文章编号:1000-5404(2012)08-0701-04

论著

Cx43基因干扰对大鼠星形胶质细胞谷氨酸基础释放的影响

王凌云,田衍平,牛建钦,肖 岚 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所)

[摘要] **目的** 构建能有效抑制大鼠星形胶质细胞(astrocytes, ASTs)连接蛋白43(connexin 43,Cx43)基因表达的siRNA载体,并检测抑制Cx43表达对星形胶质细胞谷氨酸释放的影响。**方法** 合成针对大鼠Cx43基因的siRNA寡核苷酸,构建pGCsi. U6. neo. GFP质粒载体。质粒通过电转方法转染原代星形胶质细胞后,用免疫荧光染色及Western blot检测转染干扰质粒对大鼠ASTs Cx43蛋白表达的影响。用谷氨酸ELISA定量试剂盒检测释放至培养基中谷氨酸的浓度,并用DAPI染色进行细胞计数。**结果** 测序结果显示,Cx43基因的目的片段正确插入载体,并保持正确的读码框。干扰质粒转染ASTs 48 h后与对照组相比,Cx43蛋白表达明显下降($P<0.05$),细胞存活未受影响,而谷氨酸释放明显减少($P<0.05$)。**结论** 成功构建了抑制大鼠Cx43基因表达的siRNA载体,抑制Cx43表达可降低ASTs谷氨酸的基础释放。

[关键词] 连接蛋白43;siRNA;星形胶质细胞;谷氨酸
[中图法分类号] R-332;R338;R363.27 [文献标志码] A

Effect of silencing connexin 43 gene on release of glutamate from astrocytes in rats

Wang Lingyun, Tian Yanping, Niu Jianqin, Xiao Lan (Department of Histology and Embryology, Chongqing Institute of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the siRNA plasmid that can effectively inhibit expression of connexin 43 (Cx43) and detect the effect of inhibited Cx43 expression on release of glutamate from astrocytes (ASTs). **Methods** siRNA oligonucleotides targeting the Cx43 gene in rats were synthesized, and cloned into pGCsi. U6. neo. GFP vector. After plasmids were transfected into ASTs by electroblotting, effect of the silencing plasmids on expression of Cx43 was detected by Western blotting and immunofluorescence staining. Release of glutamate from ASTs was assayed with an ELISA kit. The number of ASTs were calculated after DAPI staining. **Results** DNA sequencing showed that the target segments of Cx43 gene were correctly inserted into the plasmids and kept its correct reading frame. Forty-eight hours after the plasmids were transfected into AST, the expression level of Cx43 in ASTs and the glutamate released from ASTs were significantly lower than those in controls ($P<0.05$) with no significant difference observed in the number of ASTs. **Conclusion** The siRNA vector we constructed can effectively inhibit the expression of Cx43 in ASTs of rats, and inhibition of Cx43 expression can reduce the release of glutamate from AST.

[**Key words**] connexin 43;siRNA;astrocyte; glutamate

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171046) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BA5006).
Corresponding author: Xiao Lan, Tel: 86-23-68752230, E-mail: xiaolan35@hotmail.com

在神经系统中,星形胶质细胞(astrocytes, ASTs)能够主动摄取周围脑组织中的谷氨酸(Glutamate)并贮存于其胞内,同时它也具有释放谷氨酸的能力,而以连接蛋白43(connexin 43,Cx43)组成的半通道近年来被认为有可能是释放谷氨酸的途径之一。Cx43是ASTs表达的主要连接蛋白,参与组成星形胶质细胞功能合胞体(syncytium)。多个Cx43蛋白可形成连接子,连接子可在相邻细胞间形成缝隙连接,并单独形成半通道[1]。以往实验多采用通道阻滞剂的方法观察到半通道对ASTs释放谷氨酸的影响,但半通道阻滞剂药物毒性大,不利于细胞培养观察。因此,本研究建立了沉默ASTs Cx43基因的特异性Cx43 siRNA真核表达载体,检测Cx43表达下调对ASTs谷氨酸基础释放的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

