

bcl-xL 基因转染对脊髓损伤半胱氨酸蛋白酶-3 表达的影响

易成腊 陈安民 白祥军 宋先舟 徐卫国

【摘要】 目的 探讨 bcl-xL 基因转染对大鼠脊髓损伤 Caspase-3 表达的影响和对神经细胞的保护作用。方法 制备大鼠胸段脊髓 T_{8,9} 压迫损伤模型,随机分为 2 组:对照组, bcl-xL 组,将阳离子脂质体质粒混合后直接注入大鼠损伤脊髓,伤后 1、3 和 7 d 利用半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫组织化学检测 bcl-xL 和 Caspase-3 表达情况;TUNEL 法检测细胞凋亡,观察对神经细胞的保护作用。结果 与对照组相比, bcl-xL 组各时间段 Caspase-3 表达明显降低($P < 0.05$), TUNEL 阳性凋亡的神经细胞明显减少($P < 0.05$)。结论 外源性 bcl-xL 基因体内转染在损伤脊髓的过度表达可减少脊髓不完全性损伤后凋亡,可能与其下调 Caspase-3 的有关。

【关键词】 脊髓损伤; 脱噬作用; 基因表达

The effect of bcl-xL gene transfection in vivo on the expression of Caspase-3 and neuroprotective function following spinal cord injury YI Cheng-la, CHEN An-min, BAI Xiang-jun, et al. Department of Trauma, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bcl-xL gene transfection on the expression of Caspase-3 and neuroprotective function in rat spinal cord compression injury model. **Methods** Models of acute spinal cord compression injury at the level of T_{8,9} were set up. The rats were divided into control group and bcl-xL group. The rats of bcl-xL group were subjected to the intraspinal injection of pSFFV-bcl-xL complexed with liposome. The expression of bcl-xL and Caspase-3 at 1st day, 3rd day or 7th day after injection was detected by RT-PCR and immunostaining. The segments of injured spinal cord were harvested for morphological studies after injury. By using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) methods, cell apoptosis was detected. **Results** Compared to control group, the expression of Caspase-3 was significantly decreased ($P < 0.05$) and the number of TUNEL labeling positive cells was less at different time points ($P < 0.05$) in bcl-xL gene transfecting group. **Conclusion** bcl-xL overexpressed by gene transfecting in injured spinal cord tissue could decrease the post-traumatic apoptosis, which might be correlate with the down-regulation of Caspase-3.

【Key words】 Spinal cord injury; Apoptosis; Gene expression

本研究旨在探讨 bcl-xL 基因转染对半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3 表达的影响,以期阐明 bcl-xL 抗脊髓损伤神经细胞凋亡可能机制,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 目的基因的制备及鉴定:pSFFV-bcl-xL 质粒(由我院神经内科王芙蓉博士馈赠), bcl-xL 基因全长 771 bp (测序结果), 插在质粒表达载体 SFFV-neo 的多克隆位点内, 酶切位点为 EcoR = 1/ *ROMAN I, 质粒线性化的位点为 Pst = 1/ *ROMAN I, 位于 SFFV-LTR 上游。质粒经转化、涂板、挑菌、小提、鉴定和质粒大提后, 溶于 TE 缓冲液 - 20 保存备用。

2. 动物分组和脊髓损伤模型制备: 雄性成年 SD 大鼠 48 只, 体重 250 ~ 300 g, 随机分为两组: (1) 对照组; (2) bcl-xL 组, 每各 24 只动物, 大鼠经 20 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后固定在立体定向仪上, 切除 T₈₋₁₀ 椎板, 按 Nystrom 等^[1]的方法压迫 T_{8,9} 脊髓, 压迫重量为 35 g, 时间为 5 min, 造成中度胸髓损伤。采用脊髓内直接注射基因进行转染, 动物伤后于 T₉ 水平后正中血管旁利用微量注射器和微电极推进器, 向头侧斜行进针, 深度约 3 mm。bcl-xL 组将 Lipofectamine 3 μl 和质粒 1 μl (2.5 g/L) 混合后注入脊髓内, 对照组只注射 Lipofectamine 4 μl, 注射速度 0.5 μl/min, 注射后, 留管 2 min 缓慢拔管, 逐层缝合关闭切口, 分笼饲养。

