改变。例如, 经历“911”事件后的 PTSD 幸存者, 其体内外周血中 *Fkbp51* mRNA 的表达明显降低^[17], 而经历创伤事件后几小时内个体 *Fkbp51* mRNA 的表达变化情况与 4 个月后 PTSD 的建立也具有直接相关性^[18]。抑郁症也是慢性应激下的一种病理性行为异常, 这主要是应激后常常伴有抑郁而且应激后抑郁症发生率显著高于正常^[19]。Binder 等^[20]通过对 *Fkbp51* 基因上的 SNPs 进行研究发现, *Fkbp51* 基因上存在若干可能导致 FKBP51 蛋白表达水平改变的 SNPs, 他们与抑郁症的反复发作、抗抑郁疗效均存在显著相关性。也有研究发现, *Fkbp51* 基因多态性与抑郁症病人的抗抑郁治疗效果具有很大的关联。如 *Fkbp51* 基因 rs1360780 位点 TT 基因型的患者抑郁症发病率高, 但是对抗抑郁药物反应更快、疗效更好, 携带 rs3800373 位点 CC 基因型的患者治疗预后较该位点其他基因型的患者更好。

利用基因工程技术敲除 *Fkbp51* 基因后, 小鼠在生理和神经内分泌功能上出现对长期社会压力反应性的降低, 表现为肾上腺比重的降低以及皮质酮水平的降低, 以及对急性应激刺激和强力复苏反应的衰减^[21-22]。通过我们前期研究和文献报道, *Fkbp51* 基因敲除 (*Fkbp51* KO) 小鼠在抑郁、焦虑、成瘾等行为学的改变, 进一步证实 FKBP51 基因与多种应激刺激导致的精神类疾病发生具有直接联系。

6 FKBP51 在代谢中的作用

6.1 HPA 轴在代谢中的作用

HPA 轴不仅在机体的神经调节中具有重要功能, 还通过影响机体神经-内分泌-免疫调节系统, 在物质代谢中发挥调节作用。例如, 已发现 II 型糖尿病患者伴有 HPA 轴的功能紊乱, 并且随着 HPA 轴紊乱程度的加重其糖脂代谢障碍进一步恶化^[23]。HPA 轴对代谢的调节作用, 也依赖于 GR 的活性的变化, 例如高脂诱导引起的肥胖与 GR 活性的改变具有直接联系, 而抑制 GR 活性具有促使机体肥胖发生的作用。据文献报道, AgRP-特异性 GR 敲除小鼠(一种神经特异在 AgRP 神经元中敲除 GR 的条件性基因修饰小鼠)在经过高脂饮食后, 相比于野生型小鼠, 表现为能量消耗的增加, 同时对高脂饮

食诱导产生的肥胖具有显著的抵抗作用^[24]。这表明,在高脂饮食条件下,GR 在 AgRP 神经元调节通路中具有抑制能量消耗的作用,从而导致机体肥胖的产生。此外,GR 可能通过调节脂肪细胞分化、脂肪细胞胰岛素敏感性在代谢中发挥作用。

6.2 FKBP51 在代谢相关应激中的作用

高脂饮食诱导对于机体来说是一种慢性应激刺激,慢性应激也被认为是患精神疾病和代谢紊乱疾病的主要危险因素^[25-26],因此机体需要相应的应激反应来抵抗或者适应这些刺激。有研究发现^[27],相比于正常饮食,对小鼠进行为期 8 周的高脂饮食(high-fat diet, HFD)喂养后,小鼠的体重显著增加,并且下丘脑腹内侧核中 *Fkbp51* mRNA 表达水平升高。这表明在高脂饮食刺激下,下丘脑中 *Fkbp51* 基因的表达情况与小鼠体重的增加具有显著的相关性。此外,我们的前期研究结果也发现,FKBP51 KO 小鼠对高脂饮食诱导的肥胖具有明显的抵抗作用^[28]。这些研究结果表明 *Fkbp51* 基因可能作为应激与代谢调节相关基因的靶点。

此外,脂肪诱导分化可以认为是一种对细胞的特殊刺激。通过细胞脂肪诱导分化实验,同样发现 *Fkbp51* 基因与脂肪诱导刺激具有显著的相关性。有文献报道^[29],通过对 3T3-L1 和小鼠成纤维细胞进行脂肪诱导分化实验发现,敲除 FKBP51 后将抑制细胞向脂肪细胞的分化,并且减少脂质在细胞中的积累,表现出对该刺激的明显抵抗作用。

