

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.001

培养大鼠海马脑片模拟痫性发作后 pCREB
在细胞凋亡中的作用的初步研究

何志慧, 蒋 莉, 陈恒胜, 张晓萍

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

【摘要】目的:观察痫性发作对体外培养海马脑片的损伤作用,研究细胞磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(Phosphorylated cAMP response element-binding protein, pCREB)对损伤海马神经元的作用。方法:以培养 11 d 的海马脑片为研究对象,随机分为 3 组:(1)正常对照组:正常海马脑片培养液培养至 14 d。(2)痫性发作模型组:正常海马脑片培养液培养至 14 d,更换为含匹罗卡品(0.5 mmol/L)的完全培养液作用 1 h 后终止培养。(3)抗 pCREB 抗体干预组:用含 pCREB 抗体的海马脑片培养液(pCREB 抗体终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$)预培养 3 d,换为含匹罗卡品(0.5 mmol/L)的完全培养液作用 1 h 后终止培养。采用 TUNEL 原位末端标记法检测各组培养海马脑片凋亡细胞;免疫组化染色观察海马脑片神经元内 pCREB 蛋白的表达变化。结果:(1)痫性发作模型组:海马脑片 CA1 区发生凋亡的细胞(95.44 ± 14.30)显著多于对照组(41.30 ± 9.30) ($P < 0.05$);pCREB 表达(201.36 ± 19.31)较对照组(75.12 ± 13.71)显著升高($P < 0.05$)。(2)抗 pCREB 抗体干预组:海马脑片 CA1 区发生凋亡的细胞(140.88 ± 18.32)较痫性发作模型组显著增多($P < 0.05$);pCREB 表达(172.60 ± 17.68)较对照组显著升高、较模型组显著降低($P < 0.05$)。结论:(1)痫性发作可以增加体外培养海马脑片神经细胞凋亡发生,加重神经元损伤。(2)痫性发作后海马脑片神经细胞 CREB 的磷酸化增强,阻断 CREB 的磷酸化可导致神经细胞凋亡加重。

【关键词】pCREB;海马脑片;痫性发作;凋亡**【中国图书分类法分类号】**R329.28**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-10-24Effect of pCREB on the apoptosis of neurons in cultured hippocampal
slices after seizure-like activity

HE Zhihui, JIANG Li, CHENG Hengsheng, ZHANG Xiaoping

(Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effect of seizure-like activity and pCREB on the neurons in cultured hippocampal slices in vitro. **Methods:** Hippocampal slice cultured for 11 days were randomly divided into 3 groups: (1) control group: cultured hippocampal slices were exposed to regular media to 14 d. (2) seizure-like activity model group: cultured hippocampal slices were exposed to regular media to 14 d, then returned to regular media with pilocarpine (final concentration: 5 mmol/L) for another 1 h. (3) anti-pCREB antibody treated group: cultured hippocampal slices were pre-cultured with regular media with anti-pCREB antibody (final concentration: 5 $\mu\text{g/ml}$) to 14 d, then returned to regular media with pilocarpine (final concentration: 5 mmol/L) for another 1 h. The apoptosis neurons of cultured hippocampal slices was detected by terminal deoxynucleotidyl dUTP nick end-labeling (TUNEL) staining in situ. Expression of pCREB protein in the neurons of cultured hippocampal slices was detected by immunocytochemistry. **Results:** (1) Seizure-like activity model group: the number of apoptotic neurons in CA1 of cultured hippocampal slices was (95.44 ± 14.30) significantly increased compared with that of (41.30 ± 9.30) in the control group ($P < 0.05$). The expressions of pCREB in neurons in CA1 of cultured hippocampal slices were (201.36 ± 19.31), remarkably up-regulated compared with those of (75.12 ± 13.71) in the control group ($P < 0.05$). (2) Anti-pCREB antibody treated group: the number with of apoptotic of neurons in CA1 of cultured hippocampal slices was (140.88 ± 18.32) significantly increased compared with that in the seizure-like activity model group ($P < 0.05$). The expressions of pCREB were (172.60 ± 17.68) remarkably up-regulated compared with those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** (1) Seizure-like activity can induce neuronal apoptosis and aggravate neuronal injury in cultured hippocampal slices. (2) Seizure-like activity

can up-regulate the level of CREB phosphorylation to cultured hippocampal slice, and blocking CREB phosphorylation may lead to neuronal cell apoptosis accentuation.

