

肿瘤发病机制与治疗

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000129

食管癌相关基因 4 在体外纯化培养大鼠
脉络丛上皮细胞中的表达研究陈 博¹, 谢延凤², 师 蔚¹, 濮璟楠¹, 刘重霄¹, 王芳茹¹, 唐文渊²

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院神经外科, 西安 710049; 2. 重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究食管癌相关基因 4(esophageal cancer related gene 4, ECRG4)在体外培养条件下大鼠脉络丛上皮细胞(choroid plexus epithelial cells, CPECs)中表达的情况。**方法:**分离纯化培养新生 1 d 斯泼累格·多雷大鼠(Sprague-Dawley rats, SD Rats) CPECs, 并进行传代培养, 分为原代培养组(A 组)、传 1 代培养组(B 组)和传 2 代培养组(C 组)、原代培养干预组(D 组, 使用氯化锰给予毒化), 并应用 qRT-PCR 法、Western blot 法及 ELISA 法分别检测 ECRG4 在各组 CPECs 中的表达情况。**结果:**① qRT-PCR 法检测 ECRG4 mRNA 在原代培养和传代培养的 CPECs 中的表达; B 组 ECRG4 mRNA 表达高于 A、C 2 组, 差异具有统计学意义($P=0.000$), A、C 2 组差异无统计学意义($P=0.127$)。D 组与 A 组比较表达明显降低, 差异具有统计学意义($P=0.001$)。② Western blot 法 ECRG4 蛋白在原代培养和传代培养的 CPECs 中的表达; B 组 ECRG4 蛋白表达水平明显高于 A 组及 C 组, C 组 ECRG4 蛋白表达水平明显高于 A 组, 差异具有统计学意义($P=0.000$)。A 组 ECRG4 蛋白表达水平明显高于 D 组, A、D 2 组 ECRG4 蛋白表达水平的差异具有统计学意义($P=0.000$)。③ ELISA 方法检测 ECRG4 在原代培养和传代培养的 CPECs 中的分泌情况; B 组高于 A、C 2 组, A 组高于 C 组, 差异具有统计学意义($P=0.000$)。而 A、B 2 组差异无统计学意义($P=0.131$)。**结论:**通过对 ECRG4 在 CPECs 中的表达研究, 提示 ECRG4 可能参与 CPECs 对损伤的反应, 并影响了 CPECs 的生物学特性, 为 ECRG4 在神经再生中的作用研究奠定理论和实验基础。

【关键词】食管癌相关基因 4; 脉络丛上皮细胞; 原代培养; 传代培养; 纯化培养

【中图分类号】R741.05

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-22

Expression of esophageal cancer related gene 4 in choroid plexus epithelial cells of purified rat in vitro

Chen Bo¹, Xie Yanfeng², Shi Wei¹, Pu Jingnan¹, Liu Chongxiao¹, Wang Fangru¹, Tang Wenyuan²(1. Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an JiaoTong University;
2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect expression of esophageal cancer related gene 4 (ECRG4) in choroid plexus epithelial cells of purified rat in vitro. **Methods:** Primary and passage choroid plexus epithelial cells were obtained from 1 d newborn Sprague-Dawley rats. Expression of ECRG4 was measured by qRT-PCR and Western blot. Secretion of ECRG4 was detected by ELISA. Cells were divided into primary cells (A), passage 1 cells (B) and passage 2 cells (C) groups. Cells which using $MnCl_2$ were divided into intervening primary cells (D) groups. **Results:** ① Expression of ECRG4 mRNA was higher in group B than in groups A and C with statistical differences ($P=0.000$). There was no statistical difference in expression of ECRG4 mRNA between group A and group C ($P=0.127$). Expression of ECRG4 mRNA was significantly reduced in group D than in group A ($P=0.001$). ② ECRG4 protein expression was significantly higher in group B than in group A and group C. ECRG4 protein expression was significantly higher in group C than in group A ($P=0.000$). ECRG4 protein expression was significantly higher in group A than in group D ($P=0.000$). ③ Secretion of ECRG4 detected by ELISA was significantly higher in group B than in group A and group C. Secretion of ECRG4 was significantly higher in group A than in group C ($P=0.000$). There was no statistically significant difference between group A and group B ($P=0.131$). **Conclusions:** ECRG4 might participate in the responding of choroid plexus epithelial cells to injury and influence bionomics of choroid plexus epithelial cells. The work on ECRG4 expression in choroid plexus epithelial cells can establish theoretical and experimental basement for clarifying the function of choroid plexus epithelial cell in nerve regeneration promoting.