通过以上的研究结果,更加确定了 *Fkbp51* 基因可能是应激与代谢调节之间的一个潜在基因靶点。

7 小结

应激对机体生理功能、心理和行为活动有着极大的调节作用,是人类生活质量、身心健康和疾病的主要风险因素。一方面,应激促使机体在面对紧迫和危险时快速有效的重新分配生理和心理资源,从而使机体更好的适应并提高生存能力;另一方面,应激会影响我们的生活质量和身心健康,超负荷的应激更会引发一系列应激相关精神疾病和代谢疾病的发生。PTSD、抑郁症、社会心理应激障碍等应激相关疾病已经成为一类严重影响人类身心健康的精神疾病,而与应激相关的肥胖、糖尿病等代谢疾病同样成为阻碍人类健康的一大类疾病。因此对应激相关疾病的预防和治疗已经成为一个亟待解决的科学问题。

目前,人们大多将重点集中在应激所引发的精神障碍和心理疾病,而对应激所诱发的肥胖等代谢相关疾病的研究还相对较少。FKBP51 作为免疫亲和蛋白家族的一员,通过对 GR 的负反馈作用来调节 HPA 轴对机体的调控,不仅与应激产生的精神疾病发生具有相关性,并且在多种应激产生的糖、脂代谢调节中具有重要的调节作用。因此我们可以推测,FKBP51 对于各种精神类和物质类应激可能具有较为广谱的抵抗作用,调控 *Fkbp51* 基因的表达能够使机体更好的对抗不良环境、维持体内稳态。未来通过加深对 *Fkbp51* 基因在多种应激刺激下的相关研究,将为应激相关精神疾病和代谢疾病的研究和治疗提供新的思路和靶点。

参考文献:

- [1] 罗跃嘉,林婉君,吴健辉,等. 应激的认知神经科学研究[J]. 生理科学进展. 2013(05): 345-353.
- [2] 柴丽,赵博. 抑郁症与 HPA 轴关系及中药干预的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志. 2011(12): 268-271.
- [3] 周江宁,闫雪波. 抑郁症发病的下丘脑中枢驱动调节机制[J]. 中国科学技术大学学报. 2008(08): 967-977.
- [4] Yehuda R. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder[J]. Psychiatr Clin North Am. 2002, 25(2): 341-368.
- [5] Munck A, Naray-Fejes-Toth A. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions[J]. Ann N Y Acad Sci. 1994, 746: 115-130, 131-133.
- [6] Yehuda R. Advances in understanding neuroendocrine alterations in PTSD and their therapeutic implications[J]. Ann N Y Acad Sci. 2006, 1071: 137-166.
- [7] de Kloet C S, Vermetten E, Geuze E, et al. Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review[J]. J Psychiatr Res. 2006, 40(6): 550-567.
- [8] Roy A, Hodgkinson C A, Deluca V, et al. Two HPA axis genes, CRHBP and FKBP5, interact with childhood trauma to increase the risk for suicidal behavior[J]. J Psychiatr Res. 2012, 46(1): 72-79.
- [9] 陈鹏,陈宏宏,程元荣. FKBP5 的研究进展[J]. 海峡药学. 2004(03): 6-10.
- [10] Wozniak G M, Ruegg J, Abel G A, et al. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells[J]. J Biol Chem. 2005, 280(6): 4609-4616.
- [11] Tatro E T, Everall I P, Masliah E, et al. Differential expression of immunophilins FKBP51 and FKBP52 in the frontal cortex of HIV-infected patients with major depressive disorder[J]. J Neuroimmune Pharmacol. 2009, 4(2): 218-226.
- [12] 季鑫,高春芳. TGFβ1 基因单核苷酸多态性与疾病的关系

