论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1024-04

重组质粒 pCDNA3.1(+)/Ngb 对局灶性脑缺血大鼠脑保护作用的研究

朱 继,唐文渊 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆,400016)

提 要:目的 研究重组神经球蛋白表达质粒 pCDNA3.1(+)/Ngb 对缺血中的脑保护作用。**方法** 54 只雄性大鼠按随机数字表法分为生理盐水组、空质粒组和重组神经球蛋白组,每组 18 只分别于皮质区两部位注射生理盐水、质粒 pCDNA3.1(+)和重组质粒 pCDNA3.1(+)/Ngb,并于注射后 24 h 采用改良线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血 24 h 模型。采用 TTC 染色、原位细胞凋亡检测、间接免疫荧光法和 Western blot 检测各组大鼠脑梗死面积,神经细胞凋亡状况和 bcl-2 蛋白表达变化。**结果** 经重组质粒 pCDNA3.1(+)/Ngb 处理的大鼠,其脑梗死面积和注射处缺血半暗带凋亡细胞数较其他两组显著减少($P<0.01$),注射处缺血半暗带 bcl-2 阳性细胞面积百分比显著增高($P<0.01$),bcl-2 蛋白的表达上升约 40%~50%。**结论** 质粒 pCDNA3.1(+)介导大鼠神经球蛋白基因转入脑内可通过上调 bcl-2 蛋白表达抑制局灶性脑缺血神经细胞凋亡,起到局灶性脑缺血脑保护作用。

关键词:神经球蛋白;脑缺血;神经细胞;bcl-2 蛋白

中图法分类号:R394.6;R741.05;R743.31 **文献标识码**:A

Protective role of recombinant plasmid pCDNA3.1(+)/Ngb during focal cerebral ischemia of rat brain

ZHU Ji, TANG Wen-yuan (Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the protective effect of recombinant plasmid pCDNA3.1(+)/Ngb during focal cerebral ischemia in rat brain. **Methods** Fifty-four male Wistar rats were randomly divided into three groups: normal saline(NS) control group, plasmid control group, and recombinant neuroglobulin group [pCDNA3.1(+)/Ngb]. NS, plasmid pCDNA3.1(+) and recombinant plasmid pCDNA3.1(+)/Ngb were respectively injected into two sites of the rat cerebral cortex 24 hours before induction of neocortical focal ischemia by occlusion of the right middle cerebral artery for 24 hours. The condition of local ischemic damage, expression of bcl-2 and the apoptosis in neural cells were confirmed by staining with 2% 2.3.5-triphenyltetrazolium chloride, in-site cell apoptosis detection, indirect immunofluorescent staining and Western blotting, respectively. **Results** The extent of cerebral infarction tissue and the apoptosis cells in the pCDNA3.1(+)/Ngb group were significantly reduced than those in other control groups ($P<0.01$). The number of expression of bcl-2 cells in pCDNA3.1(+)/Ngb group was much more than that in other control groups ($P<0.01$). The relative expression level of bcl-2 protein was elevated by 40% -50%. **Conclusion** The neural cells could be protected by recombinant plasmid pCDNA3.1(+)/Ngb during focal cerebral ischemia through up-regulating the expression of bcl-2 gene and retarding the apoptosis of neural cells.

Key words: neuroglobulin; brain ischemia; neuron; bcl-2 gene

神经球蛋白(neuroglobulin, Ngb)是新近发现类似血红蛋白和肌红蛋白的携氧球蛋白,主要存在于脊椎动物脑组织,参与脑细胞缺血缺氧等应激过程[1,2]。脑缺血后迟发性神经元损伤常伴有凋亡的发生,而目前认为 bcl-2 是一种重要的内源性抗凋亡因子,对维持局灶性脑缺血再灌注后神经细胞的生存具有重要作用[3]。本研究建立大鼠脑缺血模型,利用真核表达载体,通过立体定向技术将重组大鼠神经球蛋白基因直

