

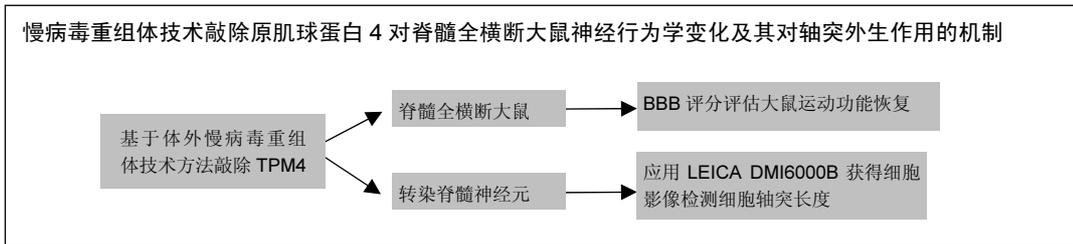
原肌球蛋白4通过慢病毒重组体技术应用于脊髓损伤后的作用及机制研究：随机对照实验方案

罗夙医¹, 黄薇², 王晶³, 王玺赟⁴, 李劲涛³ (昆明医科大学, ¹病原生物学与免疫学系, ³神经科学研究所, ⁴2012级麻醉专业, 云南省昆明市呈贡新区 650500; ²云南省第三人民医院神经内科, 云南省昆明市 650011)

引用本文: 罗夙医, 黄薇, 王晶, 王玺赟, 李劲涛. 原肌球蛋白4通过慢病毒重组体技术应用于脊髓损伤后的作用及机制研究: 随机对照实验方案[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(37):5573-5579.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.37.015 ORCID: 0000-0002-1661-9305(罗夙医)

文章快速阅读:



罗夙医, 女, 1983 年生, 云南省昭通市人, 汉族, 2012 年大理大学毕业, 硕士, 助教, 主要从事微生物免疫研究。

通讯作者: 李劲涛, 博士, 副教授, 昆明医科大学神经科学研究所, 云南省昆明市 650000

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)37-05573-07

稿件接受: 2016-07-26

文题释义:

原肌球蛋白: 相对分子质量为 64 000, 以大量异构体形式广泛分布于各种真核细胞中, 最常见于骨骼肌细胞内, 是肌动蛋白结合蛋白的一种。原肌球蛋白与肌动蛋白结合, 位于肌动蛋白双螺旋的沟中, 主要作用是加强和稳定肌动蛋白丝, 抑制肌动蛋白和肌球蛋白结合, 哺乳动物中的 4 个原肌球蛋白基因已被确认, 分别命名为 TPM1, TPM2, TPM3, TPM4。

原肌球蛋白 4(TPM4)的功能: TPM4 有稳定 F-肌动纤维的作用, 在肌肉收缩的调节中发挥重要的作用。此外, TPM4 作为一种仅次于其它细胞骨架肌动蛋白的一种有趣的候选蛋白, 可在未成熟的神经元中调节转录, 并与肌肉相关。TPM4 的表达也在肿瘤中和神经系统被发现, 不仅如此, 据报道 TPM4 与神经轴突的生长和突触可塑性相关。

摘要

背景: 前期研究采用 2-DE/MALDI-TOF/MS 方法, 发现原肌球蛋白 4 在脊髓表达增加, 但迄今为止, 有关原肌球蛋白 4 与脊髓损伤的发病机制和进展的关系仍知之甚少。

方法/设计: ①随机对照动物实验: 建立脊髓全横断损伤大鼠模型, 通过 2-DE 双向电泳、氨基酸系列分析、q-PCR 和 Western-Blot 方法明确脊髓横断损伤 3-28 d 在损伤脊髓头侧原肌球蛋白 4 的表达变化。②基因水平的机制探索实验: 用基于体外慢病毒重组体技术敲除原肌球蛋白 4, 研究其对体外培养的脊髓神经元树突生长长度的作用; 并通过 BBB 评分法评估原肌球蛋白 4 敲除对脊髓横断损伤大鼠运动功能恢复的作用。

讨论: 实验结果拟为脊髓横断损伤后促进运动功能恢复的治疗提供一种基于慢病毒重组体为载体携带原肌球蛋白 4 干扰 RNA 的、新的、有效的分子治疗策略, 并阐明其治疗作用机制, 为临床脊髓全横断损伤的基因治疗开辟乐观的应用前景。

伦理批准: 研究经昆明医科大学医学伦理委员会批准, 大鼠的外科操作和术后护理遵循中国实验动物保护和伦理委员会的规定, 并与美国国立卫生与健康研究院的指南一致。

关键词:

组织构建; 组织工程; 原肌球蛋白 4; 脊髓损伤; 基因敲除

主题词:

脊髓损伤; 原肌球蛋白; 基因敲除技术

基金资助:

云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项

缩略语:

原肌球蛋白 4: Tropomyosin 4, TPM4

Luo Su-yi, Master,
Teaching assistant,
Department of Pathogenic
Biology & Immunology,
Kunming Medical
University, Kunming
650500, Yunnan Province,
China

Effects of tropomyosin 4 applied in spinal cord injuries via lentiviral vector recombination and the underlying mechanism: study protocol for a randomized controlled trial

Luo Su-yi¹, Huang Wei², Wang Jing³, Wang Xi-yun⁴, Li Jin-tao³ (¹Department of Pathogenic Biology & Immunology, ³Institute for Neuroscience, ⁴Department of Anesthesiology Grade 2012, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China; ²Department of Neurology, the Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650011, Yunnan Province, China)

Corresponding author:
Li Jin-tao, M.D., Associate
professor, Institute for
Neuroscience, Kunming
Medical University,
Kunming 650500, Yunnan
Province, China

Abstract

BACKGROUND: Tropomyosin 4 level has been found to be an increase in the spinal cord based on the 2-DE/MALDI-TOF/MS method. However, there is little report about the relationship between tropomyosin 4 and pathogenesis and progress of spinal cord injuries.

METHODS/DESIGN: Randomized controlled trial: rat models of complete spinal cord transection were made and expression levels of tropomyosin 4 at 3–28 days after modeling were determined by two-dimensional electrophoresis, amino acid serie analysis, quantitative PCR and western blot. Experiment for exporing the genetic mechanism: effects of tropomyosin 4 scilencing by lentivirus recomination technology on the dendrite length of spinal cord neurons *in vitro* were observed, and its effects on the neurological function of rats after complete spinal cord transection were assessed through Basso, Beattie, and Bresnahan scoring.

DISCUSSION: This study will be powered to provide a novel and effective treatment strategy for neurological function recovery after spinal cord transection based on the lentivirus recomination carrying tropomyosin 4, as well as optimistic future for clinical gene treatment of complete spinal cord transection through figuring out the underlying mechanism.

ETHICAL APPROVAL: This study was approved by the Ethics Committee of Kunming Medical University, China. The surgical operation and postoperative care of rats were in line with the rules of Chinese Experimental Animal Protection and Ethics Committee, and the guideline of the National Institutes of Health

Subject headings: Spinal Cord Injuries; Tropomyosin; Gene Knockout Techniques

Funding: the Special Project for Applied Basic Research of Yunnan Provincial Science and Technology Department-Kunming Medical University

Cite this article: Luo SY, Huang W, Wang J, Wang XY, Li JT. Effects of tropomyosin 4 applied in spinal cord injuries via lentiviral vector recombination and the underlying mechanism: study protocol for a randomized controlled trial. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(37):5573-5579.

1 实验设计 Experimental design

1.1 实验设计类型 ①随机对照动物实验; ②基因水平的机制探索实验。

1.2 实验设计的描述 ①随机分组对照, 动物体内实验; ②细胞水平, 基因敲除实验。

1.3 实验完成地点 中国, 昆明, 昆明医科大学神经科学研究所神经干细胞培养实验室(云南省高校神经科学重点实验室)。

2 学术背景及理论基础 Academic background and theoretical basis

2.1 前言 脊髓损伤后常因感觉和运动功能缺陷而致终生残疾, 因此其修复的方法成为众多研究的焦点。目前, 治疗脊髓损伤的两种关键策略包括干细胞移植和组织工程技术, 前者对于改善功能是有用的, 但是并非成熟的治疗方法, 离真正的临床应用还有很大的距离; 后者在脊髓

损伤的修复策略中是很有吸引力的, 然而其在临床实践中也缺乏实质性的应用^[1-3]。脊髓损伤研究主要的问题是面临发生于损伤脊髓的众多复杂事件, 因而很难仅仅根据一些已知的分子就确定众多相关因子中的重要分子, 而蛋白组学的应用为描绘脊髓损伤后分子的变化提供了可能, 依此可找到新的以系统生物学为基础的蛋白靶点。

2.2 背景研究 原肌球蛋白(Tropomyosin, TPM)是4种基因(TPM1, TPM2, TPM3, TPM4)编码的一个蛋白质家族, 与脊髓损伤的一些病理过程相关^[4]。研究显示TPM4有稳定F-肌动纤维的作用, 在肌肉收缩的调节中发挥重要的作用^[5]。此外, TPM4作为一种仅次于其它细胞骨架肌动蛋白的一种有趣的候选蛋白, 可在未成熟的神经元中调节转录^[6-8], 并与肌肉相关^[4-5]。TPM4的表达也在肿瘤中和神经系统被发现^[9-11], 如费菲^[10]发现TPM4在高低转移潜能的人类乳腺癌细胞株MDA-MB-435中表达有差异, 在淋巴结阳性的乳腺癌原发灶中

