论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2318-04

腺病毒介导的NgR特异性RNA干扰对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠神经行为学的影响

张 艳,秦新月,王 敬,张沁丽 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

【摘要】 目的 观察NgR特异性RNA干扰的重组腺病毒(Ad-shRNA-NgR)转染实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠脑组织后,EAE大鼠脑内NgR表达及神经行为学的情况。方法 Wistar大鼠108只,采用随机数字表法分为正常对照组($n=27$)、空白对照组($n=27$)、阴性对照组($n=27$)、特异性RNAi组($n=27$)。造模后第7天,通过侧脑室对阴性对照组及特异性RNAi组分别注射Ad-shRNA-HK、Ad-shRNA-NgR,空白对照组以等量的PBS代替。注射后第7、14天,RT-PCR、免疫荧光染色观察脑组织中NgR的表达并行Koh神经功能评分。结果 特异性RNAi组大鼠脑组织中NgR mRNA的表达及NgR免疫荧光染色的IOD值:注射后第7天,较空白及阴性对照组均明显下降($P<0.01$);注射后第14天,较该组注射后第7天时增高($P<0.05$),但仍低于空白及阴性对照组($P<0.05$)。特异性RNAi组EAE的发病潜伏期延长($P<0.05$),Koh神经功能评分降低($P<0.05$),体质量无明显减轻。结论 腺病毒介导的NgR特异性RNAi可明显下调EAE大鼠脑组织中NgR的表达,改善EAE大鼠的神经行为。

【关键词】 nogo受体;RNA干扰;重组腺病毒;实验性自身免疫性脑脊髓炎;神经行为

【中图法分类号】 R392.3;R741.05;R744.3 【文献标志码】 A

Effect of adenovirus-mediated NgR specific RNA interference on neuroethology of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis

Zhang Yan, Qin Xinyue, Wang Jing, Zhang Qinli (Department of Neurology, Key Laboratory of Neurology of Chongqing, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To observe the expression of NgR in the brain and the neuroethology of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) after Ad-shRNA-NgR was transfected into the lateral cerebral ventricle of rats. Methods One hundred and eight Wistar rats were randomly divided into normal control group, blank control group, negative control group, and specific RNAi group, 27 rats in each group. Rats in blank control group, negative control group, and specific RNAi group were injected with PBS, Ad-shRNA-HK and Ad-shRNA-NgR, respectively, in 7 d after EAE model establishment. Expression of NgR in brain tissue of rats was detected by RT-PCR with immunofluorescence staining after 7 and 14 d, respectively. Neurologic function was scored according to the Koh scoring system. Results The expression of NgR mRNA and the IOD of NgR in specific RNAi group was significantly lower than the blank or negative groups ($P<0.01$) at the 7th day, and was higher in 14 d than in 7 d after injection of different substances ($P<0.05$) and was still lower than in blank or negative group ($P<0.05$). The latent period of EAE was longer and the neurologic score was lower in specific RNAi group than in blank or negative group ($P<0.05$). No significant change was observed in body weight of rats. Conclusion Adenovirus-mediated NgR specific RNAi can down-regulate the expressing of NgR and ameliorate the neural behaviors of rats with EAE.

【Key words】 nogo receptor; RNA interference; recombinant adenovirus; experimental autoimmune encephalomyelitis; neuroethology

Corresponding author: Qin Xinyue, Tel: 86-23-89012478, E-mail: qinxinyue@yahoo.com

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统(central nervous system,CNS)常见的自身免疫性疾病,以慢性炎性脱髓鞘为主要病理改变[1]。Tallantyre等[2]报道MS早期存在轴突损伤,该病理变化不但与急性期神经功能障碍有关,而且是引起缓解期神经功能永久性障碍的病理基础。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是研究MS常用的动物模型[3]。Nogo受体(nogo

