

Bcl-xl 基因对硝普钠诱导 SY5Y 细胞凋亡的抑制作用

杨炼红^{1*}, 蒋龙元², 蔡晓冬³, 刘淑琼¹, 吴秀勤¹, 刘 军¹, 陶恩祥¹

(中山大学 1. 孙逸仙纪念医院神经内科, 2. 孙逸仙纪念医院急诊科, 广东广州 510120; 3. 附属第一医院神经内科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究 *Bcl-xl* 基因对成人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞毒性的影响。【方法】将构建好的 *Bcl-xl* 基因重组真核表达载体 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 转染 SH-SY5Y 细胞, 并分为正常组、pIRES2-EGFP 空质粒转染组、pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 质粒转染组, 利用凋亡诱导剂硝普钠(50 $\mu\text{mol/L}$) 诱导各组细胞凋亡, 行 Hoechst33258 细胞染色对比观察各组细胞凋亡情况, 通过 MTT 法分析各组细胞存活率。RT-PCR 与 Western blotting 检测转染后 *Bcl-xl* 基因的表达情况。【结果】转染 SH-SY5Y 细胞后, 检测结果显示 *Bcl-xl* 基因能够高效转染并在此细胞中蛋白表达。相对于未转染细胞来说, 转染细胞能部分对抗硝普钠诱导的凋亡, MTT 显示有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】*Bcl-xl* 基因能够通过升高基因的表达抑制 NO 诱导的类神经元细胞死亡, 同时也能间接说明硝普钠产生的 NO 对细胞的毒性可能大部分是通过凋亡途径来产生的。

关键词: *Bcl-xl* 基因; SH-SY5Y; 硝普钠; 凋亡; 基因治疗

中图分类号: R741.02 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)04-0449-05

Inhibition Effect of *Bcl-xl* Gene on Apoptosis of SY5Y Cells Induced by Sodium Nitroprusside

YANG Lian-hong^{1*}, JIANG Long-yuan², CAI Xiao-dong³, LIU Shu-qiong¹, WU Xiu-qin¹, LIU Jun¹, TAO En-xiang¹
(1. Department of Neurology, 2. Department of Emergency, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To study the effect of *Bcl-xl* gene on cytotoxicity of SH-SY5Y cells induced by sodium nitroprusside. 【Methods】 The plasmid pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* was transfected into SH-SY5Y cells. Three groups were designed: A) normal control group; B) pIRES2-EGFP control group; C) pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* group. After SH-SY5Y cells being treated with sodium nitroprusside (50 $\mu\text{mol/L}$), the apoptosis was valued by Hoechst33258 stain. In addition, MTT was employed to test cell viability. We also did RT-PCR and Western blotting to investigate *Bcl-xl* gene expression. 【Results】 By transfection of pIRES2-EGFP/*Bcl-xl*, *Bcl-xl* gene could effectively express in SH-SY5Y cells. Supported by MTT results, *Bcl-xl* gene was able to partially reduce cell death induced by sodium nitroprusside. 【Conclusion】 Transfection of *Bcl-xl* gene can increase the expression of *Bcl-xl* and thus lead to weaken cell death induced by NO supplied by sodium nitroprusside. This result supports that cytotoxicity induced by SNP is mainly mediated via the process of apoptosis.

Key words: *Bcl-xl* gene; SH-SY5Y; sodium nitroprusside; apoptosis; gene therapy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(4): 449-453; 459]

在中枢神经系统内, 生理水平的 NO 是一种胞内信使分子, 对维持正常生理活动有着重要的作用。高浓度的 NO 可产生神经毒性, 导致多种神经系统疾病, 如阿尔茨海默病、帕金森病、多发性

硬化、脑血管病等^[1]。然而, NO 的细胞毒性机制目前仍还不十分清楚。目前认为, NO 既可以诱导细胞凋亡, 也可以引发细胞坏死, 其中, 凋亡可能为主要途径。因此确认这种凋亡途径且选择性地阻

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B36004016); 广东省自然科学基金(S2011010004626)

作者简介: 杨炼红, * 通信作者, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 癫痫的诊断与治疗, E-mail: wuxiuqin1987@yahoo.com.cn

