

[文章编号] 1000-2200(2009)05-0376-03

· 基础医学 ·

阿霉素中毒大鼠肺组织中 β -防御素-2 的基因表达

于影, 胡杰, 关宿东

[摘要] **目的:**探讨阿霉素(adriamycin, ADM)所致大鼠急性肺损伤对肺组织 β -防御素-2 (BD-2) 基因表达的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分成 ADM 低剂量组(10 mg/kg)、中剂量组(20 mg/kg)、高剂量组(40 mg/kg)及对照组, 每组 10 只。模型组分别一次性腹腔注射不同剂量 ADM 制备急性肺损伤模型; 对照组用生理盐水腹腔注射。3 天后剖胸取肺, 采用半定量 RT-PCR 技术检测肺组织 BD-2 mRNA 表达的变化。**结果:**ADM 中、高剂量组大鼠 BD-2 基因表达均较对照组明显上调($P < 0.01$), 低剂量组与对照组无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**ADM 所致大鼠急性肺损伤中, 肺组织 BD-2 的 mRNA 表达水平上调。

[关键词] 阿霉素; 肺; β -防御素-2; 基因表达; 大鼠

[中国图书资料分类号] R 979.14 [文献标识码] A

Expression of β -defensin-2 gene in the lung tissue of rats intoxicated by adriamycin

YU Ying, HU Jie, GUAN Su-dong

(Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of acute pulmonary injury induced by adriamycin (ADM) on β -defensin-2 (BD-2) gene expression in rats. **Methods:** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: low dose ADM group, medium dose group, high dose group and control group. The ADM groups were administered ADM of different doses (10, 20 and 40 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹). Meanwhile, normal saline was given to the control group. All the rats were killed three days later, and the lung tissues were removed by thoracotomy. The expression of BD-2 at mRNA level was determined by RT-PCR analysis. **Results:** The level of BD-2 gene expression in medium-dose and high-dose groups was up-regulated significantly compared with that in the control group ($P < 0.01$); and the difference had no statistical significance between the low-dose group and the control ($P > 0.05$). **Conclusions:** The level of BD-2 gene is up-regulated in the lung tissues of rats with acute pulmonary injury induced by ADM.

[Key words] adriamycin; lung; β -defensin-2; gene expression; rats

阿霉素(adriamycin, ADM)是临床常用的广谱、高效蒽环类抗肿瘤药物,主要用于治疗乳腺癌、肺癌、卵巢癌、甲状腺癌、软组织瘤等,但其对正常机体组织亦有一定的损伤作用。新近研究表明,使用 ADM 除了对心脏、肾脏产生严重副作用外,还会损害膈肌的收缩功能和肺功能^[1,2]。 β -防御素-2(β -defensin-2, BD-2)主要分布于皮肤和呼吸道上皮细胞,尤其在肺部,是具有广谱高效抗菌作用的小分子抗菌肽,不仅具有杀灭细菌、病毒、真菌、螺旋体等灭菌作用,还在机体的免疫炎症反应中发挥重要作用^[3]。本实验旨在观察 ADM 致大鼠急性肺损伤模型中肺组织 BD-2 的基因表达水平变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 采用雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,由蚌埠医学院实验动物中心提供。随

机分成 ADM 低剂量组(10 mg/kg)、中剂量组(20 mg/kg)、高剂量组(40 mg/kg)和对照组,每组 10 只。模型组分别一次性腹腔注射不同剂量 ADM 制备急性肺损伤模型;对照组用等量生理盐水腹腔注射。各组大鼠均自由饮水进食喂养 3 天后,20% 氨基甲酸乙酯(5 ml/kg)腹腔注射麻醉,断头处死剖胸取肺。

1.2 主要药品和试剂 ADM 购自深圳万乐药业有限公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自 MBI Fermentas 公司;引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 肺组织病理切片观察 肺组织取材后,10% 甲醛固定,石蜡包埋切片。HE 染色后行常规病理观察。

1.3.2 肺组织总 RNA 的提取 快速取左肺组织约 100 mg 置液氮速冻,置 -80℃ 冰箱保存备用,准备提取总 RNA。采用 Trizol 一步法提取组织总 RNA,并于 260 nm 和 280 nm 处测定其 OD 值,计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,观察总 RNA 的纯度。

1.3.3 RT-PCR 检测 BD-2 mRNA 表达 取总 RNA

[收稿日期] 2008-09-26

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学基金资助项目(kj2007B018)

[作者单位] 蚌埠医学院 生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 于影(1981-),女,助教。

