

慢病毒介导的 Cdh1-siRNA 在大鼠全脑缺血再灌注损伤后的表达及功能

陈志则, 祁月红, 张雪, 姚文龙, 张传汉

【摘要】 目的:探讨慢病毒介导 RNA 干扰 Cdh1 的表达对全脑缺血再灌注损伤的影响。方法:将 150 只雄性 SD 大鼠随机分成生理盐水组(A组)、空慢病毒组(B组)和重组慢病毒组(C组)各 50 只。分别给予 3 组大鼠注射生理盐水、空慢病毒和重组慢病毒,注射 3d 后采用改良 4-VO 法建立 SD 大鼠全脑缺血再灌注损伤模型,采用荧光定量 PCR 检测大鼠海马组织 Cdh1 mRNA 表达,Western blot 检测 Cyclin B 的变化,TUNEL 法检测海马 CA1 区凋亡细胞指数(AI)。于全脑缺血再灌注术后第 7 天行 Morris 水迷宫测试认知功能的变化。结果:C 组 Cdh1 mRNA 表达明显低于 A、B 组($P<0.05$);AI 值及 Cyclin B 表达均明显高于 A、B 组($P<0.05$);水迷宫测试结果显示,术后第 9~11 天各时间点 C 组的寻台潜伏期明显长于 A、B 组($P<0.05$)。结论:细胞周期末期分裂促进复合物及其调节亚基 Cdh1 可能通过 Cyclin B 堆积介导缺血性神经元的凋亡。

【关键词】 脑缺血;细胞周期末期促进复合物;慢病毒;RNA 干扰;凋亡

【中图分类号】 R49;R743 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2013.03.001

Expression and function of lentivirus-mediated Cdh1-siRNA in global brain ischemia-reperfusion damage of rats

CHEN Zhi-ze, QI YUE-hong, ZHANG Xue, et al. Department of Anesthesiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective: To investigate the expression and function of Cdh1-siRNA in cerebral ischemia-reperfusion injury of rats. Methods: All 150 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal saline group (group A, $n=50$), lentivirus vector group (group B, $n=50$) and recombinant lentivirus group (group C, $n=50$). The rats in 3 groups were injected with normal saline, lentivirus vector and recombinant lentivirus respectively. At the 3rd day after injection, cerebral ischemia-reperfusion injury model of rat was established by modified four-vessel occlusion (4-VO) method. The expression of Cdh1 mRNA and Cyclin B was detected by quantitative real-time PCR and Western blotting. Apoptosis index (AI) was examined by using TUNEL staining method and the behavior was evaluated with Morris water maze test at the 7th day. Results: The expression of Cdh1 mRNA in group C was significantly lower than that in groups A and B ($P<0.05$), but that of Cyclin B and the levels of AI in group C were significantly higher than those in groups A and B ($P<0.05$). In addition, Morris water maze tests revealed that the latent period of seeking the platform in group C was longer than that in the other two groups from the 9th to 11th day after surgery. Conclusion: Cyclin B accumulation by APC-Cdh1 may mediate apoptosis of ischemic neurons.

【Key words】 cerebral ischemia; anaphase promoting complex; lentivirus; RNA interference; apoptosis

缺血性脑损伤是临床常见的疑难问题,包括心跳骤停引起的全脑缺血、脑血管动脉硬化引起的局灶性脑缺血、围术期发生的各种缺血性脑损伤等,极易导致永久性神经功能不全甚至死亡。目前,各种脑保护措施对神经功能恢复作用有限,主要原因为缺血性

神经元死亡或凋亡导致神经功能丧失,以及胶质细胞的过度增殖活化不利于神经元的存活和再生^[1]。细胞周期后期分裂促进复合物(anaphase promoting complex, APC)及其调节亚基 Cdh1 是细胞内主要的泛素蛋白酶小体系统^[2]。泛素蛋白酶小体系统与细胞周期成分在脑缺血后神经元凋亡及胶质细胞过度增殖活化过程中发挥重要作用^[3-4]。本研究拟通过调控 Cdh1 的表达探讨其在全脑缺血再灌注损伤中的作用机制。