作者介绍:陈 博, Email: slash0704@sina.com,

研究方向: 神经系统损伤及修复, 癫痫的外科治疗。

通信作者:师 蔚, Email: sweins@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 30973099/H0906、81271341/H0910)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000129.html>

【Key words】esophageal cancer related gene 4; choroid plexus epithelial cells; primary culture; passage culture; serial subcultivation

脉络丛上皮细胞(choroid plexus epithelial cells, CPECs)是脉络丛细胞的主要组成部分,是脉络丛组织的基本功能单位^[1]。CPECs 作为种子细胞进行移植为神经系统疾病治疗提供了新思路和新方法。作者课题组前期的实验研究证明,在大鼠脑出血后的移植 CPECs 可明显促进神经轴突的再生和修复,但其机制尚未明确,可能与 CPECs 的生物学活性及分泌特点有关。食管癌相关基因 4(esophageal cancer related gene 4, ECRG4)在大鼠脑外伤后脉络丛中有明显表达^[2],而 ECRG4 在 CPECs 中表达情况尚未见报道。本文在前期研究工作的基础上,改良了 CPECs 的培养方法^[3-5],研究 ECRG4 在体外纯化培养的 CPECs 中的表达情况,为 CPECs 在神经再生、神经功能恢复及神经网络重建中的作用和机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级斯泼累格·多雷大鼠(Sprague-Dawley rats, SD Rats)由西安交通大学医学院动物实验中心提供,实验过程中对动物的处置严格按照实验动物伦理学^[6]标准执行。雌雄不限的新生 1 d 的 SD 大鼠用于本实验。

1.2 CPECs 培养及分组

在传统方法^[3-5]改良的基础上进行 CPECs 的培养。用 10% 水合氯醛麻醉动物,碘伏消毒,剪断颈总动脉放血处死。沿矢状缝剪开颅骨,完整暴露并取出大脑,立即放入预冷的 HBSS 缓冲液烧杯中,静置 5 min 后转入冰上盛有 PBS 的培养皿内,显微镜下取出侧脑室脉络丛组织,浸入 4 °C 预冷 DMEM (购自美国 Thermo 公司)培养液的烧杯中,剪碎并用 20 号标准注射器反复抽吸,机械分离 20 次,链酶蛋白酶消化 5 min,加入含有胎牛血清(购自美国 Thermo 公司)的 DMEM/F12(购自美国 Thermo 公司)培养基终止消化,1 000 r/min,离心 10 min,用 DMEM/F12 培养基重悬细胞,稀释细胞约为 30 000 个/ml,接种细胞于 6 孔板上,在 37 °C,饱和湿度、95 ml/L 空气、50 ml/L CO₂ 的培养箱中。细胞分为原代培养组(A 组)、传 1 代培养组(B 组)及传 2 代培养组(C 组)、原代培养干预组(D 组)。

1.3 CPECs 的纯化

置于培养箱后 6 h,平稳取出 6 孔板,缓慢吸出培养液,移入事先用多聚赖氨酸包被妥当的 6 孔板中,加入 L-羟脯氨酸(L-Hydroxyproline, L-Hp)(购自美国 Sigma 公司)不含胎牛血清的 DMEM 低糖培养基(购自美国 Thermo 公司),再次置于培养箱中,48 h 勿动,其后更换培养液,添加含有胎牛

血清和 L-Hp 的培养基,以后每隔 2 d 根据情况确定全量或半量更换培养基,并记录细胞生长情况,待细胞生长覆盖 80% 的 6 孔板单孔备用,需要 12 d。

1.4 CPECs 的鉴定

采用 qRT-PCR 法、Western blot 法和 ELISA 法检测 TTR 的表达,结果见后。

1.5 CPECs 传代培养

待原代培养的 CPECs 生长并铺满 70%~80% 的 6 孔板单孔后,进行传代培养。吸取培养基,用 PBS 冲洗 3 遍,并轻微晃动培养板,用加强胰酶 2 ml 消化 5 min,加入含有胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,1 000 r/min,离心 10 min,再次用 DMEM/F12 培养基重悬,接种入新的用多聚赖氨酸包被的培养皿中,相同条件培养箱培养备用。