断这种途径以期改变这种疾病的进程为本实验的根本目的。以往,抗凋亡基因研究多集中在 *Bcl-2* 上,但仍有研究发现,导入 *Bcl-2* 基因后并没有抑制细胞凋亡,反而促进了凋亡,他们认为 *Bcl-2* 在不同细胞中凋亡的作用是有差别的^[2]。*Bcl-xl* 的结构和 *Bcl-2* 相似,在多种细胞中扮演抑制凋亡角色。国内外已有学者将其应用于抗神经细胞凋亡的各种研究中,并取得良好效果^[3-5]。González-García 等^[6]研究还发现 *Bcl-2* 在成熟的中枢神经系统的表达水平明显较 *Bcl-xl* 低,他们认为,*Bcl-xl* 蛋白在中枢神经系统保护神经元方面可能发挥着重要的作用。因此,本研究选择 *Bcl-xl* 基因作为研究对象,探索其对抗 NO 毒性的作用。本实验中,拟以硝普钠作为 NO 供体处理人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞,模拟高浓度 NO 的细胞毒性现象,构建抗凋亡基因 *Bcl-xl* 的真核表达载体并行转染,观察其对于 NO 的细胞毒性是否具有抑制作用,以期为中心神经系统疾病治疗提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及来源

主要包括:真核表达载体 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 由本实验室构建保存;DNAMarker,逆转录酶,聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(Takara 公司),Lipofectamine2000 转染试剂盒和 Trizol(Invitrogen 公司);胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程公司);SNP(Sigma 公司);ECL 发光液(Bio-Rad 公司);免疫组织化学 ABC 试剂盒(武汉博士德生物制品公司);鼠抗人 *Bcl-xl*(Invitrogen 公司)和 β -actin 多抗(康成公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 SH-SY5Y 细胞培养 SH-SY5Y 细胞株由中山大学药理教研室馈赠。细胞培养于含有体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在体积分数 5% CO₂、37 °C 的条件下培养。每隔 48 h 换培养液,当单层细胞培养细胞汇合以后,传代培养。

1.2.2 硝普钠诱导细胞凋亡 弃原培养基,用无血清 DMEM 洗 3 次。换无血清 DMEM,分别加不同浓度的(200、100、50、0 μ mol/L)硝普钠(SNP)作用 24 h,收集细胞进行实验,每组至少重复 3 次,

观察各组浓度 SNP 对细胞的影响,送流式细胞仪检测,并行 MTT 试验对细胞存活率进行检测。最终选取 50 μ mol/L 为实验浓度。

1.2.3 细胞转染并分组 转染前一天铺板,以便转染时细胞密度有 60%,借助 Lipofectamine2000 转染试剂将构建好的 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 质粒转进 SY5Y 细胞中,利用荧光显微镜及流式细胞仪判断转染效率。本实验设正常组(A)、pIRES2-EGFP 空质粒转染组(B)、pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 质粒转染组(C),各组细胞生长 48 h 后,分别用 50 μ mol/L SNP 行药物诱导。

1.2.4 Hoechst33258 细胞染色 SNP 作用于转染组细胞 24 h 后,吸出培养基,冰 PBS 冲洗 2 次,40 g/L 多聚甲醛液固定 20 min,冰 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,Hoechst33258 10 μ g/mL 常温染色 5 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,荧光显微镜下观察核染情况。

1.2.5 MTT 比色法测定细胞活性 SH-SY5Y 细胞以每孔 10⁴/mL 接种于 96 孔培养板,每孔体积 200 μ L,转染并实验分组,培养 24 h,然后分别加入 50 μ mol/L SNP,继续培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μ L,37 °C 孵育 4 h,离心弃去上清,再加入 200 μ L DMSO 充分振荡,在酶标仪上于 490 nm 波长处测定吸光度(D)值。以 $D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 定义为细胞存活率。其中对照组为正常接种细胞,未转染,未加药物。