基金项目:国家自然科学基金(30872452)

收稿日期:2012-10-15

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科,武汉 430030

作者简介:陈志则(1974-),男,博士,主要从事麻醉与脑保护方面的研究。

通讯作者:张传汉。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物:成年雄性 SD 大鼠 150 只, 体质量 260~300g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。②试剂与仪器: Trizol 试剂(上海华舜公司)、Cdh1 基因 RNA 干扰慢病毒载体(pENTR/H1/TO)(本课题组构建)、Cyclin B 单抗(美国 BD 公司)、Cdh1 多克隆抗体(北京奥维亚生物技术有限公司)、8453E 型紫外分光光度计(美国 Agilent 公司)、实时定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)、Light Cycler 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Roche 公司)、TUNEL 染色试剂盒(德国 Roche 公司); 大鼠立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司)、低温恒冷冷冻切片器(德国 Leica 公司)、TE2000 生物显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法 ①分组:150 只大鼠随机分为生理盐水组(A 组)、空慢病毒组(B 组)和重组慢病毒组(C 组)各 50 只。②方法:将大鼠腹腔麻醉成功后固定于脑立体定位仪上, 头部消毒, 切开大鼠头部中段头皮组织长约 1.0~2.0cm, 分离皮下软组织直至充分显露颅骨及前囟、冠状缝、矢状缝, 分别以大鼠左右海马区为进针点, 用电钻钻开颅骨, 注意避免伤及脑组织。采用 10 μ L 的微量注射器垂直刺入大脑皮质, 分别给 3 组大鼠注射生理盐水(10 μ L)、空慢病毒(10 μ L, 1 \times 10⁹ifu)和重组慢病毒(10 μ L, 1 \times 10⁹ifu), 逐层缝合关闭切口, 分笼饲养。③模型制作:脑立体定向注射 3d 后, 采用改良 4-VO 法建立 SD 大鼠全脑缺血再灌注损伤模型^[5]。因该造模方法对大鼠损伤较大, 故实验前通过预实验以提高造模成功率。翻正反射消失、双侧瞳孔放大、眼球呈灰白色、疼痛反射消失、能自主呼吸为模型成功标志, 以判断是否发生全脑缺血。颈总动脉夹闭 2min 内未昏迷、瞳孔不散大者、缺血后出现痉挛或者发生癫痫者弃之。

1.3 检测指标 随机每组各取 20 只分别用于定量 PCR 检测 APC-Cdh1 的表达和 Western Blot 检测 Cyclin B 的表达, 另外每组 30 只用于 TUNEL 法检测细胞凋亡情况($n=10$)和 Morris 水迷宫检测大鼠的行为学改变($n=20$)。①实时荧光定量 PCR 检测 Cdh1 mRNA 相对表达量:全脑缺血再灌注损伤后第 7 天, 采用 Trizol 试剂盒提取各组大鼠海马区总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 按实时定量 RT-PCR 试剂盒说明书取 500ng 总 RNA 逆转录合成 cDNA, 然后以 SYBR Green I 作为荧光标记物, 在 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。PCR 引物为: Cdh1(XM_001075601) 上游引物为 5'-AGCTAC-

