

· 基础研究 ·

大鼠中枢神经系统体内基因转染及功能蛋白表达的实验研究

李琦, 曾炳芳, 徐建广, 孔维清

(上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233)

【摘要】 目的:通过实验进一步探讨局部应用神经生长因子的途径和方法。**方法:**24 只 SD 大鼠共分为实验组和对照组(每组 12 只)。腹腔麻醉后, 俯卧位切开胸椎椎板。用微量注射器, 分别对其进行经 DOTAP 转染的含报告基因质粒(实验组)和空载体-脂质体粒(对照组)的鞘内直接注射。术后 2 周处死动物, 取相应节段脊髓组织行 RT-PCR 及免疫组化检测。**结果:**免疫组化发现, 在实验组脊髓组织胶质细胞及神经元中可见 beta-半乳糖苷酶阳性染色。同样, 在相同组织 RT-PCR 检测到 Lac Z mRNA。而对照组无上述阳性发现。**结论:**外源性基因于体内神经组织中有效转染是目前治疗脊髓损伤的热点。通过上述技术将特定神经生长因子输入局部损伤区域, 有助于促进中枢神经再生, 避免早期继发损伤。

【关键词】 基因; 转染; 脊髓损伤; 注射, 脊髓; 动物实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.01.013

Transfection of exogenous gene: Lac Z into spinal cord of SD rats and its protein expression; an in vivo study LI Qi, ZENG Bing-fang, XU Jian-guang, KONG Wei-qing. Shanghai No.6 People's Hospital of Jiaotong University, Shanghai 200233, China

ABSTRACT Objective: To explore a way of the gene therapy for acute spinal cord injury (ASCI) by vivo transfection of exogenous gene into spinal cord tissue. **Methods:** Twenty-four rats of SD were divided into experiment group and control group (each group had 12 rats). After anaesthesia by abdominal cavity, lamina of thoracic vertebra of all rats were cut-open in prone position. Complex of plasmid and report gene-Lac Z, and plasmid without report gene-Lac Z were respectively injected into cavum subdural of SD rats of experiment group and control group by cation liposome (DOTAP) encapsulation. The rats were killed at the 2nd week after operation, spinal cord tissue of injected segments were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry. **Results:** In experiment group, positive staining of β -galactosidase can be clearly observed in neuron and glia cell of rat's spinal cord by immunohistochemistry detection. Lac Z mRNA in same area was also detected by RT-PCR. But, in control group, no above-mentioned positive results were found. **Conclusion:** Effective transfection of exogenous gene in vivo into spinal cord is a new hot spot for treatment of SCI. Thus certain nerve growth factor imput partly area of spinal cord injury can promote central nerve regrowth and avoid early secondary injury.

KEYWORDS Genes; Transfection; Spinal cord injuries; Injections, spinal; Animal experimentation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(1):47-50 www.zggssz.com

脊髓损伤不仅引起受损部位的神经细胞损伤, 还通过由复杂机制引发的继发损伤造成严重的肢体功能障碍, 大量基于动物实验的研究揭示了继发损伤的病理机制^[1]。神经保护治疗方案旨在减少继发损伤, 最大限度改善肢体功能。一些神经因子如胶质源性神经营养因子 (GDNF), 神经转化因子- β 1

(TGF- β 1) 等均具有神经保护和神经营养作用。应用神经营养因子可能是治疗脊髓损伤的有效方法之一, 虽然输注外源性神经营养因子具有治疗效果, 但其半衰期短, 分子量大, 费用昂贵及难以通过血脑屏障等缺陷均限制了其临床应用。近年来, 随着转基因技术的快速发展, 许多技术已应用于脊髓损伤的治疗中。基因转染可导致全身或局部的基因表达, 其在中枢神经系统的表达已经受到越来越多的关注。应用单纯疱疹病毒及腺病毒载体已经可以完成有效的基因转染, 但免疫反应及癌变可能仍限制了其在临床的广泛应用。因此十分有必要建立一种安全有效的非病毒介导的转染体系, 一些研究已经开始涉及

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 30973022); 上海市卫生局课题面上项目(编号: 2011348); 上海第六人民医院院级课题(编号: 2011-1320); 上海交通大学医学院科研基金(编号: YZ1060)

Fund programs: Supported by National Natural Science Foundation of China (General Program) (No. 30973022)

