

糖尿病小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中脑周细胞的变化

谈启松¹, 陈二峰¹, 卞尔保¹, 马春春¹, 熊志刚², 赵兵¹

摘要 目的 探讨糖尿病高血糖状态下局灶性脑缺血再灌注损伤中脑周细胞的变化特点。方法 采用四氧嘧啶一次性腹腔注射制备 1 型糖尿病高血糖 C57BL/6 小鼠模型,以线栓法为基础使大脑中动脉缺血建立局灶性脑缺血再灌注小鼠模型,使用行为学、组织化学、qRT-PCR 及 Western blot 等方法,对比观察假手术组(空白对照组)、正常血糖脑缺血再灌注组(缺血组)、糖尿病高血糖脑缺血再灌注组(高糖并缺血组)大脑皮质周细胞数量变化和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的相对表达情况。结果 免疫组化及 TTC 染色显示,与空白对照组比较,缺血组缺血 1 h 再灌注 24 h 后脑组织中 α -SMA 阳性细胞数量明显增多,梗死脑组织水肿明显($P < 0.05$);高糖并缺血组再灌注 24 h, α -SMA 阳性细胞数目较同期缺血组更多,梗死区域水肿极严重($P < 0.05$);qRT-PCR 和 Western blot 分别显示高糖并缺血组 α -SMA 蛋白对应基因、 α -SMA 蛋白的相对表达量均高于缺血组($P < 0.05$)。结论 糖尿病高血糖与缺血再灌注两种损伤机制同时作用于脑组织时,使脑组织损伤更严重,损伤区域 α -SMA 的表达增强,周细胞数量明显增加。

关键词 脑缺血再灌注;高血糖;周细胞; α -平滑肌肌动蛋白中图分类号 R 743

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1627-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.010

周细胞是血管神经单元的重要组成部分之一,广泛分布于全身各组织如脑、心脏、眼睛等的微血管和毛细血管壁而被微血管基底膜包被,位于内皮细胞外,其具有多种功能并在脑部参与血脑屏障功能的维持^[1-2]。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是微丝的线性结构蛋白,是构成周细胞的重要纤维成分,能作为周细胞可靠的标记分子^[3-4]。脑缺血时周细胞可发生启动激活、迁移增强、数量增多、凋亡、免疫炎性损伤和血管生成等改变^[5]。文献^[6]报道,糖尿病高血糖患者发生脑缺血

后比血糖正常的脑缺血患者梗死面积更大,感觉、运动功能障碍更明显,预后也更差。糖尿病小鼠局灶性脑缺血模型中,胶质纤维酸性蛋白(GFAP(神经胶质细胞特有标记分子)表达增强,星形胶质细胞数量明显增加^[7]。周细胞与星形胶质细胞同时存在于脑组织中,但周细胞在高血糖和缺血再灌注同时存在时如何变化的相关研究尚未有报道。该研究采用四氧嘧啶(alloxan, ALX)一次性腹腔注射制备 1 型糖尿病高血糖 C57BL/6 小鼠模型^[8],通过大脑中动脉缺血模型建立局灶性脑缺血再灌注小鼠模型^[9],以观察两种损伤机制同时存在时周细胞的组织形态学、数量变化和 α -SMA 的相对表达情况。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 清洁级成年雄性 C57BL/6 小鼠 45 只,体重 18 ~ 25 g,购自安徽医科大学实验动物中心;水合氯醛购自中国上海白鹤化工厂;ALX、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyl-tetrazolium chloride, TTC)购自美国 Sigma 公司;XTL-2400 连续变倍显微镜购自上海精密仪器仪表有限公司;小鼠抗 α -SMA 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;20 μ l 的反应体系(10 μ l 2 \times SYBR Green PCR Master Mix)购自美国 ABI 公司;羊抗小鼠 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔抗羊 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Syngene Bio Imaging 检测系统购自英国 SYNGENE 公司;7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 随机分组将 45 只小鼠分为假手术组(空白对照组)、正常血糖脑缺血再灌注组(缺血组)、糖尿病高血糖脑缺血再灌注组(高糖并缺血组),每小组各 15 只,其中,有缺血处理因素(即高糖并缺血组和缺血组)的小鼠缺血时间为 1 h,再灌注时间 24 h,各个分组中 6 只用于备做 TTC 染色及梗死体积测定、免疫组织化学染色及检测,另外 9 只用于提取脑组织蛋白做 Western blot 研究,提取 mRNA 做 qRT-PCR 分析(注:具体分配视情况而定)。