[通讯作者] 关宿东,研究生导师,教授。

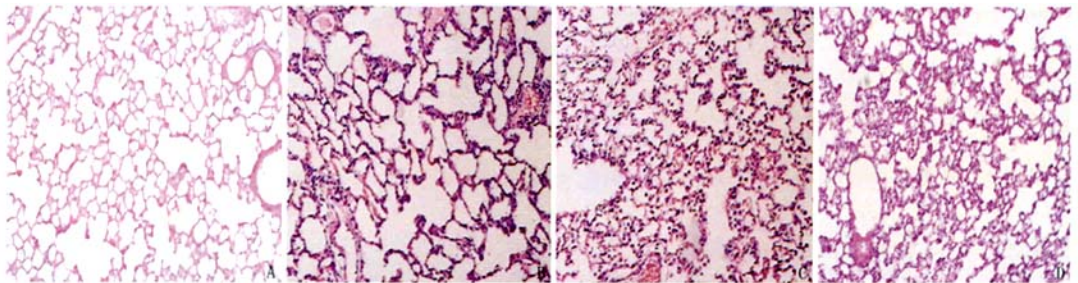
3 μl 为模板,用随机引物逆转录合成 cDNA,以此 cDNA 1.5 μl 为模板,进行 PCR 扩增。所用 BD-2 引物:上游 5'-ATT TCT CCT GGT GCT GCT GT-3';下游 5'-TCC ACA AGT GCC AAT CTG TC-3',预计扩增产物长 132 bp。以 β -actin 为内参照,引物上游:5'-GAT GGT GGG TAT GGG TCA GAA GGA C-3';下游:5'-GCT CAT TGC CGA TAG TGA TGA CT-3',预计扩增产物长 630 bp。PCR 反应终体积为 25 μl ,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。将 4 μl PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色。图像分析仪对

凝胶中每一泳带进行光密度扫描定量,结果以目的基因与内参对照的积分吸光度比值(BD-2/ β -actin ratio)表示 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

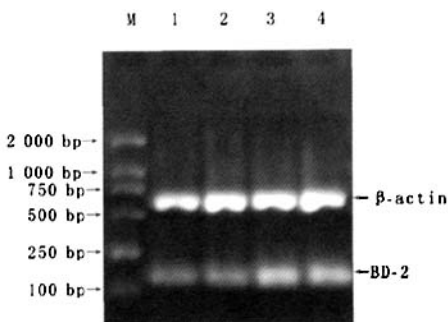
2.1 肺组织常规病理切片观察结果 与对照组相比,中剂量和高剂量 ADM 组可看到肺泡隔稍有增宽,肺组织灶内出血,肺内质炎症反应明显,以中性粒细胞渗出为主;而低剂量组与对照组相比无统计学意义。表明急性肺损伤程度与 ADM 有剂量依赖性(见图 1)。



A: 对照组肺组织,肺泡结构清晰(HE $\times 100$); B: 低剂量组肺组织,肺泡结构清晰,无明显细胞浸润(HE $\times 100$); C: 中剂量组肺组织,肺泡隔稍有增宽,肺组织灶内出血,肺内质炎症反应,以中性粒细胞渗出为主(HE $\times 100$); D: 高剂量组肺组织,肺泡隔稍有增宽,肺组织灶内出血,肺内质炎症反应明显(HE $\times 100$)

图 1 阿霉素中毒大鼠肺组织光镜下变化

2.2 大鼠肺组织 BD-2 的 mRNA 表达的变化 4 组大鼠肺组织提取的总 RNA,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.8 ~ 2.0;使用 RBD-2 特异性引物进行 RT-PCR,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 132 bp 处有核苷酸片段的表达,与预计扩增片段大小相符(见图 2)。



M: Marker; 1: 对照组; 2: 低剂量组; 3: 中剂量组; 4: 高剂量组
图 2 不同剂量阿霉素处理组大鼠肺组织 BD-2 的 mRNA 表达检测结果

2.3 大鼠肺组织 BD-2 基因 mRNA 表达 ADM 模型中剂量组和高剂量组 BD-2 基因表达均明显高于对照组($P < 0.01$),而低剂量组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 不同剂量大鼠急性肺损伤 BD-2 mRNA 表达的比值 (%) ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	BD-2 (%)	F	P	MS _{组内}
高剂量组	1.03 \pm 0.14 *	12.34	<0.01	0.014
中剂量组	0.92 \pm 0.11 ** 0.76 \pm 0.12			
对照组	0.70 \pm 0.10			

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

蒽环类抗癌药物于 20 世纪 60 年代开始应用于临床,是应用最广泛的抗癌药物之一,因其抗癌谱广、抗瘤活性强,在肿瘤化疗中获得很高评价^[4]。

ADM 是临床上治疗常见实体瘤最有效的药物之一。ADM 可以诱导 NF- κ B 的表达,引起 NOS 活性升高,造成 DNA 损伤^[5,6],长期应用对心、肝、肾等内脏及许多正常细胞有较严重的损伤^[7]。本实验采用一次性腹腔注射 ADM 的方法复制不同剂量 ADM 致大鼠急性肺损伤模型,病理切片观察到,与对照组相比,中剂量和高剂量 ADM 组可看到肺泡隔稍有增宽,肺内质炎症反应明显,以中性粒细胞渗出为主;而低剂