通讯作者: 李琦 E-mail: drlee12@sjtu.edu.cn

但体内试验较少^[2]。阳离子脂质体转染质粒目前已经成为转染质粒 DNA 的标准方法^[3], 中枢神经系统外的体内试验已取得了一些成果^[4]。在中枢神经系统中, 相关研究较少且结果各异^[5]。本研究中, 通过阳离子介导将含报告基因的质粒(Lac Z cDNA)^[6]导入大鼠脊髓组织, 观察功能蛋白的表达情况, 以进一步优化转染体系。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与材料 24 只 SD 大鼠, 体重 340~360 g (由中科院上海实验动物中心提供), 分为两组(实验组和对照组, 每组 12 只)。分别将基因质粒及空质粒由脂质体 DOTAP 转染经鞘内注射到实验组和对照组大鼠体内。阳离子转染剂 DOTAP 购自罗氏公司。感受态大肠杆菌 E.coli DH5 α , 限制性内切酶 Hind III 和 Xba-I 购自 Takara 公司。载体基因(pcDNA3)图谱由 Invitrogen (Life Technologies, USA) 公司提供。

1.2 分子扩增和质粒提取 用含报告基因(Lac Z)的表达载体转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑选抗氨苄青霉素阳性克隆进行小量扩增、质粒抽提。构建的 pcDNA3-Lac Z 以限制性内切酶 HindIII、Xba-I 行双酶切、电泳并行基因测序。鉴定正确后碱裂解法大量制备。

1.3 质粒 DNA、DOTAP 脂质体混合物的制备 用于转染的双链 DNA 须先经过纯化处理, 以去除内毒素减少细胞毒性。用 HBS 缓冲液(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 将 5 μ g DNA 稀释至浓度为 0.1 μ g/ μ l 的溶液, 并使最终体积为 50 μ l。同样在另一试管中加入 30 μ l DOTAP, 以 HBS 缓冲液稀释至总体积为 100 μ l。将经稀释的核酸溶液(50 μ l)注入 HBS 稀释的 DOTAP(100 μ l)中, 轻柔振荡数次充分混匀转染混合物。实施转染前, 先将混合物置于 15~25 $^{\circ}$ C 静置 10~15 min。

1.4 鞘内注射 术前用戊巴比妥钠(45 mg/kg)对两组 SD 大鼠进行腹腔注射麻醉。切除 T₁₁ 椎板暴露其下的胸段脊髓。然后用显微剪打开 T₁₁ 与 T₁₂ 间的黄韧带。用微量注射器的针头先在脊髓硬膜上戳一小洞(此时应有脑脊液由洞内漏出), 将针头小心插入大鼠的蛛网膜下腔, 实验组缓慢注入事先准备好的混合溶液, 对照组注入空载体-脂质体混合物。注意: 注射时间不少于 1 min。为避免大鼠颅内压的升高, 注药前可先抽出相同体积的脑脊液。术后以 5-0 缝线逐层关闭切口。常规抗炎处理。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 毒副作用 术后观察动物行为表现、进食及睡眠习惯。每隔 3 d 对其进行称重并记录以了解其

生长发育情况。

1.5.2 酶切与基因测序 对构建完成的基因质粒 pcDNA3-Lac Z 以限制性内切酶 HindIII、Xba-I 行双酶切、电泳并以 T7 通用引物进行基因测序。以验证相关质粒构建的正确性。

1.5.3 免疫组化 术后 14 d, 注射过量戊巴比妥钠(60 mg/kg, i.p.) 处死大鼠, 以 300 ml 冰 4% 0.01 M PBS (pH 7.4) 多聚甲醛固定后, 用 150 ml 生理盐水经颈动脉灌注。切取 1.5 cm 脊髓组织, 包括对照组、实验组注射点近端及远端组织组(分别为近端组织组和远端组织组)以相同固定液固定后过夜。转移至含 30% 蔗糖的 0.01 M PBS (pH 7.4) 溶液中冷冻防护。将标本包埋于组织冷冻介质中, 切取 20 μ m 层厚切片并置于静电载玻片上。在显微镜下观察 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-乳糖苷(X-gal)的组织染色来评价转染效率。计算并比较各组 β -半乳糖苷酶的阳性染色面积。以图像分析软件行定量分析。

