



诱导型一氧化氮合酶反义核酸在脊髓损伤后细胞凋亡和p-p38 MAPK信号转导通路中的作用

一氧化氮(NO)已被证实参与了脊髓损伤的继发性反应过程,其中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性变化与脊髓损伤过程中的细胞凋亡密切相关[1, 2],但有关参与此病理过程中的信号转导通路目前所知甚少。我们应用NOS反义核酸(ASODN)阻断NOS的表达,研究其与细胞凋亡和磷酸化p38丝裂原激活蛋白激酶(p-p38 MAPK)信号转导通路变化之间的关系。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

ESCORT、凋亡试剂盒(Sigma公司),寡脱氧核苷酸(ODN,上海生工生物工程公司);TRIzol试剂盒、RT-PCR试剂盒(Gibco BRL),p38 MAPK assay kit (NEB公司),羊抗兔IgG-HRP(华美公司),PVDF膜(Hybond);蛋白电转移装置(Bio-Rad),微量注射器(上海医用激光仪器厂),冷冻离心机(Eppendorf),流式细胞仪(Coulter),PCR仪(MJ Research, Inc),微型电泳仪(北京东方特力科贸中心)。

1.2 ODN的设计与合成

反义(AS)和无义(NS)ODN根据iNOS的cDNA序列设计,与mRNA中的AUG起始密码子后的18个碱基序列互补。ASODN-iNOS: 5' CAGGGGCAAG CCATGTCT3'; NSODN-iNOS: 5' GACAGTCGCGAGC ACTGT3'。硫代磷酸基修饰, PAGE纯化。经NCBI Blast Program检验未发现与啮齿类组织具有同源性。

1.3 实验分组和模型制备

健康SD雄性大鼠(中山医科大学实验动物中心提供),体质量280~320 g,随机分为4组:ASODN-iNOS、NSODN-iNOS、损伤对照组和正常对照组,每组9只动物。每组动物分别于伤后6 h进行Western blottin和RT-PCR检测,72 h进行细胞凋亡检测,每次检测任取3只动物。脊髓后路压迫伤模型采用Nystrom的方法[3],咬除T₁₀~L₂节段的椎板,压迫物质量35 g,时间10 min。

1.4 体内转染过程

脂质体原液浓度为2 mg/ml,参考说明进行配制;ODN终浓度为40 μmol/L,现用现配。脂质体与ODN的质量比为6:1。轻柔混合,室温孵育15 min。ASODN-iNOS和NSODN-iNOS组动物损伤前12 h蛛网膜下腔微量注射混合物,每只动物10 μl。损伤对照组仅注射ESCORT与无菌生理盐水的混合物10 μl,正常对照组不做任何处理。

1.5 RT-PCR

取脊髓组织100 mg,加1 ml TRIzol混匀5 min;加0.2 ml氯仿震荡15 s,4 °C、10 000 g离心15 min;上层水相加0.5 ml异丙醇混匀10 min;4 °C、10 000 g离心10 min;沉淀加1 ml 75%乙醇,4 °C、5 000 g离心5 min,用DEPC水重新溶解;将9 μl提取的总RNA与Oligo(d)T及下游引物各1 μl混合,70 °C反应10 min后冷却1 min;将10×PCR缓冲液、25 mmol/L MgCl₂、0.1 mol/L DTT各2 μl与1 μl 10 mmol/L

dNTP混合后加至上述混合物中, 42 °C反应5 min; 加2 μ l Superscript II 并补水至20 μ l, 42 °C反转录50 min。反转录产物 2 μ l、10 \times PCR缓冲液5 μ l、50 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l、上游引物1 μ l、10 mmol/L dNTP 1 μ l、Taq酶0.5 μ l混合后补水至50 μ l, 95 °C预变性5 min, 95 °C变性60 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环, 72 °C延伸5 min。反应产物7.5 μ l行1.2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下拍照记录[1]。引物设计如下: iNOS上游为5' CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC3', 下游为5' GGGTGTGACAGTCTTGTGCCTTTGG3', 扩增473 bp。

