

• 基础实验研究论著 •

CBS mRNA 在自发性高血压大鼠脑组织中的表达和分布

郭雅琼, 张 笠, 汪 湄, 刘 媛, 宁 燕

(甘肃省第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730000)

摘 要:目的 探讨自发性高血压大鼠(SHR)脑组织胱硫醚 β 合酶(CBS)的表达及分布情况。方法 选择 SD(Sprague Dawley)大鼠和 SHR 各 8 只, 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 real time-PCR 技术检测其大脑皮层、小脑、延髓、下丘脑、海马组织 CBS mRNA 的表达。结果 RT-PCR 检测, SHR 下丘脑、海马、小脑、大脑皮层及延髓组织的 CBS mRNA 表达水平分别为 0.93 ± 0.01 、 0.09 ± 0.03 、 0.36 ± 0.06 、 0.07 ± 0.01 及 0.39 ± 0.02 , 显著低于 SD 大鼠($P < 0.05$)。real-time PCR 检测, SD 大鼠脑组织 CBS mRNA 的表达水平从高到低依次为大脑皮层、海马、延髓、下丘脑、小脑。SHR 脑组织 CBS mRNA 的表达从高到低依次为下丘脑、延髓、大脑皮层、海马及小脑。SHR 脑组织 CBS mRNA 的表达水平低于 SD 大鼠($P < 0.05$)。结论 SHR 脑组织中 CBS mRNA 的表达下调, 可能通过中枢机制参与高血压的发病。

关键词: 胱硫醚 β 合酶; 硫化氢; 聚合酶链反应; 高血压; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)10-1243-03

CBS mRNA expression and distribution in brain tissue of spontaneous hypertensive rats

Guo Yaqiong, Zhang Li, Wang Mei, Liu Yuan, Ning Yan

(Department of Clinical Laboratory, the Second Provincial People's Hospital of Gansu, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cystathionine beta-synthase(CBS) expression and distribution in brain tissue of spontaneous hypertensive rats(SHR). **Methods** Eight SD(Sprague Dawley) rats and eight SHR were enrolled. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) and real time-PCR techniques were adopted to detect the CBS mRNA expression in their cerebral cortex, cerebellum, medulla oblongata, under thalamus, hippocampus tissue. **Results** According to RT-PCR, CBS mRNA expression levels in hypothalamus, hippocampus, cerebellum, cerebral cortex and medulla tissue of SHR were 0.93 ± 0.01 、 0.09 ± 0.03 、 0.36 ± 0.06 、 0.07 ± 0.01 and 0.39 ± 0.02 , respectively, which were significantly lower than those of SD rats($P < 0.05$). According to real-time PCR, CBS mRNA expression levels in brain tissue of SD rats from high to low in order were cerebral cortex, hippocampus, medulla oblongata, hypothalamus and cerebellum. Those of SHR from high to low in order were hypothalamus, medulla, cortex, hippocampus and cerebellum. CBS mRNA expression levels in brain tissue of SHR were lower than those of SD rats($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of CBS mRNA in brain tissue of SHR is down-regulated, which may be involved in the pathogenesis of hypertension via central mechanism.

Key words: cystathionine beta-synthase; hydrogen sulfide; polymerase chain reaction; hypertension; rats

硫化氢是一种无色、有臭鸡蛋气味的高水溶性气体, 最初被认为能通过抑制呼吸中枢而致人死亡^[1]。1989 年在牛、鼠和人等哺乳动物脑中发现有较高浓度的内源性硫化氢存在($50 \sim 160$ mmol/L)。内源性硫化氢由 L-半胱氨酸在胱硫醚 β 合酶(cystathionine beta-synthase, CBS)、胱硫醚- γ 裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)及半胱氨酸转移酶的催化下而产生, 具有抑制平滑肌细胞增殖、舒张血管等多种生理功能^[2]。在中枢神经系统内, 硫化氢能通过选择性增强 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体介导的反应, 易化海马的长时程动作电位, 调节下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)的释放, 松弛脑血管平滑肌, 抗氧化应激等^[3-5]。笔者前期研究表明, 内源性硫化氢可能通过中枢机制参与心血管活动的调节^[6-8], 推测高血压状态下, 脑组织内局部硫化氢浓度的改变可能参与了高血压发病, 但有关自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)脑内 CBS 的表达情况尚未见文献报道。因此, 本实验采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 real time-PCR 检测 CBS mRNA 在 SHR 脑组织中的分布及表达情况, 为探讨脑组织 CBS mRNA 表达

