论著

文章编号:1000-5404(2008)19-1818-03

缺氧缺血性脑损伤新生鼠 Foxg1 基因与脑皮质特定基因的表达变化及意义

郑 毅,余加林,李禄全,胡琳燕,张先红,邓 兵 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

摘 要:目的 检测缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)后 Foxg1 基因及脑皮质特定基因(Foxp2, ER81, Otx1, Foxp1, RORβ,Reelin)的动态变化。**方法** 采用 Rice 法制作新生鼠 HIBD 动物模型,假手术组作为对照组,分别在术后第3、7、14、28、56 d 取右侧脑半球。半定量 RT-PCR 检测各基因表达水平。**结果** HIBD 后 Foxg1 基因表达水平模型组 3 d 较对照组低($P<0.05$),14、56 d 表达水平均较对照组高($P<0.05$);Reelin 基因表达水平在术后 7 d 及 28 d 均较对照组高($P<0.05$);Foxp2 基因在7、14、56 d 表达水平均较对照组高(P 均 <0.05)。Otx-1 基因在术后7、14、28、56 d 表达水平均较对照组高(P 均 <0.05),模型组与对照组 Otx-1 的表达均呈下降趋势;RORβ、Foxp1、ER81 表达趋势尚不能肯定。**结论** HIBD 后 Foxg1、Reelin 及 Foxp2 表达水平呈上升趋势,Otx1 呈下调趋势,RORβ、Foxp1、ER81 表达趋势尚不能肯定,Foxg1 基因表达变化与脑损伤后大脑结构自身修复的具体机制有待进一步研究。

关键词: 新生鼠;去氧缺血性脑损伤;Foxg1;脑皮质
中图法分类号: R-332; R394.3; R743.31 **文献标识码:** A

Expressions of Foxg1 and other specified genes of cerebral cortex in neonatal rat after hypoxic ischemic brain injury

ZHENG Yi, YU Jia-lin, LI Lu-quan, HU Lin-yan, ZHANG Xian-hong, DENG Bing (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To observe the alteration of Foxg1, Foxp2, ER81, Otx1, Foxp1, RORβ, Reelin genes expressing in cerebral cortex in neonatal rat during hypoxic ischemic brain injury (HIBD). Methods The HIBD model was established according to Rice method. The expression of each gene in the right cerebral hemisphere was examined by semi-quantitative RT-PCR on 3rd, 7th, 14th, 28th and 56th day respectively. Results Compared with the control group, the expression level of Foxg1 in HIBD group was lower on 3rd day, higher on 7th and 28th day ($P<0.05$), that of Reelin was higher on 3rd, 14th and 56th day ($P<0.05$), that of Foxp2 was higher on 7th, 14th and 56th day ($P<0.05$), and that of Otx-1 was higher on 7th, 14th, 28th and 56th day ($P<0.05$). The expression level of Otx-1 was down-regulated in both HIBD and control groups, whereas the expressions of RORβ, Foxp1 and ER81 in this experiment were difficult to determine. Conclusion The expression levels of Foxg1, Reelin and Foxp2 were up-regulated, but the expression level of Otx1 was down-regulated, while the alteration tendency of RORβ, Foxp1 and ER81 were unclear in this experiment. The relationship between Foxg1 gene and repair of brain structure will be explored in future.

Key words: neonatal rat; hypoxic ischemic brain injury; Foxg1; cerebral cortex

Foxg1 基因是人类 FOX 基因家族(human Fork-head-box gene family)的重要成员[1]。在胚胎脑发育的过程中 Foxg1 基因表达缺陷将导致卡哈尔—雷济厄斯细胞(Cajal-Retzius cells,CR 细胞)过度增生,大脑皮质第一层过度膨胀而脑皮质其他五层结构均发育不良,表现为大脑皮层特定基因(Foxp2, ER81, Otx1, Foxp1, RORβ)表达缺陷,并因此认为 Foxg1 在胚胎脑发育的过程中起着关键性的作用[2]。出生后 Foxg1 基因仍然持续表达于大脑皮质、海马、嗅球及基底核等由端脑分化来的脑组织[3],而发生缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)时正是这些脑组织容易受到损伤,Foxg1 基因在 HIBD 后脑组织中的表达变化及与脑皮质特定基因的表达变化目前尚少见研究报道。本研究旨在探讨 HIBD 后 Foxg1 及其他脑皮质特定基因表达的动态变化,为进一步研究 HIBD 后脑结构及功能自身修复障碍的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