P3 SD大鼠购自第三军医大学实验动物中心;细胞培养基(DMEM/F12、胎牛血清)购自HyClone公司;鼠抗Cx43抗体购

[基金项目] 国家自然科学基金(31171046);重庆市自然科学基金(CSTC2011BA5006)
[通信作者] 肖 岚,电话:(023)68752230,E-mail: xiaolan35@hotmail.com

自 BD 公司;兔抗 GFAP 抗体购自博士德公司;荧光二抗均购自 Invitrogen 公司;鼠抗 β-actin 一抗及 HRP 标记二抗均购自 Santa Cruz 公司;电转仪及电转杯购自 Lonza 公司;谷氨酸 ELISA 定量试剂盒购自上海博耀公司;寡核苷酸由上海 Invitrogen 公司合成;干扰载体 pGCsi. U6. neo. GFP 及退火缓冲液购自碧云天生物公司;T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 Cx43 siRNA 合成 目标序列为 5′-GCTGGTTACTGGTGACAGA-3′,由 Tabernero 教授[2]提供,根据 siRNA 的设计原则在序列两端加入 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ酶切位点和保护碱基,中间加入含 9 个碱基 TTCAAGAGA 的 loop 环连接,得到一条完整的 siRNA 片段。同时设计不与任何大鼠基因序列同源的对照序列,具体序列:Cx43 干扰序列:正义链 5′-GATCCCCGCTGGTTACTGGTGACAGATTCAAGAGATCTGTCACCAGTAACCAGCTTTTTT-3′,反义链 5′-AGCTAAAAAAGCTGGTTACTGGTGACAGATCTCTTGAATCTGTCACCAGTAACCAGCGGG-3′;对照序列:正义链 5′-GATCCCCCGGTTCGTGTAAGGTGAACTTCAAGAGAGTTCACCTTACACGAACCGTTTTTT-3′,反义链 5′-AGCTAAAAAAGCTGGTTACTGGTGACAGATCTCTTGAATCTGT-CACCAGTAACCAGCGGG-3′。目的片段已利用 Blast 进行查询,确定其特异性。阴性对照序列不与任何大鼠基因序列同源,由上海 Invitrogen 生物公司合成用于下一步实验。

1.2.2 Cx43 siRNA 质粒载体的构建 将合成的寡核苷酸退火形成双链结构与经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后的 pGCsi. U6. neo. GFP 载体连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α,挑取转化菌落培养后,提取质粒经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切,鉴定载体中是否插入目的基因。挑选重组阳性菌落进行测序鉴定(上海 Invitrogen 生物技术有限公司),质粒命名为 pGCsi. U6. neo. GFP-Cx43 和 pGCsi. U6. neo. GFP-con。

1.2.3 原代细胞培养及转染 取 P3 大鼠,分离端脑,去除脑膜,切碎后接种至多聚赖氨酸预包被培养瓶中,隔天换液,培养 6~7 d 当细胞融合率达 70%~80% 时,用摇床 37 ℃、200 r/min、持续机械振荡 18 h,去除少突胶质细胞及小胶质细胞,纯化后将细胞电转(应用 Lonza 公司 Nucleofector® I Device A-33 程序),每 10^5 细胞使用 1 μg 质粒,将细胞分为转染干扰质粒(pGCsi. U6. neo. GFP-Cx43)组、转染对照质粒(pGCsi. U6. neo. GFP-con)组及野生型组,并根据实验需要将细胞按密度为 10^5 个/ml 接种于 6 孔板和 24 孔板(玻片)。

1.2.4 免疫荧光检测 Cx43 表达 转染 48 h 后取出玻片,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.01 mol/L PBS 漂洗后用 1% BSA 封闭 1 h,加入一抗(兔抗 GFAP 1∶200;小鼠抗 Cx43 1∶1 000)4 ℃过夜,PBS 漂洗后入加二抗(Alex488-标记 驴抗兔 1∶1 000;Alexa568-标记 驴抗小鼠,1∶1 000) 37 ℃ 2 h,DAPI 0.5 μg/ml,10 min,漂洗封片,荧光显微镜下随机选取 5 个视野观察并照相。

