

网络出版时间: 2021-2-5 14:00 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1049.006.html

基因干扰 lncRNA SPRY4-IT1 对 GBC-SD 细胞干样性及线粒体膜电位的影响

李 辰¹, 王庆治², 歧红阳¹, 毛建娜¹, 魏小娟¹, 王鹏立¹, 董志超¹

摘要 目的 通过基因干扰长链非编码 RNA (lncRNAs) SPRY4-IT1, 探究其对胆囊癌 (GBC) 细胞 GBC-SD 肿瘤干细胞样特性及线粒体膜电位变化的影响。方法 设计合成 SPRY4-IT1 shRNA, 将 shRNA-SPRY4-IT1 转染 GBC-SD 细胞, RT-PCR 检测 SPRY4-IT1 的表达水平; BrdU 染色检测细胞增殖; 流式检测细胞凋亡; 肿瘤细胞成球实验检测肿瘤干细胞样特性; 流式检测线粒体膜电位的变化; Western blot 检测肿瘤干样特性标志物以及线粒体损伤标志物的蛋白表达。结果 将 shRNA-SPRY4-IT1 转染 GBC-SD 细胞, SPRY4-IT1 的表达水平降低。干扰 SPRY4-IT1 表达抑制 GBC-SD 细胞增殖; 提高线粒体膜电位, 促进 GBC-SD 细胞凋亡; 降低 GBC 干细胞样特性; 抑制 SOX2, OCT4, CD44, c-Myc 和 Bcl-2 的表达以及促进 cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 和 Bax 的表达。结论 基因干扰 lncRNAs SPRY4-IT1 能降低 GBC 细胞 GBC-SD 肿瘤干细胞特性, 提高线粒体膜电位, 促进 GBC 细胞 GBC-SD 的凋亡。

关键词 lncRNA SPRY4-IT1; 胆囊癌; 干细胞样特性; 线粒体膜电位

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0369-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.007

胆囊癌 (gallbladder cancer, GBC) 是胆道恶性肿瘤的一种, 是全球发病率排名第五的胃肠道恶性肿瘤^[1]。早期 GBC 患者往往无症状, 就诊时多为晚期^[2]。因此, 需要一种新的肿瘤靶标, 以提高 GBC 患者的诊断、预后判断和治疗。近年来, 研究^[3]表明长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNAs) 为基因表达的关键调控因子, 在许多人类肿瘤发生发展过程中发挥着重要作用。快速发育生长因子同源蛋白 4 内含子转录本 1 (sprouty homolog 4 intronic transcript 1, SPRY4-IT1) 为快速发育生长因子

同源蛋白 4 (sprouty homolog 4, SPRY4) 基因内的一个内含子, 在各种癌症中被证明是癌症发生发展的调节枢纽。近期研究^[4]表明, lncRNA SPRY4-IT1 的上调与乳腺癌、胃癌、肺癌、膀胱癌等肿瘤的进展及不良预后相关。此外, lncRNA SPRY4-IT1 的下调可抑制胶质瘤的细胞增殖、细胞凋亡、转移和上皮-间质转化^[5]。然而, 尚未见 lncRNA SPRY4-IT1 对 GBC 的影响及作用机制, 该研究通过基因干扰 lncRNAs SPRY4-IT1, 探究其对 GBC 细胞 GBC-SD 肿瘤干细胞样特性及线粒体膜电位变化的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 DMEM 培养液、胎牛血清、胰酶、Lipofectamine 3000 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (美国 PIERCE 公司); Super RT cDNA 试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司); ELISA BrdU (比色) 试剂盒 (瑞士罗氏公司); Matrigel™ 底膜基质 (美国 BD 公司); Sry 相关 HMG 盒 2 (Sry-related HMG box 2, SOX2)、八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, OCT4)、CD44、半胱天冬酶 3 (Caspase-3)、Caspase-9、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2, associated X, Bax)、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、c-Myc 抗体 (美国 NEB 公司); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗 (美国 Santa Cruz 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin PE/7-AAD) (南京凯基生物有限公司); 高速低温离心机 (美国 Beckman 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 电泳槽、电转仪、Chem-Doc XRS 凝胶/发光图像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); 电热恒温水浴箱 (上海医疗器械七厂); 凝胶成像系统 GDS-800 UVP (美国 UVP 公司); 流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司); shRNA-SPRY4-IT1 (广州锐博生物有限公司)。