1.6 经典毒物对 CPECs 的干预

本实验选取氯化锰(MnCl₂)对 CPECs 进行染毒^[7],并进行转甲状腺素蛋白(transthyretin, TTR)和 ECRG4 检测,明确 TTR 和 ECRG4 的表达情况。

1.7 qRT-PCR 法检测 ECRG4 和 TTR 的表达

使用 Trizol[®](Invitrogen, 美国)提取细胞总 RNA, 5 μg RNA 用于逆转录(RT, 使用 RevertAid[™] 第一链 cDNA 合成试剂盒, Fermentas, 美国)合成 cDNA 的过程。实时定量 PCR 反应使用荧光试剂 SYBR Green II 试剂(SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, Takara, 日本)。反应操作中使用 3 复孔,并选择 GAPDH 作为内参基因用来校准目的基因的相对表达,利用软件使用原始数据的 Ct 值运用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行计算,得到每个样本中目的基因 mRNA 的相对表达值。PCR 使用到的引物信息: ECRG4 上游引物序列: 5'-AAGCGTGCCAAACGACAG-CTGTGGGAC-3', 下游引物序列: 5'-TTAATAGTCATCATA-GTTGACACTGGC-3', 产物长度 252 bp; TTR: 上游引物序列: 5'-GGGCTCACACAGATGAGAA-3', 下游引物序列: 5'-TGT-GAAAACCACCTCTGCGT-3', 产物长度 120 bp; GAPDH: 上游引物序列: 5'-TTCCAGTATGACTCTACCCACG-3', 下游引物序列: 5'-GCGGAGATGATGACCCTTTT-3', 产物长度 230 bp。RT 反应条件: 42 °C 60 min, 70 °C 5 min; PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 10 min, PCR 循环中 95 °C 变性 10 s, 在引物各自最佳退火温度退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 共循环 40 次。反应结束, 附带溶解曲线绘制。

1.8 Western blot 法检测 ECRG4 和 TTR 的表达

采用 BCA 法提取细胞蛋白。全细胞蛋白使用 RIPA 溶液进行裂解,蛋白浓度使用 BCA 法进行定量。裂解液按照常规操作步骤在 SDS/PAGE 胶中上样并进行电泳,转印以及一抗、二抗的抗体孵育过程,并最终进行曝光。同一张 NC 膜上的 GAPDH 作为内参对照。一抗分别使用兔抗 ECRG4(购自美国 santa 公司),兔抗 TTR(购自中国博奥森)和小鼠抗 GAPDH (Abcam 购自美国 Abcam 公司)抗体,信号检测使用的是山羊抗兔或山羊抗小鼠的 HRP 标记二抗。化学发光信号强度

使用 Supersignal® West Pico 试剂盒(Thermo Scientific)进行底物反应并曝光得到条带,上样量为 100 μg。

1.9 ELISA 法检测 ECRG4 和 TTR 的分泌

收集细胞上清液并在-20 °C 储存。用 ELISA 法测定 ECRG4 和 TTR 在细胞上清液中的含量。细胞上清液 1 000 r/min, 4 °C 离心 5 min, 操作严格按照 96 孔 ELISA 试剂盒(购自中国蓝图公司)说明书进行。ELISA 检验步骤如下: 96 孔板使用每孔 100 μl 稀释好(1:100)的山羊抗大鼠多克隆抗体 4 °C 包被过夜。次日, 洗涤后将 100 μl 标准品或上清样品加入复孔内, 37 °C 摇晃孵育 1 h, 再洗涤, 接着使用带 HRP 标记的小鼠抗大鼠多克隆抗体(1:100)在 37 °C 孵育 1 h。洗涤后, 加入 100 μl 四甲基联苯胺底物溶液并于 37 °C 避光反应 10 min, 加入终止液后在 450 nm 波长下使用酶标仪进行检测。使用标准品梯度稀释得到的曲线构建标准曲线并相应计算每个上清样本中的蛋白浓度。空白调零组使用细胞培养基。

1.10 统计学分析

统计分析软件版本号: SPSS 13.0。使用 Levene 检验进行方差齐性分析, 数据以平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示, 多组的组间差异使用单因素方差分析进行检验, 其组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 显微镜下细胞形态学观察

见图 1。12~14 d 时, 原代细胞、传代细胞可见主要由多角形细胞组成的铺满培养皿的细胞层, 体积大, 透明度及遮光性强, 细胞衔接紧密, 融合成片。MnCl₂ 染毒 24 h 后, 细胞体积较未染毒细胞胞体明显缩小, 透明度及遮光性差, 细胞衔接疏松。

