

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.035.html>

自噬相关基因在慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型中的表达及意义

骆广跃¹ 张礼刚¹ 张 力^{1,2}, 陈先国^{1,2} 梁朝朝^{1,2}

摘要 目的 检测慢性非细菌性前列腺炎(CNP)大鼠模型中自噬相关基因表达的水平及时序变化,探讨自噬在CNP病程中的可能作用。方法 取3月龄雄性SD大鼠40只,随机分为正常对照组和2、4、6周CNP模型组,每组10只。HE染色观察各组前列腺组织炎性细胞浸润情况,采用Western blot、免疫组化SABC法检测各组前列腺组织中自噬微管相关蛋白1轻链3(LC3)、Beclin-1的表达。结果 HE染色结果提示成功构建大鼠CNP模型,Western blot法、免疫组化法检测显示各实验组LC3、Beclin-1蛋白的表达均高于正常对

照组,并随着时间的推移表达量逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 自噬相关基因可能在CNP的发病过程中发挥重要作用。

关键词 自噬;慢性前列腺炎;Beclin-1;LC3

中图分类号 R 697+33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0159-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.002

2016-11-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81470986);国家临床重点专科建设项目基金(编号:2100299)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

²安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230032

作者简介:骆广跃,男,硕士研究生;

陈先国,男,主治医师,副教授,责任作者,E-mail:cxg7866186@126.com;

梁朝朝,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:Liang-chaozhao@163.com

慢性前列腺炎是泌尿外科常见病和多发病,我国的一项大样本流行病学调查^[1]显示中国男性前列腺炎样症状发生率为8.4%,约占泌尿外科门诊量的25%。慢性前列腺炎主要表现为排尿异常,下腹及会阴部疼痛不适,可导致性功能障碍和男性不育,严重影响患者的身心健康和生活质量。慢性前列腺炎主要分为细菌性和非细菌性,90%为慢性非细菌性前列腺炎(chronic non-bacterial prostatitis, CNP)。由于目前对CNP的发病机制及病理生理改变尚不清楚,因此治疗上主要是对症治疗,导致治疗

interfering with the p65/RPS3 interaction[J]. PLoS Pathog 2015, 11(3):e1004705.

[9] Giogha C, Lung T W, Pearson J S, et al. Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens [J]. Cytokine Growth

Factor Rev, 2014, 25(2):235-43.

[10] Pearson J S, Giogha C, Ong S Y, et al. A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection [J]. Nature 2013, 501(7466):247-51.

Construction of z0986-z1444 double deletion mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Su Li^{1,2}, Wang Jianxin², Chen Fanghong², et al

(¹Anhui Medical University Hefei 230032; ²Dept of Microbiological Omics and Bioinformatics, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract Objective To construct the double deletion mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 by knocking out z0986 gene and z1444 gene with Red recombinant system. **Methods** Firstly, the target fragments of z0986 and z1444 were established. Secondly, competent cells were struck by lightning, then the bacteria were identified through PCR. The growth curve of the ultimate positive monoclonal was assayed. **Results** The solo deletion mutant ($\Delta z1444/933$) and the double deletion mutant ($\Delta z0986/\Delta z1444/933$) were successfully constructed and their growth curves had no significant difference compared to the wild type EHEC. **Conclusion** The deletion mutant of z0986 and z1444 has no effect on growth of EHEC. The construction of $\Delta z1444/933$ as well as $\Delta z0986/\Delta z1444/933$ would be helpful for further study of functions and mechanisms of z1444 gene.

