

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:31 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.014.html>

正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜 COX-1 mRNA 和 COX-2 mRNA 表达的影响

刘 昊¹ 陈 英² 徐 珊² 杜 斌² 唐合兰² 颜 伟² 邱 杰² 杨春敏^{1,2} 王建昌²

摘要 目的 探讨正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜环氧合酶 1 (COX-1) mRNA 和环氧合酶 2 (COX-2) mRNA 表达的影响。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别标记为 A、B、C、D、E 组。A 组为空白对照组, 不做任何处理; B 组大鼠每天 +5 Gz 值暴露 5 min, 连续暴露 5 d; C 组大鼠每天 +10 Gz 值暴露 5 min, 连续暴露 5 d; D 组大鼠适应性训练即 +4 Gz 值每天暴露 3 min, 连续暴露 5 d 后 +5 Gz 值每天暴露 5 min, 连续暴露 5 d; E 组大鼠适应性训练即 +4 Gz 值每天暴露 3 min, 连续暴露 5 d 后 +10 Gz 值每天暴露 5 min, 连续暴露 5 d。试验结束后肉眼和光学显微镜下观察胃黏膜损伤情况, ELISA 法检测胃黏膜 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$) 的含量, RT-PCR 法检测胃黏膜内 COX-1 mRNA 和 COX-2 mRNA 的相对表达量。结果 B 组和 C 组 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量低于 A 组 ($P < 0.05$); 适应性训练后 D 组 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量高于 B 组, E 组 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量高于 C 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。COX-1 mRNA 相对表达量各组间差异无统计学意义。B 组 COX-2 mRNA 表达高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组 COX-2 mRNA 表达高于 A 组和 B 组 ($P < 0.05$)。适应性训练后 D 组 COX-2 mRNA 表达高于 B 组, E 组 COX-2 mRNA 表达高于 C 组 ($P < 0.05$)。6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量与 COX-1 mRNA 和 COX-2 mRNA 相对表达量间均无相关性。结论 正加速度适应性训练明显减轻高 + Gz 值带来的胃黏膜损伤, 其机制与前列环素生成及 COX-2 mRNA 表达增加有关。

关键词 正加速度; 适应性训练; 胃黏膜; 环氧合酶 1; 环氧合酶 2; 前列环素

中图分类号 R 852.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0951-06

现代高性能战斗机有机动性、超重和高正加速度 (+Gz) 增长率等特点, 远远超过人体正常的生理耐限, 因此, 提高高性能战斗机飞行员的抗载荷防

护能力是航空医学研究的一个主攻方向。持续的 +Gz 离心机适应性训练作为提高抗 +Gz 耐力的一种手段, 其应用已有几十年的历史, 目前尚未有相关研究报道其分子机制。研究^[1]表明大鼠正加速度适应性训练可明显减轻高 +Gz 带来的胃黏膜损伤, 其机制与胃黏膜内前列环素物质生成相关, 前列环素 (prostacyclin, PGI $_2$) 为大鼠胃黏膜内含量最为丰富的一型前列腺素类物质, 由于 PGI $_2$ 的生物半衰期 ($T_{1/2}$) 较短, 故通常测定其稳定的代谢产物 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$) 代表其含量的变化^[2], 环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 为合成前列腺素类物质的限速酶, 该研究拟从 COX mRNA 水平上探讨正加速度适应性训练提高其抗胃黏膜损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40 只雄性 SD 大鼠 (180 ± 10) g, SPF 级, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 食用由中国航空航天医学研究所提供的全营养颗粒饲料, 自由饮食及水, 空调下饲养, 维持室内恒温、恒湿。

1.2 试剂与仪器 小动物离心机、小动物手术器械、游标卡尺、试验动物解剖操作台由航空航天医学实验室提供; TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); TaqMix、dNTP、M-MLV 逆转录酶 (大连宝生物工程公司); DNaseI (美国 Fermentas 公司); 6 × Loading Buffer (美国 MBI 公司); GelRed (美国 Biotium 公司); Chromo4 荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); MICRO 17TR 离心机 (韩国 Hanil 公司); Image system (EUV-LDUV) 凝胶成像系统 (韩国 KoreaBio-tech 公司); 戊巴比妥钠 (美国 Sigma 公司); 病理切片及光学显微镜由中国人民解放军空军总医院病理科提供。