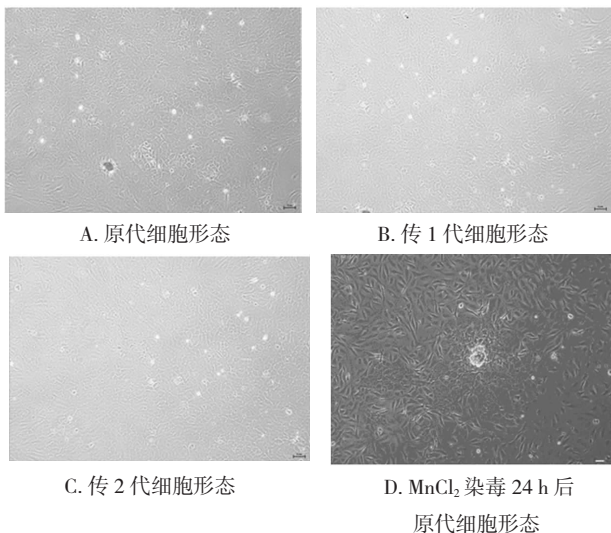


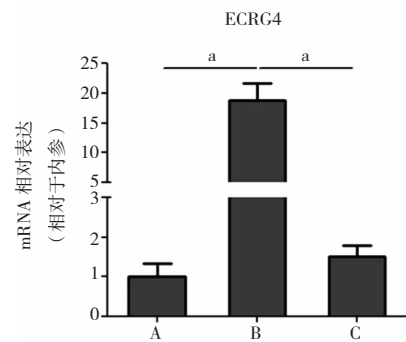
图 1 光镜下 CPECs 的形态, 倒置相差显微镜摄片 (10 ×, 标尺 10 μm)

Fig.1 Morphology of CPECs under light microscope (inverted phase contrast microscopy, 10 ×, bar: 10 μm)

2.2 qRT-PCR 检测 ECRG4 mRNA 和 TTR mRNA 的表达

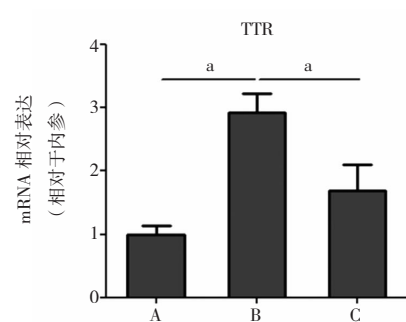
2.2.1 ECRG4 mRNA 的表达情况 qRT-PCR 方法检测 A、B、C 3 组 ECRG4 mRNA 表达, 见图 2。方差分析 3 组 ECRG4 mRNA 表达水平的差异, 差异具有统计学意义 ($F=34.805, P=0.000$)。两两比较 A、B 2 组和 B、C 2 组差异均有统计学意义, A、C 2 组差异无统计学意义 ($P=0.127$)。B 组 ECRG4 mRNA 表达高于 A、C 2 组, 差异具有统计学意义。见表 1。

2.2.2 TTR mRNA 的表达情况 qRT-PCR 方法检测 A、B、C 3 组 TTR mRNA 表达, 见图 3。方差分析 3 组 TTR mRNA 表达水平的差异, 差异具有统计学意义 ($F=10.638, P=0.011$)。两两比较 A、B 2 组 ($P=0.004$) 和 B、C 2 组 ($P=0.027$) 差异具有统计学意义, A、C 2 组 ($P=0.227$) 差异无统计学意义。B 组 TTR mRNA 表达高于 A 组和 C 组, 差异具有统计学意义。见表 1。



A. 原代细胞培养组; B. 传 1 代培养组; C. 传 2 代培养组
a. $P<0.05$

图 2 qRT-PCR 检测 ECRG4 mRNA 的表达
Fig.2 ECRG4 mRNA expression detected by qRT-PCR



A. 原代细胞培养组; B. 传 1 代培养组; C. 传 2 代培养组
a. $P<0.05$

图 3 qRT-PCR 检测 TTR mRNA 表达
Fig.3 TTR mRNA expression detected by qRT-PCR

2.3 Western blot 法检测 ECRG4 和 TTR 蛋白的表达

2.3.1 ECRG4 蛋白表达情况 Western blot 方法检测 A、B、C 3 组 ECRG4 蛋白表达。3 组蛋白表达见图 4, 方差分析 3 组 ECRG4 蛋白表达水平的差异, 差异具有统计学意义 ($F=26.291, P=0.001$)。两两比较差异均有统计学意义, 认为 B 组 ECRG4 蛋白表达水平明显高于 A 组及 C 组, C 组 ECRG4 蛋

