维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)05-0520-06

缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液增强分化 PC12 细胞缺氧耐受性的最适浓度研究

李 宏[1,2],高钰琪[1]

(1. 第三军医大学高原医学系高原生理学与病理生理学教研室 全军高原医学重点实验室,重庆 400038;
2. 重庆教育学院生化系,重庆 400067)

【摘 要】目的:探索缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液(Brain tissue extract of hypoxia-preconditioned mice,BHP)对 NGF 诱导分化的 PC12 细胞缺氧耐受性的影响及保护性作用的适合浓度。方法:复制小鼠急性重复缺氧模型,制备 BHP,用考马斯亮蓝法定量蛋白。在分化 PC12 细胞中加入 BHP 使其蛋白终浓度分别为 1.0、10.0、100.0 μg/ml(BHP 组)。以等蛋白终浓度正常小鼠脑匀浆提取液(Brain tissue extract of normal mice,BN)作为对照组(BN 组)。同时设置只加 PBS 的溶剂对照组(PBS 组)。缺氧($2\%O_2$)培养 24、48、72h 后,采用回唑盐(MTT)比色法检测各组细胞活力(OD_{570nm} 值)和乳酸脱氢酶(LDH)透出率、缺氧 72h 晚期凋亡率。结果:缺氧 24h 时,蛋白终浓度为 10.0、100.0 μg/ml 的 BHP 组 OD_{570nm} 值显著高于同浓度 BN 组和缺氧 PBS 组,其 LDH 透出率显著低于同浓度 BN 组和缺氧 PBS 组。随缺氧时间延长,其保护作用逐渐减弱。至缺氧 72h 时,仅蛋白终浓度为 100.0 μg/ml 的 BHP 组 OD_{570nm} 值显著高于同浓度 BN 组,其 LDH 透出率、晚期凋亡率均显著低于缺氧 PBS 组。结论:BHP 对分化 PC12 细胞缺氧耐受性的增强作用有浓度依赖性和时间依赖性,蛋白终浓度为 100.0 μg/ml 的 BHP 组保护作用稳定、持久。

【关键词】缺氧;预处理;小鼠;脑匀浆提取液;分化 PC12 细胞
【中图中国图书分类法分类号】R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-25

A study of optimal concentration of brain tissue extract of hypoxia-preconditioned mice to enhance tolerance of differentiated PC12 cells to hypoxia

LI Hong, et al

(*Key Laboratory for High Altitude Medicine of PLA, Section of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, the Third Millitary Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of brain tissue extract of hypoxia-preconditioned mice (BHP) on tolerance of NGF-induced differentiated PC12 cells to hypoxia and the optimal concentration for protective effect. *Methods*: The mice model of acute repetitive hypoxia was reproduced and BHP was prepared. BHP was added into the cultures of 4~5 day differentiated PC12 cells and the final protein concentrations of BHP were 1.0、10.0、100.0 μg/ml(BHP groups) respectively. Brain tissue extract of normal mice(BN) at the same three protein concentrations were used as controls(BN groups) and PBS solvent control groups were also prepared in which only PBS was added(PBS groups). Then differentiated PC12 cells were cultured in hypoxia ($2\%O_2$). After 24,48,72 hours' hypoxia, colorimetric method(OD_{570nm}) of tetrazolium salt MTT staining was adopted to determine cell viability and lactate dehydrogenase(LDH) leakage assays were also conducted at the same time. Besides, apoptotic percentages at late stage(72 hours' hypoxia) were detected. *Results*: After 24 hours' hypoxia, OD_{570nm} values of BHP groups with protein concentrations being 10.0、100.0 μg/ml were significantly higher, but their LDH leakage percentages were significantly lower than those of BN groups with the same protein concentrations and of hypoxic PBS group. With hypoxia prolonging, BHP gradually lost the protective effect. At the time point of 72 hours' hypoxia, OD_{570nm} values of only BHP group at 100.0 μg/ml protein concentration was significantly higher than that of the corresponding BN groups, its LDH leakage percentage and apoptotic percentage was significantly lower than those of the hypoxic PBS group. *Conclusion*: The effects of BHP on tolerance of differentiated PC12 cells to hypoxia depend on its concentrations and on its treating time. Besides, BHP at final concentration of 100.0 μg/ml protein showed steady, prolonged protective effect.