1.2.2 糖尿病模型制备 在高糖并缺血组小鼠制

2017-07-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31540021)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院神经外科,合肥 230601

²安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:谈启松,男,硕士研究生;

赵兵,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhaopumcmd@yeah.net

备糖尿病模型阶段,注射药物前禁食不禁水 12 h,按体质量给予 185 mg/kg ALX(以 0.1 mol/L、pH 4.0 柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液临时配制成 2% 浓度)腹腔注射一次,注药速度不宜太慢;缺血组和空白对照组一次性腹腔内注射等量生理盐水,各组小鼠 3 d 后断尾取血(取血前禁食不禁水 12 h),测得各小鼠空腹血糖值(fasting blood glucose, FGB), $FGB \geq 11.1$ mmol/L 视为造糖尿病模型成功^[8]。

1.2.3 脑缺血再灌注模型制备 以 Koizumi 法为基础制备脑缺血模型,每组小鼠用 3.5% 水合氯醛(0.08 ml/10 g)做腹腔注射麻醉后,小鼠呼吸变浅慢、四肢瘫软并对疼痛刺激反应迟钝,表示麻醉效果良好,将小鼠仰卧固定于显微手术台上,胶带固定小鼠四肢,颈部皮肤以 75% 酒精消毒 3 遍,沿颈部正中作一“1”形长约 1.5 cm 切口,然后钝性分离皮下组织、肌肉及下颌腺体等,在显微镜下可以看到颈总动脉位于气管旁的颈动脉鞘内且搏动有力,充分暴露、分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA) 结扎 ECA 与 ICA 交汇处的 ECA 近心端和远心端,离断 ECA,可以清楚看见 ECA 深部的 ICA,绕 ICA 穿线打一活结阻断来自 ICA 上方的血流。绕 CCA 穿两根线,近心端结扎,远心端不打结,在两根线之间的 CCA 正中处剪一小口,插入头端包裹硅橡胶的 0.104 mm 栓线(酒精并紫外线消毒后风干),解开 ICA 上活结,缓慢向 ICA 靠内、上、后方插入一直到稍感有阻力为止,栓线进深距 CCA 分叉处约 10.0 mm^[9] 将大脑中动脉阻塞,结扎 CCA 远心端并固定栓线,插线完成即开始记录缺血时间,缝合皮肤,栓线末端留在皮肤外。缺血 1 h 后拔除栓线以实现再灌注,缝合伤口。空白对照组只做分离和暴露颈部血管而不做任何其他干预并缝合皮肤,待小鼠清醒后进行 Longa 生物行为 5 分制评分,1~3 分视为成功模型。再灌注 24 h 的小鼠模型在麻醉状态下迅速开颅取脑。

1.2.4 Longa 生物学评分 0 分:无任何神经损伤症状;1 分:提起小鼠尾巴时,出现左前肢内收;2 分:爬行时向左侧转圈,出现追尾动作;3 分:身体不稳并向病灶左侧倾倒,打滚、动作缓慢;4 分:不能行走或昏迷^[9]。其中 1~2 分视为轻度脑缺血,3 分为中度脑缺血,4 分为重度脑缺血。0 分缺损极轻,4 分缺损极重,在 TTC 染色、免疫组化、qRT-PCR 和 Western blot 实验中均需剔除,而 1~3 分纳入实验标准。

1.2.5 TTC 染色 所取脑组织置于 -20°C 速冻 20 min,以 2 mm 厚度做冠状切片,放入现配的 2% TTC (PBS 磷酸缓冲液作为溶媒)中,于 37°C 恒温水浴箱中严格密封、避光染色 30 min,每隔 10 min 翻动脑片 1 次使之均匀接触染料,TTC 染剂可以使正常脑组织染成红褐色,缺血梗死灶出现苍白色,染色结束将脑片放于 4% 多聚甲醛中固定 2 h 取出,整齐摆放于蓝色背景下并拍照,利用 Image J 图像分析软件计算出梗死灶体积占整个大脑体积百分比。

