



《中华急诊医学杂志》第五届组稿会

论文汇编

中华急诊医学杂志编辑委员会 主办
吉林省医学会急诊医学分会 承办

2006年7月28~8月1日·长春

目 次

人 TLR4 基因 5' 正调控区的鉴定	冯凯 文爱清 黄宏等(1)
胚胎干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤海马的影响	马杰 杨敏 江峰等(7)
灯盏花素抑制血管平滑肌细胞增殖的分子基础研究	钱传云 郝萍 陈荣琳等(14)
实验性室颤家兔血浆和脑组织内皮素及一氧化氮变化及其意义的研究	刘光亮 邢吉红 孙明莉(30)
头孢哌酮钠联合左氧氟沙星对大鼠创伤弧菌脓毒症的实验治疗及血中 mCD14 的影响	卢中秋 梁欢 李景荣等(32)
大鼠创伤弧菌脓毒症血清细胞因子动态变化的实验研究	卢中秋 邱俏桦 梁欢等(38)
创伤弧菌脓毒症大鼠血浆组织因子和组织因子途径抑制物的动态变化及抗菌药物对其影响	梁欢 卢中秋 邱俏桦等(41)
氧化糖基化抑制剂对糖尿病鼠血脂和主动脉细胞间粘附分子-1 表达的影响	李强翔 钟惠菊 肖扬等(45)
重症胰腺炎并急性肺损伤大鼠肺组织蛋白激酶 C 与细胞外信号调节激酶的表达及意义	路小光 战丽彬 范治伟等(53)
盐酸戊乙奎醚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用	许铁 庞涛 纵雪梅等(57)
乌司他丁对脓毒症大鼠急性肺损伤保护作用研究	李文华 宋志芳 单慧敏(62)
乌司他丁对脓毒性休克患者细胞因子的影响	蒋龙元 杨炼红 常建星等(69)
降钙素原在脓毒症患者中的动态变化及中药干预的影响	莫晶晶 王红 张淑文等(72)
大剂量糖皮质激素治疗重症心肌炎与肺炎并发心衰与急性呼吸窘迫综合征抢救成功一例	宋志芳 谢伟 单慧敏等(76)
动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者脑脊液 IL-6、sICAM-1 含量变化的动态研究	陆士奇 程晓娟 肖接承(82)
脑出血患者血浆及血肿液 TAT 含量变化的意义	吴成翰 杨瑞玲 李会忠等(86)
脑出血患者神经元凋亡及调节机制的观察	吴成翰 丁喜艳 叶小包等(91)
心肌梗死超急性期 T 波改变的临床意义	尤明丽 顾卫东(97)
心肌型脂肪酸结合蛋白在急诊胸痛患者中早期诊断急性心梗的价值评价	张鹏 王前 郑磊等(99)
爱通立早期静脉溶栓治疗急性脑梗死临床研究	王雪里红 曹红 樊琨等(103)
血栓前体蛋白与血脂对急性冠脉综合征预后的评估价值	沈雁波 俞燕 张彬等(112)
血清蛋白指纹技术在冠心病不稳定型心绞痛诊断中的应用	冯凯 赵文度 郑燕华等(116)
老年急性心肌梗死并急性左心衰竭 20 例临床分析	段德云 苗翠 刘利江等(122)
特发性异常 J 波与 Brugada 综合征的临床研究	胡建伟 林加锋 林文辉等(123)

三磷酸腺苷终止阵发性室上性心动过速的有效剂量及安全性···	胡建伟 诸葛慧香 林加锋(126)
急诊快速诊断标准心电图的方法·····	徐汉友(129)
高渗性非酮性糖尿病昏迷二例·····	余安平 樊满松(131)
应用长托宁抢救急性左心功能不全一例·····	王晶岩(132)
四例肢体动脉闭塞临床分析·····	林亚棋 吴梅芳 许锋(133)
妊娠相关血浆蛋白 A 在急性冠脉综合征中的预测价值·····	邓学军 覃数(134)
癫痫持续状态治疗探讨·····	陈兴泉(137)
儿童非何杰金淋巴瘤 APRIL 及其受体 mRNA 水平的定量测定·····	顾健辉 张冬雷 徐美玉(139)
应用长托宁抢救氨基甲酸酯类杀虫药重度中毒一例·····	崔广凯(144)
毒鼠强中毒反跳分析·····	张建川 陈国明 王树山(145)
特殊情况下急性一氧化碳中毒的诊断·····	高兴斌 王淑琴(148)
腹部外科脓毒症 368 例的临床救治·····	岳茂兴 戎亚雄 史卫海等(150)
重症急性胰腺炎的手术时机和手术方式·····	刘保池 刘海燕 朱志强等(155)
依达拉奉对脑外伤和脑出血病人肝肾功能的影响·····	邵林华 傅斌 施达等(158)
食管穿孔急诊处理原则及治疗方式的探讨·····	何泽锋 王建军 汪文东等(161)
微创血肿引流加尿激酶灌注治疗重症高血压脑出血临床观察·····	赵建修(165)
新思路大面积烧伤早期复苏治疗(附 62 例报告)·····	杨苓山 孙建忠 吴劲(168)
成批重度烧伤的分阶段救治·····	杨苓山 孙建忠 吴劲(170)
不同内固定方法治疗掌指骨骨折的探讨·····	孙 适(172)
外伤性臀肌筋膜室综合征的早期诊断及处理对策——附 3 例报告···	张鹏 王家林 张春才(174)
39 例外伤急诊死亡病例分析·····	赵成进 韩希望(176)
374 例急性颅脑损伤中躁动病人的分析·····	高永平(178)
急性脑外伤对心电图的影响内蒙古包头市中心医院·····	尤明丽 顾卫东 蔡林(179)
弥漫性轴索损伤的诊断和治疗·····	顾卫东 尤明丽(181)
心脏创伤临床救治·····	吴金荣 陈方明(183)
精神分裂症病人突发呛食呼吸停止半小时抢救成功一例·····	于秀平 冯娜 姬素丽(185)
心脏骤停时肾上腺素最适剂量的研究·····	刘晓亮 邢吉红 孙明莉(186)
复苏药物联合应用研究进展·····	陈寿权 章杰 李章平(190)
胃粘膜气体张力计在休克液体复苏中的应用·····	张斌 李锐(193)
395 例院前心搏停止病例统计工作中的问题·····	高兴斌 王淑琴 曹长兰(196)
北京市突发事件中成批伤病的特点研究及救治分析·····	樊琨 王雪里红 吴贵革等(198)
深圳市 3 年急救死亡病例普查的一般情况分析·····	梁实 江捍平 许四虎等(202)
拓展社区健康服务中心院前急救空间的探讨·····	朱一龙 赵云鹏 陈虹(207)
零距离护理服务在急诊中的实践·····	谢丽芳 杨华(210)
《中华急诊医学杂志》网上投稿系统使用说明·····	编辑部(212)
文后参考文献著录规则(GB/T 7714 - 2005)·····	(221)

人 TLR4 基因 5' 正调控区的鉴定

解放军第 306 医院中心实验室(北京,100101) 冯 凯

中国人民解放军交通医学研究所(重庆,400042) 文爱清 黄 宏 朱佩芳 王正国 蒋建新

【摘要】目的 初步确定 TLR4 基因 5' 远端髓系细胞特异性的转录调控区域。**方法** 采用分子克隆结合报告基因分析的方法,构建 TLR4 基因 5' 旁侧 -2413 ~ +66 序列与荧光素酶报告基因载体 pGL-3 的重组质粒及其缺失质粒,通过 DEAE-Dextran 介导的转染技术导入人 K562 细胞,检测各报告基因质粒荧光素酶活性。**结果** TLR4 基因 5' 旁侧转录起始位点上游 -1337 ~ -683bp 区域在 K562 细胞中,能够增强报告基因转录活性。**结论** TLR4 基因 5' 旁侧存在远端细胞特异性的调控区域,定位并鉴定参与调控的转录因子,可望阐明 TLR4 基因表达调控及其组织和细胞特异性表达的机制。