1.3 动物分组 40 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后按随机数字表法分为 5 组, 每组 8 只大鼠, A 组为空白对照组, B 组为 +5 Gz 值暴露组, C 组为 +10 Gz 值暴露组, D 组为适应性训练后 +5 Gz 值暴露组, E 组为适应性训练后 +10 Gz 值暴露组。

2016-03-23 接收

基金项目: 全军十二五后勤科研计划基金资助项目 (编号: AKJ11J004)

作者单位: ¹安徽医科大学空军临床学院, 北京 100142

²中国人民解放军空军总医院干部病房, 北京 100142

作者简介: 刘 昊, 男, 硕士研究生;

杨春敏, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Chunmyang9816@163.com

1.4 +Gz 暴露及适应性训练 采用由中国航空航天医学研究所提供的小动物离心机模拟 +Gz 值暴露,离心机半径为 1 m,离心全程由电脑进行加速度程序控制。参照本课题组前期试验方法^[3]及预实验结果,适应性训练及 +Gz 暴露处理如下: A 组大鼠不做任何处理; B 组大鼠每天在 +5 Gz 值加速度下暴露 5 min,连续暴露 5 d; C 组大鼠每天在 +10 Gz 值加速度下暴露 5 min,连续暴露 5 d; D 组大鼠适应性训练即每天在 +4 Gz 值加速度下暴露 3 min,连续暴露 5 d 后每天在 +5 Gz 值加速度下暴露 5 min,连续暴露 5 d; E 组大鼠适应性训练即每天在 +4 Gz 值加速度下暴露 3 min,连续暴露 5 d 后每天在 +10 Gz 值加速度下暴露 5 min,连续暴露 5 d。

1.5 标本采集 各实验组在相应天数正加速度处理完毕后,用 2% 戊巴比妥钠(2.3 ml/kg)腹腔麻醉后固定,打开腹腔,小心分离大鼠胃脏,贲门和幽门侧离断后取出大鼠胃置于干净纱布上,沿胃大弯侧剪开胃腔,生理盐水冲洗,小刀轻轻刮取适量胃黏膜置于冻存管中 -80 ℃ 保存。

1.6 组织病理切片制备 取胃黏膜损伤最严重处组织(10 mm × 10 mm)一块,甲醛固定、组织脱水、透明、浸蜡与包埋、切片、制片、HE 染色。光学显微镜下观察胃黏膜组织病理学变化。

1.7 胃黏膜 6-Keto-PGF_{1α} 含量检测 采用 ELISA 法检测胃黏膜 6-Keto-PGF_{1α} 的含量,具体操作方法严格按照 6-Keto-PGF_{1α} 试剂盒说明书进行,测定结果以 pg/ml 表示。

1.8 胃黏膜 COX-1 mRNA、COX-2 mRNA 实时定量 PCR(RT-PCR) 法检测 取胃黏膜标本置于研钵中并加入液氮小心研磨,严格按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 RNA,向样品 RNA 中依次加入 RNase I Inhibitor 4 μl, DNase I buffer 10 μl, DNase I 10 μl,并加入 DEPC 至 100 μl,混匀 90 min,消化样品 RNA 中的 DNA。按照 M-MLV 逆转录酶试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,引物由北京中美泰和生物技术有限公司合成,见表 1。向各样本中加入染料 2 × Ex Taq Mix 12.5 μl, 10 μmol/L 引物混合物 0.75 μl,对应的 cDNA 各 1 μl,其中一管不加模板用作阴性对照,各管补加水至 25 μl,混匀后置于 PCR 仪中 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃、30 s, 60 ℃、30 s, 72 ℃、30 s,共 40 个周期,产物在 4 ℃ 保存。120 V 电压下电泳 20 min,电泳结束后在凝胶紫外分析仪照

