

三种多酚类化合物对模拟间断性高原低氧暴露小鼠肠道菌群的影响*

潘存瑶^{1,2,3+}, 张宝怡¹⁺, 梁兰兰²⁺, 刘 辉², 郭长江¹, 陈照立¹, 王新兴^{1△}

(1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050; 2. 兰州大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000;
3. 成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610000)

【摘要】 目的: 探索三种多酚类化合物对高原低氧暴露小鼠肠道菌群的保护作用。**方法:** 将60只雄性Balb/c小鼠随机分为平原对照组、模拟高原低氧组、高原原花青素组、高原槲皮素组、高原白藜芦醇组, 每组12只。原花青素、槲皮素、白藜芦醇分别以50 mg/kg, 100 mg/kg, 20 mg/kg的剂量进行灌胃, 三种药物干预且高原模拟海拔6000 m暴露30 d后, 收集血清进行二胺氧化酶(DAO)检测, 收集小鼠无菌粪便, 回肠组织固定并HE染色, 16S rRNA技术检测小鼠肠道菌群多样性以及菌群组成。**结果:** HE染色结果显示, 模拟高原低氧组较平原对照组回肠组织损伤明显, 血清DAO浓度显著升高($P<0.05$), 但肠道菌群物种丰度、菌群多样性差异无统计学意义。与模拟高原低氧组相比, 高原槲皮素、白藜芦醇组小鼠回肠组织结构得以改善, 血清DAO水平降低, 且肠道菌群物种丰度、 α 多样性降低($P<0.05$), 拟杆菌相对丰度降低($P<0.05$), 厚壁菌升高($P<0.05$), 谷氨酸棒状杆菌、罗伊氏乳杆菌相对丰度升高($P<0.05$)。**结论:** 槲皮素和白藜芦醇可有效增加小鼠有益菌群的丰度, 抑制并降低条件致病菌, 对高原低氧暴露小鼠肠道有一定的保护作用。

【关键词】 高原低氧; 原花青素; 槲皮素; 白藜芦醇; 肠道菌群

【中图分类号】 R73-3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-008-006

【DOI】 10.12047/j.cjap.6241.2022.073

Effects of three Polyphenolic compounds on the intestinal flora of mice exposed simulated intermittent plateau hypoxia

PAN Cun-yao^{1,2,3+}, ZHANG Bao-yi¹⁺, LIANG Lan-lan²⁺, LIU Hui², GUO Chang-jiang¹,
CHEN Zhao-li¹, WANG Xin-xing^{1△}

(1. Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050;
2. School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000; 3. Chengdu Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610000, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the protective effects of three Polyphenolic compounds on intestinal microbial communities in mice exposed intermittent plateau hypoxia. **Methods:** In this study, 60 healthy male Balb/c mice were randomly divided into plain control group, plateau control group, primary anthocyanin intervention group, quercetin intervention group and resveratrol intervention group, 12 mice in each group. Primary anthocyanin, quercetin and resveratrol were administrated by gavage at the doses of 50, 100 and 20 mg/kg in pharmacological intervention group, respectively. After exposure of the mice to simulation plateau-condition for 30 days, the serum samples were collected for DAO testing, sterile feces were collected in mice, and the diversity and genus level of the mouse gut bacteria were detected by using 16S rRNA technology. Ileum tissue was fixed and stained with HE. **Results:** HE staining showed that the plateau control group had significant damage to the intestinal tissue structure compared to the plain control group, and the serum DAO concentration was increased ($P<0.05$), but there was no statistical difference in the abundance and diversity of intestinal flora species. Contrast to simulated intermittent plateau hypoxia group, the structure of the intestine tissue and the level of DAO in the quercetin intervention group and resveratrol intervention group were improved ($P<0.05$), the abundance and α diversity of the intestinal flora were decreased, the relative abundance of Bacteroidetes was reduced ($P<0.05$), and the Firmicutes was increased. Concomitantly, significant decreases in relative abundance were observed for *Corynebacterium glutamicum* and *Lactobacillus reuteri* ($P<0.05$). **Conclusion:** Quercetin and resveratrol showed some degree of protection to mice intestinal microbial communities, and increased the diversity and the abundance of the dominant flora and inhibited the growth of conditional pathogenic bacteria.