水平的改变是否参与高血压的发病提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级成年雄性 SD(Sprague Dawley)大鼠和 SHR 各 8 只, 分别购自甘肃中医学院实验动物中心[动物许可证: SCXR(甘)2005-0007]和北京维通利华实验动物技术有限公司[动物许可证: SCXK(京)2002-0003]。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂: RNAiso Plus、鸟类成髓细胞性白血病病毒(avian myeloblastosis virus, AMV)逆转录酶、dNTP Mixture、Oligo(dT)₁₈ 引物、TaKaRa SYBR Ex Script™ real-time PCR 试剂盒均购自大连宝生物有限公司; 引物由大连宝生物有限公司设计合成。主要仪器: Stratagene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司)、RM6240 生物信号采集处理系统(成都仪器厂)。

1.3 血压、心率的测定 准确称量大鼠质量后, 腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉, 右股动脉、股静脉插管, 动脉导管连接压力传感器并通过 RM6240 生物信号采集处理系统监测血压和心率, 记录 20 min。用颈椎脱臼法处死, 于冰盒上迅速分离大脑皮层、小脑、延髓、下丘脑、海马组织, 置-80℃冰箱保存备用。血压以平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)表

示,MAP=舒张压+(收缩压-舒张压)÷3。

1.4 脑组织 CBS mRNA 的 RT-PCR 检测 取-80℃冰箱冻存标本,称质量,加入 RNAiso Plus 进行匀浆,经氯仿、异丙醇过滤、沉淀后,提取总 RNA,以此为模板,用 Oligo(dT)₁₈ 引物、AMV 逆转录酶合成 cDNA。PCR 反应体系(25 μL):Taq 聚合酶 0.25 μL,MgCl₂ 2.5 μL,10×Buffer 2.5 μL,dNTP Mixture 4.0 μL,模板 DNA 1.0 μL,目的基因及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)基因上、下游引物各 0.5 μL,加灭菌蒸馏水至 25 μL。反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂凝胶电泳,采用凝胶成像系统扫描,并进行定性分析。

1.5 脑组织 CBS mRNA 的 real-time PCR 检测 RNA 提取及逆转录同 RT-PCR。PCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL,ROX Reference Dye II (50×) 0.5 μL,模板 DNA 1.0 μL,上、下游引物各 0.5 μL,加水至 25 μL。反应条件:95℃预变性 2 min,95℃变性 10 s,63℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环,引物序列见表 1。通过分析融解曲线和扩增曲线确认目的基因和内参基因的 Ct 值及 PCR 反应的特异性;采用 2^{-ΔΔCt} 法[ΔCt=Ct_{目的基因}-Ct_{GAPDH},ΔΔCt=ΔCt_{实验组}-ΔCt_{对照组}]分析 CBS 的相对表达水平,将 SD 大鼠的表达水平视作“1”,进行样品间相对表达水平的比较^[9]。

表 1 real time-PCR 反应引物

基因	引物	循环数	片段大小(bp)
CBS	F:5'-TCA TCC TGC CCG ACT CTG TG-3'	40	148
	R:5'-GGT GCT GAT AGG CTC AGC TCT TG-3'	40	
GAPDH	F:5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3'	40	143
	R:5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'	40	

