基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000376

星形胶质瘤细胞 GFAP 的缺失对细胞周期相关蛋白的影响

刘成宇，谢　鹏
（重庆医科大学神经科学研究中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：应用 RNA 干扰(RNAi)方法下调胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein，GFAP)基因表达，研究 GFAP 对星形胶质瘤细胞 U251 细胞增殖的影响及可能的作用机制。**方法**：采用小分子 RNA 干扰(Small interfering RNA，siRNA)技术特异性的干扰 U251 细胞中内源性 GFAP 的表达，并通过 RT-PCR 和 Western blot 技术检测 U251 细胞中 GFAP 的 mRNA 和蛋白表达水平，确定干扰效率。Western blot 技术检测 si-NC 和 si-GFAP 转染 48 h 后，U251 细胞中 GFAP、CREB、cyclinD1、CDK2、CDK4、CDK6、p15、p18、p27、Bax、Bcl-2 和 Caspase 3 蛋白表达变化；MTT 检测各组的细胞增殖情况。**结果**：(1)在 U251 细胞中特异性的抑制 GFAP 表达，抑制细胞增殖，降低细胞总 RNA 和总蛋白含量(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=3.962，P=0.017；t=3.833，P=0.019)。(2)在 U251 细胞中干扰 GFAP 表达，显著性抑制 CREB(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=4.834，P=0.008)、cyclin D1(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=3.610，P=0.023)、CDK2(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=6.678，P=0.003)和 CDK4(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t= 4.530，P=0.011)的表达水平；并且显著性提高细胞周期依赖性激酶抑制因子 p18(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=-3.339，P= 0.029)和 p27(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=13.859，P=0.000)的蛋白表达水平。(3)MTT 检测结果显示 24 和 48 h 时 si-GFAP 组细胞生长速度明显低于 si-NC 组(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=6.389，P=0.000；t=6.058，P=0.000)，差异有统计学意义。(4)在 U251 细胞中抑制GFAP 表达，对凋亡相关蛋白 Bax(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=-0.657，P=0.547)、Bcl-2(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=-0.991，P=0.378)和 Caspase 3(si-NC 组 vs.si-GFAP 组：t=-1.848，P=0.138)的表达无明显影响。**结论**：在 U251 细胞中抑制 GFAP 的表达，影响细胞周期相关蛋白的表达，从而抑制细胞的增殖。

【关键词】调胶质纤维酸性蛋白；星形胶质瘤细胞；细胞周期；抑郁症
【中图分类号】R329.2+8；R749.99　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2014-02-19

Effects of knocking-down GFAP on cell cycle related proteins in glioma cells

Liu Chengyu，Xie Peng
(Neuroscience Center，Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***：To investigate the effects and possible mechanism of glial fibrillary acidic protein(GFAP) on the proliferation of human astroglioma cell lines U251 by RNA interfering technique. ***Methods***：GFAP siRNA was designed to specifically knockdown endogenous GFAP expression in U251. The mRNA and protein levels of GFAP after si-GFAP transfection were detected to determine the efficiency interference in U251 cells. After knocking down GFAP in U251 cells，the protein levels of GFAP，CREB，cyclinD1，CDK2，CDK4，CDK6，p15，p18，p27，Bax，Bcl-2 and Caspase 3 were assessed by Western blot and the proliferation of cells was measured by MTT assay. ***Results***：(1)Specific inhibition of GFAP expression suppressed cell proliferation，as well as reduced total RNA and protein contents in U251 cells(si-NC group vs. si-GFAP group：t=3.962，P=0.017；t=3.833，P=0.019). (2)In U251 cells，interfering GFAP expression significantly inhibited protein levels of CREB(si-NC group vs. si-GFAP group：t=4.834，P=0.008)，cyclin D1 (si-NC group vs. si-GFAP group：t=3.610，P=0.022)，cyclin-depended kinase 2(CDK2) (si-NC group vs. si-GFAP group：t= 6.678，P=0.003) and CDK4(si-NC group vs. si-GFAP group：t=4.530，P=0.011)，and greatly elevated protein levels of p18(si-NC group vs. si-GFAP group：t=-3.339，P=0.029) and p27(si-NC group vs. si-GFAP group：t=13.859，P=0.000)，the cyclin-depended kinase inhibitors(CKIs). (3)Silencing GFAP by siRNA significantly inhibited the proliferation of U251 cells at 24 h and 48 h after the transfection(si-NC group vs. si-GFAP group：t=6.389，P=0.000；t=6.058，P=0.000). (4)Knocking down GFAP exerted no significant effect on the expression levels of apoptotic proteins，including Bax(si-NC group vs. si-GFAP group：t=-0.657，P=0.547)，Bcl-2(si-NC group vs. si-GFAP group：t=-0.991，P=0.378) and caspase 3(si-NC group vs. si-GFAP group：t=-1.848，P=0.138) in U251 cells. ***Conclusion***：GFAP inhibition in U251 cells results in cell cycle arresting，thereby suppresses cell proliferation.