Key words enterohemorrhagic *Escherichia coli*; Red recombinant system; type III secretion system

效果欠佳,治愈率低,复发率高,使患者背负严重的经济和心理负担^[2]。细胞自噬通过自噬溶酶体来消除、降解和消化受损、变性和衰老的细胞器及变性蛋白质等核酸大分子来维持细胞内环境稳态。细胞自噬在免疫和炎症反应的调控中起重要作用,同时免疫和炎症反应也能影响细胞自噬水平,研究^[3]表明,在许多炎症性疾病中都存在自噬水平的异常如克罗恩病、脑脊髓膜炎、关节炎等。该研究通过建立SD大鼠CNP模型,检测自噬相关基因在CNP病程中的动态变化,进一步明确自噬在该疾病中的作用,旨在为CNP的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠40只,3月龄,200~300 g,购买并饲养于安徽省动物实验中心SPF级动物房,相对湿度50%~70%,室温20~26℃,光照黑暗各12 h,自由摄食饮水。

1.2 主要仪器与试剂 Chemscope 5600 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);ELx800 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);超净工作台(苏州净化设备公司);完全弗氏佐剂(美国Sigma Aldrich公司);BCA法测蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物技术公司);兔多克隆抗LC3A/B抗体、兔多克隆抗Beclin-1抗体(英国Abcam公司,货号:ab128025、ab55878);山羊抗兔IgG-HRP(美国Santa Cruz公司);SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物有限公司)。

1.3 SD大鼠前列腺蛋白提纯液的制作 超净台紫外光消毒1 h,取6只300 g左右的雄性SD大鼠,水合氯醛麻醉后脱颈椎处死,碘伏消毒后置于超净台,用消毒器械剪开腹部皮肤、筋膜和肌肉,提起膀胱暴露前列腺,完整剪下前列腺组织,剔除脂肪及膀胱,置于冰生理盐水中清洗3遍,剪刀剪碎后放在玻璃匀浆器中匀浆,匀浆器置于冰水混合物中保持低温,匀浆后于冷冻离心机离心4℃条件下12 000 r/min离心30 min,吸取上清液,BCA法稀释蛋白提纯液至40 g/L,-20℃冷冻管保存备用。

1.4 模型的分组和建立 40只3月龄SD雄性大鼠适应性饲养1周后,随机分为正常对照组和2、4、6周CNP模型组,每组10只。腹腔注射水合氯醛300 mg/kg麻醉后下腹部正中切口,暴露前列腺,前列腺蛋白提纯液与完全弗氏佐剂等体积混合,造模

组注射0.2 ml混合液于前列腺左右两侧叶,正常对照组注入等量生理盐水。正常对照组6周后麻醉处死,造模组分别于2、4、6周麻醉处死,留取前列腺组织,剪去部分于10%中性福尔马林溶液固定,待做病理检查,另一部分组织置于EP管中于-80℃冷冻保存,待做Western blot法检测。

1.5 HE染色 取正常对照组及2、4、6周甲醛固定的各组前列腺组织,石蜡包埋、切片,常规HE染色后于光学显微镜下观察各组前列腺组织结构变化并拍照。

1.6 Western blot法检测LC3、Beclin-1的表达 采用RIPA裂解液裂解新鲜前列腺组织,提取总蛋白,使用BCA法测定蛋白浓度,等量蛋白上样缓冲液上样,分离胶浓度为15%(LC3)和10%(Beclin-1)SDS-PAGE凝胶电泳后将蛋白转移至PVDF膜上,脱脂牛奶封闭1 h,加入LC3、Beclin-1一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗(山羊抗兔)37℃孵育1 h,采用ECL显影,Chemscope 5600化学发光成像系统成像,使用Image J进行灰度值分析。

1.7 免疫组化法检测LC3、Beclin-1的表达 采用SABC免疫组化法检测LC3、Beclin-1在各组中的表达。操作严格按照说明书进行:组织切片脱蜡、梯度酒精脱水;次碘酸灭活组织内源性过氧化物酶,微波炉抗原修复,山羊血清封闭后滴加兔多克隆抗体LC3(1:200)、Beclin-1(1:300),阴性对照以PBS代替4℃孵育过夜,次日PBS冲洗3次,每次5 min,滴加生物素化山羊抗兔IgG,室温20 min,滴加试剂SABC,然后DAB显色,苏木精轻度复染,中性树胶封片、镜检。每张盖玻片随机选取3个不连续视野400倍镜下拍照,用Image Pro Plus分析软件进行阳性染色积分光密度值分析。

