

· 基础研究 ·

增龄及乙醇对大鼠肝和大脑纤溶酶原激活物抑制物 1 mRNA 表达的影响

周俊 拓西平 李谊文 苗振春 赵建新

【摘要】 目的 探讨增龄及乙醇对大鼠肝和大脑纤溶酶原激活物抑制物 1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)mRNA 表达的影响。方法 将老龄与幼龄大鼠随机分为乙醇灌胃组和对照组。乙醇灌胃组以 50%乙醇(V/V)12ml/kg 每日灌胃 2 次,对照组给予等量蒸馏水。7d 后获取肝和脑组织标本,抽提总 RNA 后,采用单管竞争性逆转录-聚合酶链反应进行 PAI-1 mRNA 和内参照物片段的扩增,对比分析两者的光密度值,得到 PAI-1 mRNA 的相对表达量。结果 短期大剂量乙醇灌胃后老龄乙醇灌胃组死亡率明显高于幼龄乙醇灌胃组。析因分析显示,增龄和乙醇灌胃均使大鼠肝脏 PAI-1 mRNA 的相对表达量显著高于对照组;同时增龄和乙醇具有协同作用。 χ^2 检验发现,大脑皮质组织中 PAI-1 mRNA 的阳性表达率,老龄乙醇灌胃组显著高于老龄对照组和幼龄乙醇灌胃组;幼龄乙醇灌胃组明显高于幼龄对照组;老龄对照组明显高于幼龄对照组。结论 增龄和短期大剂量乙醇摄入均可诱导大鼠肝脏和大脑皮质组织表达 PAI-1 mRNA,而在增龄的基础上乙醇诱导 PAI-1 mRNA 高表达的作用更为明显。

【关键词】 纤溶酶原激活物抑制物 1;基因表达;酒精中毒;老年人

Effect of ageing and alcohol on plasminogen activator inhibitor 1 mRNA expression in rat's liver and cerebral cortex

ZHOU Jun, TUO Xiping, LI Yiwen, MIAO Zhenchun, ZHAO Jianxin

Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes in plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1) gene expression in rat's liver and cerebral cortex induced by ageing and ethanol. Methods Male Sprague-Dawley rats were assigned to 4 groups. They were aged/ethanol (EtOH) group, aged control group, young/EtOH group and young control group. EtOH groups were given intragastrically 50% alcohol (V/V) at the dose of 12ml/kg twice per day and the control groups were given equal volume of water. The rats were dissected after 7 days and total RNA were extracted from their liver and cerebral cortex samples. Then PAI-1 mRNA was amplified by RT-PCR and compared with β -actin mRNA. Results Mortality was significantly higher in aged/EtOH group than in young/EtOH one after intragastric administration of large dose of alcohol in a short time. Both ageing and alcohol induced the over-expression of PAI-1 mRNA in rat's liver, and they acted synergically. The rate of expression of PAI-1 mRNA in rat's cerebral cortex significantly increased in aged/EtOH group as compared with aged control one. The same results were observed when aged/EtOH group was compared with young/EtOH one, young/EtOH group was compared with young control one and aged control one was compared with young control one. Conclusions Both ageing and alcohol can induce the over-expression of PAI-1 mRNA in rat's liver and cerebral cortex.

【Key words】 plasminogen activator inhibitor 1; gene expression; alcoholism; aged

纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)参

作者单位:200433 上海市,解放军第二军医大学附属长海医院老年病科(周俊、拓西平、李谊文、苗振春);125105 辽宁兴城,解放军总装备部兴城疗养院门诊部(赵建新)

作者简介:周俊,男,医学硕士,医师

通讯作者:周俊,电话:021-25072071, E-mail: fatzhou@163.com

与血栓和细胞外基质成分的降解,而纤溶酶原激活物抑制物 1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)是哺乳动物体内 PA 的主要生理抑制剂,其含量和活性在肝脏中最高^[1]。PAI-1 的过度表达对栓塞的形成和纤维化的发展均有促进作用。本研究通过观察短期大剂量乙醇灌胃前后老龄和幼龄大鼠肝脏

和大脑皮质中 PAI-1 mRNA 表达的差异,以探讨增龄及乙醇对大鼠肝和大脑 PAI-1 mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠,老龄 40 只(18 月龄,体重 550~600g),幼龄 41 只(2 月龄,体重 160~200g),购自上海西普尔-必凯公司。将大鼠随机分为乙醇灌胃组和对照组。老龄乙醇灌胃组 25 只,老龄对照组 15 只,幼龄乙醇灌胃组 26 只,幼龄对照组 15 只。乙醇灌胃组以 50% (V/V)乙醇 12ml/kg 早晚灌胃各 1 次,对照组以等量蒸馏水灌胃,其余时间给予标准饲料喂养。7d 后麻醉并解剖动物,切取肝右叶及大脑皮质组织, -80℃ 保存 (<24h)。