【Key words】pCREB; hippocampal slice; seizure-like activity; apoptosis

作者介绍:何志慧(1974-),女,副主任医师,博士,
研究方向:神经内科。现工作单位:重庆市第九
人民医院。

通信作者:蒋 莉,女,教授,Email:dr_jiangli@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672217)。

cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 是一种真核生物细胞核内蛋白质, 它的功能是调节基因转录, 因此被称为调节转录的核因子, CREB 激活后 (pCREB) 可参予到机体对外界刺激的反应中去^[1,2]。国内外有研究表明在大鼠惊厥模型中, 严重惊厥发作将导致以海马 CA1、CA3 区为主的神元凋亡发生^[3-6]; 而阻断 CREB 的磷酸化过程, 可以导致海马细胞凋亡发生率增加^[7]。为了避免在体实验诸多因素的干扰, 本文以体外培养的大鼠海马脑片为研究对象, 建立痫性发作模型, 在完整的海马组织层面上对惊厥性脑损伤及 pCREB 的作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂

新生 6~9 d 的 Wistar 鼠由重庆医科大学实验动物中心提供, 雌雄不限。BME 培养基、B27、L-glutamine 购自美国 GIBCOBRL 公司, 兔抗大鼠 pCREB 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 小鼠抗兔二抗购自武汉博士德公司, TUNEL 检测试剂盒购自 Roche 公司。插入式微孔滤膜 (0.4 μm 孔径、3 cm 直径) 为 Millipore 公司产品。

1.2 海马脑片培养

取新生 6~9 d Wistar 鼠, 用 75% 乙醇浸泡消毒后, 无菌条件下断头取脑, 迅速置于含糖 (7.5 mg/ml) 的 4 $^{\circ}\text{C}$ 汉克氏平衡盐溶液 (Hanks' balanced salt solution, HBSS) 中, 分离出完整的海马 (海马是相对独立完整的组织, 与周围脑组织分界清楚), 放入无菌的 3% 琼脂块凹槽中, 再放置于振动切片机的载物平台上, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ HBSS 液中以 400 μm 厚度进行切片 (垂直于隔颞轴)。6 孔培养板内各加入 1.3 ml 的海马脑片培养液, 然后放入插入式微孔滤膜, 并于培养脑片前 1 h 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中以调节培养基的酸碱度。将完好的海马脑片分放在各孔内的滤膜上, 每孔 8 张, 移去膜表面多余的液体。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、平衡湿度的标准培养箱内培养, 第 2 天换液 1 次, 后为每周更换培养液 2 次, 每次换液 1.2 ml。培养液成分为: 50% Eagle 氏基础培养基 (Basal medium eagle, BME), 25% HBSS, 24% 马血清, 50 U/ml 青-链霉素, 1 mmol/L 谷氨酰胺, 7.5 mg/ml 葡萄糖, pH 7.2, 临用时加入 B27 添加剂 (1:50 体积比稀释)。

1.3 培养海马脑片痫性发作模型的建立^[8,9]

取培养 14 d 的海马脑片, 更换培养液为含匹罗卡品 (终浓度 0.5 mmol/L) 的完全培养液, 作用 1 h 后终止培养, 即用 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) 固定脑片。

