DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.003

大鼠脊髓缺血损伤后β管蛋白及其 mRNA的表达变化*

杨青峰** 龙在云 曾 琳 廖维宏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室) 重庆, 400042

提 要 目的: 研究大鼠脊髓缺血损伤后β管蛋白及其 mRNA的表达变化。方法: 利用β管蛋白的单抗及地高辛标记 cDNA探针,借助于免疫组化、原位杂交、图像分析等方法,对腹主动脉阻断(肾动脉上)30 min后再灌流不同时间点大鼠缺血损伤脊髓神经元β管蛋白及其 mRNA的变化进行了定性定量研究。结果: SCI后β管蛋白及 mRNA均明显降低,3 d达最低水平,7 d有所恢复,到 14 dβ管蛋白 mRNA恢复到伤前,而β管蛋白仍维持低水平。结论: β管蛋白破坏,可能与 Ca^{2+} 激活的中性蛋白酶有关;β管蛋白与其 mRNA的分离,提示β管蛋白的减少,除转录水平减少所致翻译产物降低外,破坏增多亦是可能的原因。

关键词 脊髓损伤;β管蛋白;β管蛋白 mRNA;大鼠
中图法分类号 R651.2

神经细胞有一个长的轴突和多数短的分枝的树突,神经细胞的这种极性具有明显的功能意义,维持这种极性有赖于神经细胞骨架。微管是神经细胞的主要骨架成份之一,它同神经微丝、微丝及其相关蛋白共同构成神经细胞的骨架系统。各种原因所致的神经损伤或疾病,都可能导致神经细胞骨架的异常[1,2]。研究脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)后神经细胞骨架的变化,有助于对 SCI机制的探讨,并为 SCI的防治提供可能的途径。本实验仅从β管蛋白出发,利用β管蛋白的单抗及其 cDNA探针,研究缺血损伤后脊髓神经元β管蛋白表达的变化。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物模型的制备[3]

Wistar大鼠 30只,雌雄不拘,体重 200 g左右,随机分成 5组,每组 6只。无菌条件下行 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉,背部左侧肋缘下正中线旁 0.5 cm纵切口,腹膜后暴露腹主动脉,于肾动脉上阻断腹主动脉 30 min后再灌流,制备再灌流缺血模型。分别于阻断前(对照),再灌流后 1、3、7、14 d,经心主动脉插管,0.02% DEPC-PBS冲洗,0.02% DEPC-4%多聚甲醛灌注固定,取腰 2段脊髓后固定,冰冻切片,-70℃冻存备用。

1.2 β管蛋白 cDNA的制备及地高辛标记

含β管蛋白 cDNA片段的 pT_2质粒[4](美国霍普金斯大学医学院 Cleveland教授惠赠)转染 JM103大肠杆菌,37℃ LB培养基扩增,碱裂解法抽提,HindⅢ(宝灵曼公司)酶切,1.2%低融点琼脂糖分离,酚氯仿抽提,乙醇沉淀得到纯化的β管蛋白 cDNA(1.7 kb)[5],按地高辛标记与检测试剂盒(宝灵曼公司)说明书标记β管蛋白 cDNA。将标记样品和对照点在 NC膜上按说明书进行地高辛标记效率的检测。标记 cDNA-20℃冻存备用。

1.3 免疫组化[6]

损伤不同时相点腰段脊髓组织冰冻切片,利用β管蛋白的单抗(Sigma)进行常规免疫组织化学染色(ABC-AEC法)。ABC试剂盒为 Vector产品,AEC试剂盒为重庆医科大学病生教研室提供。并设立阳性对照及阴性对照。

1.4 原位杂交[7]

损伤不同时相点腰段脊髓组织冰冻切片,复温后依次经 5 mol/L $MgCl_2$-0.1 mol/L PBS(pH7.4)冲洗,37℃ 1 μl/ml蛋白酶 K(宝灵曼公司)消化 20 min,0.1 mol/L甘氨酸-$MgCl_2$-PBS终止消化,4%多聚甲醛固定 20 min,再用含 $MgCl_2$的 PBS漂洗,梯度酒精脱水,37℃预杂交(预杂交液 50%去离子甲酰胺,5× SSC,5× Denhardt's液,2% SDS,1 μg/μl变性鲑精 DNA)1 h,42℃杂交(上述预杂交液中加入 10%硫酸葡聚糖及 1 ng/μl的地高辛标记β管蛋白 cDNA)20 h,再依次经含 50%去离子甲酰胺 1 mmol/L EDTA的 2× SSC、1× SSC、0.5× SSC漂洗,室温 1∶1000的标记碱性磷酸酶的抗地高辛抗体 2 h,经缓冲液漂洗后,37℃ NBT/X磷酸盐(4.5 μl NBT+ 3.5 μl X磷酸盐+ 1 ml Buffer 3)显色 10 h,1× TE终止反应,1%甲基绿复染,脱水透明 DPX封片。整个过程均在无菌条件下进行。

