文章编号:1000-5404(2006)09-0929-03

论著

反义波形蛋白逆转录病毒对损伤的星形胶质细胞的作用

夏永智,林江凯,冯 华 (第三军医大学西南医院神经外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨重组反义波形蛋白cDNA逆转录病毒重组质粒对体外培养损伤的星形胶质细胞(astrocyte, AST)波形蛋白(vimentin)表达的影响。**方法** 采用体外培养AST划伤模型,设实验组及对照组,通过免疫荧光、RT-PCR、Western blot等方法,研究反义波形蛋白逆转录病毒感染对损伤AST波形蛋白表达的影响。**结果** 反义波形蛋白逆转录病毒使损伤AST生长抑制,突起回缩,波形蛋白mRNA及蛋白水平表达降低。**结论** 反义波形蛋白可有效抑制体外培养损伤AST的生长及其波形蛋白的表达。

关键词: 星形胶质细胞;波形蛋白;RT-PCR;Western blot
中图法分类号: R322.8; R373; R394.2 **文献标识码:** A

Effect of antisense vimentin retrovirus on injured astrocytes

XIA Yong-zhi, LIN Jiang-kai, FENG Hua (Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of recombinant antisense Vim retrovirus on Vim gene expression of injured astrocytes (AST). **Methods** The injured AST *in vitro* was established and divided into two groups: experiment and control. After transfected with retrovirus carrying antisense complementary DNA (cDNA) for vimentin, vimentin gene expression of injured astrocytes was investigated by immunocytofluoresence, RT-PCR and Western blotting. **Results** The processes of the injured astrocytes transfected by retrovirus became retracted. Transfection of antisense vimentin retrovirus into injured astrocytes also inhibited the growth of astrocytes and decreased the expression of vimentin at both transcription and translation level. **Conclusion** Retrovirus carrying vimentin antisense cDNA could inhibit effectively the growth and vimentin gene expression of injured astrocytes *in vitro*.

Key words: astrocyte; vimentin; RT-PCR; Western blotting

星形胶质细胞(astrocyte, AST)广泛参与中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后胶质瘢痕的形成,传统认为再生轴突在胶质瘢痕形成处停止生长,因此AST长期被认为是CNS损伤后轴突再生的主要障碍之一。正常时AST很少表达中间丝波形蛋白(vimentin),但CNS损伤时却明显表达[1]。如能有效抑制波形蛋白的表达,干扰AST细胞骨架结构,将有可能影响AST胶质化反应,从而抑制或延缓胶质瘢痕的形成。本研究利用体外培养胶质细胞损伤模型,运用免疫荧光、RT-PCR及Western blot等方法,观察反义波形蛋白逆转录病毒对正常及损伤的AST波形蛋白表达的影响,有利于揭示波形蛋白在胶质瘢痕形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 AST的分离培养及鉴定

出生1~2 d大鼠,75%乙醇浸泡消毒后断头,入预冷D-Hanks液中,取皮层组织入含20%胎牛血清的DMEM培养基中,加入0.125%胰酶,反复吹打,制成细胞悬液,1 000 r/min离心5 min,收集沉淀,调整细胞密度至1.5×10^6/ml,种植于培养瓶,37 ℃恒温箱中经30 min差速粘附去除成纤维细胞后,200目金属滤网过滤,将滤液转移另一培养瓶继续培养,每3天换液1次,9 d后细胞基本长满瓶底,加入0.25%胰蛋白酶消化、传代,重复传代3~4次,得到纯化AST。

1.2 培养AST划伤模型的建立

按照我们建立的方法[2],简述如下:细胞消化后接种于24孔板中经多聚赖氨酸处理的盖玻片上,生长至60%~70%融合后,用10 μl Tip头贴盖玻片划过,造成细胞损伤,D-Hanks液清洗去除损伤细胞碎片,补加新鲜培养基继续培养。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471781)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471781)
作者简介:夏永智(1977-),男,河北省景县人,硕士研究生,实习研究员,主要从事中枢神经系统损伤方面的研究。电话:13108916251
通讯作者:林江凯,电话:(023)68765759,E-mail: jklin2002@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-10-24;修回日期:2005-11-20

