

· 论著 ·

特布他林对去甲肾上腺素和烧伤血清诱导大鼠神经胶质细胞血管内皮生长因子基因表达的影响



王艺明 杨宗城

【摘要】 目的 了解 β_2 肾上腺素能受体激动剂特布他林对烧伤血清和去甲肾上腺素 (NE) 诱导神经胶质细胞血管内皮生长因子 (VEGF) 基因表达的影响。方法 制备烧伤大鼠及正常大鼠血清。取出生 1~3 d 乳鼠脑组织行原代神经胶质细胞培养,并在培养液中加入不同的刺激物,分为:(1)对照组:加入体积分数 10% 的正常大鼠血清;(2)NE1、NE2、NE3 组:分别加入体积分数 10% 烧伤血清 + 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ NE;(3)TBN1、TBN2、TBN3 组:分别加入 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 特布他林 + 体积分数 10% 烧伤血清 + 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ NE。采用蛋白质印迹法检测各组 VEGF 蛋白的表达;实时荧光定量 PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达。结果 对照组 VEGF 蛋白的表达处于较低水平,NE1、NE2、NE3 组其表达随 NE 浓度的增大逐渐增加,而 TBN1、TBN2、TBN3 组的表达明显增加。对照组神经胶质细胞 VEGF mRNA 表达量 [(5.72 ± 0.12) 拷贝数/g] 较低,NE1、NE2、NE3 组 VEGF mRNA 的表达 [(13.26 ± 0.03) 、 (10.37 ± 0.04) 、 (14.87 ± 0.55) 拷贝数/g] 均高于对照组 ($P < 0.01$)。而 TBN1、TBN2、TBN3 组 VEGF mRNA 表达量 [(13.39 ± 0.19) 、 (15.77 ± 0.11) 、 (16.00 ± 0.07) 拷贝数/g] 也逐渐增加,除 TBN1 组外其余 2 组与各 NE 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 特布他林可增强烧伤血清和 NE 诱导神经胶质细胞 VEGF 基因的表达。

【关键词】 烧伤; 肾上腺素能 β 激动剂; 去甲肾上腺素; 血清; 血管内皮生长因子 A; 神经胶质

The influence of terbutaline on VEGF gene expression in rat astrocytes after norepinephrine and burn serum induction WANG Yi-ming*, YANG Zong-cheng. *Department of Psychology, Hospital Affiliated to Guiyang Medical College, Guiyang 550001, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of adrenoreceptor beta-agonists terbutaline on gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat astrocyte after induction by norepinephrine (NE) and burn serum. Methods The sera of normal and burn rats were separated for use. Primary astrocytes of brain tissue were isolated from neonatal 1~3 d rats and cultured and divided into following groups: (1) Control group: with 10% normal rat serum in the culture medium. (2) NE1, NE2, NE3 groups: with 10% burn rat serum and 10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$ NE in the culture medium, respectively. (3) TBN1, TBN2, TBN3 groups: with 10% burn rat serum and 10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$ NE and 10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$ terbutaline in the culture medium, respectively. The mRNA and protein expression of VEGF in each group were determined with real-time PCR and Western blotting, respectively. Results There was a low protein expression of VEGF in control group, but it increased slightly in NE1 group, and then increase gradually in NE2, NE3 groups, and it was obviously increased in TBN1, TBN2, TBN3 groups. The mRNA expression of VEGF in NE1, NE2, NE3 groups were [(13.26 ± 0.03)], [(10.37 ± 0.04)], [(14.87 ± 0.55) copies/g], respectively, which were significantly higher than that of control [(5.72 ± 0.12) copies/g, $P < 0.01$]. In addition, the expression of VEGF mRNA in TBN1, TBN2, TBN3 groups was higher than that in control group, and expression of VEGF mRNA [(13.39 ± 0.19)], [(15.77 ± 0.11)], [(16.00 ± 0.07) copies/g] was gradually increased, which showed obvious difference between TBN2 and NE2, and also between TBN3 and NE3 groups ($P < 0.01$). Conclusion Terbutaline can increase gene expression of VEGF in rat astrocytes after induction by NE and burn serum.

【Key words】 Burns; Adrenergic beta-agonists; Norepinephrine; Serum; Vascular endothelial growth factor A; Neuroglia

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(200599)

作者单位:550001 贵阳医学院附属医院心理科(王艺明);第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(杨宗城)

研究表明,大鼠严重烧伤后脑组织血管内皮生长因子(VEGF)的基因表达增加^[1],去甲肾上腺素(NE)和烧伤血清可诱发神经胶质细胞分泌 VEGF^[2]。 β 肾上腺素能受体(β -AR)阻滞剂普萘洛尔能阻断细胞膜上 β -AR,降低烧伤血清和 NE 诱导 VEGF 的表达,但 NE 诱导神经胶质细胞 VEGF 基因表达是通过细胞膜上的 β_1 受体或 β_2 受体,还是二者共同介导,目前尚不清楚。笔者通过选择 β_2 -AR 激动剂特布他林观察其对 NE 和烧伤血清诱导神经胶质细胞 VEGF 基因表达的影响。拟阐明 NE 和烧伤血清诱导神经胶质细胞 VEGF 基因表达的路径,为临床防治烧伤后脑水肿提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及来源