1.8 统计学处理 运用SPSS 16.0软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用One-Way ANOVA分析,两两比较采用SNK- q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

模型组共有30只大鼠,其中2周模型组2只因术后肠胀气坏死而死亡,正常对照组1只因缝线脱落内脏漏出死亡,其余大鼠正常存活。

2.1 HE染色 成功构建SD大鼠CNP模型,正常

对照组前列腺组织结构完整,腺腔规则,腺上皮细胞排列整齐,腺腔间质未见炎性细胞浸润(图1A);2周模型组腺腔结构完整,但腺上皮细胞排列不齐,基膜向腺腔内凹陷,间质见少量炎性细胞浸润(图1B);4周模型组腺腔扩大且不规则,腺腔上皮细胞排列紊乱,腺腔间质周围见大量淋巴细胞浸润(图1C);6周模型组腺腔广泛破坏,间质及腺体内炎细胞浸润明显,腺腔周围可见纤维结缔组织增生(图1D)。

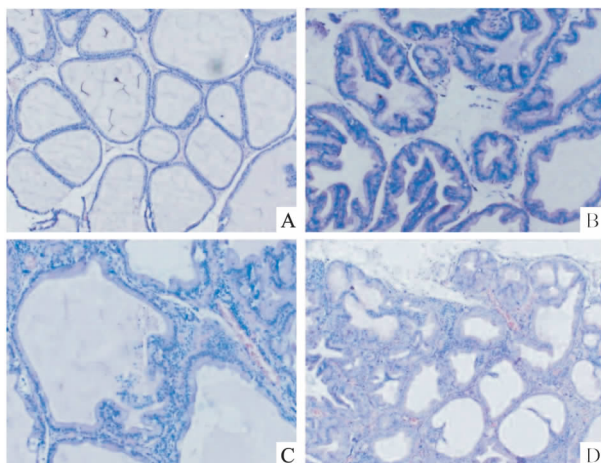


图1 前列腺组织光镜照片 HE ×100

A:正常对照组;B:2周造模组;C:4周造模组;D:6周造模组

2.2 Western blot 法检测结果 两项指标采用单因素方差分析进行主体间效应检验 ($F_{LC3} = 62.35$ 、 $F_{Becl} = 49.28$, $P < 0.01$)。SNK- q 检验两两比较结果显示:各模型组 LC3-I / II 的转化水平均高于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。2周模型组和4周模型组 LC3B-I / II 的转化差异无统计学意义,2周模型组与6周模型组比较 LC3B-I / II 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4周模型组与6周模型组比较 LC3B-I / II 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Beclin-1 各模型组表达水平均高于正常对照组,2、4、6周模型组两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图2。

2.3 免疫组化法检测 LC3 和 Beclin-1 在 CNP 模型组不同阶段的表达 结果显示 LC3 和 Beclin-1 蛋白主要表达在前列腺上皮细胞质内。见图3、4。两项指标采用单因素方差分析进行主体间效应检验 ($F_{LC3} = 66.75$ 、 $F_{Becl} = 64.04$, $P < 0.01$)。SNK- q 检验两两比较结果显示各组 LC3、Beclin-1 蛋白表达均高于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2、4、6周模型组 LC3、Beclin-1 表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且与时间成正比。见图5。