1.3 逆转录病毒感染培养正常及损伤 AST

设实验组和对照组。实验组提取反义波形蛋白逆转录病毒上清 10 U,感染盖玻片上的实验组生长正常或损伤 AST[3],72 h 后经固定、漂洗,进入培养细胞的波形蛋白免疫荧光染色步骤(SABC 法)[4],磷酸甘油封片,荧光显微镜观察照相。

1.4 生长曲线测定

按 1×10^5 接种 24 孔板,分别于 0、1、3、5、7 d,各取 3 孔细胞,胰酶消化后,台盼蓝染色,计数活细胞,绘制生长曲线。

1.5 半定量 RT-PCR

分别取正常及划伤后 1、3、5、7 d 两组 AST 进行 RT-PCR 分析,每个时间点取 5 孔细胞。采用 Roche 公司 Tripure 试剂,按说明书方法提取细胞总 RNA。RT-PCR 采用 Takala 公司 RNA PCR Ver. 3.0 试剂盒,10 μl RT 反应体系含 1 μl 总 RNA、2 μl $MgCl_2$、1 μl 10 × buffer、3.75 μl Rnase Free dH_2O、1 μl dNTPs(各 10 mmol/L)、0.25 μl RNasin、0.5 μl AMV 逆转录酶、0.5 μl Olig dT 引物。反应条件为 42 ℃温育 30 min,后接 99 ℃ 5 min 灭活逆转录酶。设计波形蛋白引物序列为:正义 5′-CGTTTC-CAAGCCTGACCTCACC-3′、反义 5′-GCCATCTTTACATTGAG-CAGGT-3′,扩增片段长 392 bp;以 β-actin 阳性产物作为内参照,引物序列为:正义 5′-CCTTCCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3′、反义 5′-AGGAGCAATGATCTTGACTTC-3′,扩增片段长 165 bp。同时扩增波形蛋白和 β-actin,50 μl PCR 反应体系内含 10 μl cDNA、10 μl 5 × buffer、28.75 μl 灭菌 dH_2O、0.25 μl *Taq* 酶及上、下游 PCR 引物各 0.5 μl。反应条件为:94 ℃ 2 min,接94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环后,72 ℃延伸 10 min。PCR 产物 -20 ℃保存,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,加入终浓度 1 μg/ml EB,DNA Marker Ⅰ(无为时代公司)作为片段大小参照,紫外灯观测照相,以波形蛋白与 β-actin 条带面积与光密度乘积之比作为波形蛋白相对表达量。

1.6 半定量 Western blot

分别取两组 10 cm 培养皿中正常及划伤后 1、3、5、7 d AST,加入 100 μl 细胞裂解液裂解细胞,100 ℃加热 10 min 后,超声打碎 DNA,1000 r/min 离心 10 min,取上清并加入蛋白酶抑制剂 PMSF,-20 ℃保存备用。Bradford 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,调整样本蛋白质浓度,保证上样量一致,12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,Bio-Rad 湿法转膜装置将蛋白转移至 PVDF 膜上,含 5% 脱脂奶粉 TBST 室温下封闭 2 h,小鼠抗波形蛋白单抗(北京中山公司)37 ℃孵育 1 h,辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(武汉博士德公司)37℃孵育 1 h,DAB 显色,扫描成像,以波形蛋白条带面积与光密度乘积比值计算其相对表达量。

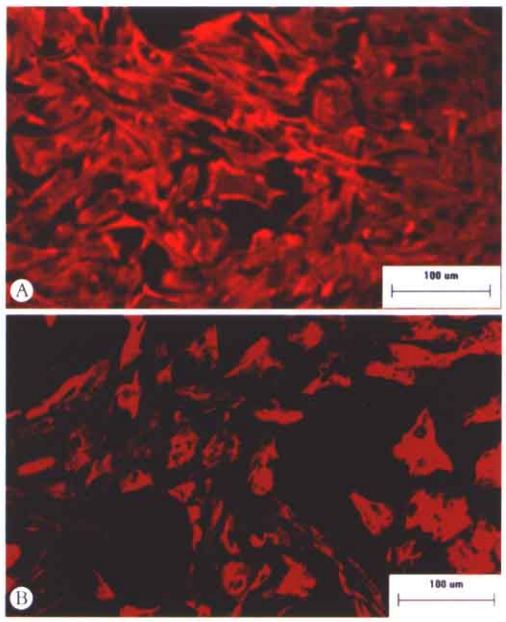
1.7 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行单向方差分析,继以 Turkey 法行多重比较。

