

SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测大鼠外伤性视神经损伤后 P53、bax 和 caspase 3 基因表达

吕瀛娟 赵秀兰 杨洁 于金国 颜华

Detect of P53, bax and caspase 3 genes expression after optic nerve injury in rats with SYBR green I fluorescence quantitative PCR

Lü Yingjuan, Zhao Xiulan, Yang Jie, Yu Jinguo, Yan Hua. Department of Ophthalmology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Abstract Objective Previous study showed that the histopathological basis of visual function damage caused by optical nerve injury is apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs). This procedure is regulated by P53, bax and caspase 3 genes. Present study aimed to observe the expression of bax, P53 and caspase 3 mRNA in RGCs after traumatic optic nerve damage in the rats by SYBR green I fluorescence quantitative PCR method. **Methods** The animal model of optic nerve injury was established in the right eyes of 56 adult Wistar rats by a fluid percussion brain injury device (FPI). Animal were killed on days 1, 3, 5, 7, 9, 14, 28 days separately after injury. Other 16 Wistar rats were divided into normal control group and sham operation group. The total RNA was isolated from rat fresh retina tissue by Trizol method and was treated by reverse transcription to cDNA using Oligo(dt) 18 as primer and then amplified. The target fragments of bax, P53 and caspase 3 cDNA were linked with carrier pTZ57 R/T to construct recombinant plasmids which were transformed to *E. coli* DH5 α by T/A clone method. Recombinant plasmids were extracted with alkaline lysis method and the plasmids were selected in white colonies by ampicillin screening, EcoR I restrictive enzyme analysis, and their specificity was evaluated using DNA sequencing. The standard curves were created by plasmid DNA and the precise expression level of target genes in samples were determined using software. The results were expressed as the ratios of target gene mRNA to GAPDH mRNA. **Results** The standard curve drawn by pTZ57R/T and target gene presented a good linear tendency with the higher sensitivity and specificity. The expression of P53 and bax mRNA began to increase on the third day after the injury of optic nerve and peaked on the fifth day and started to decline on the seventh day. The expression of caspase 3 mRNA increased from the fifth day through the ninth days after injury and declined on the fourteenth day. The significant differences were found in the expression of P53, bax and caspase 3 between model group and control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The pro-apoptotic protein P53, bax and caspase 3 play an important role in RGCs apoptosis.

Key words SYBR green I method; fluorescence quantitative polymerase chain reaction; T/A clone method; traumatic optic nerve injury; P53; bax; caspase 3

摘要 目的 应用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法检测外伤性视神经损伤后 P53、bax 和 caspase 3 基因 mRNA 表达的变化。**方法** 应用液压颅脑损伤仪建立大鼠外伤性视神经损伤动物模型, 伤后 1、3、5、7、9、14、28 d 处死, 以 Trizol 法提取新鲜视网膜组织的总 RNA, 以 Oligo (dt) 18 为引物逆转录合成 cDNA 并进行扩增, 以 T/A 克隆法将纯化的目的片段与 T/A 克隆载体 (pTZ57R/T) 连接成重组质粒并转化入 *E. coli* DH5 α 。采用碱裂解法提取重组质粒, 经蓝白斑筛选、酶切、测序鉴定后, 根据标准品建立标准曲线, 由软件自动计算出待测样本中靶基因 mRNA 的含量, 并以靶基因和内参 GAPDH mRNA 含量的比值作为评价靶基因表达水平的指标。**结果** 由 pTZ57R/T 与目的基因所构建的标准曲线的线性关系良好、灵敏度高、特异性强、准确可靠。P53 和 bax 均在视神经损伤后 3 d mRNA 表达明显增加, 5 d 时达到高峰, 7 d 后开始下降; 伤后 5 d caspase 3 mRNA 表达明显增加, 9 d 时达到高峰, 14 d 后开始下降。三者表达水平与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 促凋亡基因 P53、bax 和 caspase 3 在视神经损伤后视网膜神经节细胞 (RGCs) 的凋亡发生中起到重要作用。

