

Anti-apoptosis effect of bcl-xl on retinal ganglion cells by ultrasound-mediated microbubble destruction

LI Wei¹, LIU Su^{1*}, WANG Zhi-gang²

(1. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China;

2. Institute of Ultrasonic Image, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To assess the effect of bcl-xl gene on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis on cultured retinal ganglion cells (RGCs) by ultrasound-mediated microbubble destruction. **Methods** RGCs were cultured in 24-well plates. NMDA-induced apoptosis in cultured RGCs was established. The experiment was divided into three groups: control, NMDA treatment and bcl-xl transfection+NMDA treatment group (bcl-xl gene was transfected into RGCs 48 h by ultrasound-mediated microbubble destruction before NMDA-induced apoptosis was established). The expression of bcl-xl protein in transfected and non-transfected RGCs was assessed by immunohistochemistry assay. The morphotic character of RGCs was revealed by acridine orange and ethidium bromide staining. DNA fragment was detected by agarose gel electrophoresis. **Results** The expression of bcl-xl protein in transfected and non-transfected RGCs was different. Lots of apoptotic bodies was found in NMDA treatment group, less were found in the other two groups. Representative DNA fragment was detected in the NMDA treatment group. **Conclusion** Transfection of bcl-xl has anti-apoptosis effect on cultured RGCs from apoptosis induced by NMDA with ultrasound-mediated microbubble destruction. It may be a promising gene therapy for retinal and optic nerve diseases.

[Key words] Ultrasound contrast agent; Retinal ganglion cells; Apoptosis; Bcl-xl; Gene therapy

超声微泡介导 bcl-xl 基因抗视网膜神经节细胞凋亡作用的实验研究

李 伟¹, 刘 苏^{1*}, 王志刚²

(1. 重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010;

2. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

[摘 要] **目的** 评价超声微泡介导 bcl-xl 基因抗视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡的作用。**方法** 体外混合培养 Long Evans 大鼠 RGCs, 并建立 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)损伤的 RGCs 凋亡模型。将体外培养的 RGCs 分为 A 组(正常对照组), B 组(NMDA 组), C 组(bcl-xl 转染+NMDA 组); 其中 C 组在加入 NMDA 前 48 h 用超声微泡介导 bcl-xl 转染 RGCs。转染 48 h 后采用免疫组化分析转染细胞和未转染细胞的 bcl-xl 蛋白水平; 加入 NMDA 36 h 后采用吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双荧光染色检测细胞凋亡的形态特征, 琼脂糖电泳检测细胞凋亡 DNA 片断。**结果** 免疫组化检测表明转染细胞与未转染细胞的 bcl-xl 蛋白表达水平有差异, AO/EB 检测发现 B 组可见大量凋亡小体, C 组可见少许凋亡细胞。琼脂糖电泳检测亦发现 B 组呈典型的 DNA“梯度”条带, 而 A 组和 C 组无明显的 DNA“梯度”条带。**结论** 超声微泡介导 bcl-xl 基因抗视网膜神经节细胞凋亡有一定作用, 有可能为视网膜视神经疾病的基因治疗提供一种新的方法。

[关键词] 超声造影剂; 视网膜神经节细胞; 凋亡; bcl-xl; 基因疗法

[中图分类号] R445.1; Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2006)08-1147-04

[基金项目] 本研究受国家自然科学基金重点项目资助(30430230)。

[作者简介] 李伟(1977—), 女, 四川人, 在读硕士, 住院医师。研究方向: 青光眼。E-mail: liwei_cqums@yahoo.com

[通讯作者] 刘苏, 重庆医科大学附属第二医院眼科, 400010。E-mail: liusu2836@sina.com

[收稿日期] 2006-04-29 **[修回日期]** 2006-05-30

随着对青光眼病理机制研究的不断深入,人们认识到青光眼的治疗仅仅降低眼压是不够的,还需考虑如何从其他途径进一步保护视神经,防止或延迟对视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的损害,从而提出了青光眼治疗的新概念——视神经保护,这也是21世纪青光眼研究的方向和热点。针对青光眼这种以RGCs凋亡为关键环节的疾病,我们建立了RGCs兴奋毒性损伤模型,利用前期实验——超声微泡介导报告基因在视网膜神经节细胞表达的实验研究——所得最佳转染效率的参数,进行超声微泡介导抗凋亡基因bcl-xl抗RGCs凋亡的研究,希望为视神经保护提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 质粒SFFV. neo-bcl-xl的制备及鉴定 按常规方法复苏大肠杆菌DH5a,将质粒SFFV. neo-bcl-xl按经典氯化钙法转化细菌并扩增,按试剂盒(EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qia-gen公司,德国)要求抽提,纯化质粒。取少量质粒用*Pst* I酶切,1%琼脂糖电泳鉴定酶切结果。