【Key words】glial fibrillary acidic protein；glioma cell；cell cycle；depression

作者介绍：刘成宇，Email：liuchengyu0418@hotmail.com，
研究方向：抑郁症的蛋白质组学与多肽组学研究。
通信作者：谢　鹏，Email：xiepeng@cqmu.edu.cn。

基金项目：国家重点基础研究发展计划资助项目(编号：2009CB008300)。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161026.1526.001.html
(2014-07-15)

抑郁症是最常见的精神疾病之一，影响全球超过 16%人口的生活和生存状态，并且近年来全世界发病率逐渐上升[1]。星形胶质细胞（astrocyte）是中枢神经系统中数量最多，分布最广的一种胶质细胞。星形胶质细胞通过参与神经系统中神经递质摄取、糖代谢；调节突触的可塑性和维护血脑屏障的功能，从而达到维持中枢神经系统微环境稳定的作用。胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）是星形胶质细胞标志性蛋白。近些年研究中发现，GFAP 参与星形胶质细胞的许多生物学功能，包括维护血脑屏障正常的生理功能、突触可塑性、细胞增殖与分裂、自噬、对囊泡及溶酶体在星形胶质细胞转运、维持神经递质在星形胶质细胞及神经元与胶质细胞平衡等[2]。GFAP 在抑郁症患者脑皮层边缘系统和海马等关键脑区中的表达水平显著性降低可能是导致胶质细胞和神经元凋亡以及脑部特定环路改变的关键原因[3-4]，因此 GFAP 已成为抑郁症疾病发生、发展和治疗的新靶点被广泛关注[5-6]。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程，主要通过细胞蛋白（cyclins）-周期蛋白依赖性激酶（cyclin-depended kinases，CDKs）-周期蛋白依赖性激酶抑制因子（CDK inhibitors，CKIs）级联通路来实现其对个体的发育、生长和神经发生等生物功能的调控[7]。越来越多的研究表明，细胞周期的失调已成为神经退行性疾病，如阿尔茨海默病、帕金森疾病、精神分裂症和抑郁症疾病的病因之一[8-11]。另外，研究表明，星形胶质细胞中的 vimentin，一种Ⅲ型中间丝蛋白，能够促进细胞粘附和迁移、参与细胞有丝分裂、分化及信号转导的作用[12-13]。GFAP 作为星形胶质细胞的另一种Ⅲ型中间丝蛋白，但是关于其对细胞周期的调控尚无报道。本论文通过特异性干扰人源星形胶质瘤细胞内源性 GFAP 表达，研究 GFAP 调控细胞周期的分子机制。

1 对象与方法

1.1 材料

人脑星形胶质瘤细胞系 U251 由武汉大学生命科学学院李文化教授实验室惠赠。siGFAP 购自广东锐博生物技术有限公司（共设计 3 条，序列见表 1）。合成的 siRNA 用 DEPC 水溶解至终浓度 20 M，于-20 ℃保存。细胞培养用 DMEM 培养基、胎牛血清（FBS）、0.05%胰酶、氨苄青霉素/链霉素双抗（P/S）均购自美国 Thermo 公司。MTT 试剂购自美国 Amersco 公司。转染试剂 lipotamin TMRNAiMax 购自美国 Gibco 公司。RNA 提取试剂 RNAiso Plus 购自日本 TaKaRa 公司。cDNA第一链合成试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。2×Taq Mixture 缓冲液购自中国康为生物有限公司。抗体：β-actin 购自美国 Sigma 公司，GFAP 抗体购自英国 Abcam 公司，cyclinD1，CDK2，CDK4，CDK6，p15，p18，p27，Caspase 3，Bax 和 CREB均购自美国 Cell Signaling Technology（CST）公司，Bcl-2 购自美国 BD 公司。HRP 偶联的羊抗兔/羊抗鼠二抗购自美国 Bio-Rad 公司。