TPM4表达明显高于淋巴结阴性的乳腺癌;在有癌转移的淋巴结中TPM4蛋白的表达明显高于原发灶,TPM4蛋白表达的差异与临床分期有关;张毅等^[11]则报道在神经细胞老化过程中TPM4表达下降。不仅如此,据报道TPM4与神经轴突的生长和突触可塑性相关。然而,目前尚未见对TPM4在脊髓损伤中的作用报道^[12-13]。因此,研究调查了TPM4在通过慢病毒重组体技术应用于脊髓损伤后的作用,这可能为未来脊髓损伤的临床治疗提供一种新的分子治疗策略。

2.3 前期实验介绍 前期实验研究采用2-DE/MALDI-TOF/MS方法,发现TPM4在脊髓表达增加,这使得这种蛋白质在脊髓损伤后的作用更加醒目。迄今为止,有关TPM4与脊髓损伤的发病机制和进展的关系仍知之甚少。为了确定这种结构蛋白是否具有实际应用价值,作者通过Q-PCR和Western Blot方法估计其表达,结果与2-DE分析结果一致。以上基于对TPM4蛋白在脊髓中的表达及其作用研究为本项目打下了一个良好的研究基础。

2.4 研究的理论依据 通过应用2D电泳方法,筛查了一些蛋白质,发现了TPM4可能是一种与脊髓损伤密切相关的蛋白。尤玲等^[14]的Real-time PCR结果显示大鼠脊髓钝挫伤后,TPM4基因呈现先降低再升高的变化,提示TPM4可能参与脊髓钝挫伤后的修复。基于此,作者设想构建一种慢病毒重组体技术方法敲除TPM4,为临床脊髓全横断损伤的基因治疗开辟一种新的、有效的治疗策略。

3 研究目的 Study purpose

3.1 主要目的 ①明确TPM4在大鼠脊髓全横断损伤中的作用;②阐明其作用的可能分子机制。

3.2 次要目的 观察TPM4敲除对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的作用。

4 动物的选择 Animal selection

选择雌性SD大鼠,体质量220-250 g,由四川大学实验动物中心提供。所有大鼠体型正常,健康状况良好,没有处于妊娠或哺乳期,排除健康状况不良,不活泼,有发烧、腹泻等症状者。

5 实验方法 Experimental methods

5.1 脊髓全横断损伤大鼠损伤脊髓TPM4表达变化

5.1.1 脊髓全横断损伤大鼠模型建立 大鼠腹膜内注射3.6%的水和氯醛(10 mL/kg)麻醉,麻醉成功后将大鼠俯卧固定于手术台上,沿背部正中线行一纵行皮肤切口,

咬骨钳咬除T₁₀₋₁₂椎板显露脊髓,完全横断脊髓。术后,大鼠自由饮食饮水,每天人工挤压膀胱协助排尿,持续两三天,肌注青霉素16×10⁴ IU/(kg·d)直至损伤后3 d。

5.1.2 分组及取材 将SD大鼠随机分为4组:假手术组不横断脊髓;术后3 d组、术后14 d组和术后28 d组建立脊髓全横断损伤模型,分别在损伤后3, 14和28 d处死大鼠,获取损伤头侧的脊髓组织并储存于-80 °C备用。

5.1.3 二维凝胶电泳和蛋白质组学分析(TOF/TOFTM)

二维凝胶电泳和图像分析: 0.2 g脊髓组织溶解于1 mL裂解缓冲液,4 °C下12 000 r/min离心,然后充分匀浆或裂解并在4 °C下孵育15 min。收集上清,上清液中蛋白的总量用Bradford分析进行测定。然后,总蛋白(1.2 mg, 580 μL)与DTT(0.02 g/mL)和Biolyte一起在室温下孵育1 h,接着在25 000 r/min下于4 °C孵育10 min。用一维等电聚焦方法(IEF)进行分离后干燥,行固定的pH梯度(IPG)分带(17 cm, pH3-10)实验操作。二维电泳在12%SDS-PAGE凝胶上进行,然后凝胶块用考马斯亮蓝G-250进行染色。蛋白条带染色图像用Bio-Rad图像扫描仪进行扫描,差异蛋白的表达用PDQuest 7.4软件(Bio-Rad)进行识别。只有存在显著变化(1.5倍)的蛋白点才被选择行TOF/TOFTM分析。在同一条件下进行2D电泳2次以确保每批标本实验数据的一致性。

