文章编号:1000-5404(2007)21-2027-04

论著

转录因子 AP-2α 对脑外伤后蓝斑神经元 TH 表达的影响

余维华,孙善全,汪克建,杨 美,刘 辉,贺桂琼 (重庆医科大学基础医学院解剖学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨转录因子激动蛋白-2α(activator protein 2α, AP-2α)对脑外伤后蓝斑去甲肾上腺素能神经元中酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)表达的影响。**方法** 将90只Wistar大鼠分为对照组和脑外伤组,脑外伤组又分为外伤后1、3、6、24、72 h共5个组($n=15$)。用Feeney氏法制作机械性脑外伤大鼠模型,分别于脑外伤后各相应时间点取出脑干,对蓝斑(locus ceruleus, LC)所在部位作冷冻切片,用免疫荧光双标检测TH和AP-2的表达,观察二者在外伤后各相应时间点LC神经元中的表达变化。**结果** 在脑外伤后各时段,LC神经元的TH和AP-2α阳性细胞数量和荧光强度值均比对照组明显增加($P<0.05$),3 h达到高峰,随后逐渐降低,但72 h仍然高于对照组;而且TH和AP-2α的表达变化趋势基本一致,在同一神经元可以共表达。**结论** 机械性脑外伤使LC去甲肾上腺素能神经元中TH表达增加,使去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)合成增多,NE在外伤应激过程中起着重要作用;AP-2α参与了TH的表达调控,AP-2α上调可能是导致了TH表达增加的重要原因。

关键词: 酪氨酸羟化酶;激动蛋白-2α;脑外伤;蓝斑
中图法分类号: R322.81; R394.2; R651.102 **文献标识码:** A

Effect of transcription factor AP-2α on expression of tyrosine hydroxylase in locus ceruleus after traumatic brain injury

YU Wei-hua, SUN Shan-quan, WANG Ke-jian, YANG Mei, LIU Hui, HE Gui-qiong (Department of Anatomy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the role of transcription factor activator protein 2α (AP-2α) on the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in noradrenergic neurons of locus ceruleus (LC) after traumatic brain injury. **Methods** Ninety rats were randomly divided into control group and injury group that comprised 5 subgroups. There were 15 rats in each group. The rat model of traumatic brain injury was established with Feeney's methods. Brain stems were dissected from decapitated heads 1, 3, 6, 24 and 72 h after traumatic injury and freeze-mounted for cryo-sectioning. TH and AP-2α expressions in noradrenergic neurons of LC were analyzed with double immunofluorescence. **Results** The number and fluorescence intensity of TH and AP-2α-positive neurons in LC at various intervals after injury significantly increased as compared with control group ($P<0.05$). The expression of TH reached the peak 3 h after injury and decreased gradually, but still higher than control group 72 h after injury. The pattern of AP-2α expression was consistent with that of TH in LC, and AP-2α and TH could coexist in the same neurons. **Conclusion** The increase of TH expression in LC can synthesize more norepinephrine rapidly after brain injury. Norepinephrine plays an important role during the process of injury stress. AP-2α participates in the regulation of TH expression in noradrenergic neurons and its upregulation may be an important reason for increased TH expression in LC.

Key words: tyrosine hydroxylase; activator protein 2α; brain injury; LC

蓝斑(locus ceruleus, LC)去甲肾上腺素能神经元在应激反应中起着非常重要的作用,多种内部和外部应激原均能将其快速激活[1,2],使其释放去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),参与机体内外环境的功能调节。机械性脑外伤对机体是一种急性应激,能否快速激活LC去甲肾上腺素能神经元,目前国内外相关报

基金项目:国家自然科学基金(30270437)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30270437)
作者简介:余维华(1976-),男,重庆市合川区人,博士,讲师,主要从事神经生物学方面的研究。电话:(023)60826579, E-mail: weihuayu0707@gmail.com
通讯作者:孙善全,电话:86-23-68485763, E-mail: sunsq2151@sohu.com
收稿日期:2007-03-26;修回日期:2007-04-27

