

• 基础实验研究论著 •

长时间高糖培养导致施万细胞 PDGF 表达下调

张 华¹, 殷 娟², 杨红英^{3△}

(1. 湖北医药学院附属东风医院检验科, 湖北十堰 442008; 2. 攀枝花市中心医院检验科, 四川攀枝花 617067;
3. 昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南昆明 650001)

摘要:目的 观察高糖培养条件下施万细胞血小板源性生长因子(PDGF)表达变化情况。方法 试验分为普通糖水平组及 30 mmol/L 作用 2 d 组(HG2)、作用 4 d 组(HG4)和作用 6 d 组(HG6)。应用逆转录聚合酶链反应检测各组 PDGF mRNA 表达。结果 与普通糖水平组比较, HG2 组 PDGF mRNA 无变化($P > 0.05$), HG4 组、HG6 组均下降($P < 0.05$), 且 HG4 组、HG6 组比较无统计学差异($P > 0.05$)。结论 PDGF 与还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶和反应性氧化产物间可能存在负反馈调节机制。

关键词: 细胞, 培养的; 血小板源性生长因子; 葡萄糖

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)22-2689-02

Schwann cell culture under high glucose result in downregulation of PDGF

Zhang Hua¹, Yin Juan², Yang Hongying^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei Medical University, Shiyan, Hubei 442008, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua, Sichuan 617067, China;
3. Department of Clinical Laboratory, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change of platelet derived growth factor (PDGF) mRNA in high glucose cultured schwann cells. **Methods** Normal glucose level group, and groups including 2 (HG2 group), 4 (GH4 group) and 6 (GH6 group) days of 30 mmol/L glucose culturing were settled. PDGF mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** Compared with normal glucose level group, there was no change of PDGF mRNA in HG2 group ($P > 0.05$), but that in HG4 and HG6 group increased ($P < 0.05$), and there was no significant differences between HG4 and HG6 group. **Conclusion** There might be a negative feedback mechanism between PDGF, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and reactive oxygen species.

Key words: cells, cultured; platelet-derived growth factor; glucose

施万细胞(SCs)是周围神经系统中的神经胶质细胞,起源于胚胎的神经嵴细胞,发育过程包括 SCs 前体、未成熟 SCs,最后形成成熟 SCs。成熟 SCs 包绕周围神经的轴突形成有髓或无髓神经纤维。细胞外表面有基膜,能分泌神经营养因子,促进受损伤神经元的存活及其轴突的再生。血小板源性生长因子(PDGF)可促进多种细胞的有丝分裂,调节细胞生长与分化,诱导分泌其他细胞因子,促进细胞基质成分的合成,在组织修复、胚胎发育、免疫及多种常见疾病中起着重要作用,特别是对一些慢性难愈性伤口(如糖尿病溃疡、慢性静脉性溃疡、压疮、放射性溃疡等)有明显促进愈合的作用。本研究利用高糖刺激体外培养的 SCs,并观察 PDGF 表达水平。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器与试剂 1~3 日龄 SD 乳鼠(四川大学华西医学院动物中心),DMEM/F12 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗(Hyclone),阿糖胞苷(Sigma),CO₂ 培养箱(Thermo),倒置相差显微镜(Nikon),解剖显微镜(舜宇),超净工作台(Airtech),凝胶成像系统、电泳仪(BioRAD),细胞培养板(Nest),逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(Fermenters),S-100 抗体(Abcam)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 取 SD 乳鼠,75%乙醇浸泡 30 s,断颈处死,

