doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.003

基于 Wnt/β-catenin 信号转导通路的电针抗抑郁中枢效应机制研究*

王 珑¹ 贾朋丽² 田旭升² 李艳秋¹ 于婷婷¹ 申 颖² 王作山² 孙忠人^{2Δ} 邹 伟^{2Δ} (1黑龙江中医药大学附属第一医院 黑龙江哈尔滨 150040;2 黑龙江中医药大学 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要目的:基于 Wnt/β-catenin 信号转导通路探究电针抗抑郁中枢效应机制。方法:运用随机数字表法将 144 只 SD 大鼠分为空 白、模型、电针及西药组,每组又分别依据干预时间进一步分为 7d、14d、21d 3 个亚组。空白组不接受任何刺激。模型组大鼠采取禁 食等方式构建 CUMS 抑郁大鼠模型。电针组选取百会、神庭穴施以电针。西药组每日灌胃给予氟西汀。分别于第 1d、7d、14d、21d 观测大鼠行为学指标改变情况。采用蛋白免疫印迹法检测大鼠海马内 Wnt/β-catenin 信号转导通路中关键蛋白表达。结果:模型组 大鼠 OFT、SPT 评分均较空白组有所下降,体质量减轻,电针组和西药组 OFT、SPT 评分及体质量检测则较模型组明显上升(P< 0.05)。模型组各亚组大鼠 wnt1 及 β-catenin 蛋白表达水平下降,GSK-3β 蛋白表达水平有所上升,与模型组相比,电针及西药组大 鼠 Wnt/β-catenin 通路中蛋白含量趋近正常水平,且两组与模型组组间比较差异具有统计学意义(P<0.05)。结论:电针可通过调控 海马内 Wnt/β-catenin 信号转导通路中关键蛋白的表达,减轻抑郁症状。

关键词:抑郁;Wnt/β-catenin 信号转导通路;电针;行为学;蛋白表达水平

中图分类号:R-33;Q593.2;R245;R749 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)06-1011-05

Mechanism of Electroacupuncture Anti-depression Central Effect Based on Wnt/β-catenin Signal Transduction Pathway*

WANG Long¹, JIA Peng-Ir², TIAN Xu-sheng², LI Yan-qiu¹,

YU Ting-ting', SHEN Ying², WANG Zuo-shan², SUN Zhong-ren^{2A}, ZOU Wei^{2A}

(1 Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

2 The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT Objective: Probe into the central effect mechanism of electroacupuncture on anti-depression based on Wnt/ esf-catenin signal transduction pathway. **Methods:** 144 SD rats were divided into blank group, model group, electroacupuncture group and western medicine group by random number table method. The blank group did not receive any stimulation. The model group was established by fasting and other methods. The electroacupuncture group selects baihui and shenting cave to perform electroacupuncture. In the western medicine group, fluoxetine was administered daily by gavage. Changes in behavioral indicators were observed on 1d, 7d, 14d and 21d, respectively. The key protein expressions in the Wnt/ hygro-catenin signal transduction pathway in the hippocampus of rats were detected by using protein western blotting. **Results:** The OFT, SPT scores and body weight of model group were obviously lower than those of the control group, while the OFT, SPT scores and body weight of the electroacupuncture group and the western medicine group were decreased, and the expression levels of gsk-3 human protein were increased. Compared with the model group, the protein levels in Wnt and hygr-catenin pathways in rats in the electroacupuncture and western medicine group were close to normal, and the comparison between the two groups and the model group was statistically significant(P<0.05). **Conclusion:** Electroacupuncture can reduce depressive symptoms by regulating the expression of key proteins in the Wnt/ human-catenin signal transduction pathway in the hippocampus.

Key words: Depression; Wnt/β-catenin signal pathway; Electroacupuncture; Behavior; Protein expression level

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; R245; R749 Document code: A Article ID: 1673-6273(2019)06-1011-05

作者简介:王珑(1978-),男,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:针刺抗抑郁中枢机制研究,E-mail: wlkeyan@163.com △通讯作者:孙忠人(1960-),男,主任医师,博士研究生导师,研究方向:针灸防治脑脊髓神经病研究,E-mail: 1035186010@qq.com 邹伟(1965-),男,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中西医结合治疗脑部疾病的临床和机理研究, E-mail: kuangzou2003@yahoo.com.cn