【通信作者】 秦新月,电话:(023)89012478,E-mail:qinxinyue@yahoo.com

receptor, NgR)是3个轴突再生抑制因子的共受体,在CNS损伤后有抑制轴突再生的作用[4]。在MS患者脑组织中NgR的表达增高,且主要在小胶质细胞及星形胶质细胞上表达[5]。因此,NgR很可能参与了MS的早期轴突损害及慢性炎性脱髓鞘过程。NgR特异性RNAi的重组腺病毒(Ad-shRNA-NgR)可特异性沉默NgR基因表达,从而下调NgR蛋白的表达[6]。本实验通过侧脑室注射Ad-shRNA-NgR转染EAE大鼠,观察转染后大鼠脑组织中NgR的表达情况,以及EAE大鼠的神经行为,从而为临床上MS的基因治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及器材

DMEM(高糖)培养基(Gibco,美国),胎牛血清(杭州四季青),卡介苗(bacilus calmette-guerin, BCG)及百日咳杆菌(bordetella pertussis vaccine, BPV)(石家庄伟天),NgR引物序列:上游引物为5′-TGCTGGCATGGGTGTTATGG-3′,下游引物为5′-CGGAAGGTGTTGTCGGGAAG-3′(上海生工合成),RNA提取液(Trizol)及PCR试剂盒(TaKaRa宝生物公司),NgR抗体(Abcam公司,英国),TRITC标记的荧光二抗(武汉博士德)。Vivapure Adeno PACK 20(Sartorius,德国),倒置相差显微镜及荧光显微镜(Olympus公司,日本)。293细胞(重庆医科大学附属第一医院实验研究中心)。

1.2 实验动物及分组

豚鼠14只,体质量380~450 g,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供,用于造模时制备新鲜豚鼠全脊髓匀浆(spinal cords homogenate of guinea pig, GPSCH)。6~8周龄的雌性Wistar大鼠108只,体质量160~190 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,采用随机数字表法分为:正常对照组($n=27$)、空白对照组($n=27$)、重组腺病毒载体Ad-shRNA-HK干预组(阴性对照组)($n=27$)、重组腺病毒载体Ad-shRNA-NgR干预组(特异性RNAi组)($n=27$)。

1.3 方法

1.3.1 重组腺病毒的构建、扩增、纯化及滴度测定 Ad-shRNA-NgR重组腺病毒由本课题组的张沁丽[6]构建,并用绿色荧光蛋白(green fluorescence prtein, GFP)标记。

用50 μl重组腺病毒原液感染293细胞,进行重组腺病毒的扩增。当60%~70%的细胞出现细胞病理效应(cytopathic effect,CPE)后,收集扩增的重组腺病毒,并用Vivapure Adeno PACK 20纯化。采用组织培养半数感染剂量(50% tissue culture infective dose,TCID50)法测定纯化所得重组腺病毒的滴度[7]。

1.3.2 Wistar大鼠EAE模型的建立 除正常对照组不加任何干预外,其余各组均参照文献[3]的方法诱导Wistar大鼠EAE模型。四足垫加尾跟部皮下注射抗原,0.5 ml/只。造模当天双后足背皮下加注BPV,0.1 ml/只。

1.3.3 侧脑室立体定向注射 造模后第7天,麻醉动物,显效后固定于立体定位仪。剪开头顶皮肤,在前囟后0.8 mm,旁开1.4 mm处插入微量注射器深约3.3 mm入侧脑室,以2 μl/min的速度行侧脑室立体定位注射。特异性RNAi组注射滴度为1.25×10^{10} pfu/ml的Ad-shRNA-NgR,10 μl/只;阴性对照组注射滴度1.28×10^{10} pfu/ml的重组腺病毒空载体(Ad-shRNA-HK),10 μl/只;空白对照组以等量PBS代替。

1.3.4 神经行为学观察 造模后每天观察大鼠的体质量,并采用Koh等[8]报道的评分标准对大鼠进行行为学评分,最高分为5分,以评分达到或超过1分作为EAE建模成功标准。