【KEY WORDS】 plateau hypoxia; Procyanidin; Quercetin; Resveratrol; intestinal microbial

*【基金项目】国家自然科学基金面上项目(31971106, 18CXZ044)

【收稿日期】2021-12-13 【修回日期】2022-09-28

△【通讯作者】Tel: +86-22-84655206; E-mail: wxemail@sina.cn. +: 为共同第一作者

近年来,随着我国西部大开发,进入高原地区旅游、工作的人群越来越多,平原常住人群进入高原后,由于高原低氧会产生神经、呼吸、循环、消化等多系统的不良反应^[1-4]。其中消化系统的损伤主要体

现在肠道屏障功能受损及其继发的不良炎症反应,表现为恶心、呕吐、腹痛、腹泻等症状。严重者会导致失控的炎症反应和免疫功能的紊乱,造成“混合性拮抗反应综合征(mixed antagonist response syndrome, MARS)”、“全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)”,其机制与高原低氧环境导致胃肠道黏膜屏障破坏,肠道菌群紊乱,进而导致肠道细菌易位及毒素入侵有关,若机体本身存在创伤、失血、休克等损伤,则会加快MARS和SIRS的进程。肠粘膜屏障是机体抵抗外界毒素入侵的一个重要环节,主要包括肠粘膜机械屏障、生物屏障、化学屏障和免疫屏障。其中生物屏障主要是肠道菌群组成的较大且复杂的微生物群落,极易受到环境、饮食等因素影响。当机体受到外界环境刺激时,肠道菌群的种类和数量会发生改变,导致稳态失衡,胃肠功能紊乱,进而继发多种疾病。因此有关如何干预高原低氧环境导致胃肠功能损伤的问题备受关注。

以往研究表明,原花青素、槲皮素、白藜芦醇这三种多酚类物质均能治疗肠道功能紊乱。原花青素可以通过调节肠道免疫平衡和肠道菌群改善高脂饮食引起的肠道屏障受损^[5]。槲皮素可以通过增加双歧杆菌数量调节肠道菌群,减少胃肠功能损伤^[6]。白藜芦醇可以减轻右旋糖苷诱导的急性溃疡性结肠炎^[7]。因此本实验采用这三种多酚类化合物对高原低氧暴露小鼠进行干预,观察其对高原低氧小鼠肠道菌群的调节作用,旨在寻求改善高原低氧环境中肠道菌群的有效药物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选取 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠共 60 只,平均体重 18 ~ 22 g,饲养在标准生活条件下,温度 18 ~ 24℃,相对湿度 55% ~ 60%,光/暗 12 h 交替循环。本研究中所有动物实验均符合军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所医学伦理委员会要求(审查编号: IACUC of AMMS -04-2020-040)。

1.2 试剂与仪器

原花青素(上海源叶生物科技有限公司);槲皮素(上海源叶生物科技有限公司);白藜芦醇(北京索莱宝科技有限公司);羟甲基纤维素钠(VIRTUE-CLARA);甲醛、正丁醇、无水乙醇、二甲苯、盐酸、氨水、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司);DAO ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);HE 染

液(上海经科化学科技有限公司)。

动物低压氧舱(宏远氧业有限公司);病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);脱水机(武汉俊杰电子有限公司);正置白光拍照显微镜(Nikon)。

1.3 实验分组

将 60 只雄性 Balb/c 小鼠随机分为平原对照组(Control)、模拟高原低氧组(Hypoxia)、高原原花青素组(PC)、高原槲皮素组(Que)、高原白藜芦醇组(Res)。通过查阅文献并结合本实验室前期实验结果将原花青素、槲皮素、白藜芦醇灌胃剂量分别设置为 50 mg/kg, 100 mg/kg, 20 mg/kg, 平原、模拟高原低氧组给予同体积(0.4 ml)羧甲基纤维素钠。

