

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

张新宇¹, 袁初松¹, 袁新安民¹, 袁爱林², 袁京¹, 袁第一军医大学珠江医院脊柱骨病科袁广东 广州 510282 中山医科大学袁广东 广州 510089 袁

摘要 目的 研究一氧化氮合酶(NOS)反义核酸(SODN)对脊髓损伤后 NOS 表达、细胞凋亡、信号转导通路的影响。方法 设计并合成诱导型 NOS 反义寡脱氧核苷酸(SODN-iNOS)及诱导型 NOS 无义寡脱氧核苷酸(SODN-iNOS)微量注入大鼠蛛网膜下腔并制备成脊髓压迫动物模型。伤后 6 h 分别用 RT-PCR 检测 iNOS mRNA 表达及用 Western blotting 检测组织中磷酸化丝裂原激活蛋白激酶(p-p38MAPK)的变化。用双标染色流式细胞术检测伤后 72 h 细胞凋亡情况。伤后对照组鞘内注射不含核酸的溶液成分。结果 脊髓损伤后组织中存在 iNOS 的表达和 p-p38 MAPK 变化。损伤后局部组织中存在明显的细胞凋亡。ASODN-iNOS 可以抑制 iNOS 的表达,并可以显著抑制损伤后 p-p38MAPK 的表达和细胞凋亡的发生。与损伤对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 ASODN-iNOS 可以抑制脊髓损伤后 iNOS 的表达和细胞凋亡。SODN 的这种作用可能与 p-p38MAPK 信号转导通路有关。

关键词 一氧化氮合酶;寡核苷酸类;反义;细胞凋亡;蛋白激酶类;信号转导;脊髓损伤

中图分类号 R342.22;R345.44;R651.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)06-0578-03

Role of antisense oligodeoxynucleotide of inducible nitric oxide synthase in the apoptosis and p-p38 MAPK signal transduction in rat neurons after spinal cord injury

ZHANG Xin-yu¹, ZHOU Chu-song¹, JIN An-min¹, GUO Ai-lin², TIAN Jing¹

¹Department of Orthopaedics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Sun Yat-sen Medical University, Guangzhou 510089, China

Abstract: Objective To study the role of antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) of inducible nitric oxide synthase (iNOS) on the apoptosis and p-p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) signal transduction of the neurons after spinal cord injury (SCI). Methods Antisense and non-sense oligodeoxynucleotides of iNOS were designed and synthesized, and injected into the subarachnoid space 12 h before the compressive injury was given to the rat spinal cord. Reverse transcription-PCR and flow-cytometry were used to examine the iNOS mRNA expression and the apoptosis of the neurons within the injured spinal cord. The changes of p-p38MAPK signal transduction pathway were detected by Western blotting. Results Obvious increase in iNOS expression and up-regulated p-p38MAPK were detected after SCI, and neuronal apoptosis was observed in the injured spinal cord. ASODN-iNOS treatment resulted in decreased expression levels of iNOS mRNA and p-p38MAPK, and the neuronal apoptosis was alleviated. Conclusion ASODN-iNOS inhibits iNOS expression and neuronal apoptosis following SCI which may be related to the p-p38MAPK signal transduction pathway.

Key words: nitric oxide synthase; oligonucleotides; antisense; apoptosis; protein kinase; signal transduction; spinal cord injuries

一氧化氮(NOS)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(NOS)的活性变化与脊髓损伤过程中的细胞凋亡密切相关。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(SODN)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-p38MAPK)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(SODN)上海生工生物工程公司;TRIzol 试剂盒, T-PCR 试剂盒, Gibco BRL; p38 MAPK assay kit, EBI 公司;羊抗兔 IgG-HRP, 华美公司;PVDF 膜, Bond;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, Pendorf;流式细胞仪, Coulter;PCR 仪, MJ Research;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(SODN)和无义(SODN)根据 iNOS 的 cDNA 序列设计, 与 mRNA 中的 AUG 起始密码子后的 18

收稿日期 2003-02-28

基金项目 国家自然科学基金 9800166

Supported by National Natural Science Foundation of China (39800166)