相。整个 PCR 过程由计算机收集数据,绘制曲线,并以 β-actin 作为内参,读取数据,各 mRNA 表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,首先对数据进行正态性检验和方差齐性分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,两变量关系采用线性相关分析。

表 1 PCR 引物系列

名称	序列(5'-3')	产物长度(bp)
β-actin	F: GAAGTGTGACGTTGACATCCG	282
	R: GCCTAGAAGCATTTGCGGTG	
COX-1	F: GAGTGGTTTGTCTGCGCTCT	160
	R: TCAACTGCCTCTGCCTTCC	
COX-2	F: CACGGACTTGCTCACTTTGT	165
	R: GGAGAAGCGTTTGCCTGA	

2 结果

2.1 试验动物基本情况 各组大鼠在整个试验操作过程中均无死亡,每次正加速度处理完毕后出现暂时性行走不稳、精神萎靡,但随着时间推移,各组大鼠逐渐恢复至正常活动和饮食。

2.2 组织病理学 A 组:胃黏膜组织形态正常,未见损伤性改变,黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层组织完整。B 组:黏膜层及黏膜下层有部分坏死组织,绒毛结构部分脱落,黏膜层可见炎性细胞浸润。C 组:损伤深达肌层和浆膜层,腺体结构破坏严重,大量组织脱落、中断,炎性细胞浸润。D 组:损伤达黏膜层,腺体部分破坏,绒毛破坏较轻,可见炎性细胞浸润。E 组:损伤达黏膜层,黏膜下层有部分损伤,腺体结构部分破坏,可见炎性细胞浸润。见图 1。

2.3 胃黏膜 6-Keto-PGF_{1α} 含量 B 组和 C 组 6-Keto-PGF_{1α} 含量均低于 A 组($P < 0.05$); B 组和 C 组间比较差异无统计学意义;适应性训练后, D 组 6-Keto-PGF_{1α} 含量高于 B 组, E 组 6-Keto-PGF_{1α} 含量高于 C 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 胃黏膜 COX-1 mRNA、COX-2 mRNA RT-PCR 检测结果 COX-1 mRNA 相对表达量各组差异无统计学意义。B 组 COX-2 mRNA 表达高于 A 组($P < 0.05$), C 组 COX-2 mRNA 表达高于 A 组和 B 组($P < 0.05$)。适应性训练后, D 组 COX-2 mRNA 表达高于 B 组, E 组 COX-2 mRNA 表达高于 C 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