1.4 缺氧干预

从灌胃处理的第 1 日开始, Hypoxia(模拟高原低氧组)、PC(高原原花青素组)、Que(高原槲皮素组)、Res(高原白藜芦醇组)四组的动物每天进入高原低压氧舱,舱内模拟海拔高度为 6 000 m、为期 30 d 的低氧暴露。其大致过程如下:早上 9:00,将小鼠以 1 000 m/min 的速度上升至 5 000 m,并停留 3 min;而后再以 500 m/min 速度上升至 6 000 m,停留 8 h。下午 5:00,将小鼠以 500 m/min 速度下降至 5 000 m,并停留 3 min,而后再以 1 000 m/min 的速度下降至海平面高度。

1.5 样品采集

末次灌胃及低氧暴露后,应激排便法采集小鼠粪便,用无菌镊夹取新鲜粪便 0.1 ~ 0.2 g 于冻存管中,置于 -80℃ 保存留样,送至北京诺禾致源公司委托检测肠道菌群。眼眶后静脉丛取血法收集血液于无菌 EP 管中,室温下静置 2 h,离心取上层血清测定 DAO。用生理盐水将回肠内容物冲洗干净后,置于 4% 的多聚甲醛中固定 24 h,后续进行 HE 染色,观察肠道病理变化。

1.6 DAO 检测

采用 ELISA 法检测血清二胺氧化酶(DAO)水平,并严格按照试剂盒说明书进行检测。

1.7 HE 染色

HE 染色简要步骤如下:石蜡切片梯度脱蜡后,苏木素染细胞核,伊红染细胞质,脱水封片后显微镜镜检。

1.8 粪便肠道菌群 16S rRNA 高通量测序

利用高通量基因测序手段,对 5 组小鼠低氧暴露的粪便样本进行肠道菌群 16S rRNA 扩增子测序。样本中各物种的丰度和样本各组间在门、属等水平上差异的统计分析采用 OTU(operational taxo-

onomic unit) 聚类分析和比对注释, 以分析小鼠肠道微生物结构的差异和变化。

1.9 统计学处理

使用 Graph Pad Prism 8.0 进行统计检验。用单因素方差分析 (ANOVA) 和 *t* 检验对定量数据进行组间差异的统计学分析, 不服从正态分布资料通过 Tukey 和 wilcoxon 秩和检验进行组间差异分析。

2 结果

2.1 三种多酚类化合物对高原低氧暴露小鼠体重及摄食量影响的比较

实验期间各组小鼠毛色光泽, 随喂养时间增加体重增长不明显, 实验结束时各组小鼠体重无统计学差异 ($P>0.05$), 表明三种多酚类化合物对小鼠体重增长无明显影响。

Tab. 1 The body weight of mice in each group (g, $\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Group	Initial body weight	Final body weight
Control	22.37±0.92	21.74±0.60
Hypoxia	22.02±1.08	22.08±1.41
PC	22.07±1.31	21.96±1.44
Que	22.22±1.23	22.69±1.42
Res	22.14±0.80	22.61±1.04

2.2 三种多酚类化合物对高原低氧暴露小鼠回肠损伤影响的比较

HE 染色结果显示 (图 1), Control 组小鼠回肠黏膜排列整齐, 上皮细胞排列整齐, 未见炎性细胞浸润。Hypoxia 组小鼠回肠出现明显损伤, 上皮细胞排列杂乱无章, 黏膜下层及固有层毛细血管扩张充血, 炎性细胞浸润增多。PC、Que、Res 组小鼠较 Hypoxia 组均有不同程度的改善, 可见三种多酚类化合物可不同程度的缓解缺氧所致的小鼠肠黏膜损伤。