作者简介 张新宇, 男, 1968 年, 辽宁沈阳人, 第一军医大学在读博士研究生。

主治医 袁初松, E-mail: zhx@yiyee.com

个碱基序列互补 ASODN-iNOS 随 CAGGGGCAAG CCATGTCT3' NSODN-iNOS 随 GACAGTCGCGAGC ACTGT3' 硫代磷酸基修饰 AGE 纯化经 NCBI BlastProgram 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 280~320g 随机分为 4 组 NSODN-iNOS 组、ASODN-iNOS 组、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 blotting 和 RT-PCR 检测 2 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 切除 T₁₀~L₂ 节段的椎板 压迫物质量 3.5 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 终浓度为 40 μmol/L 表现用现配脂质体与 ODN 的质量比为 6 轻轻混合室温孵育 15 min 用 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 离心 15 min 上层水相加 0.5 ml 异丙醇混匀 10 min 离心 10 min 沉淀加 1 ml 75% 乙醇离心 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 反应 10 min 后冷却 1 min 将 10 μl PCR 缓冲液 5 mmol/L MgCl₂ 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 反应 5 min 加 2 μl Superscript 域并补水至 20 μl 反应 50 min 反转录产物 2 μl 加 PCR 缓冲液 5 μl 10 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl 上游引物 1 μl 10 mmol/L dNTP 1 μl 酶 0.5 μl 混合后补水至 50 μl 预变性 5 min 变性 60 s 退火 30 s 延伸 30 s 循环 72 次 延伸 5 min 反应产物 7.5 μl 行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 紫外灯下拍照记录 引物设计如下 NOS 上游为 5'CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC3' 下游为 5'GGGTGTCAGAGTCTTGTGCCTTTGG3' 扩增 473 bp

1.6 Western blotting

取脊髓组织 100 mg 加入 PBS 洗 3 次 剪碎 加 1 ml 裂解液 匀浆 常规提取蛋白质并定量 取 200 μg 蛋白加入 20 μg 重悬的 p-p38MAPK 抗体

抗人 1:200 轻轻摇过夜 依次用 1 裂解液和 1 磷酸酶缓冲液洗 2 次 再与 200 μmol/L ATP 和 2 μg 活性转录因子 -2 室温孵育 30 min 加 25 μg SDS 上样缓冲液 表 100 μg 变性 5 min 取 30 μg 样品进行 10% SDS-PAGE 电泳 以湿性垂直电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜 0.4 mA 5 h 封闭 1 h 将膜与 ATF-2 抗体 0.000 μg 4 μg 孵育过夜 羊抗兔 HRP-IgG 0.000 μg 孵育 1 h 用 TBST 洗 3 次 显色 用 PVDF 膜显色条带为相对分子质量为 35000~40000 的 p-p38 蛋白

1.7 细胞凋亡检测

取脊髓组织 100 mg 剪碎 轻柔吹打 0.00 目筛网过滤 4 μg 800 r/min 离心 10 min 弃上清 沉淀用冰生理盐水稀释 细胞计数并配成 1 × 10⁶/ml 单细胞悬液 取 1 ml 上述单细胞悬液 离心 5 min 弃上清 沉淀用 500 μl binding 缓冲液 溶解 再依次加入 5 μl Annexin V-FITC 10 μl 碘化丙啶 室温避光孵育 10 min 流式细胞仪检测

1.8 统计学处理

采用 SPSS8.0 统计软件行单因素方差分析 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 NSODN-iNOS 条带与 NSODN-iNOS 和损伤对照组的相比明显变弱 正常对照组则没有明显的 iNOS 条带

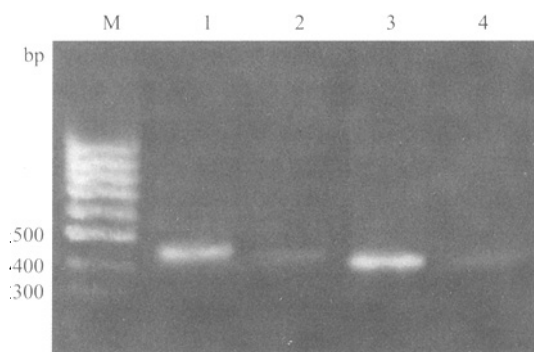


图 1 RT-PCR 结果

Fig.1 Results of RT-PCR

M:Marker; Lane1:NSODN; Lane2:ASODN; Lane3:Injured spinal cord as control; Lane4:Normal control

2.2 Western blotting 结果

图 2 所示为损伤后 6 h 时 p-p38MAPK 表达情况 ASODN-iNOS 组 p-p38MAPK 信号分子表达与损伤对照组相比明显降低

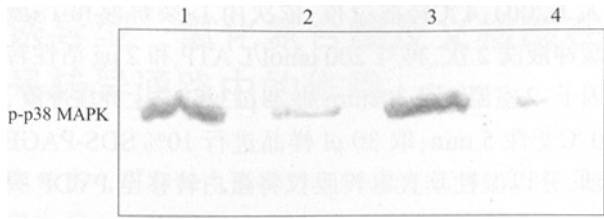


图 2 p-p38MAPK 的 Westernblotting 检测结果
Fig.2 Westernblotting of p-p38 MAPK
1: NSODN; 2: ASODN; 3: Injured spinal cord as control;
4: Normal control

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 来看 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 $\bar{x} \pm s$
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 \pm 0.70
Injury control	8.40 \pm 0.27
NSODN-iNOS	7.95 \pm 0.83
ASODN-iNOS	1.97 \pm 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 NO 可与周围环境中的超氧离子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 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酸化和 DNA 断裂等最终导致神经细胞凋亡已知 p-p38MAPK 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-p38MAPK 的表达增加说明脊髓损伤后存在 p-p38MAPK 信号转导通路的改变但 p-p38MAPK 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-p38MAPK 表达显著增加这与以往的研究结果接近应用 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 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-p38MAPK 激活而 p-p38MAPK 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-p38MAPK 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

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

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

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

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

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. *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. *Acta Physiol Sin*, 2002, 54(2): 99-102.