1.2.6 免疫组织化学染色 所取脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋后制备 5 mm 厚石蜡切片,按照免疫组化常规步骤脱蜡水化、高压修复,遵照试剂说明书精细准确操作,牛血清稀释液稀释的抗 α -SMA 抗体孵育 4°C 过夜,置于稀释后的二抗中并室温下孵育 2 h,显色剂中显色、中性树脂封片,组织切片置于显微镜 200 倍视野下观察,胞质显示棕黄色为 α -SMA 标记阳性细胞(即周细胞)。每张切片更换视野后拍摄照片数张,结果见图。

1.2.7 qRT-PCR 分析 取各组小鼠右侧大脑组织,按照常规提取 RNA,步骤如下:加入 TRIzol 试剂充分研磨、低温离心、氯仿抽提、75% 酒精洗涤、DEPC 水溶解、RNA 定量、稀释、逆转录成 cDNA,加入 α -SMA 引物及 SYBR 后采用 7500 型荧光定量 PCR 仪检测各组中 α -SMA 蛋白对应基因的相对表达情况。

1.2.8 Western blot 取各组小鼠右侧大脑组织,加入 PMSF 细胞裂解液和 RIPA 混合液充分研磨,按照常规提取总蛋白步骤提取:离心、取蛋白、煮沸,得到各组标本的总蛋白后采用 Bradford 法进行蛋白定量。按顺序制备 SDS-PAGE 凝胶(分离胶 10%,浓缩胶 5%),按上样量 30 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 上样电泳(80 V, 40 min; 120 V, 60 min),硝酸纤维素膜湿转(200 mA, 60 min),封闭液(含 10% 脱脂牛奶 TBST 封闭缓冲液)室温封闭 1 h, α -SMA 抗体(大鼠抗小鼠, 1:500) 4°C 过夜, β -actin(大鼠抗小鼠, 1:1000) 4°C 过夜,辣根酶标记的 IgG(羊抗大鼠, 1:10000) 室温 2 h,在暗室曝光显色,采用 Syngene Bio Imaging 检测系统检测各组中 α -SMA 蛋白的相对表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单样本配对比较和两独立样本均数比较采用 t 检验,组间比较用单因素方差分析,各实验组间的两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表1 腹腔注射 ALX 后 3 d 各组小鼠 FGB 及注药前后体重变化情况

组别	数量(只)	造模后血糖值 FGB	注药后 3 d 体重	成模数量	成模率	造模死亡率
		(mmol/L)	- 注药前体重(g)	(只)	(%)	(%)
高糖并缺血	15	18.39 ± 1.77	- 3.11 ± 2.04	10	66.7	20.0
空白对照	30	5.89 ± 1.72	0.14 ± 0.08	0	0	0

图1 各组小鼠脑组织切片 TTC 染色结果
A: 空白对照组; B: 缺血组; C: 高糖并缺血组

2.1 腹腔注射 ALX 后 3 d 各组小鼠 FGB 及注药前后体重变化情况 腹腔注射 ALX 或等量生理盐水后 3 d 各组小鼠 FGB 以 $\bar{x} \pm s$ 表示并计算成模率、死亡率以及注射 ALX 或生理盐水前、后 3 d 体重改变值。结果表明空白对照组注射生理盐水后体重不减轻且有增重趋势, 差异有统计学意义 ($t = 9.424$, $P < 0.05$); 高糖并缺血组注射 ALX 后体重减轻, 差异有统计学意义 ($t = 4.672$, $P < 0.05$)。见表 1。

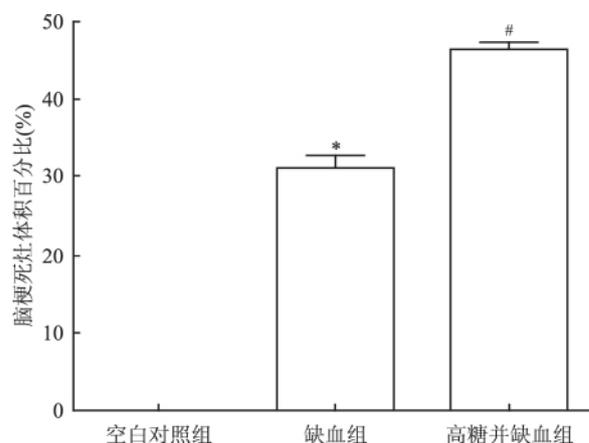
2.2 小鼠脑缺血 1 h 再灌注 24 h 后 Longa 评分情况 小鼠脑缺血 1 h 再灌注 24 h 后行 Longa 生物学评分, 评估其神经功能缺损情况。结果表明高糖并缺血组小鼠神经功能缺损评分高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($t = 12.244$, $P < 0.05$); 高糖并缺血组小鼠神经功能缺损评分高于缺血组, 差异有统计学意义 ($t = 4.121$, $P < 0.05$)。