本课题为天津医科大学科研基金资助 (2006ky19)

作者单位: 300052 天津医科大学总医院眼科 [吕瀛娟 (现在天津医科大学眼科中心 300070)、于金国、颜华]; 300070 天津医科大学病理教研室 (赵秀兰), 免疫教研室 (杨洁)

通讯作者: 颜华 (Email: phuayan2000@yahoo.com)

关键词 SYBR Green I 法; 实时荧光定量 PCR; T/A 克隆法; 外伤性视神经损伤; P53; bax; caspase 3
分类号 R 774.01 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-0973-05

外伤性视神经病变是眼科常见的致盲性眼病,目前尚无有效方法预防视神经萎缩的发生^[1]。研究表明视神经损伤后视功能损害的组织病理学基础是视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的凋亡,其发生由基因调控,包括促凋亡基因 (P53、bax、caspase 3 等) 和抑凋亡基因 (bcl-2 等)^[2-3]。本研究旨在应用液压冲击颅脑损伤仪建立标准化的外伤性视神经损伤动物模型^[4], SYBR Green I 实时荧光定量 PCR (real time-PCR) 法检测损伤后 P53、bax、caspase 3 基因在视网膜中的表达,为进一步研究促凋亡基因在外伤性视神经损伤中的作用机制,寻找经济、有效的新疗法,恢复患者视功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 成年雌性 Wistar 大鼠 72 只,体重 250~300 g (天津实验动物中心)。按随机数字表法将动物随机分为 9 组,每组 8 只;其中 2 组分别作为正常对照组和假伤对照组;剩余为实验组,按观察时间点分为损伤后 1、3、5、7、9、14、28 d 共 7 个亚组。每只大鼠右眼为实验眼。

1.1.2 主要试剂及仪器 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); RevertAid TM First strand cDNA Synthese Kit (立陶宛 Fermentas 公司); E. coli DH5 α 、SYBR Green Real-time PCR Master Mix (北京天根生化科技有限公司); Takara Mini BEST Plasmid Purification Kit (大连宝生物工程公司)。液压冲击颅脑损伤仪 (天津市神经病学研究所); 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠视神经损伤模型的建立 实验组大鼠用 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg) 麻醉后,右眼沿 10:00~2:00 方位弧形剪开穹隆部结膜,将大鼠头部固定在液压冲击颅脑损伤仪鼠架上,沿巩膜外壁将打击管经结膜切口伸入眼眶内约 2 mm,打击锤以 25° 角打击视神经,平均打击力量为 (6.9 \pm 0.6) atm。打击后缝合结膜切口。假伤对照组仅弧形剪开上睑穹隆部结膜,分离暴露视神经,不予打击。成功模型具备以下条件:术后伤眼出现 Marcus-gun 瞳孔,眼球无明显突出,检眼镜观察眼底无明显出血;伤后 1 d 进行视神经磁共振 (MRI) 检查距伤眼眼球 1.0~2.5 mm 处视神经信号增高,眼眶内结构紊乱;视觉诱发电位检查表现为 P₁₀₀ 波

隐含量延长和波幅减低,甚至波形消失。

1.2.2 总 RNA 的提取 实验组 8 只大鼠分别于伤后不同时间点,正常对照组及假伤对照组 8 只大鼠在伤后 5 d,用过量 10% 水合氯醛处死,摘取右眼眼球,沿角巩膜缘剪去角膜,去除晶状体及玻璃体后分离视网膜,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA;紫外分光光度计检测其纯度和浓度。采用合格的 RNA 标本,按 RevertAid TM First strand cDNA Synthese Kit 说明书逆转录合成 cDNA, -20 °C 保存。