1.2 总 RNA 抽提 采用罗氏公司 Tripure 试剂,其他试剂为分析纯。

1.3 肝脏及脑组织 PAI-1 mRNA 的测定 采用竞争性逆转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)法同时扩增 2 条目标基因片段,大鼠 PAI-1 mRNA 扩增片段引物为 5'-CAGGCTCCAAAGACCGAAATG-3', 5'-TACAGC-CCCTTGGCCAGTAAG-3' (396bp)。内参照物 β -肌动蛋白(actin) mRNA 扩增片段引物为 5'-CTCCG-CAGGGTGTGATGGTG-3', 5'-AGAAGGGCGT-GCTGAGAAGTTGA-3' (307bp)。产物经电泳、计算机图像扫描和光密度值分析,得到 PAI-1 mRNA/

β -肌动蛋白 mRNA(以下简称 P/ β)的相对表达量。RT-PCR 采用 TaKaRa 公司一步法试剂盒,引物由 DNA 合成仪合成。电泳条带的光密度值利用 Bio-Rad 公司 Flours-S MultiImager 自动凝胶成像仪分析,分析软件为系统自带的 Quantity ONE 分析软件。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 统计软件包进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用析因分析的方法进行检验,计数资料采用 χ^2 检验,取双侧检验, $P < 0.05$ 为确定差异有统计学意义的水平。

2 结果

2.1 动物的死亡率 造模结束时,动物死亡率为老龄乙醇灌胃组 36% (9/25);幼龄乙醇灌胃组 3.8% (1/26);另两组无死亡。经 χ^2 检验,老龄乙醇灌胃组死亡率明显高于幼龄乙醇灌胃组 ($\chi^2 = 6.443, P < 0.05$)。

2.2 肝脏和大脑皮质 PAI-1 mRNA 的表达 存活大鼠标本中,幼龄乙醇灌胃组 25 份标本随机抽取 15 份抽提总 RNA,其他各组标本均全部抽提并进行目标片段的扩增。PAI-1 mRNA 和 β -肌动蛋白 mRNA 扩增片段分别为 396 和 307bp,均位于 250 和 500bp 的标志物(marker)条带之间, β -肌动蛋白 mRNA 片段位置靠前。各组动物肝脏和大脑皮质标本的凝胶电泳图分别见图 1 和图 2。

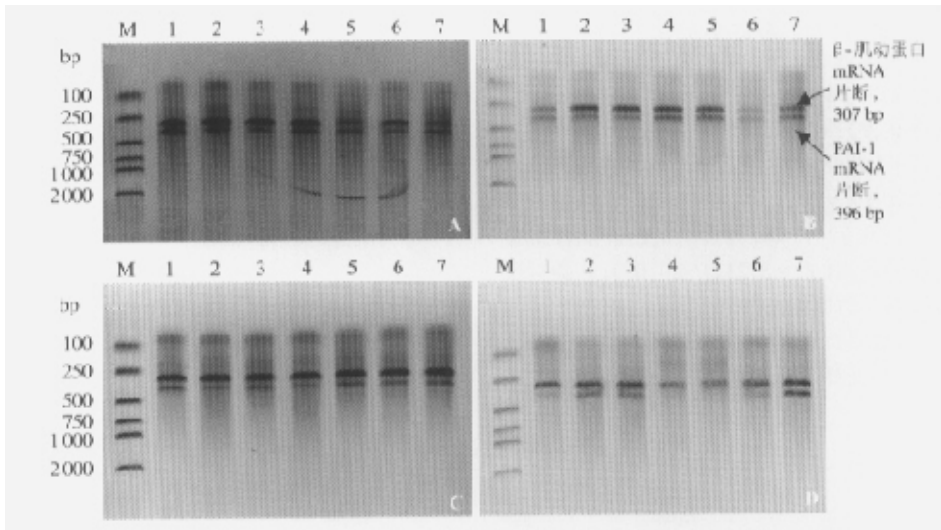


图 1 肝脏样本扩增产物电泳条带

A: 老龄乙醇灌胃组, B: 老龄对照组, C: 幼龄乙醇灌胃组, D: 幼龄对照组。各凝胶左侧第一孔为标志物(Marker, M), 从前至后条带分别为 100, 250, 500, 750, 1 000 和 2 000bp。 β -肌动蛋白 mRNA 片段为 307bp, 位置靠前; PAI-1 mRNA 片段为 396bp, 条带位置紧随其后