基金项目:重庆市卫生局资助项目(06-2-177)
Supported by the Chongqing Bureau of Public Health (06-2-177)

作者简介:朱 继(1965-),男,重庆市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事神经外科脑血管病方面的研究。电话:13808399425,E-mail: a68690569@cta.cq.cn

收稿日期:2007-01-08;**修回日期**:2007-03-14

接导入实验大鼠脑内，观察脑缺血 24 h 后各组大鼠脑梗死面积、神经细胞凋亡状况和 bcl-2 蛋白表达变化，以探讨神经球蛋白对脑缺血后治疗的新策略。

1　材料与方法

1.1　材料

54 只健康 Wistar 雄性大鼠，体质量 250～300 g，由重庆医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为生理盐水组、空质粒组和重组神经球蛋白组，每组 18 只。质粒 pCDNA3.1(+)由重庆医科大学生物化学教研室惠赠，重组质粒 pCDNA3.1(+)/Ngb 由本课题组构建。

1.2　方法

1.2.1　质粒提取　　采用试剂盒提取质粒 pCDNA3.1(+)、pCDNA3.1(+)/Ngb，选用内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ对其进行酶切鉴定。分光光度法测定质粒浓度，按 1 μg/μl 质粒保存于 -20 ℃冰箱备用。

1.2.2　立体定向转基因入脑　　参照以往研究大鼠 24 h 脑缺血后，脑梗死内缘于脑表面定位数值[4]，取距脑梗死内缘 0.5～1.0 mm、近于脑缺血周边区(相当于脑缺血半暗带)皮质处注射。实验大鼠 10% 水和氯醛 0.35 ml/kg 腹腔麻醉，3～5 min 见效，将大鼠固定于立体定向仪。常规消毒、剪毛，取两耳中点始向后 3.0 cm 头皮正中切口，暴露矢状缝、前囟及右侧颅骨表面，将微量加样器抽取 6.6 ml pCDNA3.1(+)/Ngb 并固定于立体定位仪上，移动立体定位仪标尺，以微量加样器针头选择注射点 1(距矢状缝右侧 3.8 mm、前囟前 1.7 mm 处)，于此处以牙钻钻透颅骨，移动立体定位仪垂直标尺，将微量加样器针头置于该骨孔内深 2.8 mm。以速率为 0.25 μl/min 注入 3.3 μl pCDNA3.1(+)/Ngb，注射结束 5 min 后撤出微量加样器，以骨蜡封闭骨孔。同样方法于注射点 2(正中线右侧 3.8 mm、前囟后 3.3 mm、深 2.3 mm 处)注射 3.3 μl pCDNA3.1(+)/Ngb。青霉素棉签擦洗颅骨表面，用 4 号丝线角针间断缝合头皮。麻醉管理，待苏醒。对照组同样方法注入等量生理盐水、质粒 pCDNA3.1(+)。

1.2.3　动物模型　　立体定向注射后 24 h，应用改良线栓法将各组实验动物制成右侧大脑中动脉缺血模型。实验大鼠 10% 水和氯醛 0.35 ml/kg 腹腔麻醉后，分离结扎右颈总动脉、右颈外动脉及其分支。于右颈总动脉远端 1 cm 处以 1 ml 注射器针头刺破右颈总动脉上壁，将直径 0.25 mm 尼龙线经右颈总动脉插入右颈内动脉，平均入右颈内动脉(21.4 ± 1.2) cm。遇阻力停止。1 号线于右颈总动脉远端处固定尼龙线。生理盐水冲洗手术范围，青霉素棉签擦洗暴露组织表面，4 号线间断缝合皮下组织、皮肤。麻醉管理，待苏醒。