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. *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. *Trauma Surg*, 2001, 3(3): 237-8.

结果显示 HCV 核心蛋白包膜蛋白非结构蛋白 NS₃和 NS_{5a} 和 NS_{5b} 在细胞中得到表达

目前对丙型肝炎的治疗还没有理想的药物。抗病毒疫苗可能是最终解决病毒性疾病的有效手段。但由于 HCV 存在高度变异特性。其主要原因是在病毒 RNA 复制过程中 RNA 依赖的 RNA 聚合酶缺乏校正功能。使得只根据某一基因型病毒的单个抗原设计的基因工程疫苗或 DNA 疫苗只能对该基因型的病毒有效。不能保护其他型别病毒感染。同时。该抗原的变异也将使单抗原疫苗在短期内趋于无效。限制了这些候选疫苗的实际应用。有效的疫苗必须能诱导机体产生针对不同病毒株的免疫保护作用。灭活疫苗或减毒活疫苗具有病毒的全套抗原。可诱发针对所有病毒抗原的免疫反应。可以克服使用单个抗原时由于变异所引起的免疫逃避。本研究结合先前的研究提示。编码 HCV 大前体蛋白的 ORF 序列克隆入载体。转染真核细胞后能够表达各组分蛋白。这为 HCV 核酸疫苗的研制提供了新的思路。克服传统利用单一抗原来研制核酸疫苗的局限。

参考文献

- 王福生, 雷周. 丙型肝炎病毒 NS5A 基因结构及其功能的研究进展. *生物技术通讯* (Lett Biotech), 1994, 5(3): 127-30.
- Neddermann P, Clementi A, De-Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis c virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *Virology*, 1999, 73(12): 9984-91.
- 赵玮, 廖国阳, 李卫东, 等. HCV 核心蛋白在大肠杆菌中的表达及免疫学特异性研究. *免疫学杂志*, 2001, 17(6): 425-9.
- Zhao W, Liao GY, Li WD, et al. Expression of hepatitis C virus core protein in *E. coli* and its immunological characteristics. *Immunology*, 2001, 17(6): 425-9.
- Tsitoura E, Lucas M, Revol G V, et al. Expression of hepatitis C virus envelope glycoproteins by herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. *Gene Virol*, 2002, 83(Pt3): 561-6.
- Gesell J J, Liu D, Madison V S, et al. Design, high-level expression, purification and characterization of soluble fragments of the hepatitis C virus NS₃ RNA helicase suitable for NMR-based drug discovery methods and mechanistic studies. *Protein Eng*, 2001, 14(8): 573-82.
- Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, et al. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol*, 2001, 75(3): 1252-6.
- Mizuno M, Yamada G, Tanaka T, et al. Virion-like structures in HeLa cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology*, 1995, 109(6): 1933-40.
- Selby M J, Choo Q L, Berger K, et al. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *Gene Virol*, 1993, 74(Pt6): 1103-13.
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gene Virol*, 2000, 81(Pt): 71631-48.
- 李兵, 奚骏, 王立新, 等. HCV 结构区 DNA 疫苗诱发小鼠特异性细胞免疫反应的研究. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(6): 394-7.
- Li B, Du J, Wang L X, et al. DNA immunization of mice with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins elicits significant cell-mediated immune responses. *Chin J Immunol*, 2002, 18(6): 394-7.
- 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. *Brain Res*, 2000, 867(1-2): 80-9.
- Lee Y B, Yune T Y, Baik S Y, et al. Role of tumor necrosis factor- α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2000, 166(1): 190-5.
- Aiwu C, Sic LC, Ollivier M, et al. P38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells. *Biochem*, 2001, 276(46): 43320-7.
- Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinase. *Cell*, 2000, 103(2): 239-52.
- Nakahara S, Yong K, Sakou T, et al. Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK-1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK-1 and p38 pathways in neuronal apoptosis. *J Neuropathol Exp*, 1999, 58(5): 442-50.
- Oh-hash K, Maruyama W, Yi H, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263(2): 504-9.
- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, et al. Effect of exogenous transforming growth factor-beta 1 on spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*, 1996, 203(2): 97-100.
- 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. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(1): 74-5.
- Liu C L, Jin A M, Zhou C S, et al. Changes of nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue. *Chin J Exp Surg*, 2001, 18(1): 74-5.

链接 580 页