无菌切取双侧坐骨神经,在解剖显微镜下小心剥离神经外膜,将去膜的神经用显微剪剪成 0.5 cm 的小段,小心接种在 6 孔培养板上,每孔预先加入 DMEM/F12 培养基(含 10% 胎牛血清)0.5 mL,5% CO₂、37 °C 培养箱培养 24 h,可见体积稍大、形态不规则的细胞首先迁出,将植块取出,重新接种到新的 6 孔培养板培养,24 h 后加入阿糖胞苷(终浓度 5~10 mol/L),24 h 后吸去含阿糖胞苷的培养液,之后每 3 天更换培养液。显微镜下观察细胞长满培养板后吸去培养液,用 0.01 mmol/L PBS 洗 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min,显微镜下见细胞突起回缩、细胞体变圆变亮后立即加入含血清的培养液终止消化,用加样枪轻轻吹打培养板底,收集细胞培养液,1 200 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀,重悬后接种到新的培养板。取第 2 代细胞,分为 4 组,用 30 mmol/L 葡萄糖分别作用 0、2、4、6 d,取材细胞。

1.2.2 S-100 鉴定 SCs 显微镜下观察培养板中的细胞,选择细胞形态良好的微孔,吸去培养液,0.01 mmol/L PBS 漂洗,每孔加入 200 μL 多聚甲醛固定 10 min,3% H₂O₂ 避光封闭内源性过氧化物 30 min,5% 羊血清封闭 30 min,2% 羊血清稀释的 S-100 抗体 100 μL/孔,4 °C 培养 18~24 h,通用型 PV9000-1 37 °C 孵育 30 min,PV9000-2 37 °C 孵育 30 min,DAB 显色 5 min,单蒸水终止显色,显微镜下观察并拍照。

△ 通讯作者, E-mail: yyh8657@163.com。

1.2.3 RT-PCR 检测 β -actin 上、下游引物序列分别为 5'-GTA AAG ACC TCT ATG CCA ACA-3'、5'-GGA CTC ATC GTA CTC CTG CT-3', PDGF 上、下游引物分别为 5'-CTG CTG CTA CCT GCG TCT GG-3'、5'-GCA CTG CAC ATT GCG GTT ATT-3'。按 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA, PCR 反应条件为:95 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,循环 34 次;72 °C 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶(含 1:20 000 的 Gold View)电泳检测 PCR 产物(电压 280 V、电泳 15 min),凝胶成像系统拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 行单因素方差分析,显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

显微镜观察及 S-100 鉴定发现 SCs 纯度达 95% 以上,可用于后续研究,见图 1。长时间高糖培养使 SCs PDGF mRNA 表达在第 4、6 天分别下降 40% 和 50%,见图 2。

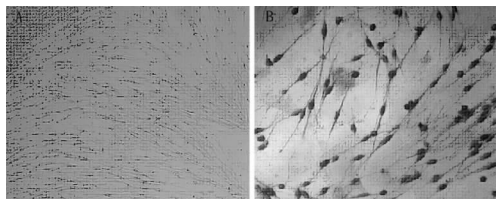


图 1 A:原代培养($\times 100$),可见 SCs 呈头对头、肩并肩,极性生长;B:S-100 免疫细胞化学染色图片($\times 400$),可见 SCs 细胞体及突起均染成棕色,细胞体呈长梭型,突起细长。

图 1 SCs 观察

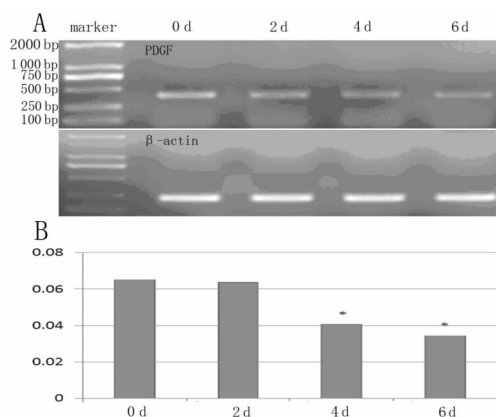


图 2 A:SCs 高糖培养不同时间后 PCR 产物电泳图;B:PCR 产物电泳带相对亮度比较图;*:与第 0、2 天 PDGF mRNA 表达水平比较, $P<0.05$ 。

图 2 PDGF mRNA PCR 产物电泳条带图及统计数据图

3 讨论

本研究发现 SCs 在高糖培养条件下 PDGF mRNA 表达下调,在高糖作用后第 4 天下降后一直保持低水平,第 4、6 天表达水平分别比第 0、2 天下降 40%~50%,显示高糖可抑制 SCs 合成 PDGF 的能力。