1.2.4　TTC 染色、图像分析检测脑梗死状况　　脑缺血 24 h 后每组动物各 6 只断头处死，取大脑，立即置于 2% TTC(红四氮唑)溶液中(37 ℃)避光孵育，30 min 后显色完全(白色为梗死区)，其后将脑组织取出，由前向后切成层厚 2 mm 的冠状切片，再置于 2% TTC 溶液中(37 ℃)避光孵育 20～30 min，4% 多聚甲醛溶液固定 30 min。德国 Leica MZ16 显微镜下将每片脑组织照像，经显微图像分析系统分析每片脑片上下面积及脑梗死面积，根据公式 $V=(A_1+\cdots A_n)t/2$ 计算脑体积及脑梗死体积。其中 t 为切片厚度，A 为脑片面积或梗死面积。

1.2.5　免疫荧光标记法染色　　脑缺血 24 h 后每组动物各 6 只断头处死，取注射点 1 和 2 之间的脑组织制成石蜡切片备用。取每例石蜡切片，常规脱蜡至水后经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3×10 min 后，置入含 30 mg/L Triton X-100 的 PBS 30 min(室温)；经山羊血清孵育 12 h(室温)后；再经兔抗大鼠 bcl-2 多抗(1∶1 000，Sigma)孵育 24 h(4 ℃)；经 FITC 标记的山羊抗兔(1∶500，Sigma) IgG 抗血清室温孵育 2 h(避光)。常规甘油与 PBS(1∶1)的混合液封片。每步骤后均用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)充分洗涤。用 PBS 代替一抗作阴性对照。结果在共聚焦显微镜下观察各组切片 bcl-2 蛋白变化。采用图像分析软件(LSM；Zeiss，Oberkocn，German)对图像进行数字化分析，在设定的图像框面积下，测定脑缺血 24 h 后各组 bcl-2 阳性产物的面积。

1.2.6　原位神经元凋亡检测　　用 TUNEL 法检测凋亡神经元。用不加 TUNEL 反应液和不加转化液(Coverter-AP)的切片作为阴性对照。结果判定：每张切片经显微镜检测 3 个缺血半暗带处有代表性高倍视野凋亡细胞数，取均值。

1.2.7　免疫蛋白印迹检测　　脑缺血 24 h 后每组动物各 6 只断头处死，取注射点 1 和 2 之间的脑组织，提取蛋白质，-80 ℃保存备用。蛋白定量后加入 4 倍体积样本缓冲液，95 ℃变性 5 min。经 10% SDS-PAGE 电泳，电转至硝酸纤维素膜，根据分子量大小切取条带，分别加入 bcl-2 多抗(1∶300)和 β-actin 单抗(1∶400)，4 ℃过夜，冲洗，分别与生物素标记的羊抗兔 IgG 抗血清(1∶100)室温下振荡孵育 1 h 30 min，显色。将特异蛋白条带用扫描仪进行扫描，β-actin 为内参照，应用 CMIAS 真彩色医学图像分析系统(北京航空航天大学研制)测定条带灰度值。

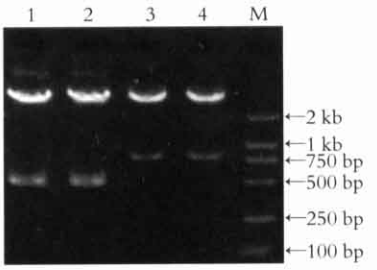
1.3　统计学方法

各组数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，利用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验和单因素方差分析。

2　结果

2.1　重组质粒鉴定[5]

Wistar 大鼠 Ngb 基因约 500 bp，用 *Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ对重组质粒进行双酶切。鉴定结果如图 1。



1-4：*Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切；M：DNA 标准(DL 2000)

图 1　pCDNA3.1(+)/ Ngb 重组质粒的酶切鉴定

2.2 脑梗死状况检测

生理盐水组、空质粒组、重组 Ngb 组大脑体积分别为(1 512 ± 58)、(1 467 ± 37)、(1 601 ± 34) mm^3,3 组间差异不显著($P > 0.05$);生理盐水组、空质粒组脑梗死体积与 Ngb 组相比有显著性差异($P < 0.01$),而生理盐水组和空质粒组梗死体积之间无显著性差异($P > 0.05$)(表 1)。