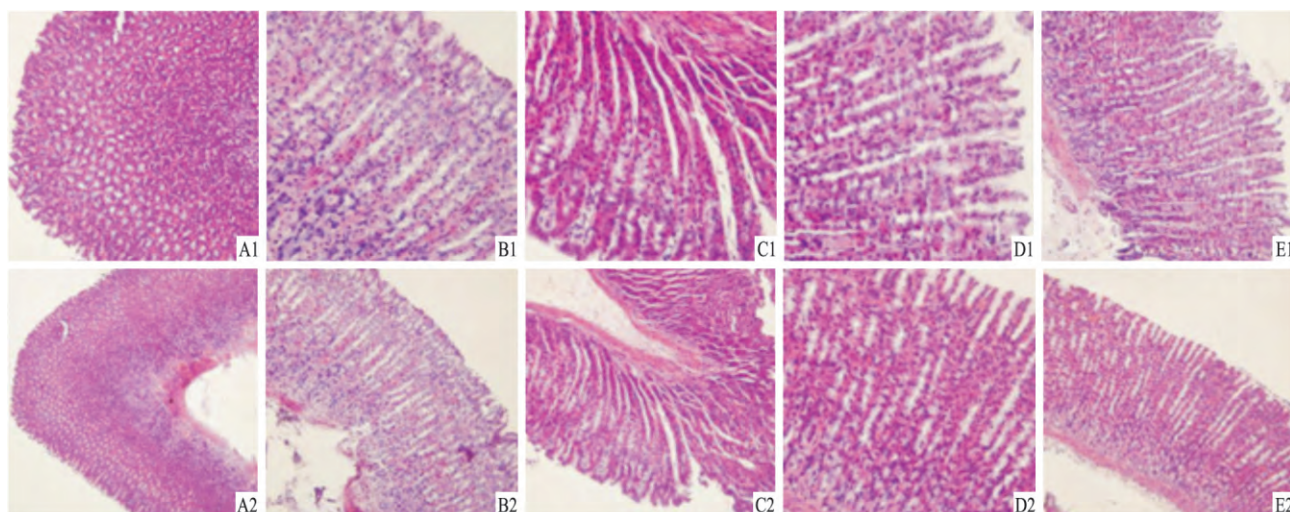
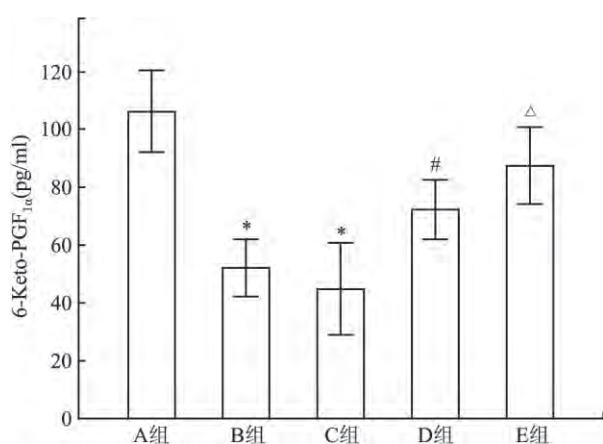


图1 各组大鼠胃黏膜 HE 染色结果

A: 空白对照组; B: +5 Gz 值暴露组; C: +10 Gz 值暴露组; D: 适应性训练后 +5 Gz 值暴露组; E: 适应性训练后 +10 Gz 值暴露组; 1: $\times 400$; 2: $\times 100$

图2 胃黏膜 6-Keto-PGF_{1α} 含量变化

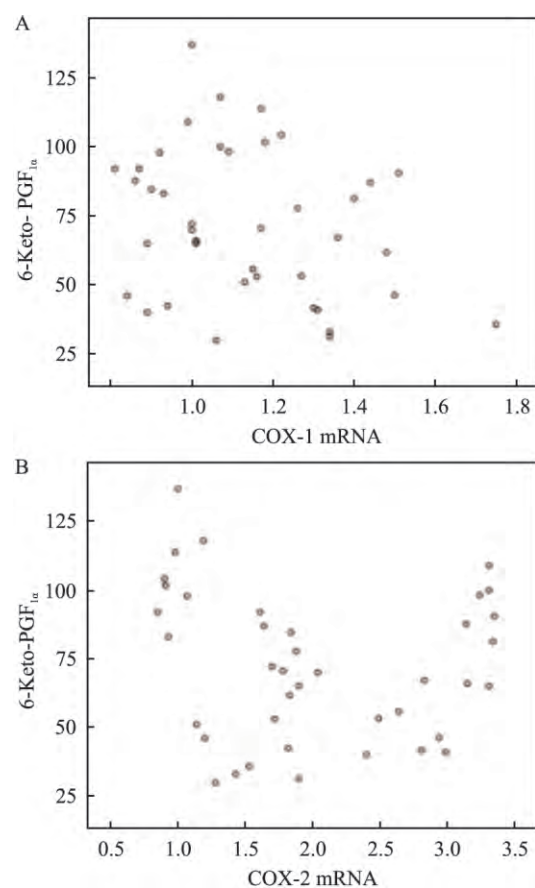
与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: $\Delta P < 0.05$

