毛芮22011010025 张沈圆22011010028 李汝仪22011010030 张雨萱22011010039

题目：STZ(链脲佐菌素)对小鼠肝组织中 iNOS 基因表达的影响

关键词：STZ；iNOS；氧化应激；基因表达；Western Blot；RT-PCR

研究背景：

Ⅰ型糖尿病也称胰岛素依赖型糖尿病(insulin-dependent diabetic mellitus, IDDM),其早期的病理改变是胰岛内伴有单核-巨噬细胞浸润的炎症反应。研究显示,这种炎症反应引起的β细胞损伤及胰岛素分泌衰竭与巨噬细胞释放白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosing factor, TNF)等,介导诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达有关。祁忠华等曾测过实验动物血浆一氧化氮(nitric oxide, NO)代谢物浓度和内脏器官中iNOS-mRNA表达。但用原位杂交技术检测外周血白细胞iNOS-mRNA表达的研究尚未见报道。

一氧化氮（NO）是机体细胞产生的一种具有强烈舒血管作用的因子，由一氧化氮合成酶（NOS）合成。NOS包括诱生型（iNOS）和组成型（cNOS)，两者均可利用L﹣精氨酸合成NO。NO在调节肾血流动力学方面具有重要地位，刺激NO产生可使肾血浆流量（RPF)、肾小球滤过率（GFR）升高，而抑制NO合成则使RPF、GFR下降。2003年来对一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)与糖尿病(DM)及其并发症关系的研究比较重视,多数研究表明DM期NO增高,糖尿病肾病(DN)期NO降低。有研究结果显示，对照组PBL中无eNOS mRNA和iNOS mRNA的表达，DM组两型NOS mRNA均有明显表达，说明两型iNOS mRNA的表达与DM的发生有关。

链脲佐菌素Streptozotocin（STZ），是一种被广泛应用于在实验室动物中诱发糖尿病的化学物质。STZ是一种细胞毒性葡萄糖类似物，通过GLUT2葡萄糖转运体被胰岛β细胞吸收。吸收进细胞后，STZ通过诱导DNA分裂和甲基化来抑制DNA合成，导致细胞死亡。这种对β细胞的细胞毒性会导致胰岛素释放的减少，随后血糖水平升高。有研究表明，STZ糖尿病大鼠模型的胰岛损伤和胰岛素分泌衰竭与大量NO产生有关;同时发现该模型的单核细胞释放IL-1、TNF等细胞因子增加。检测实验组和对照组各5例肝、肺组织中iNOS-mRNA的表达,发现实验组肝、肺组织中的吞噬细胞有阳性表达,而对照组全部呈阴性反应,认为肝、肺组织中这些iNOS-mRNA阳性细胞来自于血液,反映STZ糖尿病大鼠可能存在着全身性单核-巨噬系统iNOS-mRNA表达增强的情况。

实验设计方案：

1.观察指标：分别检测对照组和实验组小鼠肝组织中iNOS基因的mRNA的表达量和iNOS蛋白质的表达量。

2.检测方法：

2.1Western blot技术测定iNOS蛋白浓度

2.1.1小鼠肝脏组织总蛋白的提取

（1）颈椎脱白法处死小鼠，取小鼠肝脏，把组织剪切成细小的碎片。

（2）称取约30 mg肝组织，加入600 μL 含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液，匀浆后离心取上清液，即得总蛋白。

2.1.2 BCA法测定总蛋白浓度

根据BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定总蛋白浓度，制备上样缓冲液。

2.1.3蛋白样品的处理

测完蛋白含量后,计算含50µg总蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品至1mL离心管中,加入5×SDS上样缓冲液至终浓度为1×,将样品于沸水中煮5min使蛋白变性。

2.1.3.1电泳

（1）准备试剂（6种，ACR及TEMED有毒）和器械，将试剂恢复至室温;

（2）清洗电泳所用的玻璃板，晾干或 60 ～ 70℃ 烤干;

（3）安装玻璃板(长板在外、短板在内) 并插挡板固定（拧紧以防漏胶）;

（4）配胶: 分离胶和浓缩胶（按照配方剂量选择合适剂量的移液器及枪头，调好至相应计量备用）;

（5）异丙醇封闭，静置20~40min；

（6）-80℃冰箱取出蛋白样本插至冰中融化备用，-20℃冰箱取出marker及buffer插至冰中融化备用；

（7）放好电泳槽，加入配置好的1x电泳液，上样，根据实验要求选择电压和时间。

2.1.3.2 电泳转膜

（1）将玻璃板撬开，根据目的条件选择切胶位置。切胶时根据溴酚兰的位置先将左右两侧多余的凝胶切去，然后根据 Marker 切去上下多余的凝胶，在胶块右下角切去一小角作为标记，测量胶的大小后将凝胶置于转膜液中浸泡。

（2）转一张膜需准备 4 张 3 mm 的滤纸和 1 张 PVDF 膜。根据凝胶大小裁剪滤纸和 PVDF 膜( PVDF 膜右下剪角作标记)，将 PVDF 膜置于甲醇中激活1min，浸泡于转膜液中待用。

（3）将分离胶盖于滤纸上，用手调整使其与滤纸对齐，轻轻用滚轮擀去气泡。将膜盖于胶上，要盖满整个胶，并除去气泡。在膜上盖两层滤纸并除去气泡。整个操作在转移液中进行，膜两边的滤纸不能相互接触，否则会发生短路。

（4）根据实验需求选择半干转或湿转，注意电极的正负。

2.1.3.3 免疫反应

（1）将膜用 PBS 冲洗 10 min 后，移至用 PBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭液中，室温下摇床上摇动封闭 2 h。