1.2.6 RT-PCR 法检测细胞转染后 *Bcl-xl* 基因的 mRNA 转录情况 用分子克隆方法提取 C 组转染前、转染后 24 h、转染后 48 h、转染后 72 h、转染后 96 h 细胞总 RNA,紫外分光光度仪测吸光度值并定量,取等质量总 RNA 和 Oligo dT 引物,使用 TaKaRa PrimeScript™ RT-PCR Kit 行 RT-PCR 反应。反应得到产物 cDNA,使用 *Bcl-xl* 引物(由 Takara 公司合成)和 GAPDH 内参引物常规进行 PCR 反应,反应条件:94 °C 5 min,(94 °C 30 s、52 °C 30 s、72 °C 30 s)28 个循环,72 °C 7 min。将 PCR 反应产物行 2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像仪下观察并照相。实验独立重复 3 次。

1.2.7 Western blotting 检测转染后细胞蛋白表达情况 按分子克隆方法提取 C 组转染前、转染后 24 h、转染后 48 h、转染后 72 h、转染后 96 h 细胞总蛋白,经 BCA 分析方法定量,各组取 10 μ g 总蛋白进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转印到 PVDF 膜上,用 Bio-Rad 封闭液封闭非特异性抗

原,先用小鼠抗人 *Bcl-xl* 一抗 4 ℃ 孵育过夜。次日 TBST 洗膜,HRP 标记的羊抗小鼠二抗,37 ℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜后,接着使用小鼠抗人 β -actin HRP 直接标记的抗体 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后 ECL 荧光显色,实验独立重复 3 次,图像分析系统测定灰度比值。

1.3 统计学处理

本实验数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和卡方检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜及流式细胞仪检测转染效率

如图 1 所示,显微镜下观察,发出绿色荧光的细胞即为转染成功并有蛋白表达的细胞。因为构建的是融合蛋白,所以具有绿色荧光的细胞都能表达目的蛋白 *Bcl-xl*。经流式细胞仪检测,转染效率约为 63%,且各转染组之间细胞活性未受影响(图 1D)。

2.2 转染后 *Bcl-xl* 基因转录情况

如图 2 所示,1%的琼脂糖凝胶电泳后扫描并用凝胶成像系统分析,空白对照组有很微弱的电泳带,转染不同时间后电泳带较空白对照组都明显增强,而其中转染 48 h 的条带最强,均在 700 bp 附近,说明神经母细胞瘤细胞自身可分泌少量 *Bcl-xl*,转染后表达均增强,而在转染后 48 h 组 mRNA 表达最强,之后又渐减弱。

2.3 转染后基因表达情况

如图 3 所示,未转染组、转染 24 h 组、转染 48 h 组可见弱曝光带,强度一致,而转染 72 h 组,转染 96 h 组见较前 3 组明显增强曝光带,其中转染 72 h 组亮度最强,位于 32 ku 左右。同时,各组间 β -actin 强度一致。

2.4 SNP 对细胞影响

光镜下可以观察到,随着 SNP 浓度的升高,细胞突起回缩或断裂,胞体固缩,呈圆点状,网络消失。流式细胞仪检测也发现,凋亡率逐渐增高,并有浓度依赖性(图 4B)。MTT 比色试验结果也提示