1.5.4 RT-PCR 检测 取 1~2 g 液氮冷冻的两组脊髓组织置入组织匀浆器, 加冰预冷的 TRIZOL 试剂 1~2 ml, 在冰浴中迅速匀浆 15~30 s, 充分研碎组织。匀浆液移至 1.5 ml EP 管充分混匀, 室温静置 5 min。加入 200~400 μ l 氯仿摇匀 15 s, 室温静置 2~3 min。4 $^{\circ}$ C 以 12 000 g 高速离心 15 min; 取上层至一新 EP 管中, 加 0.5 ml 异丙醇振荡, 室温静置 10 min; 4 $^{\circ}$ C 以 11 000 g 高速离心 10 min。弃上清, 加入 1 ml 70% 乙醇, 4 $^{\circ}$ C 以 8 000 g 高速离心 5 min。弃上清, 空气干燥 RNA 沉淀 5~10 min。50 μ l DEPC 处理过的双蒸水溶解 RNA, 55~60 $^{\circ}$ C 温浴 10 min。-70 $^{\circ}$ C 保存备用。转录反应在 25 μ l 反应体系中进行, 加入总 RNA 10 μ l、oligo(dT)₂₀ 1 μ l, 在 70、0 $^{\circ}$ C 分别反应 5 min; 然后加入 M-MLV Buffer 5 μ l、dNTP 0.5 μ l、RNasin 0.6 μ l 和 M-MVRT 1 μ l, 加 DEPC 水至总体积为 25 μ l。42 $^{\circ}$ C 放置 1 h 备用。PCR 扩增在 30 μ l 反应体系中进行, 其中含有: 模板 cDNA 3 μ l, Taq 酶 0.5 μ l, 10 \times buffer 6 μ l, 引物(p1、p2)各 2.5 μ l, Mg²⁺ 2.4 μ l, dNTP 4 μ l, 加双蒸水至总体积 30 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 min; 45 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。两组最终产物同时电泳后紫外灯下观察。

1.6 统计学处理 分析结果行单因素方差(one way-ANOVA)分析比较组间差异(统计软件 SAS Ver 8.10), 数据以 M \pm SD 表示。如差异有显著性则行组间两两 t 检验。显著性水平为 P<0.05。

2 结果

2.1 毒性和副作用评价 鞘内注射基因转染后未见实验动物死亡及发生明显副反应(行为及习惯改

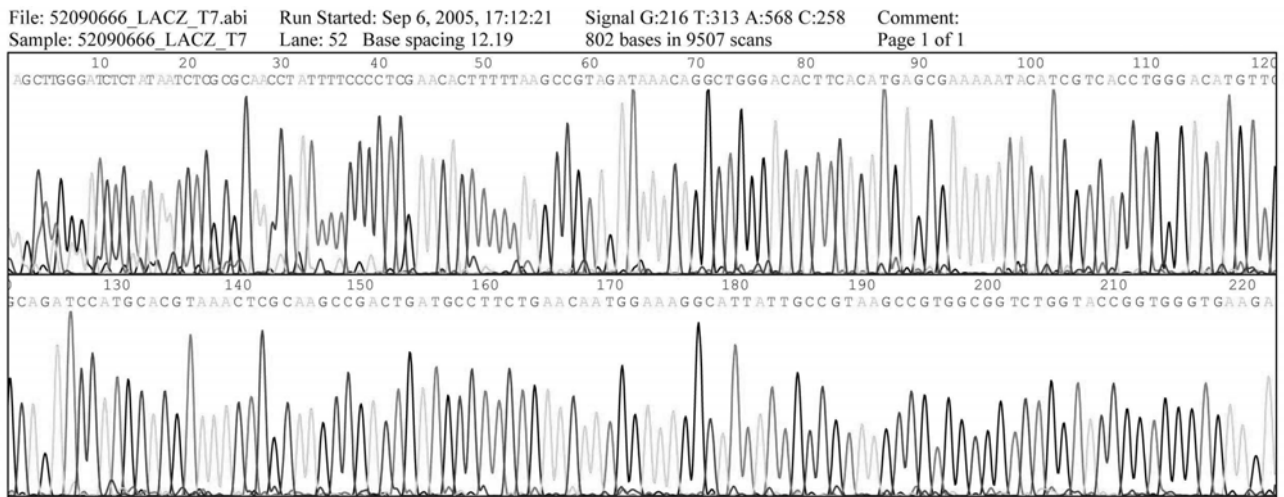


图 2 基因测序结果

Fig.2 Gene sequence of pcDNA3-Lac Z with universal primer T7

变)。对照组和实验组初始平均体重分别为(270.0±5.0) g 和 (250.0±8.0) g。术后 14 d 两组平均体重分别为(361.0±4.0) g 和 (345.0±6.0) g。两组间平均体重增加无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 酶切与基因测序 载体基因 (pcDNA3) 有 5 446 个核苷酸构成, 含 T7 启动子及 Hind III 和 Xba-I 的酶切位点。构建完成的 pcDNA3-Lac Z 载体经双酶切形成 300 bp 和 5.4 kbp 两个片段。其中, Lac Z 全长 300 bp, 真核表达载体 pcDNA3 长 5.4 kb (图 1)。以 T7 通用引物进行基因测序, 证实基因扩增正确(图 2)。