7 d 龄健康 Wistar 新生鼠(12~15 g/只)140 只购自重庆医

基金项目:重庆医科大学儿童医院院级科研课题(2005,2006)
Supported by the Scientific Research Foundation of Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University (2005,2006)
作者简介:郑 毅,男,重庆市南川区人,硕士,医师,主要从事新生儿缺氧缺血性脑损伤方面的研究。电话:(023)63877054
通信作者:李禄全,E-mail:liluquan456@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-09-14;修回日期:2007-10-24

科大学实验动物中心,雌雄不限。TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 RT-PCR 试剂盒及引物(表 1)购自大连宝生物有限公司,RNA/DNA 同步抽提试剂购自上海华舜生物工程有限公司,PCR 仪器及相应检测设备为本中心实验室提供。

表 1　RT-PCR 所用引物

基因	引物(5′~3′)	产物
Foxg1	正义:ACTTTGAGTTACAACGGGACCACG	282 bp
	反义:AAAGTAACTGGTCTGGCCCGC	
Reelin	正义:ATACGTGGATCCCTGTATCTACTTGCTGTGTTGC	342 bp
	反义:ATACGTCTAGACAAGTCACTTTGTTACCACAG	
RORβ	正义:GATTTATTTTGCACTGCAACATGTG	96 bp
	反义:ACTGCCGTGATAGTTGGTATCTTG	
Foxp1	正义:GCAGCAGCTCTGGAAAGAAG	501 bp
	反义:GCAGACTTGGAGAGGGTGAC	
ER81	正义:CTCAGGTACCTGACAATGATG	338 bp
	反义:CTGAGAAGGAGGGAGGTGAGC	
Otx-1	正义:GCTGTTCGCAAAGACTCGCTAC	423 bp
	反义:ATGGCTCTGGCACTGATACGGATG	
Foxp2	正义:TGGGAGATCAAGTGGTGACA	502 bp
	反义:GCTGCTCTTTTGCTTGCTTT	
β-actin	正义:AGGGGCCGGACTCGTCATACT	642 bp
	反义:ACACTGTGCCCATCTACGAGG	

1.2　动物模型的建立

同窝别新生鼠用随机数字法 1∶1 比例分两组,每组每时间点 10 只,采用 Rice 法制作 HIBD 动物模型:腹腔注射 1% 的水合氯醛 0.15 ~0.2 ml 麻醉后分离并结扎右侧颈总动脉,术后放入缺氧仓中,恒温通入氮气,测氧浓度调整氧浓度到 8% 并保持 3 h。后取出新生鼠与对照组混合后放回母鼠身边喂养。假手术组分离但不结扎右侧颈总动脉,术后亦不进行缺氧,于术后第 3、7、14、28、56 天待检,本实验中共制备 140 只动物模型,其中 14 只于术中颈总动脉断裂,12 只缺氧过程中死亡未纳入统计,4 只用于动物模型鉴定。

1.3　动物模型的鉴定

模型制备后 24 h 及 28 d,取 HIBD 组及正常组各 2 只新生鼠脑组织,4% 多聚甲醛固定,石蜡切片并作常规 HE 染色检测。

1.4　半定量 RT-PCR 检测

于各时间点快速分离鼠右侧脑半球脑(切除小脑及脑干),制备匀浆,RNA/DNA 同步抽提法提取 RNA,将 β-actin 与目标基因于同一反应体系进行 RT-PCR 操作, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后用 Quantity one 软件分析图片获取相关数据。

1.5　统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件包分析处理。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用双因素方差分析(组间比较采用 LSD 法)。

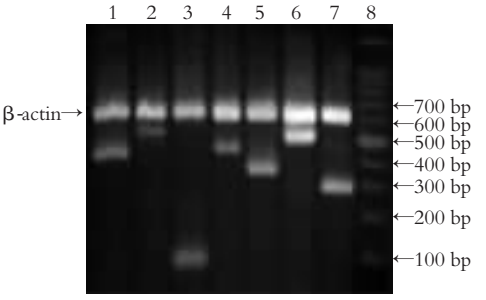
2　结果

2.1　动物模型鉴定结果

常规 HE 染色显示右侧出现明显病理变化,肉眼见脑组织苍白,镜下观察主要为神经元坏死,组织结构模糊,炎性细胞增多等,与本研究小组前期的结果相似[4],在 28 d 检测时发现右侧脑半球存在团聚状胶质斑痕,提示模型制作成功。