【关键词】 内毒素 TOLL 样受体 4 转录调控

人 TLR4 基因自 1998 年成功克隆以来^[1],大量研究表明,它是介导细菌内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 跨膜信号转导的关键蛋白分子,它的表达水平对于 LPS 介导的非特异免疫反应具有重要作用,与脓毒症的发生发展密切相关^[2-5]。TLR4 的表达存在种属特异性和细胞特异性,现代分子生物学认为这主要与其转录水平的控制有关。然而,TLR4 基因的转录调控机制尚不清楚了,给该基因参与与脓毒症进程的研究造成很大困难。2000 年 Rehli 等的研究表明,人 TLR4 基因无 TATA 盒,其表达主要受远端调控元件的调控,启动子位于转录起始位点之前 743bp 序列以内,参与基础转录调控的核心区域位于 -75 至起始密码子之间^[6]。他们实验显示,在 TLR4 基因 5' -3228 ~ -743bp 之间,可能存在一个单核细胞特异的远端负调控区,在 THP-1 细胞中特异地抑制荧光素酶报告基因活性。Roger 等对小鼠 TLR4 基因基本转录调控的研究,也发现了类似的上游调控区域^[7]。但到目前为止,TLR4 基因 5' 远端调控区域尚没有更精确的研究。为此,我们采用基因克隆和报告基因技术,在髓系 K562 细胞中,对 TLR4 基因 5' 远端调控区域进行了研究,希望能够对 TLR4 基因的转录调控机制进行更深入的认识,为其参与脓毒症进程的关系研究奠定基础。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pGL-3 - promoter、pRL - CMV 购自 Promega 公司。

1.1.2 引物 TLR4 5' 区 (-2413 ~ +66) 克隆用引物由上海生物工程有限公司合成。上游引物 P1 5' 加上了 MluI 酶切位点和三个保护碱基,下游引物 P2 5' 加上了 XhoI 酶切位点和三个保护碱基,其序列为:

P1: 5' tgc, acg, cgt, acc, tgg, acc, tgt, gat, gat, tag, g 3'

P2: 5' cta, ctc, gag, agc, aat, tgg, tgt, att, caa, agc, a 3'

1.1.3 试剂 小量质粒抽提试剂盒,小量胶回收试剂盒为 Omega 公司产品;PCR 反应试剂盒, DNA 连接试剂盒, BglII, HindIII, MluI, SphI, XhoI, SnaBI, NdeI, KpnI, BamHI 限制性内切酶,均购于 TaKaRa 公司;DNA 聚合酶大片段 (Klenow 酶), DEAE-Dextran 转染试剂,双荧光报告分析系统 (Dual-Luciferase Reporter Assay Systems) 为 Promega 公司产品。

1.1.4 其它 人白血病细胞株 K562 由重庆医科大学检验系提供, JM109 菌株购于 Promega 公司。

1.2 主要仪器 Eppendorf 梯度 PCR 扩增仪为美国 Eppendorf 公司产品;荧光光度计 (Lumi-

noskan Ascent luminometer) 为芬兰 Thermo Lab-systems 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 各重组载体的构建

采用真核转录调控的基本方法—缺失法,对功能区域进行初步定位。先将 TLR4 基因 5' 区(-2413~66)克隆到一个无启动子的荧光报告基因的上游,然后根据不同的限制性内切酶对克隆到荧光报告载体上游的 TLR4 基因 5 区进行缺失,形成含有不同 TLR4 基因 5' 区片段的衍生质粒。

1.3.1.1 pGL-3-TLR4 基因 5 区(-2413~66)质粒的构建

pGL3-promoter SV40 缺失质粒(pGL-3-BH)的构建 将 pGL3-promoter 采用 HindIII 和 BglII 限制性内切酶进行双酶切,然后用 DNA 聚合酶大片段(Klenow)将其粘性末端补平,再连接形成 pGL3-BH。

TLR4 基因 5' 调控区(-2413~+66)PCR 反应体系如下:10×缓冲液, MgCl₂25mM, dNTP 2.5mM, Taq Ex 1U, 上下游引物各 5pmol, 100ng 人基因组 DNA。反应条件:预变性 94℃5 分钟,94℃30 秒,56℃1 分钟,72℃3 分钟,30 个循环,最后 72℃延伸反应 10 分钟。

pGL3-BH 及 TLR4 5' 调控区 PCR 产物进行 MluI 和 XhoI 双酶切,pGL3-BH 双酶切后纯化产物与 PCR 片段双酶切后纯化产物的连接获得 pGL3-TLR4 基因 5' 区(-2413~+66)质粒。pGL3-TLR4 基因 5 区(-2413~+66)质粒转化以氯化镁法制备的感受态大肠杆菌 JM109,然后铺于含 100μg/ml 氨苄青霉素的琼脂平板上,37℃培养 16~18 小时。挑取单个菌落分别接种于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃培养,200rpm 气浴摇床振荡培养 12~14h。4000rpm 离心收集菌液,少量碱裂解法提取质粒 DNA 并纯化。经转化 JM109 大肠杆菌筛选出多个阳性克隆,通过测序,我们获得了插入片段完全正确的 pGL-3-TLR4 基因 5' 区(-2413~+66)质粒,简称为 pGL3-TLR4-F,这是本研究所有缺失质粒的母本。

1.3.1.2 pGL3-TLR4-F 缺失质粒构建 为

了明确 TLR4 基因 5' 区具有调控作用的 DNA 片段,利用内切酶将 pGL3-TLR4-F 质粒进行分段切割,分别构建 5' 区缺失质粒。

在 TLR4 基因 5' -2413~+66 存在着四个常见的单一限制性内切酶位点: MluI (-2413)、SnaBI (-1613), NdeI (-1337) 和 BglII (-683)。通过上述内切酶不同组合对 pGL3-TLR4-F 质粒酶切,末端补平后再连接,获得 4 种重组缺失质粒:分别为 pGL3-TLR4-A、pGL3-TLR4-B、pGL3-TLR4-C 和 pGL3-TLR4-D。pGL3-TLR4-A 为 MluI、BglII 酶切后去除 -2413~-683 片段,即插入的片段为 -682~66。pGL3-TLR4-B 为 MluI、NdeI 酶切后去除 -2413~-1337 片段,插入片段为 -1337~66。C 为 NdeI、BglII 酶切后去除 -1337~-683 片段,插入片段 -2413~-1338 和 -682~66 连接的片段。D 为 SnaBI、BglII 酶切后去除 -1613~-683 片段,插入 -2413~-1614 和 -682~66 连接的片段。

1.3.1.3 pGL3-TLR4-G 质粒构建

pGL3-TLR4-B MluI、BglII 酶切产物克隆到 pGL3-promoter 质粒多克隆位点。然后用 MluI、NdeI 酶切后去除 -2413~-1337 片段,末端补平,再连接后建成 pGL3-TLR4-G (-1337~-683) 质粒。

1.3.2 pGL3-TLR4-F 及其它质粒的筛选和鉴定

筛选方法同 pGL3-TLR4-F 质粒。本研究对构建的母本质粒“pGL3-TLR4-F”进行了插入片段的测序,其它克隆采用常规方法进行鉴定。

1.3.3 K562 细胞培养:本实验采用的细胞系是人类白血病细胞系 K562,该细胞在免疫相关研究中应用广泛。K562 细胞为悬浮细胞,培养方法参照《分子克隆第三版》。

1.3.4 K562 细胞转染 转染前一天将 2×10⁶ K562 细胞接种于 6 孔细胞培养板。第二天,分别以 2μg pGL3 质粒和 0.02μg pRL-CMV 质粒双转染 K562 细胞,转染方法为 DEAE-Dextran 法,具体参照 Promega 公司操作手册,本研究采用的 DEAE-Dextran 浓度为 400ug/ml。