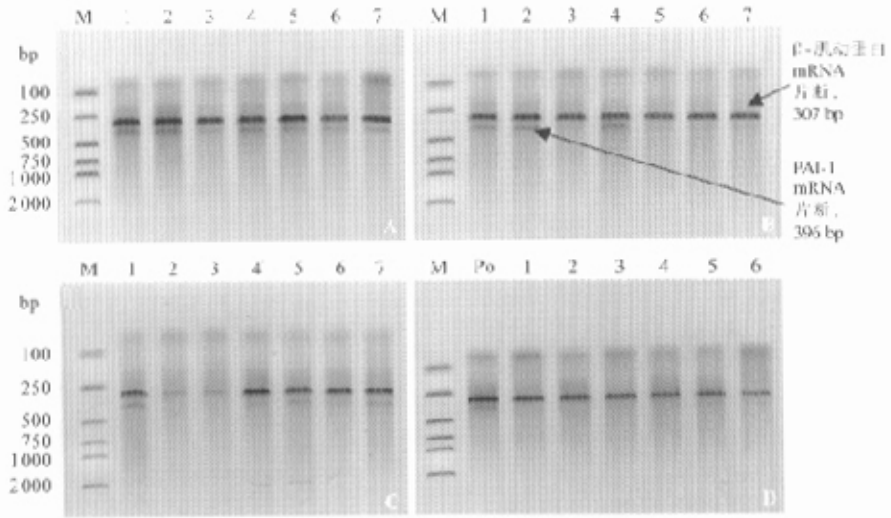


图2 脑组织样本扩增产物电泳条带

A: 老龄乙醇灌胃组, B: 老龄对照组, C: 幼龄乙醇灌胃组, D: 幼龄对照组。凝胶左侧第一孔为标志物(M), 从前至后条带分别为 100, 250, 500, 750, 1 000 和 2 000bp。1~7: 脑组织样品, D组 Po 孔为阳性对照。图中 A 组 PAI-1 mRNA 各孔样品均阳性表达, D 组除阳性对照外均无表达, B、C 两组为部分样品表达

不同组别大鼠肝脏和大脑皮质 P/β 的相对表达量见表 1。析因分析发现, 增龄和短期大剂量乙醇灌胃均使大鼠肝脏 P/β 的相对表达量明显高于对照组, 同时, 增龄和乙醇灌胃之间具有协同效应。

各组动物肝脏和大脑皮质 PAI-1 mRNA 的阳性表达率情况见表 2。肝脏阳性表达率均为 100%。χ² 检验表明, 不同组大鼠大脑皮质 PAI-1 mRNA 阳性表达率的差异有极显著性意义(χ² = 31.6, P < 0.01)。进一步两两比较发现, 老龄乙醇灌胃组明显高于老龄对照组(χ² = 8.88, P < 0.01)和幼龄乙醇灌胃组(χ² = 10.77, P < 0.01); 幼龄乙醇灌胃组显著高于幼龄对照组(χ² = 5.21, P < 0.05); 老龄对照组明显高于幼龄对照组(χ² = 6.71, P < 0.05)。

此外, 统计分析也表明, 大鼠体内 PAI-1 mRNA 的表达能力, 肝脏要强于大脑皮质组织(表 1, 表 2)。

3 讨论

PA 和 PAI-1 是调节纤溶系统的重要成分, 纤溶系统功能正常可防止血栓形成和维持血管内血流通畅。而在肝纤维化的过程中, 这种平衡的失调同样会促进胶原、糖蛋白、蛋白多糖等细胞外基质的合成增加^[2]。研究显示, 四氯化碳肝硬化造模大鼠血浆中 PAI-1 抗原水平随肝纤维化程度的增加而明显增高^[3]。

脑部病变方面, Hino 等^[4]采用免疫组化法对大鼠 PAI-1 进行了组织定位, 发现人类神经元细胞着色数个体差异较大, 星形胶质细胞着色仅见于白质损害的患者, 而阿尔茨海默病患者的老年斑部位也出现了微弱的染色, 提示 PAI-1 很可能参与脑内多种病理过程。在脑卒中方面的研究也证实, 脑梗死

表 1 不同组别肝脏和大脑皮质 P/β 相对表达量

组织部位	相对表达量($\bar{x} \pm s$)				析因设计方差分析(F)		
	老龄乙醇组	老龄对照组	幼龄乙醇组	幼龄对照组	年龄作用	乙醇作用	交互作用
肝脏	0.872 ± 0.075**	0.551 ± 0.084**	0.712 ± 0.123**	0.437 ± 0.163**	21.27 ^{△△}	100.30 ^{△△}	5.83 [△]
大脑皮质	0.579 ± 0.151	0.194 ± 0.217	0.195 ± 0.247	0	39.39 ^{△△}	39.70 ^{△△}	4.57 [△]

