

大鼠大脑皮质星形胶质细胞 $\alpha 2A$ 型肾上腺素受体的表达研究

罗雪妮 杨振宇 付豹 张宇 喻田

摘要 目的 验证大鼠大脑皮质星形胶质细胞中的 $\alpha 2A$ 肾上腺素能受体 ($\alpha 2A - AR$) 的表达情况,并与 $\alpha 2B$ 肾上腺素能受体 ($\alpha 2B - AR$)、 $\alpha 2C$ 肾上腺素能受体 ($\alpha 2C - AR$) 相比较。方法 获取目的基因 $\alpha 2A - AR$ 、 $\alpha 2B - AR$ 、 $\alpha 2C - AR$ 的 RNA 反转录,与内参基因 $\beta - actin$ 一起进行实时荧光定量 PCR。重复 6 组,所得数据进行统计学分析并运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算。结果 大鼠大脑皮质星形胶质细胞中确实表达了 $\alpha 2A - AR$,并且 $\alpha 2A - AR$ 的相对表达量是 $\alpha 2B - AR$ 的 $2^{4.53}$ 倍,是 $\alpha 2C - AR$ 的 $2^{7.98}$ 倍。结论 $\alpha 2A - AR$ 可能为大鼠大脑皮质星形胶质细胞接受儿茶酚胺类神经递质调控的主要受体。

关键词 $\alpha 2A$ 肾上腺素能受体 星形胶质细胞 实时荧光定量 PCR

中图分类号 Q189 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.014

Investigation on the Expression of the $\alpha 2A$ Adrenergic Receptor in the Cerebral Astrocytes of Rats. Luo Xueni, Yang Zhenyu, Fu Bao, et al. Guizhou Key Laboratory of Anesthesia and Organ Protection, Guangxi 563000, China

Abstract Objective To testify the expression of $\alpha 2A$ adrenergic receptor ($\alpha 2A - AR$) in the cerebral astrocytes of rats, and compare the expression level of $\alpha 2A$ adrenergic receptor with the $\alpha 2B$ adrenergic receptor ($\alpha 2B - AR$) and $\alpha 2C$ adrenergic receptor ($\alpha 2C - AR$). **Methods** Cerebral astrocytes were get from SD rats (aged 1 - 3 days). High purity of astrocytes were tested. We extracted and reversely transcribed the target RNA of $\alpha 2A - AR$, $\alpha 2B - AR$ and $\alpha 2C - AR$ from the astrocytes, then Real - time PCR was performed together with the house gene $\beta - actin$. The aborer proedures were repeated six times, and all data were used for statistical analysis and a method ofto caculate the results. **Results** $\alpha 2A - AR$ were found markably expressed in the cerebaral astrocytes of rats, which was $2^{4.53}$ times to the expression of $\alpha 2B - AR$ and $2^{7.98}$ times to the expression of $\alpha 2C - AR$. **Conclusion** Based on the results, we infer that the $\alpha 2A - AR$ is the main adrenergic receptor in the cerebaral astrocytes of rats that receiving catecholamine regulation.

Key words $\alpha 2A$ Adrenergic receptor; Astrocytes; Real - time PCR

肾上腺素以及去甲肾上腺素是机体内重要的神经递质,它们参与调节机体的多种生理功能。体内的 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体可调节众多与内源性儿茶酚胺释放相关的重要生理功能。其中 $\alpha 2$ 类受体又可以继续分为 3 个亚型: $\alpha 2A$ 肾上腺素能受体 ($\alpha 2A$ adrenergic receptor, $\alpha 2A - AR$)、 $\alpha 2B$ 肾上腺素能受体 ($\alpha 2B$ adrenergic receptor, $\alpha 2B - AR$) 和 $\alpha 2C$ 肾上腺素能受体 ($\alpha 2C$ adrenergic receptor, $\alpha 2C - AR$)。在这 3 个亚型中, $\alpha 2A - AR$ 的生理作用主要包括突触前反馈抑制去甲肾上腺素释放、血压降低、镇痛、镇静和催眠。近年来,星形胶质细胞的肾上腺素能调控作用越来越受人们所重视。已有研究显示,减少脊髓的星形胶质