培养 24 小时后换液, 继续培养 24 小时, 收集细胞, 进行化学发光检测。

1.3.5 荧光检测 采用荧光光度仪, 以化学发光强度为指标, 每份样本重复测定 3 次取平均值。pRL-CMV 质粒的化学发光强度作为参照 (监测转染效率), 标化 pGL3 系列载体的发光强度, 用其比值作为比较各实验组差别的指标。具体方法参照 Promega 公司操作手册。

1.4 统计学分析

转染实验重复 3 次, 所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差表示 ($\pm s$), 采用 Orgion6.1 软件作图。利用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (One way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异明显, $P < 0.01$ 表示相差非常显著。

2 结果

2.1 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒鉴定

2.1.1 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒电泳根据实验的策略构建的各荧光报告载体在 JM109 大肠杆菌中进行转化, 挑选阳性克隆培养, 提取质粒 DNA 进行初步鉴定 (图 1)。由于各缺失质粒来源于 pGL3-TLR4-F 母质粒, 各缺失质粒是否构建成功可以根据其与母质粒和空载体 BH 的关系进行初步判断。理论上 pGL3-TLR4-F > pGL3-TLR4-C > pGL3-TLR4-D > pGL3-TLR4-B > pGL3-TLR4-A > BH > pRL; (pRL 为共转染质粒, promega)。电泳显示与预期一致。

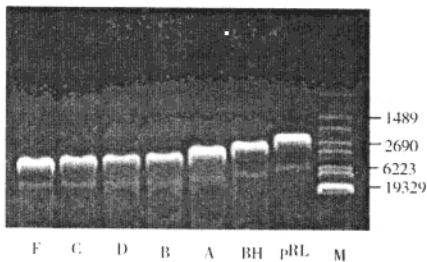


图 1 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒电泳结果 1% 琼脂糖凝胶电泳。F: pGL3-TLR4-F; A: pGL3-TLR4-A; B: pGL3-TLR4-B; C: pGL3-TLR4-C; D: pGL3-TLR4-D; BH: 空载体; pRL: 共转染质粒 (promega); M: λ -EcoT14 I DNA Marker (TaKaRa)

2.1.2 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒单酶切

结果

将上述质粒进一步线性化, 观察片段的大小。理论上: pGL3-TLR4-F 长度为 7.3kb, pGL3-TLR4-C 为 6.6kb、pGL3-TLR4-D 为 6.3kb、pGL3-TLR4-B 为 6.2kb、pGL3-TLR4-A 为 5.5kb、BH 为 4.9kb, 如图 2 所示, 各片段大小与预期一致。

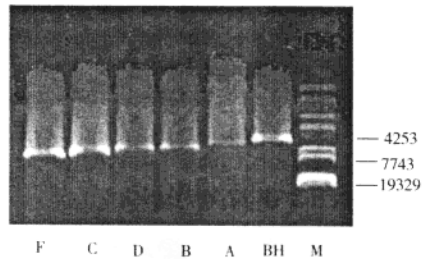


图 2 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒单酶切结果采用 BamHI 单酶切 1% 琼脂糖凝胶电泳。F: pGL3-TLR4-F; A: pGL3-TLR4-A; B: pGL3-TLR4-B; C: pGL3-TLR4-C; D: pGL3-TLR4-D; BH: 空载体; M: λ -EcoT14 I DNA Marker (TaKaRa)

2.1.3 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒双酶切结果

对 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒, 采用 XhoI 和 KpnI 双切, 理论上应能够切会插入片段, pGL3-TLR4-F 酶切产物应为 2.4 和 4.9kb, pGL3-TLR4-C 为 1.7 和 4.9kb, pGL3-TLR4-I 为 1.4 和 4.9kb, pGL3-TLR4-B 为 1.3 和 4.9kb, pGL3-TLR4-A 为 0.6 和 4.9kb。结果与预期一致。(图 3)

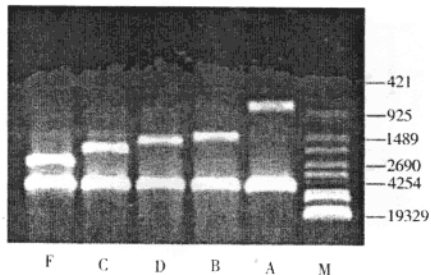


图 3 pGL3-TLR4-F 及其缺失质粒双酶切结果 采用 XhoI 和 KpnI 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳。F: pGL3

-TLR4 - F; A: pGL3 - TLR4 - A; B: pGL3 - TLR4 - B; C: pGL3 - TLR4 - C; D: pGL3 - TLR4 - D; M: λ - EcoT14 I DNA Marker (TaKaRa)

2.2 pGL3 - TLR4 - F 及其缺失质粒鉴定

为了进一步明确增强启动子活性的 DNA 片段, 对 -1337 ~ -683 片段的功能活性进行了进一步观察。将其插入到无关启动子 SV40 上游, 构建成 pGL3 - TLR4 - G 质粒, 观察其对荧光素酶报告基因转录活性的影响。

2.2.1 pGL3 - TLR4 - G 质粒电泳鉴定

如图 4 所示, pGL3 - TLR4 - G 质粒电泳带与预期结果一致, pGL3 - TLR4 - G > pGL3 - promoter > BH > pRL (pRL 为共转染质粒, promega)。

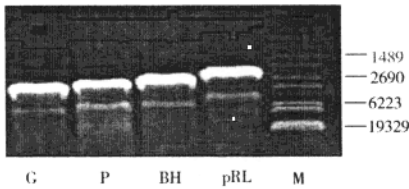


图 4 pGL3 - TLR4 - G 质粒的电泳图谱。G: pGL3 - TLR4 - G (-1337 ~ -683); P: pGL - 3 - promoter 质粒; BH: 空载体; pRL: 共转染质粒 (promega); M: λ - EcoT14 I DNA Marker (TaKaRa)

2.2.2 pGL3 - TLR4 - G 质粒单酶切鉴定

采用 BamH I 内切酶对 pGL3 - TLR4 - G、pGL - 3 - promoter 质粒进行酶切, 各质粒酶切片段大小与预期一致, 分别为 5.6kb、5.1kb (图 5)

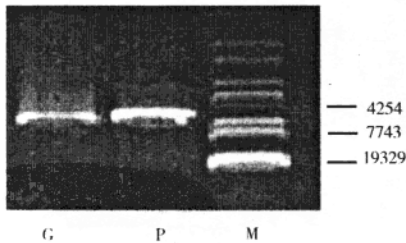


图 5 pGL3 - TLR4 基因 5' (-1337 ~ -683) - SV40

质粒的单酶切电泳图谱。G: pGL3 - TLR4 - G (-1337 ~ -683); P: pGL - 3 - promoter 质粒; M: λ - EcoT14 I DNA Marker (TaKaRa)

2.2.3 pGL3 - TLR4 - G 质粒双酶切鉴定

pGL3 - TLR4 - G 质粒采用 KpnI 和 Bgl II 双酶切回收插入片段, 酶切产物大小 0.7 和 4.9kb 与预期结果一致。(图 3 - 13)。

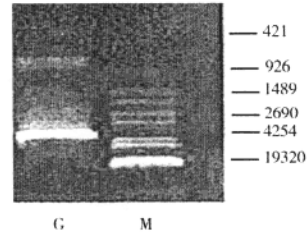


图 6 pGL3 - TLR4 - G 质粒质粒的双酶切鉴定。G: pGL3 - TLR4 - G (-1337 ~ -683); M: λ - EcoT14 I DNA Marker (TaKaRa)