1.2.5 Western blot 检测 Cx43 表达 转染 48 h 取出细胞,RIPA 裂解液裂解,提取总蛋白。取 25 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,半干法转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入小鼠抗 Cx43 或小鼠抗 β-actin,4 ℃过夜,PBST 漂洗后入 HRP 标记二抗室温 4 h,ECL 试剂盒显色。

1.2.6 谷氨酸浓度测定 大鼠原代 ASTs 转染质粒后接种于 24 孔板(玻片),用 DMEM/F12 + 10% 胎牛血清 + 100 μg/ml G418 培养至 7~14 d,换为无血清培养基 DMEM/F12 培养 24 h,取上清液。按照谷氨酸 ELISA 定量试剂盒说明书检测谷氨酸浓度,实验重复 4 次,每次每组 3 个复孔。取出玻片,DAPI 0.5 μg/ml,染色 10 min,荧光显微镜下随机选取 5 个视野照相并计数。

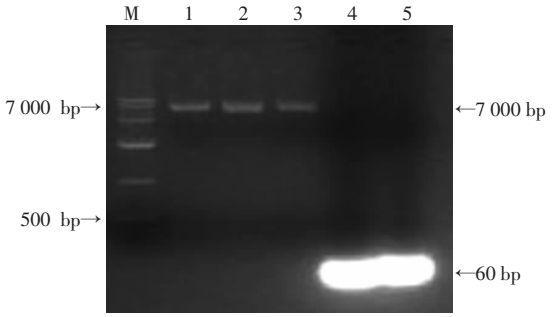
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析或独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 重组质粒 pGCsi. U6. neo. GFP-Cx43 的构建与鉴定

将寡核苷酸片段退火后(图 1)与经过双酶切的干扰载体 pGCsi. U6. neo. GFP 片段连接、转化细菌,小量提取可疑阳性菌的重组质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳分析表明,所出现的条带的相对分子质量大小与理论值相符,重组后的质粒由上海 Invitrogen 公司完成测序鉴定。可疑阳性重组质粒测序结果表明,目的基因正确插入载体,并保持正确的读码框。

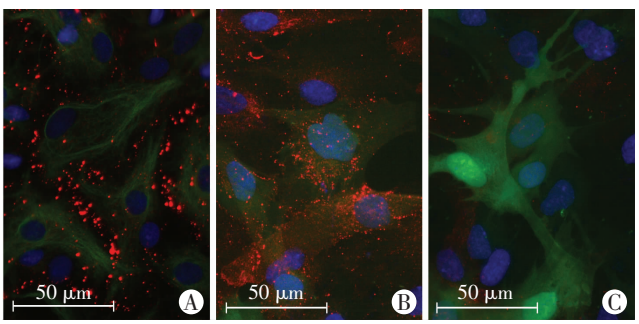


M:DNA 标准;1:空载体;2:插入干扰片段的质粒;3:插入对照片段的质粒;4:退火后的干扰片段;5:退火后的对照片段

图 1 干扰质粒的构建电泳结果

2.2 免疫荧光检测转染干扰质粒 48 h 后星形胶质细胞 Cx43 蛋白表达变化

因干扰载体带有绿色荧光蛋白的标签,成功转染质粒的细胞表达绿色荧光蛋白。荧光显微镜下观察转染干扰质粒组有绿色荧光蛋白表达的细胞几乎无 Cx43 表达(红色荧光),而转染对照质粒组可见 GFP 表达的细胞仍有 Cx43 表达,野生型组的 ASTs(GFAP 标记),其胞膜周围有大量 Cx43 表达(图 2)。