1.5 图像分析

利用德国 Leica MD20真彩图像分析仪,对免疫组化、原位杂交结果进行图像分析处理(每组计数 60个神经元),得不同时相点损伤神经元平均光密度(D_A值)。

2 结果

2.1 β管蛋白 cDNA片段的制备及标记效率的检测

图 1示琼脂糖凝胶电泳① pT_2,② pT_2/HindⅢ,箭头示β

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270240
** 杨青峰,男,33岁,助理研究员,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

管蛋白 cDNA(1.7 kb);③ Marker: Lamda DNA/EcoRⅠ+ HindⅢ。β管蛋白 cDNA地高辛标记效率的检测结果表明,标记β管蛋白 cDNA高出对照一个数量级为 10 ng/μl

2.2 免疫组化及原位杂交图像分析结果

2.2.1 免疫组化 正常脊髓各层神经细胞胞浆,有β管蛋白单抗的强烈染色见图 2A 脊髓缺血损伤后 1 d,神经元染色明显减低,伤后 3 d,染色强度最低,见图 2B,7 d有所恢复,14 d仍维持较低水平,见图 2C。

2.2.2 原位杂交结果 正常脊髓各层细胞,神经元胞浆明显染色呈深蓝色颗粒状,胞核不染,见图 3A 损伤后 1 d染色明显减低,3 d达最低,见图 3B,7 d接近伤前,见图 3C。

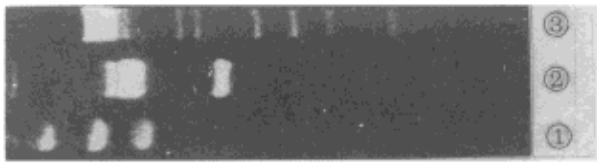


图 **1** 琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Agarose electriphoresis

① pT2,② pT2/HindⅢ, arrow: β tubulin cDNA (1.7 kb),③ Marker: Lamda DNA/EcoRⅠ+ HindⅢ

图 **2** 大鼠缺血脊髓β管蛋白免疫组化反应(**ABC**法)

2A: 手术对照(ABC× 100),2B 缺血损伤 3 d(ABC× 200),2C 缺血损伤 14 d(ABC× 200)。脊髓腹角,可见大运动神经元及中小神经元不同程度的染色

Fig 2 β tubulin immunohistochemical reactivity in rat ischemic spinal cords

2A: sham-operated control (ABC× 100), 2B: 3 d after ischemia (ABC× 200). 2C: 14 d after ischemia (ABC× 200). Ventral horns: motoneurons, medium-size and small neurons stained with different degree.

图 **3** 大鼠缺血脊髓β管蛋白 **mRNA**原位杂交组织化学反应(地高辛标记法)

3A: 手术对照(ABC× 100),3B 缺血损伤 3 d(ABC× 200),3C 缺血损伤 14 d(ABC× 100)。腹角及中间带各型神经元均有染色

Fig 3 ***In situ*** **detection of β tubulin mRNA in rat ischemic spinal cords with DIG-β tubulin cDNA probe**

3A: sham-operatedcontrol (ABC× 100), 3B 3 d after ischemia (ABC× 200), 3C: 14 d after ischemia (ABC× 100), Ventral horns and intermediate zones: different neurons stained with different degree.

方差分析结果显示,不同时点之间β管蛋白,β管蛋白 mRNA变化差异显著($P < 0.01$),但两者变化并非一致。伤后 1 d,β管蛋白及其 mRNA都同时降低,3 d降到最低水平,7 d有所恢复,14 d β管蛋白 mRNA基本恢复到伤前,而β管蛋白仍维持较低水平,见图 4