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81303044);黑龙江省自然科学基金项目(H2015036);中国博士后科学基金项目 (2013M531080,2016T90320);哈尔滨市科技创新人才专项(2014RFQXJ134);黑龙江中医药大学创新人才支持计划项目资助; 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(yjscx2017033,2018yjscx022)

⁽收稿日期:2018-10-18 接受日期:2018-11-13)

前言

抑郁症是以持续而显著的兴趣缺失及情绪消沉为主要临 床表现的常见精神障碍综合性疾病,临床可见心境低落及情绪 消沉,甚则悲观厌世有自杀行为,其病因病机十分复杂^[14],相关 阐释目前仍不十分明确。

Wnt 信号转导通路参与生物整个生命周期^[5]。研究表明调 控 Wnt 信号可能是改善情绪障碍类疾患的一个重要靶点^[6]。大 部分抑郁患者常处于急慢性应激刺激境况中,而此类应激事件 和异常的 Wnt 信号之间存在联系^[7],但其具体的机制尚未被完 全阐明。本研究以 Wnt/β-catenin 信号转导通路为切入点,采用 电针为主要治疗手段,进一步探寻抑郁证的发病机制,以期弥 补抑郁症脑内神经传导通路相关的针灸疗法获效机制研究的 不足。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康 SD 雄性大鼠 180 只购于黑龙江中医药大学 动物实验中心[动物许可证号:SYXK(黑)2013-012],体质量控 制在 200± 20g,适应性饲养一周。其后,通过旷场实验筛选出 144 只水平与垂直总计数在 30-120 之间的大鼠纳入实验,采用 随机数字表法将其分为空白组、模型组、电针组和西药组,每组 36 只,在此基础上每组再依照干预时间不同分为 7d、14d、21d 3 个亚组,每亚组 12 只。实验过程中对动物的处置符合国家科技 部 2006 年颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

1.2 主要仪器及试剂

针具:华佗牌针灸针(规格:0.25 mm× 25 mm);电针仪:青 岛鑫升实业有限公司 G6085-II 型;电热恒温箱:上海一恒;氟西 汀:礼来苏州制药有限公司 (批号:4501A);wntl 抗体:Abcam (批号:AB85060,规格 100mg);β-catenin 抗体:CST(批号9582S, 规格 100 μL);GSK-3β 抗体:CST(批号 9315S,规格 100 μL)。

1.3 模型构建

除空白组外,余组皆通过旷场实验筛选后次日进行相关造 模操作,参照 Willner 和 Hennessy^{□1}等的建模方式构建 CUMS 抑郁大鼠模型,造模动物全部接受孤养。每一亚组大鼠在各自 实验期间内需接受各项不同刺激,项目主要涉及禁食(24h)、禁 水(24h)、夹尾(3 min)、冰水游泳¹⁸(10℃,5 min)、水平震荡(2 min)、昼夜颠倒¹⁹(24h)及温箱刺激(40℃,5 min),根据实验计划 每组每种刺激项目需满足使大鼠不可预判的条件。

1.4 实验动物干预方式

电针组:选穴参照全国针灸学会实验针灸研究会制定的 《实验动物针灸穴位图谱》进行选穴,选取相当于人体解剖部位 的百会、神庭穴,平刺进针,方向由百会刺向神庭,针刺深度为 0.5-1cm,使用 HANSLH202 型电针治疗仪,正极百会,负极神 庭,频率控制为 2Hz,电流强度稳定在 0.6mA,针刺强度以大鼠 头部微颤而不嘶叫为宜,每日 1 次,每次 20 分钟,疗程为 21 天;西药组:在造模期间,每天按体重 0.18 mg/kg,0.018 mg/mL 浓度配比进行灌胃给药,日 1 次。除空白组外其余各组纳入实 验后即开始相应造模操作,保持于应激刺激前给予治疗,并且 间隔不少于 1h,持续至取材当日。

1.5 取材及样本制备

分别于第7d、14d、21d,各实验组完成相应实验项目后,以 10%的水合氯醛按0.3 mL每100g体质量对大鼠进行腹腔注 射麻醉,麻醉后,迅速断头,将所需脑组织在冰板上快速取出, 摘除额极,并对左右大脑半球海马组织进行分离,快速封存于 冻存管内,-80℃液氮速冻,以待进行下一步操作。