CCCAGGACACCCAA-3', 下游引物为 5'-GCAACG-CAATCAGAGTCAACG-3', PCR 产物片断为 104 bp。 β -actin(NM_031144) 上游引物为 5'-TGACAG-GATGCAGAAGGAGA-3', 下游引物为 5'-TAGAGC-CACCAATCCACACA-3', PCR 产物片断为 104bp。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10s, 94 $^{\circ}$ C 变性 5s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 20s, 共反应 40 个循环。分析融解曲线, 以 Δ Ct 表示 Cdh1 表达水平, Δ Ct=Ct(Cdh1)-Ct(β -actin), 即 Δ Ct 值越高, Cdh1 表达水平越低^[6]。② Western blot 检测 Cyclin B 蛋白的表达:全脑缺血再灌注损伤后第 7 天快速断头处死大鼠, 立即取大鼠海马组织, 用冷 0.01mol/L PBS 洗去血液后置于插在冰块中的组织匀浆器中, 加入 10 倍体积的匀浆缓冲液〔包括 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、150mmol/L NaCl、1% Triton-X100、1mmol/L 乙二胺四乙酸、1mmol/L 二巯基苏糖醇、10 μ g/mL 胃蛋白酶抑制剂、10 μ g/mL 亮抑蛋白酶肽、10 μ g/mL 胰蛋白酶抑制剂、1mmol/L 苯甲基磺酰氟〕, 匀浆后以 4 $^{\circ}$ C、12000r/min (离心半径 2.5cm) 离心 30min 弃去沉淀, 收集上清。以 β -actin 为内参照, 取等量蛋白质经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1h, 加 10mg/L 抗 Cyclin B 单抗或抗 β -actin 单抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:400), 室温孵育 1h, TBST 漂洗后二氨基联苯胺显色 2~3min, 漂洗后照相。③ TUNEL 法检测海马区凋亡细胞:全脑缺血再灌注损伤后第 7 天, 以 100g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后断头取脑, 经冷冻切片剂包裹后迅速置入异戊烷中 -80 $^{\circ}$ C 速冻 3~5min, 取出后置 -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。于 -20 $^{\circ}$ C 恒冷箱切片机上于前囟后 2.5~5.0mm 处行冠状连续冷冻切片(片厚 10 μ m), 切片置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。按凋亡试剂盒操作步骤进行染色, DAB 显色, 封固, 光学显微镜下观察细胞凋亡情况。细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 染色阳性细胞, 即凋亡细胞。计算海马 CA1 区凋亡细胞指数 (apoptosis index, AI), 计算方法:每只动物随机选 2 张切片, 每张切片观察 CA1 或 CA3 区, 分别计算各区凋亡细胞数和总细胞数, AI=凋亡细胞数/细胞总数 \times 100%。④行为学检测:各组分别随机取 10 只大鼠, 于全脑缺血再灌注损伤造模后第 7~11 天连续 5d 采用 Morris 水迷宫进行大鼠空间定向能力测试。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 14.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 方差分析及 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 和 TUNEL 检测 C 组 Cdh1 mRNA 表达量明显低于 A、B 组 ($P < 0.05$), AI 值明显高于 A、B 组 ($P < 0.05$); A、B 2 组间比较差异无统计学意义。见表 1。

2.2 Western blot 检测 C 组 Cyclin B 表达较 A、B 组明显增高 ($P < 0.05$), A、B 2 组间的比较差异无统计学意义。见图 1。

2.3 水迷宫测试 3 组大鼠训练阶段第 7~11 天寻台潜伏期均呈下降趋势 ($P < 0.05$), 但 C 组大鼠训练阶段第 9~11 天各时间点的寻台潜伏期明显长于 A、B 组 ($P < 0.05$); A、B 2 组间比较差异无统计学意义。见表 2。

表 1 3 组 Cdh1 mRNA 表达和 AI 值比较 $\bar{x} \pm s$

组别	Cdh1 mRNA	AI(%)
A 组	1.00 ± 0.08	52.77 ± 8.65
B 组	0.98 ± 0.06	52.26 ± 8.43
C 组	0.58 ± 0.06 ^a	87.56 ± 8.76 ^a