白表达水平明显高于 A 组,差异具有统计学意义。见表 1。

2.3.2 TTR 蛋白表达情况 Western blot 方法检测 A、B、C 3 组 TTR 蛋白表达。3 组蛋白表达见图 4,方差分析 3 组 TTR 蛋白表达水平的差异,差异具有统计学意义 ($F=13.158, P=0.006$)。两两比较差异均有统计学意义,认为 B 组 TTR 蛋白表达水平明显高于 A 组及 C 组,C 组 TTR 蛋白表达水平明显高于 A 组,差异具有统计学意义。见表 1。

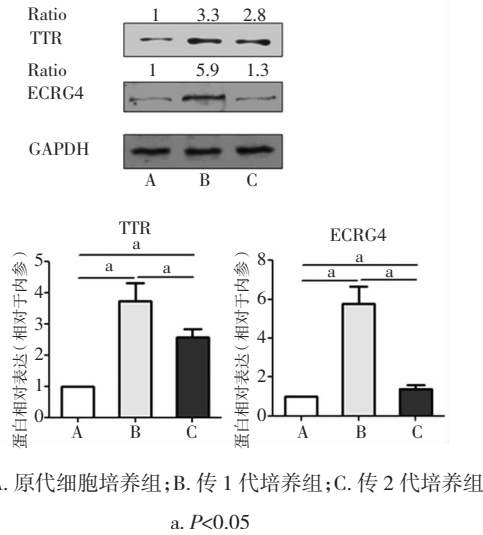


图 4 Western blot 检测 ECRG4 和 TTR 的表达
Fig.4 ECRG4 and TTR protein expression detected by Western blot

表 1 A、B、C 组表达差异

Tab.1 Differential expression in A,B,C groups

指标	ECRG4 基因	TTR 基因	ECRG4 蛋白	TTR 蛋白
A 组	1.000 ± 0.340	1.000 ± 0.130	1.000	1.000
B 组	18.750 ± 2.930	2.931 ± 0.300	5.770 ± 0.870	3.730 ± 0.590
C 组	1.510 ± 0.280	1.700 ± 0.400	1.400 ± 0.210	2.570 ± 0.280
F 值	34.805	10.638	26.291	13.158
P 值	0.000	0.011	0.001	0.006

注:ECRG4 基因:A 组和 B 组比较, $P=0.000$,B 组和 C 组比较, $P=0.000$,A 组和 C 组比较 $P=0.127$;TTR 基因:A 组和 B 组比较, $P=0.004$,B 组和 C 组比较, $P=0.027$,A 组和 C 组比较 $P=0.227$;ECRG4 蛋白:A 组和 B 组比较, $P=0.000$,B 组和 C 组比较, $P=0.000$,A 组和 C 组比较 $P=0.000$;TTR 蛋白:A 组和 B 组比较, $P=0.000$,B 组和 C 组比较, $P=0.000$,A 组和 C 组比较 $P=0.000$

2.4 ELISA 法检测 ECRG4 和 TTR 的表达

2.4.1 ECRG4 泌量 ELISA 方法检测 A、B、C 3 组 ECRG4 的分泌。3 组分泌情况见图 5,方差分析 3 组 ECRG4 蛋白表达水平的差异,差异具有统计学意义 ($F=617.708, P=0.000$)。而两两比较结果显示 A、C 2 组和 B、C 2 组差异均有统计学意义,而 A、B 2 组差异无统计学意义 ($P=0.131$)。认为 B 组高于 A、C 2 组,A 组高于 C 组,差异具有统计学意义。见表 2。

2.4.2 TTR 泌量 ELISA 方法检测 A、B、C 3 组 TTR 的分泌。3 组分泌情况见图 5,方差分析 3 组 TTR 蛋白表达水平的差异,差异具有统计学意义 ($F=32.136, P=0.000$)。而两两比较结果显示差异均有统计学意义,认为 B 组 TTR 泌量高于 A 组和 C 组,A 组 TTR 泌量高于 C 组,差异具有统计学意义。见表 2。