表2 大鼠胃黏膜 COX mRNA 相对表达量 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	COX-1 mRNA	COX-2 mRNA
A	1.045 $\pm$ 0.134	0.978 $\pm$ 0.109
B	1.222 $\pm$ 0.198	1.492 $\pm$ 0.281*
C	1.230 $\pm$ 0.296	2.642 $\pm$ 0.320*#
D	1.098 $\pm$ 0.214	1.782 $\pm$ 0.099#
E	1.102 $\pm$ 0.233	3.268 $\pm$ 0.083 Δ

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: $\Delta P < 0.05$

2.5 6-Keto-PGF_{1α} 与 COX mRNA 相对表达量的相关性分析 各组大鼠胃黏膜 6-Keto-PGF_{1α} 含量与 COX-1 mRNA、COX-2 mRNA 相对表达量间均无相关性 ($r = -0.277, -0.135, P > 0.05$)。见图 3。

图3 大鼠胃黏膜 6-Keto-PGF_{1α} 含量与 COX mRNA 表达的相关性分析

A: COX-1 mRNA; B: COX-2 mRNA

3 讨论

PGI₂ 由血管内皮细胞生成, 为小鼠胃黏膜中含

量最丰富的一型前列腺素类物质,内源性含量降低则可造成胃黏膜损伤^[4-5]。研究^[6]表明,应激性胃黏膜损伤与胃的高幅和高频收缩密切相关,而 PGI₂ 能抑制胃环形肌收缩,刺激纵形肌收缩,从而防止或减轻胃黏膜损伤。研究^[7]显示 PGI₂ 在适应性细胞保护中有重要作用,能够刺激辣椒素敏感神经释放降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP),CGRP 可扩张微动脉从而增加胃黏膜血流量,为黏膜细胞提供丰富的氧和营养物质,带走有害物质,增加胃黏液分泌,促进胃黏膜上皮细胞的修复,同时还可以恢复胃黏膜溃疡基底层血管的微循环。本研究结果表明,随着 +Gz 暴露值的增加,胃黏膜损伤逐渐加重,PGI₂ 含量逐渐降低。在适应性训练后,D 组 6-Keto-PGF_{1α} 含量高于 B 组,E 组 6-Keto-PGF_{1α} 含量明显高于 C 组,且差异均有统计学意义,说明适应性训练后,PGI₂ 合成增加,胃黏膜保护作用加强。

20 世纪 90 年代以来,科学家们发现 COX 有两个亚型,即结构性表达的 COX-1 和诱导性表达的 COX-2。随着近年来研究的深入,第 3 种 COX 被发现,将其命名为 COX-3,但随后的研究^[8]显示,这种 COX 亚型没有 COX 活性,在人体组织中无法催化花生四烯酸生成前列腺素类物质(prostaglandins, PG),大鼠中 COX-3 同样没有 COX 活性。COX-1 来源的 PG 在维持胃黏膜的完整性方面有重要作用,而 COX-2 催化的产物则与炎症反应密切相关。外源性 PG 能够抵御应激性刺激从而维持胃黏膜的完整性。Robert et al^[9]首次提出内源性 PG 合成和释放在适应性细胞保护中占有重要地位,但是目前仍然不清楚何种 COX 牵涉适应性保护作用。既往研究^[10]已明确内源性 PG 的合成依赖于 COX 的作用,COX 是合成 PG 物质的限速酶。

在正常生理状况下,PG 的合成依赖花生四烯酸的存在和 COX-1 的活动。相反地,COX-2 在大多数组织中却不是构成性表达的,COX-2 能够被众多刺激因素所诱导,这些刺激因素包括白细胞介素-1、肿瘤坏死因子 α、生长因子、脂多糖和氧化应激等。许多刺激物如乙醇、吡咯美辛、水杨酸盐等均能带来 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白的表达^[11]。Mizuno et al^[12]发现在乙醇致大鼠胃黏膜急性损伤中 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白的显著上升。既往研究^[8]显示,在正常胃黏膜中 COX-1 是持续性表达的,COX-2 则不表达或者只有微量表达。在正常胃黏膜和应激性损伤胃黏膜中均检测到 COX-1 mRNA 的高表达,