细胞的激活来调控肾上腺素能通路对于加速创伤后痛觉超敏状态的恢复很重要^[1]。而中枢神经系统的星形胶质细胞作为肾上腺素作用的主要靶点在很早就被人们所认识,它参与了细胞的形态塑造、能量代谢、膜转运、缝隙连接的渗透和免疫反应。并有证据证明, $\alpha 2A - AR$ 存在于中枢神经系统的星形胶质细胞中^[2]。因此,本研究采用培养的大鼠大脑皮质星形胶质细胞进行实时荧光定量 PCR 的方法进一步探究大脑皮质星形胶质细胞的 $\alpha 2A - AR$ 表达情况,及其相对于 $\alpha 2B - AR$ 、 $\alpha 2C - AR$ 的相对表达情况。

材料与方法

1. 材料及仪器:(1) 动物: Sprague ~ Dawley 大鼠 (1 ~ 3 天), SPF 级 [第三军医大学医学实验动物中心,实验动物许可证号: SCXK (渝) 2012 - 0005]。(2) 试剂: 钙离子荧光探针 Fluo - 3/AM, Life Technologies 公司; 兔源 GFAP 一抗, Abcam 公司; 羊抗兔荧光二抗 (FITC 标记), 中杉金桥; 反转录体系试剂

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460219)

作者单位: 563000 遵义医学院、贵州省麻醉与器官保护基础重点实验室

通讯作者: 喻田, 教授, 电子信箱: dlllyutian@163.com

(PrimeScript RT Reagent Kit): 5X PrimeScript Buffer, PrimeScript RT Enzyme Mix I, Oligo dT Primer, Random 6 mers, TaKaRa 公司产品; 荧光染料: SsoAdvanced SYBR Green Supermix, BIO - RAD 公司; 上下游引物 (Adrenergic α 2AF: 5' - TGG CCA ACG AGG TTA TGG GTT ACT - 3'; Adrenergic α 2AR: 5' - AGA TGA CCC ACA CGG TGA CAA TGA - 3'; Adrenergic α 2BF: 5' - TCT TGG CTT CCA GCA TCG GAT CTT - 3'; Adrenergic α 2BR: 5' - AAG GGT GGG TTG AAT ACT GAG GCA - 3' Adrenergic α 2CF: 5' - AAG TGT GGT GTG GTG TAT ACC TGG - 3'; Adrenergic α 2CR: 5' - AGC CTA TGC AGG AGG ACA AGA TGT - 3'), 北京绿泽森生物有限公司。(3) 仪器: 三通道梯度荧光定量 PCR 仪 (CFX 10NNECT TM Real-time System), 美国 Bio - Rad 公司; 梯度 PCR 仪 (T100TM Thermalcycler), 美国 Bio - Rad 公司; 多功能读数仪 (Varioskan Flash), 美国 Thermo Scientific 公司。

2. 方法: (1) 大脑皮质星形胶质细胞获取: 取 1 ~ 3 天的 SPF 级 Sprague - Dawley 大鼠大脑皮质组织, 消化、漂洗、终止消化、离心后, 弃掉上清液加入双抗、DMEM/F12 完全培养基混匀, 接种于细胞培养瓶, 放入 37℃、CO₂ 浓度为 5% 的细胞培养箱。每天更换培养基 1 次, 3 天后每 2 ~ 3 天更换 1 次。10 ~ 14 天后, 将培养瓶置于 37℃ 恒温空气摇床中 180r/min 摇动 18h, 更换完全培养基, 待细胞铺满瓶底。之后进行传代培养, 获取 3 代星形胶质细胞用于接下来的细胞纯度鉴定以及后续试验^[3]。取上述培养好的 3 代星形胶质细胞制作好细胞爬片后, 进行细胞纯度鉴定。将制作好细胞爬片进行 DAPI 染色, DAPI 即 4', 6 - 二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (4', 6 - diamidino - 2 - phenylindole), 是一种能够与 DNA 强力结合的荧光染料, 常用于荧光显微镜观测。因为 DAPI 可以透过完整的细胞膜, 它可以用于活细胞和固定细胞的染色^[4]。同时, 对制作好的细胞爬片进行 GFAP 染色。GFAP 是星形胶质细胞的骨架蛋白, 为星形胶质细胞所特有, 可作为成熟星形胶质细胞的标志物^[5]。在荧光显微镜下观察并计数, 计算得到其纯度, 供后续实验使用^[6]。(2) 目的 RNA 提取: 取培养鉴定好的 3 代大脑皮质星形胶质细胞 1 瓶, 用细胞刷将贴附于细胞培养瓶上的细胞刷下于培养基中。将细胞悬液转移到 10ml 的离心管中, 加入 PBS 溶解混匀后移入新的去酶 EP 管, 加入 Trizol、氯仿, 混匀后离心, 得到上层