1.2.3 引物的设计 引物序列由天津润泰生物技术公司合成。GAPDH: 5'-GTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3', 5'-CTTTGTCACAAGAGAAGGCAG-3', 产物长度为 101 bp; p53: 5'-GTACCGTATGAGCCACCTGAG-3', 5'-CGTCCCAGAAGATTCAC-3', 产物长度为 149 bp; Bax: 5'-ACACCTGAGCTGACCTTGGA-3', 5'-CCGTGTCCACGTCAGCAATC-3', 产物长度为 133 bp; Caspase3: 5'-AGAGCTGGACTGCGGTATTGAG-3', 5'-GAACCATGACCCGTCCTTG-3', 产物长度为 148 bp。

1.2.4 重组质粒的构建 采用下述反应体系和条件进行扩增: 10 μ L Premix Taq 酶、8.1 μ L 灭菌水、0.9 μ L 引物、1 μ L cDNA, 共 20 μ L; 94 °C 5 min; 94 °C 45 s、57 °C (GAPDH、caspase 3、bax)/56 °C (P53) 40 s、72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。经胶回收的 PCR 目的片段 10 μ L 与 T/A 克隆载体 (pTZ57R/T) 22 °C 过夜连接后转化感受态 E. coli DH5 α , 经蓝白斑筛选, EcoR I 酶切初步鉴定, 阳性克隆进行测序分析, 由上海英骏生物技术公司完成。将筛选出的阳性菌株进一步扩增, 应用 Takara Mini BEST Plasmid Purification Kit 提取质粒。紫外分光光度计测定重组质粒的浓度, 计算出初始拷贝数及拷贝数浓度, 将以上重组质粒原液进行梯度稀释, 制成 2 \times 10³、2 \times 10⁴、2 \times 10⁵、2 \times 10⁶、2 \times 10⁷、2 \times 10⁸、2 \times 10⁹ 拷贝数浓度的标准品, -20 °C 保存备用。

1.2.5 标准曲线的建立与结果计算 将以上拷贝数浓度的质粒标准品以及所有 cDNA 工作液按如下 RT-PCR 反应体系分别配制: 12.5 μ L SYBR Green RT-PCR Master Mix、1 μ L cDNA Template、1 μ L Primer forward、5.5 μ L Primer reverse、5 μ L ddH₂O, 共 25 μ L, 混匀放入 RT-PCR 仪。反应条件: 95 °C 预变性 60 s、95 °C 15 s、57 °C (GAPDH、caspase 3、bax)/56 °C (P53) 15 s、72 °C 45 s, 进行 40 个循环。反应结束后电脑自动绘制各自

的标准曲线,由软件自动计算出待测样品中目的基因或管家基因的准确含量。以同一样本目的基因和管家基因 GAPDH 含量的比值作为评价目的基因表达水平的指标。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学处理, P53、bax 和 caspase 3 基因表达的数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据资料的方差齐性检验采用 Levene 法,证实方差齐 ($P > 0.05$)。不同组 P53、bax 和 caspase 3 基因表达的总体比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织总 RNA 提取的结果

提取 Wistar 大鼠视网膜组织总 RNA,吸光度 A260/A280 为 1.8~2.0,说明总 RNA 纯度较高,基本去除蛋白质和糖类等其他物质的污染。经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,28 S 与 18 S 的吸光度比值约为 2,说明总 RNA 的完整性较好,基本无降解。

2.2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶水平电泳检测

P53、bax 及 caspase 3 及 GAPDH RT-PCR 扩增产物凝胶电泳检测,发现有特异的目的条带长度分别为 101、149、133、148 bp,与 GAPDH、P53、bax、caspase 3 基因大小的理论值相符(图 1)。



图 1 M:100 bp marker 1~3:GAPDH 4~6:bax 7~9:caspase 3 10~12:P53
Fig.1 M: 100 bp marker 1-3 line: GAPDH 4-6 line: bax 7-9 line: caspase 3 10-12 line: P53