表 1 GFAP 基因 siRNA 序列

Tab.1 siRNA sequence of GFAP gene

靶基因名称	siRNA序列
si GFAP -1	GGAGAACCGGATCACCATT
si GFAP -2	TGCAGACCTTCTCCAACCT
si GFAP -3	TCCAACCTGCAGATTCGAG

1.2 细胞培养与转染

U251 细胞培养于 DMEM 培养基（含 10% FBS 和 1% P/S），放置于浓度为 5% CO_2、21% O_2 的培养箱中，2~3 d 细胞传代 1 次。待细胞生长到细胞密度达 40% 时，更换无 P/S 培养基，进行转染实验。非特异性 si-NC 与 si-GFAP -1，-2，-3 根据 LipotaminTMRNAiMax reagent 的转染指南中步骤转染至 U251 细胞，转染 48 h 后收取细胞进行后续实验。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 检测 细胞转染 48 h 后，非特异性 si-NC 组与 si-GFAP 组细胞用 PBS 洗去培养基，使用 RNAiso plus 提取细胞总 RNA，用 Thermo Nano 2000 核酸酶标仪测定总RNA 浓度与纯度。取 2 μg 总 RNA、1 μL Oligo dT、1 μL dNTP 与 DEPC水配制成 12 μL 的反应体系，混匀，65 ℃孵育 5 min 后迅速置于冰上；向 12 μL 的反应体系中加入 2 μL DTT、4 μL 第一链反应溶液、1 μL RNA 酶抑制剂和 1 μL 逆转录酶，37 ℃水浴 50 min；最后 70 ℃孵育 15 min 终止反应，得到 cDNA 产物，保存于-20 ℃待用。将逆转录反应得到的 cDNA 用双蒸水稀释 10 倍之后作为模板。按如下体系配制 PCR 反应体系（20 μL）：2×Taq Mixture 缓冲液，10 μL；Primer 各 0.5 μL；模板 2 μL；灭菌水 7 μL。以 18s rRNA 作为内参，PCR 条件依据所订购引物不同先进行条件优化实验。引物通过 Primer 3 软件自行设计，见表 2。将非特异性 si-NC 与 si-GFAP -1，-2，-3 组转染 U251 细胞 48 h 后，检测 U251 细胞中 GFAP 的 mRNA 水平变化。RT-PCR 检测结果表明，与转染非特异性对照组相比，转染 si-GFAP-1，-2，-3 组中 si-GFAP-2 的干扰效率最好，后续实验都是基于 si-GFAP2 干扰 U251 细胞中 GFAP 表达来进行的。

表 2 半定量 RT-PCR 所用引物及其序列

Tab.2 Primers sequence for RT-PCR

基因名称	引物序列
18s rRNA	5'-3'TTAAGAGGGACGGCCGGGGG
	3'-5'GCCGGGTGAGGTTTCCCGTG
GFAP	5'-3'GAGAACAACCTGGCTGCCTA
	3'-5'GGTACCACTCTTCGGCTTCA

1.3.2 Western blot 检测蛋白表达 细胞转染 48 h 后，非特异性 si-NC 组与 si-GFAP 组细胞经 PBS 洗去培养基，收取细胞沉淀用 RIPA 裂解液（含 1 mmol/L PMSF）重悬，冰上裂解 10 min，超声处理 1 min，然后 4 ℃ 8 000 g 离心 10 min，收取上清。上清中蛋白浓度经二辛可酸（BCA）法测定后，取 20 μg 总蛋白与 SDS-PAGE 上样缓冲液混合，热变性 10 min，用 SDS-PAGE 胶对蛋白进行电泳分离。蛋白经电泳分离后，在湿转转膜缓冲系统中将蛋白转移至孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜。然后用去离子水洗涤 PVDF 膜 5 min，然后用 5%脱脂奶粉室温封闭 30 min，再用相应的一抗在 4 ℃冰箱摇床上孵育过夜。用 TBST 洗涤印迹膜 3 次，每次 10 min，再用对应的 HRP 偶联二抗常温孵育 2 h，再用 TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，孵育化学发光底物，于暗室用暗匣压片曝光，经过 X 光片自动洗片机显影。Western blot 技术检测 si-NC 和 si-GFAP 转染 48 h 后，U251 细胞中 GFAP、CREB、cyclinD1、CDK2、CDK4、CDK6、p15、p18、p27、Bax、Bcl-2 和 Caspase 3 的蛋白水平变化。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖 将处于对数生长期的细胞，制成单细胞悬液，按 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板，总体积为 200 μl/孔，分为两组 si-NC 组和 si-GFAP 组，设 6 个复孔，分别于转染后 12、24、48 h 每孔加入 20 μL MTT（5 g/L），继续培养 4 h 后小心弃去上清，加 DMSO 150 μL，室温振荡 30 min 至结晶紫完全溶解，置于酶联免疫检测仪上，选择 490 nm 波长测定吸光度（absorbance，A）值，最后绘制细胞增殖曲线。