A:野生型组;B:转染对照质粒组;C:转染干扰质粒组

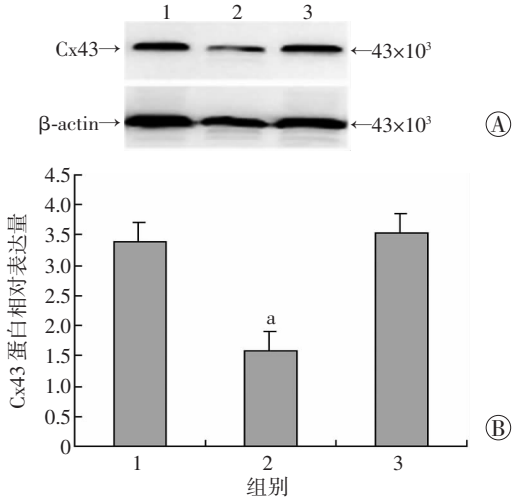
图 2 转染干扰质粒 48 h 免疫荧光检测 Cx43 蛋白的表达

2.3 Western blot 检测转染干扰质粒 48 h 后星形胶质细胞 Cx43 蛋白表达变化

Western blot 检测(图 3)显示,转染 48 h 后转染干扰质粒组 Cx43 表达明显下降($P<0.05$)。转染对照质粒组与野生型组相比,无明显差异($P>0.05$)。

2.4 转染干扰质粒对星形胶质细胞释放谷氨酸的影响

2.4.1 Cx43 干扰质粒转染效率及细胞数统计　转染干扰质粒 7 d 后,将表达绿色荧光蛋白的细胞视为转染成功细胞。转染干扰质粒组与转染对照质粒组细胞总数无明显差异($P>0.05$),即 Cx43 干扰后对细胞存活无明显影响,细胞转染效率为 60% ~70%,满足后续实验要求。



1:野生型组;2:转染干扰质粒组;3:转染对照质粒组;A: Western blot 检测结果;B:Cx43 蛋白相对表达量　a: $P<0.05$,与野生型组和转染对照质粒组比较

图 3　转染干扰质粒 48 h Western blot 检测 Cx43 表达

2.4.2 转染 Cx43 干扰质粒后对星形胶质细胞释放谷氨酸的影响　转染干扰质粒 7 ~ 10 d,用谷氨酸定量试剂盒检测星形胶质细胞谷氨酸基础释放量,转染干扰质粒组测得上清液中谷氨酸浓度为(6.393 ±0.250)nmol/L,明显低于转染对照质粒组(7.411 ±0.320)nmol/L($P<0.05$),说明 Cx43 表达下调后星形胶质细胞释放谷氨酸减少。

3 讨论

在神经系统中,Cx43 由 ASTs 表达,是 ASTs 的主要连接蛋白,6 个 Cx43 分子寡聚化形成半通道。与缝隙连接不同,半通道是细胞内与细胞外交流的非特异性直接通道,生理状态下较少开放[3]。当细胞外液中钙离子浓度降低、胞膜正性电位、奎宁及奎尼丁作用、活性氧自由基增加时能导致半通道开放频率增加,而胞外高钙、胞膜负电位、胞内低 pH、多价阳离子(Co^{2+}、Ni^{2+}、Mg^{2+}、La^{3+} 和 Gd^{3+})、缝隙连接阻滞剂 CBX 等则抑制半通道开放[4-5]。

谷氨酸是脑内主要的兴奋性神经递质, ASTs 在维持脑内谷氨酸处于正常水平发挥了重要作用,是突触传递正常与神经元存活的保证。ASTs 中储存有大量的谷氨酸,并在某些条件下释放[6]。目前认为,谷氨酸有可能多种释放的途径,主要有:①谷氨酸反向转运子[7];②阴离子通道释放[8];③钙离子依赖性胞吐释放[9];④功能性半通道介导的释放[10]。但对于半通道释放谷氨酸的机制研究,以往实验多采用半通道阻滞剂的方法来观察[11],具有一定的局限性,通道阻滞剂药物毒性大,不适合细胞长期培养,而 Cx43 基因敲除小鼠因难以存活不易获得,因此我们采取了 Cx43 基因沉默的方法。