透明澄清溶液 (RNA), 中层白色沉淀 (蛋白质), 下层红色澄清溶液 (DNA) 的分层溶液。小心吸取上层透明澄清液体 400 μ l 于新的去酶 EP 管中。(3) 目的 RNA 反转录: 将上述吸取出的 RNA 溶解、离心、清洗、控干, 加入 DEPC 处理水混匀。从混匀的液体中吸取 2 μ l 于酶标仪中测量其 AD 值。取一新的去酶 EP 管加入反转录体系 (5 \times PrimeScript Buffer、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primer、Random 6 mers) 和 DEPC 处理水, 从上述混有 RNA 的 DEPC 水中, 吸取 5 μ l 加入该 EP 管中, 配成共有 10 μ l 的混合液, 放入梯度 PCR 仪中, 根据 TaKaRa 的 PrimeScript RT Reagent Kit 的说明书条件, 进行反转录, 得到 cDNA。(4) 实时荧光定量 PCR: 将上述反转录好的 cDNA 溶液根据其测出的 A 值, 加 DEPC 水稀释为 10ng/ μ l 的浓度。一组取 12 个新的去酶 EP 管, 编号 1 ~ 12, 分别加入荧光素、DEPC 处理水, 1 ~ 3 号 EP 管中各加入内参 β - actin 的上下游引物, 4 ~ 6 号 EP 管中加入 α 2A - AR 的上下游引物, 7 ~ 9 号 EP 管中加入 α 2B - AR 的上下游引物, 10 ~ 12 号 EP 管中加入 α 2C - AR 的上下游引物。最后再在 12 个 EP 管中分别加入反转录得到的 10ng/ μ l 的 cDNA, 配成 15 μ l 的扩增体系。在三通道梯度荧光定量 PCR 仪中进行反应, 优化的反应条件为 95.0℃ 3min 预变性, 95.0℃ 10s 变性, 62.0℃ 45s 复性 39 个循环, 延伸 62.0℃ 5s, 插入溶解曲线, 荧光采集 62.0 ~ 95.0℃、0.5℃、5s。重复 6 组上述实验。

3. 统计学方法: 得到的 α 2A - AR、 α 2B - AR 及 α 2C - AR 基因扩增的 Ct 值与内参 β - actin 的 Ct 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算, 用 SPSS. 17.0 用进行统计学分析。实时荧光定量 PCR 时每组每个基因各设有 3 个副孔, 重复 6 组, 得到 6 组数据。求取 3 个副孔的平均值, 并算出 3 组的 ΔCt 值, 对 α 2A - AR、 α 2B - AR、 α 2C - AR 3 组的 ΔCt 值进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。进一步进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 星形胶质细胞 DAPI 及 GFAP 荧光染色: 原代及传代培养的大鼠大脑皮质星形胶质细胞经过 DAPI 及 GFAP 染色后, 得到以下结果, 经过计数得到皮质星形胶质细胞的纯度为 90%。