1.6 指标检测

1.6.1 **旷场实验**(open field test,OFT) 放置一立方形敞箱(100 cm× 100 cm× 40 cm),将其内外壁及底面均漆成黑色,并划分为 25 个方格,遮蔽外界视野,降低周围噪音。将大鼠自笼中取出称量后置于清洁敞箱的中央空格,开始计时,观察其 5 min内的自由活动,计得大鼠穿越底面得分(三爪或四爪进入同一格记 1 分)与直立次数得分(大鼠前双足同时离开地面记 1 分)的总和,每只大鼠监测完毕后清理大鼠排泄物、移动痕迹并消除气味,减少其它因素对实验客观性影响。分别在实验第 1d、7d、14d、21d 评测大鼠行为活动的变化。

1.6.2 蔗糖水偏好实验(Sucrose preference test,SPT) 将称量 后的常温状态的1%蔗糖水及纯净水各1瓶同时给予24小时 禁水后的受试孤养大鼠,与此同时记录予其两种液体的时间,每 12h更换两种溶液瓶的位置以减少由侧偏压产生的偏倚。24小 时后分别再次对蔗糖水及纯净水进行称重,计算24小时内大 鼠分别消耗蔗糖水及纯净水含量。于实验的第1d、7d、14d、21d 分别对大鼠蔗糖水消耗量进行评测,观察其发展变化趋势。

1.6.3 体质量评测(Weight measurement) 本实验均选取体重 在 200± 20g 范围内的健康清洁级雄性 SD 大鼠,分别于各实 验组第 1d、7d、14d、21d 称取其体质量数据,取三次测量的平均 值作为实际体重,并观察其体重变化趋势及其它行为学改变。 1.6.4 蛋白免疫印迹法(Western-Blot) 细胞按 1× 10⁶ 数量种 于六孔板,培养过夜,细胞完全舒展覆盖板底 90%,后提取相应 蛋白。首先进行将细胞进行裂解制备蛋白样品,随后进行蛋白 浓度 测定,进而进行灌胶及转膜孵育一抗二抗,完成 SDS-PAGE 电泳及抗体杂交。用 Gel-pro Analyzer 4.0 图像分析 软件测定各目的蛋白积分光密度(IOD)值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析。所有数据以 x ± SD 表示,多组间总体比较方差齐者采用(ANOVA),方差不齐 时采用秩和检验。两组间比较采用 t 检验。以 P<0.05 为差异有 统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为学改变情况

2.1.1 各组大鼠 open-filed test 评分比较 模型构建成功前,各 组 open-filed test 评分差异无统计学意义(p>0.05)。实验第 7d, 与空白组相比,其余各组评分均显著下降(p<0.01),与模型组相 比,电针及西药组大鼠评分有所提升,差异具有统计学意义(p< 0.05);实验第 14d,与空白组相比,模型组大鼠评分显著降低(p< 0.01),与模型组相比,电针组及西药组大鼠评分有所回升,差异 具有统计学意义(p<0.05,p<0.01);实验第 21d,与空白组相比, 模型组大鼠旷场实验评分显著下降(p<0.01),与模型组相比,电 针及西药组大鼠旷场实验评分显著提高(均p<0.01)。但西药组 与电针组大鼠在各干预时间段内组间评分对比不具统计学差 异(p>0.05)。详见图 1。



注:与空白组相比,**p<0.01,与模型组相比, ${}^{#}_{p}<0.05$, ${}^{#\!\!\!m}_{p}<0.01$ 。 Note: **p<0.01 vs control group; ${}^{#}_{p}<0.05$, ${}^{#\!\!\!m}_{p}<0.01$ vs model group.

2.1.2 各组大鼠蔗糖偏好实验结果比较 模型构建成功前,各 组评分差异无统计学意义(p>0.05)。实验第7d,与空白组比较, 模型组大鼠蔗糖水消耗量明显下降(p<0.01),与模型组相比,电 针及西药组蔗糖水消耗量不具明显差异(p>0.05);实验第14d, 与空白组相比,模型组蔗糖水消耗量显著下降(p<0.01),与模型 组相比,电针与西药组蔗糖水消耗量有所升高(p<0.05);实验第 21d,与空白组相比,模型组大鼠蔗糖水消耗量显著降低,与模 型组相比,电针与西药组大鼠蔗糖消耗量显著回升(p<0.01)。但 西药组与电针组大鼠在各干预时间段内组间1%蔗糖水消耗对 比不具统计学差异(p>0.05)。详见图2。