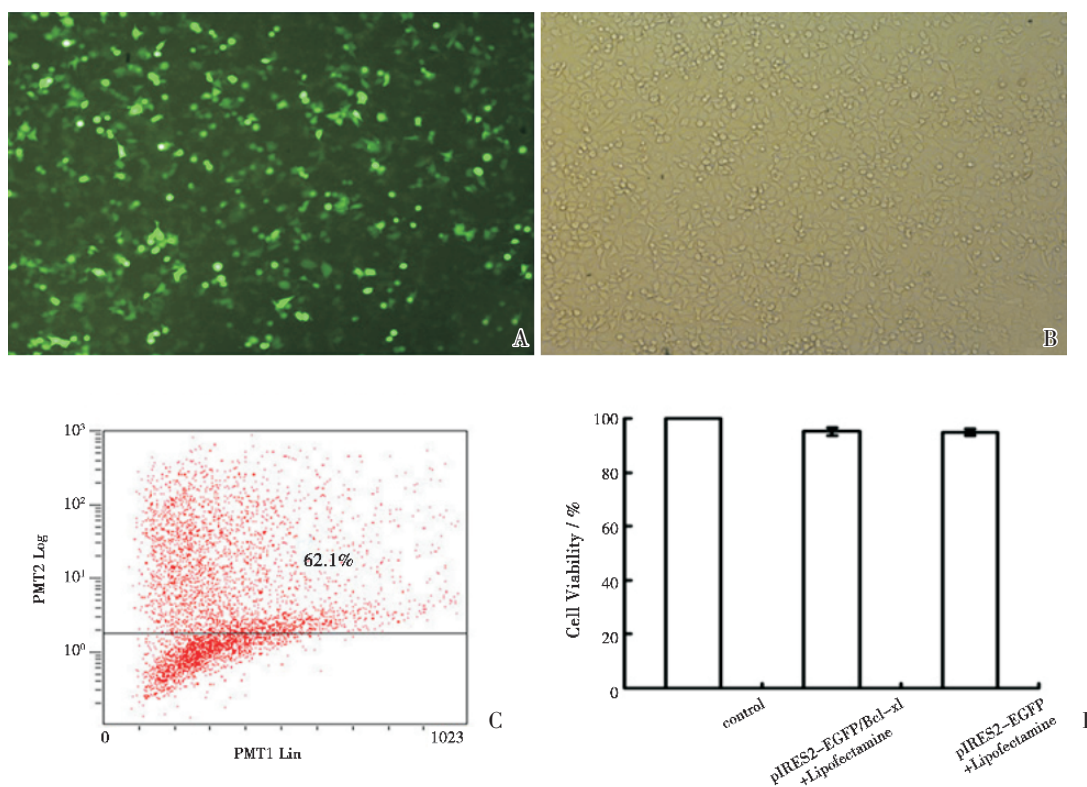


图 1 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 转染 SH-SY5Y 细胞 48 h 转染效率

Fig.1 Transfection efficiency 48 h after transfecting pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* into SH-SY5Y cells

A: The transfected cells presented green under a fluorescent microscope, $\times 100$; B: The cells under bright field microscope; C: Transfection efficiency calculated by flow cytometry; D: Comparison of transfection cytotoxicity between groups using MTT assay. pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* + lipofectamine; Cells transfected with pIRES2-EGFP/*Bcl-xl*. pIRES2-EGFP + lipofectamine; Cells transfected with pIRES2-EGFP.

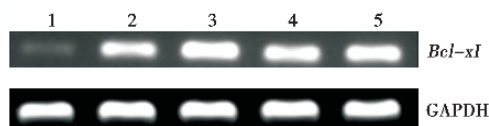


图 2 转染前及转染后不同时间点 RT-PCR 电泳图

Fig.2 RT-PCR for *Bcl-xl* of different time points

Lane 1: Before transfection; Lane 2-5: 24, 48, 72, and 96 h after transfection, respectively.

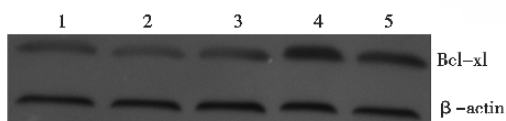


图 3 转染前及转染后不同时间点 Western-blot 图

Fig.3 Western-blot for *Bcl-xl* of different time points

Lane 1: Before transfection; Lane 2: 24 h after transfection; Lane 3: 48 h after transfection; Lane 4: 72 h after transfection; Lane 5: 96 h after transfection

随着 SNP 浓度的升高, 细胞存活率逐渐降低 (图 4A)。本实验中最终选取 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验浓度。

2.5 荧光显微镜下观察凋亡

Hoechst33258 染色后, 荧光显微镜下观察, 正常细胞核呈蓝色或淡蓝色, 着色均匀, 有时可见核分裂像, 仅个别细胞核染色较深 (图 5A), 而 50 $\mu\text{mol/L}$ SNP 作用的细胞染色后发现约 30% 为凋亡细胞 (图中箭头所指), 与流式细胞结果相符: 呈核浓染, 核固缩或为典型的凋亡小体 (图 5B)。而 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 质粒转染组则凋亡细胞明显减少, 仅小部分胞核呈浓染状, 约 10% 左右。 (图 5D)。

2.6 存活率检测

如图 6, 可以看出在 SNP 作用后, 各组细胞行 MTT 检测, pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 质粒转染组存活率比正常组和 pIRES2-EGFP 空质粒转染组都要高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而正常组和 pIRES2-EGFP 空质粒转染组之间存活率则无明显统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