2.3 TTC 染色后各组小鼠脑切片缺血梗死灶比较

2.3.1 TTC 染色情况 空白对照组小鼠脑组织全部红染, 无梗死灶, 双侧大脑形态对称(图 1A)。缺血组小鼠脑组织右侧脑皮质区及纹状体部分区域呈现出苍白色, 提示非完全梗死, 水肿严重(图 1B)。高糖并缺血组小鼠脑组织右侧大脑半球大部分出现苍白色梗死灶并深入皮质区、纹状体及海马等区域, 两侧大脑半球形态不对称, 质地不均, 水肿极严重(图 1C)。

2.3.2 小鼠脑缺血梗死灶体积百分比分布情况 缺血组和高糖并缺血组梗死灶体积百分比分别为 $(30.06 \pm 1.94)\%$ 、 $(46.01 \pm 2.11)\%$ 。结果表明高糖并缺血组梗死灶体积百分比高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($t = 46.711$, $P < 0.05$); 高糖并缺血组梗死灶体积百分比高于缺血组, 差异有统计学意义

($t = 12.418$, $P < 0.05$)。见图 2。

图2 各组小鼠脑缺血梗死灶体积百分比分布情况
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与缺血组比较: # $P < 0.05$

2.4 α -SMA 免疫组织化学染色结果 光镜下, 空白对照组小鼠脑组织皮质区 α -SMA 标记阳性细胞(即周细胞)几乎不可见(图 3A)。缺血组、高糖并缺血组小鼠脑组织缺血皮质区 α -SMA 标记阳性细胞布满整个视野, 形态不规整, 高糖并缺血组周细胞数目较同期缺血组增加, 分布极度不均(图 3B、C)。

2.5 qRT-PCR 检测小鼠脑缺血梗死区域中 α -SMA 蛋白对应基因的相对表达 缺血组和高糖并缺血组梗死区域中 α -SMA 蛋白对应基因的相对表达分别为 (2.72 ± 0.43) 、 (7.37 ± 0.53) 。qRT-PCR 结果表明, 以 β -actin 作为参照, 高糖并缺血组 α -SMA 蛋白对应基因的相对表达量高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($t = 32.070$, $P < 0.05$); 高糖并缺血组 α -SMA 蛋白对应基因的相对表达量高于缺血

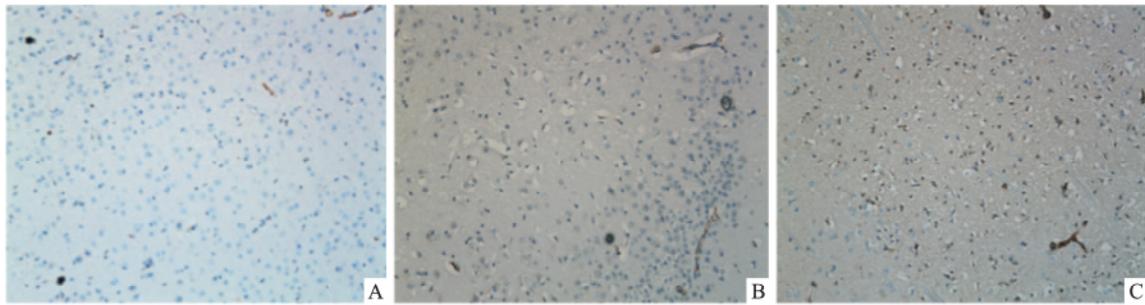


图3 各组小鼠脑缺血梗死区 α -SMA 免疫组织化学染色结果 $\times 20$
A: 空白对照组; B: 缺血组; C: 高糖并缺血组

组, 差异有统计学意义 ($t = 18.020, P < 0.05$)。见图 4。

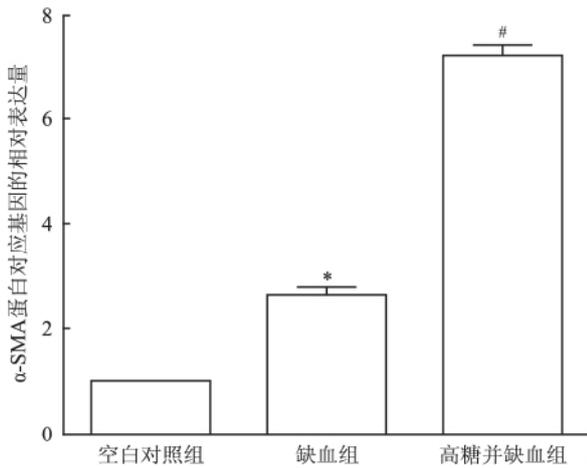


图4 各组小鼠脑缺血梗死区域中 α -SMA 蛋白对应基因的相对表达情况
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与缺血组比较: # $P < 0.05$