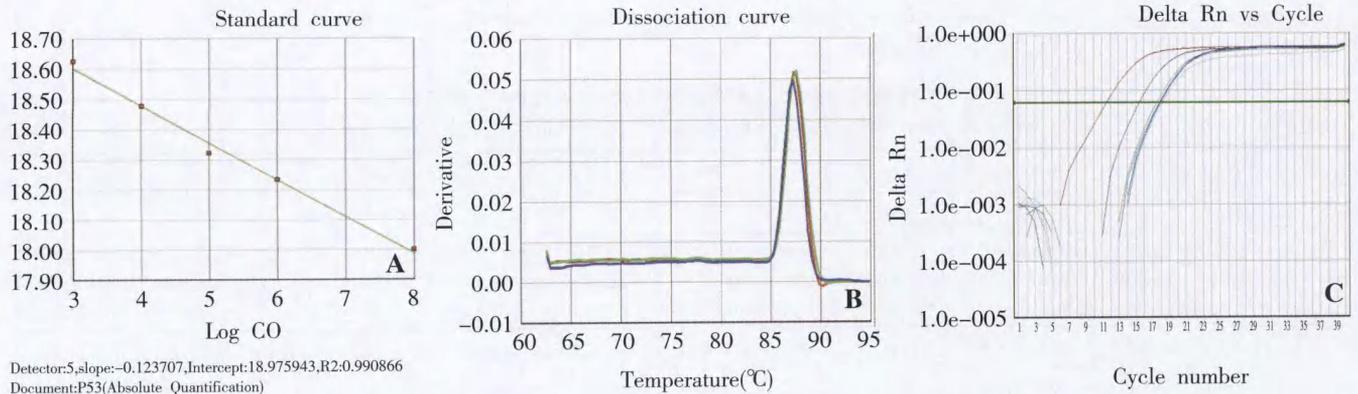


图 2 P53 曲线 A:标准曲线 B:溶解曲线 C:扩增曲线
Fig.2 P53 curve A: standard curve B: dissolving curve C: amplification curve

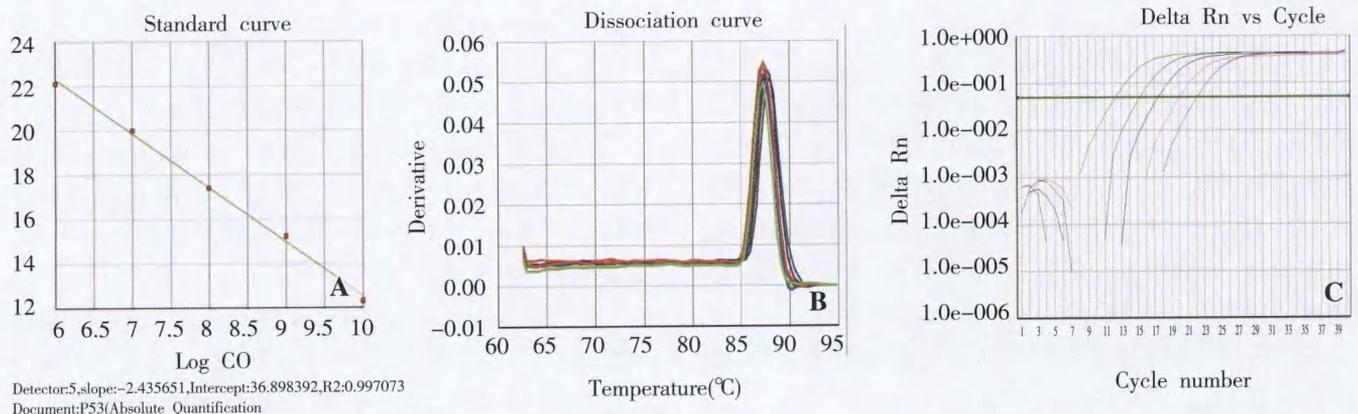


图 3 Bax 曲线 A:标准曲线 B:溶解曲线 C:扩增曲线
Fig.3 P53 curve A: standard curve B: dissolving curve C: amplification curve