1.4 *数据处理与统计学分析*

将扫描后的 DNA 凝胶成像结果和免疫印迹显影结果用 Quantity One 1-D 分析软件（美国 Bio-rad 公司）进行灰度值测量，将目的表达量归一化到同一样品的内参表达量。数据应用 StatView 5.0 标准统计软件进行统计学分析。各组数据经过 Mann-Whitney 检验进行两组数据之间的评估，然后计算各个实验组的平均值和标准方差，最后归一化到对照组的平均值。将对照组平均值设为 1，得到各实验组相对变化倍数，结果以平均值±标准方差的形式呈现。各组数据经过 t 检验进行 2 组数据之间的评估；MTT 实验中吸光度水平比较采用重复测量方差分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 *抑制 GFAP 基因表达对细胞增殖及总 RNA 含量和总蛋白含量影响*

观察 U251 细胞转染 si-GFAP 后 24 h 的细胞图片发现，与 si-NC 组细胞相比，转染 si-GFAP 细胞的数量明显减少（图 1 A）；并且细胞的总 RNA 含量（59.92 ± 2.65、46.75 ± 5.11）与总蛋白质含量（383.33 ± 3.71、259.52 ± 55.83）都明显降低（t=3.962，P=0.017；t=3.833，P=0.019），统计结果见图 1B、C（n=3，P<0.05）。结果表明抑制 GFAP 的表达可减少细胞的增殖，并能明显降低细胞总的 RNA 和蛋白含量。另外，MTT 的结果显示，转染 si-GFAP 和 si-NC 12 h 后 2 组的 U251 细胞的增殖速度无明显变化（F=4.129，P=0.07）。但是转染后 24 和 48 h 各组的 U251 细胞的增殖速度均不同，si-GFAP 组的细胞生长速度明显慢于 si-NC 组，且生长速度两组间有统计学差异（F=33.943，P=0.000；F=30.718，P= 0.000）与 si-NC 组相比，在 24~48 h 内，si-GFAP 组的 U251 细胞的增殖速度明显降低，结果如图 1D 显示。

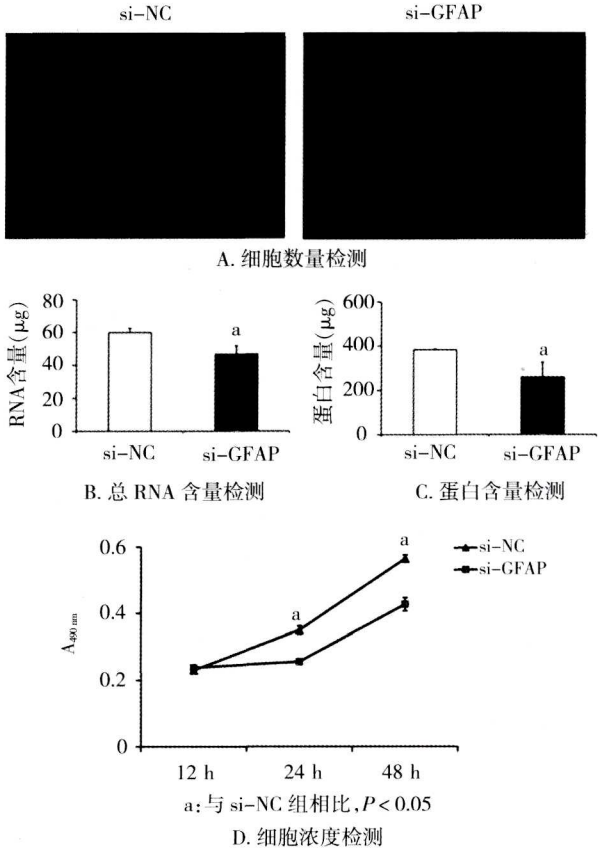
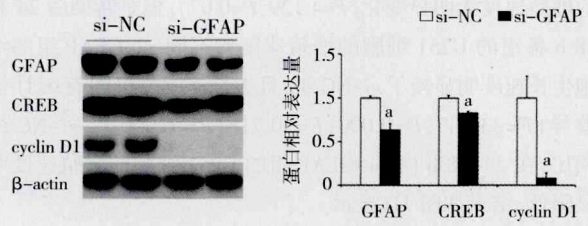