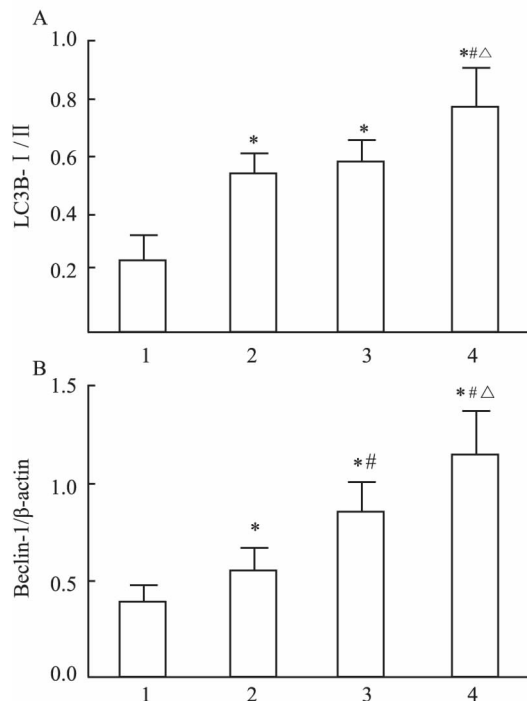
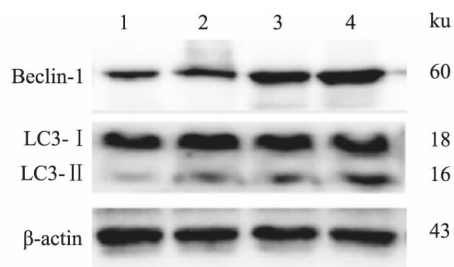


图2 Western blot 法检测 LC3B-I / II 的转化和 Beclin-1 蛋白的表达

A: LC3B-I / II 转化; B: Beclin-1 蛋白表达; 1: 正常对照组; 2: 2周模型组; 3: 4周模型组; 4: 6周模型组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与2周模型组比较: # $P < 0.05$; 与4周模型组比较: Δ $P < 0.05$