蛋白点的酶消化实验: 凝胶蛋白点在50%乙腈和50 mmol/L NH₄HCO₃的混合液中脱色2次,每次20 min,接着用100%的乙腈脱水反应10 min。蛋白点凝胶块在37 °C下孵育5-10 min。干的凝胶块用胰蛋白酶在4 °C下酶解30 min,然后于37 °C下过夜。通过加入50%乙腈和0.1%三氟乙酸后反应30 min对蛋白标本中的肽进行提取,然后用N₂进行干燥。最后,全部干燥的肽被重新溶解于0.8 μL质量浓度为0.5 g/L的基质溶液,然后在MALDI金属板上进行打点。

蛋白质组学分析(TOF/TOFTM): 蛋白质标本用质谱分析法进行分析。差异变化蛋白质的识别通过GPS(3.6版,应用生物系统)-MASCOT(2, 1版, Matrix Science, London, UK)数据库搜索引擎证实。在蛋白质数据库中5个最大的报道的采样数中,带有独特的肽的最高Mowse分数(至少25%范围)得到Western blot 验证,以此消除与多种蛋白质家族的匹配蛋白质的重复。

5.1.4 实时定量PCR(qPCR)检测TPM4基因的变化 总RNA用TRIzol试剂(Invitrogen)进行提取,然后根据说明书反应行反转录反应。qPCR应用TaqMan[®] One-Step PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA,

USA)进行。qPCR分析用Step One Plus序列电测系统重复检测3次。引物序列如下: TPM4正义链 5'-GGA GAT GCA GCT CAA AGA-3'; 反义链5'-CAG CCT CCA GTG ATT TCA GAT-3'; TM: 5'-CTC ACC CTC CAG GAT GAC C-3'。PCR循环条件为: 95 °C反应 10 min, 95 °C反应15 s, 51 °C反应1 min, 共40个循环。所有的PCR反应都在热循环系统(ABI 7300)中进行。阈值设定在非模板对照背景之上, 并在靶基因线性相扩增范围内, 此时转录本的循环次数被检测(denoted Ct)。

5.1.5 Western blotting检测TPM4蛋白的变化 获取的脊髓标本在RIPA裂解缓冲液中消化。首先用BCA法进行蛋白定量, 然后含100 µg总蛋白的标本通过15%SDS-PAGE进行分离并转到PVDF膜上。在室温下被TBST阻滞1 h后, 膜分别与兔抗TPM4(1:500)和β-actin的I抗反应过夜。用TBST液洗涤3次, 每次10 min后, 膜与II抗(1:500, 羊抗兔IgG)偶联的辣根过氧化物酶在室温下一起孵育2 h, 然后用增强-化学发光试剂ECL进行显影。β-actin用作内对照。每个TPM4和β-actin蛋白条带的吸光度值分别被计算, 然后获得其比值用于最后的统计学分析。

5.1.6 免疫荧光染色检测TPM4蛋白的定位 为了描绘TPM4在脊髓的细胞定位, 大鼠麻醉后用冰的生理盐水及4%冰低聚甲醛进行灌注。然后脊髓组织用冰冻切片机切成15 µm厚的切片, 用PBS冲洗3次。加入含体积分数5%羊血清的PBS在37 °C孵育30 min以消除非特异性结合, 然后与I抗(兔TPM4抗体, 1:400)和体积分数5%羊血清一起于4 °C孵育过夜。随后, 组织切片用PBS清洗3次后与II抗(羊抗兔, 1:200)于37 °C下反应2 h。经PBS冲洗3次后, 切片用DAPI荧光标记核, 盖上盖玻片。最后, Leica AF6000用于获得细胞荧光图像。为了验证I抗的免疫荧光特异性, 在阴性对照组中, I抗用PBS代替。

5.2 体外慢病毒重组体SiRNA干扰技术方法敲除TPM4

5.2.1 TPMS慢病毒ORF/SH RNA重组体的构建 实验首次构建了编码TPM4的质粒与樱桃荧光蛋白的融合体。TPM4 cDNA序列通过RT-PCR获得, 使用的引物序列为: TPM4, 正义链5'-ATC CAC GCT GTT TTG ACC-3', 反义链 5'-CCG GAC ACG CTG AAC TTG T -3'。TPM4 cDNAs被插入XhoI和EcoRI间的限制性酶切位点-pReceiver-Lv127。