2.2 pGL3 - TLR4 - F 及其缺失质粒荧光素酶活性检测

pGL3 - TLR4 - A 质粒插入的片段为 -683 ~ +66, 基本代表 TLR4 基因的启动子区。如表 1 和图 4 所示, pGL3 - TLR4 - F 和 pGL3 - TLR4 - B 质粒组荧光强度均明显高于 pGL3 - TLR4 - A 质粒组 ($P < 0.05$)。pGL3 - TLR4 - C 和 pGL3 - TLR4 - D 质粒组荧光强度与 pGL3 - TLR4 - A 质粒组无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 pGL3 - TLR4 - F 及其缺失质粒荧光素酶相对活性

pGL3 - TLR4 - Fvector and its deletants 质粒名称	n	Average relative luciferase activity (Firefly/Renilla) 相对发光值
pGL3 - TLR4 - A	3	0.018 ± 0.002
pGL3 - TLR4 - F	3	0.088 ± 0.066*
pGL3 - TLR4 - B	3	0.055 ± 0.028*
pGL3 - TLR4 - C	3	0.012 ± 0.003
pGL3 - TLR4 - D	3	0.024 ± 0.017

F: pGL3 - TLR4 - F; A: pGL3 - TLR4 - A; B: pGL3 - TLR4 - B; C: pGL3 - TLR4 - C; D: pGL3 - TLR4 - D。与 pGL3 - TLR4 - F 比较: * $P < 0.05$

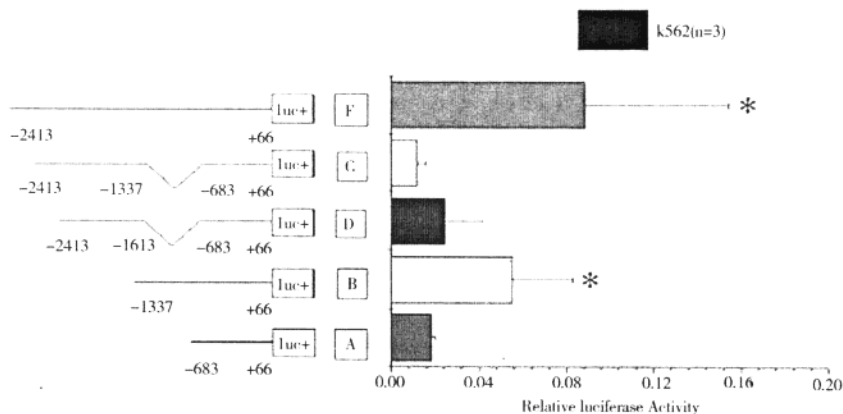


图7 pGL3-TLR4-F及其缺失质粒荧光素酶相对活性

为了进一步明确 TLR4 基因 5' 远端调控区的作用, 研究同时采用了含的荧光报告质粒 pGL3-promoter, 将 TLR4 基因 5' - 1337 ~ - 683 片段插入到 pGL3-promoter 内, 观察了该片段对 pGL3-promoter 内 SV40 启动子活性的

影响。结果显示, pGL3-TLR4-G 质粒组荧光强度明显高于 pGL3-Promoter 组。研究结果进一步说明 5' 区 - 1337 ~ - 683 片段具有增强启动子活性的作用。

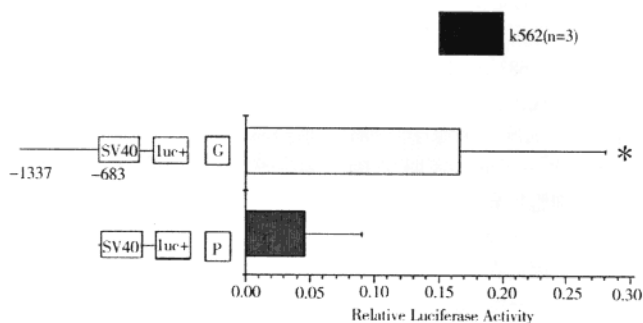


图8 pGL3-TLR4 基因 5' (-1337 ~ -683) 荧光素酶相对活性。

G: pGL3-TLR4-G (-1337 ~ -683); P: pGL3-promoter。与 pGL3-promoter 比较: * $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究在人白血病细胞系 K562 鉴定了一个 TLR4 基因 5' 正向调控区域, 其功能域位于

- 1337 ~ - 683 之间, 能够增强 K562 细胞系中报告基因的转录活性。

TLR4 基因是内毒素关键受体, 与共受体

CD14 在 MD2 的辅助下与 LPS 结合, 将 LPS 的刺激信号传导到单核-巨噬细胞内, 引起其非特异免疫反应, 这是脓毒症的重要发病机制^[2-4]。因此, TLR4 基因的表达水平与脓毒症的发生发展密切相关, 研究表明 TLR4 基因敲除小鼠和基因变异小鼠很容易感染脓毒症。因此研究 TLR4 基因转录调控机制, 对于脓毒症发生和研究脓毒症的干预手段具有重要意义。

我们将 TLR4 基因 5' - 1337 ~ - 683 区域核酸序列检索转录调控数据库 (<http://motif.genome.jp/>), 发现该区存在着的重要转录激活因子 AP-1, C/EBP, Ets-1, Oct-1 等的结合位点。Rehli 等的发现表明, 参与基础转录的激活因子是 AP-1, Ets-1, Oct-1 因子并证明 ets-1 在 THP-1 细胞 TLR4 基因的基础转录调控中起主要作用^[6]。由此我们认为在 K562 细胞中, TLR4 基因 5' - 1337 ~ - 683 中存在的这些转录因子结合位点, 可能是增强 K562 的 TLR4 基因的转录水平的主要因素。

令人感兴趣的是 Rehli 等的发现表明在 - 3228 ~ - 743bp 之间, 存在的是负调控区。而本研究的结果是一个正调控区。为了进一步确认结果, 我们将 - 1337 ~ - 683 区构建到 SV40 启动子上游, 该区同样表现出正调控作用。由于本研究采用的是 K562 细胞, 来源于骨髓, 与的 THP-1 细胞分化水平不同, 表明 TLR4 基因转录调控可能存在细胞特异性机制。K562 细胞系较单核细胞系幼稚, 可以通过诱导分化成单核细胞和红系细胞。因此在基因表达谱上可能与 THP-1 细胞存在着一定的差异, 表现为细胞内反式作用因子表达水平的不同, 这可能是我们实验结果与报道不同的原因。

本研究 PCR 采用高保真的 DNA 聚合酶,

保证了插入片断的正确性, 克隆载体采用 Promega 公司推出的第三代荧光报告基因转录调控研究系统 - pGL-3 系统, 指标更加敏感稳定。试剂和检测设备均为该系统推荐产品, 保证了结果的可靠性 (<http://www.promega.com/pnotes/57/5573a/5573a-core.pdf>)。不足之处在于, 只对母本质粒进行了测序, 对其衍生质粒只进行了常规方法鉴定。因此, 我们将在后续的研究中, 进一步证实我们的结果。

总之, 本研究通过基因克隆技术在 K562 细胞系中初步定位了一个 TLR4 基因正调控区, 为今后进一步研究 TLR4 的转录调控及其与脓毒症的关系提供了重要实验依据。

参考文献

- 1 Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (2): 588-93.
- 2 Beutler B. Innate immune sensing of microbial infection: the mechanism and the therapeutic challenge. *Wien Med Wochenschr*, 2002, 152 (21-22): 547-51.
- 3 Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*, 2000, 25 (2): 187-91.
- 4 Schwartz DA. TLR4 and LPS hyporesponsiveness in humans. *Int J Hyg Environ Health*, 2002, 205 (3): 221-7.
- 5 Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, et al. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics*, 2001, 158 (4): 1657-64.
- 6 Rehli M, Poltorak A, Schwarzfischer L, et al. PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem*, 2000, 275 (13): 9773-81.
- 7 Roger T, Micommet I, Schiesser AL, et al. Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (TLR4) gene expression. *Biochem J*. 2005 Apr 15; 387 (Pt 2): 355-65.