NE、特布他林、PCR 试剂盒购自美国 Sigma 公司,VEGF 抗体 SC-7269 购自美国 Santa Cruz 公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,Light Cycler-DNA master SYBR green I 试剂盒购自瑞士 Roche 公司。VEGF 引物:上游引物序列:5'-CCATGAACCTTCTGCTCTCTG-3';下游引物序列:5'-GGTGAGAGGTCTAGTTCCTCGA-3',由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 血清的制备及分组

Wistar 大鼠 44 只(第三军医大学实验动物中心),雌雄不限,体质量 250~300 g。将其中 34 只大鼠参见文献^[2]方法造成 40% TBSA Ⅲ度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤)。于伤后 6 h 抽取大鼠腹主动脉血,分离血清,置 -20 °C 冻存备用。同时留取正常大鼠(10 只)血清备用。取出生 1~3 d 乳鼠(来源同前,30 只)脑组织,参见文献^[2]方法进行原代神经胶质细胞培养。将生长良好的神经胶质细胞用胰蛋白酶消化后接种于培养瓶中,待其约 80% 融合时加入刺激物。根据所加物质不同分为:(1)对照组:在培养液中加入体积分数 10% 的正常大鼠血清;(2)NE1、NE2、NE3 组:分别加入体积分数 10% 烧伤血清 + 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ NE;(3)TBN1、TBN2、TBN3 组:分别加入 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 特布他林 + 体积分数 10% 烧伤血清 + 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ NE。各组施加刺激物后放入 37 °C、体积分数 5% CO_2 孵箱中培养 2 h,取标本待测。每组标本数为 6。

1.3 检测指标

1.3.1 VEGF 在神经胶质细胞中表达的检测

提取各组细胞蛋白质,采用蛋白质印迹法行 VEGF

蛋白表达的检测。

1.3.2 VEGF mRNA 表达的测定 提取各组细胞 mRNA,采用实时荧光定量 PCR 法进行 VEGF mRNA 的扩增^[2],检测其表达量并作半定量分析。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 VEGF 在神经胶质细胞中的表达

对照组 VEGF 的蛋白表达处于较低水平,NE1、NE2、NE3 组其表达随 NE 浓度的增大逐渐增加。TBN1、TBN2、TBN3 组的表达明显增加。见图 1。

C NE1 NE2 NE3 TBN1 TBN2 TBN3



图 1 各组血管内皮生长因子在神经胶质细胞中的表达。

C 为对照组;NE1~NE3 为体积分数 10% 烧伤血清 + 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 去甲肾上腺素(NE);TBN1~TBN3 为 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 特布他林 + 体积分数 10% 烧伤血清 + 10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ NE

2.2 神经胶质细胞 VEGF mRNA 的表达

对照组神经胶质细胞 VEGF mRNA 表达量 [(5.72 \pm 0.12) 拷贝数/g] 较低,NE1、NE2、NE3 组表达量 [(13.26 \pm 0.03)、(10.37 \pm 0.04)、(14.87 \pm 0.55) 拷贝数/g] 均高于对照组 ($P < 0.01$)。TBN1、TBN2、TBN3 组 VEGF mRNA 的表达量 [(13.39 \pm 0.19)、(15.77 \pm 0.11)、(16.00 \pm 0.07) 拷贝数/g] 也逐渐增加,除 TBN1 组外其余 2 组分别与 NE1~NE3 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

杨宗城^[3]认为细胞的许多功能是其基因调控的,组织和细胞对刺激的不同反应可能取决于差异基因。王克万等^[4]在大鼠颅脑损伤实验中观察到,在局部脑挫伤后 6 h 内,脑损伤区即出现星形胶质细胞应激反应,伤后 24 h 达高峰,且波及双侧大脑半球,其范围远比挫伤范围广。有学者认为,脑出血大鼠大量 NE 聚集在脑组织周围,一方面促进神经细胞内 Ca^{2+} 超载,使神经细胞产生迟发性死亡;另一方面导致神经细胞过度兴奋,加速能量消耗,进而引起并加剧脑细胞继发性损害^[5]。VEGF 是一种高度特异性结合血管内皮细胞的糖蛋白,其生物学

特性主要表现为增加微血管的通透性;特异性地与血管内皮细胞受体结合,促进血管内皮细胞的分裂和增殖。生理情况下它主要分布于胞质,呈静止或弱活化状态;各种病理因素引起 VEGF 的异常激活可导致脑水肿^[6,7]。