2. RT - PCR 的结果: 用提取的目的 RNA 反转录得到的 α 2A - AR、 α 2B - AR 及 α 2C - AR 基因的 cDNA 与内参基因 β - actin 进行实时荧光定量 PCR。

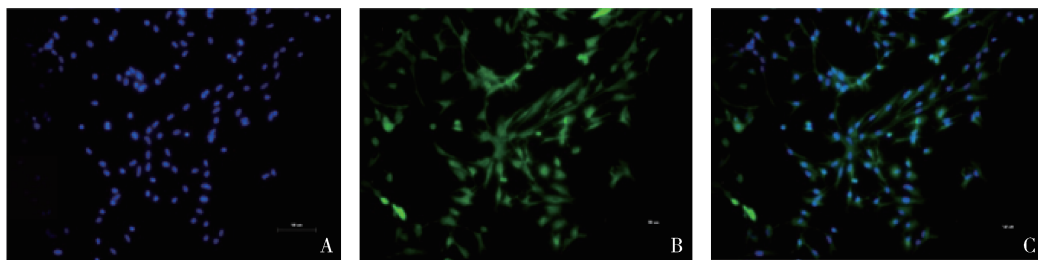


图 1 大鼠大脑皮质星形胶质细胞免疫荧光染色结果

A. 所有细胞经 DAPI 染色后,在荧光显微镜下发出蓝色荧光;B. 星形胶质细胞特异的骨架蛋白 GFAP 染色,发出绿色荧光;C. 图 A 与图 B 的融合图

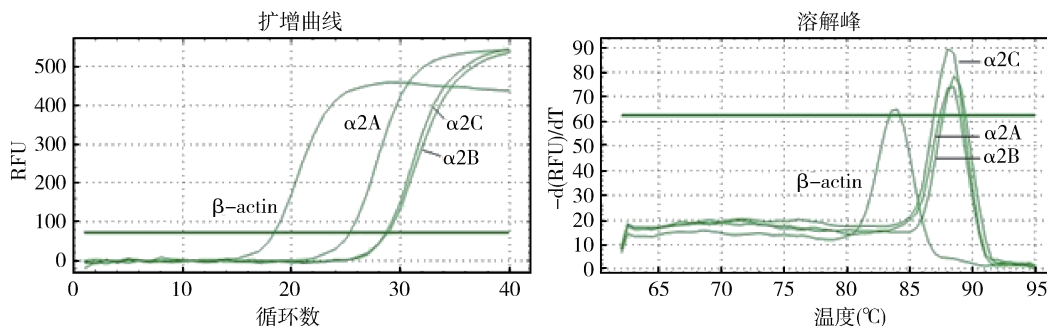


图 2 β -actin、 $\alpha 2A$ -AR、 $\alpha 2B$ -AR 和 $\alpha 2C$ -AR 实时荧光定量 PCR 的扩增曲线及溶解峰

A. 一组 β -actin、 $\alpha 2A$ -AR、 $\alpha 2B$ -AR 和 $\alpha 2C$ -AR 实时荧光定量 PCR 的扩增曲线;
B. 该组 β -actin、 $\alpha 2A$ -AR、 $\alpha 2B$ -AR 和 $\alpha 2C$ -AR 的溶解峰

按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, $\Delta\Delta C_q = \text{Average } \Delta C_q (\alpha 2A - AR) - \text{Average } \Delta C_q (\alpha 2B - AR) = 5.90 - 10.43 = -4.53$, $\Delta\Delta C_q = \text{Average } \Delta C_q (\alpha 2A - AR) - \text{Average } \Delta C_q (\alpha 2C - AR) = 5.90 - 13.88 = -7.98$ 。得到 $\alpha 2A - AR$ 相对于 $\alpha 2B - AR$ 的相对表达量为 $2^{4.53}$ 倍,而 $\alpha 2A - AR$ 相对于 $\alpha 2C - AR$ 的相对表达量为 $2^{7.98}$ 倍^[7],详见表 1。