2.3 标准曲线及溶解曲线分析

ABI7500 定量 PCR 仪自带软件绘制标准曲线得到以下方程: GAPDH $Ct = (-1.099) \times \log C_0 + 43.681$; P53 $Ct = (-0.123) \times \log C_0 + 18.975$ (图 2A); Bax $Ct = (-2.435) \times \log C_0 + 36.898$ (图 3A); Caspase 3 $Ct = (-0.824) \times \log C_0 + 26.952$ (图 4A)。

GAPDH、P53 (图 2B)、bax (图 3B)、caspase 3 (图 4B) 均得到了理想的单一峰形融合曲线, 位置均符合

预期。本实验中 GAPDH、P53 (图 2C)、bax (图 3C)、caspase 3 (图 4C) 定量 PCR 扩增的特异性均好。

2.4 P53、bax、caspase 3 基因实时 PCR 检测结果

实验结果显示 P53、bax、caspase 3 在损伤早期均有表达, P53 及 bax 伤后 3 d, mRNA 表达明显增加, 5 d 时达到高峰, 7 d 后下降; Caspase 3 伤后 5 d, mRNA 表达明显增加, 9 d 时达到高峰, 14 d 后下降。其表达量变化的具体数值及组间比较结果见表 1。

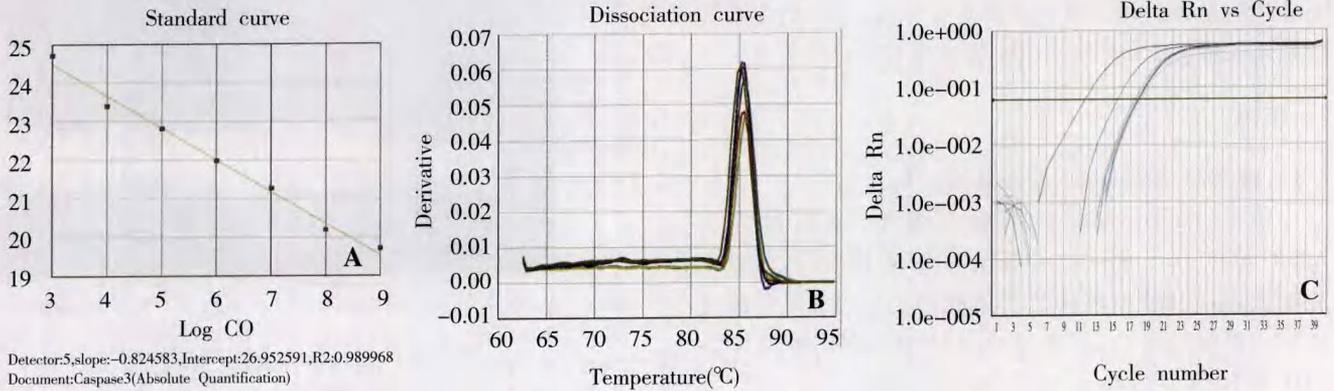


图 4 Caspase 3 曲线 A: 标准曲线 B: 溶解曲线 C: 扩增曲线

Fig. 4 Caspase 3 curve A: standard curve B: dissociation curve C: amplification curve

表 1 视神经损伤后不同时间点 P53、bax、caspase 3 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of P53, bax, caspase 3 after optical nerve injury ($\bar{x} \pm s$)