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

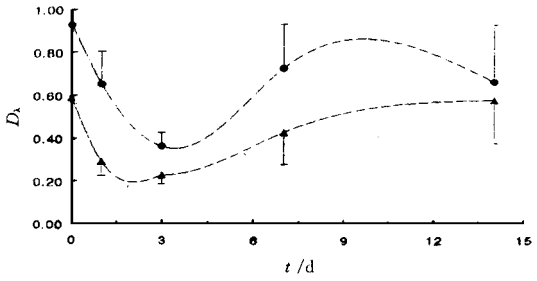


图 4　大鼠 SCI后不同时点神经细胞β管蛋白及其 mRNA的变化

●'β管蛋白,'△'β管蛋白 mRNA

Fig 4　Changes of β tubulin and its mRNA of ischemic neurons after SCI of rats

●'β Tubulin,'△'β Tubulin mRNA

3　讨论

细胞骨架蛋白作为重要的结构和功能蛋白,在中枢神经系统损伤研究中受到了越来越多的重视。各种原因所致的中枢神经系统的损伤,往往导致神经细胞骨架的破坏。而神经细胞骨架的破坏势必影响到神经细胞的结构和功能,严重者将导致神经细胞的变性坏死[1,2]。我们从β管蛋白出发,利用β管蛋白单抗及 cDNA探针,借助于免疫组化,原位杂交和图像分析方法,从蛋白和核酸水平上,对大鼠腹主动脉再灌流所致 SCI后损伤脊髓神经元β管蛋白及其 mRNA进行了定性定量研究。结果表明, SCI后β管蛋白及其 mRNA都明显减低,伤后 3 d达最低, 7 d有所恢复, 14 dβ管蛋白 mRNA基本恢复到伤前,而β管蛋白仍维持较低水平。β管蛋白及其 mRNA的减低,表明β管蛋白转录受阻,翻译减少; SCI 7 d后β管蛋白及其 mRNA的分离,表明 SCI后期转录恢复后仍有其它因素影响到β管蛋白的表达,可能合成减少,可能破坏增多。参与继发性损伤的各种机制都可能影响到神经细胞骨架蛋白成份的表达,如兴奋性氨基酸、Ca^{2+} 失衡[8]。兴奋性氨基酸受体拮抗剂、Ca^{2+} 通道阻滞剂[9]、Ca^{2+} 激活的中性蛋白酶(Calpain)抑制剂[10]等都有助于 SCI神经元的保护和神经功能的恢复,它们的作用可能直接或间接通过保护神经细胞骨架发挥作用。

参考文献

1　Tetzlaff W, Leonard C, Krekoski C A *et al*. Reductions in motoneuronal neurofilament synthesis by successive axotomies: a possible explanation for the conditioning lesion effect on axon regeneration. Exp Neurol, 1996; 139: 95

2　Shelanshi M L, Frappier T, Georgieff I *et al*. Cytoskeletons of central and peripheral neurons. J Neurol Sci, 1994; 124(supl): 33

3　杨青峰,龙在云,曾　琳等.大鼠脊髓缺血损伤后中间丝改变的研究.神经科学, 1995; 2(Sup): P15

4　Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J *et al*. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by α and β tubulin mRNA. Nature, 1981; 289: 650

5　Sambroob J, Fritsch E F, Manistis T.分子克隆实验手册.北京:科学出版社, 1992: 16~34

6　杨青峰,廖维宏,丁珍明等.胞体型神经微丝单抗的研制.第三军医大学学报, 1995; 17(1): 61

7　McCabe J T, Pfaff D W. *In situ* hybridization: a methodological guide. In: Conn P M ed. Methods in neurosciences, vol I: Gene Probes. New York: Academic Press Inc, 1989: 98~104

8　Tomimoto T, Yanagihara T. Immunoelectron microscopic study of tubulin and microtubule-associated proteins after transient cerebral ischemia in gerbils. Acta Neuropathol, 1992; 84: 394

9　Saimpson P B, Challiss R A J, Naborski S R. Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. TINS, 1995; 18: 299

10　Li Z H, Hogan E L, Banik N L. Role of calpain in spinal cord injury: Increased mealpain immunoreactivity in spinal cord after compression injury in the rat. Neurochem Int, 1995; 27(4/5): 425

(收稿: 1997-03-04;修回: 1998-01-21)

(编辑　汪勤俭)

Changes of tublinβ and its mRNA expression in injured neurons after spinal cord ischemia in rats

Yang Qingfeng, Long Zaiyun, Zeng Lin, Liao Weihong (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract　Objective: To observe the changes of tublinβ and its mRNA expression in injured neurons af-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

ter spinal cord ischemia (SCI) in rats. **Methods:** After 30 min-occlusion and reperfusion of peritoneal aorta above renal artery, the qualitative and quantitative changes of tublinβ and its mRNA expression in injured neurons were determined with immunohistochemistry, in situ hybridization and image analysis. **Results:** Tublinβ and its mRNA expression became lower after SCI, reached the lowest level on the 3rd day and began to restore on the 7th day. On the 14th day after SCI, the mRNA expression returned to normal but tublinβ remained lower. **Conclusion:** Degradation of tublin might be associated with Ca^{2+}-activated neutral proteinase. The separation of tublinβ from its mRNA indicates that tubulinβ is reduced by increased degradation in addition to its transcription and translation.

