橄榄苦苷对染砷小鼠大脑神经免疫相关基因表达的影响*

王 昱**

(陇南师范高等专科学校农林技术学院,陇南特色农业生物资源研究开发中心,甘肃 成县 742500)

摘要:为了研究橄榄苦苷(OP,oleuropein)对染三氧化二砷(As_2O_3)小鼠大脑神经免疫相关基因表达的影响.将昆明小鼠随机分成对照组、As_2O_3 组和 As_2O_3 + OP 组,按不同方式灌胃,连续 5 周后,利用基因芯片技术来评价 OP 对染砷小鼠大脑神经免疫相关基因表达的影响.与对照组比较,As_2O_3 组小鼠大脑白细胞介素(IL,interleukin)家族基因 IL-3、IL-10、IL-11、IL-1a、IL-15、IL-20、IL-23a、IL-31、IL-1f6、IL-13、IL-25 和 IL-24 表达下调,IL-17d 表达上调;白细胞介素家族受体基因 IL-13 受体 α1(IL-13ral)和 IL-2 受体 γ 链(IL-2rg)表达上调,IL-17 受体 C (IL-17rc)表达下调;下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴受体相关基因精氨酸加压素(Avp)、精氨酸加压素受体 1B(Avpr1b)、精氨酸加压素受体 1A(Avpr1a)、精氨酸加压素受体 2(Avpr2)、促肾上腺皮质激素释放激素受体 1(Crhr1)、促肾上腺皮质激素释放激素受体 2(Crhr2)表达下调,促肾上腺皮质激素释放激素(Crh)和阿黑皮素原 α(Pomc1)表达上调.经 OP 干预后,As_2O_3 致小鼠的神经免疫毒性明显减轻,大脑组织白细胞介素家族部分基因和下丘脑-垂体-肾上腺轴受体相关基因的表达水平与对照组表达无差异.OP 可降低 As_2O_3 对小鼠神经免疫的毒性,其机制与影响大脑组织白细胞介素家族部分基因和下丘脑-垂体-肾上腺轴受体相关基因的表达有关.

关键词:橄榄苦苷;三氧化二砷;白细胞介素;下丘脑-垂体-肾上腺轴;基因芯片;小鼠

中图分类号:R28 **DOI**:10.19789/j.1004-9398.2020.01.006

0 引 言

我国饮水型砷中毒分布广、影响人群多,是环境砷中毒的主要类型[1].砷通过食物链或饮用水进入人体,容易蓄积,潜伏期长,危害大.研究显示,慢性饮水型高砷暴露使动物的空间学习、记忆能力下降[2],损伤神经元或增加神经系统损伤易感性[3],诱导凋亡人胶质瘤细胞[4],干扰动物大脑组织白细胞介素(IL,interleukin)家族部分基因和下丘脑-垂体-肾上腺轴受体相关基因的表达[5],抑制机体的细胞免疫、体液免疫、巨噬细胞及淋巴细胞系统整体功能[6-7].橄榄苦苷(OP,oleuropein)属于天然的多酚化合物,是油橄榄中最主要的含量最多的活性成分[8].本课题组前期已经研究了 OP 在降血糖、抗衰老及降血脂等方面的药理作用[9-11].为了进一步研究 OP 的药理作用,本研究在三氧化二砷(As_2O_3)染毒小鼠的基础上给予 OP 干预,观察大脑组织部分神经免疫相关基因表达的变化,探讨其拮抗神经毒性的保护作用.

1 材料与方法

1.1 动物模型建立与给药

健康昆明小鼠 30 只(购于兰州大学实验动物中心,生产许可证编号:14 - 006,体质量 18 ~ 20 g,雌雄各半),同条件饲养 1 周后随机分为 3 组(每组 10 只):As_2O_3 组、As_2O_3 + OP 组和对照组.As_2O_3 组每天灌胃 4 mg/kg 剂量的 As_2O_3 溶液[12];OP 组灌胃 4 mg/kg 剂量的 As_2O_3 溶液,同时灌胃 100 mg/kg 的 OP[10](陇南田园油橄榄科技开发有限公司提供);对照组每天灌胃等量的 0.9% 生理盐水.3 组实验连续处理 5 周后,断头处死小鼠,立即取大脑储存于 RNA 保存液中,备用.