2.2　半定量 RT-PCR 结果

琼脂糖凝胶电泳图见图 1,分析凝胶得数据见表 2。



1:Reelin;2:Foxp2;3:RORβ;4:Otx-1;5:ER81;6:Foxp1;7:Foxg1;8:标准

图 1　HIBD 后 Foxg1 及相关基因琼脂糖凝胶电泳图

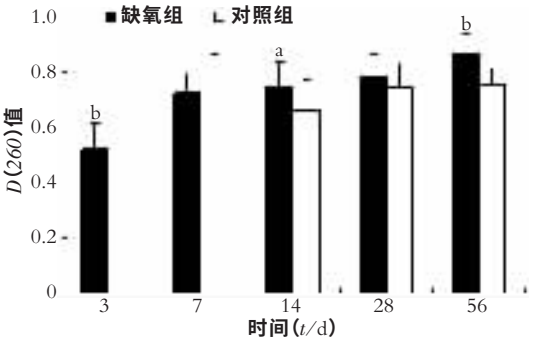
表 2　缺氧缺血性脑损伤新生鼠 Foxg1 与其他脑皮质特定基因的变化($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 56 天
Foxg1					
模型组	0.52 ±0.09[a]	0.73 ±0.07	0.75 ± 0.09[a]	0.79 ±0.08	0.87 ±0.07[a]
对照组	0.80 ±0.12	0.79 ±0.08	0.66 ±0.11	0.74 ±0.09	0.76 ±0.06
Reelin					
模型组	0.59 ± 0.03	0.54 ±0.13 [a]	0.53 ± 0.08	0.70 ±0.06 [a]	0.67 ±0.14
对照组	0.57 ± 0.11	0.33 ± 0.06	0.47 ±0.08	0.55 ±0.07	0.62 ±0.10
RORβ					
模型组	0.95 ±0.12	0.84 ±0.08	0.79 ±0.11[a]	0.83 ±0.11[a]	0.84 ±0.08[a]
对照组	0.98 ±0.13	0.87 ±0.17	1.06 ±0.22	1.24 ±0.15	1.15 ±0.17
Foxp1					
模型组	0.62 ±0.06 [a]	0.87 ±0.08[a]	0.71 ±0.06	0.64 ±0.07[a]	0.70 ±0.11[a]
对照组	0.74 ±0.11	0.74 ± 0.10	0.75 ±0.11	0.74 ±0.08	0.90 ±0.06
ER81					
模型组	0.65 ±0.10	0.94 ±0.07[a]	0.74 ±0.09	0.86 ±0.08	1.03 ±0.11
对照组	0.71 ±0.12	0.67 ±0.13	0.80 ±0.11	0.94 ±0.11	0.98 ±0.12
Otx-1					
模型组	—	0.74 ±0.09[a]	0.54 ±0.07[a]	0.54 ±0.04[a]	0.55 ±0.04[a]
对照组	0.56 ±0.08	0.43 ±0.08	0.44 ±0.09	0.44 ±0.09	0.40 ±0.06
Foxp2					
模型组	0.44 ±0.07[a]	0.52 ± 0.07[a]	0.52 ±0.08[a]	0.45 ±0.05	0.57 ±0.06[a]
对照组	0.52 ±0.07	0.36 ± 0.05	0.45 ±0.06	0.47 ±0.04	0.43 ±0.03