SCs 在糖尿病神经病变及周围神经损伤后的修复和再生中具有重要作用,其分泌的多种细胞因子参与修复过程,是组织工程的种子细胞之一,高糖造成周围神经损伤以及损伤后的修复都离不开 SCs 的参与。在 Wallerian 变性中,SCs 首先表现为增殖反应,进而发生合成和分泌功能的变化,对损伤的神经轴突起到营养和趋化作用。

氧化应激在周围神经病变过程中扮演着重要角色。体内

反应性氧化产物(ROS)生成过多可快速耗竭尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺),进而明显抑制 3-磷酸甘油醛脱氢酶活性而使磷酸丙糖浓度增高,导致丙酮醛和糖代谢终末产物生成增加,激活蛋白激酶 C,引起细胞损伤。还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶则可直接产生 ROS,并导致氧化应激^[1]。

Du 等^[2]发现高糖可增加三羧酸循环产物,使质子梯度超过阈值,进而使内皮细胞内超氧化物增加。Du 等^[3]也发现成模 2 个月的糖尿病大鼠视网膜氧自由基显著增加,这种变化可被 2-噻吩甲酰三氯丙酮(TTFA,特异性线粒体电子传递链抑制剂)阻断,证实超氧化物主要由线粒体产生。

PDGF 是一种在发育和病理过程中具有多种功能的蛋白质。在中枢神经系统,PDGF 促进神经元增殖和分化,表现为神经保护性作用。Zheng 等^[4]认为 PDGF-BB 激活 PI3-K/Akt 途径对抗氧化应激,以达到神经元保护作用。Peng 等^[5]发现 PDGF 通过诱导神经元突触可塑性基因 Arc/Arg3.1 而参与突触重建。

Anusaksathien 等^[6]发现 PDGF 可促进牙周软组织修复,且可以诱导神经纤维肉瘤来源的 SCs 增殖^[7],通过磷酸化 PDGF 受体而增加恶性周围神经鞘瘤来源的 SCs 侵袭活性^[8]。Lobsiger 等^[9]发现 NT3 与 PDGF-BB 联合作用可阻止 SCs 前体细胞凋亡。Lange 等^[10]发现 PDGF-BB 通过增加细胞内钙离子浓度而诱导产生 ROS,激活 ERK1/2 信号途径,促进血管生成。Salmeen 等^[11]发现在 PDGF 诱导健康人成纤维细胞表达磷酸化的视网膜母细胞瘤蛋白过程中,两种 NADPH 氧化酶 NOX4 和 DUOX2 是必不可少的。Adachi 等^[12]研究了非吞噬细胞 NADPH 氧化酶来源的 ROS 在 PDGF 诱导的肝星状细胞(HSCs)增殖中的作用,以及 PDGF-BB 诱导的 HSCs 增殖与 ROS 的清除和 NADPH 氧化酶抑制间的关系,发现 PDGF-BB 激活 NADPH 氧化酶,导致 ROS 的产生,并且 NADPH 氧化酶来源的 ROS 通过磷酸化 p38 MAPK 诱导 HSCs 增殖。

因此,PDGF 能增加 NADPH 氧化酶的活性,导致细胞内 NADPH 减少,高糖培养后细胞内 PDGF 下降是为了降低 NADPH 氧化酶的活性,从而减少 ROS 的产生,说明细胞为了在高糖培养条件下生存而代偿性减少 PDGF 表达。高糖培养条件下,细胞内 ROS 产生增加,反馈抑制 NADPH 氧化酶的活性,进一步抑制 PDGF 的表达,NADPH 氧化酶、ROS 与 PDGF 之间可能也存在负反馈抑制作用。