Key words spinal cord injury; tubulinβ; tublinβ mRNA; rat

帕金森病基因治疗的实验研究*

An experimental study of Parkinson's disease by gene therapy

刘 俊** 蔡文琴*** 张可成 (第三军医大学附属新桥医院神经外科) 重庆, 400037

帕金森病(PD)是一种常见的中枢神经系统退化性疾病,其治疗方法很多,但都疗效短且存在副作用。因此,应寻找更为可靠有效的治疗方法。利用移植基因工程细胞成为目前寻找治疗 PD最有效方法的突破口。多巴胺(DA)合成的主要调节因素是酪氨酸羟化酶(TH),研究发现 PD病人的 THmRNA和 TH含量明显低于正常人。因此,提供 TH有助于增加 DA的合成而对 PD起治疗作用。目前,国内外均采用单基因(如 TH基因或神经营养因子等)进行 PD的基因治疗研究,取得了不同程度的效果。由于引起 PD的因素很多,单靠给予某一种基因或因子所起的效果有限,同时应用两种或两种以上的基因治疗 PD可能具有更好的疗效。生长相关蛋白质(GAP-43),是一种位于神经元突触前膜上的磷酸蛋白质,对神经纤维生长、发育、再生以及突触功能的维持和神经递质释放起着重要作用。目前国内外尚未见将 GAP-43用于 PD的治疗研究。据此,我们应用重组 DNA技术、细胞培养、脑移植技术等研究方法,将 TH及 GAP-43基因构建入逆转录病毒载体中,再将此重组 DNA转染培养的星形胶质细胞后移植入 PD大鼠脑内,以观察 GAP-43是否能对 PD起到一定的治疗作用,同时了解 GAP-43是否能够增强 TH对 PD的治疗作用。结果如下:① 利用重组 DNA技术,构建了 pN_2ATH-3及 pN_2AGAP-43两种重组逆转录病毒表达质粒。用电穿孔方法将 pN_2ATH-43及 pN_2AGAP-43重组质粒转染包装细胞 PA317,筛选 G418抗性细胞克隆,并用 NIH3T3细胞测定病毒滴度,病毒颗粒效价大约在 5.95×10^{4}~3.30×10^{5} cfu/ml;② 制备了培养的星形胶质细胞,将病毒上清成功地感染了星形胶质细胞,建立了能表达 TH-3蛋白、GAP-43蛋白的胶质细胞模型:胶质细胞/TH-3胶质细胞/GAP-43;③ 将胶质细胞/TH-3胶质细胞/GAP-43移植入 PD大鼠伤侧纹状体内,术后在不同时间内检测 PD大鼠旋转行为的变化。发现 TH胶质细胞移植组大鼠旋转行为改善明显,GAP-43-胶质细胞移植组动物旋转行为无明显改善。但 TH/GAP-43-胶质细胞联合移植组动物旋转行为改善较 TH-胶质细胞移植组更为明显,提示 GAP-43具有促进 TH疗效的作用。④ 术后两个月检测移植区 DA及 DOPAC的含量有所增加,提示移植细胞在局部已分泌 DA,促进了 PD大鼠症状的改善。总之,本实验首先采用 GAP-43与 TH基因联合的双基因表达形式,采用培养的星形胶质细胞作为基因工程细胞,成功地进行了治疗 PD的实验研究,扩大了目的基因和工程细胞的来源,为 PD的治疗开辟了新的方法和途径。当然,进一步探讨其它的基因治疗 PD的方法,以期寻找更好、更有效的治疗途径是我们今后要做的工作。

关键词 基因治疗;帕金森病;GAP-43;TH-3;脑组织移植

中图法分类号 R745.7

(收稿: 1997-12-03;修回: 1998-01-06)

(编辑 冷怀明)

* 国家自然科学基金资助项目 No, 39370686

** 刘 俊,男,31岁,主治医师,博士研究生 *** 基础医学部组织学与胚胎学教研室 重庆, 400038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net