2 结果

2.1 免疫荧光分析

接种 24 h 后存活细胞贴壁,9 d 后分层铺满瓶底。传 3、4 代后,形成大致均一的单层细胞,为扁平、多角形,突起短而粗大,GFAP 及波形蛋白免疫荧光鉴定阳性。细胞划伤 24 h 后,可见细胞体积增大,突起变长,2 ~ 4 d 后突起变细长,彼此交织,成网状聚集(图 1A)。病毒感染培养损伤 AST 24 h 后,可见细胞体积缩小,突起回缩;2 ~ 4 d 后,细胞数量减少,形态发生改变,呈不规则形,突起减少回缩(图 1B)。



A:对照组;B:感染 72 h 后损伤

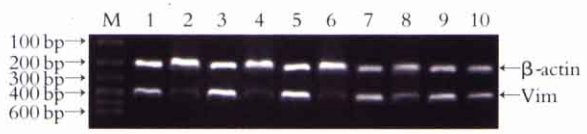
图 1 AST 波形蛋白免疫荧光分析 (SABC × 100)

2.2 细胞生长曲线

反义波形蛋白感染损伤 AST 后,与对照组相比,实验组细胞生长受到抑制,生长曲线向右侧移位。

2.3 RT-PCR

体外培养正常 AST 波形蛋白 mRNA 相对表达量为(0.91 ± 0.07),损伤后表达量为(0.94 ± 0.19),病毒感染后表达量显著下降至(0.38 ± 0.14)($P<0.01$)(图 2)。



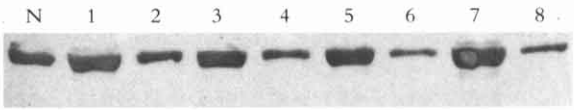
M:标准;1,3,5,7:分别为对照组划伤后 1、3、5、7 d AST;2,4,6,8:分别为实验组划伤后 1、3、5、7 d AST;9:正常 AST;10:病毒转染正常 AST

图 2 AST 波形蛋白 RT-PCR 产物分析

2.4 Western blot

Bradford 法测得蛋白标准曲线 y = 0.0119 x + 0.1068(其中 y 代表吸光度,x 代表样品的浓度,$R^2=0.9469$),Western blot 结果示波形蛋白条带分子质量约为 57×10^3,正常 AST 波形蛋白表达量为(856.49 ± 41.15),损伤后蛋白表达增加为

(1321.15 ± 151.02)($P < 0.01$)，病毒感染损伤 AST 后表达量降为(606.20 ± 169.93)($P < 0.01$)(图 3)。



N：正常 AST；1,3,5,7：分别为对照组划伤后 1、3、5、7 d AST；2,4,6,8：分别为实验组划伤后 1、3、5、7 d AST

图 3　AST 波形蛋白 Western blot 分析

3　讨论

反应性胶质化是 CNS 损伤后发生的基本病理过程，早期可能有利于 CNS 功能的恢复，但过度的胶质化将导致胶质瘢痕的形成，而胶质瘢痕是 CNS 轴突再生的主要障碍之一。AST 是反应性胶质化涉及的最主要细胞，因此抑制胶质细胞的细胞骨架可能有利于抑制反应性胶质化。中间丝是细胞骨架的基本成分，而波形蛋白和 GFAP 是两种主要的中间丝。CNS 损伤后反应性 AST GFAP 表达显著增加，而正常仅在胚胎发育期表达的波形蛋白重获表达，提示波形蛋白在反应性胶质化中有重要作用[1]。对 GFAP 基因敲除小鼠的研究发现其反应性胶质化未受到明显抑制[5]，而将小鼠波形蛋白和 GFAP 双基因敲除后，其反应性胶质化明显受到抑制[6]。因此对波形蛋白的研究有利于揭示其在反应性胶质化中的作用，从而为实现抑制反应性胶质化带来希望。