此外, 设计了4个系列的潜能性shRNS序列以一种

特别的方式沉默TPM4的表达。每个shRNA序列包含一个选择的siRNA序列对应的包括正义和反义方向的TPM4 mRNA靶点(NCBI Accession Number NM_001001491.1), 通过一个发夹环序列(5'-TCA AGA G-3')而分离。XhoI和EcoRI限制性酶切位点分别结合到5'和3'末端。潜能性的siRNA序列依据实验经验进行选择, 是在siRNA设计工具的帮助下完成的。编码每个shRNA的DNA片段通过2个互补寡核苷酸的退火产生, 接着将双链DNA片段插入psiHIV-U6(HIV为基础的)XhoI和EcoRI酶切位点之间。通过加入U6启动子从GeneCopoeiaTM中获得了psiHIV-U6。还在每个shRNA序列设计了SV40 polyA以填满人造病毒。对于慢病毒载体的生成, TPM4在U6启动子控制下的有效表达在OS286704-HIVU6中得到恢复, OS286704-HIVU6插入慢病毒载体前体质粒ps 2 µL ORF iHIV-U6-eGFP中。

5.2.2 双酶切反应 将2 µL含有TPM4的ORF质粒加入18 µL不含核酸酶的水中, 使反应体系总体积达到20 µL; 另一个含有1 µg空载体, 2 µL 10×的缓冲液, 1 µL XhoI, 1 µL EcoRI, 加入不含核酸酶的水使反应总体积达到20 µL, 作为对照。在37 °C反应45 min和70 °C反应5 min后, 进行电泳检测, 用Alpha Innotech (Bio-Rad)照相系统进行摄片。

5.2.3 C6细胞培养 C6细胞在37 °C, 饱和湿度, 体积分数5% CO₂, 95%的空气下, 以及在DMEM培养液添加体积分数10%胎牛血清、1%抗生素溶液(10 U/mL青霉素G和10 g/L链霉素的混合液)中培养。

5.2.4 有效的干扰片段筛选HIV 行短暂转染C6细胞的shRNA筛选。 C6细胞被接种于6孔培养板中, 每孔与总量为2 mg的DNA应用SuperFectin™II在体外DNA转染试剂进行转染。转染后8 h更换新鲜细胞培养液。细胞培养48 h, SuPerfecTRI™总RNA分离试剂用于提取mRNA, 然后继续合成用于PCR反应的cDNA。最后, PCR产物行10%琼脂糖凝胶电泳, 用Alpha Innotech (Bio-Rad)系统进行显微照相。β-actin作为内对照。最后用Image J软件进行TPM4和β-actin的每个条带的灰度值分析。TPM4和β-actin的灰度值比值用于统计学分析。

5.2.5 慢病毒产物 转染2 d前, 将1.5×10⁶浓度的GeneCopoeia 293Ta慢病毒包装细胞接种于一个直径为10 cm的培养皿中, 培养皿中有10 mL DMEM和5%热灭活胎牛血清, 细胞达70%–80%融合时, 于37 °C, 体积分数5% CO₂条件下培养。

将2.5 µg慢病毒ORF/SH RNA表达质粒和5.0 µL

(0.5 g/L)Lenti-Pac HIV与200 μ L Opti-MEM 混合, 命名为I液; 将15 μ L EndoFectinLenti用200 μ L Opti-MEM I稀释, 命名为II液。将一滴II液与I液混合, 并在室温下孵育25 min, 形成DNA-EndoFectin复合物, 随后将此复合物直接加入每个细胞培养孔中, 轻轻混匀。然后, 293Ta细胞与以上混合液在37 $^{\circ}$ C, 体积分数5% CO₂下孵育。培养12 h后, 新鲜的DMEM加入10%胎牛血清, 并添加青霉素、链霉素更换原培养液。将2.0 μ L Titer Boost试剂加入细胞培养液并在培养箱中于37 $^{\circ}$ C, 体积分数5% CO₂条件下培养48 h。最后, 包含假病毒的无菌培养液在500 \times g下离心10 min以去除细胞碎片, 从上清液中获取病毒。

5.3 TPM4敲除对脊髓横断损伤大鼠运动功能恢复的作用

5.3.1 干预方法 雌性SD大鼠随机分为4组, 假手术组, 术后3, 14, 28 d组。如上述的方法建立脊髓全横断模型, 用纤维剪剪开背侧正中皮肤切口, 显露脊髓。然后将TPM4 ORF或SH慢病毒(每注射点5 μ L)分别注射入损伤脊髓的头侧。慢病毒空载体作为阴性对照。

5.3.2 行为学检测 在注射慢病毒后大鼠后肢的功能恢复用BBB方法经3个实验者用盲法(确保观察者不知道大鼠分组)进行评价。BBB评分在开放的视野进行, 每周评估1次。