	Normal group	Sham group	Expression value after injury						
			1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	14 d	28 d
P53	0.964 ± 0.010	0.964 ± 0.009	0.959 ± 0.008	1.008 ± 0.003 ^{ef}	1.011 ± 0.003 ^c	1.006 ± 0.004 ^{bci}	0.997 ± 0.005 ^c	0.997 ± 0.008 ^c	0.966 ± 0.021 ^l
Bax	0.964 ± 0.010	0.965 ± 0.011	0.959 ± 0.008	0.981 ± 0.009 ^{ef}	1.007 ± 0.004 ^c	0.990 ± 0.009 ^{ci}	0.987 ± 0.008 ^c	0.988 ± 0.000 ^c	0.966 ± 0.009 ^l
Caspase 3	0.964 ± 0.010	0.965 ± 0.010	0.959 ± 0.008	0.972 ± 0.008 ^{fi}	0.979 ± 0.004 ^c	1.008 ± 0.003 ^c	1.009 ± 0.003 ^c	1.005 ± 0.003 ^c	0.996 ± 0.004 ^{cl}

$F_{P53} = 17.89, P = 0.00; F_{bax} = 18.15, P = 0.00; F_{caspase} = 17.95, P = 0.00$ ^b $P < 0.05$ vs respective 9 d value, ^c $P < 0.01$ vs respective normal value, ^l $P < 0.01$ vs respective 1 d value, ⁱ $P < 0.01$ vs respective 5 d value, ^l $P < 0.01$ vs respective 14 d value (ANOVA, LSD-t test)

3 讨论

本实验应用促凋亡基因 P53、bax、caspase 3 通用引物, 采用 SYBR Green I 技术的 RT-PCR 法进行定量分析。SYBR Green I RT-PCR 是目前定量检测核酸较准确的方法之一^[5], 具有以下特点: SYBR Green I 可与所有双链 DNA 结合, 不需要定制特异性探针, 通用性较好, 价格相对较低^[6-8]; 特异性强、准确度高; 荧光数值收集和实验操作中受污染的可能性小; 反应速度快且分析时间短; 利用溶解曲线分析去除非特异性产物干扰, 增加实验结果的可靠性。

RT-PCR 检测结果发现在视神经损伤早期 P53、bax、caspase 3 mRNA 表达均有不同程度的增加, 说明

他们在调控 RGCs 凋亡中起重要作用, 并随时间的延长, 呈不同的表达。实验发现 P53 伤后 3 d, mRNA 表达明显增加, 5 d 时达到高峰, 7 d 后开始下降, 证实了神经细胞发生凋亡时伴随 P53 基因水平表达的增加^[9-10]。P53 可以影响细胞生长和凋亡的基因产物 IGF - DP3, 使 IGF - DP3 通过结合 IGF 阻止其有丝分裂信号传递途径, 阻止 IGF 与其受体结合的相互作用, 促进细胞凋亡; 诱导基因编码蛋白, 催化氧化还原反应, 并产生活性氧, 引起线粒体细胞色素 C 释放, 激活细胞凋亡的线粒体途径^[11]。过度表达的 P53 还可能通过抑制 bcl-2 基因的转录, 激活促凋亡基因 bax, 使之高表达, 形成 bax 和 bax 同源二聚体, 直接影响 bcl-2 和 bax 的平衡作用^[12-13]; 还可以通过上调 bax 的表

达,使 bax 转移到线粒体外膜,诱导线粒体释放细胞色素 C 等效因子激活线粒体途径。

损伤早期 bax 表达较弱,伤后 3 d 表达明显增加,5 d 时达到高峰,7 d 后开始下降,提示视网膜上 bax 表达增多,其本身已形成同源二聚体,使细胞处于凋亡状态,并且随着 bax 的高水平表达,细胞凋亡状态会持续一定时间,直到 bax 表达水平下降,bax/bcl-2 比率降低到一定水平,二者又形成异源二聚体,从而抑制凋亡。