道较少。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是合成NE的限速酶,也是鉴定LC去甲肾上腺素能神经元激活的标志性酶。有研究表明[3],在正常情况下,转录因子激动蛋白2α(activator protein 2α, AP-2α)参与了TH表达的调控,如果脑外伤应激能影响LC内TH的表达,那AP-2α是否介导其表达变化呢?因此,本研究利用免疫荧光双标,对脑外伤各时段LC内TH和AP-2α的表达变化进行检测,探讨脑外伤应激后LC内TH的表达调控机制,以便为脑外伤应激的分子机制研究提供形态学证据。

1 材料与方法

1.1 实验分组及模型制作

成年Wistar大鼠90只(由本校实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量为(220±37) g。利用随机数字法分为对照组和实验组,实验组又分为外伤后1、3、6、24 h和72 h共5个组(n=15)。闭合性脑外伤模型的制作和取材:用Feeney's法制作大鼠闭合性脑外伤模型[4]:在左顶骨,用牙科钻在冠状缝后1.5 mm,中线左侧旁2.5 mm处钻一直径5 mm骨窗,保持硬脑膜完整,用80 g砝码于50 cm高处,沿金属杆自由落下撞击硬脑膜,造成闭合性脑外伤。在脑外伤后1、3、6、24 h和72 h取出脑干,根据HE染色和尼氏染色对LC进行定位,对含有LC的部位作冷冻切片,做TH和AP-2α的免疫荧光双标,检测两者在脑外伤后各时段的表达变化。

1.2 伤后行为学评价

从在木棒上行走的平衡能力、能否自主翻身、能否支起头部质量、能否稳定的行走直线、用无齿镊以中等力夹尾能否逃走及迅速收回其肢体等六个方面[5],对脑外伤后各个时段大鼠的行为学进行评分。脑外伤模型鼠的行为学评分比对照组显著降低(P<0.05)时,才归入实验组。

1.3 切片免疫染色

从对照组和脑外伤成年大鼠新鲜取出的脑干作冷冻切片,作免疫荧光染色。用OCT包埋脑干后作冷冻切片,一张切片上连续贴6张脑片(片厚10 μm),第7张用来做HE染色和Nissl氏染色(以判断LC所在的位置)。连续的冷冻切片用电吹风吹干(吹15 min),用4%多聚甲醛(PBS pH 7.4)固定15 min,冷PBS洗5 min,包含5%羊血清的PBS室温下封闭1 h,PBS洗5 min,更换3次,随后加用含有5%羊血清的PBS稀释一抗,鼠抗TH(1∶1 000),4 ℃过夜,PBS洗5 min,更换3次,用TRITC标记的抗鼠Ig G(1∶100)在黑暗中室温孵育1 h;PBS洗5 min,更换3次;然后用5%羊血清+3%小牛血清白蛋白封闭2 h,PBS洗后加兔抗鼠AP-2α(1∶400),4 ℃过夜,PBS洗5 min,更换3次,用FITC标记的羊抗兔Ig G(1∶100)在黑暗中室温孵育1 h;PBS洗5 min,更换3次,最后50%甘油封固后,在荧光显微镜下观察。

1.4 图像分析及统计学处理

利用随机数字法取对照组和脑外伤组的LC切片,对照组取15张,脑外伤后每个时间点各取15张,在荧光显微镜下对每张切片TH和AP-2α阳性神经元进行计数,并用激光共聚焦显微镜对两者的荧光强度进行测定,记录其平均强度值作为统计值。采用SPSS 11.0统计软件对实验数据进行组间t检验。