1.4 实验分组

采用培养 11 d 的海马脑片随机分为 3 组, 每组 5 孔。

(1) 对照组: 正常海马脑片培养液培养至 14 d。

(2) 痫性发作模型组: 正常海马脑片培养液培养至 14 d, 更换为含匹罗卡品 (终浓度 0.5 mmol/L) 的完全培养液作用 1 h 后终止培养。

(3) 抗 pCREB 抗体干预组: 用含 pCREB 抗体的海马脑片培养液 (pCREB 抗体终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$) 预培养 3 d, 换为含匹罗卡品 (终浓度 0.5 mmol/L) 的完全培养液作用 1 h 后终止培养。

1.5 培养海马脑片 TUNEL 染色原位检测凋亡细胞

各组海马脑片终止培养时用 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) 固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 然后将脑片换入 30% 蔗糖溶液 (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) 中, 至脑片沉底后行冰冻连续冠状切片, 片厚 20 μm , 裱于用多聚赖氨酸处理过的玻片上, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 行凋亡细胞检测。具体步骤为: PBS (0.01 mol/L) 漂洗 5 min \times 3 次, 复合消化液室温下处理 2 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 在冰上用含 0.1% TritonX-100 的 0.1% 枸橼酸钠溶液中透化处理 2 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 室温下用 3% H_2O_2 浸泡玻片 20 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 加 20 μl TUNEL 反应混合液 (酶溶液与标记液按 1:9 混合) 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 中性甘油封片后进行荧光观察并照像, PBS 漂洗 5 min \times 1 次, 加 20 μl Converter-POD, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, DAB 显色 3~10 min, 镜下控制反应时间, 蒸馏水漂洗中止反应, 苏木素复染, 室温干燥后, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。阴性对照片用标记液代替 TUNEL 反应混合液, 其余步骤不变。

以细胞核内出现荧光染色或者棕黄色颗粒为阳性表达神经元。每孔取 2 张切片, 每组共 10 张切片, 400 倍视野下于每张切片的 CA1 区随机取 5 个视野, 计数每个视野内的阳性表达细胞。荧光图片计数得出凋亡细胞数, 组化复染图片计数得出凋亡细胞率 (阳性细胞数/全部细胞数)。

1.6 培养海马脑片神经元 pCREB 蛋白表达检测

培养海马脑片在各时点用 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) 固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 然后将脑片换入 30% 蔗糖溶液 (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) 中, 至脑片沉底后行冰冻连续冠状切片, 片厚 20 μm , 裱于用多聚赖氨酸处理过的玻片上, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 行免疫组化。其主要步骤为: PBS (0.01 mol/L) 漂洗 5 min \times 3 次, 3% H_2O_2 去离子水室温下处理 20 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 枸橼酸液中微波煮沸修复抗原 5 min 后自然冷却, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 加入 5% BSA 室温下处理 30 min, 甩去多余液体, 加入兔抗大鼠 pCREB 一抗 (1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 加入生物素化单克隆小鼠抗兔二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 加入 SABC 液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min, PBS 漂洗 5 min \times 3 次, DAB 显色 3~10 min, 镜下控制反应时间, 蒸馏水漂洗中止反应。室温干燥后, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。阴性对照用 BSA 代替一抗, 其余步骤不变。

以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达神经元, 其中每孔取 2 张切片, 每组共 10 张切片, 400 倍视野下于每张切片的 CA1 区随机取 5 个视野, 在图像分析仪上进行图像分析, 测量每个视野内的阳性表达细胞数。

1.7 统计方法

采用 SPSS15.0 统计软件对实验数据进行统计处理。计量资料均值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。由于凋亡细胞数各组间方差不齐, 多组间比较单因素方差分析检验 (经 Brown-Forsythe 法修正), 均值间两两比较采用 Dunnett's C