图 1 U251 细胞中敲除 GFAP 基因减少细胞数目、总 RNA 和蛋白的含量

Fig.1 Transfection of si-GFAP reducing the cell number, the total RNA and protein contents of U251 cells

2.2 *抑制 GFAP 基因表达导致核转录因子 CREB、cyclinD1 蛋白水平下调*

U251 细胞中敲除 GFAP 基因后，与 si-NC 组相比，si-GFAP 组 GFAP 蛋白水平（1.22 ± 0.04、0.77 ± 0.12）降低了 37%，GFAP/β-actin：t=4.834，P=0.008。由于发现在 U251 细胞中抑制 GFAP 基因的表达导致细胞数目的减少，因此检测了 CREB 和 cyclin D1 的蛋白水平。如图 2 所示，与 si-NC 组相比，U251 细胞敲除 GFAP 基因后 CREB 蛋白水平（1.09 ± 0.05、0.90 ± 0.03）降低了 18%，同时 cyclin D1 蛋白水平（1.84 ± 0.43、0.15 ± 0.10）降低了 92%。定量结果显示 si-NC 组和 si-GFAP 组的 CREB/β-actin：t=4.834，P=0.008；cyclin D1/β-actin：t=3.610，P=0.023。统计结果显示 U251 细胞中抑制 GFAP 基因表达能显著性降低 CREB 和 cyclin D1 的蛋白水平，差异有统计学意义（n=3，P<0.05）。



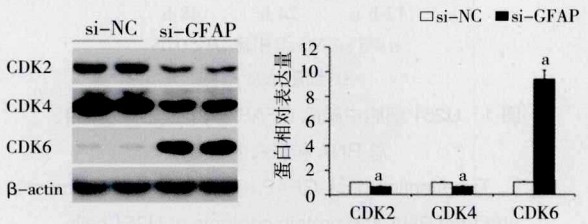
a：与 si-NC 组相比，$P<0.05$

图 2 U251 细胞中敲除 GFAP 基因能抑制 CREB 和 cyclin D1 蛋白的表达

Fig.2 Knockdowning GFAP inhibiting CREB and cyclin D1 levels in U251 cells

2.3 GFAP 表达的降低对 CDKs 及 CKIs 的影响

结果如图 3 显示，通过抑制 U251 细胞 GFAP 基因表达后，细胞周期依赖激酶 CDK2 和 CDK4 的蛋白水平都明显降低，其中 CDK2（1.23 ± 0.05、0.76 ± 0.08）降低了 39%，CDK4（1.21 ± 0.10、0.78 ± 0.11）降低了 36%，定量结果显示 CDK2/β-actin：$t=6.678$，$P=0.003$；CDK4/β-actin：$t=4.530$，$P=0.011$，统计结果显示 U251 细胞中抑制 GFAP 基因表达从而明显降低 CDK2 和 CDK4 的蛋白水平表达，差异有统计学意义（$n=3$，$P<0.05$）。但是抑制 U251 细胞 GFAP 基因的表达后，CDK6 的蛋白水平（0.19 ± 0.01、1.84 ± 1.27）上升了 9.4 倍，CDK6/β-actin：$t=-11.470$，$P=0.000$，统计结果显示抑制 U251 细胞中的 GFAP 表达从而明显升高 CDK6 的蛋白水平表达，差异有统计学意义（$n=3$，$P<0.05$）。CDK4 和 CDK6 与 cyclin D1 形成相应的复合物，CDK6 蛋白表达升高可能是由于 CDK4 的降低而导致 CDK6 代偿性的升高。

