

后肢接振对家兔脑及肌肉组织内皮素受体 mRNA 水平的影响

林立, 张兆强, 聂继池, 张春芝

摘要: [目的] 探讨后肢接振家兔内皮素受体(ETR)mRNA表达的影响。[方法] 将32只新西兰大白兔随机分为低、中、高强度接振组(4h等能量频率计加权加速度分别为3.03、6.13、12.30 m/s²)和对照组, 对各强度组家兔进行接振实验, 共45d。接振实验结束后, 取各组家兔脑组织及肌肉组织, 应用实时荧光定量PCR技术检测各组家兔组织中ETR-A mRNA、ETR-B mRNA的表达量。[结果] 接振实验后低、中、高强度组脑组织ETR-A mRNA、ETR-B mRNA的表达量分别为8.31±4.78、40.07±24.84、30.62±16.33、212.58±74.49和54.01±27.64、341.42±203.73, 骨骼肌ETR-A mRNA、ETR-B mRNA的表达量分别为1.40±0.56、2.51±1.14、2.06±1.89、0.79±0.87和0.85±0.16、1.44±0.68。各强度组家兔骨骼肌组织、脑组织ETR mRNA表达总体上增高($P<0.05$, $P<0.01$)。与对照组比较, 3个强度组脑组织ETR-A mRNA、ETR-B mRNA表达均增强($P<0.01$); 骨骼肌组织中, 中强度组的ETR-A mRNA及低强度组ETR-B mRNA的表达增强($P<0.05$, $P<0.01$)。[结论] 后肢接振可致家兔ETR mRNA表达升高。振动性血管损伤和神经损伤的发生, 可能是内皮素等缩血管物质与其受体水平上调共同作用的结果。

关键词: 振动; 内皮素受体; 内皮素; mRNA; 振动性血管损伤; 家兔

Effects on Endothelin Receptor mRNA Levels in Rabbits with Hind Legs Vibration LIN Li, ZHANG Zhao-qiang, NIE Ji-chi, ZHANG Chun-zhi (Key Laboratory of Occupational Health and Environmental Medicine, School of Public Health, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China). Address correspondence to ZHANG Chun-zhi, E-mail: zhangchunzhi48@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the effects on endothelin receptor (ETR) mRNA levels in rabbits exposed to hind legs vibration. [Methods] Thirty-two New Zealand white rabbits were randomly divided into low (3.03 m/s², 4 hours energy equivalent frequency-weighted acceleration, 3.03 m/s²), moderate (6.13 m/s²), and high (12.30 m/s²) intensity groups and control group. All the exposure groups recieved vibration loading test for 45 d. After that, the ETR-A and ETR-B mRNA expressions of muscle tissue and brain tissue were measured by real-time fluorescent quantitative PCR. [Results] After the vibration loading test, the expression levels of ETR-A mRNA and ETR-B mRNA in brain tissue were 8.31±4.78 and 40.07±24.84 in the low intensity group, 30.62±16.33 and 212.58±74.49 in the moderate intensity group, and 54.01±27.64 and 341.42±203.73 in the high intensity group, respectively, and the expression levels in muscle tissue were 1.40±0.56 and 2.51±1.14 in the low intensity group, 2.06±1.89 and 0.79±0.87 in the moderate intensity group, and 0.85±0.16 and 1.44±0.68 in the high intensity group, respectively. The expression levels of ETR mRNA in both muscle and brain tissues of the rabbits in each group were elevated significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression of ETR-A mRNA and ETR-B mRNA in brain tissues of the three intensity groups increased statistically compared with the control group ($P<0.01$); in muscle tissues the expression level of ETR-A mRNA in the moderate intensity group and the expression level of ETR-B mRNA in the low intensity group were higher than those in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). [Conclusion] Vibration loaded to hind legs could induce increased expression of ETR mRNA in muscle and brain tissues of rabbits, which might result in vascular and nervous impairments.

Key Words: vibration; endothelin receptor; endothelin; mRNA; vascular impairment induced by vibration; rabbit

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15707

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81273042); 山东省自然科学基金(编号: ZR2011CM025)

[作者简介] 林立(1967—), 男, 博士, 教授; 研究方向: 职业卫生与职业医学; E-mail: linli6711@sina.com

[通信作者] 张春芝, E-mail: zhangchunzhi48@163.com

[作者单位] 济宁医学院公共卫生学院职业卫生与环境医学重点实验室, 山东 济宁 272067

振动性血管损伤是手臂振动对机体的主要危害之一, 表现为指端小血管的收缩、痉挛, 严重者可出现振动性白指, 但其发生机制尚未阐明。内皮素(endothelin, ET)是体内收缩血管作用最强的物质, 近年来的研究表明, 无论是手臂振动作业工人还是局部接振的实验动物, 均可出现ET水平的增高, 认为其在振动性血管损伤中可能具有重要作用^[1-3]。ET只有与