检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 培养海马脑片凋亡细胞原位测定

经 TUNEL 染色发现,正常状态下,海马脑片 CA1 区存在少量凋亡细胞。予以匹罗卡品作用后,凋亡细胞增多。各组凋亡细胞数、凋亡细胞率比较见表 1 及图 1。

2.2 培养海马脑片神经元阳性表达 pCREB 蛋白细胞数测定

免疫组化染色显示 pCREB 在神经元胞核内表达,正常状态下,海马脑片 CA1 区存在少量 pCREB 阳性细胞表达。在给予匹罗卡品作用后,各组阳性细胞增多。痫性发作模型组、抗 pCREB 抗体干预组神经元内 pCREB 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。抗 pCREB 抗体干预组神经元内 pCREB 表达显著低于痫性发作模型组 ($P < 0.05$)。各组阳性细胞数比较见表 1 及图 2。

3 讨 论

1986 年 Montminy MR 等在脑啡肽原、烯醇丙、酮酸磷酸羧激酶基因的 5 端转录调节区内,发现 1 段 cAMP 应答序列,这是 1 个 30 bp 左右的 DNA 片段,为许多基因的转录诱导所必需。通过足迹法检测,发现这种蛋白质特异地和 CRE 结合,于是将它命名为 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein),缩写为 CREB。CREB 作为核内第三信使之一,应激性刺激后,在协同激活剂的诱导下,其丝氨酸 133 位磷酸化而激活转录^[10]。CREB 激活后 (pCREB) 可以增强机体对外界刺激的应对能力^[11],可通过调控 NTFs 和即刻早期基因产物 (bcl-2、c-fos 等) 的表达,从而发挥重要的生理作用^[12,13]。

表 1 不同实验条件对培养大鼠海马脑片 CA1 区细胞凋亡及 pCREB 表达的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of different experimental condition on the apoptosis of neurons in CA1 area of cultured rat hippocampal slices and the expression of pCREB ($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数(个)	凋亡细胞数(个)	凋亡细胞率(%)	pCREB 阳性细胞(个)
对照组	50	41.300 0 \pm 9.302 73	12.550 0 \pm 1.946 14	75.120 0 \pm 13.713 75
痫性发作模型组	50	95.440 0 \pm 14.300 22 [▲]	41.020 4 \pm 3.504 44 [▲]	201.360 0 \pm 19.306 08 [▲]
抗 pCREB 抗体干预组	50	140.880 0 \pm 18.316 54 ^{▲★}	68.399 4 \pm 2.605 97 ^{▲★}	172.600 0 \pm 17.675 07 ^{▲★}
F 值(渐近 F 分布)		595.025	5 117.451	752.005

注:▲,与对照组比较, $P < 0.05$;★,与模型组比较, $P < 0.05$

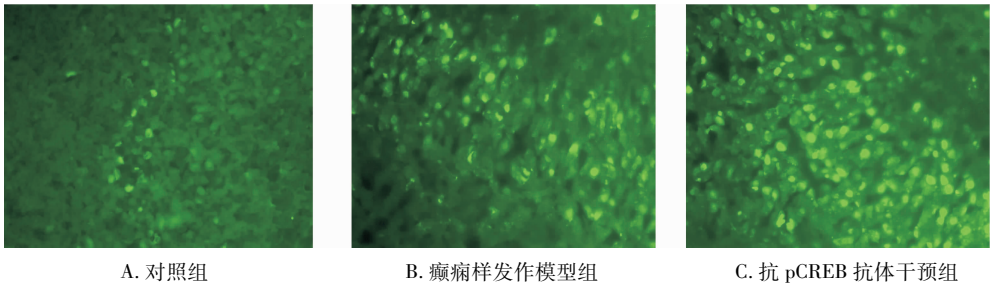


图 1 不同处理组培养大鼠海马脑片 CA1 区凋亡细胞表达 (DAB,400 ×)

Fig.1 Expressing of apoptotic neurons in CA1 of cultured rat hippocampal slices in different groups (DAB,400 ×)