量组与对照组相比无统计学意义,表明急性肺损伤程度与 ADR 有剂量依赖性。

本研究采用半定量 RT-PCR 技术测定大鼠肺组织 BD-2 基因的表达水平,结果提示 BD-2 基因在 ADM 中剂量组和高剂量组大鼠肺脏中表达明显上调。引起 BD-2 基因表达升高的可能机制是:(1)大鼠 BD-2 基因启动子区域的顺式作用元件包括 NF- κ B、NF-IL₆ 等转录因子的结合位点^[8],而 ADM 刺激大鼠后通过细胞内信号转导途径可活化 NF- κ B、NF-IL₆ 等转录因子,活化的转录因子与顺式作用元件的结合将在转录水平上上调 BD-2 基因的表达。(2)ADM 大鼠机体内大量炎性介质的释放可能诱导 BD-2 基因表达上调。本实验观察到 ADM 致急性肺损伤可上调肺组织中 BD-2 的表达水平,提示异常的 BD-2 表达水平可能在肺部感染、急性肺损伤的发生、发展中起着一定的作用,但其确切作用有待于进一步阐述。

近年来的研究还发现防御素在抗肿瘤方面的应用,有些肿瘤细胞能抵抗 TNF- α 或 NK 细胞的作用,但不能抵抗防御素的作用。防御素能杀伤多种肿瘤细胞,特别是对抗肿瘤坏死因子的 U9TR 细胞系及抗 NK 细胞毒因子的小鼠淋巴瘤细胞系(YAC1)和单核细胞白血病(U937)细胞系具有杀伤活性^[9]。另外应用单克隆抗体的特异结合性,将防御素的细胞毒性多肽引入肿瘤的治疗领域,建立由防御素介导的特异性杀伤肿瘤技术来治疗肿瘤^[10]。

本研究结果提示,对需要用 ADM 化疗的肺癌患者,除防止心脏毒性外^[1],还要注意肺部感染及损伤,以防止诱发或加重呼吸衰竭。今后可以进一步深

入对 β -防御素合成途径、生物学活性等方面的研究,开发出高效能抗肿瘤多肽类新药。

[参 考 文 献]

- [1] 关宿东,葛 敏.牛磺酸对阿霉素致膈肌的保护作用[J].中国药理学通报,2001,17(2):220-222.
- [2] Andriollo M, Favier A, Guiraud P. Adriamycin activates NF- κ B in human lung carcinoma cells by IkappaBalpha degradation[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 413(1):75-82.
- [3] 周 慧,黄 宁,陈新年,等.大鼠不同发育阶段 β -防御素-2 基因在肺组织的表达研究[J].中国病理生理杂志,2001,17(3):226.
- [4] 赵先英,张 涛,刘毅敏.右丙亚胺对萘环类抗肿瘤抗生素心脏保护作用的研究进展[J].癌症,2001,20(4):439.
- [5] Wang S, Kotamraju S, Konorev E, et al. Activation of nuclear factor- κ B during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic; the role of hydrogen peroxide[J]. Biochem J, 2002, 367(Pt 3):729-740.
- [6] Chlopkiwicz B, Gruber B. The study on adriamycin induced DNA scissions in human cells with different activity of some antioxidant enzymes[J]. Acta Pol Pharm, 2000, 57(5):359-362.
- [7] 何 伟,秦续军,海春旭,等.复合抗氧化剂对阿霉素化疗引起的大鼠肝癌、心脏损伤的保护作用[J].第四军医大学学报,2004,25(13):1165-1167.
- [8] Jia HP, Mills JN, Barahmand-Pour F, et al. Molecular cloning and characterization of rat genes encoding homologues of human β -defensins[J]. Infect Immun, 1999, 67(9):4827-4833.
- [9] Pleskach V, Aleshina G, Artsybasheva I, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes[J]. Immunol, 2003, 171:3262-3269.
- [10] 张 伟,朱连勤,赵凤立,等. β -防御素研究进展[J].动物医学进展,2006,27(5):47-50.

网络发送返修稿件注意事项

作者在接到修改稿件的通知,稿件修改完毕后,要将修改单、原稿、一修稿邮寄至编辑部,并需经网络发送返修稿件。网络发送修改稿件应注意以下几点:(1)作者所发送的电子文件名称必须与该稿件名称完全一致,并附加“修改稿”字样及稿件编号、作者姓名;(2)作者在向本刊发送电子邮件时应在“主题”栏中录入:稿号、姓名(第一作者)及与文章名称相同的文件名,并以附件的形式发送;(3)本刊只接受以“Word”形式发送的文件,文章内所涉及的图、表均应插入在“Word”文件内,不要另附其他格式的文件,即文章内所涉及的所有内容,均应在一个“Word”文件内呈现;(4)电子文件格式:文章标题2号字,正文4号字,页面上空2cm,下、左、右各空1.5cm,行间距为默认值,无需修改。