1.3.5 GFP表达的观察 注射后第7天,采用随机数表法每组选取3只大鼠取侧脑室附近脑组织,制作厚度为20 μm的冰冻切片,在荧光显微镜下直接观察转染区局部GFP的表达情况。

1.3.6 RT-PCR检测NgR mRNA的表达情况 注射后第7、14天,采用随机数表法每组选取6只大鼠,参照罗家明等[3]的方法取侧脑室附近脑组织100 mg,RT-PCR检测NgR mRNA表达水平。PCR扩增产物用Quantity One 4.4.0软件行定量分析,以目的基因与β-actin条带平均光密度比值表示目的基因mRNA的相对表达量。

1.3.7 免疫荧光染色检测NgR蛋白的表达情况 注射后第7、14天,通过随机数表法每组选取6只大鼠,经灌流固定后取脑组织,制作石蜡切片,按免疫荧光染色常规步骤进行操作。NgR一抗按1∶100稀释,以等量PBS代替一抗作为阴性对照。荧光显微镜下观察采集图像。采用Image Pro Plus 4.0(IPP),对免疫荧光染色图像进行累积光密度值(integrated optical density,IOD)分析。IOD值越高表明其免疫荧光信号越强。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料数据以$\bar{x}\pm s$表示,2组间比较用t检验,率的比较用χ^2检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒的扩增、纯化及滴度测定

重组腺病毒原液转染293细胞后24~72 h,293细胞中GFP阳性表达逐渐增多(图1)。纯化所得的重组腺病毒转染293细胞10 d后,所有细胞均出现细胞变圆、肿胀、脱落等典型CPE现象(图2)。经测定Ad-shRNA-NgR及Ad-shRNA-HK的滴度分别为2.93×10^{10}、2.84×10^{10} pfu/ml。

2.2 侧脑室附近脑组织GFP的表达

注射后第7天,阴性对照组及特异性RNAi组侧脑室附近脑组织针道周围有较多的GFP表达,且2组之间未见显著差异,而正常及空白对照组未见GFP阳性表达(图3)。

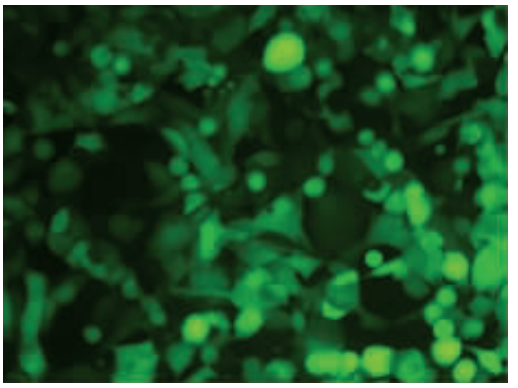


图1 荧光显微镜观察重组腺病毒原液转染72 h后293细胞中GFP的表达 (×200)