1.2 视网膜神经节细胞体外混合培养及鉴定 参照文献^[1]方法制备鼠尾胶原,无菌条件下抽出Long Evans大鼠尾腱,以每克尾腱50 ml的比例,加入0.3%醋酸溶液,4℃放置1周后离心(3000 r/min, 20 min),取上清液分装保存。用前稀释鼠尾胶原并涂于预置盖玻片的24孔培养板,37℃烘干。将出生后1~2天的Long Evans大鼠置于75%的乙醇中浸泡1~2 min后,在超净工作台的弯盘中断头摘出眼球。按照常规方法制备细胞悬液及接种培养,并采用小鼠抗大鼠Thy-1.1单克隆抗体免疫细胞化学法鉴定RGCs。

1.3 超声微泡介导转染细胞操作模型 取声诺维(注射用六氟化硫微泡)1支,加生理盐水调节微泡混悬液浓度至45 μg/ml,再加入浓度50 μg/ml的质粒DNA于微泡混悬液中轻柔混匀,置于4℃冰箱中30 min。培养板中每孔换入100 μl不含抗生素和血清的DMEM培养液,加入100 μL微泡质粒混合液,37℃孵育3 h。采用超声频率300 kHz、声强1.25 W/cm²、连续波、照射60 s后,立即将24孔培养板置于CO₂浓度为5%的细胞培养箱内,37℃温育6 h,吸出转染液,加DMEM培养液继续培养。

1.4 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)损伤模型的建立 RGCs培养3天后,取24孔板的细胞,分为A、B、C组,其中A组为正常对照组,B组为NMDA模型组,C组为bcl-xl转染+NMDA模型组。C组的细胞为培养1天后超声微泡介导bcl-xl转染的细胞。在B、C组加入浓度为20 nmol/L NMDA后,放回二氧化碳培养箱中继续培养12~36 h,在此期间倒置显微镜下密切观察细胞变化,发现B组大多数细胞胞体皱缩、变圆、脱落,轴突断裂时,取各组细胞进行实验分析。

1.5 免疫组化检测 bcl-xl转染48 h后,S-P免疫细胞化学染色法检测bcl-xl蛋白的表达。按S-P试剂盒说明书进行。一抗为小鼠抗人多抗克隆抗体,二抗由试剂盒提供,用DAB显色。镜下观察,胞浆呈原色为阴性,胞浆呈棕色或棕褐色为阳性。

1.6 细胞凋亡的形态学检测 加入NMDA 36 h后,倒置显

微镜观察未染色细胞形态特征,并取出长在盖玻片上的细胞,微干,然后将100 mg/L溶于PBS的吖啶橙和100 mg/L溶于PBS的溴化乙锭(EB)各5 μl混匀后加入,轻轻吹打,30 s后用激光共聚焦显微镜观察照相。

1.7 琼脂糖电泳检测 加入NMDA 36 h后,各组收集细胞,分别取 2×10^6 细胞,加入500 μl细胞裂解液(10 mmol/L Tris+HCl, 10 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 50 mg/ml RNA酶,pH值为7.4)37℃处理30 min,再加入0.1 mg/ml蛋白酶K 50℃处理3 h,然后用等体积酚/氯仿抽提两次,12 000 g 5 min离心,收取上清,然后加入1/10体积的3 mol/L的醋酸钠和2.5倍体积的无水乙醇-20℃过夜沉淀DNA,12 000 g 10 min离心,沉淀重悬于TE中,1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色并照相。

2 结果

2.1 质粒SFFV. neo-bcl-xl酶切鉴定 SFFV. neo-bcl-xl质粒经*Pst* I酶切后,电泳显示有一条单一的5.1 kb条带,根据SFFV. neo-bcl-xl图谱分析,该质粒含有单一的*Pst* I酶切位点,全长为5.1 kb左右,故可验证所获质粒确为SFFV. neo-bcl-xl(图1)。