与 A、B 组比较, ^a $P < 0.05$

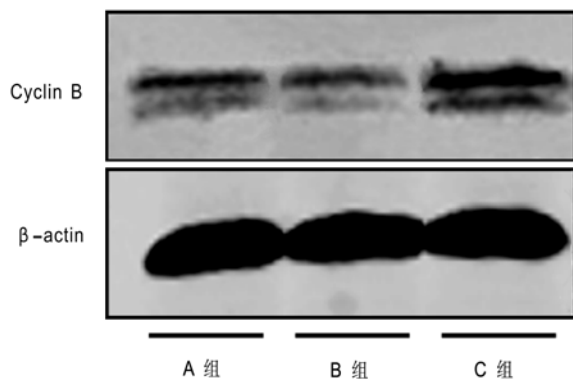


图 1 3 组 Cyclin B 的表达

表 2 3 组大鼠术后各时间点寻台潜伏期比较 $s, \bar{x} \pm s$

组别	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天
A 组	155.32 ± 6.32	135.62 ± 8.19 ^a	87.93 ± 6.19 ^a	69.77 ± 6.36 ^a	56.56 ± 6.49 ^a
B 组	156.63 ± 4.66	137.71 ± 9.46 ^a	92.17 ± 7.83 ^a	70.61 ± 7.24 ^a	58.38 ± 7.63 ^a
C 组	159.41 ± 7.54	139.41 ± 9.33 ^a	105.68 ± 9.25 ^{ab}	94.55 ± 8.28 ^{ab}	72.33 ± 7.34 ^{ab}

与前一时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与同时间点 A、B 组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

近年随着临床急救技术的提高,心肺复苏、休克、窒息、心肌梗死等危重患者的抢救成功率随之提高,而由这些疾病所导致的全脑缺血损伤以及缺血后再灌注损伤也成为研究热点,其中脑缺血再灌注损伤后如何减少神经元凋亡成为临床研究的难点。许多研究从形态学、分子生物化学等多角度证实细胞凋亡存在于脑缺血再灌注损伤中。探讨如何有效抑制细胞凋亡是减轻脑缺血再灌注损伤的一个重要环节。本研究采用全

脑缺血再灌注损伤模型探讨慢病毒介导 RNA 干扰 Cdh1 表达对脑缺血再灌注损伤的影响。

APC 是 Cylin D-Cdk4 通过 Rb 信号途径介导的 G1/S 期进程负性调控的关键分子^[7],是联系细胞内泛素蛋白酶小体系统与细胞周期成分的中间枢纽,它通过底物特异性泛素化降解细胞周期蛋白,具有泛素连接酶 E3 的功能,在细胞周期进程调控中起重要作用^[8]。Kim 等^[9]最早从蛋白质水平研究发现 APC 及其调节亚基 Cdh1 在原代培养的大鼠海马神经元中大量表达,且具有泛素化周期蛋白 B 的活性,而 CDC20 却无表达,从而开始了对中枢神经系统 APC-Cdh1 的研究。随着研究的逐渐深入发现 APC-Cdh1 在神经系统中亦可能发挥关键作用。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA(double stranded RNA)介导的基因阻抑现象,通过在多种生物细胞内导入外源或内源的双链 RNA 可特异性阻滞基因的表达功能,使内源性 mRNA 发生特异性降解,从而引起转录后的基因沉默,是生物进化中一种保守的防御机制。慢病毒载体介导 RNAi 就是将慢病毒载体高效感染和整合的特性与 RNAi 特异性抑制同源基因表达的作用相结合^[10]。作者课题组在前期的研究中发现,通过对大鼠脑立体定位注射 Cdh1RNA 慢病毒后,其发挥作用的最高峰在注射后第 3 天,大鼠全脑缺血再灌注后第 3 天海马神经元中 APC-Cdh1 表达达到显著降低。因此,为达到注射慢病毒后对 APC-Cdh1 的表达下调至最佳效果,该研究应用立体定位注射 Cdh1 RNA 慢病毒感染大鼠海马区后的第 3 天建立全脑缺血再灌注损伤模型,通过荧光定量 PCR 检测 Cdh1 表达,结果显示 C 组与 A、B 组间差异均有统计学意义,表明慢病毒准确注射于目标区域大鼠海马,且其成功下调该区域 APC-Cdh1 的表达。

近年有研究先后报道了 APC-Cdh1 在调节神经元轴突生长及神经元存活方面的作用。通过体内外研究发现,在神经系统发育过程中下调 Cdh1 表达能促进轴突生长,其发挥作用的下游底物有 Smad 核转录共抑制因子(SnoN)或 DNA 结合抑制因子 2(Id2)^[11-13]。Almeida 等^[14]研究发现 APC-Cdh1 具有抑制神经元凋亡的作用。下调成熟神经元 APC-Cdh1 活性可引起 Cyclin B 的积聚,促使神经元再次进入 S 期,引起神经元凋亡;过表达 Cdh1 可减轻淀粉样蛋白引起的神经元凋亡,推测 APC-Cdh1 的活性降低和 Cyclin B 的异常积聚可能是阿尔茨海默病及其他神经退行性疾病神经元凋亡的机制之一。该研究结果显示,C 组 Cyclin B 表达较 A、B 组增高,同时 C 组 AI 大