95% 以上的血清二胺氧化酶 (DAO) 只存在于完整的肠道上皮黏膜中, 当肠道黏膜屏障受损时 DAO 会进入血液循环。平原对照组、模拟高原低氧组、高原原花青素组、高原槲皮素组、高原白藜芦醇组血清 DAO 水平分别为 5.72 ± 1.13 、 7.93 ± 2.15 、 6.22 ± 2.37 、 3.35 ± 1.64 、 5.68 ± 1.49 U/L。与 Control 组相比, Hypoxia 组的血清中 DAO 显著升高 ($P<0.05$)。与 Hypoxia 组相比, Que、Res 干预后血清 DAO 含量显著降低 ($P<0.05$)。PC 干预后 DAO 有所下降, 但差异无统计学意义。

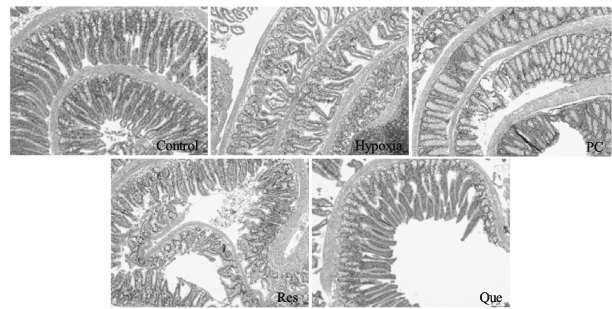


Fig. 1 Representative images of ileum tissues stained by HE ($\times 400$)

2.3 三种多酚类化合物对高原低氧暴露小鼠肠道菌群影响的比较

2.3.1 菌群丰度、多样性分析 采用 venn 图描述各组 OUT 数量及其共有和特有的 OUT 情况, 结果显示 (图 2A), Control、Hypoxia、PC、Que、Res 的总 OUT 数量分别为 2080、2044、1563、1883、1881 个, 特异性 (每组特有的) OUT 数量分别为 256、242、195、76、264 个, 共有 OUT 数量为 957 个。高原低氧暴露后肠道菌群物种丰度无显著变化, 药物干预高原低氧暴露小鼠后总 OTU 数量减少, 肠道菌群物种丰度显著降低。

Alpha 多样性指数是反映样本中微生物丰富度和均匀度的综合指标, 可用于比较不同组间微生物多样性差异。小鼠肠道菌群 Alpha 多样性测定结果显示 (图 2B), Hypoxia 较 Control 组 Chao1 指数和 Shannon 指数有所上升, 但差异无统计学意义。Que 干预后肠道菌群 Alpha 多样性较 Hypoxia 组显著降低 ($P<0.05$), PC 和 Res 干预后 Alpha 多样性没有显著性差异。

基于 Bray Curtis 距离对小鼠的肠道菌群结构进行 PCoA 分析, 结果证实 (图 2C), Control 组、hypoxia 组、Res 组大部分样本点都聚在一起, 说明三个组之间菌群的丰度和构成相似, 物种结构和组成无明显差异, Que 组和 PC 组菌群丰度及构成与其他三组可能存在差异。

Anosim 是一种基于置换检验和秩和检验的非参数检验方法, 用来检验组间的差异是否显著大于组内差异。高原低氧暴露处理后, 与 Control 组相比, Hypoxia 组微生物群落结构发生了较大改变 ($R=0.162$, $P=0.006$); 而与 Hypoxia 组相比, PC、Que、Res 处理后, 肠道菌群变化也很明显, 三组间差异均有统计学意义。

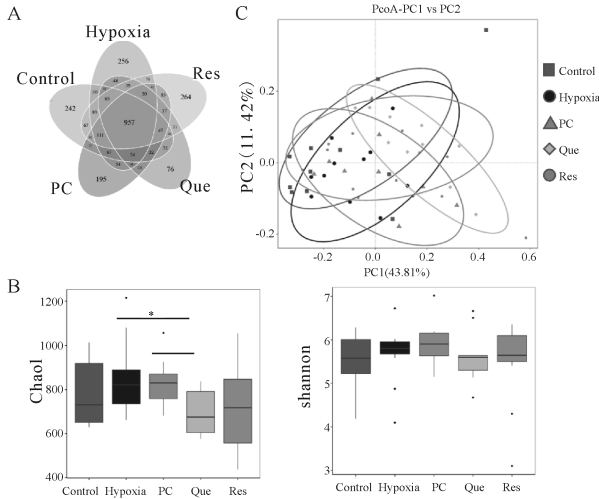


Fig. 2 Effects of three kinds of Polyphenolic compounds on diversity and richness of the gut microbiota after plateau exposure in mice ($n=12$)