【Key words】 Hypoxia; Preconditioning; Mouse; Brain tissue extract; Differentiated PC12 cell

作者介绍:李 宏(1963-),女,副教授,博士,
研究方向:缺氧预适应相关研究。
通讯作者:高钰琪,男,教授,E-mail:gyq@mail.tmmu.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金重大项目(NO.30393131)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

缺氧为一常见病理过程，寻找增强机体抗缺氧能力的药物和措施可缓解缺氧造成的损伤，是目前研究的一个热点。研究表明缺氧/缺血预适应可以诱导内源性物质改变而显著增强动物或细胞对缺氧的耐受性[1-5]，小鼠急性重复缺氧耐受模型研究表明，小鼠经 4 次连续亚致死量缺氧不仅可增强小鼠本身对缺氧的耐受性，而且用此模型制备的 BHP 能显著提高正常小鼠和离体细胞对缺氧的耐受性，其机制可能也与内源性保护机制的激活、抗缺氧活性物质的产生或增加等因素有关[6-8]。但文献中均无 BHP 显著增强正常小鼠和离体细胞对缺氧耐受性的有效浓度的报道。研究表明，随着 BHP 的浓度不同，其对细胞的作用呈现出双相效应，即在浓度较高时，对细胞既有保护效应又有损伤作用[9]。为寻找 BHP 保护性成分作用的适合浓度，本研究通过观察较低剂量 BHP 对缺氧培养不同时间、用 NGF 诱导分化的 PC12 细胞缺氧耐受性的影响，为研究 BHP 增强缺氧耐受性的物质基础和进一步寻找 BHP 中增强神经细胞缺氧耐受性的有效成分奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞

昆明小鼠，18~22g，雌雄各半（第三军医大学动物所提供）。PC12 细胞来源于 ATCC。

1.2 方法

1.2.1 缺氧预适应小鼠模型的复制和 BHP 的制备 按文献[6]复制小鼠急性重复缺氧模型。按文献[7]制备 BHP 储存液和 BN 储存液。过滤除菌后分装，-70℃冻存。实验时用 PBS 稀释至所需浓度。

1.2.2 BHP 和 BN 中蛋白含量检测 按照文献[10]用考马斯亮蓝法以 BSA（Sigma 公司）为标准蛋白绘制蛋白浓度标准曲线并测定 BHP、BN 中蛋白含量。按照文献[9]加样后，分别取 300μl BSA 配制的绘制标准曲线用样品、BHP、BN 样品于 96 孔板各孔中，于酶标仪上 595nm 波长下比色，根据绘制的标准曲线读取各样品蛋白浓度值。

1.2.3 PC12 细胞的培养及诱导分化 用含 10%马血清和 5%胎牛血清（HyClone 公司）的 RPMI1640（Gibco 公司）常规培养 PC12 细胞[11]，按照 1.5×10^4 个/cm^2 接种传代，每 2d 换液，用对数生长期细胞做实验，实验前 1d 换液。用含 50ng/mlNGF（promega 公司）的 RPMI1640 诱导分化。以分化第 4~5d 细胞做各项检测。

1.2.4 实验分组及缺氧前样品处理

1.2.4.1 实验分组 见表 1。

1.2.4.2 缺氧前样品培养、处理 各项检测中，各组样品在接种对数期细胞后，均用含 10%马血清和 5%胎牛血清的 RPMI1640 常氧培养 24h，换成分化培养液诱导分化。分化第 4~5d 后按照表 1 分组并分别加 BHP 储存液、BN 储存液和 PBS。各组继续常氧培养 8h，除 NPBS 组外其余各组行缺氧（$2\%O_2$）处理。

1.2.5 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞 MTT（OD_{570nm}）值的影响 接种 PC12 细胞于多聚赖氨酸（Sigma 公司）包被的 96 孔板（3.0×10^3 个/孔），按表 1 分组并行缺氧前样品培养、处理，除 NPBS 组外其余各组缺氧（$2\%O_2$）培养 24、48、72h。NPBS 组继续常氧培养相应时间。随后按文献[12]MTT 方法，在酶标仪上检测 OD_{570nm} 值。各组每个时间点做 3 个复孔，进行 3 次独立实验。

1.2.6 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞 LDH 透出率的影响 接种 PC12 细胞于多聚赖氨酸包被的 24 孔板（1.0×10^4 个/孔），按表 1 分组并行缺氧前样品培养、处理，每孔吸取培养