1.2 细胞培养 GBC-SD 细胞由中科院上海细胞库提供, 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长。所有细胞均在含有 5% CO₂ 的培养箱中 37 °C

2020-08-18 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (编号: 2018020934)

作者单位: ¹新乡市中心医院消化内科, 新乡 453000

²新乡医学院第三附属医院消化内科, 新乡 453000

作者简介: 李 辰, 女, 硕士研究生;

董志超, 男, 本科, 副主任医师, 责任作者, E-mail: dzc20090102@163.com

培养,细胞汇合率达到85%以上时用0.25%胰酶进行消化传代。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞转染 将GBC-SD细胞传代培养于6孔板中。培养24 h后根据转染试剂盒说明书用Lipofectamine 3000将Scramble组细胞转染与shRNA-SPRY4-IT1基因无同源性的shRNA作为阴性对照,shRNA-SPRY4-IT1组细胞转染shRNA-SPRY4-IT1,48 h后进行相应检测。

1.3.2 RT-PCR 使用TRIzol试剂提取总RNA,并通过超微紫外分光光度计在260和280 nm处测定吸光度。按照Super RT cDNA试剂盒说明书配制反应体系,振荡混匀,短暂离心,使关闭溶液收集至管底,反转录合成cDNA,反应条件42℃孵育50 min,85℃孵育5 min,短暂离心,冰上冷却。此外,使用Quantifast® SYBR® GreenPCR Kit进行PCR,反应条件为95℃、15 s和60℃、60 s。用于该反应的引物序列如下:SPRY4-IT1:上游5'-AGCCACATAAAT-TCAGCAGA-3',下游5'-CGATGTAGTAGGATTC-CTTTCA-3'; GAPDH:上游5'-GACTCATGACCA-CAGTCCATGC-3',下游5'-AGAGGCAGGGATGAT-GTTCTG-3'。

1.3.3 BrdU染色 细胞增殖测定采用细胞增殖ELISA BrdU(比色)试剂盒根据说明书转染48 h后, 1.0×10^4 个/孔加入到96孔的培养皿中,并让其附着过夜。细胞用BrdU标记2 h,固定,用抗BrdU-pod孵育。通过洗涤去除未结合的过氧化物酶偶联物。然后加入底物,15 min后测量(370~492 nm)吸光度值。

1.3.4 流式细胞术 采用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒对GBC-SD细胞凋亡进行分析和测量。用不同浓度的二氢杨梅素或二甲基亚砷作对照,在6孔板中以 3×10^6 个/孔的密度培养48 h。细胞用冷PBS冲洗3次,然后用100 μ l结合缓冲液处理。然后用3 μ l Annexin V-FITC和10 μ l碘化丙啶孵育20 min。采用流式细胞仪进行细胞凋亡。

1.3.5 成球实验检测肿瘤干细胞样特性 收集对数生长期的GBC-SD细胞,用DMEM培养基洗1次并重悬,血细胞计数器计数细胞密度。在6孔板中加含2% B27、20 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和20 ng/ml表皮细胞生长因子(epidermal growth factor,EGF)的DMEM/F12培养基,每孔接种1 000个细胞,置于5% CO₂恒温培养箱中。每隔2 d补加新鲜培养基,