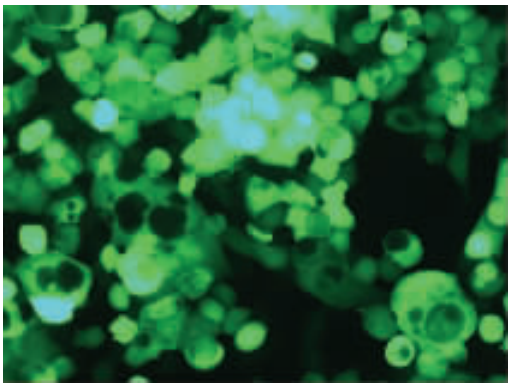


图2　纯化所得的重组腺病毒转染293细胞10 d后CPE现象观察　（荧光显微镜 ×200）

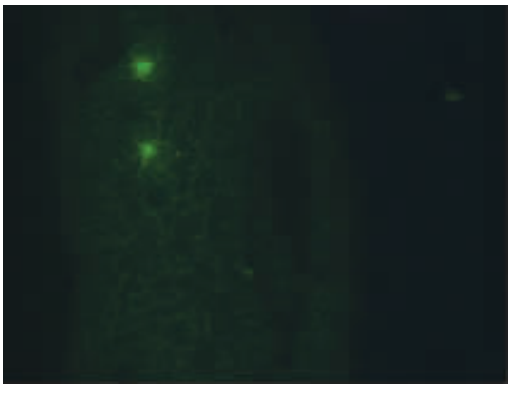


图3　荧光显微镜观察注射后第7天特异性RNAi组大鼠侧脑室附近脑组织GFP的表达　（×200）

2.3　侧脑室附近脑组织NgR mRNA的表达

通过RT-PCR检测相同时间点侧脑室周围脑组织NgR mRNA的表达情况（图4，表1）。特异性RNAi组：注射后第7天的表达水平明显低于空白及阴性对照组（$P<0.01$），与正常对照组相近；注射后第14天，较该组前一时间点的表达水平有所增加（$P<0.05$），略低于空白及阴性对照组（$P<0.05$）。空白及阴性对照组：与正常对照组相比，注射后第7天表达明显增高（$P<0.01$），注射后第14天仍有较高表达（$P<0.05$）。

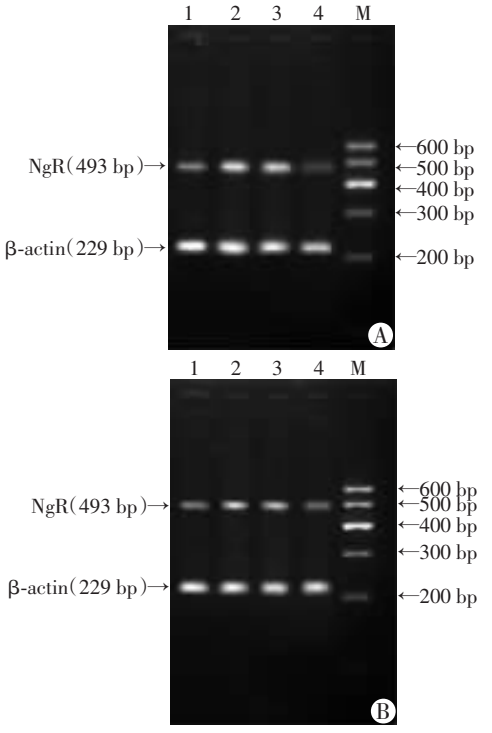
2.4　脑组织中NgR免疫荧光染色

大鼠脑组织中NgR阳性表达为红色荧光，主要集中大脑皮质，多数在胞膜上表达，偶有细胞质表达。注射后第7天（表2，图5A、B）：空白及阴性对照组大鼠脑组织中有大量NgR表达，其IOD值明显高于正常对照组（$P<0.01$）；特异性RNAi组的脑组织仅有少量或几乎没有NgR表达，其IOD值明显低于空白及阴性对照组（$P<0.01$）。注射后第14天（表2，图5CD）：特异性RNAi组脑组织中NgR的IOD值较该组在注射后第7天时有所增加（$P<0.05$），但仍低于空白及阴性对照组（$P<0.05$）。