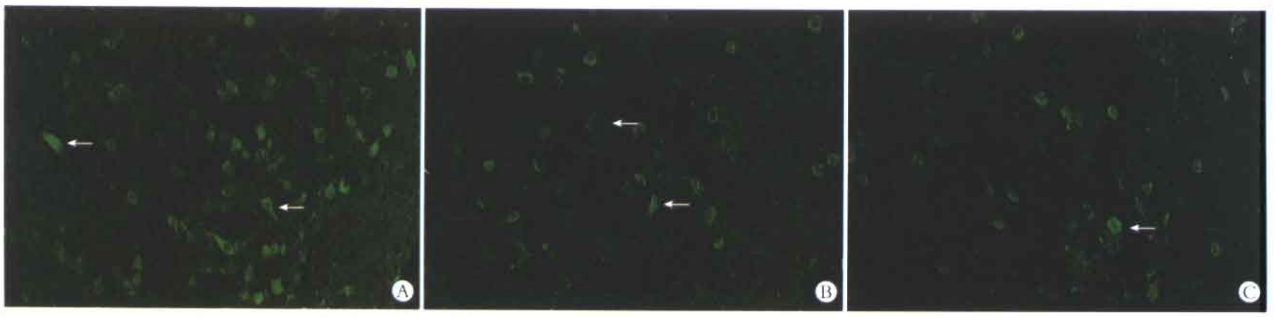
2.3 免疫荧光分析

重组 Ngb 组、空质粒组、生理盐水组注射处缺血半暗带 bcl-2 阳性细胞面积百分比见表 1。与对照组比较,重组 Ngb 组注射处缺血半暗带 bcl-2 阳性细胞面积百分比显著增高($P < 0.01$)。免疫荧光分析显示 bcl-2 阳性细胞呈绿色,大鼠脑缺血皮质重组 Ngb 组注射处 bcl-2 蛋白表达较空质粒组和生理盐水组明显增多,见图 2。

表 1 各组脑梗死体积、凋亡细胞数与 bcl-2 测定结果($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	V(梗死)/mm^3	凋亡细胞数 个/400 倍视野	bcl-2 阳性面积百分比(%)	bcl-2 相对表达量
生理盐水组	218.17 ± 11.44[a]	61.34 ± 5.62[a]	15.05 ± 2.12[a]	0.52 ± 0.07[a]
空质粒组	213.50 ± 14.12[a]	58.68 ± 3.12[a]	19.05 ± 2.99[a]	0.43 ± 0.11[a]
重组 Ngb 组	131.33 ± 9.18	36.85 ± 4.88	35.55 ± 4.33	0.83 ± 0.05

a: $P < 0.01$, 与重组 Ngb 组比较



A:重组 Ngb 组; B:空质粒组;C:生理盐水组

图 2 免疫荧光分析大鼠脑缺血 24 h 大脑皮质注射处 bcl-2 蛋白表达结果(↑: bcl-2 阳性细胞) (免疫荧光 ×400)

2.4 原位细胞凋亡分析

TUNEL 染色结果显示,bcl-2 阳性细胞核呈棕黄色,重组 Ngb 组、空质粒组、生理盐水组注射处缺血半暗带凋亡细胞数(个/高倍视野)见表 1。数据显示重组 Ngb 组凋亡细胞数与生理盐水组、空质粒组相比,显著降低($P < 0.01$)。

2.5 Western blot 分析

在预染蛋白标准约 26 000 处,可见 bcl-2 特异性蛋白条带。灰度分析结果显示,重组 Ngb 组与生理盐水组和空质粒组相比,bcl-2 蛋白的表达上升约 40% ~ 50% ($P < 0.01$)(表 1)。