2.6 Western blot 检测小鼠脑缺血梗死区域中 α -SMA 蛋白的相对表达 缺血组和高糖并缺血组梗死区域中 α -SMA 蛋白的相对表达分别为 (1.80 ± 0.31) 、 (3.21 ± 0.24) 。Western blot 结果表明, 以 β -actin 作为参照, 高糖并缺血组 α -SMA 蛋白的相对表达量高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($t = 24.620, P < 0.05$); 高糖并缺血组 α -SMA 蛋白的相对表达量高于缺血组, 差异有统计学意义 ($t = 9.521, P < 0.05$)。各组 α -SMA 蛋白条带显影情况与结果一致。见图 5。

3 讨论

缺血性脑血管病占脑血管病的主导地位, 死亡率逐年升高。临床上, 糖尿病合并脑缺血卒中较常见。然而, 1 型糖尿病的高血糖状态是缺血性脑血

管病一个相当重要的危险因素, 若脑缺血梗死前就已经存在高血糖状态, 则缺血所引起的损伤极为迅速, 与正常血糖脑缺血梗死的自然进程相比, 高血糖状态下脑缺血梗死会明显提前^[6-7]。

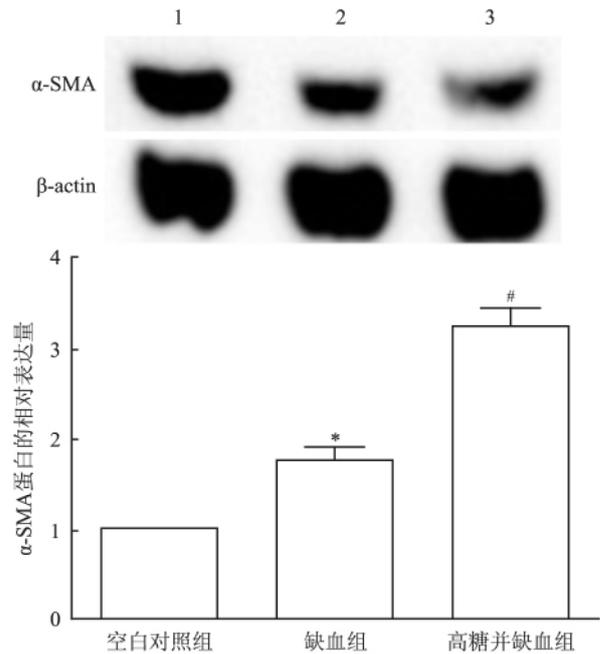


图5 各组 α -SMA 蛋白的相对表达情况
1: 高糖并缺血组; 2: 缺血组; 3: 空白对照组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与缺血组比较: # $P < 0.05$

韩冬等^[10]研究发现, 在正常血糖状态下, 大鼠脑缺血再灌注损伤后周细胞数量相对增加。周细胞是血管神经单元的重要组成部分, 其具有收缩、免疫、炎性损伤、迁移等多种功能, 同时, 其参与脑部血流的自我调节并在血脑屏障功能的维持和血管生成中发挥着重要的作用^[11]。 α -SMA 可作为周细胞在缺血脑梗死中新生血管的标记分子^[3-4]。相对于缺血性卒中中, 李强等^[11]研究发现脑出血损伤过程

中,周细胞参与炎性活化,细胞数量明显增加。刘馨等^[7]研究显示,在糖尿病小鼠局灶脑缺血模型中,缺血1 h再灌注24 h后,高糖并缺血组的GFAP高于缺血组,且星形胶质细胞数量明显增加。李俊君等^[12]研究发现,糖尿病大鼠局灶脑缺血再灌注模型中,高血糖能明显加重脑缺血再灌注时神经胶质细胞的损伤,同时高血糖可能通过某些分子途径介导神经胶质细胞的凋亡进程。