在本研究中可以观察到: ① *Bcl-xl* 基因在 SY5Y 中有弱表达, 将构建质粒 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl* 转染入该细胞后 48 h, 转录水平最高, 而 72 h

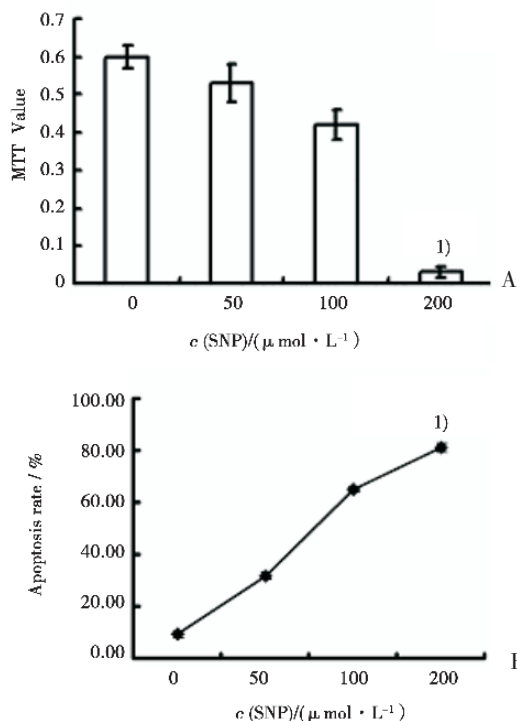


图 4 不同浓度硝普钠处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后对细胞活性的影响

Fig.4 Dose-dependent changes of SH-SY5Y cell viability induced by SNP

SH-SY5Y cells were treated with SNP at 0, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$. After 24 h incubation in 37 $^{\circ}\text{C}$, cell viability was measured with MTT assay (A), and apoptosis rate was measured with flow cytometry (B). 1) $P < 0.05$ for concentration-dependence

为翻译高峰状态, 符合生物学表达规律。②硝普钠 (SNP) 对 SH-SY5Y 细胞具有凋亡效应, 而且与剂量有依赖性。③在 SNP 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其细胞毒性效应能被 *Bcl-xl* 部分抑制。

Bcl-xl 是 *Bcl-2* 家族中新近研究较多的一个基因, 它被认为可以阻断凋亡途径中最为关键的步骤——细胞色素 C 的释放, 具备强大的抗凋亡作用^[7], 目前被广泛地运用于各种研究中。这可能是因为报道认为 *Bcl-2* 在成熟的中枢神经系统中表达较 *Bcl-xl* 弱有关^[6]。外源性 *Bcl-xl* 基因在 SH-SY5Y 细胞的表达时间还不清楚。在我们的实验中发现, SH-SY5Y 细胞本身表达 *Bcl-xl* 基因较弱, 外源性的 *Bcl-xl* 基因转录高峰期在转染后的 48 h, 翻译的高峰期在转染后的 72 h, 随后渐减弱。因此, 在本实验中, 为了尽可能保证 *Bcl-xl* 的作用, 我们选择在转染后的 48 h 使用硝普钠。

硝普钠是 NO 的供体。在本实验中, 我们利用

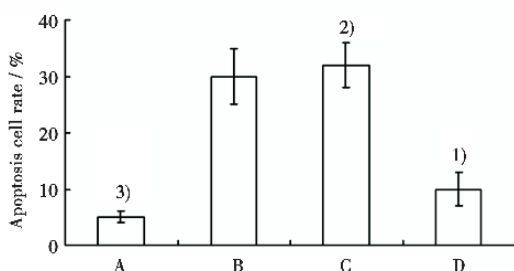
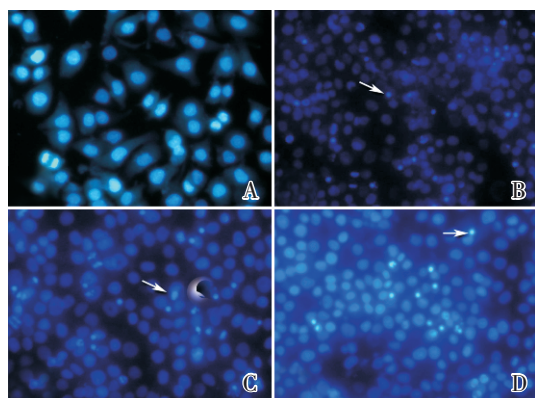