内皮素受体(endothelin receptor, ETR)结合才能发挥其生理作用,即 ETR 水平是决定 ET 发挥生理学功能的重要因素。但目前尚未见振动对 ETR 影响的研究报告。本研究用后肢接振的方法,对新西兰家兔进行为期 45 d 的振动负荷实验,并对实验后家兔脑组织和骨骼肌组织中 ETR mRNA 表达进行检测,旨在为振动性血管损伤的发生机制及其防治研究提供基础资料。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 3.5 月龄一级新西兰家兔 32 只作为实验对象(由山东新华鲁抗实验动物中心提供,动物合格证号:0003471),体重 2.0~2.5 kg,雌雄各半。将家兔随机分为高、中、低强度接振组和对照组,每组 8 只。4 组家兔由专人进行管理,饲养条件、生活环境完全相同。本研究中所涉及的实验动物均按国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》进行管理和处置。

1.2 仪器与试剂

电动振动台/D-150-1 型及振动控制仪/KD-3 型(苏州实验仪器厂,中国),ND2 精密声级计(国营红

声器材厂,中国),微量紫外分光光度计(Quawell,美国),高速冷冻离心机/TGL-20M 型(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,中国),CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国),5020 型 Arktik 多功能 PCR 仪(Thermo,美国),AlphaImager Mini 凝胶成像系统(ProteinSimple,美国),Trizol(大连宝生物工程有限公司,中国),PrimeScript RT 试剂(大连宝生物工程有限公司,中国),SYBR® Fast qPCR Mix(大连宝生物工程有限公司,中国),引物及内参的设计及合成[生工生物工程(上海)有限责任公司,中国]。

1.3 实验方法

1.3.1 动物接振实验 将新西兰兔置于自制固定装置上,双后肢密切接触电动振动台振动台面,振动参数由振动控制仪调控^[4]。接振实验总时间为 45 d。振动强度以 4 h 等能量频率计加权加速度有效值计,低、中、高强度接振组分别为 3.03、6.13、12.30 m/s²。对照组在接振实验过程中与中强度接振组置于同一环境下,接触与中强度接振组相同时间、相同强度噪声,而不予接振。应用 ND2 精密声级计现场测试不同振动强度时的噪声声级。具体分组、接振强度、接振时间及噪声水平见表 1。

表 1 各组振动负荷实验参数

组别	动物数	振动频率(Hz)	振动加速度(g)	接振时间(h/d)	4h 等能量计加权加速度(m/s ²)	噪声声级[dB(A)]
对照	8	—	—	—	—	74.8
低强度	8	125	7	0.5	3.03	74.4
中强度	8	125	10	1.0	6.13	74.9
高强度	8	125	20	1.0	12.30	78.6

1.3.2 标本制备 在家兔接振第 45 天,将其处死,在其濒死状态下迅速取出大脑组织、分离肌肉组织,-78℃冰箱中保存待测。

1.3.3 总 RNA 的提取 取 100 mg 冰冻家兔脑组织标本,迅速研碎至粉末状,加入 500 μL Trizol 后匀浆,置于洁净的离心管中(本实验所有容器均经 RNA 酶处理)。室温静置 5 min 后,在管中加入 100 μL 的氯仿,剧烈振荡混匀 30 s 后室温静置 5 min,12 000 × g 4℃离心 15 min,取上清,移至新的离心管中。加入与上清等体积的异丙醇,室温静置 10 min,12 000 × g 4℃离心 10 min。向沉淀中加入 0.5 mL 75%(体积分数)乙醇清洗沉淀,7 500 × g 4℃离心 5 min,弃上清保留沉淀,室温干燥,溶解于适量的焦碳酸二乙酯处理水中,待 RNA 完全溶解后于 -80℃保存。

1.3.4 测量所提取 RNA 浓度及纯度 各样本取 3 μL 测量 D₂₆₀/D₂₈₀ 值计算其浓度和纯度;另取 3 μL RNA 溶液,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭(EB)染色,观察 RNA 的完整性。

1.3.5 逆转录反应 按逆转录试剂盒说明操作。反应液组成:RNA(1 μg)、逆转录缓冲液(5 × RT Buffer)(2 μL)、逆转录混合酶(0.5 μL)、混合引物(0.5 μL)、无核酸酶水(补足至 10 μL),总体积 10 μL。37℃下反应 15 min,再于 98℃下反应 5 min,使多余的酶失活。反应结束后测 cDNA 样本的浓度及纯度,-20℃保存待用。