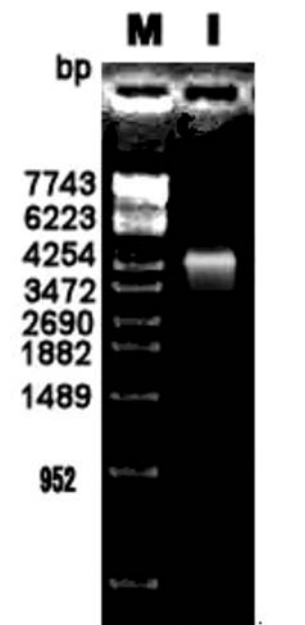


图1 SFFV. neo-bcl-xl质粒*Pst* I酶切鉴定。M:λ-EcoT14I digest DAN Maker; I: SFFV. neo-bcl-xl质粒被酶切的条带

2.2 GRCs形态学观察及鉴定 倒置显微镜下观察,细胞接种培养4~6 h开始贴壁,24 h后细胞基本完全贴壁。24 h后少数细胞膜上伸出短而小的突起;48 h后细胞体积较前稍增大,伸出突起细胞增多(图2);72 h后胞体进一步增大,突起进一步增长,少数细胞形成典型的细胞突起,且突起相互连接。细胞免疫化学染色后在倒置荧光显微镜下观察见RGCs呈阳性反应,表现为圆形或椭圆形黄绿色荧光,部分视野可见RGCs伸出的突起(图3)。

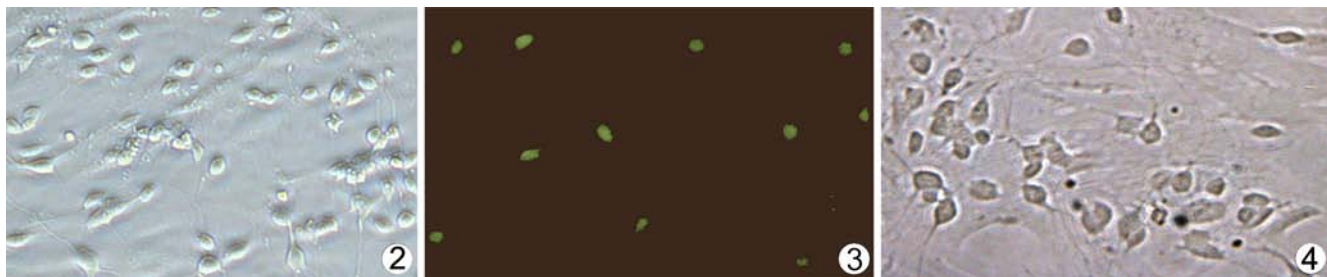


图2 培养2天的RGCs(相差显微镜×200) 图3 混合培养2天的RGCs, Thy1.1单克隆抗体的细胞显示绿色(免疫荧光×200) 图4 未转染 bcl-xl 的RGCs的 bcl-xl 蛋白表达多数细胞呈淡棕色(DAB显色×200)

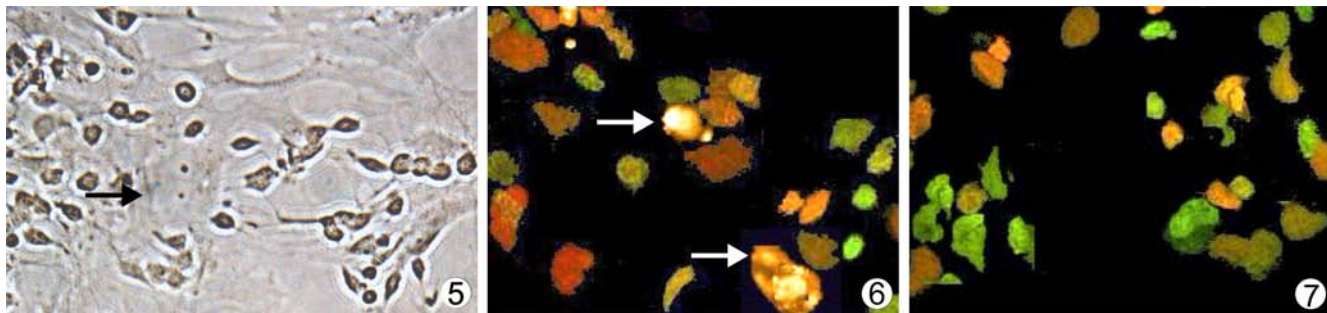


图5 转染 bcl-xl 的RGCs的 bcl-xl 蛋白表达多数细胞呈深棕色(DAB显色×200) 图6 AO/EB染色未转染 bcl-xl 组多数为橘红色凋亡细胞,核浓染,核固缩或为典型的凋亡小体(箭头)(激光共聚焦显微镜×400) 图7 AO/EB染色转染 bcl-xl 组大多数为绿色活细胞,少数核浓染,核固缩(激光共聚焦显微镜×400)