1.2 总 RNA 的提取和基因芯片杂交

分别研磨各组实验小鼠大脑,按照 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)操作说明从中抽提总 RNA,用 RNeasy Mini Kit(美国 Oiagen 公司)进行纯化.用 UV-1800 紫外分光光度仪(日本 Tokyo)测定

收稿日期:2019-02-25

* 甘肃省高等学校科研项目(1128B-01);甘肃省陇南市科技计划项目(2016-11)

** 通信作者:gswangyu@126.com

首都师范大学学报(自然科学版)

RNA 的浓度和纯度,变性胶电泳(美国 Sigma 公司 DEPC 水和溴酚蓝,Bocherigmer 公司 MOPs 缓冲液)检测 RNA 有无降解,然后反转录成 cDNA、体外转录合成 cRNA 探针,同时用生物素标记探针,片段化处理探针,45℃下在杂交箱 640 (美国 Affymetrix 公司)中与 Mouse Genome 4302.0 Araay 基因芯片杂交 16 h,全自动芯片洗涤工作站 450(美国 Affymetrix 公司)中洗脱、染色;最后用 GeneArrayTM 扫描仪 3000(美国 Affymetrix 公司)扫描杂交信号.

1.3 芯片数据处理和生物学信息分析

采用 Microarray Suite Version 5.0 软件(美国 Affymetrix 公司)进行分析,在对单个样本表达分析的前提下,建立对照组、As_2O_3 组、As_2O_3 + OP 组基因表达谱,其中 $P > 0.06$ 为不表达,$P < 0.04$ 为表达,P 值在 0.04 ~ 0.06 为临界值. 将各组实验的基因表达谱进行组间比较,根据信号强度比值的对数(signal log ratio,SLR)判断. SLR > 1(即表达倍数 > 2)为表达上调,SLR < −1(即表达倍数 < 2)为表达下调,建立各组差异表达的数据库.

2 结 果

2.1 IL 家族基因的表达

OP 对小鼠大脑 IL 家族基因表达的影响结果列于表 1. 与对照组相比,As_2O_3 组小鼠大脑组织基因 IL-3、IL-10、IL-11、IL-1a、IL-15、IL-20、IL-23a、IL-31、IL-1f6、IL-13、IL-25 和 IL-24 表达均下调,IL-17d 表达上调. 与 As_2O_3 组比较,As_2O_3 + OP 组小鼠大脑组织基因 IL-3、IL-10、IL-11、IL-1a、IL-15、IL-20、IL-23a、IL-31、IL-25 和 IL-24 表达下调,IL-1f6 和 IL-17d 表达上调,IL-13 表达无差异. 除了基因 IL-15、IL-24 外,其他基因在对照组与 As_2O_3 + OP 组小鼠大脑组织的表达无差异. 不同组间 IL 家族基因差异表达倍数结果显示,OP 干预后,基因表达变化幅度减小,说明 OP 干预有效.

表 1 不同组间小鼠大脑白细胞介素家族基因差异表达倍数

基因	探针号	As_2O_3 组与对照组	As_2O_3 + OP 组与 As_2O_3 组	As_2O_3 + OP 组与对照组
IL-3	1450566_at	−13.32	−8.60	−1.57
IL-10	1450330_at	−5.46	−4.39	1.05
IL-11	1449982_at	−17.46	−12.03	−1.12
IL-1a	1421473_at	−22.27	−15.32	1.66
IL-15	1450550_at	−9.03	−7.50	2.71
IL-20	1421608_at	−21.73	−18.03	1.12
IL-23a	1419529_at	−12.87	−9.44	−1.17
IL-31	1430001_at	−10.66	−5.31	1.22
IL-1f6	1418609_at	−5.54	2.23	1.05
IL-13	1420802_at	−4.41	1.32	1.00
IL-25	1420740_at	−23.46	−17.00	−1.25
IL-24	1426181_at	−20.15	−16.92	−5.30
IL-17d	1435714_at	5.73	2.33	1.02

注:OP 为橄榄苦苷;As_2O_3 为三氧化二砷;IL 为白细胞介素.

2.2 IL 家族受体基因的表达

OP 对小鼠大脑 IL 家族受体基因表达谱数据列于表 2. 与对照组比较,As_2O_3 组小鼠大脑组织基因 IL-13 受体 α1(IL-13ral)和 IL-2 受体 γ 链(IL-2rg)表达上调,IL-17 受体 C (IL-17rc)表达下调. 与 As_2O_3 组比较,As_2O_3 + OP 组小鼠大脑组织基因 IL-13ral、IL-12rg 和 IL-17rc 表达上调. 基因 IL-13ral、IL-2rg 和 IL-17rc 在对照组与 As_2O_3 + OP 组小鼠大脑组织的表达无差异. As_2O_3 + OP 组与 As_2O_3 组的基因差异表达倍数均小于 As_2O_3 组与对照组的表达倍数绝对值,说明 OP 干预有效.