5.4 TPM4敲除对体外培养的脊髓神经元树突生长长度的作用

5.4.1 脊髓神经元培养和慢病毒体外转染 根据细胞中TPM4定位主要在神经元的实验结果, 进行了脊髓神经元的培养, 然后用慢病毒对其进行转染。从新生SD大鼠获取脊髓组织, 剪成约1 mm³大小的组织块, 37 $^{\circ}$ C条件下DNAase消化反应30 min。加入等量含体积分数10%FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM终止消化, 制成细胞悬液后, 在1 000 r/min于4 $^{\circ}$ C下离心10 min。弃上清, 细胞重悬于同样的培养液中, 轻轻吹匀, 将细胞接种于24孔培养板, 接种细胞浓度为 2×10^8 L⁻¹。培养24 h后将培养液更换为新鲜的神经基础(GIBCO)培养液+1%青霉素/链霉素+2% B27。接种后6 d, 神经元用含慢病毒(10 μ L)和聚凝胺(3 μ L)的DMEM转染。细胞在4 $^{\circ}$ C下孵育2 h, 然后在培养箱中于37 $^{\circ}$ C, 体积分数5% CO₂下培养12 h。然后将培养液更换为N+B27培养液以观察细胞形态。光镜200倍的细胞影像在转染后0, 2和4 d通过应用LEICA DMI6000B获得, 分别检测细胞轴突长度、细胞体和细胞数目。

5.4.2 siRNA合成并作用于PC12细胞 siRNA合成参考美国国立生物技术中心NCBI数据库中查找到的编号为NM012678.1的TPM4基因mRNA序列。NCBI的GENE数据库用于设计TPM4的siRNA序列, 然后在培养的PC12系统中(高糖培养基加10%FBS)检测siRNA对TPM4表达的作用。

PC12细胞培养系统用于确定TPM4下调对片段活性的作用。Lipo2000 转染随机序列用作对照。PC12细胞和siRNA转染的PC12西北培养于6孔细胞培养板的DMEM/F-12中, 并添加10%FBS和1%的青霉素-链霉素。细胞培养于37 $^{\circ}$ C, 饱和湿度, 体积分数5%CO₂, 95%的空气条件下, 隔天更换培养液。正常组, 单纯脂质体组, siRNA sh-SCR组和siRNA干扰组都分别加入50, 80, 100 nmol/L的干扰siRNA。

所有实验操作均严格遵循RNA操作原则并遵照Lipofectamine[®] Reagent kit(Invitrogen, USA, Lot NO.791053)的说明书进行。

对数生长期的细胞被接种于6孔细胞培养板中, 转染前1 d将原培养液更换为不含抗菌素的DMEM/F12。细胞长满60%~50%时推荐进行以下操作: ①在Opti-MEM[®]培养液和Opti-MEM[®]培养液中稀释4份Lipofectamine[®] Reagent, 混合液与Lipofectamine[®] 2000 Reagent 的体积比为1 000 : 5。②将DNA在Opti-MEM[®]培养液中(无血清OPTI-MEM培养液, 且要达到要求的浓度)稀释。③将稀释的DNA加入稀释的Lipofectamine[®] 2000 Reagent(体积比为1 : 1)。④将1滴Lipofectamine[®] 2000 Reagent和1滴siRNA复合物混合后加入细胞培养体系中, 然后在37 $^{\circ}$ C, 饱和湿度, 体积分数95%空气下孵育细胞。细胞培养6 h后, 细胞培养液更换为新鲜的包含体积分数10%FBS的全培养液。培养48 h后对每组细胞和突起的数目进行分析。实验重复次数不少于1次。

5.4.3 MTT分析 将细胞接种于96孔细胞培养板, 接种密度为10⁴/孔, 每孔接种125 μ L, 细胞生长过夜。在每个时间点的末期, 加入20 μ L质量浓度为5 g/L的MTT (Sigma, St. Louis, MO)作用10 min, 在570 nm波长处确定吸光度。每次实验均重复3次。最后, PC12细胞系统中剩余足够的siRNA用于后续的统计学分析。