A: Observed richness at OTU level (number of OTUs);
 B: Box plots of α diversity of intestinal flora; C: The beta diversity of gut microbiota in mice analyzed by PCoA

* $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs hypoxia

2.3.2 肠道微生物种属变化 如图3所示,各组小鼠肠道菌群主要以拟杆菌(Bacteroidetes)和厚壁菌(Firmicutes)两种为主。与Control组相比, Hypoxia组拟杆菌相对丰度由60.10%降低到55.55% ($P>0.05$),厚壁菌相对丰度无明显变化。此外, Que组较Control组拟杆菌相对丰度降低(33.43% vs 60.10%, $P<0.05$),放线菌(Actinobacteria)相对丰度升高(12.65% vs 1.35%, $P<0.05$)。Res组较Control组拟杆菌相对丰度降低,放线菌升高。与Hypoxia组相比,经过PC、Que、Res干预后, Que组拟杆菌相对丰度由55.55%降低到33.43% ($P<0.05$),厚壁菌由31.93%升高到45.62% ($P<0.05$),放线菌由3.45%升高到12.65% ($P<0.05$);PC组对菌群相对丰度影响不明显。

如图4所示,与Control组相比, Hypoxia组谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*), 脲气球菌(*Aerococcus urinaequi*)相对丰度都有所增加,但差异无统计学意义。鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)相对丰度无明显改变。此外, Que干预后,与Control组相比,谷氨酸棒状杆菌、罗伊氏乳杆菌相对丰度升高; Res干预后,与Control组相比,罗伊氏乳杆菌、鼠乳杆菌相对丰度也有所升高。与Hypoxia组相比,经过PC、Que、Res干预后, Que组谷氨酸棒状杆菌、鼠乳杆菌相对丰度升高($P<0.05$); Res组鼠乳杆菌相对丰度升高($P<0.05$);PC组对各菌相对丰度影响较

低($P>0.05$)。

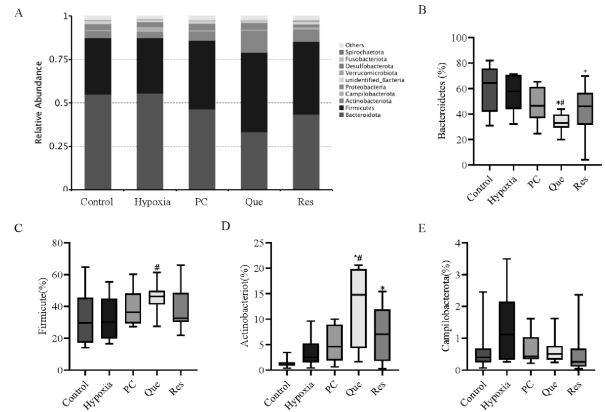


Fig. 3 Effects of three kinds of Polyphenolic compounds on relative abundance at the phylum level for each group of mice after plateau exposure ($n=12$)

A: Relative abundance of gut bacterial taxa at the phylum-level; B-E: The relative content of Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria and Campilobacterota in phylum level

* $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs hypoxia

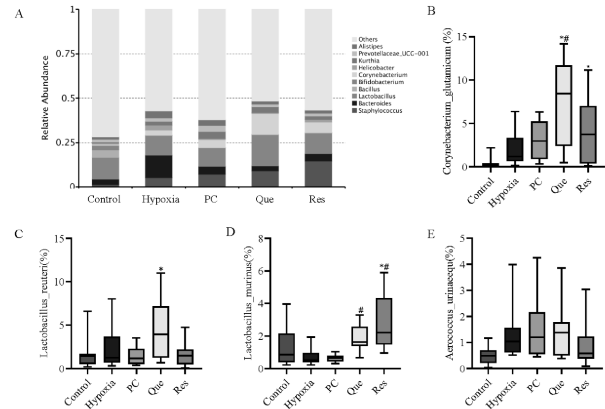


Fig. 4 Effects of three kinds of Polyphenolic compounds on relative abundance at the genus level for each group of mice after plateau exposure ($n=12$)