RNA 干扰是指与靶基因同源的双链 RNA 诱导的特异转录后基因沉默现象。其作用机制是双链 RNA 被特异的核酸酶降解,产生干扰小 RNA(siRNA),这些 siRNA 与同源的靶 RNA 互补结合,特异性酶降解靶 RNA,从而抑制、下调基因表达。RNA 干扰已经发展成为基因治疗、基因结构功能研究的快速而有效的方法[12]。本实验所构建的真核表达载体即是针对大鼠 Cx43 基因的 shRNA 片段,合成 siRNA 寡核苷酸,并通过电转方法将质粒成功转染到原代 ASTs,该干扰载体对 ASTs 的 Cx43 干扰率达到 70%,表明本实验成功构建 Cx43 siRNA 表达载体。此外,实验用原代 ASTs 进行转染实验,与细胞系不同,原代培养细胞很难达到高转染率,所以采用电转染的方法以提高转染效率。但因电压刺激,电转后细胞的死亡率较高。实验依照 Lonza 公司说明书应用 Nucleofector® I Device T-020 程序转染细胞后,发现细胞死亡率极高,经过条件优化摸索,采用 A-33 程序,不仅提高了转染效率,也大大降低了细胞死亡率,得到了理想的实验结果。

在生理情况下,生理性刺激引起突触前神经元释放神经递质至突触间隙,可作用于突触周围星形胶质细胞上的相应受体,导致适量的谷氨酸从 ASTs 释放,作用于突触后膜上的谷氨酸受体,从而调节神经元的兴奋性及突触传递。而在神经炎症、创伤、局部缺血等病理条件下,ASTs 半通道开放增加,可引起神经元的损伤[13]。本研究已证实半通道释放谷氨酸,而其开放增加必然导致细胞外谷氨酸浓度过高,谷氨酸产生的兴奋性毒性使细胞损伤加剧,提示半通道介导的谷氨酸释放可能是病理条件下神经元损伤的重要原因。

本研究采用基因沉默的方法直接抑制了 Cx43 蛋白表达,证实 Cx43 下调后 ASTs 谷氨酸释放减少。但 Cx43 下调后,不仅半通道形成减少,Cx43 介导的缝隙连接形成也减少,因缝隙连接能协同相邻细胞的电活动及代谢,所以缝隙连接功能的变化也可能影响了 ASTs 释放谷氨酸,其具体机制有待于我们做进一步的研究。

综上所述,本实验通过构建Cx43的干扰载体,成功转染至原代培养ASTs,达到了较好的抑制效果。将Cx43干扰质粒转染至ASTs,其释放谷氨酸明显减少,提示Cx43介导的半通道是谷氨酸释放的途径之一,并为研究病理条件下的神经元损伤的机制提供了新的思路。

参考文献:

[1] Bruzzone R, Hormuzdi S G, Barbe M T, *et al*. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(23): 13644-13649.

[2] Herrero-Gonzalez S, Valle-Casuso J C, Sanchez-Alvarez R S, *et al*. Connexin43 is involved in the effect of endothelin-1 on astrocyte proliferation and glucose uptake[J]. Glia, 2009, 57(2): 222-233.

[3] Bennett M V, Contreras J E, Bukauskas F F, *et al*. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate [J]. Trends Neurosci, 2003, 26(11): 610-617.

[4] Saez J C, Contreras J E, Bukauskas F F, *et al*. Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS[J]. Acta Physiol Scand, 2003, 179(1): 9-22.

[5] Contreras J E, Sanchez H A, Eugenin E A, *et al*. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(1): 495-500.

[6] Ye Z C, Ransom B R, Sontheimer H. (1R, 3S)-1-Aminocyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid (RS-ACPD) reduces intracellular glutamate levels in astrocytes[J]. J Neurochem, 2001, 79(4): 756-766.

[7] Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids[J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(11): 462-468.

[8] Kimelberg H K, Rutledge E, Goderie S, *et al*. Astrocytic swelling due to hypotonic or high K^+ medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(3): 409-416.

[9] Parpura V, Haydon P G. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(15): 8629-8634.