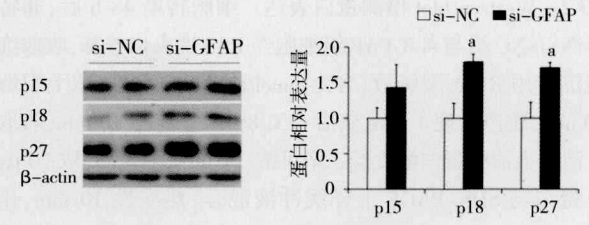


a：与对照组比较，$P<0.05$

图 3 U251 细胞中敲除 GFAP 基因能调节 CDKs 蛋白的表达

Fig.3 Knockdowning GFAP regulating CDKs levels in U251 cells

细胞周期依赖激酶抑制因子 p15、p18 和 p27 是细胞周期负性调控因子。结果如图 4 显示，抑制 U251 细胞 GFAP 基因表达后，细胞周期依赖激酶抑制因子 p18 和 p27 的蛋白水平（0.72 ± 0.37，1.29 ± 0.18；0.74 ± 0.38，1.27 ± 0.13）分别上升了 1.8 倍和 1.7 倍，p18/β-actin：$t=-3.339$，$P=0.029$；p27/β-actin：$t=13.859$，$P=0.000$，统计结果显示抑制 GFAP 基因表达从而显著性升高 p18 和 p27 的蛋白水平表达，差异有统计学意义（$n=3$，$P<0.05$）。其中抑制 U251 细胞中 GFAP 基因的表达对 p15 的蛋白水平（0.83 ± 0.26，1.19 ± 0.58）无明显影响，p15/β-actin：$t=-1.217$，$P=0.290$。结果说明抑制 GFAP 基因的表达影响了 U251 细胞中 CDKs 和 CKIs 的蛋白水平，由此可能影响细胞周期从而影响细胞的增殖等。



a：与 si-NC 组相比，$P<0.05$

图 4 U251 细胞中敲除 GFAP 基因能上调 CKIs 蛋白的表达

Fig.4 Knockdowning GFAP up-regulating CKIs expression levels in U251 cells

2.5 凋亡相关蛋白在 GFAP 被抑制无显著性变化

本研究检测了凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3，如图 5 显示，U251 细胞中抑制 GFAP 基因的表达对 Bax、Bcl-2 和 Caspase 3 的蛋白水平无（0.95 ± 26.00，1.06 ± 0.13；0.96 ± 0.04，1.04 ± 0.14；0.91 ± 0.16，1.09 ± 0.11）明显影响，定量结果显示 Bax/β-actin：$t=-0.657$，$P=0.547$；Bcl-2/β-actin：$t=-0.991$，$P=0.378$；Caspase-3/β-actin：$t=-1.848$，$P=0.138$。Bax、Bcl-2 和 Caspase 3 蛋白水平无明显变化，差异无统计学意义（$n=3$，$P>0.1$）。结果说明 U251 细胞抑制 GFAP 表达并无凋亡现象的发生，那么 GFAP 基因的缺失导致细胞数目的减少仅通过调节细胞周期通路来完成的。

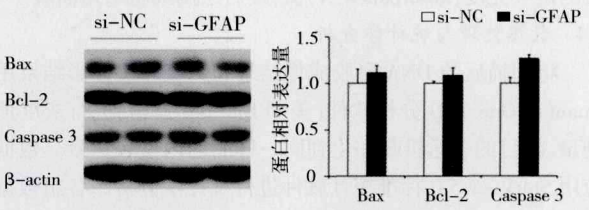


图 5 U251 细胞中敲除 GFAP 基因的表达对细胞凋亡反应无影响

Fig.5 Knockdowning GFAP exerting no effect on apoptosis pathway in U251 cells

3 讨 论

目前，研究发现抑郁症、帕金森病及阿尔茨海默病等神经退行性疾病均与星形胶质细胞的功能紊乱有关[14]。GFAP 作为一种Ⅲ型中间丝蛋白主要表达在成熟的星形胶质细胞中，作为骨架蛋白主要对细胞起到支持和保护的作用。本论文通过 siRNA 技术特异性的抑制星形胶质瘤细胞 U251 中 GFAP 基因的表达，发现 GFAP 的低表达可以抑制促细胞增殖的细胞周期调控蛋白的表达，最终抑制细胞的增殖。