1.3.6 引物设计 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)中查找其基因序列(ETR-A: NM_001105674.1; ETR-B: NM_001082721.1; 内参: GAPDH, NM_001082253.1)。各基因 PCR 引物序列见表 2。

表2 各基因PCR引物序列

基因名	上游引物	下游引物	基因扩增产物长度(bp)
ETR-A	ACAGGGGTGAACAGCACAAA	ACTGAGGGCAATCCTCAAGC	194
ETR-B	CAAAGAAGGGAGGACAGCCG	CACGAGGCAGGATACACAG	112
GAPDH	GACCAGGTCGTCTCTGCG	GGCTCTTACTCCTTGAGGC	179

1.3.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 按试剂盒说明操作进行。反应条件: 预变性95℃, 30s, 变性95℃ 5s, 退火和延伸60℃ 30s, 共循环40次。根据仪器设定程序添加熔解曲线, 熔解温度65~95℃, 每升高0.5℃进行1次荧光摄影。以灭菌双蒸水为阴性对照模板, 每个样品设3个复孔。反应结束后, 计算出每个样品mRNA的表达, 采用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$)进行分析, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ 。

1.4 统计学分析

使用SPSS 18.0进行数据录入, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表达, 组间比较用F检验, 并用LSD法进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 家兔总RNA的提取

电泳结果可见28s和18s两条带, 提示RNA完整。紫外分光光度计检测 D_{260}/D_{280} 在1.8~2.0之间, 表明本次提取RNA纯度符合实验要求。

2.2 各组脑、骨骼肌ETR mRNA的表达情况

各强度组家兔骨骼肌组织、脑组织ETR mRNA表达在总体上明显增高($F=3.09\sim17.43$, $P=0.00\sim0.04$)。与对照组比较, 3个强度组脑组织ETR-A mRNA、ETR-B mRNA表达均增强($P<0.01$); 骨骼肌组织中, 中强度组的ETR-A mRNA及低强度组ETR-B mRNA的表达增强($P<0.05$)。见表3。

表3 不同接振强度组家兔脑、骨骼肌ETR mRNA的表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ETR-A mRNA		ETR-B mRNA	
		脑	骨骼肌	脑	骨骼肌
低强度	8	8.31 ± 4.78**	1.40 ± 0.56	40.07 ± 24.84**	2.51 ± 1.14*
中强度	8	30.62 ± 16.33**	2.06 ± 1.89*	212.58 ± 74.49**	0.79 ± 0.87
高强度	8	54.01 ± 27.64**	0.85 ± 0.16	341.42 ± 203.73**	1.44 ± 0.68
对照	8	0.94 ± 0.06	0.53 ± 0.29	0.90 ± 0.27	1.30 ± 1.70
F		17.43	3.61	16.75	3.09
P		0.00	0.03	0.00	0.04

[注] 与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

3 讨论

周围循环功能障碍是手臂振动病的主要病理改

变之一, 表现为指端小血管的收缩、痉挛、管内小血栓、平滑肌增生及管腔狭窄乃至闭塞等。在这个致病过程中, ET(起主要作用的被认为是ET-1)合成与分泌的紊乱是因素之一^[5-7]。上述的研究指出, 家兔后肢接振可导致其后肢血管内皮细胞凋亡的增强, 但这种增强却是ET合成分泌增加的启动因素。ET生物学效应的实现, 依赖于与ETR的结合, 进而激活多个信息通路。ETR主要有ETR-A、ETR-B两个亚型, 其中ETR-A主要分布在机体各个动脉的平滑肌中, 与ET-1的亲和力较大, 结合后发挥强烈的收缩血管的作用; 而ETR-B主要分布在内皮细胞中, 在血管效应上具有双重作用, 一方面可与ET-1结合收缩血管, 另一方面也可以刺激一氧化氮、前列腺素等的合成, 出现舒张血管的效应^[8-9]。目前研究显示, ETR的表达受多种因素的作用, 使其水平上调的因素有ET(负反馈作用)、血管紧张素Ⅱ、皮质醇, 但氧自由基、组织缺血缺氧、高胆固醇、高脂等则是其水平下调的因素^[10]。而ETR最终显示何种水平, 则是上述两类因素相互作用的结果。