COX-1 在正常胃黏膜中执行“看家”的生理功能^[13]。在胃黏膜受到温和或剧烈的刺激后,COX-2 mRNA 则高度表达,有利于适应性细胞保护作用的产生。Davies et al^[14]认为这种在剧烈刺激时的 COX-2 mRNA 过度表达可能补充了正常胃黏膜中 PG 的产生不足。COX-2 能够诱导表皮生长因子、肝细胞生长因子、转化生长因子 α、血管内皮生长因子等增殖性因子表达,促进上皮细胞增殖和血管生成,参与胃黏膜的防御和修复^[15]。COX-2 在急性胃黏膜损伤中表达明显增强,从而发挥对胃黏膜的保护作用并促进胃黏膜损伤的愈合。

本研究显示,B 组(+5 Gz 值暴露组)和 C 组(+10 Gz 值暴露组)大鼠胃黏膜 COX-1 mRNA 相对表达量较空白对照组差异无统计学意义。适应性训练后,COX-1 mRNA 相对表达量亦无明显改变。COX-1 mRNA 似乎在正加速度适应性训练中作用不大。COX-2 mRNA 在 A 组(空白对照组)相对表达量较低,B 组(+5 Gz 值暴露组)和 C 组(+10 Gz 值暴露组)COX-2 mRNA 相对表达均高于 A 组,且 C 组 COX-2 mRNA 相对表达高于 B 组,说明 +Gz 暴露值越大,COX-2 mRNA 相对表达越高。适应性训练后,D 组 COX-2 mRNA 相对表达量高于 B 组,E 组相对表达量高于 C 组,说明适应性训练可刺激 COX-2 mRNA 表达增加,促进胃黏膜的修复,维持胃黏膜的完整。

6-Keto-PGF_{1α} 与 COX-1 mRNA 和 COX-2 mRNA 相对表达均无相关性。故推断本研究中 PGI₂ 生成是由 COX-1 和 COX-2 共同作用的结果,COX-2 mRNA 表达增加占主要地位。正常生理状况下,COX-1 来源的 PGI₂ 促进胃黏液分泌,增加胃血流量,保护胃黏膜。当受到 +Gz 刺激时,COX-1 和 COX-2 共同作用产生 PGI₂ 促进胃黏膜内各种生长因子的大量生成、抗黏膜损伤、增加胃黏膜血流量,发挥适应性细胞保护作用。

综上所述,本研究结果表明,正加速度适应性训练可显著提高 +Gz 暴露下胃黏膜抗损伤的能力,其机制与 PGI₂ 生成及 COX-2 mRNA 表达增加有关,与 COX-1 mRNA 表达关系不大,为深入研究飞行人员正加速度适应性训练在减少胃肠道损伤方面的研究奠定基础。

参考文献

- [1] 刘昊,陈英,徐珊,等.正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜 PGI₂、TXA₂ 含量及 TXA₂/PGI₂ 比值的影响[J].世界华人