2.1.3 各组大鼠体质量变化水平比较 模型构建成功前,各组 评分差异无统计学意义(p>0.05);实验第7d,与空白组比较,模 型组体质量下降明显(p<0.01),与模型组相比,电针及西药组大 鼠体质量有所回升(p<0.05),但两组组间的差异并无统计学意 义(p>0.05);实验第14d 及21d,相较于空白组,模型组大鼠体 质量下降显著(p<0.01),相较于模型组,电针组及西药组大鼠体 质量提升显著(均 p<0.01),且电针及西药组大鼠组间体质量对 比不具有统计学意义(p>0.05)。详见图 3。



Fig.3 Changes in body weight of rats in each experimental group 注:与空白组相比,**p<0.01,与模型组相比, $p^*_p<0.05$, $p^m_p<0.01$ 。 Note: **p<0.01 vs control group; $p^*_p<0.05$, $p^m_p<0.01$ vs model group.

2.2 电针对 Wnt/β-catenin 信号转导通路中关键蛋白表达水平 的改变

2.2.1 各实验组 Wnt1 蛋白表达水平改变 模型构建成功前, 各组 wnt1 表达比较差异无统计学意义(p>0.05);实验第 7d,四 组间 wnt1 表达比较未见明显统计学差异(p>0.05);14d 及 21d, 与空白组相比,模型组大鼠 Wnt1 蛋白表达显著下降(P<0.01), 与模型组相比,电针组及西药组大鼠 Wnt1 蛋白表达有所上升, 差异具有统计学意义(均 p<0.05),但电针及西药组大鼠组间蛋 白表达水平对比未见明显统计学差异(p>0.05)。详见图 4-7。





2.2.2 各实验组 β-catenin 蛋白表达水平改变 模型构建成功前,各组β-catenin 蛋白表达比较差异无统计学意义(p>0.05); 实验第7d,四组β-catenin 蛋白表达对比未见明显统计学差异 (p>0.05);14d及21d,与空白组相比,模型组大鼠β-catenin 蛋 白表达显著下降(P<0.05,P<0.01),与模型组相比,电针组及西 药组大鼠β-catenin 蛋白表达有所上升,差异具有统计学意义 (均p<0.01),但电针及西药组大鼠组间蛋白表达对比未见明显 统计学差异(p>0.05)。详见图 8-11。 2.2.3 各实验组 GSK-3β 蛋白表达水平改变 模型构建成功 前,各组 GSK-3β 表达比较差异无统计学意义(p>0.05);实验第 7d,与模型组相比,西药组大鼠 GSK-3β 蛋白表达有所下降,差 异具有统计学意义(p<0.05);14d 及 21d,与空白组相比,模型组 大鼠 GSK-3β 蛋白表达显著上升(P<0.05),与模型组相比,电针 组及西药组大鼠 GSK-3β 蛋白表达有所降低,差异具有统计学 意义(P<0.05,p<0.01),但电针及西药组大鼠 GSK-3β 蛋白表达 对比差异未见明显统计学意义(p>0.05)。详见图 12-15。

3 讨论

分析整体行为学数据可知,于 OFT 实验中模型组大鼠水 平及垂直运动减少,活动度减小,不动时间提升,提示其自主运 动减少并对新鲜环境和事物的缺乏好奇性;在 SPT 实验过程 中,模型组大鼠 1%蔗糖水消耗量显著下降,表明其欣快感降低 或缺失;在体质量评测过程中模型组大鼠体重和摄食量均有所



图 10 各实验组 21d β-catenin 蛋白表达水平

Fig.10 21d β-catenin protein expression level in each experimental group

下降,可推知模型组大鼠对食物奖赏的愉悦感降低,呈明显抑 郁样行为^[10-12],与之前相关文献表述相吻合,由此可知,本实验 抑郁模型复制成功。相较于模型组大鼠,电针组及西药组大鼠 行为学指标评测均显著提高,可知两种干预方式均可有效改善 大鼠抑郁样行为,进而治疗抑郁症。又因干预组间比较无显著 差异,因此可推知二者可能具有近似的疗效。

最新研究表明,Wnt 信号通路是一类高度保守的信号通路 ^[13],在动物胚胎的早期发育、器官形成、组织再生和其它生理病 理过程中至关重要^[14,15]。该通路中关键蛋白主要涉及 Wnt 蛋 白、β- 连环蛋白(β-catenin)、糖原合成酶激酶 3β(GSK-3β)等。 Wnt 蛋白作为一种分泌性糖蛋白,以自分泌或者旁分泌途径发 挥作用,在机体内广泛表达。它通过与靶细胞膜上的受体家族 成员结合,介导胞内经典的 Wnt/β-catenin 信号通路并对特定 基因表达起调控作用,在神经系统发育过程中具有重要作用。 β-catenin 为多功能蛋白,具有介导细胞粘附及信号传导的作





Note: **p < 0.01 vs control group; p < 0.05, p < 0.01 vs model group.