（2）将一抗用 PBST 稀释至适当浓度; 从封闭液中取出膜，置于抗体稀释液中。摇床 4℃ 孵育过夜。

（3）用 TBST 在室温下摇床上洗三次，每次 10 min。

（4）同上方法准备二抗稀释液并与膜接触，室温下孵育 2 h。

（5）用 TBST 在室温下摇床上洗三次，每次 10 min，进行化学发光反应。

（6）化学发光，显影，定影。

2.2 RT-PCR技术测定iNOS的mRNA表达量

2.2.1 组织总RNA提取（TRIZOL法）

（1）取50~100mg新鲜的小鼠肝组织，加入1mlTrizol充分匀浆，室温静置5分钟，4℃，12000rpm离心10分钟。

（2）上清液移至一新的用DEPC处理过的EP管（1.5ml）中，加入0.5ml异丙醇，振荡混合，室温静置5分钟。4℃，12000rpm离心15分钟。

（3）小心将上清液无色水相移至一新的EP管（DEPC处理）中，加入0.5ml异丙醇，颠倒混匀数次，室温静置10分钟，4℃，12000rmp离心15分钟，倒掉上清。

（4）加入1ml75%乙醇（4℃保存），振荡混合。4℃，7500rmp离心5分钟，倒掉上清。

（5）室温或37℃放置20min（EP管倒置在滤纸上），使RNA沉淀干燥，加入20ul DEPCH2O充分溶解RNA

（6）RNA纯度鉴定 取1ulRAN溶液测定OD260/OD280比值，≥2.0为合格。

（7）RNA完整性鉴定 取3ulRNA溶液，行1%琼脂糖凝胶电泳。电泳后的凝胶于紫外光下，可见由正极向负极依次增强5S，18S和28S三条荧光区带，即为高质量RNA。

2.2.2 cDNA第一链的合成

（1）在微量离心管中，加入以下：

总RNA1~5ugOligo(dT)(100ug/ml) 1ul，补充适量

DEPCH2O使总面积达10ul。轻轻混匀、离心。

（2）PCR仪上70℃加热5分钟，立即将微量离心管插入冰浴中至少1分钟。

（3）然后加入以下试剂：

5×buffer 4ul

4种dNTP(每种浓度10mmol/L) 2ul

DTT 2ul

RNase抑制剂 0.5ul

RTase 1ul

轻轻混匀，离心。

（4）42℃孵育60分钟。

（5）于95℃加热5~10分钟以终止反应，将管插入冰中。

2.2.3 PCR扩增

（1）在0.5ml的无菌drof管依次加入反应缓冲液、底物、上下游引物、Taq酶、DNA模板各5ul,总反应体积为25ul.

（2）离心混匀后，将drof管放入PCR仪。

（3）进行PCR扩增，反应条件为：

①95℃预变性5分钟。

②94℃变性40秒，58℃退火40秒，72℃延伸1分钟，循环26次。

③72℃延伸5分钟。

扩增完成后，取扩增液10ul，加入2ul 6×上样缓冲液混匀，在1.5%琼脂糖凝胶（配置30ml凝胶加入1~2ulEB）中电泳30分钟。电泳缓冲液：1×TBE；电压：100V。最后通过紫外透射鉴定。

实验预期

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 条件 | iNOS的表达量 |
| 1组 | 对照组 | 无 |
| 2组 | 单纯高脂饮食组 | 略高但不明显 |
| 3组 | 单纯STZ处理组 | 略高但不明显 |
| 4组 | 高脂饮食联合STZ处理组 | 明显上升 |

实验结论

STZ（链脲佐菌素）对肝组织中iNOS基因表达起促进作用。但STZ并未直接参与到iNOS基因表达的通路中，而是通过诱发糖尿病导致肝中氧化应激的产生，从而间接导致iNOS生成。

参考文献：

[1]李瑞峰,郭成浩,陈融,李莉,孔乐凯,王建丽,胡维诚.链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠外周血白细胞iNOS-mRNA表达的变化[J].中国病理生理杂志,2001,(12):89-91+125.

[2]祁忠华,林善锬.早期糖尿病大鼠肾脏诱生型一氧化氮合酶基因表达[J].中华内分泌代谢杂志,1998,14(1):41.

[3]陈福琴,邵倩,李瑞峰,李莉,陈融,胡维诚.外周血白细胞两种类型一氧化氮合酶mRNA的表达与糖尿病的关系[J].中华内分泌代谢杂志,2003,(04):53-54+101.

[4]李瑞峰,郭成浩,陈融等.链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠外周血白细胞iNOS-mRNA表达的变化[J].中国病理生理杂志,2001(12):89-91+125.

[5]赵君,谭小月,张勉之.五味子合剂对糖尿病肾病小鼠肾组织MCP-1及iNOS表达的影响[J].天津医药,2012,40(06):594-597+645.

[6]赵永吉,陆莹,游志鹏.藏红花酸对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠视网膜神经上皮的保护作用[J].中国药理学通报,2020,36(03):399-403.

[7]周群,高思琦,张霖璋等.黄芪总苷通过调控SIRT1表达对胆汁淤积性肝纤维化小鼠的影响[J].中成药,2023,45(11):3568-3576.

[8]李文通,王家耀,刘兆华,郭成浩,李瑞峰.阿司匹林对STZ糖尿病大鼠外周血白细胞iNOSmRNA和胰岛细胞iNOS表达的影响[J].山东大学学报(医学版),2005(10):57-59+88.

[9]何姜,陈闽,刘小莺,王燕萍,刘礼斌.氧化应激对内皮细胞NF-κB、iNOS和NO信号表达的影响[J].福建医科大学学报,2010,44(03):186-189.