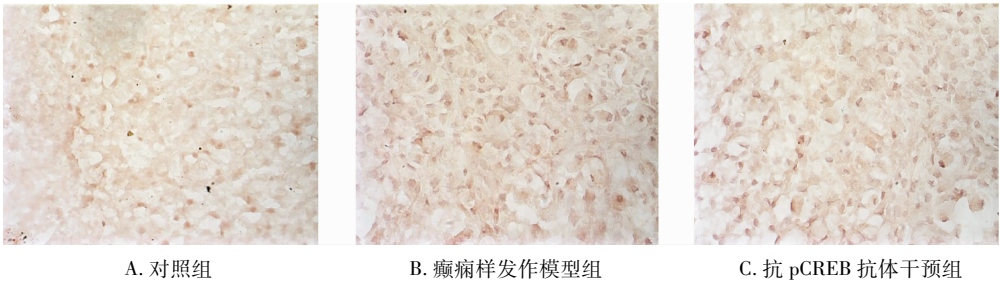


图 2 不同处理组培养大鼠海马脑片 CA1 区 pCREB 表达 (DAB,400 ×)

Fig.2 Expression of pCREB in neurons in CA1 of cultured rat hippocampal slices in different groups (DAB,400 ×)

本课题组前期在体研究表明:严重惊厥发作将导致以海马 CA1、CA3 区为主的选择性脑损伤,而这种脑损伤主要表现为神经元死亡,其中包括神经元凋亡过程^[5,6];大鼠对惊厥的应激反应涉及细胞 CREB 的磷酸化过程,而经一侧侧脑室注射抗 pCREB 抗体,可以导致该侧海马细胞凋亡发生率的增加^[7]。Kim BW 等发现 pCREB 在一定时间窗内有减少凋亡和促进未成熟海马细胞功能完善的作用^[14]。Chun H 以及 Li N 等发现 pCREB 在脑损伤过程中也参与了保护神经元、减轻神经细胞凋亡的信号传导过程^[15,16]。但由于体内实验往往受到较多因素的干扰,故本文以单一痫性放电的神经毒性作用及 pCREB 在神经元凋亡中的作用为研究内容,在已建立体外长期稳定的海马脑片培养技术的基础上^[17],以体外培养的大鼠海马脑片为研究对象,用节后拟胆碱药匹罗卡品加入培养液中制作培养海马脑片的痫性发作模型,采用免疫组化染色观察各组脑片 pCREB 的表达,用 TUNEL 染色法对各组培养海马脑片凋亡神经元进行了检测。由于海马脑片 CA1 区对外界损伤最为敏感^[18,19],故分别在荧光显微镜和普通光学显微镜下对各组培养海马脑片 CA1 区的凋亡细胞作了荧光计数和凋亡细胞率的统计比较,并在图像分析仪上对 CA1 区的 pCREB 的阳性表达细胞作了测定和统计比较。结果显示,正常培养脑片即存在少量凋亡细胞,可能与脑片培养过程中的细胞自我新陈代谢有关。而无论是以荧光计数还是凋亡细胞率比较,痫性放电组的凋亡神经元均较正常对照组显著增多;痫性发作引起了海马脑片神经元 pCREB 表达显著增加;给予外源性抗 pCREB 抗体干预则引起了海马细胞凋亡发生率显著增加。本研究的结果表明,痫性发作能够加重海马脑片组织中神经元凋亡,而阻断 CREB 的磷酸化可导致海马脑片组织中神经细胞凋亡加重。因此,无论是在体、还是体外培养海马脑片实验,本组研究结论是一致的:(1)痫性发作可以增加神经细胞凋亡发生,加重神经元损伤。(2)痫性发作后神经细胞 CREB 的磷酸化增强,阻断 CREB 的磷酸化可导致神经细胞凋亡加重。