注: * P < 0.05, ** P < 0.01, 与大脑皮质 P/β 相对表达量比较; △ P < 0.05, △△ P < 0.01

表2 不同组别肝脏和大脑皮质 PAI-1 mRNA 阳性表达率

组织部位	老龄乙醇组	老龄对照组	幼龄乙醇组	幼龄对照组
肝脏	16/16	15/15	15/15	15/15
大脑皮质	16/16	7/15	6/15	0/15

患者血浆 PAI-1 活性明显高于对照组^[5]。

本研究结果表明,无论是肝脏或大脑皮层组织,增龄和大剂量乙醇灌胃均有诱导 PAI-1 mRNA 表达增强的作用,并且在增龄的基础上,乙醇诱导 PAI-1 mRNA 高表达的现象更为明显。这可能与衰老所致的器官功能减退、抗氧化能力下降等有关,具体机制有待深入研究。同时 PAI-1 mRNA 在大鼠肝脏中的表达能力要强于脑组织,这与 Simpson 等^[1]“肝脏是 PAI-1 主要来源”的观点相符。而幼龄对照组的脑组织样品未出现 PAI-1 mRNA 条带,提示通常情况下,幼龄大鼠大脑皮质组织可能并不表达 PAI-1 mRNA,或其表达量极低而难以被 RT-PCR 方法检出。

肝脏 PAI-1 mRNA 的过度表达将使 PAI-1 合成增加,造成 PA/PAI-1 平衡的失调,主要有两大后果:一是导致循环中纤溶活性下降,促进血栓的形成;二是组织中 ECM 降解减少,促进脏器纤维化的发展。而大脑皮质局部 PAI-1 表达的增强有可能进一步增加脑卒中的危险。已有研究证实,兴奋性损伤后 24h,小鼠海马部 PAI-1 表达即增强,并使组织型 PA 活性下调^[6]。研究过程中老龄乙醇灌胃组死亡率明显增高,考虑与器官功能减退、耐受酒精中毒的能力下降有关,同时也不能除外 PAI-1 mRNA 高表达诱发的重要脏器栓塞。由于未能进行死亡动物

的组织病理检查,确切死因并不清楚,是由酒精中毒直接引起或是出现重要脏器栓塞、感染、胃肠道损伤等并发症所致,尚有待进一步验证。由于老年人是冠心病和脑卒中的高危人群,因此,对老年人群而言,应避免连续大量的饮酒,以防组织内 PAI-1 过度表达而诱发心、脑血管意外发生。

参考文献

- 1 Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, et al. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J Clin Pathol*, 1991, 44:139-143.
- 2 Stoop AA, Lupu F, Pannekoek H. Colocalization of thrombin, PAI-1, and vitronectin in the atherosclerotic vessel wall: a potential regulatory mechanism of thrombin activity by PAI-1/vitronectin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20:1143-1149.
- 3 Zhang LP, Takahara T, Yata Y, et al. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol*, 1999, 31:703-711.
- 4 Hino H, Akiyama H, Iseki E, et al. Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues. *Neurosci Lett*, 2001, 297: 105-108.
- 5 孙琦,张颖东,刘阳,等.脑梗死患者血浆纤溶酶原激活物抑制物-1 活性及其基因多态性研究. *脑与神经疾病杂志*, 2001, 9:323-326.
- 6 Salles FJ, Strickland S. Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J Neurosci*, 2002, 22:2125-2134.

(收稿日期:2002-11-05)

(本文编辑:周宇红)

·征订启事·

欢迎订阅《中华老年多器官疾病杂志》

《中华老年多器官疾病杂志》是经国家新闻出版署批准的医学学术期刊,由解放军总医院主管、该院老年心血管疾病研究所主办,王士雯院士任总编辑、国内多学科知名专家组成编委会,于2002年6月创刊发行。

本刊主要探讨老年心血管疾病以及各种老年疾病的发病机制和有效防治措施,重点报道老年疾病研究中具有创新意义的涉及多器官疾病的临床、基础和预防方面的最新成果和经验。2003年新增的系列专题笔谈栏目很受读者欢迎。是一本具有可读性和指导性的杂志。

本刊为季刊,大16开本,80页,每册定价12元。邮发代号:82-408。订阅请到各地邮局订购或直接汇款至本刊编辑部。