6 研究设计 Study protocol

6.1 研究设计概要 蛋白水平、基因水平的基础实验。

6.2 实验计划 实验计划解决2个问题: ①明确TPM4

在大鼠脊髓全横断损伤中的作用; ②阐明其作用的可能分子机制。技术难点在于解决TPM4基因敲除所需要的慢病毒体外重组体SiRNA干扰技术。

6.3 实验步骤

(1)建立大鼠脊髓全横断损伤模型。

(2)采用2-DE双向电泳方法、氨基酸系列分析、q-PCR和Western-Blot、免疫荧光染色等方法研究TPM4在脊髓横断损伤大鼠表达变化。

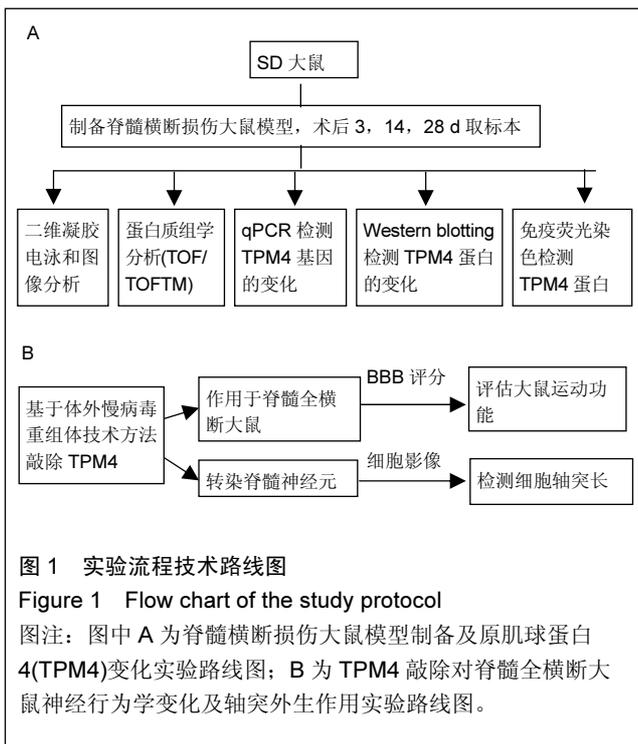
(3)用体外慢病毒重组体SiRNA干扰技术方法敲除TPM4。

(4)通过BBB评分法评估TPM4敲除对脊髓全横断损伤大鼠运动功能恢复的作用。

(5)研究TPM4敲除对体外培养的脊髓神经元树突生长长度的作用。

6.4 实验动物脱落情况 在手术及实验过程中有死亡脱落者, 分析原因, 另外重做实验补足动物数量。

6.5 技术路线图 见图1。



7 指标与观察 Outcome measurement

7.1 主要观察指标 ①TPM4蛋白及mRNA的表达变化, 包括2-DE双向电泳、氨基酸系列分析、q-PCR和Western-Blot及免疫荧光染色实验结果; ②TPM4敲除后体外培养的脊髓神经元树突生长长度变化。

7.2 次要观察指标 BBB评分结果, 0分代表完全瘫痪, 21分代表功能正常。

7.3 实验观察指标一览表 见表1。

表 1 数据观察记录表

Table 1 Schedule for outcome assessment

项目	假手术组	术后 3 d 组	术后 14 d 组	术后 28 d 组
2-DE 双向电泳	√	√	√	√
氨基酸系列	√	√	√	√
q-PCR	√	√	√	√
Western-Blot	√	√	√	√
免疫荧光染色	√	√	√	√

8 统计方法 Statistical analysis

8.1 研究假设 所有假设检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

8.2 样本量 根据预实验结果每组大鼠的数量定为10只。

8.3 实验分析 应用SPSS 17.0统计学软件完成数据统计分析, 计量资料(包括TPM4蛋白及mRNA的表达、神经元树突长度及BBB评分)用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有实验数据都采用ANOVA进行分析。

8.4 统计分析 由不参与实验的专业统计人员完成统计工作。在所有数据录入、审核完毕后, 统计人员应及时完成统计分析工作, 并出具书面统计分析报告。

9 行政部分 Administration

9.1 细胞及引物的保存 实验用引物及限制性内切酶由GeneCopoeiaTM公司合成或提供; 大鼠神经胶质瘤(C6)细胞系由四川大学转化神经科学中心提供; siRNA的设计和合成由中国广州Ribobio公司完成; PC12细胞和siRNA转染的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系(PC12)购自ATCC(CRL-1721)公司。以上均由专人保存, 使用后有相应的记录。

9.2 数据质量保证 ①研究者认真填写数据观察记录表, 记录过程不遗漏项目, 经常检查原始资料的准确性, 保证准确无误; ②监察员应定期确认所有的数据记录正确完整, 与原始记录一致; ③由2个数据录入员分别将数据双份输入计算机数据库中。

10 总条款和协议 Terms and conditions

10.1 科研审查委员会 由云南省科技厅批复, 同意开展“慢病毒重组体携带TPM4作为一种改善脊髓全横断大鼠神经行为学的新策略及其对轴突外生作用的机制”相关研究。