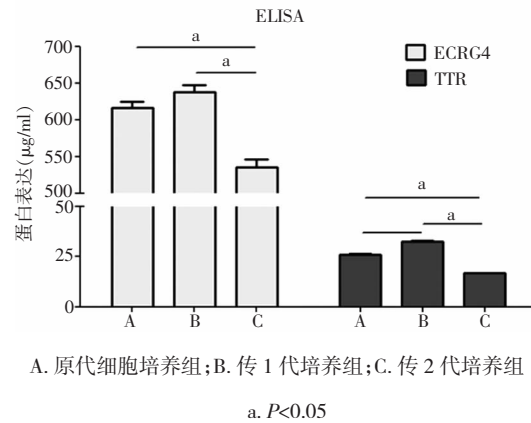


图 5 ELISA 法检测各组细胞中 ECRG4 和 TTR 的分泌情况
Fig.5 Detection of secretion of ECRG4 and TTR protein by ELISA

表 2 A、B、C 组表达差异

Tab.2 Different expression in A,B,C groups

指标	ECRG4	TTR
A 组	616.880 ± 7.850	26.100 ± 0.300
B 组	638.130 ± 9.880	32.640 ± 0.390
C 组	535.380 ± 10.740	16.810 ± 0.260
F 值	617.708	32.136
P 值	0.000	0.000

注:ECRG4:A 组和 B 组比较, $P=0.131$,B 组和 C 组比较, $P=0.000$,A 组和 C 组比较 $P=0.000$;TTR:A 组和 B 组比较, $P=0.000$,B 组和 C 组比较, $P=0.000$,A 组和 C 组比较 $P=0.000$

2.5 MnCl₂ 染毒 24 h 后 ECRG4 和 TTR 的表达

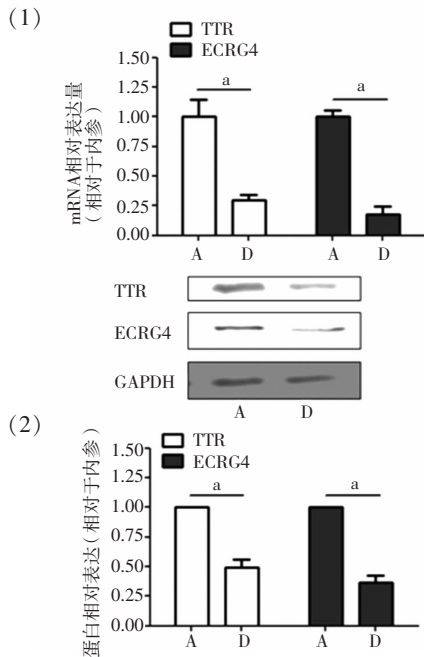
用 MnCl₂ 50 µmol/L 染毒 24 h 后对 A、D 2 组 ECRG4 和 TTR 表达情况进行检测。

2.5.1 ECRG4 mRNA 的表达情况 qRT-PCR 方法检测 A、D 2 组 ECRG4 mRNA 表达见图 6(1)。方差分析 2 组 ECRG4 mRNA 表达水平的差异,差异具有统计学意义 ($F=89.897, P=0.001$),见表 3。

2.5.2 TTR mRNA 的表达情况 qRT-PCR 方法检测 A、D 2 组 TTR mRNA 表达见图 6(1)。方差分析 2 组 TTR mRNA 表达水平的差异,差异具有统计学意义 ($F=20.425, P=0.011$),见表 3。

2.5.3 ECRG4 蛋白表达情况 Western blot 方法检测 A、D 2 组 ECRG4 蛋白表达。2 组蛋白表达见图 6(2),方差分析 2 组 ECRG4 蛋白表达水平的差异,差异具有统计学意义 ($F=130.325, P=0.000$),见表 3。

2.5.4 TTR 蛋白表达情况 Western blot 方法检测 A、D 2 组 TTR 蛋白表达。2 组蛋白表达见图 6(2), 方差分析 2 组 TTR 蛋白表达水平的差异, 差异具有统计学意义 ($F=57.330, P=0.002$), 见表 3。



A. 原代细胞培养组; B. Western blot 检测 ECRG4 和 TTR 的表达; D. 原代培养干预组

a. $P < 0.05$

图 6 qRT-PCR 检测 TTR mRNA 和 ECRG4 mRNA 的表达
Fig.6 Expression of TTR mRNA and ECRG4 mRNA detected by qRT-PCR