转染shRNA-SPRY4-IT1处理14 d,于倒置显微镜下拍照并统计成球直径和成球率。

1.3.6 Western blot实验 使用RIPA裂解缓冲液裂解各组细胞样品,在6孔板中每孔加入250 μ l裂解液,用枪吹打均匀使细胞与裂解液充分接触裂解。然后,使用BCA蛋白质测定试剂盒定量蛋白质浓度。含有20 mg蛋白质的样品在10% SDS-PAGE中分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭蛋白2 h,随后加入一抗(SOX2,1:1 000; OCT4,1:1 000; CD44,1:1 000; Caspase-3,1:1 000; Caspase-9,1:1 000; Bax,1:1 000; Bcl-2,1:1 000; c-Myc,1:1 000)于4℃封闭过夜,第2天加入对应二抗室温封闭1 h,最后滴加ECL,设置曝光参数,检测目的条带对应化学发光强弱。

1.4 统计学处理 用软件SPSS 21.0对所有实验数据进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 t 或 t' 检验或单因素方差分析进行检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰SPRY4-IT1表达对GBC细胞增殖的影响 RT-PCR检测结果显示,与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1组SPRY4-IT1的表达水平降低($F = 317.6$, $P < 0.05$)。见图1。BrdU染色结果显示,与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1组BrdU阳性细胞数减少($F = 83.62$, $P < 0.05$)。

2.2 干扰SPRY4-IT1表达对GBC细胞凋亡的影响 流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示,3组细胞凋亡率见图2A。与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1组GBC-SD细胞凋亡率升高($F = 60.42$, $P < 0.05$)。见图2B。

2.3 干扰SPRY4-IT1表达对GBC干细胞特性的影响 干扰SPRY4-IT1表达,形成的GBC-SD细胞微球的体积和数量减少。见图3。与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1组肿瘤干细胞成球率降低($F = 17.84$, $P < 0.05$),成球直径减小($F = 49.42$, $P < 0.05$)。见表1。

2.4 干扰SPRY4-IT1表达对SOX2、OCT4、CD44的表达的影响 从Western blot条带中可以看出,shRNA-SPRY4-IT1组SOX2、OCT4、CD44蛋白表达量较对照组降低。见图4。Western blot灰度分析,与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1组SOX2、OCT4、CD44蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。见表2。

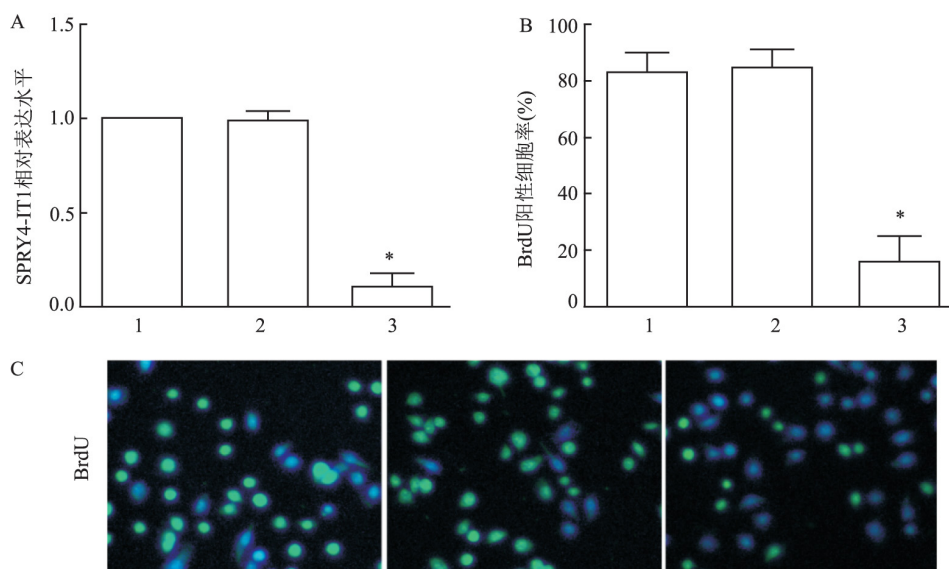


图1 GBC 细胞中 SPRY4-IT1 的表达水平以及 GBC 细胞的增殖变化

A: SPRY4-IT1 相对表达水平; B: BrdU 阳性细胞率; C: BrdU 染色结果图 $\times 400$; 1: 对照组; 2: Scramble 组; 3: shRNA-SPRY4-IT1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