2.3 免疫组化检测 转染48 h后,S-P免疫细胞化学染色法检测 bcl-xl 蛋白的表达,发现未转染细胞多数呈浅棕色,转染细胞多数呈深棕色,表明转染细胞与未转染细胞的 bcl-xl 蛋白水平有差异(图4、5)。

2.4 细胞凋亡的形态学检测 加入NMDA后12~36 h于倒置显微镜下观察,发现B组多数细胞胞体皱缩、变圆、脱落,轴突断裂。当B组中绝大多数神经元受损时,C组多数神经元仍维持正常形态,细胞间轴突可见,仅少数细胞胞体皱缩、变圆、脱落,轴突断裂。而A组大量神经元维持正常形态,轴突不断裂。激光共聚焦显微镜下,可见B组多数为橘红色凋亡细胞,核浓染,核固缩或为典型的凋亡小体(图6),而C组大多数为绿色活细胞,少数核浓染,核固缩(图7)。

2.5 DNA琼脂糖凝胶电泳图可见B组的DNA出现明显的“梯状”,而A组和C组几乎无“梯状”DNA(图8)。

3 讨论

随着青光眼发病机制的深入研究,已证明兴奋性氨基酸与青光眼视网膜神经节细胞凋亡密切相关。Nakazawa等^[2]在玻璃体内注射NMDA 1~200 nmol后表现药物剂量依赖性RGCs丧失;Sihprandi等在成年鼠玻璃体内注射仅20 nmol/L NMDA就可杀死70%的RGCs。本实验在体外培养RGCs中加入20 nmol/L NMDA,观察发现B组中绝大多数细胞受损,且大神经元损伤显著,而小神经元损伤较轻。该结果与Luo等^[3]学者的报道结果一致,即大神经元对兴奋性氨基酸兴奋毒性损伤最敏感;与青光眼性视神经病变中大RGCs受损相似。

细胞凋亡是级联式基因表达的结果。细胞内部的基因直

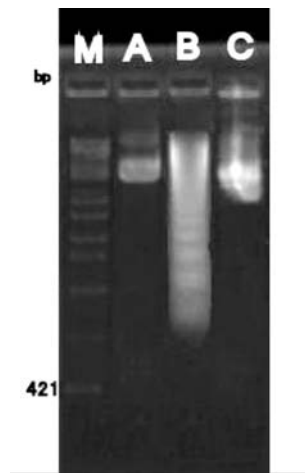


图8 DNA琼脂糖凝胶电泳 M:DNA Marker; A:正常对照; B: DNA呈“梯状”条带; C:未见明显DNA“梯状”

接控制着凋亡的发生与发展,细胞外部因素通过信号传导而影响这些基因的表达,从而间接地调控细胞凋亡。目前已发现多种基因编码的产物参加凋亡的控制,其中与RGCs凋亡研究最深入的是 bcl-2 家族。在 mRNA 和蛋白水平对 bcl-2 家族蛋白通过克隆分析和数量测定证明:在大鼠视网膜神经节细胞中 bcl-xl 的信息量是 bcl-2 的16倍,且所有的视网膜神经节细胞均表达 bcl-xl,说明在成年鼠视网膜中 bcl-xl 是 bcl-2 家族主要成员,它可以维持有丝分裂后细胞的长期生存,视神经轴索切断后开始阶段 bcl-xl 表达升高但不久其表