胚胎干细胞移植对缺氧缺血性 脑损伤海马的影响

上海交通大学附属新华医院神经外科 (上海, 200092) 马杰 杨敏 江峰

佳木斯大学附属第一医院骨科 (佳木斯, 154002) 杨建华

中国科学院上海生化细胞所 (上海, 200031) 王 裕

【摘要】目的 研究 ESc 来源的神经前体细胞移植入 HIBD 脑内后的迁移, 在海马的分化, 以进一步探讨细胞移植治疗的机制。方法 小鼠 ESc (含 LacZ 基因) 体外培养、诱导分化, 对诱导分化后的细胞 mRNA 表达进行初步鉴定。取 7 日龄 C57 小鼠, 制作 HIBD 动物模型。术后第 2-3 天, 将 ESc 来源神经前体细胞植入小鼠损伤侧侧脑室, 同时设置对照组 (只注射磷酸缓冲液) 和正常组。然后对小鼠脑组织进行病理学检测、PCR 检测、X-gal 和免疫荧光组织化学染色检测, 以判断移植细胞在宿主损伤海马内存在、迁移和分化情况。结果 小鼠 ESc 在特定条件下, 成功培养诱导分化为神经前体细胞。将此细胞移植入 HIBD 脑内后, 经 PCR 检测、X-gal 染色发现细胞长期存在于脑内, 并迁移、分布于受损的海马, 构成海马结构, 经进一步免疫荧光检测可分化为 NF 阳性的神经元, 同时病理学检测亦发现细胞移植后受损海马内的神经细胞数量明显增加。结论 体外经过特定的诱导分化后, ESc 被定向诱导分化为一群或多群细胞谱系限定的神经前体细胞, 移植入新生 HIBD 小鼠脑内后, 能迁移至损伤的海马, 分化为神经元, 替代损伤或坏死的神经细胞, 可能是其发挥治疗作用的机制之一。

【关键词】胚胎干细胞 神经前体细胞 移植 缺氧缺血性脑损伤 海马 分化

围产期窒息所致缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 是新生儿期危害最大的常见病之一, 常引起新生儿死亡和严重神经系统发育障碍。有研究证明, 将脑细胞移植至 HIBD 的新生鼠脑内, 移植细胞能够存活, 重建神经通路, 并改善损伤造成的功能障碍^[1], 说明神经细胞移植是治疗 HIBD 的一种有效方法。胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESc) 是一种高度未分化的全能细胞, 具有发育成各种类型细胞的潜能, 通过改变其培养基成分可定向诱导为某一专能干细胞, 包括神经前体细胞^[2]。本实验通过研究 ESc 来源的神经前体细胞移植入 HIBD 脑内后的迁移和分化, 以进一步探讨细胞移植治疗 HIBD 的机制, 为今后 ESc 治疗新生儿 HIBD 提供实验依据, 进而为治疗人类神经系统疾病提供新的思路。

材料与方法

一、HIBD 小鼠模型制备

(一) 实验动物 健康 7 日龄新生 C57BL/6 小鼠, 雌雄不限, 平均体重 3.45 ± 0.20 克, 由上海中科院实验动物研究所提供。

(二) 模型制作 10% 速眠新腹腔内注射麻醉后, 小鼠仰卧固定于手术板上, 75% 酒精消毒颈部皮肤, 在解剖显微镜下行颈部正中切口, 分离出右侧颈总动脉, 并用 6/0 号灭菌丝线远端结扎后自中间剪断, 缝合伤口并再次消毒皮肤。整个手术过程在 30min 内完成。术后休息 1h 后, 将小鼠置于 37℃ 的恒温密闭缺氧箱内, 并输入 8% 氧和 92% 氮的混合气体缺氧 90min, 实验结束后, 将小鼠返回母鼠身边继续哺乳喂养。

二、细胞移植

(一) 细胞 采用标记 LacZ 基因小鼠 S8 ESc 进行移植研究 (由上海交通大学医学院发育生物研究所盛慧珍教授提供)。

(二) 培养和诱导 ESc 经几次传代培养后, 0.25% 胰酶消化成单细胞, FBS 终止, 1000rpm 10min, 用诱导培养液 A (高糖 DMEM, 10% FBS, 0.5% P/S, 0.5μM RA) 重悬细胞并种于 Petri 培养皿, 避光 37℃ 5% CO₂ 培养 6 天, 以此诱导得到类胚体 (embryonic bodies, EBs), 然后将 EBs 收集并种于明胶包被的培养皿中, 采用贴壁诱导培养液 (高糖 DMEM, 10% FBS, 10% HBS, 0.5% P/S, 1% 鸡胚渗液) 继续诱导培养, 此后每 2 天换一次液, 共培养 9 天; 最后 0.05% 胰酶消化细胞, FBS 终止, 并用 350 目的滤网过滤细胞, 1000 rpm 10min; 用含有 0.5% 胎牛血清的 PBS 洗涤两次, 然后计数细胞活性 > 95%。最终细胞浓度控制在 3×10^7 /ml, 备用。

(三) 细胞移植 在 HIBD 模型建立后 2-3 天内进行细胞移植, HIBD 小鼠麻醉后固定于立体定向架上, 头部常规备皮、消毒, 无菌操作下, 用微量注射器向小鼠右侧侧脑室内 (ML = 0.75mm, AP = 0.02mm, DV = 2mm) 注入 3μl 细胞悬液 (细胞数约 1×10^4 /μl), 约 3 分钟将细胞缓慢注入, 退针前停针 2 分钟。注射完毕, 消毒缝合切口。HIBD/PBS 组, 作为对照组, 以同样的位点、同样的方法注入同量的 PBS。将苏醒后的幼鼠和母鼠同笼喂养。

三、实验动物分组

随机分为 3 组: ①正常组, 不做任何处理; ②HIBD/PBS 组, HIBD 模型制作后, 植入 PBS, 作为对照; ③HIBD/ESc 组, 细胞移植治疗组, HIBD 模型制作后, 植入 ESc 衍生细胞。每组 9 只小鼠, 其中 3 只小鼠分别在第 1、2、3 个月时除死后进行组织学检测和 PCR 检测; 其余 6 只小鼠在第 8 个月时进行各项检测。

四、检测方法

(一) 细胞 RT-PCR 检测 细胞 mRNA 的抽提以及 RT-PCR 根据 Invitrogen 公司的 RT-PCR 试剂盒说明书操作, 扩增条件为: 94℃ 5

分钟; 35 个循环: 94℃ 1 分钟, 58℃ 0.5 分钟, 72℃ 1 分钟; 最后 72℃ 10 分钟。

GAPDH: 上游引物 5' - CTCGCTCATAGA-CAAGATGGTGAAG - 3',

下游引物 5' - AGACTCCACGA-CATACTCAGCACC - 3';

GFAP: 上游引物 5' - GCGCTCAATGCTG-CCTTCAA - 3',

下游引物 5' - ACGCAGCCAGGTT-GTCTCT - 3';

MAP-2: 上游引物 5' - AGCCGCAACGC-CAATGCATT - 3'

下游引物 5' - TTTGTTCAG-GCTGGCGAT - 3';

Nestin: 上游引物 5' - CAGAGAGCGCTG-GAACAGAGATT - 3',

下游引物 5' - AGACATAGGTGG-GATGGCAGTCT - 3';

扩增后片断的长度为 GAPDH: 305bp, GFAP: 346bp, MAP-2: 313bp, Nestin: 469bp。取扩增产物 10μl 在 1.5% 琼脂糖 (0.5μg/ml 溴化已啶), 电泳检测。

(二) 脑组织 PCR 检测 将实验小鼠处死后, 取出右侧大脑海马组织, 按分子克隆 (第二版, 科学出版社) 方法, 抽提基因组 DNA, 然后利用 PCR 试剂盒 (TaKaRa) 进行扩增。扩增条件为: 94℃ 5 分钟; 40 个循环: 94℃ 1 分钟, 60℃ 0.5 分钟, 72℃ 0.5 分钟; 最后 72℃ 10 分钟。