- 消化杂志 2015 23(29):4680-6.
- [2] Liu D, Liu B, Luo W, et al. A vasoconstrictor response to COX-1-mediated prostacyclin synthesis in young rat renal arteries that increases in prehypertensive conditions [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015 309(5): H804-11.
- [3] 范勤, 陈英, 杜斌, 等. +Gz 暴露对大鼠胃黏膜损伤及胃液表皮生长因子含量的影响 [J]. *胃肠病学和肝病学* 2013, 22(3): 228-31.
- [4] Mary C C, Kenneth J O, John V R, et al. COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention [J]. *Biochim Biophys Acta* 2012 1825(1): 49-63.
- [5] Yuan C, Smith W L. A cyclooxygenase-2 dependent prostaglandin E2 biosynthetic system in the Golgi apparatus [J]. *J Biol Chem*, 2015 290(9): 5606-20.
- [6] Weiya M. Chronic prostaglandin E2 treatment induces the synthesis of the pain-related peptide substance P and calcitonin gene-related peptide in cultured sensory ganglion explants [J]. *J Neurochem*, 2010, 115(2): 363-72.
- [7] Li N S, Luo X J, Dai Z, et al. Beneficial effects of capsiate on ethanol-induced mucosal injury in rats are related to stimulation of calcitonin gene-related peptide release [J]. *Planta Med*, 2012, 78(1): 24-30.
- [8] Brzozowski T, Konturek P C, Konturek S J, et al. Expression of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress [J]. *J Physiol Paris* 2000 94(2): 83-91.
- [9] Robert A, Nezamis J E, Lancaster C, et al. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins [J]. *Am J Physiol*, 1983 245(1): G113-21.
- [10] Peskar B M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence [J]. *J Physiol Paris* 2001 95(1-6): 3-9.
- [11] Villegas I, La Casa C, de la Catalina A, et al. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response [J]. *Life Sci* 2004 74(7): 873-84.
- [12] Mizuno H, Sakamoto C H, Matsuda K, et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(2): 387-97.
- [13] Yuan C, Smith W L. A Cyclooxygenase-2 dependent prostaglandin E2 biosynthetic system in the golgi apparatus [J]. *J Biol Chem*, 2015 290(9): 5606-20.
- [14] Davies N M, Sharkley K A, Asfaha S, et al. Aspirin causes rapid up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in the stomach of rats [J]. *Alim Pharmacol Ther*, 1997, 11(6): 1101-8.
- [15] Haruna H, Shimizu T, Ohtsuka Y, et al. Expression of COX-1, COX-2, and PPAR-gamma in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* infection [J]. *Pediatr Int* 2008 50(1): 1-6.

Effects of positive acceleration adaptive training on the expression of COX-1 mRNA and COX-2 mRNA in gastric mucosa

Liu Hao¹, Chen Ying², Xu Shan², et al

(¹*Air Force Clinical Institute, Anhui Medical University, Beijing 100142;*

²*Cadre Ward, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing 100142)*

Abstract Objective To study the effects of positive acceleration adaptive training on the expression of COX-1 mRNA and COX-2 mRNA in gastric mucosa. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into 5 groups: A, B, C, D and E. Group A was the control group and did not undergo any treatment. Group B was exposed to +5 Gz for 5 minutes per day over 5 consecutive days. Group C was exposed to +10 Gz for 5 minutes per day over 5 consecutive days. Group D was exposed to +4 Gz for 3 minutes per day over 5 consecutive days and +5 Gz for 5 minutes per day over another 5 consecutive days. Group E was exposed to +4 Gz for 3 minutes per day over 5 consecutive days and +10 Gz for 5 minutes per day over another 5 consecutive days. The damage to the gastric mucosa was then observed with the naked eye and under the microscope. The 6-Keto-PGF_{1α} content in gastric mucosa was detected by ELISA. The expression of COX-1 mRNA and COX-2 mRNA was assessed with RT-PCR method. **Results** The content of 6-Keto-PGF_{1α} was significantly lower in group B than in group A and in group C than group A ($P < 0.05$). After adaptive training, the content of 6-Keto-PGF_{1α} was significantly higher in group D than in group B and in group E than group C ($P < 0.05$). There was no significant difference on the expression of COX-1 mRNA in all groups. The expression of COX-2 mRNA was significantly higher in group B than in group A and in group C