1.6 Western blotting

取脊髓组织100 mg, PBS (pH7.4)洗3次, 剪碎, 加1 ml裂解液, 匀浆, 常规提取蛋白质并定量[4]。取200 μ g蛋白加入20 μ l 重悬的p-p38 MAPK抗体(兔抗人1:200), 4 °C轻摇过夜; 依次用1 \times 裂解液和1 \times 激酶缓冲液洗2次, 再与200 μ mol/L ATP和2 μ g活性转录因子-2室温孵育30 min; 加25 μ l 3 \times SDS上样缓冲液, 100 °C变性5 min; 取30 μ l样品进行10% SDS-PAGE电泳, 并以湿性垂直电转膜仪将蛋白转移至PVDF膜(90 mA、1.5 h), 封闭1 h。将膜与ATF-2抗体(1:1 000)4 °C孵育过夜, 羊抗兔HRP-IgG(1:2 000)孵育1 h, TBST洗3次, DAB显色。PVDF膜显色条带为相对分子质量为35 000~40 000的p-p38蛋白[5]。

1.7 细胞凋亡检测

取脊髓组织100 mg, 剪碎, 轻柔吹打, 200目、400目筛网过滤。4 °C、300 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀用冰生理盐水稀释, 细胞记数并配成1 \times 10⁶/ml单细胞悬液。取1 ml上述单细胞悬液, 4 °C、1 000 r/min离心5 min, 弃上清; 沉淀用500 μ l binding缓冲液(1 \times)溶解, 再依次加入5 μ l Annexin V-FITC、10 μ l碘化丙啶, 室温避光孵育10 min, 流式细胞仪检测[6]。

1.8 统计学处理

采用SPSS8.0统计软件行单因素方差分析(ANOVA), 组间比较用LSD法。

2 结果

2.1 RT-PCR结果

RT-PCR结果(图1)显示, 在400~500 bp之间形成mRNA电泳条带, ASODN-iNOS条带与NSODN-iNOS和损伤对照组的相比明显变弱、变浅, 正常对照组则没有明显的iNOS条带。

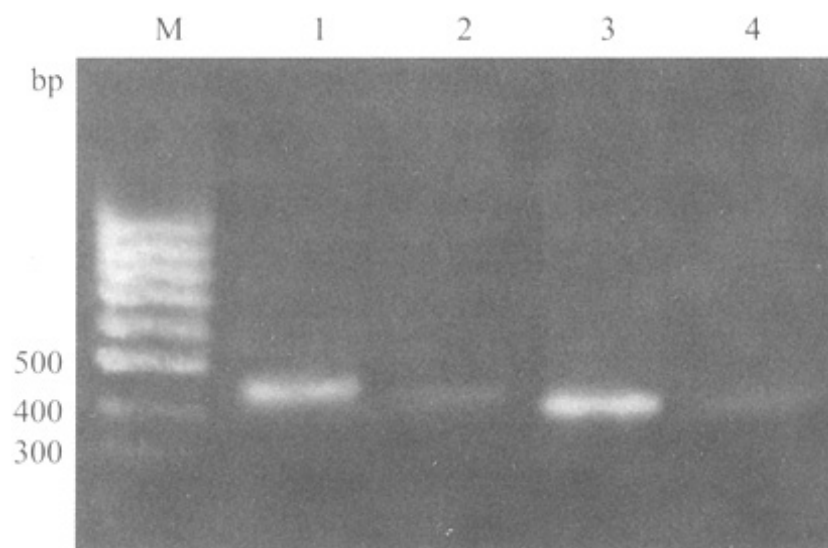


图1 RT-PCR结果

Fig.1 Results of RT-PCR

M: Marker; Lane 1: NSODN; Lane 2: ASODN; Lane 3: Injured spinal cord as control; Lane 4: Normal control

2.2 Western blotting结果

图2所示为损伤后6 h时p-p38 MAPK表达情况。ASODN-iNOS组p-p38 MAPK信号分子表达与损伤对照组相比明显降低。

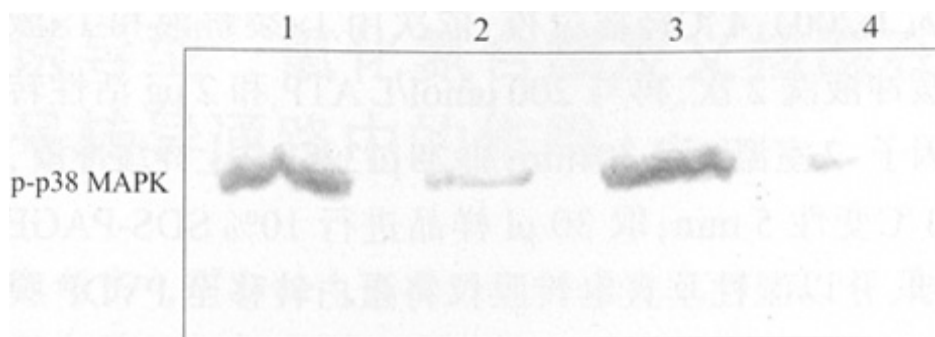


图2 p-p38 MAPK的Western blotting检测结果

Fig.2 Western blotting of p-p38 MAPK

1: NSODN; 2:ASODN; 3: Injured spinal cord as control; 4: Normal control

2.3 流式细胞术检测结果

从流式细胞术双标法检测结果(表1)看, ASODN-iNOS可以显著抑制细胞凋亡率, 与损伤对照组相比有显著差异($P < 0.01$)。

表 1 脊髓损伤 72 h 后组织中细胞凋亡比率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Ratio of apoptotic cells in local tissues 72 h after the spinal cord injury ($n=3, Mean \pm SD$)