痫性发作是由于大脑神经元异常放电引起脑功能紊乱^[20]。由于凋亡是一个可控制的细胞主动死亡方式,即为采取干预措施激活神经元保护机制、选择性阻断神经元凋亡发生的关键环节提供了新的思路。鉴于 pCREB 在细胞凋亡中的保护作用,能否通过促进 CREB 磷酸化从而达到有效减轻惊厥后神经元凋亡和坏死发生的目的,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mastrangelo L, Kim J E, Miyahara A, et al. Purinergic signaling in human pluripotent stem cells is regulated by the housekeeping gene encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(9):3377-3382.
- [2] Ljungberg M C, Ali Y O, Zhu J, et al. CREB-activity and nmnat2 transcription are down-regulated prior to neurodegeneration, while NMNAT2 over-expression is neuroprotective, in a mouse model of human tauopathy [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(2):251-267.
- [3] Szyndler J, Wierzbica T, Skorzewska A, et al. Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 81(1):15-23.
- [4] Weise J, Engelhorn T, Dorfler A, et al. Expression time course and spatial distribution of activated caspase-3 after experimental status epilepticus; contribution of delayed neuronal cell death to seizure-induced neuronal injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(3):582-590.
- [5] 蒋莉, 蔡方成, 李欣, 等. 惊厥持续状态中大鼠脑内神经元死亡的年龄特征 [J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(9):545-549.
- [6] Jiang L, Cai F C, Li X, et al. The age-dependent features of brain selective neuron death during status convulsivus [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2002, 40(9):545-549.
- [7] 胡越, 蒋莉, 李欣, 等. 持续惊厥后影响海马神经神经元凋亡的相关因素 [J]. *中华神经科杂志*, 2006, 39(1):36-38.
- [8] Hu Y, Jiang L, Li X, et al. Correlative factors of neuronal apoptosis in hippocampus after status convulsion [J]. *Chinese Journal of Neurology*, 2006, 39(1):36-38.
- [9] 胡越, 蒋莉, 李欣. 脑源性神经营养因子对大鼠惊厥性脑损伤的作用及调控因素 [J]. *中国循证儿科杂志*, 2008, 3(3):208-212.
- [10] Hu Y, Jiang L, Li X. Action of brain-derived neurotrophic factor on brain damage induced by status convulsion in rats [J]. *Chinese Journal of Evidence-Based Pediatrics*, 2008, 3(3):208-212.
- [11] Poulsen F R, Jahnsen H, Blaabjerg M, et al. Pilocarpine-induced seizure-like activity with increased BDNF and neuropeptide Y expression in organotypic hippocampal slice cultures [J]. *Brain Research*, 2002, 950(1-2):103-118.
- [12] Poulsen F R, Lauterborn J, Zimmer J, et al. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine induced seizure like activity is related to mode of Ca^{2+} entry [J]. *Neuroscience*, 2004, 126:665-676.
- [13] Lee B, Butcher G Q, Hoyt K R, et al. Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB); kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133 [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2005, 25(5):1137-1148.
- [14] Moncada D, Viola H. Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus; A molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2006, 86(1):9-18.
- [15] Lin W Y, Chang Y C, Lee H T. CREB activation in the rapid, intermediate, and delayed ischemic preconditioning against hypoxic-ischemia in neonatal rat [J]. *J Neurochem*, 2009, 108(4):847-859.
- [16] Henriksen U, Fog J, Loechel F. Profiling of multiple signal pathway activities by multiplexing antibody and GFP-based translocation assays [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(7):537-544.
- [17] Kim B W, Yang S, Lee C H, et al. A critical time window for the