3. 标本采集和处理: 在伤后 1、3、7 d 取材, 麻醉后经左心室-主动脉插管, 大鼠置冰上完整取出脊髓组织, 每组各 3 只损伤脊髓组织置入液氮罐中保存, 用于

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400449)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科(易成腊、白祥军、宋先舟), 骨科(陈安民、徐卫国)

RNA 提取。每组其余动物损伤脊髓组织置入 40 g/L 的多聚甲醛固定 2~4 h, 将损伤段组织块长约 8 mm, 石蜡包埋, 连续切片数张, 片厚 10 μm。

4. 检测指标: (1) 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR): 使用 TRIzol (Gibco 产品) 一步法提取组织总 RNA, 依照紫外分光光度仪测纯度与浓度。依照 bcl-xL 和 Caspase-3 cDNA 序列设计引物。bcl-xL 上游引物: 5'-GTTGAA GCGTTCCTGGCCCTTT-3' (相当于目的基因 99~120), 下游引物: 5'-CAGAA TGGACT-GAA TCGGA GA T-3' (相当于目的基因 598~619), 产物长度为 561 bp; Caspase-3 上游引物: 5'-AGTCT-GACTGGAA GCCGAA-3' (相当于目的基因 474~493), 下游引物: 5'-CGGGA TCTGTTTCTTTGCAT-3' (相当于目的基因 815~618), Caspase-3 产物为 342 bp; -actin 为内参照, 上游引物: 5'-ATCATGTTTGA-GACCTCAAC-3' (相当于目的基因 2158~2178), 下游引物: 5'-TTGATCTTCA TGGTGCTA GGA-3' (相当于目的基因 2845~2865), 产物长度为 708 bp, 由赛百盛生物工程技术有限公司合成。取 5 μl 总 RNA 用 AMV 逆转录酶进行反转录, bcl-xL PCR 反应条件: 94 45 s, 55 40 s, 72 50 s, 30 个循环; Caspase-3 PCR 反应条件: 94 变性 40 s, 55 退火 1 min, 72 延伸 30 s, 29 循环。结果通过凝胶电泳, 图象经 UVP GRAB-it IMAGEL 软件采集, Gelwords ID Advanced V4.01 软件处理分析, 计算相对表达率 = 实验灰度值/内参灰度值。(2) 免疫组织化学检测 bcl-xL 表达, 采用 SP 法, 试剂盒和兔抗鼠 bcl-xL 和 Caspase-3 p20 亚单位二抗购于北京中山生物制品公司, 切片经计算机图像分析系统处理, 分别测出每张切片平均每平方毫米阳性细胞数。(3) 神经细胞凋亡的检测: 按原位凋亡检测试剂盒 (TUNEL 法, 武汉博士德) 使用说明对脊髓组织切片进行染色, 在高倍光镜下, 记录每张切片的阳性细胞数

5. 统计学方法: 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 *t* 检验进行组间比较。

结 果

1. 质粒酶切鉴定 pSFFV. bcl-xL 全长 5.1 kb, 质粒经 EcoR = 1/ * ROMAN I 酶切出现 4.3 kb 的载体片段和 770 bp 基因片段, 经 Pst = 1/ * ROMAN I 酶切后出现约 5.1 kb 一条带, 表明质粒为所需的质粒 (图 1)。

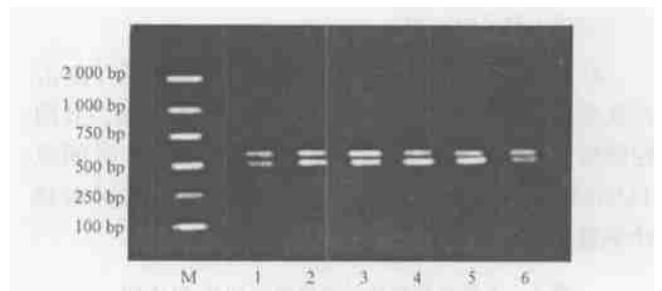
2. 两组损伤脊髓组织 bcl-xL mRNA 和蛋白水平表达 bcl-xL RT-PCR 结果显示得到两条约 560 和 700 bp 左右长的扩增产物 (图 2), 分别与 bcl-xL 和 -actin 预期大小一致。bcl-xL 组 1、3、7 d bcl-xL mRNA 的相对表达