LacZ: 上游引物 5' - CCAGTCAACAT-CAGCCGCTACAG - 3',

下游引物 5' - CACCAGACCAACTG-GTAATGGTAG - 3';

G3PDH: 上游引物 5' - ATTCTTGC-CAAGAGGTGAC - 3',

下游引物 5' - CAGCAAGGCAAG-GTAGTCTG - 3'

扩增后片断的长度为 LacZ: 198bp, G3PDH: 300bp。取扩增产物 10μl 在 1.5% 琼脂糖 (0.5μg/ml 溴化已啶), 电泳检测。

(三) 病理学检测 小鼠麻醉后, 4%多聚甲醛(PDF)经心脏灌注固定后快速取脑, 并立即置于4% PDF中固定24h以上。按照C57BL/6小鼠脑图谱, 以Bregma为中心, 前后以2mm厚度冠状切脑, 随后常规逐步脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 切片厚 $5\mu\text{m}$, 行HE染色, 光镜下观察。

(四) X-gal和免疫荧光组织化学染色检测 10%速眠新常规麻醉后, 4%PDF心脏内灌注固定, 迅速取出脑组织, 快速放入4%PDF在 4°C 下继续固定60分钟后, 用缓冲液清洗3次, 接着放入X-gal染色液中, 37°C 下染色24小时。然后用10%中性福尔马林后固定24小时, PBS冲洗三次后沉浸在30%蔗糖溶液中 4°C 过夜, -20°C 低温保存。常规冰冻切片, 片厚 $10\mu\text{m}$ 然后将这些冰冻切片常规

间接免疫荧光染色, 一抗分别为抗NF(1:100; Sigma)和抗GFAP(1:200; DAKO), 最后TSA(tm)倍增荧光显影系统显色。在同一视野下, 分别用光镜和荧光显微镜观察移植细胞(X-gal和荧光阳性细胞)。

结 果

一、ESc的体外培养和诱导

(一) 光镜下观察细胞 在含有LIF的ESM培养液和胎鼠成纤维细胞条件下, ESc保持未分化状态克隆生长良好, 形态上呈圆形或椭圆形小集落生长, 集落边缘光滑、明亮, 而细胞排列紧密, 胞体体积小, 细胞核大, 有一个或多个核仁; 此ESc经体外二步诱导培养15天后, EBs周边生长出纤维状细胞, 排列紧密, 核质比大(图1)。

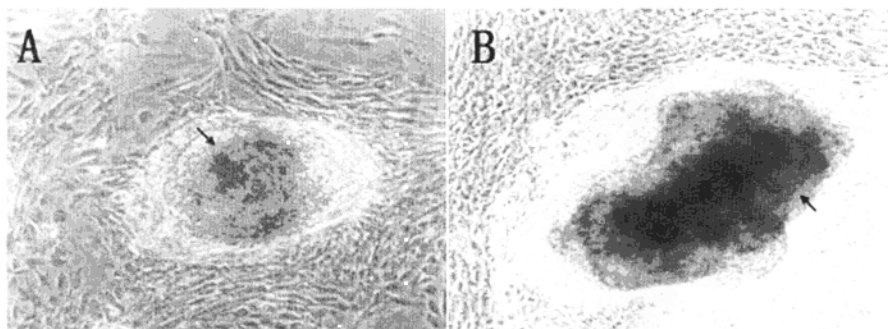


图1 A. 体外诱导分化10天的ESc($\times 10$) B. 体外诱导分化15天的ESc($\times 10$)

(二) 细胞RT-PCR检测 我们将诱导分化15天后的ESc衍生细胞与11.5天的胎鼠脑细胞和成鼠脑细胞同时进行RT-PCR检测。结果显示, 在ESc衍生细胞内强阳性表达神经巢蛋白(nestin), 一种神经前体细胞的早期标记, 表达神经元细胞的标记MAP2, 但不表达胶质细胞的标记GFAP; 在成鼠脑细胞内, MAP2和GFAP均有阳性表达, 但不表达nestin; 在胎鼠脑细胞内表达nestin和MAP2, 但不表达GFAP(图2)。表明在体外经过特定的

诱导分化处理后ESc被定向诱导分化为一群或多群细胞谱系限定的神经前体细胞。

二、脑组织PCR检测 对ESc衍生细胞标记LacZ基因进行PCR检测, 结果显示在ESc衍生细胞内有LacZ基因的阳性表达, 同样在细胞移植组的脑组织内也有LacZ基因的阳性表达, 但在HIBD/PBS组小鼠脑组织内不表达LacZ基因(图3)。表明ESc衍生细胞存在于移植后的脑组织内。

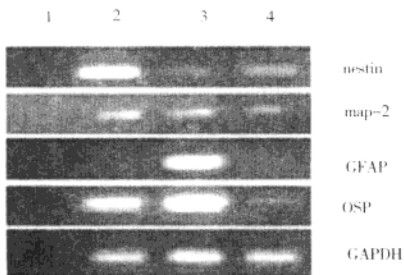


图2 体外诱导分化后的 ES 细胞 mRNA 表达的 RT-PCR 分析结果
Lane 1: 系统控制 Lane 2: 胎鼠脑组织细胞
Lane 3: 成鼠脑组织细胞 Lane 4: 体外诱导分化后的 ES

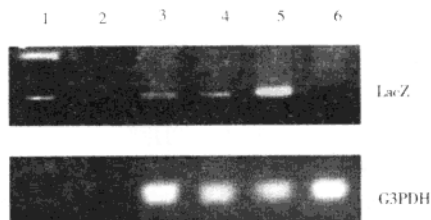


图3 小鼠脑组织中 LacZ 基因 DNA 表达的 PCR 分析结果
Lane 1: DNA ladder marker Lane 2: 系统控制
Lane 3: 细胞移植 2 个月后 HIBD 小鼠脑组织
Lane 4: 细胞移植 8 个月后 HIBD 小鼠脑组织
Lane 5: S8 (ES) Lane 6: HIBD/PBS 小鼠脑组织

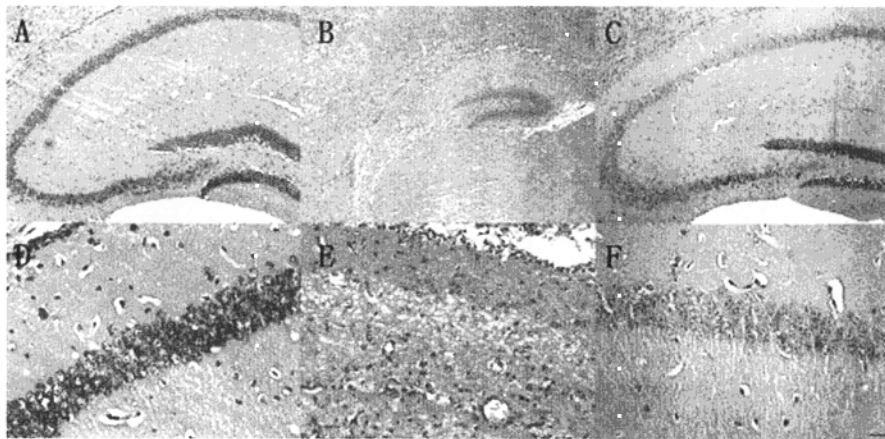


图4 小鼠右侧脑组织海马部位 HE 染色
A: 正常小鼠右侧海马 ($\times 100$) B: HIBD 小鼠右侧海马 ($\times 100$)
C: 细胞移植治疗后小鼠右侧海马 ($\times 100$) D: 正常小鼠右侧海马 ($\times 400$)
E: HIBD 小鼠右侧海马 ($\times 400$) F: 细胞移植治疗后小鼠右侧海马 ($\times 400$)