表 1 实验组的设置、表示符号及培养条件

培养条件	缺氧培养组（$2\%O_2$）						常氧培养组	
分组	BHP 组			BN 对照组			PBS 对照组	
蛋白浓度	$BHP_{1.0}$	$BHP_{10.0}$	$BHP_{100.0}$	$BN_{1.0}$	$BN_{10.0}$	$BN_{100.0}$	HPBS	NPBS
BHP 蛋白（μg/ml）	1.0	10.0	100.0	0	0	0	0	0
BN 蛋白（μg/ml）	0	0	0	1.0	10.0	100.0	0	0

注：在 BHP 组各组中加入蛋白终浓度为 1.0、10.0、100.0μg/ml 的 BHP，在 BN 组各组中加入等体积、蛋白终浓度为 1.0、10.0、100.0μg/ml 的 BN，在 PBS 对照组中只加入等体积的 PBS 作溶剂对照。除 NPBS 组一直常氧培养外，其余各组均需缺氧培养。

表 2 小鼠每次耐受时间（min）（$\bar{x}\pm s$）（n=10）

第 1 次标准耐受时间（min）	第 2 次标准耐受时间（min）	第 3 次标准耐受时间（min）	第 4 次标准耐受时间（min）
14.75 ± 1.81	31.55 ± 4.03△	69.07 ± 8.30△	157.95 ± 25.26△

△P<0.05 与第 1 次标准耐受时间比较。

维普资讯 http://www.cqvip.com

液 50μl 用于检测 LDH 活力(LDH_0)。随后缺氧培养 24、48、72h,NPBS 组继续常氧培养相应时间。处理结束后,每孔吸取培养液 50μl 检测在缺氧相应时间时培养液的 LDH 活力(LDH_1)。在 24 孔板中加入等体积 2% Triton X-100(Sigma 公司)使其终浓度为:1%,静置 10min,吹吸培养液洗下细胞碎片,4℃,8 000g,离心 5min,取上清检测 LDH 活力(LDHa)。LDH 活力检测均按南京建成 LDH 试剂盒说明进行。根据公式计算 LDH 透出率:LDH 透出率(%)=(LDH_1-LDH_0)/LDHa×100%。各组每个时间点做 3 个复孔,进行 3 次独立实验。

1.2.7 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞晚期凋亡率的影响

用细胞爬片法,即用多聚赖氨酸包被预置灭菌盖玻片的 24 孔板后,按照 2.0×10^4 个/孔接种 PC12 细胞,按照表 1 分组并行缺氧前样品培养、处理,除 NPBS 组外各组缺氧培养 72h,NPBS 组继续常氧培养 72h。随后 Hoechst 33258(Sigma 公司)染色[13],荧光显微镜观察。随机计数 500 个细胞,计算凋亡晚期细胞百分率。

1.2.8 统计分析 结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS10.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析。

2 结 果

2.1 缺氧预适应模型复制结果

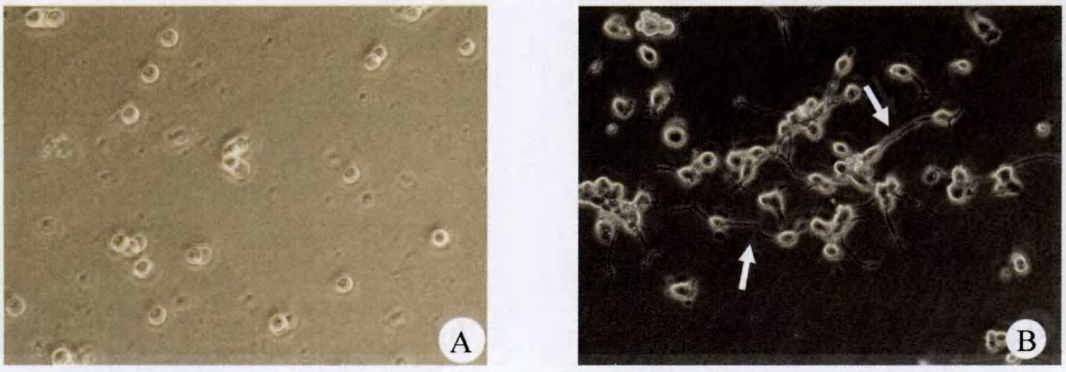
小鼠按文献[5]模型经 4 次缺氧后,缺氧耐受时间极显著增加,缺氧预适应效果极显著($P<0.001$)(表 2)。