参考文献

- [1] Pandey D, Chen F, Patel A, et al. SUMO1 negatively regulates reactive oxygen species production from NADPH oxidases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(7):1634-1642.
- [2] Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site[J]. J Clin Invest, 2001, 108(9):1341-1348.
- [3] Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(11):1491-1499.
- [4] Zheng L, Ishii Y, Tokunaga A, et al. Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(6):1273-1284.
- [5] Peng F, Yao H, Bai X, et al. Platelet-derived growth factor-mediated induction of the synaptic plasticity gene Arc/(下转第 2694 页)

有 ptxP3 基因亚型的 MLVA-91 型菌株,这些菌株应当是以后分子流行病学监控的重点。同时,应收集更多来自不同地区的百日咳杆菌菌株,尤其是 2007 年以后的分离菌株,用于分子流行病学研究,再结合血清学、流行病学研究资料,从而更加全面地了解和认识国内百日咳杆菌流行现状和趋势,从而对有效预防和控制百日咳杆菌的流行以及制定新的百日咳疫苗免疫策略奠定基础。

参考文献

[1] 张秀梅.天津市宝坻区某小学 1 起百日咳聚集性发病的流行病学调查[J]. 职业与健康,2012,28(7):875-876.

[2] 李薇,黄海涛,刘勇,等.一起院内医务人员百日咳聚集性发病的流行病学调查[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(8):1021-1022.

[3] Elomaa A, Advani A, Donnelly D, et al. Strain variation among Bordetella pertussis isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(8):3681-3687.

[4] Elomaa A, Advani A, Donnelly D, et al. Population dynamics of Bordetella pertussis in Finland and Sweden, neighbouring countries with different vaccination histories[J]. Vaccine,2007,25(5):918-926.

[5] Packard ER, Parton R, Coote JG, et al. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates

from the UK[J]. J Med Microbiol,2004,53(5):355-365.

[6] Kurniawan J, Maharjan RP, Chan WF, et al. Bordetella pertussis clones identified by multilocus variable-number tandem-repeat analysis[J]. Emerg Infect Dis,2010,16(2):297-300.

[7] Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the Bordetella pertussis population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type[J]. J Clin Microbiol,2009,47(3):680-688.

[8] Kallonen T, He Q. Bordetella pertussis strain variation and evolution postvaccination[J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(7):863-875.

[9] Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence[J]. Emerg Infect Dis,2009,15(8):1206-1213.

[10] Zhang L, Xu Y, Zhao J, et al. Effect of vaccination on Bordetella pertussis strains, China[J]. Emerg Infect Dis,2010,16(11):1695-1701.

[11] Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, et al. Analysis of Swedish Bordetella pertussis isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage[J]. J Microbiol Methods, 2009,78(3):297-301.

(收稿日期:2012-09-29)

(上接第 2690 页)

Arg3. 1[J]. J Biol Chem,2010,285(28):21615-21624.

[6] Anusaksathien O, Webb SA, Jin QM, et al. Platelet-derived growth factor gene delivery stimulates ex vivo gingival repair [J]. Tissue Eng,2003,9(4):745-756.

[7] Badache A, De Vries GH. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB[J]. J Cell Physiol,1998,177(2):334-342.

[8] Aoki M, Nabeshima K, Koga K, et al. Imatinib mesylate inhibits cell invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor induced by platelet-derived growth factor-BB[J]. Lab Invest,2007,87(8):767-779.

[9] Lobsiger CS, Schweitzer B, Taylor V, et al. Platelet-derived growth factor-BB supports the survival of cultured rat Schwann

cell precursors in synergy with neurotrophin-3[J]. Glia,2000,30(3):290-300.

[10] Lange S, Heger J, Euler G, et al. Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species[J]. Cardiovasc Res,2009,81(1):159-168.

[11] Salmeen A, Park BO, Meyer T. The NADPH oxidases NOX4 and DUOX2 regulate cell cycle entry via a p53-dependent pathway [J]. Oncogene,2010,29(31):4473-4484.

[12] Adachi T, Togashi H, Suzuki A, et al. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells [J]. Hepatology,2005,41(6):1272-1281.

(收稿日期:2012-05-09)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。