

- 9 Boland JF, Chung CC, Roberson D, et al. The new sequencer on the block: comparison of life technology's proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing[J]. Hum Genet, 2013, 132(10):

1153-1163.

[收稿日期 2015-07-03][本文编辑 刘京虹]

课题研究·论著

体外培养神经元缺氧时细胞红蛋白基因表达的变化

杨汉华, 马海然, 肖丹萍

基金项目: 汕头市医疗重点科技计划项目(编号: 汕府科 2012-113 号)

作者单位: 515041 广东, 汕头大学医学院第二附属医院儿科[杨汉华(现在深圳坪山新区妇幼保健院, 深圳大学妇幼保健院儿科工作), 肖丹萍]; 惠州市中心人民医院儿科(马海然)

作者简介: 杨汉华(1978-), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 新生儿缺氧缺血性脑损伤研究。E-mail: drsam@126.com

[摘要] 目的 探讨体外培养神经元在缺氧时细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb)基因表达的变化规律。方法 运用无血清培养技术进行胎鼠皮质神经元培养6 d, 用免疫组织化学方法进行纯度鉴定, 随机分为4组, 其中3个实验组分别置于0.5%~0.9% O₂中8、16、24 h, 对照组置于正常环境。用CCK8试剂盒测试细胞生存率, 用Real-time PCR方法检测不同时点Cygb基因表达的情况。结果 神经元纯度鉴定纯度>99%; 缺氧后神经元Cygb基因的表达随时间增长而递增。结论 体外培养神经元缺氧时Cygb基因表达增强, 提示Cygb可能在神经细胞缺氧时发挥重要作用。

[关键词] 细胞红蛋白; 神经元; 基因表达; 缺氧缺血性脑损伤**[中图分类号]** R 363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)01-0010-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.01.03

Expression of cytoglobin gene in hypoxic neurons in vitro YANG Han-hua, MA Hai-ran, XIAO Dan-ping, et al. Department of Pediatric, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong 515041, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and changes of cytoglobin(Cygb) gene on hypoxic neurons in vitro. **Methods** The primary cortical neurons from newborn rats were cultured in a serum-free culture system. The neurons were identified by polyclonal antibody against neuron specific enolase on the 6th day and were randomly divided into 4 groups for assessing cell viability by CCK8 and for observing the gene expression of Cygb by Real-time PCR at 0 h, 8 h, 16 h, 24 h after hypoxic injury was induced with the concentration of oxygen between 0.5% and 0.9%. **Results** The purity of neurons was more than 99%; Expression of RNA Cygb was increased in a time-dependent manner, and there was significant difference in each group($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Cygb in neurons increases rapidly after hypoxic injury indicating that Cygb may have an important function in the process of protecting hypoxic neuron injury.

[Key words] Cytoglobin; Neurons; Gene expression; Hypoxic-ischemic encephalopathy

细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb)是新发现的脊椎动物的第四种携氧球蛋白, 国外^[1,2]以及我们^[3,4]之前的研究初步显示它在神经细胞的细胞核及细胞浆

均有表达, 而且表达可被缺氧所诱导, 并受缺氧诱导因子调控^[1,2], 因而Cygb是一种新的缺氧反应基因^[5]。我们之前的研究已发现新生大鼠缺氧缺血性脑损伤

后脑组织 *Cygb* mRNA 表达增强,且随时间变化^[6],但单独神经元缺氧时 *Cygb* 基因表达的情况及其规律性至今未有相关研究。本研究(2011-09~2015-09,汕头大学医学院第二附属医院)通过检测体外培养神经元缺氧时 *Cygb* 基因表达的情况,探讨 *Cygb* 基因在神经细胞缺氧时的表达规律。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物为雌性孕 18 d SD 健康大鼠,雌雄不限,体重 12.5~17.6 g,由汕头大学医学院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胎龄 18 d 的胎鼠自怀孕母鼠子宫取出后置于冰上,取大脑皮层组织,用 0.0625% 胰酶消化后加含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基吹打成悬液,然后台盼蓝染色进行细胞计数,以 $25 \text{ 万}/\text{cm}^2$ 种植于多聚赖氨酸包被的六孔板内,置于 5% CO_2 的 37℃ 培养箱中进行培养,细胞贴壁后换 NEUROBASAL + L-GLUTAMINE + 2% B27 培养液进行培养,每 48 h 更换培养液 1 次,培养至第 6 天用神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫组织化学方法进行神经细胞纯度鉴定。