2.2 PC12 细胞诱导分化

经 NGF 诱导分化的 PC12 细胞形成神经突起(图 1)。

2.3 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞活力的影响

缺氧 24、48、72h 时,HPBS 组 MTT(OD_{570nm})值均显著低于 NPBS 组,说明 2%O_2 低氧环境显著降低



(A.未分化 PC12 细胞;B.分化 4~5d PC12 细胞,白色箭头指示分化形成的突起,×160)

图 1 未分化和分化 PC12 细胞

表 3 BHP、BN 作用于分化 PC12 细胞,缺氧不同时间的 MTT(OD_{570nm})值($\bar{x}\pm s$)(n=3)

OD_{570nm} 值	蛋白浓度(μg/mL)			PBS 对照组	
	1.0	10.0	100.0	NPBS	HPBS
缺氧 24 h					
BN 组	0.91±0.13	1.11±0.11#	1.45±0.11#	1.75±0.12	0.99±0.16△
BHP 组	0.99±0.17	1.32±0.06*#	1.81±0.18*#		
缺氧 48h					
BN 组	0.87±0.14	1.09±0.17	1.39±0.10#	1.29±0.16	0.81±0.09△
BHP 组	0.91±0.17	1.16±0.21	1.75±0.17*#		
缺氧 72h					
BN 组	0.35±0.11	0.46±0.15	0.51±0.05	0.84±0.17	0.34±0.11△
BHP 组	0.39±0.12	0.50±0.12	0.67±0.07*#		

△$P<0.05$ 与 NPBS 组比较;#$P<0.05$ 与 HPBS 组比较;*$P<0.05$ 与等蛋白浓度 BN 组比较。

维普资讯 http://www.cqvip.com

分化 PC12 细胞活力。

MTT(OD_{570nm})值变化为：缺氧 24h，$BHP_{10.0}$、$BHP_{100.0}$、$BN_{10.0}$、$BN_{100.0}$ 组分别显著高于 HPBS 组；$BHP_{100.0}$ 组显著高于 $BN_{10.0}$ 组，$BHP_{100.0}$ 组显著高于 $BN_{100.0}$ 组。缺氧 48h，BHP_{1000}、$BN_{100.0}$ 组分别显著高于 HPBS 组；$BHP_{100.0}$ 组显著高于 $BN_{100.0}$ 组。缺氧 72h，仅 $BHP_{100.0}$ 组显著高于 HPBS 组，也显著高于 $BN_{100.0}$ 组(表 3)。

2.4 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞 LDH 透出率的影响

缺氧 24、48、72h 时，HPBS 组 LDH 透出率均显著高于 NPBS 组，证实 2%O_2 低氧环境对分化 PC12 有显著损伤作用。

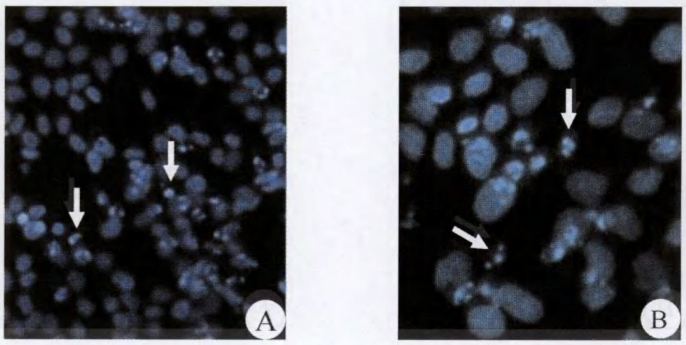
LDH 透出率变化为：缺氧 24h，$BHP_{10.0}$、$BHP_{100.0}$、$BN_{10.0}$、$BN_{100.0}$ 组均显著低于 HPBS 组；$BHP_{10.0}$ 组显著低于 $BN_{10.0}$ 组，$BHP_{100.0}$ 组显著低于 $BN_{100.0}$ 组。缺氧 48h，$BHP_{10.0}$、$BHP_{100.0}$、$BN_{100.0}$ 组均显著低于 HPBS 组；$BHP_{100.0}$ 组显著低于 $BN_{100.0}$ 组。缺氧 72h，仅 $BHP_{100.0}$ 组显著低于 HPBS 组(表 4)。