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单样本 *t* 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SD 大鼠和 SHR 的血压和心率 SD 大鼠、SHR 的血压分别为(105.07±6.14)、(153.39±5.23) mm Hg,其心率分别为(398.77±25.29)、(402.44±26.36)次/min。SHR 血压显著高于 SD 大鼠($P<0.05$),但二者心率的差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 SD 大鼠和 SHR 脑组织 CBS mRNA 的表达

2.2.1 RT-PCR 检测 SD 大鼠和 SHR 下丘脑、海马、小脑、大脑皮层及延髓组织的 RT-PCR 检测均显示单一扩增产物,提示二者上述组织中均有 CBS mRNA 表达,片段长度与目的产物相符,且 SD 大鼠脑组织电泳条带的亮度明显高于 SHR,见图 1。

2.2.2 real-time PCR 检测 设 SD 大鼠下丘脑、海马、小脑、大脑皮层及延髓组织的 CBS mRNA 表达水平为“1”,SHR 上述组织的 CBS mRNA 表达水平分别为 0.93±0.01、0.09±0.03、0.36±0.06、0.07±0.01 及 0.39±0.02,后者显著降低,二者差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 SD 大鼠脑组织 CBS mRNA 的分布和表达 以 SD 大鼠下丘脑 CBS mRNA 的表达作为对照,将其表达水平设为“1”,

然后与其他脑组织 CBS mRNA 的表达进行比较。real-time PCR 结果显示:SD 大鼠海马、大脑皮层、延髓组织 CBS mRNA 的表达水平分别为 4.63±0.03、10.90±0.09、1.99±0.01,其中以大脑皮层的表达水平最高,差异均有统计学意义($P<0.05$),而小脑 CBS mRNA 的表达水平较低(0.86±0.01, $P<0.05$)。提示 SD 大鼠脑组织 CBS mRNA 的表达水平从高到低依次为:大脑皮层、海马、延髓、下丘脑、小脑。

2.4 SHR 脑组织 CBS mRNA 的分布和表达 以 SHR 下丘脑 CBS mRNA 的表达作为对照,将其表达水平设为“1”,然后与其他脑组织 CBS mRNA 的表达进行比较。real-time PCR 结果显示:SHR 海马、延髓、皮层和小脑组织 CBS mRNA 的表达水平分别为 0.50±0.06、0.83±0.03、0.79±0.01 及 0.33±0.05,其中以小脑的表达最低(0.33±0.05, $P<0.001$)。

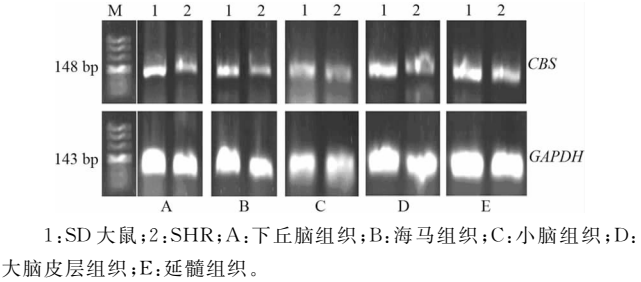


图 1 SD 大鼠及 SHR 脑组织的 RT-PCR 检测

3 讨 论

内源性硫化氢是继一氧化氮和一氧化碳之后发现的气体信号分子,由 CBS、CSE 和半胱氨酸转移酶催化产生,中枢神经系统内硫化氢主要通过 CBS 代谢产生,且 CBS 的表达具有组织特异性^[2]。本实验结果表明,正常大鼠及 SHR 脑组织中,延髓、下丘脑、海马、小脑、大脑皮层等部位均有 CBS mRNA 的表达。real time-PCR 结果进一步提示,CBS mRNA 在正常大鼠脑组织内的表达从高到低依次的大脑皮层、海马、延髓、下丘脑及小脑,SHR 脑组织 CBS mRNA 的表达从高到低依次为下丘脑、延髓、大脑皮层、海马及小脑。SHR 脑组织各部位 CBS mRNA 的表达水平均低于 SD 大鼠,尤其是大脑皮层、海马、小脑和延髓。因 SHR 大脑皮层和海马 CBS mRNA 表达降低而产生的生理学意义有待进一步研究。