1.2.2 神经元纯度鉴定 吸净培养基后以 2% 多聚甲醛固定,3% 过氧化氢水溶液封闭 10 min,加正常羊白蛋白封闭 15 min 后,加兔抗鼠神经烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)一抗,4℃ 过夜,次日取出后置室温 1 h,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 次,每次 5 min,加羊抗兔辣根过氧化物酶二抗孵育 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 DAB 显色,镜下控制显色程度, PBS 冲洗,晾干,树胶封片。显微镜下随机选取 10 个视野计数。空白对照组用 PBS 代替一抗。

1.2.3 细胞缺氧实验 实验前将培养基置于 5% CO_2 和 95% N_2 的气体中过夜作预缺氧。将细胞随

机分为 4 组,其中对照组未进行缺氧,其余 3 组置预缺氧的培养基,置于充入 5% CO_2 和 95% N_2 气体的真空袋中,各缺氧 8、16、24 h,缺氧过程用测氧仪监测真空袋中氧浓度,氧气浓度在 0.5%~0.9% 之间。

1.2.4 Rt-PCR 采用 Trizol 试剂盒((Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)按照实际说明书用 Trizol 法提取培养神经元总 RNA,并测定吸光度 260 nm。根据大鼠 *Cygb* cDNA 序列设计引物:上游 5'-CATGTGGC-CGGTGGGAAGCA-3',下游 5'-GGCCAGGACTCTTC-CGGGTCT-3',扩增产物长度为 269 bp。以 β -actin 作为内参照,其引物序列为上游 5'-CGTCCACCCGC-GAGTACAACC-3',下游为 5'-ACATGCCGGAGCCGT-TGTGC-3',扩增产物长度为 117 bp。等量取每个标本总 RNA 1 μg ,分别使用 AMV 逆转录酶逆转录成 cDNA。取上述 cDNA 1 μl 作为模板进行 PCR 反应。反应体系:12.5 μl PCRMix, 1 μl cDNA, 9.5 μl RNase-free water, *Cygb* 上下游引物各 1 μl 。按下列条件扩增:94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 40 个循环。

1.2.5 结果分析 取 PCR 产物 5 μl 进行 1.5% EB 琼脂糖凝胶电泳,采用紫外-凝胶成像分析系统成像,采用 Quantity One Software (v4.5.2, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)进行定量分析电泳结果。

1.3 统计学方法 应用 GraphPad Prism 5.01 统计软件中的 Oneway 单因素分析进行数据处理,所得数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经元纯度鉴定及细胞缺氧实验结果 培养 6d 胎鼠大脑皮层神经细胞生长状态良好,细胞个体饱满,胞浆丰富,核大,胞体大部分呈梭形、锥形,少数呈多边形,突起联结成网, NSE 免疫组织化学方法纯度鉴定提示神经元纯度 $> 99\%$ 。见图 1。



图1 神经元 NSE 染色结果图(光学显微镜观察,①100 $\times$; ②200 $\times$; ③400 $\times$)

2.2 细胞红蛋白 mRNA 测定结果 根据大鼠 *Cygb* cDNA 序列设计的引物,扩增体外培养的胎鼠神经

元 *Cygb* 编码区部分序列,所扩增片段长度与预期一致。 β -actin 扩增后的产物片段与设计相符。见图 2。

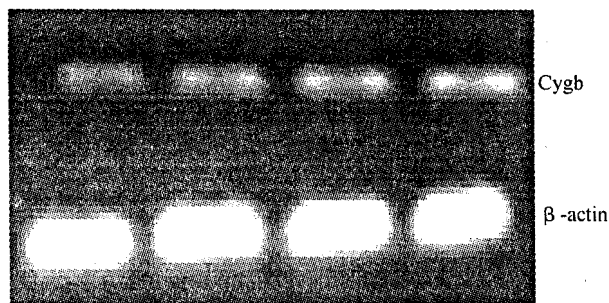


图2 Cygb RT-PCR 产物电泳图

2.3 体外培养神经元缺氧时 Cygb mRNA 表达的变化情况 实验组 Cygb mRNA 随着缺氧时间逐渐升高, 8、16、24 h 分别是 0 h 的 (1.21 ± 0.19) 倍、 (1.35 ± 0.27) 倍、 (1.82 ± 0.25) 倍。以上 Cygb mRNA 表达量升高的差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)