图 1 目的基因双酶切结果

Fig.1 Restriction endonucleases digest analysis of pcDNA3-Lac Z

2.3 PCR 检测 在 mRNA 水平, 实验组 pcDNA3-Lac Z 表达质粒在阳离子脂质体的介导下, 成功进入脊髓组织(神经元/胶质细胞), 并转录相应 mRNA。对照空载体-脂质体混合物转染组未见相应基因表达(图 3)。

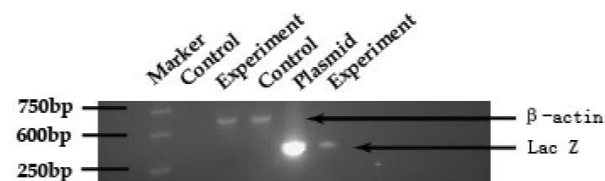


图 3 两组基因表达 PCR 检测结果

Fig.3 RT-PCR results of two groups

2.4 免疫组化 在实验组, Lac Z 基因表达产物 β-半乳糖苷酶的阳性染色提示转染成功, 相对实验组,

对照组几乎无阳性染色组织, 阳性染色含像素点为 $8\ 259.33\pm\ 683.75$ 。注射点近端组织平均染色像素点为 $28\ 138.33\pm\ 1\ 550.70$ 大于远端组织 $21\ 391.17\pm\ 1\ 539.10$ ($P<0.05$), 提示蛛网膜下腔中的脑脊液流动可能影响外源基因在中枢神经系统的转染效率, 上述 3 组任意两组间有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 研究背景 本实验中, 主要研究了脂质体介导鞘内注射基因在 SD 大鼠脊髓组织中的表达。以往更多学者均因使用病毒载体的潜在危害对上述方法的临床应用提出质疑, 而更为安全的非病毒转基因方案因转染效率低下而不为人们所重视。基于此一些学者已开始应用脂质体介导基因转染的技术, 并在一些组织中取得了初步成果, 基因转染后表达时间可长达 4 周。经研究^[7]发现, 脂质体的超分子结构可形成表面功能复合体非常适合体内基因转染。结构复杂的复合体具有利用脂类物质聚集 DNA 的功能^[8]。

3.2 研究方案制定依据 为了实施中枢神经内脂质体介导的外源基因体内转染, 首先须建立一个功能性表达体系。在此笔者选择酶蛋白 Lac Z 基因。文献报道, CCK (胆囊收缩素) 表达体系在中枢神经系统转染, 经 21 d 后实验动物异常功能得到纠正。与此研究相同, 笔者通过脂质体介导基因转染也在中枢神经系统获得了功能蛋白的表达。由于大鼠体内没有 Lac Z 活性基因, 故该表达体系具有良好的敏感性。且该基因的表达也无明显副作用。为避免转染的 Lac Z 已经没有了 mRNA 表达活性, 笔者在 2 周后利用 RT-PCR 测定其 mRNA 表达后, 进一步在蛋白水平测定了 β-半乳糖苷酶的表达。当然实验中脂质体与 DNA 混合比例与转染效率关系密切。

3.3 研究结果分析 本研究结果支持了大鼠中枢

神经系统鞘内注射体内转染脂质体-质粒复合体实现功能性表达的可行性。注入动物体内的复合体极可能被神经元及胶质细胞所吸收并表达。表达的功能蛋白将分泌入脑脊液中参与循环,并到达其他脊髓节段发挥功能。本研究发现在注射远端有阳性细胞表达,虽然表达量不多,仍然说明本表达体系的转染效率较高,且通过优化技术及复合体中混合物的配比,蛋白表达可持续达 2 周甚至更长时间。

3.4 研究的实际意义 如表达体系表达量相对较低时,可用于进行某种基因产物的功能分析,本研究结果对于体内基因异常导致关键蛋白缺失的代谢性疾患的临床治疗^[9]具有一定参考价值。此外,中枢神经系统的体内转染为脊髓损伤的基因治疗^[10-11]建立了实验平台。脊髓损伤后一些功能蛋白的低表达将阻止轴突再生及功能恢复,本研究结果对上述损伤的基因治疗的开展奠定了实验基础。

参考文献

[1] Nakamura M, Yamaguchi S, Watanabe Y, et al. Exogenous expression of interferon-beta in cultured brain microvessel endothelial cells[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(9): 1441-1443.