2.3 丘脑−垂体−肾上腺轴相关基因表达

OP 对小鼠大脑下丘脑−垂体−肾上腺轴相关基因表达结果列于表 3. 与对照组比较,As_2O_3 组小鼠大脑组织基因促肾上腺皮质激素释放激素受体 1(Crhr1)、促肾上腺皮质激素释放激素受体 2(Crhr2)、精氨酸加压素(Avp)、精氨酸加压素受体 1B(Avpr1b)、精氨酸加压素受体 1A(Avpr1a)、精氨酸加压素受体 2(Avpr2)表达下调,促肾上腺皮质激素释放激素(Crh)和阿黑皮素原 α(Pomc1)表达上

首都师范大学学报(自然科学版)

调. 与 As_2O_3 组比较,As_2O_3 + OP 组小鼠大脑组织基因 Crhr1、Crhr2、Avp、Avpr1b、Avpr1a、Avpr2 表达下调,Crh 和 Pomc1 表达上调. 除了基因 Crhr2 外,其他基因在对照组与 As_2O_3 + OP 组小鼠大脑组织的表达无差异. 同上,组间基因差异表达倍数绝对值变小,说明 OP 干预有效.

表 2　不同组间小鼠大脑白细胞介素家族受体基因差异表达倍数

基因	探针号	As_2O_3 组与对照组	As_2O_3 + OP 组与 As_2O_3 组	As_2O_3 + OP 组与对照组
IL-13ral	1454783_at	29.41	10.14	1.83
IL-2rg	1416295_a_at	15.52	6.30	1.64
IL-17rc	1419671_a_at	-4.48	2.35	1.02

注:IL-13ral 为 IL-13 受体 α1;IL-2rg 为 IL-2 受体 γ 链;IL-17rc 为 IL-17 受体 C.

表 3　不同组间小鼠大脑下丘脑-垂体-肾上腺轴相关基因差异表达倍数

基因	探针号	As_2O_3 组与对照组	As_2O_3 + OP 组与 As_2O_3 组	As_2O_3 + OP 组与对照组
Crh	14557984_at	3.55	2.33	-1.42
Crhr1	14222012_at	-4.61	-3.12	1.02
Crhr2	1450462_at	-12.83	-7.77	-3.78
Avp	1450794_at	-3.36	-3.13	1.00
Avpr1b	1422204_at	-5.27	-3.39	1.54
Avpr1a	1418603_at	-9.93	-8.52	1.25
Avpr2	1450277_at	-13.28	-9.30	-1.77
Pomc1	1455858_x_at	10.74	8.00	-1.41

注:Crh 为促肾上腺皮质激素释放激素;Crhr1 为促肾上腺皮质激素释放激素受体 1;Crhr2 为促肾上腺皮质激素释放激素受体 2;Avp 为精氨酸加压素;Avpr1b 为精氨酸加压素受体 1B;Avpr1a 为精氨酸加压素受体 1A;Avpr2 为精氨酸加压素受体 2;Pomc1 为阿黑皮素原 α.

3　讨　论

砷可通过血液和脑脊液进入脑实质而损伤脑组织,导致脑功能失调[5]. 中枢神经系统释放的 IL 可作用于神经内分泌系统,影响免疫系统特定的功能,而且还可能参与神经系统、内分泌系统及免疫系统间的相互调节. 本实验利用基因芯片技术分析结果显示,As_2O_3 组小鼠大脑 IL 家族基因及受体基因 IL-3、IL-10、IL-11、IL-1a、IL-15、IL-20、IL-23a、IL-31、IL-1f6、IL-13、IL-25、IL-24 和 IL-17rc 表达水平显著低于对照组,IL-17d、IL-13ral 和 IL-2rg 表达水平显著高于对照组,说明上述 IL 家族部分基因表达水平的变化,可能与砷的免疫毒性作用有关,这与王艳艳等[5]的研究结果一致. 经 OP 干预后,染砷小鼠大脑组织 IL 家族部分基因的表达水平与对照组表达无差异,提示通过调节大脑 IL 家族基因的表达是减轻砷致免疫毒性的途径之一.

下丘脑-垂体-肾上腺轴是神经内分泌系统的重要组成部分,已有研究表明,大脑组织 Crh 的相关基因 Avp、Avpr1b、Avpr1a、Avpr2、Crhr1 和 Crhr2 等是调控肾上腺皮质激素分泌的重要基因[5],这些基因下调会导致促肾上腺皮质激素的分泌减少,引起肾上腺皮质萎缩,分泌功能减退,进而抑制免疫功能. 本研究显示,染砷小鼠大脑组织下丘脑-垂体-肾上腺轴受体相关基因 Avp、Avpr1b、Avpr1a、Avpr2、Crhr1、Crhr2 表达水平均低于对照组,这进一步表明砷可能影响神经免疫调控功能的重要生物信息. 经 OP 干预后,染砷小鼠大脑组织下丘脑-垂体-肾上腺轴受体相关基因 Avp、Avpr1b、Avpr1a、Avpr2、Crhr1、Crhr2 的表达变化幅度均变小,这表明 OP 影响了小鼠大脑组织内下丘脑-垂体-肾上腺轴受体相关基因的表达,但还需进一步探讨.