A: Relative abundance of gut bacterial taxa at the genus-level; B-E: The relative content of *Corynebacterium glutamicum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus* and *Aerococcus urinaequi* in genus level

* $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs hypoxia

3 讨论

目前已证实,肠道微生态与心脑血管疾病、呼吸系统疾病、代谢综合征、肿瘤、消化系统疾病等密切相关[8]。同时,年龄、饮食、抗菌药物、心理压力以及外部环境等多种因素也会影响肠道菌群的形成和组成[9, 10]。研究表明,高原低氧环境会导致机体胃肠道蠕动减慢,黏膜损伤,屏障功能障碍,从而导致肠道菌群紊乱,进而影响其结构和多样性[11, 12]。

16S rDNA (18S rDNA, ITS) 扩增子测序广泛应

用于土壤、水体、人畜肠道等自然环境或人畜组织中的微生物群落结构差异比较分析。本实验数据表明,高原低氧暴露后肠道菌群总 OUT 数量无显著变化。与平原对照组相比,低氧暴露导致肠道菌群 Alpha 多样性升高,但差异无统计学意义。PCoA 结果表明,高原低氧暴露对肠道菌群 Beta 多样性影响不明显,说明低氧暴露后与暴露前的微生物组成基本相似。当药物干预高原低氧暴露小鼠后总 OTU 数量减少,肠道菌群物种丰度显著降低,尤其是槲皮素,导致低氧暴露小鼠 Alpha 多样性显著降低,说明槲皮素干预后微生物多样性显著降低,因此进一步研究槲皮素是否调节肠道菌群结构,增加低氧暴露小鼠有益菌的丰度,降低致病菌丰度。

拟杆菌和厚壁菌是构成小鼠肠道细菌的主要细菌,研究表明拟杆菌既有助于从膳食纤维和淀粉中释放能量,也有可能促进炎症,但当拟杆菌离开肠道,会导致多种感染和脓肿^[13]。本实验结果显示,与模拟高原低氧组相比,槲皮素干预的小鼠肠道菌群中拟杆菌降低,厚壁菌升高。从 HE 染色结果来看,高原低氧暴露导致小鼠肠道黏膜损伤,会影响营养物质的吸收,进而导致机体发育受阻并发生炎症损伤的可能。厚壁菌的许多成员都是有益菌,可发酵碳水化合物和蛋白质,其发酵产物能够促进机体对营养物质的吸收。结果表明槲皮素可以促进低氧暴露小鼠有益菌的生存,重新平衡肠道微生物群,间接促进营养物质的消化吸收。此外,谷氨酸棒状杆菌具有强大的氨基酸代谢和分泌转运能力^[14],槲皮素干预有效提升高原低氧暴露小鼠谷氨酸棒状杆菌数量。鼠乳杆菌作为益生菌可以加速慢性结肠炎恢复^[15],本实验证实,槲皮素和白藜芦醇可有效增加鼠乳杆菌数量,据此推测其类多酚组分和肠道菌群中乳酸杆菌丰度的增加缓解肠道炎症和肠黏膜损伤。血清 DAO 水平能够反映肠道机械屏障的完整性和受损伤程度,从本实验结果表明,高原低氧暴露导致血清 DAO 水平升高,进而导致肠道屏障功能受损,槲皮素和白藜芦醇可有效降低血清中 DAO 水平,与肠道 HE 染色结果具一致性。

本实验表明,高原低氧环境对小鼠肠道菌群丰度、多样性有一定的影响,可损伤肠道组织结构。槲皮素、白藜芦醇干预后,可不同程度的改善高原低氧暴露小鼠的肠道菌群构成,增加有益菌群数量,抑制致病菌,其中以槲皮素的效果更为显著,原花青素对小鼠肠道菌群影响不明显。本实验采用高原模拟仓模拟高原低氧环境,而真实高原低氧环境除低氧外,强辐射、寒冷等因素也是影响肠道菌群的因素。另