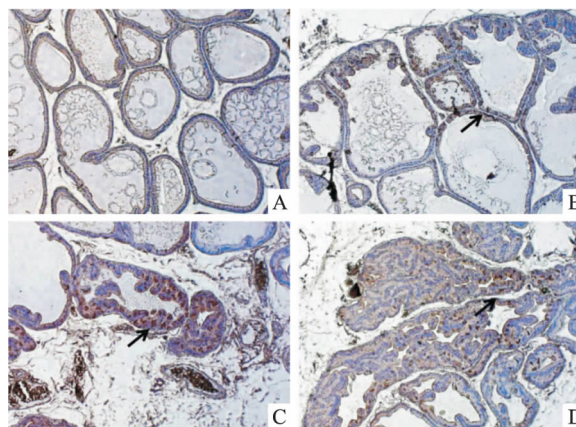


图3 SABC 法检测 LC3 在前列腺组织中的表达 ×100

A:正常对照组;B:2周模型组;C:4周模型组;D:6周模型组

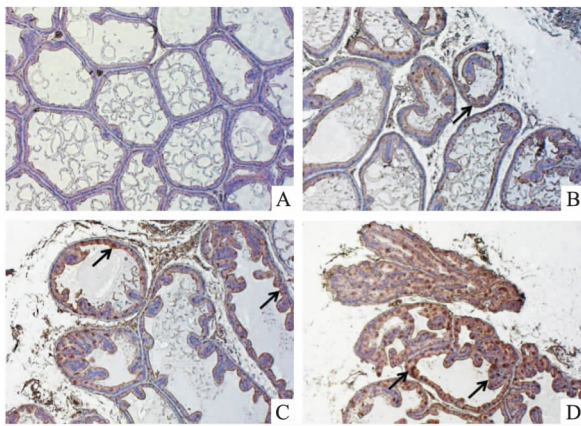


图4 SABC法检测Beclin-1在前列腺组织中的表达 ×100
A:正常对照组;B:2周模型组;C:4周模型组;D:6周模型组

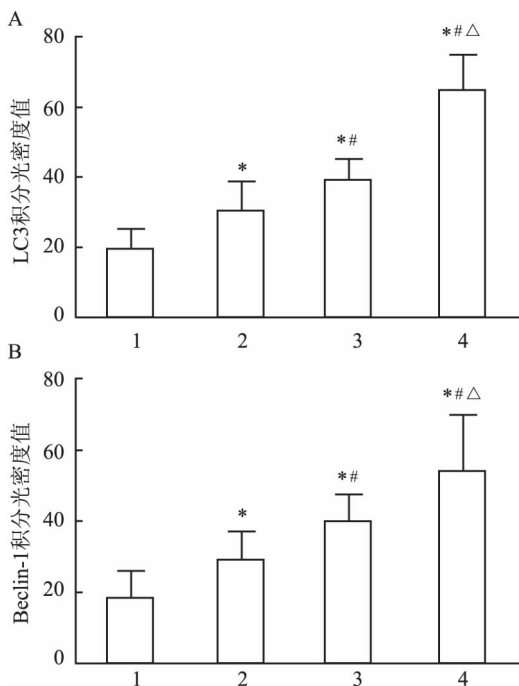


图5 免疫组化法检测 LC3、Beclin-1 蛋白的表达

A:LC3;B:Beclin-1;1:正常对照组;2:2周模型组;3:4周模型组;4:6周模型组;与正常对照组比较: * P < 0.05;与2周模型组比较: # P < 0.05;与4周模型组比较: Δ P < 0.05

3 讨论

细胞自噬是广泛存在于真核细胞中的一种高度保守的生理功能,以自噬溶酶体等自噬特征性结构为基础,将细胞内变性受损的蛋白及细胞器运送到溶酶体降解的过程,以维持细胞内稳态和细胞器更新代谢等^[4]。在正常生理状态下细胞保持较低的基础自噬水平,但在应激状态如饥饿、感染、炎症、创

伤等情况下,自噬水平会迅速提升。细胞自噬水平的改变受多种自噬相关基因调控,研究^[5]显示 Class III PI3K(Vps34)-Beclin-1 复合物与自噬启动密切相关,而自噬体的延伸则需要 Atg5 和 Atg12 的结合以及 LC3-II-PE 的形成^[6]。Western blot 法和免疫组化法检测组织中 LC3 和 Beclin-1 蛋白含量是目前检测自噬水平的公认方法。LC3 是自噬小体形成和延伸过程中一种重要的蛋白分子,经加工可成为胞质可溶性 LC3-I,后者经过进一步加工修饰继而与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3-II。当细胞内自噬水平发生变化,一般都存在 LC3-I 向 LC3-II 的转化,而且 LC3-I / II 的含量变化在某种程度上与细胞的自噬活性呈正相关性^[7]。与此同时,结合免疫结果检测细胞内 LC3 颗粒的表达更有助于分析自噬水平的变化。Beclin-1 是酵母 Atg6 基因的同源物,也是哺乳动物参与自噬的活动的特异性基因。研究^[8]表明,Beclin-1 不仅参与自噬的形成,还可以通过调节自噬活性进而影响肿瘤、炎症的发生发展。本实验通过 Western blot 联合免疫组化检测 Beclin-1 的表达水平,再结合 LC3 蛋白的变化,可对组织中自噬水平进行动态检测。

国内通用的慢性前列腺炎造模方法是经大鼠皮下注射大鼠前列腺蛋白提纯液与完全弗氏佐剂,后经腹腔注射百白破疫苗来增强自身免疫反应^[9]。本课题组通过上述方法造模结果显示造模成功率较低而且炎症程度不明显,原因可能是大鼠种系及个体对前列腺蛋白引起的自身免疫反应强弱不等,因而造模成功率并不确切。后经探索改进,通过原位注射大鼠前列腺蛋白提纯液与完全弗氏佐剂的混合物成功制造出 CNP 模型。一方面,直接将引起自身免疫反应的前列腺蛋白直接注入前列腺中更容易引起免疫反应,而且完全弗氏佐剂更能加重免疫反应,另一方面,完全弗氏佐剂也常单独应用于制作疼痛免疫模型,其本身可能引起机体迟发型超敏反应,急性期疼痛主要是急性炎症引起疼痛,而慢性疼痛主要表现为神经源性痛,与临床上 III B 型前列腺炎引起的骨盆疼痛综合征较相似,是研究慢性前列腺炎尤其是骨盆疼痛综合征较理想的模型。