Control Model Electro Fluoxetine



图 13 各实验组 14d GSK-3β 蛋白表达水平

Fig.13 14d GSK-3ß protein expression level in each experimental group

Control Model Electro Fluoxetine



图 14 各实验组 21d GSK-3β 蛋白表达水平

Fig.14 21d GSK-3β protein expression level in each experimental group



Note: **p<0.01 vs control group; p<0.05, p<0.01 vs model group.

用。作为 Wnt/β-catenin 信号通路的第二信使,可启动促使细胞 分裂的基因,在神经元功能活动中具有重要意义。GSK-3β为降 解复合体中的蛋白激酶可作用于众多信号蛋白和转录因子,调 控细胞的分化、增殖及凋亡,在 Wnt/β-catenin 信号通路中主要 作用是磷酸化游离的 β-catenin 进而激活经典通路。通过前期 实验研究我们发现抑郁大鼠病情进展过程中伴随着海马神经 结构及功能改变,而此通路与海马神经重塑以及抗抑郁药物的 作用靶点密切相关,因而本实验以此通路为突破点进行相应机 制研究。通过实验我们发现,抑郁证发生发展过程中伴随着 Wnt/β-catenin 信号通路的异常表达^{116,17},通路中 Wnt1 蛋白、β-连环蛋白 (β-catenin) 表达水平有所下降,糖原合成激酶 3β (GSK-3β)有所上升,而经过电针及西药干预,CUMS 大鼠抑郁 症状有所缓解,蛋白表达水平趋于正常,这提示电针及西药可 有效抗抑郁,电针与 Wnt 信号转导通路存在调控和交互作用¹¹⁸, 又因二者组间对比无统计学意义,因此二者可能具有近似疗效。

与此同时,纵观整体数据我们发现,电针抗抑郁过程中改善大鼠行为学表现起效时间优于微观调控蛋白起效时间,因此我们推测电针抗抑郁可能对于行为学症状改善更为迅速。

实验过程中存在有个别样本脱落的状况,死亡原因可能是 由于其对电针束缚和西药的不耐受及个体差异。并且由于液氮 补充不及时导致部分蛋白样本发生降解,为此我们进行了多次 重复性实验,以确保实验数据的真实有效性。

本实验基于 Wnt/β-catenin 信号转导通路,采用中医特色 电针疗法进行抗抑郁中枢机制研究,从宏观和微观角度揭示了 电针对抑郁生物行为学及微观蛋白和神经转导通路的调控作 用,进一步证明了电针抗抑郁的有效性,可为后续实验研究提 供科研思路及实验室依据,也可为临床抗抑郁药物的研发提供 新靶点。

抑郁症发病机制十分复杂^[19,20],我们认为相关机制的研究 和阐释需进一步深化,行为学症状缓解与蛋白调控之间存在何 种关联,电针有效和增效机制也有待进一步探索,与此同时,实 验手段和检测方式也需调整优化,完善细节,以保证更加高效 科学地完成科研项目。

参考文献(References)