外本实验未设置药物不同梯度剂量组,后续将进一步调整药物剂量并从分子生物学水平和细胞水平研究这三种多酚类化合物对高原低氧肠道菌群的影响作用。

【参考文献】

- [1] Hogberg N, Carlsson PO, Hillered L, *et al.* Intraluminal intestinal microdialysis detects markers of hypoxia and cell damage in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(9): 1646-1651.
- [2] Liu H, Li W, Wang X, *et al.* Early gut mucosal dysfunction in patients with acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2008, 36(2): 192-196.
- [3] Bonkowsky JL, Son JH. Hypoxia and connectivity in the developing vertebrate nervous system [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(12): 150-154.
- [4] Simon MC, Liu L, Barnhart BC, *et al.* Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system [J]. *Annu Rev Physiol*, 2008, 70: 51-71.
- [5] Gao Z, Wu H, Zhang K, *et al.* Protective effects of grape seed procyanidin extract on intestinal barrier dysfunction induced by a long-term high-fat diet [J]. *J Funct Foods*, 2020, 64: 3-7.
- [6] 陈樱萌, 胡满江, 曾钰鹏, 等. 槲皮素对肠道菌群的调节作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(10): 6-15.
- [7] Zhu F, Zheng J, Xu F, *et al.* Resveratrol alleviates dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in mice by mediating PI3K/Akt/VEGFA pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 693982.
- [8] Guarner F. Role of intestinal flora in health and disease [J]. *Nutr Hosp*, 2007, 22: 14-19.
- [9] Nord CE. The effect of antimicrobial agents on the ecology of the human intestinal microflora [J]. *Vet Microbiol*, 1993, 35(3-4): 193-197.
- [10] Parfenov AI, Bondarenko VM. What we gained from a century of investigations of symbiotic intestinal microflora [J]. *Terapevt Arkh*, 2012, 84(2): 5-10.
- [11] Gao H, Chi X, Li G, *et al.* Gut microbial diversity and stabilizing functions enhance the plateau adaptability of Tibetan wild ass (*Equus kiang*) [J]. *Microbiologyopen*, 2020, 9(6): 10-13.
- [12] Zhang J, Zhang J, Wang R, *et al.* Effects of gut microbiota on drug metabolism and guidance for rational drug use under hypoxic conditions at high altitudes [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(2): 155-165.
- [13] 伍荷洁, 张丽萍, 舒青龙. 不同浓度理中汤多糖作为碳源对肠道拟杆菌及厚壁菌体外生长的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(23): 29-32.

[14] 张晓梅, 高宇洁, 杨玲, 等. 谷氨酸棒杆菌中氨基酸分泌转运蛋白及其代谢改造研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2250-2259.

[15] 陈晓瑜, 陈峰, 张晨虹. 一株节食小鼠肠道优势鼠乳杆菌加速 DSS 致慢性结肠炎恢复[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(2): 855-866.

Bdnf 基因过表达慢病毒载体的构建及表达*

钟锦, 史晋朝, 张倩, 孟金凤, 张倩倩, 李建国[△]

(山西医科大学生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的: 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)基因过表达慢病毒载体的构建和包装, 检测其在大鼠海马原代神经元中的表达。方法: 利用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增 *Bdnf* 基因的 exons4 和 CDS 序列, 将其克隆到 pcDNA3.1-mCherry 载体上, 构建 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry 慢病毒表达载体。重组质粒经 *KpnI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定和测序验证。使用三质粒包装系统将重组质粒 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry 和慢病毒辅助包装质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 和 pCMV-VSV-G 共转染 293T 细胞, 制备并浓缩慢病毒颗粒, 感染大鼠原代海马神经元, 荧光显微镜和实时荧光定量 PCR 检测目的基因在原代海马神经元中的表达。结果: 成功构建 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry 慢病毒过表达载体, 转染后的 293T 细胞表达红色荧光, 并在培养大鼠海马原代神经元中表达增加($P < 0.05$)。结论: 成功构建含有特定转录本的 *Bdnf* 基因过表达慢病毒载体, 为进一步深入研究 *Bdnf* 的作用提供技术基础。