目前,针对 CNP 的基础研究主要集中在神经内分泌改变及离子通道,而对于自噬在 CNP 中的表达鲜有报道。本研究,显示实验组各时段 Western blot 法检测 LC3-I 向 LC3-II 转化水平均高于正常对照

组提示此 CNP 模型中可能存在诱导自噬效应,并且在 6 周内与时间呈正相关性。进一步的前列腺组织免疫组化分析显示实验组 LC3 颗粒的表达明显高于正常对照组,进一步印证了诱导自噬现象的存在。同样,使用 Western blot 和免疫组化法检测各实验组参与自噬活动的特异性基因 Beclin-1 蛋白表达水平也高于正常对照组,并且在 6 周内各实验组表达水平与时间呈正相关性。HE 染色结果显示随着时间的推移,各实验组炎症程度逐渐加重,与诱导自噬效应的趋势一致,这提示自噬可能在炎症的发生发展中起调控作用。

综上所述,可以初步推测在此模型中存在自噬诱导效应,自噬可能在炎症的产生发挥重要作用。可以进一步在此模型中加入自噬抑制剂或使用自噬基因敲除的大鼠,检测炎症相关细胞因子如肿瘤坏死因子 α 、白介素-6、白介素-1 β 等来评价炎症水平,为前列腺炎的治疗提供新的思路与策略。

参考文献

- [1] Liang C Z, Li H J, Wang Z P, et al. The prevalence of prostatitis-like symptoms in China [J]. *J Urol* 2009, 182(2): 558-63.
- [2] Liang C Z, Li H J, Wang Z P, et al. Treatment of chronic prostatitis in Chinese men [J]. *Asian J Androl* 2009, 11(2): 153-6.
- [3] Jones S A, Mills K H, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases [J]. *Immunol Cell Biol* 2013, 91(3): 250-8.
- [4] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell* 2011, 147(4): 728-41.
- [5] Liang C, Lee J S, Inn K S, et al. Beclin1-binding UVRAF targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking [J]. *Nat Cell Biol* 2008, 10(7): 776-87.
- [6] Fujita N, Itoh T, Omori H. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. *Mol Biol Cell* 2008, 19(5): 2092-100.
- [7] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol* 2008, 445: 77-88.
- [8] Liang X H, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 [J]. *Nature* 1999, 402(6762): 672-6.
- [9] Wilson M J, Woodson M, Wiehr C, et al. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of estradiol-induced nonbacterial prostatitis in the lateral prostate lobe of the Wistar rat [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 77(1): 7-17.

[1] Liang C Z, Li H J, Wang Z P, et al. The prevalence of prostatitis-

Expression and significance of autophagy-related gene in chronic non-bacterial prostatitis rat model

Luo Guangyue¹, Zhang Ligang¹, Zhang Li^{1,2}, et al

¹Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

²The Urological Institute of Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the possible role of autophagy in chronic prostatitis by exploring the level of autophagy-related gene expression in chronic non-bacterial prostatitis rat model. **Methods** 40 three-month-old male SD rats were randomly divided into 4 groups, 10 rats for each, as follow: control group, 2 weeks model group, 4 weeks model group, 6 weeks model group. To assess the prostate tissue inflammation of all groups by hematoxylin-eosin staining, then expressions of light chain3 (LC3) and Beclin-1 of all groups were detected by Western blot and SABC immunohistochemistry. **Results** The results of HE staining showed that chronic non-bacterial prostatitis rats model was successfully constructed. Detection of Western blot and immunohistochemistry showed that the expressions of LC3 and Beclin-1 in each experimental groups were higher than the control group and the expression level increased gradually with the passage of time, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Autophagy-related genes may play an important role in the pathogenesis of chronic non-bacterial prostatitis.

Key words autophagy; chronic prostatitis; Beclin-1; LC3