研究表明，抑郁症模型海马和前额叶皮层区域神经发生受抑制、压力应激受阻、学习能力减退等与细胞周期失衡密切相关[15-16]。细胞周期调控是影

响细胞增殖与分化的一个复杂的生物学过程，细胞的增殖和分化受到多种蛋白的调控，其中周期素蛋白 cyclin、CDKs 和 CKIs 是调控细胞周期的主要内源性因子[17-18]。有研究报道，cAMP 应答元件结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）作为细胞核内调控因子，通过自身及其磷酸化实现调控 cyclins、CDKs 和 CKIs 的转录水平，从而调控细胞周期，影响细胞增殖[19]。另外，Wang 等[20]发现核内转录因子 CREB 的表达直接参与到对 cyclin D1 蛋白在 G1 期的调控，原因可能是 CREB 通过与cyclin D1 等基因的启动子区域的 CRE 位点结合，从而调控 cyclin D1 等基因的转录水平，进而影响细胞的增殖和分化。目前研究，与 G1 期周期蛋白结合的 CDK 激酶主要包括 CDK2、CDK4 和 CDK6，cyclin D1 是细胞周期 G1 期中关键的调控蛋白，cyclin D1 主要与 CDK4 和 CDK6 形成相应的复合物，从而调控下游蛋白影响细胞增殖，因此 cyclin Dl 对细胞周期调控至关重要[21-22]。本研究通过特异性抑制星形胶质瘤细胞中 GFAP 基因表达，从而明显降低CREB 蛋白和 cyclin D1 蛋白的表达（图 2）。这一结果提示 GFAP 基因表达下调参与 U251 细胞的周期调控，从而导致细胞周期内源性正调控蛋白表达的显著降低。本实验从细胞状态及总 RNA 和蛋白含量降低结果说明 U251 特异性的抑制 GFAP 基因表达可能导致细胞增殖和分化受到抑制。Heine 等[23]研究发现经过 3 周慢性不可预见的刺激后，大鼠海马中增殖的细胞数目明显减少，并且 CDK 抑制因子p27 阳性细胞数目明显增加。这和本实验的结果类似，在 U251 细胞中抑制 GFAP 基因表达导致CDK 抑制因子 p18 和 p27 的蛋白表达水平明显下降。

为了全面验证 GFAP 敲除对 U251 细胞增殖的作用，通过 MTT 检测结果发现 GFAP 敲除后U251 细胞的增殖明显减慢。之前的细胞结果表明干扰 U251 细胞 GFAP 基因的表达，从而导致细胞数目的减少，猜测 GFAP 基因的缺失除了影响细胞增殖外，还有可能导致细胞凋亡反应的发生，从而导致细胞数目减少。接下来检测了经典凋亡通路中的相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase 3 在 GFAP 基因缺失的U251 细胞中的表达情况。结果显示（图 5）敲除 U251 细胞中的 GFAP 基因对凋亡效应元件蛋白 Caspase 3 的蛋白水平无影响，凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的蛋白水平也无作用。因此，推测敲除U251 细胞中的GFAP 基因会降低细胞周期相关蛋白的表达，从而抑制细胞增殖，但不影响细胞凋亡。

综上所述，本实验首次证明特异性干扰星形胶质瘤细胞中 GFAP 基因的表达，导致促细胞增殖的细胞周期蛋白 cyclinD1、CDK2 和 CDK4 蛋白表达被抑制，并上调 CDK 抑制因子 p18 和 p27 的表达，从而抑制 U251 的细胞增殖和分化。但是对于 GFAP 调控细胞周期的具体的作用机制还需要进一步探讨，为进一步研究 GFAP 可能作为抑郁症研究的分子靶点提供理论依据，并为抑郁症的药物研发等提供新的靶点。

参 考 文 献

[1] Kessler RC, Berglund P, Demler O, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R)[J]. JAMA, 2003, 289(23): 3095-3105.

[2] Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease[J]. Prog Neurobiol, 2011, 93(3): 421-443.

[3] Miguel-Hidalgo JJ, Baucom C, Dilley G, et al. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder[J]. Biol Psychiatry, 2000, 48(8): 861-873.

[4] Si X, Miguel-Hidalgo JJ, O'Dwyer G, et al. Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(11): 2088-2096.

[5] Banasr M, Duman RS. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors[J]. Biological Psychiatry, 2008, 64(10): 863-870.

[6] Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, et al. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole[J]. Mol Psychiatry, 2010, 15(5): 501-511.

[7] Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited[J]. Cancer Res, 2000, 60(14): 3689-3695.

[8] Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease[J]. Molecular Neurodegener, 2011, 6: 85.

[9] Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis[J]. European J Neurosci, 2011, 33(6): 1139-1151.

[10] Reif A, Fritzen S, Finger M, et al. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression[J]. Mol Psychiatry, 2006, 11(5): 514-522.

[11] Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression [J]. Nat Neurosci, 2007, 10(9): 1110-1115.

[12] Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(10): 2050-2062.

[13] Kueper T, Grune T, Prahl S, et al. Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23427-23436.

[14] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology[J].