[10] Ye Z C, Wyeth M S, Baltan-Tekkok S, *et al*. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release[J]. J Neurosci, 2003, 23(9): 3588-3596.

[11] Jiang S, Yuan H, Duan L, *et al*. Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model[J]. Brain Res, 2011, 1392: 8-15.

[12] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002, 26(2): 199-213.

[13] Karpuk N, Burkovetskaya M, Fritz T, *et al*. Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity[J]. J Neurosci, 2011, 31(2): 414-425.

(**收稿**:2012-02-21;**修回**:2012-03-04)

(编辑 吴培红)

(上接700页)

获取良好的冠状动脉CTA图像是诊断CAF的必要条件。针对我科CT扫描仪特点,将心率控制在70次/min以下,采用快速容积扫描,消除心脏运动对图像质量的影响。图像重建时,选择合适的周期相位图像,运用多种重建技术如容积重建(VR)、最大密度投影(MIP)和多平面重建(MPR)进行重建。重建时重点观察CAF的起源动脉、瘘管的走形及粗细、瘘管与周围心腔、大血管的关系以及最终注入动脉[4]。本例采用上述扫描方法及图像后处理技术,清晰显示CAF起源于左冠状动脉主干,迂曲走形于肺动脉起始部左、前侧壁旁,然后注入肺动脉起始部,瘘管管径与左冠状动脉前降支近中段管径接近、管腔粗细较均匀。

冠状动脉-肺动脉瘘需与冠状动脉起源于肺动脉畸形(anomalous origin of coronary artery from thepulmonary artery, ACAPA)鉴别。CAF属于冠状动脉终止异常,ACAPA属于冠状动脉起源异常。全面分析冠状动脉起源、走行、分布有助于鉴别诊断,其主要鉴别点在于与肺动脉相连的冠状动脉是否由多个细小分支逆行充盈,否则为冠状动脉-肺动脉瘘[5]。此例患者左、右冠状动脉主干分别起自左、右冠状窦,瘘管起自左冠状动脉主干,终止于肺动脉起始部,未见逆行充盈现象。

综上,此病具有潜在危险性,即使无临床症状,也应及早诊治。冠状动脉造影为诊断冠状动脉瘘的"金标准",但其有创、费用较高、对小瘘口、多瘘口等复杂异常难以准确诊断,故不作为首选。冠状动脉CTA诊断CAF具有独特优势,是精确、快速、可靠而直观的无创性检查方法,与冠状动脉造影呈完全相关[6-7]。本例患者运用冠状动脉CTA检查诊断为左冠状动脉主干-肺动脉瘘,与其后冠状动脉造影检查结果相符。

参考文献:

[1] 郑丽丽, 杨有优, 谢洪波, 等. 64层螺旋CT对冠状动脉瘘诊断的临床价值[J]. 临床放射学杂志, 2009, 28(3): 330-333.

[2] 洪李锋, 马业新. 冠状动脉瘘的研究进展[J]. 内科急危重症杂志, 2010, 16(3): 154-156.

[3] Rudraiah L, Dhar G, Thatai D. Acquired coronary cameral fistula—a report of two cases[J]. Int J Cardiol, 2008, 123(2): e40-e42.

[4] 戚跃勇, 邹利光, 陈轶, 等. 冠状动脉瘘影像诊断与介入治疗[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(10): 950-952.

[5] 王向日, 谢建功, 全凌峰, 等. 成人先天性冠状动脉瘘的临床及X线诊断分析[J]. 南华大学学报:医学版, 2007, 35(1): 110-112.

[6] Kang W C, Moon C 2nd, Ahn T H, *et al*. Identifying the course of a coronary-bronchial artery fistula using contrast-enhanced multi-detector row computed tomography[J]. Int J Cardiol, 2008, 130(3): e125-e128.

[7] Lubarsky L, Jelnin V, Hecht H. Right coronary artery fistula-evaluation by multidector computed tomographic angiography[J]. Clin Cardiol, 2009, 32(7): E6-E7.

(**收稿**:2012-03-08;**修回**:2012-03-16)

(编辑 汪勤俭)