讨 论

本研究通过细胞培养、免疫荧光染色等技术获得了细胞纯度为 90% 的大鼠大脑皮质星形胶质细胞。用这样的细胞得到目的基因 RNA,经过反转录得到 cDNA,再通过实时荧光定量 PCR 得到内参 β -actin 以及 $\alpha 2A - AR$ 、 $\alpha 2B - AR$ 、 $\alpha 2C - AR$ 的扩增产物。通过计算,得到大鼠皮质星形胶质细胞中确实有 $\alpha 2A - AR$ 表达,以及相对 $\alpha 2B - AR$ 的表达量为 $2^{4.53}$ 倍,相对 $\alpha 2C - AR$ 的表达量为 $2^{7.98}$ 倍。

中枢神经系统中星形胶质细胞作为肾上腺素以及去甲肾上腺素作用的重要靶点,具有十分重要的地位。只是其作用的具体亚型仍不明确。特异性的 $\alpha 2$ 受体激动药如右美托咪啶,通过激动中枢神经系统

表 1 $\alpha 2A - AR$ 、 $\alpha 2B - AR$ 、 $\alpha 2C - AR$ 以及 β -actin 的实时荧光定量 PCR Cq 值

目的基因	组别	平均目的基因 Cq 值	平均 β -actin Cq 值	ΔC_q (target - β -actin)
$\alpha 2A - AR$	1	25.67	18.45	7.22
	2	24.48	17.32	7.16
	3	24.99	19.51	5.48
	4	24.92	20.19	4.73
	5	24.87	19.47	5.4
	6	24.68	19.27	5.41
$\alpha 2B - AR$	1	28.89	18.45	10.44
	2	28.67	17.32	11.35
	3	29.22	19.51	9.71
	4	30.28	20.19	10.09
	5	29.91	19.47	10.44
	6	29.84	19.27	10.57
$\alpha 2C - AR$	1	31.93	18.45	13.48
	2	32.68	17.32	15.36
	3	32.81	19.51	13.3
	4	34.56	20.19	14.37
	5	32.67	19.47	13.2
	6	32.82	19.27	13.55

$\Delta C_q(\alpha 2A - AR) = C_{q\alpha 2A - AR} - C_{q\beta - actin}$; $\Delta C_q(\alpha 2B - AR) = C_{q\alpha 2B - AR} - C_{q\beta - actin}$; $\Delta C_q(\alpha 2C - AR) = C_{q\alpha 2C - AR} - C_{q\beta - actin}$; 表中为 6 组的 $\Delta C_q(\alpha 2A - AR)$ 、 $\Delta C_q(\alpha 2B - AR)$ 和 $\Delta C_q(\alpha 2C - AR)$

$\alpha 2$ 受体最密集的区域——脑干蓝斑(负责调解觉醒与睡眠),引发并维持自然非动眼睡眠(NREM)状态,产生镇静、催眠作用^[8]。前额叶大脑皮质的 $\alpha 2$ 受体在不同的认知过程中起着特异的调控作用,特别参与调节了与觉醒水平相关的去甲肾上腺素的释放^[9]。而在脑中 $\alpha 2A - AR$ 主要分布在除丘脑、基底节及相关区域以外的脑区,其中蓝斑外侧、臂旁核、脑桥核、脑桥被盖网状核等处密度最高。在蓝斑、脑干A4、A5、A7区仅有 $\alpha 2A - AR$ 亚型分布,它们均表明 $\alpha 2A - AR$ 亚型在中枢生理调控中起重要作用。因此,可以认为 $\alpha 2A - AR$ 是中枢神经系统内作为具有麻醉效用的 α 受体激动药的重要靶点。而中枢神经系统星形胶质细胞的肾上腺素能受体一直是众所周知的肾上腺素以及去甲肾上腺素调控的重要位点。其中, $\alpha 2A - AR$ 作为作用相关性最为密切的一个亚单位,很有可能就是其作用的具体位置。

本研究验证了大鼠大脑皮质星形胶质细胞中确有 $\alpha 2A - AR$ 的表达,并且其相对表达量远远超过 $\alpha 2B - AR$ 和 $\alpha 2C - AR$ 。因此,可以假设 $\alpha 2A - AR$ 是大鼠大脑皮质星形胶质细胞中参与肾上腺素以及去甲肾上腺素作用的具体位点。并且,特异性 $\alpha 2$ 受体激动药右旋美托咪啶能够激动蓝斑的 $\alpha 2$ 受体,达到镇静催眠的作用。而 $\alpha 2A - AR$ 如果在中枢神经系统内的这些部位高度表达的话,是否可以假设, $\alpha 2A - AR$ 是一些麻醉药物特异性作用的靶位点,这