2 结果

2.1 大鼠行为学观察

在脑外伤后各个时间段大鼠的行为学主要有以下表现:平衡能力不好,一个或多个爪子从横梁上掉下;不能自主翻身;不能支起头部重量;能走直线但步态不稳;用无齿镊以中等力夹其尾,能逃走但不超过10 cm,用无齿镊夹尾后其肢体能够收回,但反应较慢等表现,正常组行为学评分为21.00,脑外伤后1、3、6、24、72 h大鼠的行为学评分分别为[(10.52±1.24),(11.33±1.51),(12.28±1.35),(13.11±1.24)和(4.57±1.12)]。大鼠伤后各时段的行为学评分比对照组显著下降,随着伤后时间的延长,其行为学评分有所上升,功能有所恢复,但在72 h后仍低于对照组(P<0.05)。由此可知,脑外伤的模型构建是成功的。

2.2 对照组LC内TH和AP-2α的表达

对照组LC内AP-2α阳性神经元的绿色荧光强度也较弱,强度值为(10.24±2.54),平均数量为(76±16)个,呈卵圆形或圆形(图1A);TH阳性神经元的红色荧光强度较淡,强度值为(13.67±2.13),数量较少,平均(88±14)个,胞体大,呈卵圆形或三角形(图1B);图1C为图1A和图1B的叠加,显示了TH和AP-2α在同一神经元中表达。

2.3 脑外伤组LC内TH和AP-2α的表达

脑外伤组LC的TH和AP-2α阳性神经元均排列非常紧密,两者染色加强,数量增多,其胞体较大,呈圆形、三角形等多种形状,有大量红色荧光标记的TH阳性神经元和绿色荧光标记的AP-2α阳性神经元。从见图1D、1E和表1、2可知,TH和AP-2α阳性神经元数量及荧光强度值在伤后1 h均显著增加,至3 h达到高峰,之后逐渐下降,但两者在伤后72 h仍高于对照组(P<0.05)。TH和AP-2α在同一神经元中共表达,并且两者表达范围和表达变化趋势基本一致。

表1 脑外伤后各时段LC的TH和AP-2α阳性神经元数($\bar{x}\pm s$)

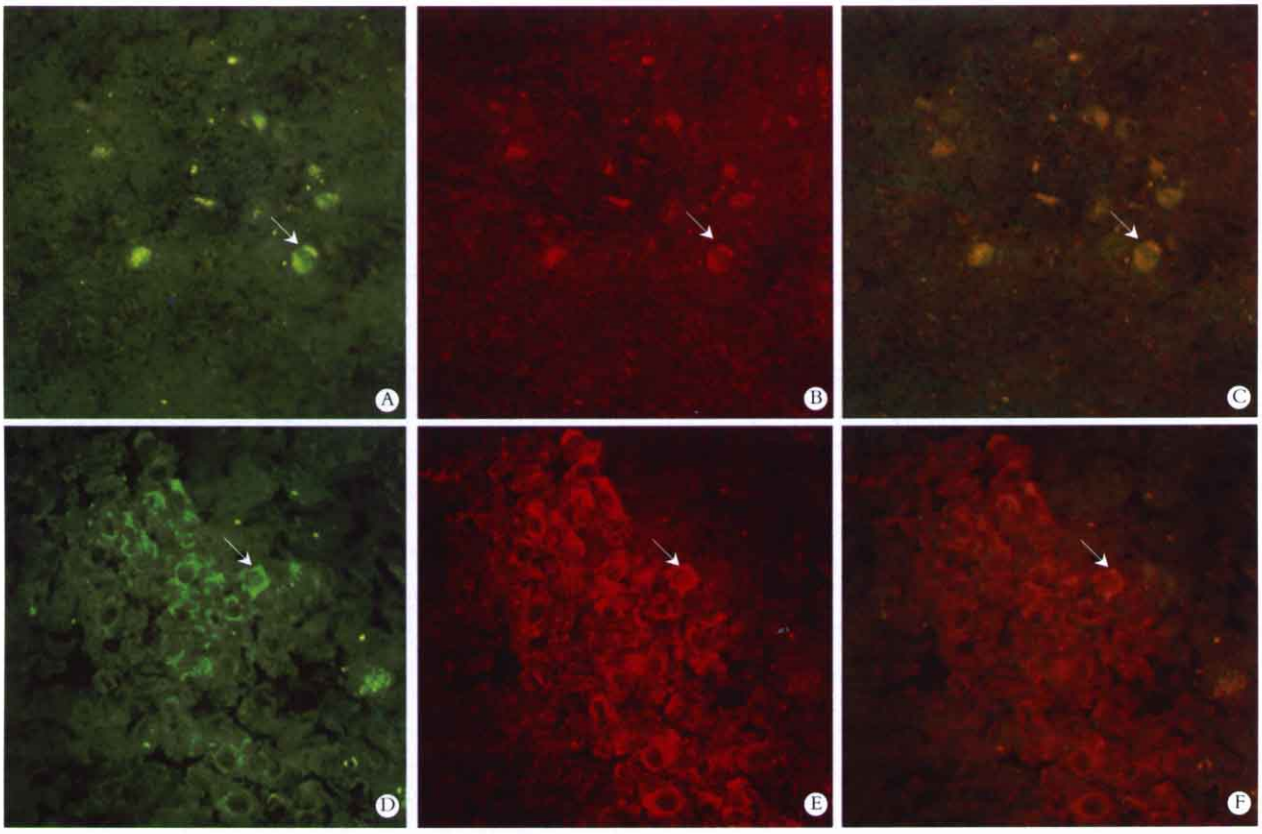
组别	TH	AP-2α
对照组	88±14	76±16
实验组		
1 h	144±28[a]	132±31[a]
3 h	184±32[a]	156±20[a]
6 h	162±26[a]	143±29[a]
24 h	144±32[a]	124±25[a]
72 h	127±23[a]	114±27[a]