率 (与 -actin 比较) 分别为 1.284 ± 0.024, 1.818 ± 0.031 和 1.614 ± 0.013; 而对照组分别为 0.865 ± 0.018, 0.792 ± 0.032 和 1.004 ± 0.022, 组间比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 2)。免疫组织化学结果显示实验组 bcl-xL 在脊髓组织过度表达明显对照组, 阳性表达的细胞主要为神经元, 其中少量为胶质细胞 (表 1)。



1: 质粒 SFFV. bcl-xL; 2: EcoRI 酶切后 771 bp 和 4.3 kb 两个片段; 3: PstI 酶切后线性化片段; M: marker

图 1 质粒 SFFV. bcl-xL 经 EcoRI 和 PstI 酶切图



M: DNA 分子量标准; 1~3: 对照组 1、3、7 d; 4~6: bcl-xL 组 1、3、7 d

图 2 RT-PCR 检测两组 bcl-xL 1、3、7 d mRNA 表达

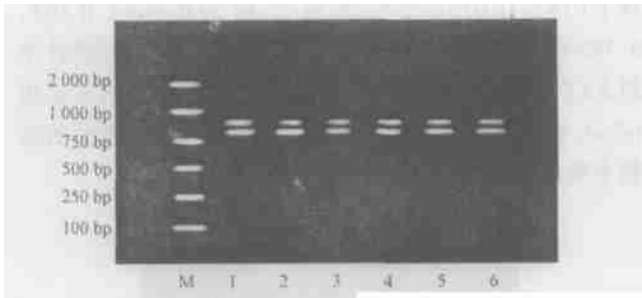
表 1 大鼠脊髓损伤后两组 bcl-xL 阳性细胞数 (个/mm², n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间 (d)		
	1	3	7
对照组	10.0 ± 1.9	15.0 ± 2.8	24.0 ± 2.3
bcl-xL 组	18.0 ± 3.2	34.0 ± 1.7 *	56.0 ± 2.1 *

注: 组间比较, * *P* < 0.05

3. 两组损伤脊髓组织 Caspase-3 mRNA 和蛋白水平表达变化: RT-PCR 结果显示 Caspase-3 mRNA 产物长度 342 bp, -actin 长度 708 bp。bcl-xL 组 1、3、7 d Caspase-3 mRNA 的相对表达率分别为 0.927 ± 0.024, 0.825 和 1.214 ± 0.022; 而对照组分别为 1.628 ± 0.024, 1.935 ± 0.013 和 1.455 ± 0.026, 其中 1、3 d 组间比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 3)。免疫组织化学结果显示伤后 1 d Caspase-3 表达的阳性细胞在灰质和白质中均存在, 3、7 d 表达阳性细胞主要位于白质中。与对照组相比, bcl-xL 组各时间点 Caspase-3 表达的阳性细胞明显减少, 组间比较差异有统计学意义

($P < 0.05$, 表 2)。



M:DNA 分子量标准;1~3:对照组 1、3、7 d;4~6: bcl-xL 组 1、3、7 d

图 3 RT-PCR 检测两组 Caspase-3 mRNA 1、3、7 d 表达

表 2 大鼠脊髓损伤后两组表达 Caspase-3 阳性细胞数(个/mm², n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间(d)		
	1	3	7
对照组	27.0 ±3.9	43.0 ±4.7	19.0 ±2.4
bcl-xL 组	11.0 ±2.2 *	22.0 ±5.2 *	7.0 ±1.6 *

注:组间比较, * $P < 0.05$

4. 对脊髓损伤细胞凋亡的影响 脊髓损伤后 1、3 d, 在灰质和白质中可见 TUNEL 标记的阳性细胞, 7 d 阳性细胞主要在白质中, bcl-xL 基因转染组各时间点 TUNEL 标记的阳性细胞明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 大鼠脊髓损伤后两组每张切片 TUNEL 标记阳性细胞数 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间(d)		
	1	3	7
对照组	106.0 ±15.2	203.0 ±13.6	146.0 ±13.8
bcl-xL 组	68.0 ±8.9 *	138.4 ±14.6 *	88.2 ±10.9 *