延髓是心血管活动的基本中枢。头端延髓腹外侧区(rostrolateral ventrolateral medulla,RVLM)及所含的前交感神经元不仅接受尾端延髓腹外侧区和下丘脑室旁核等多个心血管中枢的传入,同时发出纤维与脊髓中间外侧柱交感节前神经元发生单突触联系,以控制外周交感神经活动,是中枢交感输出的最后共同通路^[10]。孤束核是压力感受性反射的第一个接替核,接受颈动脉窦和主动脉弓传入神经的信号传递,在压力感受性反射中起重要作用^[11]。以往研究表明,在 SD 大鼠或 SHR 侧脑室注射硫化氢供体——氢硫化钠,能通过抑制 RVLM 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,NADPH)氧化酶的活性、减少活性氧的生成或开放 ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive K⁺ channels,KATP),而产生降低大鼠血压和心率的心血管效应^[6-7,12]。升高大鼠孤束核内硫化氢浓度(孤束核注射微量氢硫化钠或 S-腺苷蛋氨酸),能够通过开放 KATP 或激动谷氨酸受体机制降低血压和减慢心率^[8]。上述结果表明,硫化氢通过延髓机制调节心血管活动。本实验结果提示,CBS mRNA 在正常大鼠和 SHR 延髓中均有分布,且 SHR 延髓组织 CBS mRNA 的(下转第 1247 页)

抵抗。HHEX-IDE 基因区域是一个跨度为 295 kb 的基因组区域,包含多个 T2DM 相关 SNP,涉及 *HHEX*、*KIF11*、*IDE* 基因。其中,HHEX 基因编码含同源框的转录因子,高表达于胚胎及成熟的胰腺中,其转录受 Wnt 信号通路调控;*HHEX* 基因敲除小鼠还可出现胰腺发育缺陷;而 *IDE* 基因则编码一种细胞间金属肽酶,其降解产物包括胰岛素和多种淀粉样蛋白等。*CDKN2A* 和 *CDKN2B* 基因位于 9 号染色体(9q21),分别编码 P16INK4a 和 P15INK4b 蛋白,这 2 种蛋白均高表达于胰岛细胞中。动物模型研究显示,P16INK4a 蛋白的过度表达将导致胰岛细胞分裂能力的降低;同样,P15INK4b 异常高表达也可引起小鼠胰岛发育不全并出现糖尿病症状。本研究发现,*CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661)、*TCF7L2*(rs7903146)及 *HHEX-IDE*(rs1111875)这 3 个 SNP 检测位点的基因分布差异无统计学意义,与 Shaat 等^[6]及 Cho 等^[10]的研究结果并不一致,也许与样本数量及地域差异有关,另外,在 *TCF7L2*(rs7903146)的基因分型中,T 的等位基因携带率极小,检验效能无法保证,也可能与结果差异有一定关系。因此,接下来的研究应尽可能增大样本量及样本分布地区,进一步完善数据,为 GDM 的易感基因调查提供更全面、可靠的分析。

糖尿病是威胁人类健康的重要疾病之一,其持续增长的流行病趋势构成严重的全球性公共卫生问题。因此,通过对基因多态性与 GDM 易感性关系的研究,阐明基因型和表型之间的联系,对认识 GDM 的发生机制,进一步阐明其发病的分子遗传学机制,预测转归具有重要意义,并为个性化治疗奠定坚实的理论基础,可有效改善妊娠结局,减少产科合并症的发生,避免或延缓 GDM 发展为 T2DM。