- 张迪,王珑,田旭升,等. 电针对抑郁大鼠海马组织炎性细胞因子的 影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1953-1956
- [2] 王珑, 张迪, 田旭升, 等. 电针对慢性应激抑郁大鼠海马 CA3 区突触 可塑性的影响[J]. 中国针灸, 2017, 37(2): 162-168
- [3] Bakhtiarzadeh F, Nahavandi A, Goudarzi M, et al. Axonal transport proteins and depressive like behavior, following Chronic Unpredictable Mild Stress in male rat [J]. Physiology & behavior, 2018, 194(2018): 9-14
- [4] Post R J, Warden M R. Melancholy, anhedonia, apathy: the search for separable behaviors and neural circuits in depression [J]. Current opinion in neurobiology, 2018, 49(2018): 192-200
- [5] Zwamborn R A J, Snijders C, An N, et al. Wnt Signaling in the Hippocampus in Relation to Neurogenesis, Neuroplasticity, Stress and Epigenetics [J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2018[Epub ahead of print]
- [6] Kim H, Won S, Hwang D Y, et al. Downregulation of Wnt/β-catenin signaling causes degeneration of hippocampal neurons *in vivo* [J]. Neurobiology of aging, 2011, 32(12): 2316. e1-2316. e15
- [7] Xia J, Lu Z, Feng S, et al. Different effects of immune stimulation on chronic unpredictable mild stress-induced anxiety-and depression-like behaviors depending on timing of stimulation [J]. International immunopharmacology, 2018, 58(2018): 48-56
- [8] Liu W, Xue X, Xia J, et al. Swimming exercise reverses CUMSinduced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins[J]. Journal of affective disorders, 2017, 227 (2017): 126-135
- [9] Sato S, Sassone-Corsi P. Circadian and epigenetic control of depression-like behaviors[J]. Current Opinion in Behavioral Sciences, 2019, 25(2019): 15-22
- [10] Zhou Y, Ma C, Li B M, et al. Polygala japonica Houtt. reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis in chronic stress mice [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 99(2018): 986-996
- [11] Reid B S, Yang H, Melvin V S, et al. Ectodermal Wnt/β-catenin signaling shapes the mouse face [J]. Developmental biology, 2011, 349(2): 261-269
- [12] 李国栋,姚碧辉,金文海,等.Wnt/β-catenin 的表达与肿瘤关系研究 进展[J].世界最新医学信息文摘, 2018, 18(07): 30-31
- [13] 曹燕明,王斌,金晶,等.Wnt/β-catenin、RANKL/LGR4 通路因子在骨质疏松性骨折端的表达 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(03): 319-323+335
- [14] Sequeira A, Klempan T, Canetti L, et al. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression[J]. Molecular psychiatry, 2007, 12(7): 1-16
- [15] Wang T L, Ouyang C S, Lin L Z. β-Asarone suppresses Wnt/ β-catenin signaling to reduce viability, inhibit migration/invasion/ adhesion and induce mitochondria-related apoptosis in lung cancer cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 106(2018): 821-830
- [16] Oliva C A, Montecinos-Oliva C, Inestrosa N C. Wnt Signaling in the Central Nervous System: New Insights in Health and Disease [M] //Progress in molecular biology and translational science. Academic Press, 2018, 153(2018): 81-130 (下转第 1043 页)

机视野细胞密度显著减少,细胞增殖水平明显降低,而 NC 组 细胞增殖水平也降低(图 3b),这与 NC 组 CyclinD1 蛋白表达 量轻微低于 BC 组相一致,可能是 lipo2000 对细胞的慢性毒性 或者是由于阴性序列对细胞有一定的毒性作用所致,但是这种 毒性作用并不是阴性序列沉默 TCAB1 基因所致,因为 qPCR 结果中 NC 组并未显示 TCAB1mRNA 的降低。

细胞周期蛋白在细胞周期的不同阶段发挥调控作用。在这些细胞周期蛋白中,细胞周期蛋白 D 非常重要。在细胞周期调 控过程中,CyclinD1 参与细胞周期从 G1 期到 S 期的转换^[19, 30]。因此,我们转染 siTCAB1-749 后 48 h,对 BC、NC、siT-CAB1-749 组细胞周期进行检测,发现 siTCAB1-749 组处于G1 期细胞比率与阴性对照组和空白组比较有所增加,处于S 期细胞比率减少。Western blotting 结果显示 siTCAB1-749 组 CyclinD1 蛋白表达量明显低于 BC 和 NC 组,与细胞周期结果符合(图 4)。然而,沉默 TCAB1 抑制平滑肌的增殖是通过调节端粒酶的活性还是端粒的长度,其机制还需要进一步研究。

综上所述,沉默 TCAB1 能抑制 HAVSMC 增殖,其机制与阻碍 细胞周期蛋白 CyclinD1 有关。

参考文献(References)