特布他林是一种选择性的 β_2 -AR 激动剂,有拟交感活性。笔者前期的动物实验提示,严重烧伤大鼠脑组织 VEGF 的基因表达增加^[1]。进一步的细胞实验提示,烧伤血清中含有大量炎性因子、应激激素、毒素等,可刺激神经胶质细胞,或与增加剂量的 NE 起叠加作用,协同导致神经胶质细胞 VEGF 分泌增加,这被认为是严重烧伤诱发血管源性脑水肿的重要因素^[2]。本研究在烧伤血清加 NE 刺激的同时进一步加用特布他林,VEGF 的表达进一步增强,说明特布他林可增强烧伤血清和 NE 诱导神经胶质细胞 VEGF 基因表达的效应。Fredriksson 等^[8]在 NE 刺激棕色脂肪细胞诱导 VEGF 基因表达实验中观察到, α_1 -AR、 α_2 -AR 激动剂均无诱导作用,而 β -AR 激动剂异丙肾上腺素则使 VEGF 的表达增加,可见细胞膜 β -AR/环腺苷一磷酸信使通路的腺苷环化酶系统受体胞质部分被信号系统分子识别,激活与该信号系统分子连接的受体,传导级联反应,促进细胞反应,从而诱导细胞 VEGF 表达增强。本实验观察到,特布他林能够特异性激活细胞膜上 β_2 -AR 通道,使烧伤血清和 NE 诱导神经胶质细胞 VEGF 表达

增高的效应得到加强,故推测这种作用是通过细胞膜上 β_2 -AR 介导的。由于 VEGF 分泌增加,加重了烧伤应激性脑水肿,为临床防治严重烧伤后脑水肿提供客观实验依据。

参考文献

- [1] 王艺明,杨宗城. 去甲肾上腺素对烧伤大鼠脑组织血管内皮细胞生长因子表达的影响. 中华创伤杂志, 2005, 21(10): 741-744.
- [2] 王艺明,杨宗城,刘兴德. 去甲肾上腺素/烧伤血清诱导大鼠神经胶质细胞 VEGF 基因表达. 中国病理生理杂志, 2006, 22(5): 977-981.
- [3] 杨宗城. 加强对烧伤后缺血缺氧性损害的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 132-133.
- [4] 王克万,杨志焕,王正国,等. 大鼠颅脑创伤后星形细胞早期反应特点. 创伤外科杂志, 1999, 1(3): 135-137, 153.
- [5] Noh J, Kim EY, Kang JS, et al. Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons. Exp Neurol, 1999, 159(1): 217-224.
- [6] Wang YM, Xu F, Gainetdinov RR, et al. Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. Biol Psychiatry, 1999, 46(9): 1124-1130.
- [7] 吴宗平,何理盛,林志雄. 血管内皮细胞生长因子对胶质瘤中水孔蛋白 4 表达的影响. 中华实验外科杂志, 2005, 22(12): 1523-1524.
- [8] Fredriksson JM, Lindquist JM, Bronnikov GE, et al. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta-adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. J Biol Chem, 2000, 275(18): 13802-13811.

(收稿日期:2006-11-21)
(本文编辑:张红)

· 消息 ·

《中华烧伤杂志》征订启事

《中华烧伤杂志》由中国科学技术协会主管、中华医学会主办,是国内烧伤学术界惟一的全国性权威刊物。读者对象为从事烧伤救治和整形的临床医生,以及与烧伤防治研究有关的科研人员。烧伤病情复杂、并发症多,涉及许多相关医学科学,特别与病理生理学、病理学、免疫学、微生物学、细胞生物学、分子生物学、生物工程学等有密切关系。烧伤病程中出现的休克、感染、营养代谢、内脏并发症、水与电解质紊乱及创面修复等既是烧伤的重要问题,也是整个外科的基本问题。本刊将择优刊登上述几方面的临床和实验研究论文,为读者提供烧伤及相关学科的新理论、新技术、新方法、新经验。《中华烧伤杂志》由国内著名烧伤外科及相关学科专家组成编委会,杂志具有科学性、实用性,内容新颖,可读性强。

目前《中华烧伤杂志》的影响因子为 1.218,已被《CNKI 期刊全文数据库》《中国科技论文统计源期刊》《中国科学引文数据库统计源期刊》《中文核心期刊要目总览》《中文核心期刊(遴选)数据库》《万方数据-数字化期刊群》《中文科技资料目录-医药卫生》《中国期刊全文数据库》《中国学术期刊综合评价数据库》以及美国国立医学图书馆《医学索引》(IM) 又称《Medline 数据库》、美国化学文摘社《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)、荷兰《医学文摘》(EMBASE)、《日本科学技术社科学技术数据库》(JST)、美国《乌利希国际期刊指南》等主要检索机构收录,在国内医学期刊中具有较大的影响。

本刊为双月刊,大 16 开,80 页亚光铜版纸印刷并配彩图,每期 14 元。邮发代号:78-131。欢迎广大作者和读者通过邮局订阅或直接向编辑部邮购。汇款请寄:重庆市沙坪坝区西南医院《中华烧伤杂志》编辑部,邮编:400038。电话:023-68754670-602、65460278,传真:023-65460398, Email: emashz@mail.tmmu.com.cn。

中华烧伤杂志编辑部