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.002

PARG 基因沉默对肿瘤局部 B220⁺ DEC205⁺ DC 的影响

王洁琼,王娅兰,杨 怡,盛永涛

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose) glycohydrolase, PARG]基因沉默对肿瘤局部 B220⁺ DEC205⁺ DC 增殖分化的影响及其在大肠癌转移中的作用。方法:以 PARG-shRNA 慢病毒载体转染 CT26 细胞为实验组,未转染 CT26 细胞和空载体 CT26 细胞为对照组,分别在小鼠脾包膜下接种形成肝转移模型;Western blot 法检测脾脏移植瘤中 PARG、PARP、NF- κ B 蛋白的表达;免疫荧光双标法检测脾脏中 B220⁺ DEC205⁺ DC 的表达;ELISA 法检测各组小鼠血清中 IL-10、TGF- β 的表达。结果:PARG 基因沉默后,脾脏移植瘤体积缩小,肝脏转移癌结节数目减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);脾脏移植瘤中 PARG、PARP、NF- κ B 蛋白的表达量明显较对照组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);脾脏组织中的 B220⁺ DEC205⁺ DC 较对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清中 IL-10、TGF- β 的表达较对照组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:PARG 基因沉默可抑制小鼠结肠癌 CT26 细胞肝转移,可能与 PARG 沉默后下调 PARP,并下调 NF- κ B 的活性,从而影响 NF- κ B 依赖性因子 IL-10、TGF- β 的表达,进而影响 B220⁺ DEC205⁺ DC 的增殖分化有关。

【关键词】聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶;B220⁺ DEC205⁺ DC;大肠癌;免疫机能

【中国图书分类法分类号】R735.3⁺4

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-09-26

Effect of silencing PARG on proliferation and differentiation of local B220⁺ DEC205⁺ DC

WANG Jieqiong, WANG Yalan, YANG Yi, SHENG Yongtao

(Department of Pathology, College of Basic Medicine, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of silencing PARG on the proliferation and differentiation of tumor local B220⁺ DEC205⁺ DC and its role in colon carcinoma metastasis. **Methods:** Experiment group was established by transfecting lentivirus Poly(ADP-ribose) glycohydrolase-short hairpin RNA (PARG-shRNA) into mouse colon carcinoma CT26 cells and control group by enrolling CT26 cells without any treatment and CT26 cells with empty vector. Liver metastasis model of colon carcinoma was established by splenic subcapsular inoculation. The expressions of PARG, PARP and NF- κ B proteins in splenic carcinoma were detected by Western blot and those of B220⁺ DEC205⁺ DC in the spleen by immunofluorescence double labeling assay. The levels of IL-10 and TGF- β in the serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The size of splenic carcinoma and the number of metastatic liver nodules in experiment group were smaller and

作者介绍:王洁琼(1980-),女,硕士,

研究方向:大肠癌浸润转移机制。

通信作者:王娅兰,女,教授,Email:wangyalan074@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30870946)。

survival of neural progenitor cells by HDAC inhibitors in the hippocampus [J]. Mol Cells, 2011, 31(2):159-164.

[15] Chun H, Hao W, Honghai Z, et al. CCL3L1 prevents gp120-induced neuron death via the CREB cell signaling pathway [J]. Brain Res, 2009, 1257:75-88.

[16] Li N, Liu G T. The novel squamosamide derivative FLZ enhances BDNF/TrkB/CREB signaling and inhibits neuronal apoptosis in APP/PS1 mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(3):265-272.

[17] 何志慧,蒋 莉,陈恒胜,等. 离体培养大鼠海马脑片的形态学与细胞反应性研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(5):513-516.

He Z H, Jiang L, Chen H S, et al. A study for morphology and the reactivity of rats hippocampal slice in vitro culture [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2008, 33(5):513-516.

[18] Noer H, Kristensen B W, Noraberg J, et al. 3-Nitropropionic acid neurotoxicity in hippocampal slice cultures: developmental and regional vulnerability and dependency on glucose [J]. Exp Neurol, 2002, 176(1):237-246.

[19] Bonde C, Noraberg J, Noer H, et al. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures [J]. Neuroscience, 2005, 136(3):779-794.

[20] 杨锡强, 易著文. 儿科学 [M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2004:446.

Yang X Q, Yi Z W. Paediatrics [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004:446.

(责任编辑:关蕴良)