3 讨论

围产期缺氧缺血性脑病 (HIE) 是新生儿致畸和致残的重要原因^[7]。对于其发病机制和治疗方法的研究一直是热门话题。尤其是如何在 HIE 中最大限度地保护神经细胞存活, 是保证患儿存活率和生存质量的重中之重。

3.1 Cygb 是新发现的脊椎动物的第四种携氧球蛋白, 根据其结构特点, 目前研究推测 Cygb 可能具有以下功能: (1) 储存、转运氧及作为氧感受器^[5,8]; (2) 激活一氧化氮合成酶参与一氧化氮的清除^[9]; (3) 参与氧化应激时的器官保护作用^[10]。因此, 我们推测 Cygb 可能参与神经细胞缺氧时及缺氧后的一系列反应, 并发挥一定的作用。可能为神经系统缺氧性疾病的发病机制和治疗的研究开辟新的思路。

3.2 体外研究已证实暴露于过氧化氢时 Cygb 表达水平相应升高^[11]。提高 Cygb 的表达可在氧化应激时保护细胞, 提高细胞的生存率^[10,12,13]。Cygb 在氧化应激时对细胞保护的作用机制: 清除氧自由基和脂类衍生物^[10,12,13], 降低 DNA 损伤^[14]。已有研究证实, 通过诱导 Cygb 的表达可保护胰腺 β 细胞缺血性坏死^[15]

3.3 Schmidt 等^[1]发现缺氧时心脏和肝脏 Cygb mRNA 表达水平有明显的升高。我们之前的研究已发现缺氧时大鼠脑组织 Cygb mRNA 表达水平升高, 且随时间变化^[6]。但之前的研究并不能直接说明在缺氧情况下 Cygb 与神经元的直接关系。本实验通过研究表明, Cygb 转录水平在神经细胞时呈现明显的升高现象, 而且, 其表达随着时间推移逐渐增加。我们推测神经细胞缺氧时 Cygb 基因表达水平的升高可能有助于神经细胞从细胞外摄取氧, 并将氧传

递给线粒体, 并激活一氧化氮合成酶参与一氧化氮的清除, 从而起保护神经细胞的作用。我们之前的研究发现, Cygb 不只表达于神经细胞的胞浆, 也表达于细胞核, 提示其可能通过调节下游基因的表达参与神经细胞缺氧时的保护作用^[3,4]。Stagner 等^[15]的研究发现转染 Cygb 基因可同时提高 Cygb 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达。这也可能表明, Cygb 可能通过调节 VEGF 等下游基因的表达从而起缺氧时的细胞保护作用。

3.4 本研究结果进一步提示, 神经细胞缺氧时 Cygb 基因表达水平呈现升高现象, 其可能在神经细胞缺氧时的适应过程中起重要的调节作用。我们相信, 随着对 Cygb 上下游基因和蛋白的进一步深入研究, 将可能为研究缺氧性脑损伤开辟新的思路, 为临床寻找更好的治疗方法。

参考文献

- Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, et al. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia[J]. J Bio Chem, 2004, 279(9): 8063-8069.
- Fordel E, Geuens E, Dewilde S, et al. Cytoglobin expression is up-regulated in all tissues upon hypoxia; an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(2): 342-348.
- 杨汉华, 史雪川, 马 廉. 细胞红蛋白在新生大鼠体内的分布[J]. 中国新生儿科杂志, 2008, 23(5): 290-291.
- 杨汉华, 史雪川, 马 廉, 等. 细胞红蛋白在新生大鼠脑内的分布和定位[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(4): 5-7.
- Trent JT 3rd, Hargrove MS. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin[J]. J Biol Chem, 2002, 277(22): 19538-19545.
- 杨汉华, 田树凤, 史雪川, 等. 细胞红蛋白基因在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤时的表达[J]. 国际儿科学杂志, 2013, 40(2): 208-210.
- Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, et al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain[J]. Pediatr Res, 2001, 49(6): 735-741.
- Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(27): 25318-25323.
- Halligan KE, Jourdain FL, Jourdain D. Cytoglobin is expressed in the vasculature and regulates cell respiration and proliferation via nitric oxide dioxygenation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(13): 8539-8547.
- Xu R, Harrison PM, Chen M, et al. Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis[J]. Mol Ther, 2006, 13(6): 1093-1100.
- Li D, Chen XQ, Li WJ, et al. Cytoglobin up-regulated by hydrogen