三、病理学检测 在细胞移植 8 个月后, 对小鼠脑组织病理检查发现, HIBD/PBS 组可见右侧海马神经细胞明显减少 (图 4B, E), 并出现典型的病理表现, 如神经细胞变性坏死、胶质细胞反应性增生形成胶质细胞结节等; 在 HIBD/ES 细胞移植组, 可见右侧海马神经细胞密度明显高于 HIBD/PBS 组, 而与正常组神经细胞密度相似 (图 4A, C, D, F)。

四、X-gal 组织化学染色检测 对移植后 1、2、3、8 个月的脑组织 x-gal 染色后肉眼观察, 发现注射部位和两侧脑室内均可见蓝绿色, 表明有大量移植的被 x-gal 染成蓝绿色的 ES 衍生细胞存在。8 个月脑组织 x-gal 染色后冰冻切片在光镜下可观察到 x-gal 染色阳性的蓝绿色 ES 衍生细胞分布于小鼠脑内, 主要存在于海马, 并构成海马结构 (图 5B, D);

而正常组和 HIBD/PBS 组的脑组织经过同样的 X-gal 染色后, 在海马中都没有观察到蓝绿色的 x-gal 染色阳性细胞 (图 5A, C); 且我们

同时将用于移植的 ESc 衍生细胞团进行 x-gal 染色作为阳性对照, 发现细胞被染成蓝绿色 (图 5E)。

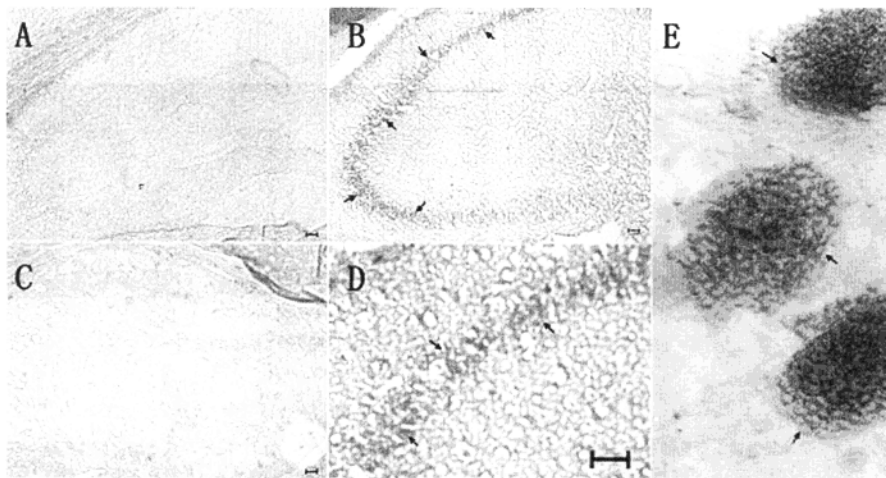


图 5 x-gal 染色后光镜下观察移植后细胞在小鼠右侧海马部位的存活、迁移
A: 正常小鼠右侧海马 (Bar = 50micron) B: 细胞移植治疗后小鼠右侧海马 (Bar = 50micron)
C: HIBD 小鼠右侧海马 (Bar = 50micron) D: 为 B 图中部分放大显示
E: S8 ESc 作为阳性对照 (x10) (↑): x-gal 染色阳性的 ESc 来源的细胞

五、免疫荧光组织化学染色检测 在细胞移植 8 个月后, 我们对细胞移植组小鼠的脑组织, 在 X-gal 染色后, 再用免疫荧光的方法, 对移植入小鼠脑内的 ESc 衍生细胞的分化进行检测。荧光显微镜下所见的 NF 阳性细胞主要分布并构成海马, 且在同一视野下与光镜所见的蓝绿色的 ESc 衍生细胞重合 (图 6B, E), 而 GFAP 阳性细胞散在分布于海马周围白质中, 与同一视野下光镜所见的 ESc 衍生细胞不重合 (图 6C, F)。在只加一抗未加二抗的对照切片中, 未见绿色荧光的阳性细胞 (图 6D)。结果表明, 在海马中, ESc 衍生细胞可分化为 NF 阳性的神经元, 而不分化为 GFAP 阳性的神经胶质细胞。

讨 论

本研究结果表明: 体外经过特定的诱导分化后, ESc 能被定向诱导分化为一群或多群细胞谱系限定的神经前体细胞, 移植入 HIBD 的新生小鼠脑内后, 能迁移至损伤的海马, 分化为神经元, 替代损伤或坏死的神经细胞, 可能是其发挥治疗作用的机制之一。

在体外 ESc 来源的 EBs 形成神经外胚层细胞的早期, 采用高浓度的 RA (10⁻⁶ - 10⁻⁷M) 能使 EBs 中细胞向神经分化的比例显著提高^[2,3,4,5]。Strübing 等的报道表明: 小鼠 ESc (D3 和 BLC6), 在自发性分化过程中神经分化细胞仅占 EBs 细胞的 15 - 30%, 而经过 RA 诱导处理后, 神经分化细胞的比例显著提高, 达到近乎 100%^[5]。在诱导过程中, 我们首先采

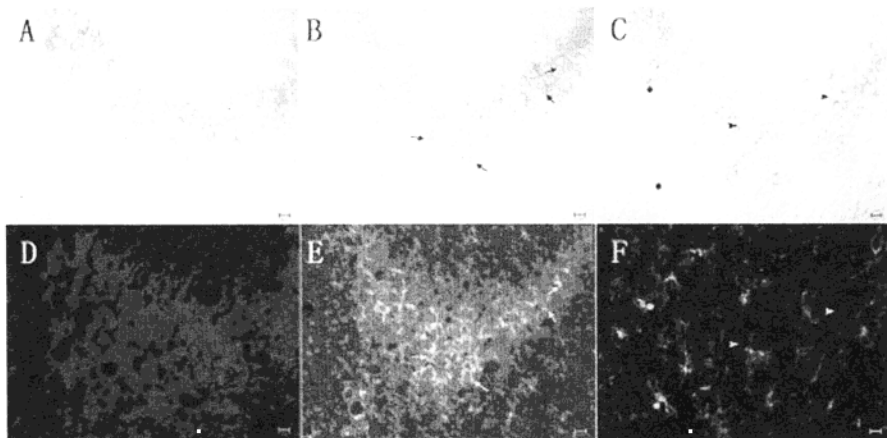


图6 ES来源神经前体细胞在缺氧缺血性损伤脑海马部位的分化

A: 未添加一抗, 阴性对照 B: 一抗为抗 NF 抗体

C: 一抗为抗 GFAP 抗体 D: 未添加一抗, 阴性对照

E: 一抗为抗 NF 抗体 F: 一抗为抗 GFAP 抗体

(↑) 荧光显微镜下所见的 NF 阳性细胞 (神经元) 主要分布并构成海马, 且在同一视野下与光镜所见的蓝绿色 x-gal 阳性的 ES 衍生细胞重合 (B, E)。((?)) 荧光显微镜下所见的 GFAP 阳性细胞 (神经胶质细胞) 散在分布于海马周围白质中, 与同一视野下光镜所见蓝绿色 x-gal 阳性的 ES 衍生细胞不重合 (C, F,)。

(A, B, C, D, E, F: Bar=12.5micron; A, B, C 光镜下观察; D, E, F 荧光显微镜下观察。)

用了全反式维甲酸对小鼠 ES 进行了诱导, 使 ES 能定向向神经细胞方向分化, 这一结果也与最近 Chiba 的报道一致^[6]。作为神经前体细胞早期标志之一, 基因编码的 nestin 在此阶段是高表达的^[7]。我们的 RT-PCR 分析表明: 在体外经过特定的诱导分化处理后 ES 被定向诱导分化为一群或多群细胞谱系限定的神经前体细胞。