于 A、B 组,表明通过对大鼠海马立体定向注射重组慢病毒可下调海马组织 Cdh1 表达,同时 Cyclin B 表达升高,而海马区神经元凋亡增加。推测 APC-Cdh1 的活性降低和 Cyclin B 的异常聚积可能是全脑缺血再灌注后神经元凋亡的机制之一。

全脑缺血再灌注后大鼠的行为学发生明显改变。有研究表明大鼠全脑缺血后其运动能力明显受损^[15],主动和被动回避反应均有所降低^[16],表明脑缺血对大鼠的认知功能产生损害。该研究结果显示,C 组脑缺血再灌注后第 9、10、11 天的潜伏期较 A、B 组延长,表明脑缺血再灌注后大鼠的学习和记忆能力严重受损。因此,也有研究者认为此模型可作为脑血管性痴呆的模型^[17]。中枢神经系统的神经元对缺血再灌注损伤存在不同的敏感性。脑缺血再灌注后学习和记忆功能的损害可能是脑缺血再灌注后海马组织损伤的直接结果,也可能是海马 CA1 区锥体细胞受损后的行为学表现。

综上所述,推测 APC-Cdh1 可能通过底物 Cyclin B 促进神经元凋亡,这为探讨通过干预 Cdh1 的表达治疗脑缺血奠定了理论基础,但其具体机制尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death[J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(2): 193-205.
- [2] Vogel G, Nobel P. Gold medal from cellular trash[J]. *Science*, 2004, 306(3): 400-401.
- [3] Wojcik C, Napoli M. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition; new strategies in stroke therapy[J]. *Stroke*, 2004, 35(12): 1506-1518.
- [4] Cernak I, Stoica B, Byrnes KR, et al. Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(8): 1286-1293.
- [5] Yamaguchi M, Calvert JVV, Kusaka G. One-stage anterior approach for four-vessel occlusion in rat[J]. *Stroke*, 2005, 36(16): 2212-2214.
- [6] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Methods*, 2008, 3(11): 1101-1108.
- [7] Binne UK, Classon MK, Dick FA, et al. Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(2): 225-232.
- [8] Acquaviva C, Pines J. The anaphase-promoting complex/cyclosome; APC/C[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(15): 2401-2404.
- [9] Kim AH, Bonni A. Thinking within the D box; initial identification of Cdh1-APC substrates in the nervous system[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(2): 281-287.
- [10] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. *Science*, 1996, 272(2): 263-267.
- [11] Konishi Y, Stegmüller J, Matsuda T, et al. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain[J]. *Science*, 2004, 303(11): 1026-1030.
- [12] Lasorella A, Stegmüller J, Guardavaccaro D, et al. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth[J]. *Nature*, 2006, 442(6): 471-474.
- [13] Roessel P, Elliott DA, Robinson IM, et al. Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase-promoting complex[J]. *Cell*, 2004, 119(5): 707-718.
- [14] Almeida A, Bolanos JP, Moreno S. Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(8): 8115-8121.
- [15] 张军艳, 张博爱, 朱红灿, 等. 学习记忆训练对全脑缺血大鼠认知能力的影响及其胆碱能机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(3): 305-309.
- [16] 沈维高, 何欣, 冯利民, 等. 老年大鼠在空间辨别性学习记忆时海马 ACh 和 ACh 能纤维的变化[J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(12): 1528-1529.
- [17] 章卫桥, 张宁, 周三权, 等. 全脑缺血伴发癫痫的早期病理损伤研究[J]. *立体定向和功能性神经外科杂志*, 2008, 21(2): 132-135.

欢 迎 投 稿