a: P<0.05,与对照组比较

表2 脑外伤后各时段LC的TH和AP-2α阳性细胞荧光强度值($\bar{x}\pm s$)

组别	TH	AP-2α
对照组	13.67±2.13	10.24±2.54
实验组		
1 h	24.54±3.67[a]	20.18±1.77[a]
3 h	38.53±2.18[a]	32.45±2.38[a]
6 h	35.59±4.28[a]	29.86±3.26[a]
24 h	30.17±3.47[a]	25.47±2.36[a]
72 h	25.43±1.85[a]	19.21±1.97[a]

a: P<0.05,与对照组比较



A：对照组 LC 内 FITC 标记的 AP-2α 阳性神经元；B：对照组 LC 内 TRITC 标记的 TH 阳性神经元；C：A 和 B 的叠加，显示 AP-2α 和 TH 在同一神经元中共表达；D：脑外伤 3 h 后 LC 内 FITC 标记的 AP-2α 阳性神经元；E：脑外伤 3 h 后 LC 内 TRITC 标记的 TH 阳性神经元；F：D 和 E 的叠加，显示 AP-2α 和 TH 在同一神经元中共表达；↑：各图中相应的阳性神经元

图 1　TH 和 AP-2α 在对照组和脑外伤 3 h 后 LC 中的表达　（免疫荧光双标 ×200）

3　讨论

LC 位于第四脑室底，脑桥被盖的背侧和小脑上脚的内侧，由多极形和圆形的大细胞组成，由于其主要分泌儿茶酚胺神经递质去甲肾上腺素（NE），故也被称为去甲肾上腺素能 A6 细胞群；LC 向腹侧继续延伸，形成一个较大的三角形的细胞群成为 LC 下核[6]。绝大多数脑内去甲肾上腺素能神经元集中在 LC。LC 的背侧部投射到海马和隔区；腹侧部投射到脊髓；吻部投射到下丘恼；尾部投射到丘脑；其核内的细胞弥散投射至小脑、新皮质和杏仁核-梨状皮质[6]。LC 发出的纤维不仅到同侧脑区，而且还投射到对侧区域。LC 神经元产生的 NE，经广泛的去甲肾上腺素能纤维投射到中枢神经系统的多个部位，作用于相应的受体，完成相应的生理功能调节。多种应激原比如寒冷、限制、足电击、隔绝、强制行走和慢性社会应激都可使 LC 迅速激活[7]，LC 激活作为一种预警信号，是机体对内外环境变化产生的一种适应性反应。因此，LC 在应激反应过程中发挥了十分重要的作用。