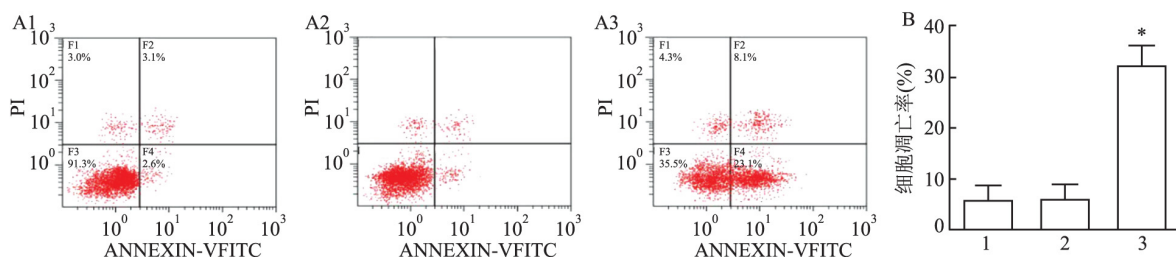
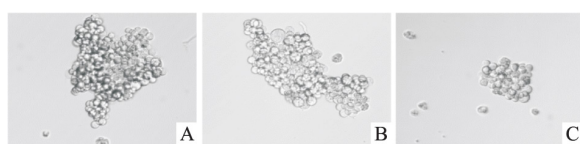


图2 GBC-SD 细胞的凋亡变化

A: 流式细胞术比较细胞凋亡; B: 细胞凋亡率统计; 1: 对照组; 2: Scramble 组; 3: shRNA-SPRY4-IT1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

图3 成球实验检测肿瘤干细胞样特性 $\times 400$

A: 对照组; B: Scramble 组; C: shRNA-SPRY4-IT1 组

表1 各组肿瘤干细胞成球率和成球直径的变化 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	成球率 (%)	成球直径 (μm)
对照	65.06 $\pm$ 15.21	139.23 $\pm$ 17.01
Scramble	64.82 $\pm$ 10.93	141.54 $\pm$ 18.71
shRNA-SPRY4-IT1	16.11 $\pm$ 7.09*	32.18 $\pm$ 8.46*
F 值	17.84	49.42

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 干扰 SPRY4-IT1 表达对线粒体膜电位的影响

正常 GBC-SD 细胞经染色后发出红色荧光,表示线粒体膜电位完整。与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1 组线粒体膜电位升高 ($F = 230.7$, $P < 0.05$)。见图 5。

2.6 干扰 SPRY4-IT1 表达对线粒体损伤标志物蛋

白表达的影响 如图 6 所示,Western blot 条带显示,shRNA-SPRY4-IT1 组 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bax 蛋白表达量较对照组升高; Bcl-2 和 c-Myc 蛋白表达量较对照组降低。Western blot 灰度分析结果见表 3,与对照组比较,shRNA-SPRY4-IT1 组 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bax/Bcl-2 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$); c-Myc 蛋白表达水