【关键词】 脑源性神经营养因子; 慢病毒; 293T 细胞; 原代海马神经元; 基因表达; 细胞培养

【KEY WORDS】 brain-derived neurotrophic factor; lentivirus; 293T cells; primary hippocampal neurons; gene expression; cell cultures

【中图分类号】 Q189

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-013-004

【DOI】 10.12047/j.cjap.6280.2022.074

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族的成员,广泛表达于大脑的各个区域^[1]。BDNF 影响神经元的增殖、分化、存活和死亡^[1-3]。BDNF 由包括神经元在内的多种细胞分泌,可通过血脑屏障^[4]。研究表明,大脑中的 BDNF 蛋白与精神障碍的发展有关^[5]。*Bdnf* 基因具有多个外显子,每个外显子都有一个特定的启动子,以形成不同的转录本^[6]。这些转录本被分选到神经元不同部位发挥作用^[7]。对应激产生抵抗的大鼠海马中观察到 *Bdnf* 外显子 IV 表达的升高^[8]。电休克疗法可以增加小鼠皮层中 *Bdnf* 外显子 I 和 IV 的表达,从而恢复由慢性应激引起的树突棘萎缩^[9]。鉴于 *Bdnf* 的多个转录本及其特定功能,海马神经元不同的树突部位可与神经系统内不同神经元形成突触联系。抑郁症患者和抑郁模型动物海马脑区神经元树突萎缩、突触减少^[10]。因此,明确不同 *Bdnf* 转录本在神经元内如何定位到特异的树突和突触部位,会为抗抑郁症研究提供新思路。为此,我们构建带红色荧光的过表达慢病毒载体 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry, 转染培养原代海马神经元后观察红色荧光在神经元中的定位,从而让特定 *Bdnf* 转录本在神经元内定位可视化。

1 材料与方法

1.1 材料

pcDNA3.1-mCherry 质粒由美国麻省 Whitehead 生物医学研究所惠赠,包装质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 由洛桑联邦理工学院 Didier Tron 教授惠赠,包装质粒 pCMV-VSV-G 购自上海碧云天生物技术有限公司,所有 RT-PCR 试剂、PCR 试剂、T4 连接酶、DNA Ladder 购自 Takara 公司,引物的合成和基因测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成,质粒抽提及胶回收试剂盒购自北京天根科技有限公司,转染试剂盒 Lipofectin3000 采用美国 Invitrogen 生物公司,*KpnI*、*EcoRI* 限制性内切酶购自美国 NEB 公司,Ampicillin 购自美国 Sigma 公司,Neurobasal、DMEM、Opti-MEM、胎牛血清、B27、胰酶 Trypsin-EDTA Solution 和青链霉素均购自 Gibco 公司,293T 细胞和大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 引物的设计合成

依据 NCBI 数据库中大鼠 *Bdnf* 基因序列设计 PCR 引物,上下游引物分别加上 *KpnI* 和 *EcoRI* 限制性内切酶酶切位点,上游引物 5'-GTGGTACCAGCCACCATGTAAAGCGG-TAGCCGGCTGG 下游引物 5'-GGAATTCTCTCCCTTTTA-ATGGTCAGTGTACATAC。

1.3 原代海马神经元培养

新生 1~3 d SD 大鼠,75%酒精浸泡消毒后断头,取出脑组织置于含预冷 PBS 的培养皿中,在解剖显微镜下分离出海马,并去除脑膜和脉络丛,移入另一装有预冷 PBS 的培养皿

*【基金项目】山西省基础研究计划面上项目(20210302123305)

【收稿日期】2022-02-25【修回日期】2022-09-28

[△]【通讯作者】Tel: 13935128325; E-mail: lijg@sxmu.edu.cn