TH 是儿茶酚胺（CA）合成过程中的限速酶，它在儿茶酚胺能神经元中的表达情况反映了 CA 的合成水平，而 LC 中 TH 的表达水平主要反映了其中 NE 合成状况。TH 表达变化可快速引起 NE 上调或下调[8]。有研究报道[9-10]，TH 基因敲除小鼠绝大部分难以存活；如果在其食物中添加儿茶酚胺类似物二羟基苯丝氨酸，则多数小鼠可能存活到成年，但其应激能力仍然很差，因为缺少 TH 基因，机体不能大量合成 NE，表明 TH 在应激过程中具有重要作用。本实验显示在机械性脑外伤后，LC 内 TH 表达水平和阳性细胞数在伤后 1 h 迅速增加，3 h 达到高峰，以后逐渐下降，但一直维持较高的水平，至 72 h 仍高于对照组。提示脑外伤应激后，LC 内 NE 合成大量增加，释放到中枢神经系统的相关部位，以提高机体在应激过程中的警惕性，影响下丘脑神经元的神经内分泌活动和边缘系统的功能，并维持大脑皮质的兴奋性和觉醒状态；同样，脑外伤应激还可使交感-肾上腺素系统兴奋性增加，释放 NE 入血，使其浓度迅速增加，调控机体对脑外伤应激的急性反应，如调节心律、心排血量、外周血管阻力、抑制胰岛素分泌、刺激高血糖素的分泌来提高大脑、心脏、骨骼肌的血氧和血糖的供给。可见，外伤后 LC 内 TH 表达迅速增加，是满足机体适应脑外伤应激反应的需要，可维持内环境的稳定。

目前研究表明[11]，许多介导细胞生长、形成和联系的基因，一般都具有 AP-2 结合位点和顺式调控序列。转录因子 AP-2 家族在基因表达调控和细胞分化过程中起着重要的作用。AP-2 是一种特殊序列的 DNA 结合蛋白，可以与诱导病毒和细胞启动子的增强元件相互作用，刺激某些基因选择性的表达。在哺乳动物中已经确定了 4 个 AP-2 家族成员，其分别为 AP-2α、AP-2β、AP-2ε 和 AP-2δ 基因。AP-2 蛋白的 DNA 结合域起始于碳端约 200 个氨基酸处，特点是脯氨酸和谷氨酸残基成簇排列，4 种不同的 AP-2 蛋白在 DNA 结合域存在序列的同一性，它们以同源或异源二聚体的形式结合到一个 GC 富含元件上。不同 AP-2 蛋白尽管存在序列上的变化，但所有类型的 AP-2 都具有激活转录的能力，本研究的是 AP-2α。成年脑内 AP-2α 的表达模式提示，AP-2α 除了在早期发育过程起重要作用外，对于某些神经元的表型决定和功能特征维持仍然很重要，AP-2α 参与调节了乙酰胆碱酯酶、乙酰胆碱转移酶、烯醇化酶、突触蛋白、早老素 2、脑啡肽原和儿茶酚胺合成酶等多种神经相关基因的调控[11]。由于 AP-2α 参与了 TH 基因转录的调节，人们推测儿茶酚胺能神经元可能表达 AP-2α，后来在实验中证实几乎所有 LC、孤束核、极后区的去甲肾上腺素能神经元均有 AP-2α 和 TH 的共表达[12]；在正常情况下，LC 中有一些神经元表达 AP-2α，但表达水平较低[3]，而脑外伤后 AP-2α 是否参与了 TH 表达变化的调控，目前还少见相关报道。本实验显示在机械性脑外伤后，转录因子 AP-2α 在伤后 1 h 就迅速增加，3 h 达到高峰，然后逐渐下降，但一直维持较高的水平，至 72 h 仍高于对照组。在本实验检测的所有时段，转录因子 AP-2α 的变化趋势与 TH 是相一致的；从图 1 可知，TH 与 AP-2α 所表达的范围基本重叠，大部分 TH 阳性神经元都表达 AP-2α；而且在斑马鱼的研究也证实，AP-2α 对于 LC 中去甲肾上腺素能神经元的分化和 TH 表达都是必需的[12]；并且有人在 TH 启动子的近端区发现了 AP-2α 在转录启动时的结合位点[13]。综上，我们得出结论，在脑外伤应激后，AP-2α 作为转录因子与 TH 启动子上的相关位点结合，启动 LC 中 TH 基因的大量转录，以满足机体应激反应的需要。