本研究结果显示,在1型糖尿病高血糖小鼠模型制备成功后,在此基础上使用线栓法制备的小鼠模型,行为学Longa评分提示高糖并缺血组神经缺损症状比缺血组严重;TTC染色及免疫组化结果都与空白对照组比较,缺血组缺血1 h再灌注24 h后脑组织水肿明显,周细胞数量明显增多;高糖并缺血组再灌注24 h,周细胞数目较同期缺血组更多,脑组织水肿极严重;qRT-PCR和Western blot分别显示高糖并缺血组 α -SMA蛋白对应基因、 α -SMA蛋白的相对表达量均高于缺血组。

综上所述,糖尿病高血糖与缺血再灌注两种损伤机制同时作用于脑组织时,使脑组织损伤更严重,损伤区域 α -SMA的表达增强,周细胞数量明显增加。但是其具体分子机制尚不是很明确。关于局灶性脑缺血再灌注时周细胞变化已有报道,同时,糖尿病高血糖对非缺血脑组织损伤机制方面的研究也有报道,但周细胞在高血糖和缺血再灌注同时存在时如何变化的相关研究尚未有报道,本文旨在为通过两种模型建立后周细胞如何变化及其机制的研究提供基础研究线索。

参考文献

- [1] Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid J F, et al. Pericytes. Morpho-function, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche [J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24(7): 909-69.
- [2] 张弘, 张志光. 血管周细胞的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2013, 40(4): 529-32.
- [3] 王医术, 李玉林, 王心蕊, 等. 用 α -SMA结合部位标记新生血管周细胞[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2003, 29(5): 594-5.
- [4] Tigges U, Welser-Alves J V, Boroujerdi A, et al. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. [J]. *Microvasc Res*, 2012, 84(1): 74-80.
- [5] 冯一梅, 邹仲敏, 徐辉. 周细胞的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(3): 571-3.
- [6] 刘馨. 肿瘤坏死因子- α 介导高血糖加重脑缺血再灌注损伤的实验研究[D]. 宁夏: 宁夏医科大学, 2013.
- [7] 刘馨, 曹彩霞, 景丽, 等. 糖尿病大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中星形胶质细胞的变化[J]. *宁夏医科大学学报*, 2013, 35(6): 617-21.
- [8] 黄桂红, 邓航, 李江, 等. 四氧嘧啶腹腔注射致小鼠糖尿病模型因素考察[J]. *中国医药导报*, 2012, 9(1): 15-7.
- [9] 贾蕃. 小鼠脑缺血模型的优化及丹红注射液抗脑缺血机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [10] 韩冬, 孙森, 张进, 等. 缺血后处理对大鼠脑缺血再灌注后周细胞的影响[J]. *中国老年学*, 2015, 35(8): 2152-4.
- [11] 李强, 阮怀珍, 冯华. 周细胞在出血性脑卒中中的作用[J]. *中华神经医学杂志*, 2015, 14(10): 1070-3.
- [12] 李俊君, 罗涛, 景丽, 等. 糖尿病脑缺血再灌注大鼠海马胶质细胞凋亡研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2010, 32(4): 477-80.

Variation in expression of α -SMA after cerebral ischemia reperfusion in diabetic mice

Tan Qisong, Chen Erfeng, Bian Erbao, et al

(Dept of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To discuss the alteration of pericyte in hyperglycemia cerebral ischemia reperfusion damage by performing the expression changes of α -smooth muscle actin (α -SMA) in hyperglycemia cerebral ischemia reperfusion damage of mice. **Methods** The model of type 1 diabetes mice was set up using Alloxan. Silk thread was applied to barraging the middle cerebral artery occlusion, then the experimental models were established. Using ethology, immunohistochemistry, Western blot and qRT-PCR, The otherness of the pericyte's number of cerebral cortex of frontal lobe and the expression of α -SMA of diabetes hyperglycemia cerebral ischemia reperfusion group (hyperglycemia & ischemia group) and normoglycemia cerebral ischemia reperfusion group (ischemia group) at 1 hour after cerebral ischemia, 24 hours after reperfusion were observed and compared. **Results** Relative to the blank control group, the immunohistochemistry as well TTC staining showed that gently edema occurred after reperfusion