表 3 A、D 组表达差异

Tab.3 Differential expression in A,D groups

指标	ECRG4 基因	TTR 基因	ECRG4 蛋白	TTR 蛋白
A 组	1.000 ± 0.060	1.000 ± 0.150	1.000	1.000
D 组	0.170 ± 0.070	0.300 ± 0.040	0.370 ± 0.060	0.490 ± 0.070
F 值	89.897	20.425	130.325	57.330
P 值	0.001	0.011	0.000	0.002

3 讨论

脉络丛分泌的神经营养因子为神经元的生长发育以及轴突的再生提供重要的微环境。脉络丛包含了广泛的参与多种活性物质生成的受体, 经过特异通路传送到固定的脑区, 通过脑脊液的循环对特异的靶细胞产生影响^[7-9]。在体外脉络丛培养实验证实^[10], 脉络丛持续、稳定的分泌神经营养因子和神经保护因子, 阻止细胞的死亡。大鼠的背根神经元与脉络丛细胞联合培养可使神经元的生长能力明显

增加^[11]。Ide 等^[12]证实移植脉络丛存活良好并促进了轴突的修复。另有研究^[13-15]证明在大鼠脑梗死模型中进行脉络丛细胞移植, 其具有分泌神经营养因子和神经生长因子的能力^[16-17], 使大鼠受损的神经功能得到了不同程度的改善。目前对 CPECs 及其生物学特点研究极少, 因此在本课题组前期研究获得的结果基础上, 对其进行更深入的研究。

CPECs 原代培养较为困难, 尤其是在培养过程中易受各种因素的影响, 以往的培养方法存在对 CPECs 损伤大, 极易受其他细胞污染, 纯化过程中 CPECs 易流失且培养周期长等缺点。本实验总结以往 CPECs 的原代培养方法, 从取材动物年龄、取材部位、分离方法、贴壁过程及药物选择等方面予以改进, 成功获得了纯化的 CPECs, 并通过 qRT-PCR、Western blot 和 ELISA 法对 CPECs 特异表达的 TTR 进行检测, 结果证明该纯化方法是成功可行的, 主要体现为对 CPECs 损伤小、细胞纯度高、细胞培养周期短、生物活性好及细胞数量充足等方面, 可满足实验研究工作的需求。

TTR 是脉络丛组织中特异表达的细胞因子, 作为 CPECs 特异性检测指标, 基于实验对于 TTR 的表达结果, 作者考虑与如下因素有关: ①纯化方法是成功可行的, 获得了高纯度的 CPECs。②化学性(药物干预)因素和物理性(机械分离)因素极易对 CPECs 造成损伤, 而这种损伤是不可逆的。虽然本实验在形态学观察中未发现原代纯化和传代细胞有显著的差别, 但是通过酶的消化和机械分离的干预, 对 CPECs 造成损伤, 虽然形态未见明显异常, 但维持其正常生理功能的稳态和生物学活性却遭到破坏, 这可能是传代细胞中 TTR 表达减低的重要原因之一。

ECRG4 最早在食道癌研究中被发现^[18], 脑内正常生理状态下, 在幼年和成年大鼠脉络丛中表达程度最高^[19], 主要由 augurin、arginin、ecilin、CΔ16-augurin、CΔ16-arginin 和 Δ16 peptide 构成^[21]。在脑外伤^[2]的研究中则发现 ECRG4 和 augurin 在脉络丛组织中表达有相应的变化。本实验细胞培养过程中, 尤其是原代培养与纯化之后, 通过 ECRG4 与 TTR 表达相关性比较后可认为 ECRG4 的表达可以反映 CPECs 对于外部损伤的反应能力和程度, 在 MnCl₂ 染毒后相应时间段进行观察, 均导致 CPECs TTR 和 ECRG4 的表达下降, 与 Zheng 和 Zhao 的研究结果^[4]一致, ECRG4 的表达程度与 TTR 相关性表达提示

其可能参与了 CPECs 对损伤的反应过程, ECRG4 的变化程度和趋势或许可以作为脑组织内环境对损伤的应激反应和对外伤预后的判定指标之一, 其分子机制有待进一步的研究。ECRG4 是否参与维持脑组织微环境的稳定, 是否为神经再生和修复的相关因子前体的活性维持提供了载体, 尚待进一步实验研究, 通过其不同组成部分如 *augurin* 等研究, 亦可对 CPECs 基因敲除等研究提供依据。