2.5 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞晚期凋亡率的影响

缺氧 72h，Hoechst 33258 染色。分化 PC12 细胞核形态变化见图 2。缺氧 72h，HPBS 组晚期凋亡率显著高于 NPBS 组。仅 $BHP_{100.0}$ 组晚期凋亡率显著低于 HPBS 组(表 5)。

3 讨 论

PC12 细胞是大鼠嗜铬细胞瘤克隆化细胞株，用 NGF 诱导分化后形成突起、失去分裂、增殖的能力，同时细胞内发生一系列变化并具有典型的神经细胞的特征，能够分泌神经递质。其特点与肾上腺素



(Hoechst 33258 染色，形态完整、呈均匀蓝色的核为正常细胞核；致密浓染或呈碎块的核为凋亡细胞核，如白色箭头所指。A.×320；B.×640)

图 2 缺氧 72h 分化 PC12 细胞核形态变化

表 4 BHP、BN 作用于分化 PC12 细胞，缺氧不同时间的 LDH 透出率($\bar{x} \pm s$，n=3)

LDH 透出率(%)	蛋白浓度(μg/mL)			PBS 对照组	
	1.0	10.0	100.0	NPBS	HPBS
缺氧 24h					
BN 组	24.03 ± 3.52	22.57 ± 2.17#	17.60 ± 2.48#	12.47 ± 2.72	28.37 ± 2.67△
BHP 组	20.40 ± 4.27	16.91 ± 2.60*#	10.67 ± 3.11*#		
缺氧 48h					
BN 组	37.34 ± 7.09	35.12 ± 5.45	32.18 ± 2.35#	25.21 ± 3.65	41.40 ± 5.09△
BHP 组	34.60 ± 4.43	30.14 ± 4.42#	25.56 ± 3.13*#		
缺氧 72h					
BN 组	65.51 ± 11.67	63.37 ± 9.81	51.57 ± 6.08	43.30 ± 4.94	69.16 ± 9.49△
BHP 组	63.00 ± 11.59	59.08 ± 7.85	44.67 ± 4.10#		

△P<0.05 与 NPBS 组比较；#P<0.05 与 HPBS 组比较；*P<0.05 与等蛋白浓度 BN 组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5 BHP、BN 对缺氧、分化 PC12 细胞晚期凋亡率的影响（$\bar{x} \pm s$，n=3）

凋亡率(%)	蛋白浓度 (μg/mL)			PBS 对照组	
	1.0	10.0	100.0	NPBS	HPBS
BN 组	45.97 ± 7.48	44.58 ± 7.44	42.87 ± 6.48	26.70 ± 4.36	47.28 ± 4.66△
BHP 组	44.15 ± 8.15	42.16 ± 6.65	37.24 ± 3.60#		

△P<0.05 与 NPBS 组比较；#P<0.05 与 HPBS 组比较。

能神经元和胆碱能神经元相似，为广泛使用的神经细胞模型，被用于神经突起形成、与神经细胞分化相关基因表达、受体表达、神经递质合成、分泌研究[14-16]。因此研究 BHP 对分化 PC12 细胞的作用有助于了解 BHP 对缺氧最敏感的神经细胞的作用。