3 讨论

近年来,国内外学者均已证实,在脑缺血缺氧状态下,神经球蛋白及其 mRNA 水平表达增加,并且发现在脑缺血缺氧损伤中对神经元具有重要的保护作用。Schmidt-Kastner 等[6]将 HN33 细胞放入 0.3% O_2 中培养 24 h 后,Ngb mRNA 比平常升高了 2 ~ 3 倍。Sun 等[7]建立脑缺血模型,通过脑室内给予神经球蛋白的反义寡核苷酸使神经球蛋白表达减少,发现脑梗死面积增加;反之,脑室内给予腺病毒相关病毒表达载体增加神经球蛋白的表达则可减少梗死面积,大鼠神经系统功能亦改善。本实验将重组质粒 pCDNA3.1(+)/Ngb 直接注入脑缺血半暗带区观察神经球蛋白对局造性脑缺血后,脑梗死面积的变化。相比生理盐水和空质粒组,重组 Ngb 组脑梗死面积缩小 50%,与 Sun 等[7]研究结果类似,提示神经球蛋白对局造性脑缺血继发神经损伤起重要的保护作用。

本研究着重观察大鼠局灶性脑缺血模型中 Ngb 对脑组织凋亡及其 bcl-2 蛋白表达的影响,探讨 Ngb 抗凋亡的可能机制。TUNEL 染色选择性的标记细胞凋亡的终产物,即裂解的双链 DNA 片段,可用来判断 Ngb 能否对抗脑缺血后神经细胞的凋亡。我们发现经 pCDNA3.1(+)/Ngb 预处理 24 h 后,局灶性脑缺血时 Ngb 组能明显减少缺血半暗带区的 TUNEL 阳性细胞,同时 bcl-2 蛋白也明显的增加,表明 Ngb 能通过增加 bcl-2 蛋白的表达抑制半暗带区的细胞凋亡。发生脑缺血时,增多的 Ngb 可结合储存更多的氧,保护脑细胞免受凋亡发生。在缺血区脑组织氧供阻断时释出,提高脑组织对缺氧的耐受性。

采用真核表达载体 pCDNA3.1(+)作为 Ngb 基因的载体,可避免使用病毒做载体易致基因插入突变,致癌致畸的危险。结果表明 Ngb 可减少神经细胞凋亡的发生,这说明采用立体定向技术直接将重组 Ngb 基因转入脑内可抑制局灶性脑缺血细胞凋亡的发生,起到脑保护作用。在生理盐水组与空质粒组的各项指标观察中,未发现二者有显著性差异,这表明无明显的毒副作用。

Ngb 抗凋亡的作用机制目前还不十分清楚。推测

它主要是促进氧向神经元中的线粒体扩散，稳定线粒体膜的通透性，或是作为NADH氧化酶促进ATP产生，参与信号转导途径，调节抗凋亡蛋白质的功能，从而抑制神经细胞凋亡发生[7]。Ngb也可能通过抑制钙超载，控制细胞信号传导等途径而发挥抗凋亡作用。本研究表明Ngb能通过增加bcl-2蛋白的表达抑制半暗带区的细胞凋亡。

总之，我们认为质粒pCDNA3.1(+)介导的大鼠Ngb在局灶性脑缺血大鼠中的表达具有抗神经元凋亡作用，为临床治疗脑缺血开辟了新思路。

参考文献：

[1] Li R C, Lee S K, Pouranfar F, *et al*. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain[J]. Brain Res, 2006, 1096(1): 173-179.

[2] Fuchs C, Heib V, Kiger L, *et al*. Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding[J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24116-24122.

[3] Rogerio F, Jordao H, Jr., Vieira A S, *et al*. Bax and bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment[J]. Brain Res, 2006, 1112(1): 80-90.