通过实验可以推断: 脑内微环境的改变对 CPECs 生理功能的影响主要是对其生物活性的破坏; CPECs 可能存在不同的亚型, 其不同的亚型可能具有不同的生物活性物质和受体, 这就可以解释为什么在某些脑出血患者中可以发生不同程度的脑积水, 而有些脑出血患者则不发生; 脑损伤后继发病变可能与调节上皮细胞相关因子的生物活性有关, 本实验观察物理和化学因素对 CPECs 损伤的敏感程度与 ECRG4 的表达有关, ECRG4 客观反映这一变化过程; 早期对脑损伤患者脑脊液中 ECRG4 尤其是对于 ECRG4 下游产物 *augurin* 的研究, 不仅是对脑内环境的检测和判断, 而且是早期给予干预和调控的客观指标, 如何给予调控、使用何种方法进行调控有助于神经功能的恢复, 并改善患者的预后将是未来研究的重点。不同培养阶段的 CPECs 所产生的相关因子不同, 随着研究的深入, 可为 CPECs 移植治疗中枢神经系统疾病奠定研究基础和理论依据。

参 考 文 献

- [1] Dziegilewska KM, Ek J, Habgood MD, et al. Development of the choroid plexus[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(1): 5-20.
- [2] Gonzalez AM, Podvin S, Lin SY, et al. *Ecr4* expression and its product *augurin* in the choroid plexus: impact on fetal brain development, cerebrospinal fluid homeostasis and neuroprogenitor cell response to CNS injury[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2011, 8(1): 6.
- [3] Huang SL, He XJ, Li ZF, et al. A novel primary culture method for rat choroidal epithelial cells[J]. *Neurosciences (Riyadh)*, 2013, 18(1): 27-32.
- [4] Zheng W, Zhao Q. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus[J]. *Brain Res*, 2002, 958(2): 371-380.
- [5] Haselbach M, Wegener J, Decker S, et al. Porcine Choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(1): 137-152.
- [6] Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*[M]. 8th ed. Washington DC: National Academies Press, 2010: 14-15.
- [7] Ferguson IA, Schweitzer JB, Bartlett PF, et al. Receptor-mediated retrograde transport in CNS neurons after intraventricular administration of NGF and growth factors[J]. *J Comp Neurol*, 1991, 313(4): 680-692.
- [8] Agnati LF, Zoli M, Stromberg I, et al. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission[J]. *Neuroscience*, 1995, 69(3): 711-726.
- [9] Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, et al. Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 57(4): 451-484.
- [10] Emerich DF, Schneider P, Bintz B, et al. Aging reduces the neuroprotective capacity, VEGF secretion, and metabolic activity of choroid plexus epithelial cells[J]. *Cell Transplant*, 2007, 16(7): 697-705.
- [11] Chakraborty S, Kitada M, Matsumoto N, et al. Choroid plexus ependymal cells enhance neurite outgrowth from dorsal root ganglion neurons in vitro[J]. *J Neurocytol*, 2000, 29(10): 707-717.
- [12] Ide C, Kitada M, Chakraborty S, et al. Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of rat spinal cord: a preliminary report[J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(2): 242-251.
- [13] Borlongan CV, Elliott RB, Skinner SJ, et al. Intraparenchymal grafts of rat choroid plexus protect against cerebral ischemia in adult rats[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(10): 1543-1547.
- [14] Borlongan CV, Skinner SJ, Geaney M, et al. Intracerebral transplants of porcine choroid plexus provide structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke[J]. *Stroke*, 2004, 35(9): 2206-2210.
- [15] Borlongan CV, Skinner SJ, Geaney M, et al. Neuroprotection by encapsulated choroid plexus in a rodent model of Huntington's disease[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(16): 2521-2525.
- [16] Emerich DF, Vasconcellos AV, Elliott RB, et al. The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(8): 1191-1201.
- [17] Emerich DF, Skinner SJ, Borlongan CV, et al. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain[J]. *Bioessays*, 2005, 27(3): 262-274.
- [18] Su T, Liu H, Lu S. Cloning and identification of cDNA fragments related to human esophageal cancer[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 1998, 20(4): 254-257.
- [19] Magdaleno S, Jensen P, Brumwell CL, et al. BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(4): e86.

(责任编辑: 冉明会)