Caspase 3 是神经元凋亡重要的效应分子,是 caspase 级联“瀑布”效应下游最关键的凋亡执行蛋白酶。本实验首次对 caspase 3 在外伤性视神经病变中的表达变化进行研究,其促进细胞凋亡可能通过以下途径:(1)通过某些刺激因子与细胞表面的死亡受体(如 Fas)结合,激活 caspase 8,然后再激活下游 caspases 分子(主要是 caspase 3)。(2)经各种细胞毒性物质刺激线粒体释放细胞色素 C,激活 caspase 9 来实现^[14-16]。

本实验应用 SYBR Green I RT-PCR 法检测外伤性视神经损伤后大鼠 RGCs P53、bax 和 caspase 3 基因的表达变化规律,此方法具有扩增效率高、特异性强、灵敏度高、Ct 值线性范围广、可重复性好的特点,为研究促凋亡基因 P53、bax 和 caspase 3 表达调控的分子机制及其在视神经损伤中的作用机制奠定了基础。我们将进一步研究 P53、bax 和 caspase 3 抑制剂对外伤性视神经损伤大鼠视网膜的保护作用,为今后抑制 RGCs 凋亡的发生、寻找治疗视神经损伤的有效方法提供理论依据。

参考文献

1 Mariak Z, Obuchowska I, Stankiewicz A, et al. Remote results of

- conservative treatment of traumatic optic neuropathy [J]. *Neurol Neurochir Pol*,1998,32(5):1165-1172
- 2 Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell [J]. *Immunol Today*,1986,7(4):115-117
- 3 Elstein KH, Zucker RM. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations [J]. *Exp Cell Res*,1994,211(2):322-331
- 4 张琳琳,吕瀛娟,于荣国,等. 标准化大鼠外伤性视神经损伤动物模型建立 [J]. *眼外伤职业眼病杂志*,2008,30(12):913-917
- 5 Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR [J]. *Advan Physiol Educ*,2005,29:151-159
- 6 Bustin SA. Quantitation of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. *Mol Endocrinol*,2002,29:23-39
- 7 Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations [J]. *Trends Mol Med*,2002,8:257-260
- 8 Luu-The V, Paquet N, Calvo E, et al. Improved real-time-PCR method for highthrough put measurements using second derivative calculation and double correction [J]. *Biotechniques*,2005,38:287-293
- 9 罗静,姜德咏,陈忠平,等. 高糖诱导培养的牛视网膜血管周细胞凋亡 [J]. *眼科新进展*,2005,25(3):242-244
- 10 Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M. Glucose and diabetic vascular disease [J]. *FASEB J*,1992,6(11):2905-2914
- 11 匡宏宇,段鹏,马丽丽,等. 高糖及不同幅度高糖波动下牛视网膜毛细血管周细胞增生与凋亡的研究 [J]. *眼科新进展*,2007,27(2):87-90
- 12 Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, et al. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2001,42(9):2110-2114
- 13 Wang B, Zou Y, Li H, et al. Genistein inhibited retinal neovascularization and expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor 1alpha in a mouse model of oxygen-induced retinopathy [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*,2005,21(2):107-113
- 14 Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin [J]. *Cell*,1998,94:695-698
- 15 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*,1998,281:1312-1316
- 16 杜鹃,朱秀安. RCS 大鼠视网膜中 caspase 3 mRNA 的表达 [J]. *眼科研究*,2002,20(1):5-8

(收稿:2009-03-20 修回:2009-10-12)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

论文中对“结果”和“讨论”部分的要求

结果是论文最重要的部分。结果应尊重事实,得出的各种数据应有统计学处理;能用简要文字讲清楚的内容不用图表;图和表应有自明性;各种数据应严谨准确,具有可靠性和重现性。

讨论是整篇文章的最后总结,主要回答“研究出什么”的问题。讨论的内容:由研究结果所揭示的原理及其普遍性;研究中有无发现例外或本论文尚难以解释和解决的问题;与先前已发表过的(他人或自己)研究工作的异同,引用他人成果要有出处,列出参考文献;本论文在理论上与实用上的价值;对进一步深入研究的建议。

(本刊编辑部)