注:组间比较, * $P < 0.05$

讨 论

细胞凋亡的发生涉及到一系列基因的激活表达及调控, bcl-2 基因家族是重要的调控基因, 其中 bcl-2, bcl-xL 对细胞凋亡有抑制作用, 而 bax、bad、bak、bcl-xS 等促进凋亡。Qiu 等^[2]研究结果显示, 脊髓损伤细胞凋亡与损伤部位 bcl-xL 表达水平急剧下降和 bcl-xL/bax 比率降低有关, 说明脊髓损伤后促进凋亡因子占优势, 而保护因子明显不足从而使神经细胞向凋亡方向发展。Lou 等^[3]用腺病毒介导的 bcl-2 基因转染挫伤的脊髓, 提高局部 bcl-2 水平, 发现脊髓损伤带减少,

bcl-2 基因有潜在的促进脊髓损伤神经元的存活。

我们利用基因转染方法, 将外源性人抗凋亡基因 bcl-xL 直接引入脊髓组织, 从 RT-PCR 和免疫组织化学结果显示 bcl-xL 组脊髓损伤后 1、3 和 7 d 的表达明显高于对照组, 说明该基因可有效转染脊髓神经元和胶质细胞。bcl-xL 基因转染组 TUNEL 标记的阳性细胞明显低于对照组, 可见提高脊髓损伤局部 bcl-xL 水平可抑制脊髓损伤后细胞凋亡的发生, 保护神经细胞。

Caspase 被认为细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶, 它直接水解激活与 DNA 断裂等凋亡特征性改变密切相关的蛋白, 又称为死亡蛋白酶。已发现 14 个家族成员, 分为两类: 一类参与 Caspase 家族其他成员的激活, 包括 Caspase-1、2、4、5、8、9 和 10; 另一类介导细胞凋亡下游的执行阶段, 包括 Caspase-3、6、7、14, 其中 Caspase-3 是凋亡过程中最重要的蛋白酶, 是多种凋亡途径的共同下游效应部分, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。

许多研究结果证实, 脊髓损伤神经元和胶质细胞凋亡 Caspase-3 激活有关, 我们在以前的实验证实脊髓损伤后 Caspase-3 的表达与神经细胞凋亡水平呈正相关^[4]。对 bcl-xL 抑制细胞凋亡的分子机制研究结果表明, bcl-xL 作用于凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1) 的上游, 通过其保守功能区 BH4 将胞浆中的 Apaf-1 结合到线粒体外膜, 从而阻断 Apaf-1 对 Caspase-9 的激活, 阻断 Caspase-9 切割 Caspase-3 而抑制细胞凋亡。本实验 bcl-xL 基因转染组各时间段 Caspase-3 mRNA 和其切割后 p20 亚单位表达水平明显降低, 说明 bcl-xL 抑制脊髓损伤后细胞凋亡机制与其下调 Caspase-3 有关。本实验通过对细胞凋亡发生的信号传导机制研究, 利用现代生物学基因转染技术对脊髓损伤后神经细胞凋亡发生进行干预, 挽救濒临死亡的神经元, 对促进脊髓损伤神经功能恢复有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Nystrom B, Berglund JE, Bergquist E. Methodological analysis of an experimental spinal cord compression model in the rat. Acta Neurol Scand, 1988, 78:460-466.
- 2 Qiu J, Nestic O, Ye Z, et al. bcl-xL expression after contusion to the rat spinal cord. J Neurotrauma, 2001, 18:1267-1278.
- 3 Lou J, Lenke LG, Xu F, et al. In vivo bcl-2 oncogene neuronal expression in rat spinal cord. Spine, 1998, 23:517-523.
- 4 易成腊, 陈安民, 徐卫国, 等. 大鼠脊髓损伤后 Caspase-3 表达和神经细胞凋亡相关性研究. 创伤外科杂志, 2004, 6:171-174.

(收稿日期:2005-05-25)