首都师范大学学报(自然科学版)

参 考 文 献

[1] 汤洁, 卞建民, 李昭阳, 等. 中国饮水型砷中毒区的水化学情况与砷中毒关系[J]. 生态毒理学学报, 2013, 8(2): 222-229.

[2] 魏绍峰, 孙宝飞, 张兵, 等. 三氧化二砷暴露原代培养大鼠海马神经元凋亡及 Bax 和 Bcl-2 表达的初步观察[J].

环境与健康杂志, 2016, 33(8): 693 – 695.
[3] 杨超, 夏之柏, 陈昆, 等. 三氧化二砷体外抑制人星形细胞瘤细胞增殖及诱导凋亡的研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(11): 667 – 669.
[4] QU Z, ZHANG J Z, WANG H G, et al. Protective effect of tetrahydropalmatine against d-galactose induced memory impairment in rat[J]. Physiol Behav, 2016, 154(1): 114 – 125.
[5] 王艳艳, 安玉, 田宏飞, 等. 三氧化二砷对小鼠大脑神经免疫相关基因表达的影响[J]. 工业卫生与职业病, 2015, 41(5): 359 – 362.
[6] BELLAMRI N, MORZADEC C, FARDEL, et al. Arsenic and the immune system[J]. Curr Opin Toxicol, 2018, 10: 60 – 68.
[7] 许智鸿, 王冰焱, 王雅华, 等. 慢性砷暴露对大鼠组织与免疫细胞功能的影响[J]. 福建医科大学学报, 2016, 50(1): 6 – 10.
[8] WANG Y, WANG S Q, CUI W H, et al. Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(22): 2021 – 2029.
[9] 王昱. 油橄榄叶提取物对酒精性肝损害大鼠肝组织转化生长因子-β1 水平的影响[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2018, 39(5): 45 – 49.
[10] 王昱, 何九军. 橄榄苦苷对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的保护作用[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(7): 8 – 12.
[11] 王昱, 秦序. 橄榄苦苷对 D-半乳糖致衰老小鼠衰老相关生化指标的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2016, 43(1): 17 – 20.
[12] 李述刚, 牛强, 徐上知, 等. 三氧化二砷染毒小鼠肝功能及砷甲基化水平变化[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(1): 23 – 26.

Effects of Oleuropein on Expression of Genes Related to Neuroimmunization in Brain of Arsenic Poisoned Mice

WANG Yu

(College of Agriculture and Forestry, Center for Research & Development of Longnan Characteristic Agro-bioresources, Longnan Teachers College, Chengxian Gansu 742500)

Abstract: To the effects of oleuropein (OP) on expression level of genes related toneuroinmmunization in brain of arsenic poisoned mice. Kunming mice were divided into control group, arsenic trioxide (As_2O_3) group and As_2O_3 + OP group. The mice were gavaged in different ways. After five weeks, expressions of target genes in cerebrum of arsenic poisoning mice were evaluated by gene chip. Compared with control group, the expressions of interleukin (IL) family genes IL-3, IL-10, IL-11, IL-1a, IL-15, IL-20, IL-23a, IL-31, IL-1f6, IL-13, IL-25, IL-24 and their receptor genes IL-13ral, IL-2rg of mouse cerebrum in As_2O_3 group were statistically down-regulated, while the expressions of gene IL-17d, IL-17rc were up-regulated. The expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis receptor related genes Avp, Avpr1b, Avpr1a, Avpr2, Crhr1, Crhr2 were significantly down-regulated, while the expression of genes Crh and Pomc1 were up-regulated. Administration of OP could obviously alleviate the neuro-immune toxicity induced by As_2O_3. The levels of gene expressions of interleukin family and hypothalamus-pituitary-adrenal axis receptor were not significantly different from those of control group. OP could reduce the neuro-immune toxicity induced by As_2O_3, due to influence the gene expressions of interleukin family and hypothalamus-pituitary-adrenal axis receptor in the cerebral tissue.

Keywords: oleuropein; arsenic trioxide; interleukin; hypothalamus-pituitary-adrenal axis; gene chip; mice

首都师范大学学报(自然科学版)