表1　各组大鼠侧脑室附近脑组织NgR mRNA的表达（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

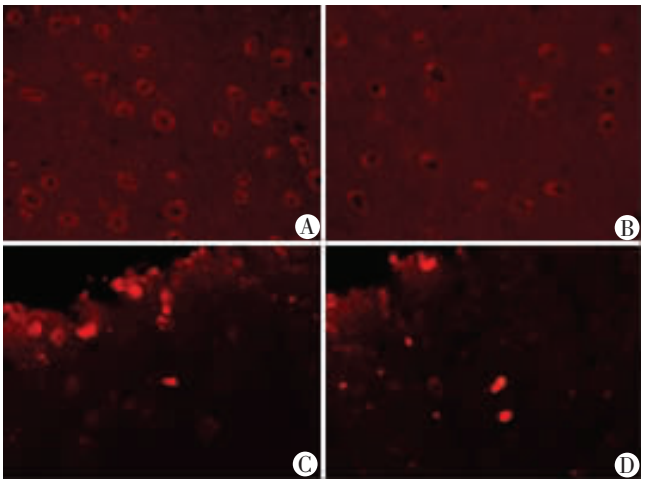
组别	注射后第7天	注射后第14天
正常对照组	0.552 ± 0.015	0.528 ± 0.013
空白对照组	1.563 ± 0.011[a]	1.129 ± 0.063[a]
阴性对照组	1.532 ± 0.021[a]	1.075 ± 0.083[a]
特异性RNAi组	0.452 ± 0.013[bc]	0.973 ± 0.013[ad]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与空白对照组比较；c：$P<0.01$，与阴性对照组比较；d：$P<0.05$，与该组注射后第7天比较



A：注射后第7天；B：注射后第14天
1：正常对照组；2：空白对照组；3：阴性对照组；4：特异性RNAi组；M：标准

图4　RT-PCR检测大鼠侧脑室附近脑组织NgR mRNA的表达



A、B：依次为空白对照组、特异性RNAi组注射后第7天　（×200）；
C、D：依次为空白对照组、特异性RNAi组注射后第14天　（×100）

图5　免疫荧光染色观察注射后第7、14天大鼠脑组织NgR的表达

表2　各组大鼠脑组织中NgR荧光染色的IOD值比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	注射后第7天	注射后第14天
正常对照组	736 ± 136	786 ± 129
空白对照组	8 657 ± 1 792[a]	8 327 ± 1 532[a]
阴性对照组	8 239 ± 1 863[a]	8 239 ± 1 736[a]
特异性RNAi组	532 ± 109[bc]	1 893 ± 1 467[bcd]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与空白对照组比较；c：$P<0.01$，与阴性对照组比较；d：$P<0.05$，与注射后第7天比较

2.5　EAE大鼠的神经行为学改变

与空白及阴性对照组相比，特异性RNAi组大鼠的发病潜

伏期延长($P<0.05$),Koh 神经功能评分降低($P<0.05$)。此外,特异性 RNAi 组大鼠的体质量与正常对照组相接近,高于空白及阴性对照组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 注射后第 14 天各组大鼠的发病情况($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	发病率(%)	潜伏期(d)	神经功能评分	体质量(g)
正常对照组	0	0	0	200.00±32.12
空白对照组	92[a]	12.10±0.63[a]	3.50±0.83[a]	123.80±28.92[a]
阴性对照组	92[a]	12.10±0.53[a]	3.50±0.72[a]	126.70±29.78[a]
特异性 RNAi 组	92[a]	15.00±0.83[abc]	2.20±1.21[abc]	189.30±29.74[bc]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与空白对照组比较;c:$P<0.05$,与阴性对照组比较

3 讨论

短链 RNA 干扰(short interfering RNAs,siRNAs)作为基因沉默技术之一,可高度特异性降解目的基因,且不引起非特异性干扰反应,因而对揭示某疾病中表达异常增高的基因或蛋白的功能非常有用[9]。本研究进行转染的重组腺病毒滴度与文献[10]报道的转染大鼠脑组织的最佳重组腺病毒滴度相接近,确保了转染的安全性及有效性。并通过 RT-PCR 及免疫荧光染色,检测转染后大鼠脑组织 NgR mRNA 及蛋白的表达情况,发现在转染后第 7 天时基因沉默效果最明显,蛋白水平的表达也明显降低;转染后第 14 天 NgR 基因及蛋白水平的表达已开始恢复,基因沉默作用减弱,与 Abe 等[11]报道的一致。