[2] Li S. Electroporation gene therapy: new developments in vivo and in vitro[J]. Curr Gene Ther, 2004, 4(3): 309-316.

[3] Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(4): 299-310.

[4] Kato N, Nemoto K, Nakanishi K, et al. Nonviral HVJ (hemagglutinating virus of Japan) liposome-mediated retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat nervous system promotes functional and histological recovery of the crushed nerve[J]. Neurosci Res, 2005, 52(4): 299-310.

[5] Pardridge WM. Tyrosine hydroxylase replacement in experimental Parkinson's disease with transvascular gene therapy[J]. NeuroRx, 2005, 2(1): 129-138.

[6] Zhu C, Zhang Y, Zhang YF, et al. Organ-specific expression of the lac Z gene controlled by the opsin promoter after intravenous gene administration in adult mice[J]. J Gene Med, 2004, 6(8): 906-912.

[7] Ewert KK, Ahmad A, Evans HM, et al. Cationic lipid-DNA complexes for non-viral gene therapy: relating supramolecular structures to cellular pathways[J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(1): 33-53.

[8] Ruozi B, Forni F, Battini R, et al. Cationic liposomes for gene transfection[J]. J Drug Target, 2003, 11(7): 407-414.

[9] Citron BA, Arnold PM, Haynes NG, et al. Neuroprotective effects of caspase-3 inhibition on functional recovery and tissue sparing after acute spinal cord injury[J]. Spine, 2008, 33(21): 2269-2277.

[10] Zhang L, Gu S, Zhao C, et al. Combined treatment of neurotrophin-3 gene and neural stem cells is propitious to functional recovery after spinal cord injury[J]. Cell Transplant, 2007, 16(5): 475-481.

[11] Yune TY, Lee JY, Jiang MH, et al. Systemic administration of PEP-1-SOD1 fusion protein improves functional recovery by inhibition of neuronal cell death after spinal cord injury[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(8): 1190-1200.

(收稿日期:2011-08-16 本文编辑:王宏)

第一届上海肢体延长与畸形矫正新理论新技术学习班通知

上海市第六人民医院骨科是国内早研发骨外固定技术的单位之一,近年来在广泛应用外固定器治疗四肢创伤的基础上,开展了外固定或内/外固定相结合进行肢体延长与畸形矫正,积累了丰富的病例资料和教学经验,并出版多部相关专著。为了普及和推广肢体延长与畸形矫正的新理论新技术,上海市第六人民医院骨科定于 2012 年 3 月 24~25 日主办继续教育项目“第一届上海肢体延长与畸形矫正新理论与新技术学习班”。学习班将邀请国内及俄罗斯、日本、韩国、香港、台湾等地的权威肢体延长与矫形专家就该领域的基本理论、技术和操作方法的最新进展进行传授和探讨,欢迎广大骨科医生踊跃参会,特别欢迎参会者携带疑难病例现场教学互动讨论。学员在课程结束后可获得 I 类继续教育学分 8 分。

授课内容: ①下肢畸形测量、术前计划与矫正的 Paley 原则; ②Ilizarov 技术基本原则与方法; ③Taylor 空间支架、Orthofix 支架和 Ilizarov 外固定器的使用方法; ④创伤后肢体骨不连、骨髓炎、骨缺损的骨搬运治疗; ⑤外固定技术治疗四肢先天畸形与疾病(佝偻病、侏儒症、膝/外内翻、先天性胫骨假关节、先天性马蹄内翻足、成人先髌、短趾/指症、成骨不全等); ⑥下肢美容矫形的基本概念与治疗策略; ⑦骨代谢性畸形矫正手术后的内科辅助治疗; ⑧支具与矫形器在肢体畸形矫正和康复中的作用。

时间:2012 年 3 月 23 日报到,24~25 日开会。**地点:**上海市宜山路 600 号骨科大楼 1 楼学术报告厅。**费用:**教学书籍及资料费 1 000 元。授课方式:大堂讲授、教学录像和模具操作。食宿自理,宾馆有多种规格可供学员选择,五星级每天 300 元/每人床,三星级每天 160 元/每人床,普通宾馆每天 100 元/每人床。

联系人:张长青,柴益民,康庆林。联系电话:18930177298, 13120742195。E-mail:orthokang@yahoo.com.cn, orthokang@163.com。上海宾馆紧张,本次学习班限定人数为 80 人,请尽早确定参会人数和住宿标准。