反应性胶质化是 AST 对 CNS 损伤反应所表现出来的特征性变化，损伤、炎症、缺血、缺氧及坏死细胞分解产物等多种因素均可诱导 AST 反应，在体情况下这些因素都难以调控，研究困难较大。而 AST 体外培养技术成熟，可稳定传代，同时消除了体内各种因素对 AST 的影响，容易控制所施加的干扰因素。利用体外分离培养 AST 可稳定表达波形蛋白的特点，使用 Tip 头进行机械划伤，受损细胞表现出反应性胶质化的特征，胞体肥大、突起粗大、长度增加，Western blot 证实波形蛋白的表达增加，说明体外培养 AST 对损伤反应敏感，可作为体外 AST 反应性胶质化的模型。

CNS 损伤后再生的神经轴芽多在瘢痕近端停止生长，因此一般认为胶质瘢痕是轴突再生的机械屏障。GFAP 是反应性胶质化的重要特征，波形蛋白阳性细胞的出现也可作为胶质细胞增殖的标志。对波形蛋白基因敲除小鼠的研究发现，正常时同时表达波形蛋白和 GFAP 的 AST 其 GFAP 网络紊乱，但经波形蛋白 cDNA 转染后可恢复正常装配[7]。这提示反应性 AST 的 GFAP 的作用可能依赖于波形蛋白的表达，因此通过抑制反应性胶质细胞波形蛋白的表达可能会抑制反应性胶质化，从而减弱胶质瘢痕的形成，促进神经轴突通过胶质瘢痕区。

如何成功实现对 AST 波形蛋白表达的抑制呢？最早应用的反义核酸技术可以特异性抑制靶基因的表达，但反义寡核苷酸作用时间短暂，效果欠佳。而逆转录病毒可整合于宿主细胞基因组并稳定表达，已成为转基因技术中较为成熟的载体。在我室成功构建了带有反义波形蛋白 cDNA 重组质粒的逆转录病毒载体的基础上[2,3]，利用体外划伤模型，我们成功抑制了 AST 波形蛋白基因的表达。结果表明，重组反义波形蛋白逆转录病毒感染划伤 AST 后，其形状变得不规则，突起回缩，细胞生长曲线呈生长抑制状态，RT-PCR 提示波形蛋白 mRNA 表达明显下降，Western blot 提示波形蛋白表达明显降低。因此从本实验结果看，重组反义波形蛋白逆转录病毒可有效抑制损伤 AST 波形蛋白基因的表达，提示利用重组反义波形蛋白逆转录病毒有可能在体内实现对 AST 胶质化的抑制，减弱或延缓胶质瘢痕形成。

参考文献：

[1] KIM D H, HEO S D, AHN M J, *et al*. Activation of embryonic intermediate filaments contributes to glial scar formation after spinal cord injury in rats[J]. J Vet Sci, 2003, 4(2): 109 - 112.

[2] LIN J, CAI W. Effect of vimentin on reactive gliosis: *in vitro* and *in vivo* analysis[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(11): 1671 - 1682.

[3] 林江凯，蔡文琴. 反义及正义 Vim 重组逆转录病毒表达载体的构建[J]. 华南国防医学杂志, 2005, 19(1): 21 - 24.

[4] 林江凯，蔡文琴. 波形蛋白在大鼠大脑穿刺损伤后的表达研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1149 - 1152.

[5] PEKNY M, LEVEEN P, PEKNA M, *et al*. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally[J]. EMBO J, 1995, 14(8): 1590 - 1598.

[6] RIBOTTA M G, MENET V, PRIVAT A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice [J]. Acta Neurochir Suppl, 2004, 89: 87 - 92.

[7] GALOU M, COLUCCI-GUYON E, ENSERGUEIX D, *et al*. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice[J]. J Cell Biol, 1996, 133(4): 853 - 863.

（编辑　周　芳）