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.016.html

重楼总苷 I 对人视网膜色素 上皮细胞系 ARPE-19 增殖、迁移的影响

苏菲菲¹, 卢木娣¹, 曾惠红¹, 江文良¹, 赖文娟¹, 梁堂钰¹, 赖雪燕¹, 龙剑文²

摘要 目的 探讨重楼总苷 I 对人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19) 增殖、迁移的影响。方法 MTT 法检测重楼总苷 I 对 ARPE-19 细胞增殖的影响, Transwell 小室实验检测 ARPE-19 细胞侵袭能力的变化, 划痕实验检测 ARPE-19 细胞迁移能力的变化, 实时荧光定量 PCR 检测 ERK1/2 mRNA 的表达, Western blot 法检测 ERK1/2 蛋白、p-ERK1/2 蛋白表达水平。结果 重楼总苷 I 可抑制 ARPE-19 细胞的增殖、侵袭、迁移, 下调 p-ERK1/2 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但对总 ERK1/2 表达、ERK1 mRNA 和 ERK2 mRNA 表达无明显影响。结论 重楼总苷 I 能有效抑制 ARPE-19 细胞的增殖、侵袭、迁移, 可能与重楼总苷 I 抑制了 ARPE-19 细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化有关, 为中药重楼治疗增生性玻璃体视网膜疾病提供了依据。

关键词 重楼总苷 I; 增殖; 迁移; 视网膜色素上皮细胞

中图分类号 R 774.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0956-05

人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞增殖、迁移, 细胞外基质成分 (extracellular matrix, ECM) 异常沉积, 形成有收缩能力的增生膜, 是增生性玻璃体视网膜疾病 (PVR) 发生和发展的重要环节^[1]。研究^[2]表明, RPE 细胞在 PVR 的发展中起着最重要的作用。重楼是中医治疗 PVR 的常

用药物之一^[3], 研究^[4-6]表明, 其有效成分重楼总苷 I 对一些肿瘤细胞有抑制作用, 但对人 RPE 细胞作用如何, 目前暂无报道。该研究观察了重楼总苷 I 对人 RPE 细胞增殖、迁移的影响, 以及对其 ERK1/2 mRNA 表达、ERK1/2 蛋白、p-ERK1/2 蛋白表达的影响, 探讨重楼总苷 I 治疗 PVR 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 重楼皂苷 I 粉剂购自中国药品生物制品检定所; 人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19) 细胞株购自武汉大学细胞库中国典型培养物保藏中心; 100 U/L 青霉素、100 μ g/L 链霉素、MTT 试剂盒购自武汉博士德生物公司; DMEM 培养基、小牛血清和胰蛋白酶均购自美国 GIBCO 公司; 分光光度仪购自芬兰 Labsystems 公司; 细胞培养箱 (热电 3111 型) 购自美国热电公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司; Quantonstep RT-PCR Kit 购自北京天根生化公司; ERK1/2、p-ERK1/2、辣根酶标记抗鼠 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根酶标记的 β -actin 抗体购自上海兴悠生物科技有限公司; ECL 试剂盒购自美国 Amersham Biosciences 公司; Transwell 小室购自美国 Millipore 公司。

1.2 MTT 法检测不同浓度药物对 ARPE-19 细胞增生的影响 将 ARPE-19 细胞以 5×10^4 /孔接种于 96 孔板, 每孔接种 100 μ l 培养液为含有 10% 小牛血清的 DMEM, 待细胞长至 60% ~ 70% 融合状态时, 加入处理因素, 每组重楼皂苷 I 终浓度分别为 0、0.75、1.5、3.0、6.0 μ g/ml, 每组均设 6 个平行孔,

2015-04-13 接收

基金项目: 湖北省卫生计生委中医药、中西医结合科研指导性项目 (编号: 2013Z-B05)

作者单位: ¹贺州市人民医院眼科, 贺州 542899

²湖北省中医院、湖北中医药大学临床医学院, 武汉 430061

作者简介: 苏菲菲, 女, 硕士, 责任作者, E-mail: 984625812@qq.com

than group B and group A ($P < 0.05$). After adaptive training, the expression of COX-2 mRNA was significantly higher in group D than in group B and in group E than group C. The content of 6-Keto-PGF_{1 α} and the expression of COX-1 mRNA and the expression of COX-2 mRNA, had no significant correlation ($P < 0.05$). **Conclusion** Adaptive training can significantly reduce the gastric mucosal damage caused by high +Gz value, and its mechanism is related to the increase in PGI₂ content and expression of COX-2 mRNA.

Key words positive acceleration; adaptive training; gastric mucosa; cyclooxygenase 1; cyclooxygenase 2; prostacyclin