虽然 BHP 能显著增强正常小鼠和离体细胞对缺氧的耐受性，但是文献中尚未报道其有效浓度[6,7,9]。在本研究以前的结果已经证实，BHP 对离体细胞存在较为普遍的缺氧保护效应，对 HepG2 细胞[8]、未用 NGF 诱导的 PC12 细胞均有缺氧保护效应（结果另文发表）。但是 BHP 在脑组织浓度为 5.0mg/ml 以上时，在缺氧 24h 对 HepG2 细胞的保护作用显著强于等浓度 BN，但在缺氧 72h 对缺氧 HepG2 细胞有损伤作用[8]。用未经 NGF 诱导的 PC12 细胞研究发现，BHP 在脑组织浓度为 6.4mg/ml 以上时，只在缺氧 24h 对缺氧、未经 NGF 诱导的 PC12 细胞有保护作用，在缺氧 72h 对缺氧的该细胞有损伤作用；在脑组织浓度为 3.2mg/ml 以上时，在缺氧 24、48h 对缺氧的该细胞有保护作用，在缺氧 72h 对该细胞的保护作用与等浓度 BN 无显著差异；而在脑组织浓度为 0.8mg/ml 时，在缺氧 24、48、72h 对该细胞均有保护作用（结果另文发表）。因此，BHP 对缺氧细胞的作用在高浓度时明显地存在着双相效应，在缺氧早期显示正向保护效应，在缺氧晚期却表现出负向损伤效应。这与近年来对有关缺氧预适应效应的研究结果一致，这可能是因为缺氧预适应具有保护和损伤双重作用，在预适应中产生保护性物质的同时，也产生了损伤性物质[17,18]，可能在 BHP 浓度较高时，其中的损伤性成分的浓度也较高，因此在缺氧后期出现损伤作用（结果另文发表）。而高浓度损伤性物质存在时将不利于 BHP 中正向保护性成分的研究，所以本研究选用较低浓度 BHP 探讨其对 NGF 诱导分化的 PC12 细胞神经元模型有无缺氧保护效应，根据蛋白含量检测，1.0、10.0、100.0 μg/ml 蛋白浓度的 BHP 分别相当于脑组织浓度为 0.015、0.147、1.467mg/ml 的 BHP。

本研究中以上述 3 种浓度的 BHP 对 NGF 诱导分化的 PC12 细胞 MTT（OD_{570nm}）值的检测结果显示，缺氧 24h 时，BHP 在其蛋白终浓度为 10.0 μg/ml 以上时对缺氧、分化 PC12 细胞有保护作用，并且其保护作用强于 BN，说明在缺氧预适应过程中，在小鼠体内确实产生了对神经细胞有保护效应的物质。随着缺氧时间的延长，蛋白终浓度为 10.0 μg/ml 的 BHP 的保护作用逐渐消失。至缺氧 72h 时，只有蛋白终浓度为 100.0 μg/ml 的 BHP 对分化PC12 细胞的保护效应显著强于 BN。这说明 BHP 中具有缺氧保护作用的物质的作用有量效关系和时间效应。

LDH 透出率检测结果显示，缺氧 24h，BHP 蛋白终浓度在 10.0 μg/ml 以上时，与等浓度 BN 比较，可显著降低分化 PC12 细胞的 LDH 透出率，证实了 BHP 中存在保护性物质。随着缺氧时间的延长，保护作用逐渐减弱。至缺氧 72h，只有蛋白浓度在 100.0 μg/ml 的 BHP 有保护作用。

晚期凋亡率检测结果显示，只有蛋白浓度在 100.0 μg/ml 的 BHP 对缺氧 72h 的分化 PC12 细胞有保护作用。

本研究结果显示 3 种浓度 BHP 对 NGF 诱导分化的 PC12 细胞无损伤作用，但浓度太低时（1.0 μg/ml 蛋白），也无显著保护作用。而在 BHP 蛋白浓度为 100.0 μg/ml 时，在不同缺氧时间点对分化 PC12 细胞均有显著保护作用，无损伤作用，因此用此浓度的 BHP 进一步实验将有助于分析、分离其中的有效保护物质，为进一步研究其中的有效成分奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Gustavsson M, Anderson MF, Mallard C, et al. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats[J]. Pediatr Res, 2005;57(2):305-309.

[2] Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury[J]. Neurorx, 2004;1(1):26-35.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[3] Westberg JA,Serlachius M,Lankila P,et al. Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling[J]. Stroke,2007;38(3):1025-1030.

[4] Bernaudin M,Tang Y,Reilly M,et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance[J]. J Biol Chem,2002;277(42):39728-39738.

[5] 周 烜,邬力祥,刘发益,等. 低氧预适应对离体星形胶质细胞缺氧复氧耐受性的影响[J]. 第三军医大学学报,2007;29(8):681-684.

[6] 吕国蔚,史美棠,李 凌,等. 急性重复缺氧对小鼠缺氧耐受性的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国病理生理杂志,1992;8(4):425-428.

[7] 董苍转, 吕国蔚. 缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液对 PC12 细胞的影响[J]. 首都医科大学学报,2001;22(2):97-99.

[8] Lu GW,Yu S,Li RH,et al. Hypoxic preconditioning:a novel intrinsic cytoprotective strategy[J]. Mol Neurobiol,2005;31(1-3):255-271.