就为进一步研究这些麻醉药物的作用机制提供了重要的线索。

参考文献

- 1 Arora V, Morado - Urbina CE, Aschenbrenner CA, et al. Disruption of spinal noradrenergic activation delays recovery of acute incision - induced hypersensitivity and increases spinal glial activation in the rat [J]. J Pain, 2015,9(10):1-13
- 2 Hertz L, Chen Y, Gibbs ME, et al. Astrocytic adrenoceptors: a major drug target in neurological and psychiatric disorders? [J]. Current Drug Targets CNS and Neurological Disorders, 2004, 3(3): 239-267
- 3 钱掩映, 杨慧民, 郑荣远. SD大鼠脑皮质星形胶质细胞的纯化 [J]. 医学研究杂志, 2008,5: 111-113
- 4 张艳芬, 许重洁, 杨保胜, 等. 小鼠骨髓组织细胞微核 DAPI 染色法 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 29: 5696-5898
- 5 Yang H, Liang Z, Li J, et al. Optimized and efficient preparation of astrocyte cultures from rat spinal cord [J]. Cytotechnology, 2006, 52(2): 87-97
- 6 李焯, 张家骅, 吴建云. 大脑皮质星形胶质细胞的培养和鉴定 [J]. 动物医学进展, 2010,4: 42-46
- 7 唐东红, 叶尤松, 李哲丽, 等. 荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测猕猴不同器官组织中黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因的 mRNA 表达差异的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2015,12: 47-53
- 8 顾健腾, 陈剑鸿, 夏培元. $\alpha 2$ 肾上腺素能受体激动药及其麻醉效应的研究进展 [J]. 中国药房, 2012,25: 2380-2382
- 9 Berridge CW, Spencer RC. Differential cognitive actions of norepinephrine $\alpha 2$ and $\alpha 1$ receptor signaling in the prefrontal cortex [J]. Brain Res, 2015, 24(11):1-8

(收稿日期:2016-03-01)

(修回日期:2016-03-30)

275 例儿童视神经炎患者流行病学及临床特征分析

杨超 方凯 孙可欣 丛衡日 李红阳 秦雪英 吴涛 张晓君 魏世辉 胡永华

摘要 目的 了解儿童视神经炎(ON)患者的流行病学及临床特征,为 ON 患儿的早期诊疗提供科学依据。方法 收集 2010 年 11 月~2014 年 1 月就诊于全国 17 家医院的 275 例(414 眼)儿童 ON 患者的临床资料,记录其人口学特征、病因分型、前驱病史、临床症状、眼科和影像学检查结果及预后情况,进行回顾性分析。**结果** 275 例患者中男女性别发病比为 1:1.24。发病年龄为 2~15 岁,以 6 岁及以上为主(94.5%)。儿童 ON 发病主要集中在秋、冬季节(64.4%),夏季较少(11.6%)。216 例(78.5%)患者符合特发性 ON 诊断标准。单眼发病者 136 例(49.5%),双眼同时或相继发病者 139 例(50.5%)。80 例(29.1%)患者在发病前 3 个月内有前驱病史。270 例(377 眼)进行了视力检查,201 眼(53.3%)视力 <0.1;271 例(406 眼)进行

基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAI08B06)

作者单位:100191 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(杨超、孙可欣、秦雪英、吴涛、胡永华);100013 北京市疾病预防控制中心(方凯);100730 首都医科大学附属北京同仁医院神经内科(丛衡日、张晓君);100853 北京,中国人民解放军总医院眼科中心(李红阳、魏世辉)

通讯作者:胡永华,电子信箱:yhhu@bjmu.edu.cn;魏世辉,电子信箱:weishihui706@hotmail.com