[4] Kobayashi M S, Takahashi Y, Nagata T, *et al*. Statistical validation of two sample comparison methods for oligonucleotide microarray in rat ischemia model[J]. Neurochem Res, 2006, 31(6): 735-740.

[5] 朱 继，唐文渊. 大鼠神经球蛋白基因的克隆及其真核表达载体构建[J]. 第三军医大学学报，2007，29(2)：144-146.

[6] Schmidt-Kastner R, Haberkamp M, Schmitz C, *et al*. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture[J]. Brain Res, 2006, 1103(1): 173-180.

[7] Sun Y, Jin K, Peel A, *et al*. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3497-500.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2007)11-1027-01

个案与短篇

子宫颈巨大血管平滑肌瘤1例

郑维英 （重庆市急救医疗中心妇产科，重庆 400016）

子宫血管平滑肌瘤是子宫平滑肌瘤的特殊类型，组织学上为良性疾病，生物学上具有转移和浸润生长的倾向；临床上很少见，术前诊断困难，主要靠病理诊断，病程进展缓慢，预后良好，该例发生于宫颈，包块巨大，且呈囊实性，实属罕见。现报告如下。

1 临床资料

患者，女性，27岁，因“发现下腹包块伴腹部逐渐长大2年余”入院。入院前2年，患者无意中扪及下腹一包块，约拳头大小，无触痛，活动，不伴任何不适，未就医。近日感下腹部逐渐长大，伴腰骶部胀痛及尿频。入院体检：既往月经规则，生命体征平稳，心肺未闻及异常，腹膨隆，腹部扪及8个月孕大小的包块，上界位于剑突下一横指，下界深入盆腔，边界清楚，不活动，无压痛，包块上部有囊性感，下部质中，形态欠规则。妇科检查：外阴发育无异常，阴道内距阴道口约3 cm处触及包块下缘，囊性感，宫颈无法暴露，整个盆腔被包块占据，子宫及双附件未触及。B超示：子宫增大如2个月孕，见宫内一节育环，在子宫左下方见32 cm×20 cm×20 cm孕大的不规则包块，边界清，下部为中液均质回声，上部为中液混合回声，无腹水，双肾轻至中度积水。入院诊断：(1)卵巢肿瘤？(2)子宫肌瘤？(3)双肾积水。患者于1999年2月20日行剖腹探查术。术中见：腹腔内有一足月孕大椭圆形包块，表面光滑，静脉怒张，有完整包膜，呈囊实性。宫体位于包块右前下方，约50 d孕大，质中，无明显突起，宫颈与包块相连，双侧输卵管充血肿胀，游离，右卵巢正常，左卵巢较正常增大1倍，呈实性。术中在包块囊性区行减张术，吸出淡黄色清亮液体约3 000 ml，吸净液体后剩下部分为肌纤维组织，灰白色，似棉絮网状，于包块近宫体处剥离包块包膜，见肿块蒂源于子宫颈后壁，行肿瘤切除及子宫切除术。病检报告：子宫颈血管平滑肌瘤。

2 讨论

血管平滑肌瘤属于平滑肌肿瘤范畴，主要来自皮肤及皮下组织，亦可深至筋膜或肌肉，少数发生在较深部外围组织，胃肠道、肠系膜及眼眶等，亦可发生于大动脉及大静脉，瘤体一般包膜完整，呈膨胀性生长，半数患者可有疼痛感[1]。血管平滑肌瘤多为单发，常见于下腹，特别是小腿，其次为前臂、腕及手掌等处，生育年龄多见。本例发生于宫颈，且肿瘤巨大，给手术带来困难。

血管平滑肌瘤分化良好，但其生物行为却具有侵蚀性，在

（下转1031页）

作者简介：郑维英（1966-），女，重庆市开县人，主治医师，主要从事妇产科肿瘤方面的研究。电话：13038309988，E-mail：zengwei2@chinacc.com

收稿日期：2007-04-11；修回日期：2007-04-20