- Martí nez P. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies[J]. J Cell Biol, 2017, 216(4): 875-887
- [2] Fu D, Collins K. Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation[J]. Mol Cell, 2007, 28(5): 773-785
- [3] Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53beta: guardian of Cajal bodies and genome integrity[J]. Front Genet, 2015, 6: 91
- [4] Ozsarlak-Sozer G, Kerry Z, Oran I, et al. Telomeric restriction analysis of vascular smooth muscle cells following balloon angioplasty in rabbits [J]. J Physiol Biochem, 2009, 65(3): 243-249
- [5] Jacob T, Hingorani A, Ascher E. Evidence for telomerase activation in VSMCs exposed to hyperglycemic and hyperhomocysteinemic conditions[J]. Angiology, 2009, 60(5): 562-568
- [6] Yuan P, Wang Z, Lv W, et al. Telomerase Cajal body protein 1 depletion inhibits telomerase trafficking to telomeres and induces G1 cell cycle arrest in A549 cells[J]. Oncol Lett, 2014,8(3): 1009-1016
- [7] Sun CK, Luo XB, Gou YP, et al. TCAB1: a potential target for diagnosis and therapy of head and neck carcinomas [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 180
- [8] Zhang C, Liu J, Jin N, et al. SiRNA Targeting mTOR Effectively Prevents the Proliferation and Migration of Human Lens Epithelial Cells[J]. PLoS One, 2016, 11(12)[Epub ahead of print]
- [9] Huang B, Zhou H, Wang S, et al. Effect of silencing SATB1 on

proliferation, invasion and apoptosis of A549 human lung adenocarcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3818-3824

- [10] Lin CH, Lilly B. Endothelial Cells Direct Mesenchymal Stem Cells Toward a Smooth Muscle Cell Fate[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(21): 2581-2590
- [11] Ma YG, Wang JW, Bai YG, et al. Salidroside contributes to reducing blood pressure and alleviating cerebrovascular contractile activity in diabetic Goto-Kakizaki Rats by inhibition of L-type calcium channel in smooth muscle cells[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2017, 18
- [12] Chalam KV, Li W, Koushan K, et al. Effect of Distance and Duration of Illumination on Retinal Ganglion Cells Exposed to Varying Concentrations of Brilliant Blue Green [J]. J Clin Med Res, 2015, 7 (7): 517-524
- [13] Nojiri S, Joh T. Albumin suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation and the cell cycle [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15 (3): 5163-5174
- [14] Li Y, Xia JY, Chen W, et al.Effects of Ling Qi Juan Gan capsule drug-containing serum on PDGF-induced proliferation and JAK/STAT signaling of HSC-T6 cells [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2013, 21(9): 663-667
- [15] Cao Z, Li J, Luo L, et al. Molecular cloning and expression analysis of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in the hypothalamus of the Huoyan goose during different stages of the egg-laying cycle [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13
- [16] Endorf EB, Qing H, Aono J, et al. Telomerase Reverse Transcriptase Deficiency Prevents Neointima Formation Through Chromatin Silencing of E2F1 Target Genes [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(2): 301-311
- [17] Sun X, Han F, Yi J, et al. The effect of telomerase activity on vascular smooth muscle cell proliferation in type 2 diabetes in vivo and in vitro [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1636-1640
- [18] Lee JH, Lee YS, Jeong SA, et al. Catalytically active telomerase holoenzyme is assembled in the dense fibrillar component of the nucleolus during S phase[J]. Histochem Cell Biol, 2014, 141(2): 137-152
- [19] Zhao Y, Lv M, Lin H, et al. Rho-associated protein kinase isoforms stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells through ERK and induction of cyclin D1 and PCNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432(3): 488-493
- [20] Li T, Song T, Ni L, et al. The p-ERK-p-c-Jun-cyclinD1 pathway is involved in proliferation of smooth muscle cells after exposure to cigarette smoke extract [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(3): 316-320

(上接第 1015 页)

- [17] Han X, Wu H, Yin P, et al. Electroacupuncture restores hippocampal synaptic plasticity via modulation of 5-HT receptors in a rat model of depression[J]. Brain research bulletin, 2018, 139(2018): 256-262
- [18] Zhang Y, Yuan S, Pu J, et al. Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis of Hippocampus in a Rat Model of Depression [J]. Neuroscience, 2018, 371(2018): 207-220
- [19] Peng W F, Fan F, Li X, et al. Different behavioral and pathological changes between epilepsy-associated depression and primary depression models[J]. Epilepsy & Behavior, 2018, 83(2018): 212-218
- [20] Tian J, Liu S, He X, et al. Metabolomics studies on corticosteroneinduced PC12 cells: A strategy for evaluating an in vitro depression model and revealing the metabolic regulation mechanism [J]. Neurotoxicology and teratology, 2018, 69(2018): 27-38