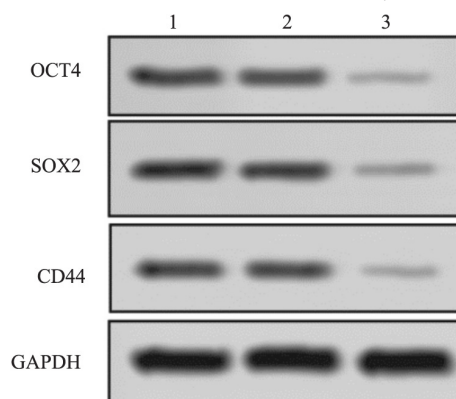


图4 不同组 SOX2、OCT4、CD44 蛋白表达量

1: 对照组; 2: Scramble 组; 3: shRNA-SPRY4-IT1 组

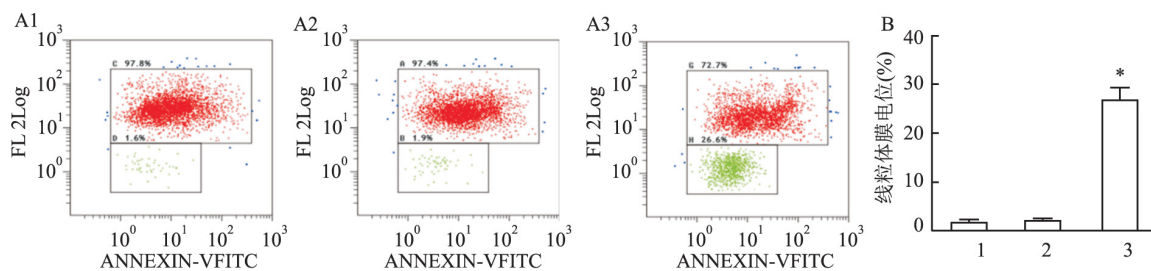


图5 不同组 GBC 细胞线粒体膜电位变化

A: 流式细胞术检测线粒体膜电位; B: 线粒体膜电位变化; 1: 对照组; 2: Scramble 组; 3: shRNA-SPRY4-IT1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$ 表2 不同组 SOX2、OCT4、CD44 蛋白表达水平变化($n = 3$ $\bar{x} \pm s$)

组别	SOX2/GAPDH	OCT4/GAPDH	CD44/GAPDH
对照	0.31 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.19 ± 0.03
Scramble	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.17 ± 0.04
shRNA-SPRY4-IT1	0.03 ± 0.02*	0.05 ± 0.03*	0.02 ± 0.01*
F 值	54.20	93.41	29.88

与对照组比较: * $P < 0.05$ 表3 不同组 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、c-Myc 蛋白表达水平变化($n = 3$ $\bar{x} \pm s$)

组别	cleaved Caspase-3/Caspase-3	cleaved Caspase-9/Caspase-9	Bax/Bcl-2	c-Myc/GAPDH
对照	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.13 ± 0.04
Scramble	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.14 ± 0.03
shRNA-SPRY4-IT1	0.22 ± 0.04*	0.24 ± 0.05*	4.24 ± 0.33*	0.02 ± 0.01*
F 值	70.17	56.33	482.6	15.35

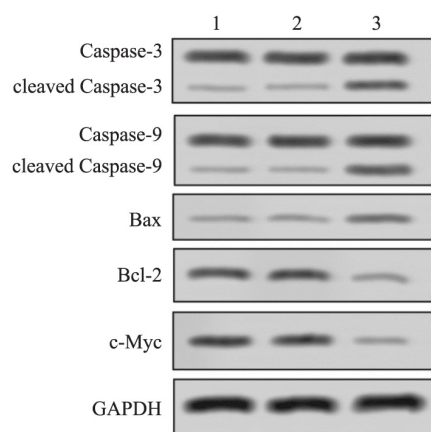
与对照组比较: * $P < 0.05$ 

图6 不同组 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、c-Myc 的蛋白表达量

1: 对照组; 2: Scramble 组; 3: shRNA-SPRY4-IT1 组

平降低($P < 0.05$)。

3 讨论

lncRNAs 是 ncRNAs 家族中重要的新成员,被认为是与癌症进展相关的各种肿瘤的关键介质。研究^[6]显示 lncRNA 在促进人类恶性肿瘤的发生和发展中起着至关重要的作用,包括细胞生长、细胞凋亡、细胞周期分布和癌症转移。最近一项研究^[7]报道称,SPRY4-IT1 在 GBC 组织中高表达,SPRY4-IT1