MS 及 EAE 发病早期均有轴突损害,该损害对急性期及缓解期的神经功能障碍均有重要影响[2,12]。因而减轻 MS 发病早期的轴突损害,对 MS 的预防及治疗具有重要意义。NgR 是轴突再生抑制因子 Nogo-A、髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMGP)的共受体,通过与以上 3 个轴突再生抑制因子结合,激活其下游的 Rho 激酶通路,从而起到抑制 CNS 轴突再生的作用[3,13,14]。研究表明,在卒中及急性脊髓损伤的动物模型中,通过拮抗 NgR 的作用,可以促进轴突再生,进而有利于神经功能的恢复[15,16]。本课题通过 Ad-shRNA-NgR 转染 EAE 脑组织,有效阻断了 EAE 脑组织中 NgR mRNA 的合成,降低了 NgR 蛋白的表达,可能促进了 EAE 早期轴突损伤的修复,起到了神经保护的作用,因而缓解并减轻了 EAE 的神经功能损害。

MS 的主要临床特点为时间及空间的多发性,延长其发病潜伏期可以减少复发[1]。本研究发现,通过腺病毒介导的 NgR 特异性 RNAi 下调 EAE 大鼠脑组织中 NgR 的表达后,大鼠的发病潜伏期延长。因而通过腺病毒介导的 NgR 特异性 RNAi 对于减少 MS 的发作具有重要意义。这为 MS 的基因治疗打下了实验基础。

参考文献:

[1] Courtney A M, Treadaway K, Remington G, *et al*. Multiple sclerosis [J]. Med Clin North Am, 2009, 93(2): 451-476, ix-x.
[2] Tallantyre E C, Bo L, Al-Rawashdeh O, *et al*. Greater loss of axons in primary progressive multiple sclerosis plaques compared to secondary progressive disease [J]. Brain, 2009, 132(Pt 5): 1190-1199.
[3] 罗家明, 秦新月, 陈黎燕, 等. 甲基强的松龙抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎 IL-23/IL-17 轴机制研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(6): 345-348.
[4] Fournier A E, GrandPre T, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 409(6818): 341-346.
[5] Satoh J, Onoue H, Arima K, *et al*. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2005, 64(2): 129-138.
[6] 张沁丽, 秦新月, 殷成, 等. 编码大鼠 Nogo 受体 mRNA 的 shRNA 重组腺病毒载体的构建和鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(1): 55-58.
[7] Barrett P N, Meyer H, Wachtel I, *et al*. Determination of the inactivation kinetics of hepatitis A virus in human plasma products using a simple TCID50 assay [J]. J Med Virol, 1996, 49(1): 1-6.
[8] Koh C S, Paterson P Y. Suppression of clinical signs of cell-transferred experimental allergic encephalomyelitis and altered cerebrovascular permeability in Lewis rats treated with a plasminogen activator inhibitor [J]. Cell Immunol, 1987, 107(1): 52-63.
[9] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, *et al*. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. Cell, 2000, 101(1): 25-33.
[10] 吴小慧, 秦新月, 王敬, 等. 重组腺病毒 Ad-shRNA-NgR 在大鼠缺血脑组织的转染效率研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 802-804.
[11] Abe K, Setoguchi Y, Hayashi T, *et al*. In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain [J]. Brain Res, 1997, 763(2): 191-201.
[12] Onuki, M, Ayers M M, Bernard C C, *et al*. Axonal degeneration is an early pathological feature in autoimmune-mediated demyelination in mice[J]. Microsc Res Tech, 2001, 52(6): 731-739.
[13] Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, *et al*. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth [J]. Neuron, 2002, 35(2): 283-290.
[14] Wang K C, Koprivica V, Kim J A, *et al*. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth [J]. Nature, 2002, 417(6982): 941-944.
[15] Lee J K, Kim J E, Sivula M, *et al*. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity [J]. J Neurosci, 2004, 24(27): 6209-6217.
[16] Li S, Strittmatter S M. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2003, 23(10): 4219-4227.

(收稿:2010-06-28 修回:2010-07-12)
(编辑 张 维)