[9] 李 宏,高文祥,卢国守,等. 缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液对 HepG2 细胞缺氧耐受性的影响[J]. 河南师范大学学报,2007;(4):127-130.

[10] 李如亮,王延枝,张楚富.生物化学实验[M]. 第 1 版.武汉:武汉大学出版社,1998.57-58.

[11] Todoroki S,Morooka H,Yamaguchi M,et al. Ropivacaine inhibits neurite outgrowth in PC-12 cells [J]. Anesth Analg,2004;99(3):828-832.

[12] 曹 亚,李官成,邓锡云,等. 实用分子生物学操作指南[M]. 第 1 版.北京:人民卫生出版社,2003.22-23.

[13] 胡 野,凌志强,单小云. 细胞凋亡的分子医学[M]. 第 1 版. 北京:军事医学科学出版社,2002.474.

[14] Tischler AS,Greene LA.Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor [J]. Lab Invest,1978;39(2):77-89.

[15] Levi A,Biocca S,Cattaneo A,et al. The mode of action of nerve growth factor in PC12 cells[J]. Mol Neurobiol,1988;2(3):201-226.

[16] Divinski I,Holtser-Cochav M,Vulih-Schultzman I,et al. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin[J]. J Neurochem,2006;98(3):973-984.

[17] Carmeliet P,Dor Y,Herbert JM,et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis,cell proliferation and tumour angiogenesis [J]. Nature,1998;394(6692):485-490.

[18] Shoshani T,Faerman A,Mett I,et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene,RTP801,involved in apoptosis[J]. Mol Cell Biol,2002;22(7):2283-2293.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 519 页)

床应用发展的趋势,结合目前对 PC MSG 基因序列及其功能分析结果[8~10],我们针对 PC MSG 靶基因设计同源序列,用含有 RNA 聚合酶启动子Ⅲ(RNA polⅢ)的转录载体 pTZU6+1 成功构建能产生 siRNA 的重组载体质粒 pPC-MSG,为 RNAi 治疗 PCP 的实验研究与临床研究奠定了基础,已经证明重组载体质粒 pPC-MSG 在体外对 PC 有一定干扰作用。

(致谢:重庆医科大学病毒性肝炎研究所的唐霓博士、郭晖老师;重庆医科大学附属第一医院的向廷秀博士、张秉强博士、余登高老师、唐小葵博士;深圳市红十字会医院倪小毅博士等。)

参 考 文 献

[1] 倪小毅,陈雅堂.卡氏肺孢子虫在八种细胞系上的增殖情况[J]. 中华传染病杂志,2002;20(4):233-236.

[2] 倪小毅,陈雅堂.快速鉴定卡氏肺孢子虫[J]. 重庆医科大学学报,1999;24(3):283-284.

[3] Keely SP,Fischer JM,Stringer JR.Evolution and speciation of Pneumocystis[J]. Eukaryot Microbiol,2003;50(S):624-626.

[4] Frenkel JK.Pneumocystis pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease(IDD):a critical historical overview[J]. Eukaryot Microbiol,1999;46(5):89-92.

[5] Cushion MT,Stringer JR.Has the name really been changed?It has for most researcher[J]. Chin Infect Dis,2005;41(12):1756-1758.

[6] Stringer JR,Beard CB,Miller RF,et al.a new name (Pneumocystis jiroveci)for Pneumocystis from humans[J]. Emerg Infect Dis,2002;8(9):891-896.

[7] Ambrose HE,Keely SP,Aliouat EM,et al.Expression and complexity of the PRT1 multigene family of Pneumocystis carinii [J]. Microbiology,2004;150(Pt 2):293-300.

[8] Stringer JR, Keely SP.Genetics of Surface Antigen Expression in Pneumocystis carinii[J]. Infection and Immunity,2001;69(2):627-639.

[9] Hauser PM,Lo Presti L,Cockell M,et al.Analysis of Pneumocystis carinii gene function by complementation in yeast mutants[J]. Eukaryot Microbiol,2006;53(Suppl 1):S149-150.

[10] Keely SP,Linke MJ,Cushion MT,et al. Pneumocystis murina MSG gene family and the structure of the locus associated with its transcription[J]. Fungal Genet Biol,2007;44(9):905-919.

(责任编辑:冉明会)