对细胞迁移和侵袭的抑制作用部分与上皮间质转化过程有关。但是干扰 SPRY4-IT1 表达在 GBC 中的功能作用尚未被阐明。在本研究中,通过基因干扰 lncRNAs SPRY4-IT1 来研究其对 GBC 细胞 GBC-SD 肿瘤干细胞样特性及线粒体膜电位变化的影响。

细胞增殖是恶性肿瘤细胞具有无限增殖能力的关键因素。同样,在 GBC 的研究中, Yang et al^[7]研究发现在 GBC 组织中 SPRY4-IT1 表达上调,进一步的实验表明 SPRY4-IT1 的下调抑制了 GBC 细胞的增殖。与 Yang et al^[7]研究结果一致,本研究显示干扰 SPRY4-IT1 表达后,绿色阳性细胞数减少,表明干扰 SPRY4-IT1 表达能抑制 GBC 细胞 GBC-SD 的增殖。

lncNASPRY4-IT1 从 SPRY4 基因的第 2 个内含子转录并调节细胞的凋亡^[8]。线粒体膜去极化引起的线粒体膜电位的下降,在凋亡信号的刺激下,线粒体膜电位的下降必然引起凋亡^[9]。本研究显示干扰 SPRY4-IT1 表达,线粒体膜电位降低,表明干扰 SPRY4-IT1 表达可诱导 GBC 细胞凋亡。c-MYC 癌基因是在包括 GBC 在内的人类癌症发展过程中最常见的激活癌基因之一^[10]。在凋亡过程中,细胞色素 C 是凋亡小体形成所必需的,并由此激活 procaspase-9,而 procaspase-9 又裂解并激活下游效

应因子 Caspase-3 ,进而导致最终的细胞凋亡^[11]。Yao et al^[12] 研究发现敲除 SPRY4-IT1、Bcl-2 的蛋白表达受到抑制 ,Caspase-3、Caspase-9、Bax 的蛋白表达增加 ,促进 PDAC 细胞的凋亡。本研究显示干扰 SPRY4-IT1 表达引起 c-Myc 蛋白表达水平降低;促进 GBCGBC-SD 细胞凋亡 ,增高 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bax/Bcl-2 蛋白表达 ,表明干扰 SPRY4-IT1 表达可调控凋亡相关蛋白的表达 ,从而促进 GBC 细胞凋亡。