10.2 伦理指导 由昆明医科大学医学伦理委员会进

行审核。

10.3 伦理批准 由昆明医科大学医学伦理委员会批准, 大鼠的外科操作和术后护理遵循中国实验动物保护和伦理委员会的规定, 并与美国国立卫生与健康研究院的指南一致。

10.4 研究数据的保密 实验数据包括书面数据和电子版数据两种形式, 电子版数据由专门计算机储存, 设定开机密码, 由资料管理员专人操作和管理; 书面数据存放于固定地点并加锁, 钥匙由资料管理员和研究室负责人保管。

10.5 资料存档 所有原始资料由文档管理员专人完整保存, 同时复制一份电子版资料, 以方便使用。

10.6 文章发表 实验完成后总结实验数据, 进行实验数据的统计学分析, 撰写研究报告, 总结报告, 作结题的准备。由主要研究者撰写科研论文。

11 参考文献 References

- [1] Liu H, Schwarz EM, Xie C. Dual differentiation-exogenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic spinal cord injury repair in a murine hemisection model. *Stem Cells Int.* 2013;2013:928982.
- [2] Liu W, Ding Y, Zhang X, et al. Bone marrow stromal cells inhibit caspase-12 expression in rats with spinal cord injury. *Exp Ther Med.* 2013;6(3):671-674.
- [3] Ji W, Zhang Y, Hu S. Biocompatibility study of a silk fibroin-chitosan scaffold with adipose tissue-derived stem cells. *Exp Ther Med.* 2013;6(2):513-518.
- [4] Spinner BJ, Zajdel RW, McLean MD, et al. Characterization of a TM-4 type tropomyosin that is essential for myofibrillogenesis and contractile activity in embryonic hearts of the Mexican axolotl. *J Cell Biochem.* 2002;85(4):747-761.
- [5] Zhao L, Zhao X, Tian T, et al. Heart-specific isoform of tropomyosin4 is essential for heartbeat in zebrafish embryos. *Cardiovasc Res.* 2008;80(2):200-208.
- [6] Habig K, Gellhaar S, Heim B, et al. LRRK2 guides the actin cytoskeleton at growth cones together with ARHGAP7 and Tropomyosin 4. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2352-2367.
- [7] Had L, Faivre-Sarrailh C, Legrand C, et al. The expression of tropomyosin genes in pure cultures of rat neurons, astrocytes and oligodendrocytes is highly cell-type specific and strongly regulated during development. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993; 18(1-2): 77-86.

- [8] Had L, Faivre-Sarrailh C, Legrand C, et al. Tropomyosin isoforms in rat neurons: the different developmental profiles and distributions of TM-4 and TMB-3 are consistent with different functions. *J Cell Sci.* 1994;107(Pt10):2961-2973.
- [9] Kabbage M, Trimeche M, Ben Nasr H, et al. Tropomyosin-4 correlates with higher SBR grades and tubular differentiation in infiltrating ductal breast carcinomas: an immunohistochemical and proteomics-based study. *Tumour Biol.* 2013;34(6):3593-3602.
- [10] 费菲. 原肌球蛋白-4在人类乳腺癌高低转移细胞株中的差异性表达及临床意义[D]. 上海: 复旦大学, 2005.
- [11] 张毅, 苗玲, 苏敏, 等. 神经细胞老化过程中蛋白质组学研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(4): 432-435.
- [12] Kimura Y, Fujita Y, Shibata K, et al. Sigma-1 receptor enhances neurite elongation of cerebellar granule neurons via TrkB signaling. *PLoS One.* 2013;8(10): e75760.
- [13] Moroz N, Guillaud L, Desai B, et al. Mutations changing tropomodulin affinity for tropomyosin alter neurite formation and extension. *PeerJ.* 2013;1:e7.
- [14] 尤玲, 夏庆杰, 王廷华. Real-time PCR检测脊髓钝挫伤大鼠 TPM4 基因的变化[J]. 四川解剖学杂志, 2014, 22(1): 12-14.

实验状态: 实验已经完成大鼠脊髓全横断损伤模型的制备, TPM4 在大鼠脊髓全横断损伤的表达变化研究; 正在进行慢病毒体外 TPM4 siRNA 重组体的制备; 重组体体外对培养的脊髓神经元树突生长长度的作用研究。

作者贡献: 李劲涛进行实验设计和实验评估; 实验实施为罗凤医、黄薇、王晶、王玺赟; 数据收集为王玺赟。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 昆明医科大学医学伦理委员会批准, 大鼠的外科操作和术后护理遵循中国实验动物保护和伦理委员会的规定, 并与美国国立卫生与健康研究院的指南一致。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者及通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。