达水平下降,这种改变可能与神经节细胞凋亡增加有关。本实验通过超声微泡介导 bc1-xl 抗视网膜神经节细胞凋亡, DNA 片断化检测结果显示 B 组的 DNA 出现明显“梯状”,而 A 组和 C 组不明显。细胞凋亡时主要的生化特征是其染色质发生浓缩,染色质 DNA 在核小体单位之间的连接处断裂,形成 50~300 kbp 长的 DNA 大片段,或 180~200 bp 整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱;B 组出现了明显的梯形图谱,说明 B 组细胞凋亡较多。同时,倒置显微镜及激光共聚焦显微镜观察显示 B 组细胞出现皱缩、变圆、脱落并可见大量的凋亡小体;C 组与 B 组比较活细胞较多,并以大 RGCs 为主;C 组与 A 组比较凋亡细胞仍较多。上述表明超声微泡介导 bc1-xl 基因抗视网膜神经节细胞凋亡有一定作用,但不能完全阻止凋亡的发生。这可能与 RGCs 凋亡是多因素多环节作用结果,还与超声微泡介导基因转染细胞的效率有关。

超声介导微泡破裂增强基因转染效率的研究报告差异较大,现有的报道从 4 倍至几百倍不等^[4,5]。在前期探讨超声介导微泡破裂优化转染条件的实验中,发现与单纯超声质粒组相比,超声微泡质粒组 RGCs 转染率增加约 5 倍。超声微泡增强基因转染效率的确切机制尚不明确,有学者^[6,7]认为超声空化效应引起细胞膜通透性增加,促进质粒 DNA 进入细胞内,加入的微泡通过降低空化阈值和增强空化效应进一步提高了基因的转染效率。通过调整超声声强,照射时间,微泡和质粒的浓度后,转染效率明显提高;筛选实验发现频率 300 kHz、声强 1.25 W/cm²、连续波、照射时间 60 s、微泡浓度 45 μg/ml,质粒浓度 50 μg/ml 时转染效率较高为 (26.87 ± 3.12)%;该转染效率尚不十分理想,需进一步制备靶向微泡提高转染效率。

本实验所用超声是专用基因转染治疗仪,所用微泡造影剂——声诺维^[8],是一种新型脂质膜包裹六氟化硫(SF₆)形成的第二代超声微泡造影剂,其单层膜的结构特点和 SF₆ 的特性决定了其良好的声学特性、稳定性和安全性。微泡造影作

为一种载体的研究仍处于基础阶段,进一步的研究包括如何将微泡与基因高效结合以及进行更多的在体动物实验。随着靶向微泡研制的成功,超声破裂微泡介导基因转染细胞可能为视网膜视神经疾病的基因治疗提供潜在而有效的新方法。

[参考文献]

[1] Zhang JB. Cell and Tissue Culture Technology[M]. Beijing: Peoples Medical Publishing House, 2002:14.
张静波. 细胞和组织培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 14.

[2] Nakazawa T, Shimura M, Endo S, et al. N-Methyl-D-Aspartic acid suppresses Akt activity through protein phosphatase in retinal ganglion cells[J]. Mol Vis, 2005, 11:1173-1182.

[3] Luo X, Heidinger V, Picaud S, et al. Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(5):1096-1106.

[4] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle[J]. Gene Ther, 2002, 9(6):372-380.

[5] Unger EC, Hersh E, Vannan M, et al. Local drug and gene delivery through microbubbles[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2001, 44(1): 45-54.

[6] Shohet RV, Chen S, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium[J]. Circulation, 2000, 101(22):2554-2556.

[7] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound[J]. Circulation, 2002, 105(10):1233-1239.

[8] Schneider M. Contrast media in ultrasonography: from synthesis to clinical use. The SonoVue example[J]. Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2002, 51(4):218-220.



关于统计获奖论文和有创新性成果 论文的通知

本刊创刊近 20 年来,有大量优秀论文获奖或报道了创新性成果,这是作者的成绩也是杂志的荣誉。请 2003—2005 年有获奖论文或有创新性成果论文的作者与本刊编辑部联系,并将获奖证书复印件(或扫描件)寄至本刊编辑部。本部将根据获奖级别给予宣传与奖励,并在以后工作中给予更多的关注与支持。

获奖论文是指成果报奖时列出的,在成果获奖前发表的文章,有获奖证书。有创新性成果论文是指报道的成果属新材料、新设计、新工艺、新设备等,有专利证书或成果鉴定证书。

联系地址:北京市海淀区罗庄南里宏嘉丽园 1 号楼 301 室 中国医学影像技术编辑部;邮编:100088。
电话:010-82050373;传真:010-82050374。
电子邮箱:cjmit@cjmit.com。