干细胞被认为是少数几个具有失控增殖特征的癌细胞之一 ,包括自我更新、多潜能分化和干细胞特征。CD44 是肿瘤的细胞表面标志物 ,被用来识别肿瘤干细胞 这些肿瘤干细胞已被证明在肿瘤进展和不良预后中起重要作用^[13]。OCT4 与胚胎干细胞和生殖细胞中观察到的多能性、增殖潜能和自我更新特性有关。SOX2 对胚胎干细胞和神经前体细胞的自我更新维持至关重要。研究^[14]表明 SOX2 在许多恶性肿瘤中过表达 ,并与肿瘤的分化和进展相关。此外 ,SOX2 蛋白与 OCT4 结合 ,调控 DNA 转录和干细胞特性 ,两者在基因调控中发挥重要作用 ,对胚胎发生以及细胞的多能性和自我更新至关重要^[15]。然而 ,肿瘤干细胞在 GBC 中的作用尚无研究。本研究显示干扰 SPRY4-IT1 表达减小肿瘤成球直径 ,降低肿瘤干细胞成球率以及 SOX2、OCT4、CD44 蛋白表达水平 ,表明干扰 SPRY4-IT1 表达能降低肿瘤干细胞特性 ,抑制 GBC 的发展 ,但具体的作用机制有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Qin Y , Zhou Y , Ge A , et al. Overexpression of SNORA21 suppresses tumorigenesis of gallbladder cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother* , 2019 , 118: 109266.
- [2] Baiu I , Visser B. Gallbladder cancer [J]. *JAMA* , 2018 , 320 (12) : 1294.
- [3] Li J , Meng H , Bai Y , et al. Regulation of lncRNA and its role in cancer metastasis [J]. *Oncol Res* , 2016 , 23(5) : 205 - 17.
- [4] 陈明伟. 长链非编码 RNA SPRY4-IT1 在膀胱癌的表达及功能研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学 , 2016.
- [5] Liu H , Lü Z , Guo E. Knockdown of long noncoding rna spry4 - it1 suppresses glioma cell proliferation , metastasis and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Clin Exp Pathol* , 2015 , 8(8) : 9140 - 6.
- [6] Tang Y , Cheung B B , Atmadibrata B , et al. The regulatory role of long noncoding mas in cancer [J]. *Cancer Lett* , 2017 , 391: 12 - 9.
- [7] Yang L , Cheng X , Ge N , et al. Long non-coding RNA SPRY4-IT1 promotes gallbladder carcinoma progression [J]. *Oncotarget* , 2017 , 8(2) : 3104 - 10.
- [8] Shi Y , Li J , Liu Y , et al. The long noncoding rna spry4-it1 increases the proliferation of human breast cancer cells by upregulating znf703 expression [J]. *Mol Cancer* , 2015 , 14: 51.
- [9] Webster K A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species [J]. *Future Cardiol* , 2012 , 8(6) : 863 - 84.
- [10] Ishak G , Leal M F , Dos Santos N P , et al. Deregulation of myc and tp53 through genetic and epigenetic alterations in gallbladder carcinomas [J]. *Clin Exp Med* , 2015 , 15(3) : 421 - 6.
- [11] Yamashita K , Discher D J , Hu J , et al. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1 , activator protein-1 , gata-2 , and p300/cbp [J]. *J Biol Chem* , 2001 , 276(16) : 12645 - 53.
- [12] Yao Y , Gao P , Chen L , et al. Upregulated long non-coding rna spry4-it1 predicts dismal prognosis for pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell proliferation and apoptosis [J]. *Gene* , 2018 , 659: 52 - 8.
- [13] Huang C F , Xu X R , Wu T F , et al. Correlation of aldhl , CD44 , OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis [J]. *J Oral Pathol Med* , 2014 , 43(7) : 492 - 8.
- [14] 闫振宇 , 孙新超. LincRNA-ROR 作为一个内源竞争 RNA 通过结合 miR-145 调节 Oct4、Sox2 和 Nanog 对结肠直肠癌干细胞生物学特性的影响及临床意义 [J]. *中华病理学杂志* , 2018 , 47 (4) : 284 - 290.
- [15] Rizzino A , Wuebben E L. Sox2/Oct4: a delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2016 , 1859(6) : 780 - 91.

Effect of gene interference lncRNA SPRY4-IT1 on stem cell-like characteristics and mitochondrial membrane potential of GBC-SD cell line

Li Chen¹ , Wang Qingzhi² , Qi Hongyang¹ , et al

(¹Dept of Gastroenterology , Xinxiang Central Hospital , Xinxiang 453000;

²Dept of Gastroenterology , The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College , Xinxiang 453000)

Abstract Objective To investigate the effects of gene-interfering long-chain non-coding RNA (lncRNA) SPRY4-IT1 on stem cell-like characteristics and mitochondrial membrane potential changes in gallbladder cancer