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001029

欧亚旋覆花总黄酮对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用

陈　慧，龙媛媛，果　磊

（重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨欧亚旋覆花总黄酮（Inula britannica flower total flavonoids，IBFTF）对 D-半乳糖诱导的亚急性衰老模型小鼠的抗衰老作用。**方法**：随机将昆明小鼠分为 6 组（每组 10 只）：空白对照组，模型组，维生素 E（vitamin E，VE）组，欧亚旋覆花总黄酮低、中、高剂量组。空白对照组给予颈背部皮下注射 0.3 mL 生理盐水，其余组均给予等体积 500 mg/kg D-半乳糖，每日 1 次，连续 8 周。造模第 3 周，低、中、高剂量组分别灌服 0.5 mL 欧亚旋覆花总黄酮 100、200 和 400 mg/kg，VE 组灌服等体积维生素 E 100 mg/kg，空白对照组和模型组灌服等体积生理盐水，每日 1 次，连续 6 周。检测小鼠体质量、胸腺指数和脾指数，同时测定血清中抗氧化酶活性如超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、过氧化氢酶（catalase，CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）等衰老指标。β 半乳糖苷酶染色试剂盒检测小鼠海马组织中衰老相关的 β 半乳糖苷酶含量。**结果**：低、中、高剂量组小鼠体质量明显高于模型组，差异具有统计学意义（P=0.053、P=0.001、P=0.000）；低、中、高剂量组小鼠胸腺指数和脾指数明显高于模型组（均 P=0.000）；低、中、高剂量组小鼠血清中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力明显高于模型组，其 MDA 含量低于模型组（均 P=0.000）；低、中、高剂量组小鼠海马组织 β 半乳糖苷酶（senescence-associated beta-galactosidase，SA-β-gal）阳性率明显低于模型组，差异有统计学意义（P=0.001、P=0.000、P=0.000）。**结论**：欧亚旋覆花总黄酮是一种天然抗氧化剂，可延缓 D-半乳糖诱导的模型小鼠的机体衰老。

【关键词】欧亚旋覆花；总黄酮；D-半乳糖；抗衰老

【中图分类号】R28　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-28

Anti-aging effect of Inula britannica flower total flavonoids on mice in D-galactose induced aging model

Chen Hui，Long Yuanyuan，Guo Lei

（*Department of Burn and Plastic Surgery，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To investigate the anti-aging effect of Inula britannica flower total flavonoids（IBFTF）on mice in D-galactose induced aging model. ***Methods***：Kunming mice were randomly divided into 6 groups（10 mice in each group）：control group，model group，vitamin E（VE）group，low，medium and high dose of IBFTF group. Mice in control group were subcutaneously injected with 0.3 mL saline，while those in other groups were injected with the same volume of D-galactose（500 mg/kg），once daily for 8 weeks. From the third week，mice in low，medium

作者介绍：陈　慧，Email：fengxinbinger@126.com，
研究方向：创面愈合与瘢痕防治。

通信作者：果　磊，Email：cqguolei@sina.com。

基金项目：重庆市卫生局中医药科技资助项目（编号：ZY20132123）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.0910.002.html（2016-10-27）

Acta Neuropathol，2010，119(1)：7-35.

[15] Patricio P，Mateus-Pinheiro A，Sousa N，et al. Re-cycling paradigms：cell cycle regulation in adult hippocampal neurogenesis and implications for depression[J]. Mol Neurobiol，2013，48(1)：84-96.

[16] Cunningham KA，Watson CS. Cell cycle regulation，neurogenesis，and depression[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2008，105(7)：2259-2260.

[17] van den Heuvel S. Cell-cycle regulation[J]. WormBook，2005：1-16.

[18] Lim S，Kaldis P. Cdks，cyclins and CKIs：roles beyond cell cycle regulation[J]. Development，2013，140(15)：3079-3093.

[19] Gubbay O，Rae MT，McNeilly AS，et al. cAMP response element-binding（CREB）signalling and ovarian surface epithelial cell survival [J]. J Endocrinol，2006，191(1)：275-285.

[20] Wang Z，Kar S，Carr BI. Cdc25A protein phosphatase：a therapeutic target for liver cancer therapies[J]. Anticancer Agents Med Chem，2008，8(8)：863-871.

[21] Sherr CJ，Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases[J]. Genes Dev，2004，18(22)：2699-2711.

[22] Matsuura I，Denissova NG，Wang G，et al. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads[J]. Nature，2004，430(6996)：226-231.

[23] Heine VM，Maslam S，Joels M，et al. Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement[J]. Neuroscience，2004，129(3)：593-601.

（责任编辑：张辉洁）