综上，脑外伤是一种急性应激，外伤后 TH 表达水平增加、表达范围扩大使 LC 内 NE 合成迅速增多，NE 通过其广泛的投射纤维向上投射到大脑皮质、上丘、丘脑、小脑、主嗅球及侧嗅球、杏仁核，向下投射到脑干和脊髓，参与了中枢神经系统各个部位功能的调节，比如投射到大脑皮质，参与伤后皮层感觉、运动功能的调节，有利于伤后功能的恢复；投射到下丘脑，参与了全身神经内分泌包括体内各种激素和细胞因子水平的调节；投射到脊髓，完成躯体、内脏的各种感觉和运动调节，可见 TH 在此应激过程扮演了非常重要的角色。转录因子 AP-2α 在外伤后各个时段均参与了 TH 的表达调控，其水平上调引起 TH 表达增加，提示不管在正常或应激情况下，AP-2α 对于 LC 去甲肾上腺素能神经元中 TH 的表达均有重要作用。

参考文献：

[1] Xu G P, Van-Bockstaele E, Reyes B, *et al*. Chronic morphine sensitizes the brain norepinephrine system to corticotropin-releasing factor and stress[J]. J Neurosci, 2004, 24(38): 8193-8197.

[2] Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability[J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 2): 385-396.

[3] Kim H S, Hong S J, LeDoux M S, *et al*. Regulation of the tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase genes by the transcription factor AP-2[J]. J Neurochem, 2001, 76(1): 280-294.

[4] Golarai G, Greenwood A C, Feeney D M, *et al*. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury[J]. J Neurosci, 2001, 21(21): 8523-8537.

[5] Yager J Y, Wright S, Armstrong E A, *et al*. The influence of aging on recovery following ischemic brain damage[J]. Behav Brain Res, 2006, 173(2): 171-180.

[6] Bouret S, Sara S J. Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(11): 574-582.

[7] Aston-Jones G, Cohen J D. Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance[J]. J Comp Neurol, 2005, 493(1): 99-110.

[8] Sabban EL, Hebert MA, Liu X, *et al*. Differential effects of stress on gene transcription factors in catecholaminergic systems[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1032: 130-140.

[9] Paladini C A, Beckstead M J, Weinshenker D. Electrophysiological properties of catecholaminergic neurons in the norepinephrine-deficient mouse[J]. Neuroscience, 2007, 144(3): 1067-1074.

[10] Dunn A J, Swiergiel A H, Palamarchouk V. Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1018: 25-34.

[11] Coelho D J, Sims D J, Ruegg P J, *et al*. Cell type-specific and sexually dimorphic expression of transcription factor AP-2 in the adult mouse brain[J]. Neuroscience, 2005, 134(3): 907-919.

[12] Holzschuh J, Barrallo-Gimeno A, Ettl A K, *et al*. Noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain are induced by retinoic acid and require tfap2a for expression of the neurotransmitter phenotype[J]. Development, 2003, 130(23): 5741-5754.

[13] Sabban E L, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events [J]. Trends Neurosci, 2001, 24(2): 91-98.

（编辑 栾 嘉）