- peroxide plays a protective role in oxidative stress[J]. *Neurochem Res*, 2007,32(8):1375-1380.
- 12 Hodges NJ, Innocent N, Dhanda S, et al. Cellular protection from oxidative DNA damage by over-expression of the novel globin cytoglobin in vitro[J]. *Mutagenesis*, 2008,23(4):293-298.
- 13 Fordel E, Thijs L, Moens L, et al. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging[J]. *FEBS J*, 2007,274(5):1312-1317.
- 14 Trandafir F, Hoogewijs D, Altieri F, et al. Neuroglobin and cytoglobin as potential enzyme or substrate[J]. *Gene*, 2007,398(1-2):103-113.
- 15 Stagner JL, Parthasarathy SN, Wyler K, et al. Protection from ischemic cell death by the induction of cytoglobin[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(8):3452-3453.
- [收稿日期 2015-02-10][本文编辑 杨光和]

课题研究·论著

无精子症患者抗精子抗体的临床检测价值

刘 晃, 张志兴, 郑厚斌, 姜彦嘉, 邓顺美, 崔 蓉, 唐运革

基金项目: 广东省人口和计划生育委员会科研项目(编号:20132007)

作者单位: 510600 广州, 广东省计划生育科学技术研究所; 国家卫生和计生委男性生殖与遗传重点实验室

作者简介: 刘 晃(1981-), 男, 大学本科, 硕士学位, 主治医师, 研究方向: 生殖男科学。E-mail: k114@163.com

[摘要] 目的 评估无精子症患者血清和精浆中的抗精子抗体检测在区分梗阻性无精子症与特发性无精子症的临床价值。方法 回顾性分析2010-01~2013-12住院行睾丸附件探查手术的204例无精子症患者的临床资料, 根据手术探查的结果分为特发性无精子症组(A组)106例和梗阻性无精子症组(B组)98例, 比较两组对象术前检测的血清和精浆中抗精子抗体的结果, 分析血清和精浆抗精子抗体的检测在区分梗阻性无精子症与特发性无精子症的临床价值。结果 204例血清抗精子抗体的总阳性率为9.31%, 精浆抗精子抗体的总阳性率为6.86%。A组术前血清和精浆抗精子抗体阳性率分别为7.55%和4.72%, 其中IgG为2.83%和1.89%、IgM为1.89%和0.94%、IgA为2.83%和1.89%。B组的术前血清和精浆抗精子抗体阳性率分别为11.22%和9.18%, 其中IgG为6.12%和4.08%、IgM为3.06%和2.04%、IgA为2.04%和3.06%。两组间比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。结论 无精子症患者的血清和精浆均有抗精子抗体阳性表达, 但两者在区分梗阻性无精子症与特发性无精子症的灵敏度不高, 临床上无法通过血清和精浆抗精子抗体的检测来判断无精子症患者的临床分型。

[关键词] 抗精子抗体; 无精子症; 精浆; 血清**[中图分类号]** R 698.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)01-0013-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.01.04

The clinical value of detecting antisperm antibody in azoospermia patients LIU Huang, ZHANG Zhi-xing, ZHENG Hou-bin, et al. Family Planning Research Institute of Guangdong, Guangzhou 510600, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical value of detecting antisperm antibodies of seminal plasma and serum to distinguish obstructive azoospermia from idiopathic azoospermia. **Methods** The clinical data of 204 cases with azoospermia and testicular appendage surgical exploration in our hospital from January 2010 to December 2013 were retrospectively analyzed. According to the results of the surgical exploration, the patients were divided into group A (idiopathic azoospermia, $n=106$) and group B (obstructive azoospermia, $n=98$). The antisperm antibodies of seminal plasma and serum before the detection were compared between the two groups, and the clinical value of antisperm antibodies in the seminal plasma and serum was analyzed to differentiate the obstructive azoospermia from the idiopathic azoospermia. **Results** There were 9.31% of the all 204 azoospermia patients with the antisperm antibodies in serum positive, and 6.86% in seminal plasma; these data were respectively 7.55% and 4.72% in group A, among which IgG-AsAb were 2.83% and 1.89%, IgM were 1.89% and 0.94, IgA were 2.83% and 1.89%. and the