NS2 激活 TLR7 抑制 RSV 感染肺泡上皮细胞中 IFN 的表达

汪旻旻 孙 涛 袁晓玲 黄升海

摘要 目的 探讨非结构蛋白 NS2 在呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染人 II 型肺泡上皮细胞 (A549) 活化 TLR7 信号转导过程中的可能作用。方法 以 RSV 感染体外培养的 A549 细胞, 设立正常对照组、RSV 感染组、RSV NS2 小干扰 RNA 沉默组 (NS2 siRNA + RSV 组) 及 TLR7 激动剂组 (R848 + RSV 组)。各组分于病毒感染后的 4、12、24、48 h 收集细胞和培养上清液。Western blot 法检测各组不同时间点 TRIF、TRAF6 及 p-I κ B- α 蛋白表达; ELISA 法检测各组细胞培养上清液中 I 型干扰素 α (IFN- α)、IFN- β 含量的变化。结果 正常对照组中 TRIF、TRAF6、p-I κ B- α 蛋白的表达量较低, 经 RSV 感染之后, 随感染时间增加, 表达量升高; 在 NS2 siRNA + RSV 组三者表达量较正常对照组上调, 但相对于 RSV 感染组, 表达下降, 表明 RSV NS2 可以活化 TRIF、TRAF6 及 p-I κ B- α 蛋白的表达。RSV 感染组及 NS2 siRNA + RSV 组 IFN- α 、IFN- β 含量随感染时间增加逐渐升高, 4 h 开始升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); R848 + RSV 组 IFN- α 和 IFN- β 呈时间依赖性增加, 感染 4 h 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 NS2 在病毒感染 A549 细胞过程中激活 TLR7, 抑制了 IFN- α 和 IFN- β 的表达。

关键词 A549 细胞; NS2; 呼吸道合胞病毒; Toll 样受体; siRNA

中图分类号 R 373.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1632-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.011

2017-06-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371797); 安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2012A152)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 汪旻旻, 女, 硕士研究生;

黄升海, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huang-shh68@aliyun.com

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是非节段性单股负链 RNA 病毒, 属于副黏病毒科肺炎病毒属^[1]。RSV 会引发婴幼儿和儿童急性下呼吸道感染, 导致毛细支气管炎, 对老年人也是一个重要威胁, 可导致严重肺部感染, 死亡率极高^[2]。Toll 样受体 7 (Toll-like receptor 7, TLR7) 主要识别单链 RNA 病毒 (ssRNA), 参与胞内病毒感染^[3]。在介导病毒免疫反应中发挥着必不可少的作用。RSV 感染后, 机体可经 TLR7 介导的 TLR7/MyD88/NF- κ B/TNF- α 或 TLR7/MyD88/IRF7/I 型干扰素 α (type I interferon α , IFN- α) 信号转导通路诱导炎症反应, 从而发挥抗病毒作用^[4-6]。RSV 非结构蛋白 NS 包括含有 139 个氨基酸的 NS1 和含有 124 个氨基酸的 NS2。有研究^[7-8]显示 NS 蛋白对干扰素有拮抗作用, 但并未揭示出其具体机制。瑞喹莫德 (Resiquimod, R848) 是一种 TLR7 激动剂, 具有很强的细胞因子诱导效应^[9], 可以激活 TLR7 从而产生免疫刺激效应^[10]。该研究通过 RSV 感染体外培养的气道上皮细胞, 加之 TLR7 激动剂和 NS2 siRNA 预处理, 探究 NS2 在 RSV 感染 A549 细胞活化 TLR7 信号转导通路中对 IFN 的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒 A549 细胞为人 II 型肺泡上皮细胞, RSV 为国际标准株 Long 株, 以上均由安徽医科大学微生物学教研室保存。

1.2 主要试剂 新生胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 超敏化学发

for 24 hours, the number of pericyte were increased obviously in ischemia group ($P < 0.05$); The pathology change was more significantly in hyperglycosemia & ischemia group than that in the ischemia group after reperfusion for 24 hours. Cerebral edema was aggravated remarkably, at the same time, the number of pericyte were increased massively ($P < 0.05$). qRT-PCR and Western blot showed that the expression of α -SMA was higher in hyperglycosemia & ischemia group than that in ischemia group ($P < 0.05$). **Conclusion** Diabetes hyperglycosemia cerebral ischemia reperfusion can aggravate cerebral damage, reinforce the expression of α -SMA and increase the number of pericyte.

Key words cerebral ischemia reperfusion; hyperglycosemia; pericyte; α -smooth muscle actin