图5 Hoechst33258染色后荧光显微镜下观察细胞凋亡情况
Fig.5 Cell apoptosis among groups stained with hoechst 33258

A: normal SH-SY5Y cells; B: SH-SY5Y cells treated with SNP; C: SH-SY5Y cells transfected with pIRES2-EGFP and treated with SNP; D: SH-SY5Y cells transfected with pIRES2-EGFP/Bcl-xl and treated with SNP. The arrow-marked cells in figure are apoptotic cells. 1) Compared with B and C groups $P < 0.05$; 2) Compared with B group, $P > 0.05$; 3) Compared with other groups, $P < 0.05$.

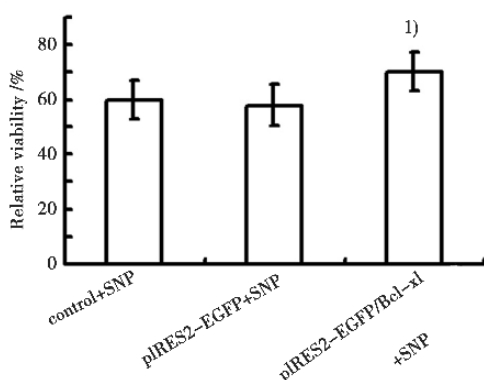


图6 各组在硝普钠(SNP)50 $\mu\text{mol/L}$ 作用24 h后的MTT结果及组间比较

Fig.6 Cell viability estimated by MTT assay among different groups after treating with SNP (50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h

1) pIRES2-EGFP/Bcl-xl group vs pIRES2-EGFP+SNP group or control+SNP group, $P < 0.05$

硝普钠来处理细胞,以此模拟高浓度的NO对细胞的毒性现象。到目前为止,NO的细胞毒性机制还不是很明确。以往的研究认为,其毒性的产生主要是跟细胞色素C氧化酶和超氧自由基有关^[1,8],对它的研究也主要是集中在氧化应激方面,治疗方面也多选用抗氧化剂^[9],抗凋亡的材料几乎没有被选择过。因此在我们的试验中选择了公认的抗凋亡基因 *Bcl-xl*,以此来推测硝普钠的细胞毒性机制。

细胞凋亡在形态学上主要表现为形成凋亡小体,核固缩^[10]。在我们的实验中,可以看到 *Bcl-xl*能够部分抑制凋亡小体地形成。除此之外,MTT试验也证实 *Bcl-xl*能够极大地增加NO作用后细胞的活性。我们知道,*Bcl-xl*可以抑制凋亡而不是坏死。因此,我们的试验能够说明NO对SH-SY5Y细胞的毒性作用主要是通过凋亡而不是坏死。需要说明的是,在本实验中,我们还观察到 pIRES2-EGFP/*Bcl-xl*转染组仍存在部分细胞凋亡。我们认为这主要跟细胞的转染效率未能达到100%有关。尽管如此,目前的转染效率以及后续实验数据已经可以初步说明问题,但仍需进一步深入的研究来阐明具体的机制。

SH-SY5Y细胞是来源于人神经母细胞瘤的细胞,其细胞形态、生理和系列化功能与正常神经细胞相似,适合于作为神经损伤细胞模型,被广泛的用于中枢神经系统疾病研究中^[11]。而研究发现,高浓度的NO具有神经毒性,与多种病变发生有关,如脑缺血、神经退行性疾病、帕金森病、阿尔茨海默病等^[1]。因此,本实验结果表明,*Bcl-xl*基因在类神经元中可以对抗NO的毒性作用,抑制其产生的凋亡效应,一方面说明NO的细胞毒性作用是通过凋亡途径而产生的,另一方面也反映出 *Bcl-xl*基因在神经元中同样具有强大的抗凋亡作用,具备潜在的治疗价值,可能可以为中枢神经系统疾病的治疗提供一个新的方向,但其具体的机制仍需要更深入的研究。

参考文献:

- [1] Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration [J]. *J Neurochem*, 2006, 97 (6): 1676-1689.
- [2] Akkiche N, Bossenmeyer-Pourie C, Pourie G, et al.

(下转第459页 to page 459)