本研究显示, 家兔在接振45d后, 出现ETR-A mRNA、ETR-B mRNA在脑组织和肌肉组织中表达的增强, 而且振动强度越高, 其表达越强, 提示ETR的这种变化与振动所导致的损伤有一定关系。局部振动所致ETR mRNA表达增强, 可能与以下因素有关: 以末梢血管、痉挛为主要表现的振动性血管损伤的后果是组织缺血缺氧, 而后者是导致ETR mRNA表达增强的重要因素^[11]; 以往的研究表明, 振动可导致心、脑、肾等组织中氧自由基增多、脂质过氧化增强^[11-12]。但是, 振动又是ET、血管紧张素Ⅱ的强烈刺激因素, 可导致这类缩血管物质合成、分泌的明显升高, 与ETR结合的结果, 就是ET所表现的强烈的缩血管效应。也可以认为, 振动性血管损伤的实现, 可能是ET等缩血管物质与其受体水平上调共同作用的结果。本研究结果还显示, 家兔接振后, 在其中枢神经系统中两类ETR mRNA的表达也增多。中枢性ETR则可反射性提高血中儿茶酚胺的水平^[13], 后者正是交感神经张力增高的佐证, 对血管的效应也是使其收缩和痉挛。

本研究结果中,脑、骨骼肌ETR-B mRNA表达量在中、高强度组出现标准差过大的现象,同时骨骼肌组织中ETR的水平有与脑组织中的变化不一致的表现,即脑组织中ETR mRNA相对含量变化具有规律性,而在骨骼肌中的表达却无明显的规律性,可能与以下因素有关:①后肢骨骼肌组织在振动实验过程中,除了受到血管痉挛而致的组织缺血缺氧、生化因子改变的影响之外,还受到振动的直接机械性损伤刺激;②骨骼肌ETR-A mRNA、ETR-B mRNA在对照组也有较大差异,可能是这两种受体振动实验后在各强度组变化规律不同的原因之一;③样本含量较小。确切的原因还需进一步研究。

综上,通过本研究,初步发现家兔接振后组织中ETR的变化以及这种变化在振动性血管损伤中的作用和机制;也为我们今后的研究提出了方向,即可以通过ETR的拮抗或阻断来防治振动性血管损伤。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Kohout J, Topolcan O, Bejcková H. The serum level of endothelin in patients with hand-arm vibration syndrome[J]. Cent Eur J Public Health, 1995, 3 Suppl: 43-44.
- [2] Palmer KT, Mason H. Serum endothelin concentrations in workers exposed to vibration[J]. Occup Environ Med, 1996, 53(2): 118-124.
- [3] 林立, 张春之, 聂继池, 等. 局部振动对家兔血浆内皮素浓度的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18(3): 137-139.
- [4] 曾晓立, 李召军, 赵广臣, 等. 振动对机体影响实验研究中动物接振方式的设计与评价[J]. 济宁医学院学报, 1995, 18(2): 18-19.
- [5] 林立, 张璟, 郭堂春. 煤矿掘进工手部循环功能与血管内皮活性物质的关系[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(8): 460-463.
- [6] Krajnak KM, Waugh S, Johnson C, et al. The effects of impact vibration on peripheral blood vessels and nerves[J]. Ind Health, 2013, 51(6): 572-580.
- [7] Wehland M, Ma X, Braun M, et al. The impact of altered gravity and vibration on endothelial cells during a parabolic flight[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(2/3): 432-451.
- [8] 汤旭磊. 内皮素受体研究进展[J]. 兰州医学院学报, 2000, 26(1): 58-61.
- [9] Lüscher TF, Wenzel RR. Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications[J]. Agents Actions Suppl, 1995, 45: 237-253.
- [10] Leonard MG, Briyal S, Gulati A. Endothelin B receptor agonist, IRL-1620, reduces neurological damage following permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res, 2011, 1420: 48-58.
- [11] Kuc RE, Carlebur M, Maguire JJ, et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension[J]. Life Sci, 2014, 118(2): 391-396.
- [12] 林立, 张春之, 隋桂英, 等. 局部振动对家兔外周血中脂质过氧化物的影响[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(3): 218-220.
- [13] Zicha J, Dobešová Z, Kuneš J, et al. Chronic endothelin A receptor blockade attenuates contribution of sympathetic nervous system to salt hypertension development in adult but not in young Dahl rats[J]. Acta Physiol (Oxf), 2012, 205(1): 124-132.
- (收稿日期: 2015-12-15)
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)
-
- (上接第770页)
- [11] Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, et al. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways[J]. Front Oncol, 2012, 2: 88.
- [12] 张伟, 秦秀军, 许超琪, 等. γ 射线照后不同时间点人肝细胞基因差异表达谱的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(6): 416-420.
- [13] Bonnaud S, Niaudet C, Legoux F, et al. Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis[J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9905-9915.
- [14] Fang YJ, Moore BJ, Bai Q, et al. Hydrogen peroxide enhances radiation-induced apoptosis and inhibition of melanoma cell proliferation[J]. Anticancer Res, 2013, 33(5): 1799-1807.
- (收稿日期: 2015-09-02)
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)