Group	Apoptosis(%)
Normal control	2.70±0.70
Injury control	8.40±0.27
NSODN- iNOS	7.95±1.83
ASODN-iNOS	1.97±0.43*

* $P < 0.01$ vs injury control group

3 讨论

脊髓损伤病理过程分为原发性损伤和继发性损伤, 最终细胞死亡的方式有坏死和凋亡。坏死主要发生在原发性损伤的中心部位, 对细胞来说是被动或不受控的; 细胞凋亡主要伴随于继发性损伤而出现, 发生于损伤中心区及其周围邻近部分, 是一种可控的程序性死亡。有研究显示, 脊髓损伤后第1天就开始出现细胞凋亡, 第3天达到高峰, 以后逐渐减少[7][8]。细胞凋亡的重要性在于决定损伤后细胞的存活数量和突触联系的有效形成。本实验选用伤后72 h作为检测凋亡发生的时间点, 发现在脊髓损伤早期存在细胞凋亡过程。ASODN-iNOS可以抑制脊髓损伤后细胞凋亡率, 提示iNOS的诱导活化与脊髓继发性损伤过程中细胞凋亡有关。

NO已被证实参与了脊髓损伤的继发性反应过程, 其中iNOS的活性变化与脊髓损伤过程中的细胞凋亡密切相关[1][2]。NO可与周围环境中的超氧离子(O_2^-)结合生成亚硝酸根离子($ONOO^-$), 后者可使DNA烷化, 并抑制DNA修复酶O-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶的活性, 抑制细胞DNA合成, 破坏细胞内的蛋白质和核酸, 并启动凋亡

连锁反应(如polyADP-ribose polymerase的激活、线粒体膜通透性改变、细胞色素C的释放、蛋白质的亚硝化和DNA断裂等),最终导致神经细胞凋亡[9]。已知p-p38 MAPK参与了神经细胞凋亡过程中的信号转导,其表达的强弱预示神经细胞的存活与否,是细胞对不同损伤的应急反应表现[10]。在脊髓损伤后神经元和胶质细胞的凋亡过程中可以看到p-p38 MAPK的表达增加,说明脊髓损伤后存在p-p38 MAPK信号转导通路的改变[11],但p-p38 MAPK与NO/NOS在脊髓损伤后的关系目前所知甚少,脊髓损伤后NOS活性变化是否有p-p38信号转导途径参与目前还未见相关文献报道。我们对此进行了初步研究,从实验结果看,损伤后6 h时p-p38 MAPK表达显著增加,这与以往的研究结果[5][12]接近;应用ASODN-iNOS可以明显降低损伤后p-p38信号分子的表达,而NSODN-iNOS则没有这方面的作用。有研究报道脊髓损伤后iNOS mRNA的表达高峰为伤后6~24 h[13][14],而p-p38在伤后6 h出现高峰,其高峰出现在iNOS大量表达之前,由此推论:脊髓损伤导致p-p38 MAPK激活,p-p38 MAPK的激活又可能使NOS活性增强,并促使细胞发生凋亡;ASODN可以降低p-p38 MAPK和NOS mRNA的表达,并减少细胞凋亡的发生。

本实验采用的方法为脂质体介导的寡核苷酸片段进行直接体内转染,该方法简便、有效,脂质体载体在体内安全、无毒,并可避免以往基因治疗中存在的免疫排斥反应、炎症反应和移植细胞不能长期存活的问题,为基因治疗的实际应用提供了一定的实验依据和技术途径。

参考文献:

- [1] Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, et al. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 85(1-2): 114-22.
- [2] Estevezl A, Spear N, Manuel SM, et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(3): 923-31.
- [3] Nystrom B, Berglund JE. Spinal cord restitution following compression injuries in rats[J]. *Acta Neurol Scand*, 1988, 78(6): 467-72.
- [4] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 92-3.
- [5] 孟爱宏, 凌亦凌, 赵晓云, 等. CCK-8对内毒素休克大鼠肺脏细胞因子的抑制效应[J]. *生理学报*, 2002, 54(2): 99-102.
- Meng AH, Ling YL, Zhao XY, et al. Inhibitory effect of cholecystokinin-octapeptide on production of cytokines in the lung of endotoxic shock rats[J]. *Acta Physiol Sin*, 2002, 54(2): 99-102.
- [6] 汪志文, 沈岳. PI和Annexin V/PI在创伤后脊髓凋亡细胞分选中的应用[J]. *创伤外科杂志*, 2001, 3(3): 237-8.
- Wang ZW, Shen Y. The application of PI and Annexin V/PI methods to the differentiating of apoptosis nerve cells in spinal cord after trauma[J]. *J Trauma Surg*, 2001, 3(3): 237-8.
- [7] Ray S, Matzelle DC, Wilford GG, et al. E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats[J]. *Brain Res*, 2000, 867(1-2): 80-9.
- [8] Lee YB, Yune TY, Baik SY, et al. Role of tumor necrosis factor- α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2000, 166(1): 190-5.
- [9] Aiwu C, Sic LC, Ollivier M, et al. P38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43320-7.
- [10] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinase[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-52.
- [11] Nakahara S, Yong K, Sakou T, et al. Induction of apoptosis signal regulating kinase1 (ASK-1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK-1 and p38 pathways in neuronal apoptosis[J]. *J Neuropathol Exp*, 1999, 58(5): 442-50.

[12] Oh-hashi K, Maruyama W, Yi H, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263(2): 504-9.

[13] Hamada Y, Ikata T, Katoh S, et al. Effects of exogenous transforming growth factor-beta 1 on spinal cord injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 203(2): 97-100.

[14] 刘成龙, 靳安民, 周初松, 等. 大鼠脊髓损伤后一氧化氮合酶基因表达的变化[J]. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(1): 74-5.

Liu CL, Jin AM, Zhou CS, et al. Changes of nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue[J]. *Chin J Exp Surg*, 2001, 18(1): 74-5.

参考文献:

[1] Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, et al. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 85(1-2): 114-22.

[2] Estevez A, Spear N, Manuel SM, et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(3): 923-31.

[3] Nystrom B, Berglund JE. Spinal cord restitution following compression injuries in rats[J]. *Acta Neurol Scand*, 1988, 78(6): 467-72.

[4] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 92-3.

[5] 孟爱宏, 凌亦凌, 赵晓云, 等. CCK-8对内毒素休克大鼠肺脏细胞因子的抑制效应[J]. *生理学报*, 2002, 54(2): 99-102.

Meng AH, Ling YL, Zhao XY, et al. Inhibitory effect of cholecystokinin-octapeptide on production of cytokines in the lung of endotoxic shock rats[J]. *Acta Physiol Sin*, 2002, 54(2): 99-102.

[6] 汪志文, 沈岳. PI和Annexin V/PI在创伤后脊髓凋亡细胞分选中的应用[J]. *创伤外科杂志*, 2001, 3(3): 237-8.

Wang ZW, Shen Y. The application of PI and Annexin V/PI methods to the differentiating of apoptosis nerve cells in spinal cord after trauma[J]. *J Trauma Surg*, 2001, 3(3): 237-8.

[7] Ray S, Matzelle DC, Wilford GG, et al. E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats[J]. *Brain Res*, 2000, 867(1-2): 80-9.

[8] Lee YB, Yune TY, Baik SY, et al. Role of tumor necrosis factor- α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2000, 166(1): 190-5.

[9] Aiwu C, Sic LC, Ollivier M, et al. P38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43320-7.

[10] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinase[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-52.

[11] Nakahara S, Yong K, Sakou T, et al. Induction of apoptosis signal regulating kinase1 (ASK-1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK-1 and p38 pathways in neuronal apoptosis[J]. *J Neuropathol Exp*, 1999, 58(5): 442-50.

[12] Oh-hashi K, Maruyama W, Yi H, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263(2): 504-9.

[13] Hamada Y, Ikata T, Katoh S, et al. Effects of exogenous transforming growth factor-beta 1 on spinal cord injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 203(2): 97-100.

[14] 刘成龙, 靳安民, 周初松, 等. 大鼠脊髓损伤后一氧化氮合酶基因表达的变化[J]. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(1): 74-5.

Liu CL, Jin AM, Zhou CS, et al. Changes of nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue[J]. *Chin J Exp Surg*, 2001, 18(1): 74-5.

[回结果列表](#)