莫诺苷介导 Nrf2 通路对 HIBI 模型大鼠的 抗氧化和神经保护作用

李江涛¹, 尹永锋¹, 王润青¹, 张平², 赵杰¹, 刘荣丽¹, 陈园园¹

摘要 目的 研究莫诺苷对 HIBI(HIBI)模型大鼠的抗氧化和神经保护作用及其可能机制。方法 采用 Rice 法建立 HIBI 模型,再将大鼠随机分为 6 组:对照组、模型组、莫诺苷(25、50、100 mg/kg)组及尼莫地平组。前 2 组灌胃给予生理盐水,后 4 组灌胃给予对应剂量的莫诺苷和尼莫地平,每 d 1 次,连续 28 d。对大鼠脑神经功能进行评分,检测大鼠脑积水量;HE 染色观察大鼠脑组织病理学改变;ELISA 测定大鼠脑组织中丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)水平;Western blot 法检测脑组织中 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Caspase-9、脑源性神经营养因子(BDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、突触小泡蛋白(SYP)、突触后密度蛋白 95(PSD95)、转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)和醌氧化还原酶 1(HO-1)的蛋白表达水平。结果 与模型组比较,莫诺苷处理组大鼠神经功能评分和脑积水量均降低($P < 0.01$),脑组织的病理学损伤程度也得到改善,凋亡相关蛋白 Bcl-2 上调,Bax、Caspase-3 和 Caspase-9

则均下调($P < 0.01$),且脑组织中抗氧化酶 SOD 活性上升($P < 0.01$),LDH 和 MDA 含量降低($P < 0.01$),bFGF、BDNF、PSD95、SYP 及抗氧化通路蛋白 Nrf2 和 HO-1 的表达均上调($P < 0.01$)。结论 莫诺苷对 HIBI 模型大鼠可发挥抗氧化和神经保护作用,这一作用是通过介导 Nrf2 信号通路实现的。

关键词 莫诺苷; HIBI; 核因子 E2 相关因子 2; 醌氧化还原酶 1

中图分类号 R 743

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0374-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.008

低氧缺血性脑病是由于脑缺氧或缺血引起脑损伤,从而导致意识改变、肌张力变化,常引起诸如脑瘫、癫痫等后遗症。其中血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一种由大脑低氧缺血引发的脑血管疾病,会损伤患者的学习和记忆,常伴随着运动失调、语言能力受损及人格障碍^[1]。阿尔茨海默病(alzheimer disease,AD)有约 15% 的患者会发生 VD^[2]。山茱萸,中医称为“山珠玉”,莫诺苷是其活性成分,长期以来一直被用于治疗脑血管疾病和糖尿病^[3]。莫诺苷具有抗氧化应激^[4]、改善微血管循环^[5]、抗细胞凋亡^[6]和神经修复功能^[7]等多种

2020-10-23 接收

基金项目: 河南省科技厅科技攻关计划项目(编号: 182102310529)

作者单位: ¹ 郑州大学附属郑州中心医院神经内三科, 郑州 450000

² 新乡医学院第一附属医院神经内科, 河南省神经修复重点实验室 新乡 453100

作者简介: 李江涛,男,本科,副主任医师,责任作者, E-mail: lijiaog-
tao178@163.com

cell line GBC-SD. **Methods** shRNA-SPRY4-IT1 shRNA was designed and synthesized. shRNA-SPRY4-IT1 was transfected into GBC-SD cells, and the expression level of SPRY4-IT1 was detected by RT-PCR. BrdU staining was used to detect cell proliferation. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Tumor cell pelleting assay was used to detect the characteristics of tumor stem cells. The changes of mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the protein expression of dry tumor characteristic markers and mitochondrial damage markers. **Results** shRNA-SPRY4-IT1 was transfected into GBC-SD cells, the expression level of SPRY4-IT1 decreased. Interference with SPRY4-IT1 inhibited proliferation of GBC-SD cells, improved mitochondrial membrane potential and promoted apoptosis of GBC-SD cells, reduced stem cell-like properties of gallbladder cancer, inhibited the expression of SOX2, OCT4, CD44, c-Myc, Bcl-2 and promoted the expression of cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, Bax. **Conclusion** Gene interference with lncRNA SPRY4-IT1 can reduce the characteristics of GBC-SD cancer stem cells in gallbladder cancer cells, increase mitochondrial membrane potential, and promote apoptosis of gallbladder cancer cell line GBC-SD.

Key words lncRNA SPRY4-IT1; gallbladder carcinoma; stem cell-like properties; mitochondrial membrane potential