- [J]. 现代免疫学. 2009(02): 165-168.
- [13] Binder E B, Bradley R G, Liu W, *et al.* Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults[J]. JAMA. 2008, 299(11): 1291-1305.
- [14] Castro-Vale I, van Rossum E F, Machado J C, *et al.* Genetics of glucocorticoid regulation and posttraumatic stress disorder-What do we know? [J]. Neurosci Biobehav Rev. 2016, 63: 143-157.
- [15] Mehta D, Gonik M, Klengel T, *et al.* Using polymorphisms in FKBP5 to define biologically distinct subtypes of posttraumatic stress disorder; evidence from endocrine and gene expression studies[J]. Arch Gen Psychiatry. 2011, 68(9): 901-910.
- [16] Kang H, Sayner S L, Gross K L, *et al.* Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation[J]. Biochemistry. 2001, 40(35): 10485-10490.
- [17] Yehuda R, Cai G, Golier J A, *et al.* Gene expression patterns associated with posttraumatic stress disorder following exposure to the World Trade Center attacks[J]. Biol Psychiatry. 2009, 66(7): 708-711.
- [18] Segman R H, Shefi N, Goltser-Dubner T, *et al.* Peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles identify emergent post-traumatic stress disorder among trauma survivors [J]. Mol Psychiatry. 2005, 10(5): 500-513, 425.
- [19] 安书成, 安锋利. 5-羟色胺与应激反应及其抑郁症的关系[J]. 陕西师范大学继续教育学报. 2006(01): 122-124.
- [20] Binder E B, Salyakina D, Lichtner P, *et al.* Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment[J]. Nat Genet. 2004, 36(12): 1319-1325.
- [21] Touma C, Gassen N C, Herrmann L, *et al.* FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior [J]. Biol Psychiatry. 2011, 70(10): 928-936.
- [22] Hartmann J, Wagner K V, Liebl C, *et al.* The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress [J]. Neuropharmacology. 2012, 62(1): 332-339.
- [23] 张汝学, 马海港, 周珺, 等. 慢性应激对大鼠糖代谢的影响及初步机制[J]. 西北国防医学杂志. 2013(03): 201-204.
- [24] Shibata M, Banno R, Sugiyama M, *et al.* AgRP Neuron-Specific Deletion of Glucocorticoid Receptor Leads to Increased Energy Expenditure and Decreased Body Weight in Female Mice on a High Fat Diet[J]. Endocrinology. 2016; n20151430.
- [25] Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression [J]. Neuropsychopharmacology. 2000, 23(5): 477-501.
- [26] Tamashiro K L. Metabolic syndrome: links to social stress and socioeconomic status[J]. Ann N Y Acad Sci. 2011, 1231: 46-55.
- [27] Balsevich G, Uribe A, Wagner K V, *et al.* Interplay between diet-induced obesity and chronic stress in mice: potential role of FKBP51[J]. J Endocrinol. 2014, 222(1): 15-26.
- [28] 张曼, 邱彬, 曹勇, 等. 共伴侣蛋白 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的作用[J]. 中国比较医学杂志. 2015, 25(7): 53-58.
- [29] Stechschulte L A, Hinds T J, Khuder S S, *et al.* FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GRalpha and PPARgamma [J]. Mol Endocrinol. 2014, 28(8): 1265-1275.

[修回日期]2016-07-06

(下接第 84 页)

果有一定影响。采集后离心前的放置时间延长可导致血清血浆 GLU 持续下降, 血清 AST、CK、LDH 升高, 但对血浆 AST、CK、LDH 指标无明显影响。

参考文献:

- [1] 吴晓燕, 王冬平, 等. 不同日龄 SPF 级 Wistar 大鼠血液生化参考值的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(7): 28-32.
- [2] 王刚, 黄少琼, 等. 性别、年龄等对 SPF 级近交系 Wistar 大鼠血常规值的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(3): 147-150.
- [3] 胡雄飞, 杨秀鸿, 陈志莲. 不同周龄、雌雄 SD 大鼠血液生理生化指标比较分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(10): 1173-1176.
- [4] 王冬平, 隋丽华, 尚世臣, 等. 清洁级 SD 大鼠血液生理生化

指标的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 44-46.

- [5] 樊军, 秦俊, 刘春霞, 等. 建立 Wistar 大鼠血液及生化指标正常参考值范围的探讨[J]. 公共卫生与预防医学, 2010, 21(6): 50-52.
- [6] 郑红芬. 血液标本处理方式对生化检验结果的干预作用[J]. 医药前沿, 2016, 6(2): 349-350.
- [7] 梁贵昌. 溶血标本对常规生化检验结果的影响[J]. 当代医学, 2012, 18(32): 102-102.
- [8] 赵来, 鲍淑银, 董宇. 标本前处理对生化检测的影响[J]. 临床合理用药, 2010, 3(2): 124-125.
- [9] 张庆侠, 张然蓉, 周天祥, 等. 标本放置时间和温度对血清乳酸脱氢酶活性的影响[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(13): 1847-1848.

[修回日期]2016-07-01