参考文献

[1] Hummel S,Much D,Rossbauer M,et al. Postpartum outcomes in women with gestational diabetes and their offspring:POGO study design and first-year results[J]. Rev Diabet Stud,2013,10(1):49-

(上接第 1244 页)

表达水平明显低于正常大鼠,提示内源性硫化氢在延髓组织局部产生减少,可能与高血压发病有一定的关联。

综上所述,本实验研究表明,正常大鼠及 SHR 脑组织中均有 *CBS* mRNA 表达,且 SHR 脑组织中 *CBS* mRNA 的表达均下调,提示脑组织内源性硫化氢生成减少可能通过延髓等中枢机制参与高血压的发病。

参考文献

[1] Burnett WW,King EG,Grace M,et al. Hydrogen sulfide poisoning:review of 5 years' experience[J]. Can Med Assoc J,1977,117(11):1277-1280.
[2] Łowicka E,Bettowski J. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists[J]. Pharmacol Rep,2007,59(1):4-24.
[3] Kimura H. Hydrogen sulfide as a biological mediator[J]. Antioxid Redox Signal,2005,7(5/6):778-780.
[4] Zhao W,Zhang J,Lu Y,et al. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) Channel opener[J]. EMBO J,2001,20(21):6008-6016.
[5] Kimura Y,Goto Y,Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria [J]. Antioxid Redox Signal,2010,12(1):1-13.

57.
[2] Reece EA,Assimakopoulos E,Hagay Z,et al. Assessment of carbohydrate tolerance in pregnancy[J],Obstet Gynecol Surv,1991,46(1):1-14.
[3] Ryan AS,Mclenithan JC,Zietowski GM. Accelerated metabolic susceptibility to type 2 diabetes in older women with a history of gestational diabetes[J]. Endocr Connect,2013,2(2):79-86.
[4] Steinthorsdottir V,Thorleifsson G,Reynisdottir I,et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes [J]. Nat Genet,2007,39(6):770-775.
[5] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls[J]. Nature,2007,447(7145):661-678.
[6] Shaat N,Lernmark A,Karlsson E,et al. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus[J]. Diabetologia,2007,50(5):972-979.
[7] Watanabe RM,Allayee H,Xiang AH,et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans[J]. Diabetes,2007,56(5):1481-1485.
[8] National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance[J]. Diabetes,1979,28(12):1039-1057.
[9] Fu W,Wang Y,Wang Y,et al. Missing call bias in high-throughput genotyping[J]. BMC Genomics,2009,10:106.
[10] Cho YM,Kim TH,Lim S,et al. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population[J]. Diabetologia,2009,52(2):253-261.

(收稿日期:2013-12-09)

[6] 刘文庆,柴琛,曹农,等. 内源性硫化氢的中枢心血管效应与 KATP 通道开放机制有关[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(33):6527-6530.
[7] Liu WQ,Chai C,Li XY,et al. The cardiovascular effects of central Hydrogen sulfide are related to K(ATP) channels activation[J]. Physiol Res,2011,60(5):729-738.
[8] Qiao W,Yang L,Li XY,et al. The cardiovascular inhibition functions of Hydrogen sulfide within the nucleus tractus solitarii are mediated by the activation of KATP channels and glutamate receptors mechanisms[J]. Pharmazie,2011,66(4):287-292.
[9] Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure[J]. Nat Rev Neurosci,2006,7(5):335-346.
[10] Michelini LC. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals[J]. Curr Hypertens Rep,2007,9(3):214-221.
[11] 于海云,马红,曹银祥,等. 硫化氢对 SHR 大鼠的中枢心血管效应及其机制探讨[J]. 中国分子心脏病学杂志,2011,11(4):235-240.
[12] Hui Y,Du J,Tang C,et al. Changes in arterial hydrogen sulfide (H(2)S) content during septic shock and endotoxin shock in rats [J]. J Infect,2003,47(2):155-160.

(收稿日期:2013-12-09)