海马是大脑内与学习记忆相关的重要部位, 已有的研究表明: 哺乳类动物大脑的海马对缺血缺氧损伤非常敏感, 易受到损伤, 因此 HIBD 必导致其学习、记忆功能的下降^[8]。因此神经前体细胞在 HIBD 海马内的生存、分化, 可能为神经前体细胞移植治疗 HIBD、改善恢复 HIBD 小鼠的学习和记忆功能的机制之一。已有报道 ES 来源性神经前体细胞能改善恢复 HIBD 小鼠的学习和记忆功能^[6,9,10]。本研究发现, ES 来源的神经前体细胞移植入 HIBD 脑内后, 经 PCR 检测、X-gal 染色发现

此细胞长期存在于脑内, 并迁移、分布于受损的海马, 构成海马结构, 经进一步免疫荧光检测可分化为 NF 阳性的神经元, 同时病理学检测亦发现细胞移植后受损海马内的神经细胞数量明显增加。这些植入损伤脑内, 构成海马结构, 并分化为神经元的细胞可能对改善恢复 HIBD 小鼠的学习和记忆功能起到了重要作用。移植神经前体细胞治疗 HIBD 的确切机理尚不清楚, HIBD 的主要病理改变在海马、额叶皮层和枕叶皮层。有实验发现, 在体外由神经前体细胞分化来的神经元之间可以形成有功能的突触联系^[11]; 将神经前体细胞移植至大鼠的海马, 由移植神经前体细胞分化来的神经元和宿主神经元之间亦可形成功能性突触联系^[12]。因此, 移植入脑内的神经前体细胞分化为神经元, 替代海马损伤或坏死的神经细胞而重建神经通路, 可能是其发挥治疗作用的机理之一。另外, 海马损伤后, 一些神经营养因子的表达上调。这些神经营养因子可能有助于移植的神

经前体细胞分化或成熟, 从而使其发挥治疗作用^[13]; 移植细胞的迁移分化亦与受损的脑组织所释放的各种生物信使因子密切相关^[14]。

综上所述, ES 来源的神经前体细胞移植入新生 HIBD 小鼠脑内后, 能迁移至损伤的海马, 分化为神经元, 替代损伤或坏死的神经细胞。这一研究为细胞治疗新生儿 HIBD 治疗提供新的思路, 也将为今后采用人类 ES 移植治疗 HIBD 及其他神经系统疾病提供参考。

参考文献

- 1 Jansen EM, Solberg L, Underhill S, et al. Transplantation of fetal neocortex ameliorates sensorimotor and locomotor deficits following neonatal ischemic-hypoxic brain injury in rats. *Exp Neurol*, 1997, 147: 487-497.
- 2 Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*, 1995, 168 (2): 342-357.
- 3 Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J cell Sci*, 1995, 108: 3181-3188.
- 4 Wobus AM, Kleppisch T, Maltsev V, et al. Cardiomyocyte-like cells differentiated in vitro from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca²⁺ channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1994, 30A (7): 425-434.
- 5 Strubing C, Wobus AM, Hescheler J. Establishment of an in vitro model system for the differentiation of synaptically coupled neurons from mouse embryonic stem cells. *ALTEX*, 1995, 12 (3): 129-137.
- 6 Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, et al. Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant*, 2003, 12 (5): 457-468.
- 7 Lothian C, Lendahl U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci*, 1997, 9 (3): 452-62.
- 8 Choi DW. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci*, 1990, 10 (8): 2493-501.
- 9 Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 2002, 418 (6893): 50-56.
- 10 Bjorklund LM, Sanchez-Pernate R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (4): 2344-2349.
- 11 Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, et al. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol*, 2000, 165: 66-76.
- 12 Auerbach JM, Eiden MV, McKay RD. Transplanted CNS stem cells form functional synapses in vivo. *Eur J Neurosci*, 2000, 12: 1696-1704.
- 13 Lindvall O, Koksa Z, Bengzon J, et al. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci*, 1994, 17: 490-496.
- 14 Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 2001, 32: 2682-2688.

灯盏花素抑制血管平滑肌细胞增殖的分子基础研究

钱传云 郝萍 陈荣琳 王燕琼 王云徽 许汪斌 冯忠堂

昆明医学院第一附属医院急诊科、EICU (昆明, 650032)

【摘要】目的 研究反义凝血酶受体寡核苷酸 (Antisense Thrombin Receptor Oligo-deoxy-nucleotides, Antisense TR ODNs) 及灯盏花素在凝血酶 (Thrombin, IIa) 诱导的血管平滑肌细胞增殖中的作用, 比较二者对血管平滑肌细胞凝血酶受体基因、蛋白表达功能及肌醇代谢的影响, 以期在分子水平探讨高血压脑出血预防用药的作用机制以及药物筛选方法。方法 应用细胞转染、反转录聚合酶链式反应 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)、免疫印迹 (Western-Blot)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 及 ³H 肌醇掺入实验等对体外培养的第 4-6 代 Sprague-Dawley (SD) 大鼠血管平滑肌细胞的凝血酶受体基因、蛋白表达功能、核酸及肌醇代谢进行测定。探索灯盏花素和反义凝血酶受体对血管平滑肌细胞增殖的影响。结果 灯盏花素和反义凝血酶受体寡核苷酸均明显抑制凝血酶诱导的大鼠血管平滑肌细胞的增殖, 与对照组、正义组相比, 存在统计学差异 ($P < 0.05$), RT-PCR、Western-Blot 及 ELISA 试验结果显示灯盏花素和反义凝血酶受体显著抑制了大鼠血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 和蛋白的表达; 且明显抑制了血管平滑肌细胞磷酸肌醇代谢。灯盏花素和反义凝血酶受体对平滑肌细胞增殖的抑制效应没有差异。结论 灯盏花素和凝血酶受体反义序列明显抑制血管平滑肌细胞增殖, 其作用机制为通过抑制凝血酶受体基因的表达 (mRNA 和蛋白的表达), 抑制细胞内信号传递来完成。灯盏花素在预防治疗高血压脑出血中的作用机制之一是通过阻断凝血酶受体表达抑制血管平滑肌细胞增殖而实现的, 该研究结果为反义基因技术应用于心脑血管疾病药物作用位点的筛选提供了理论和实验依据。

【关键词】灯盏花素 反义凝血酶受体寡核苷酸 凝血酶 凝血酶受体 血管平滑肌细胞

前言

高血压性脑出血 (Hypertensive Intracerebral Hemorrhage, HICH) 目前已成为我国中老年人死亡的主要原因, 且发病年龄有明显低龄化的趋势。其发生机理复杂、学说众多。近年来较多学者认为: 高血压引起脑动脉灌注压增高, 使脑血管壁张力增大。持续的张力增大可引起脑血管内膜损伤、血小板聚集、脂质沉积和中层平滑肌增生, 最后形成粥样纤维斑块。同时, 高血压对脑动脉壁的机械压力增加, 血管内皮损伤时, 可释放出较多的血管活性物质, 引起血管平滑肌细胞 (Vascular Smooth Muscle Cells, VSMCs) 的增殖。凝血酶作为关键酶, 除在动脉损伤血管壁、血栓形成中起重

要作用外, 尚可通过多个环节调节 VSMC 增殖。加之由损伤或炎症产生的化学介质作用下, 致血管壁增厚、僵硬, 在粥样斑块形成的参与及其它危险因素的相互作用下, 共同导致动脉硬化及微小动脉瘤的形成, 成为脑出血的主要病因。

血管平滑肌细胞 (Vascular Smooth Muscle Cells, VSMCs) 的异常增殖迁移和表型改变是动脉粥样硬化和脑血管疾病中关键环节。有多种体液因子参与调节血管平滑肌细胞生长增殖: 凝血酶、血管紧张素 II、内皮素、组胺、血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子 β_1