a:$P<0.05$, 与对照组比较

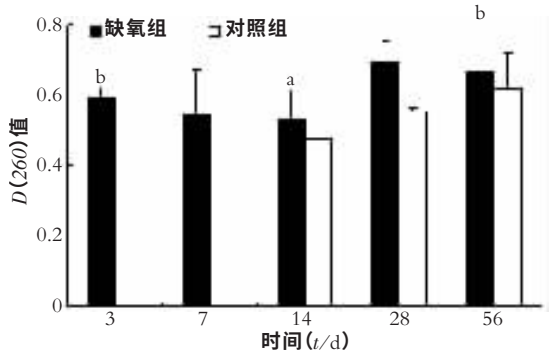
2.3　Foxg1、Reelin 基因变化趋势

以不同时间为横坐标,基因变化为纵坐标,绘制的 Foxg1、Reelin 基因的时间变化趋势见图 2、3。



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$, 与对照组比较

图 2　Foxg1 基因动态变化图



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

图3 Reelin 基因动态变化图

3 讨论

本实验用经典 Rice 法成功制备了 HIBD 动物模型,在此基础上,动态检测 Foxg1 表达。发现术后 7d 模型组 Foxg1 表达较对照组低,推测为出生后 Foxg1 由端脑分化来的大脑皮质、海马、嗅球等脑组织中表达[3]。HIBD 时正是这些组织最易受损,故导致 HIBD 后 7d 内 Foxg1 表达较对照组低。HIBD 7d 后内环境改善,大脑皮质、海马等部位内源性神经干细胞(neural stem cell, NSC)反应性增生,Foxg1 表达又逐渐上调,这符合 HIBD 后自身修复的病理生理过程。

Foxg1 是调控神经上皮细胞增殖和分化的关键基因[2],本研究动态检测与 Foxg1 关系密切的其他皮质层特定基因在 HIBD 后表达的自然演化过程,发现 reelin 表达总体上模型组高于对照组,呈上调趋势。已有研究表明 HIBD 时脑皮质会出现选择性神经元坏死,即主要损伤的是那些代谢旺盛神经元,尤其是第3、5层神经元损伤更为突出甚至出现层状坏死。本研究从基因水平上发现 HIBD 后脑皮质第2层特定基因 RORβ,第3层 Foxp1 表达总体上对照组高于模型组,第4层 Otx-1 基因表达呈逐步下调,而脑皮质第1层基因 reelin 表达过度,提示 HIBD 后脑皮质第1层修复可能过度,但需要进一步研究证实。

Foxg1 调控神经上皮细胞增殖与分化,影响脑发育的进程主要通过两条途径实现:①对抗转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)的抗增殖作用,调控神经上皮细胞增殖[5,6]:Foxg1 通过与 Smad 蛋白复合物竞争与 DNA 结合配偶体结合,调控 TGF-β 信号通路,发挥对抗 TGF-β 的抗增殖作用,促进神经上皮细胞增殖;②Foxg1 抑制骨形成蛋白4(bone morphogenetic proteins 4 ,BMP4)过度表达,调控神经上皮细胞分化[3,5]:BMP4 可作用于细胞膜上受体 BMPR,经细胞内信号转导途径而发挥作用,BMP4 表达增加将导致神经上皮细胞过早分化[7],Foxg1 可抑制 BMP 4 过度表达。胚胎脑发育过程中若 Foxg1 表达缺陷,其调控 TGF-β 信号通路、抑制 BMP4 均下降将导致神经上皮细胞过度分化,干细胞库消耗过度而导致脑发育不良。另一方面,胚胎脑发育过程中,若 Foxg1 过度表达,上述调控能力过度增强又会促进神经上皮细胞过度增殖而分化不足,将导致端脑和中脑向外过度膨胀性生长,同样导致脑发育不良[8]。本研究表明在 HIBD 后期 Foxg1 表达高于对照组且呈上调趋势,同时脑皮质第1层基因 Reelin 表达呈上调趋势并始终高于对照组,而第2、3、5层基因表达并无此现象,提示在 HIBD 后期 Foxg1 基因表达过度上调,可能导致 NSC 过度增殖而分化不足从而导致脑皮质的自身修复能力下降。本研究表明目前尚不能解释的现象是:第4层的特定基因 Otx-1 无论在 HIBD 组还是对照组均表现为逐步下调的趋势,同时第6层的特定基因 Foxp2 在 HIBD 后逐步上调,这有待进一步研究。

本研究检测在胚胎期脑发育过程中起关键作用的基因 Foxg1 及与之相关的脑皮质特定基因在新生鼠 HIBD 后脑组织中表达变化,结合脑皮质第1层特定基因 reelin 表达过度,推测 HIBD 后 Foxg1 基因表达过度上调,可能导致 NSC 过度增殖而分化不足从而导致脑皮质的自身修复能力下降,为进一步研究 HIBD 后 Foxg1 过度对大脑修复影响的信号转导机制提供新的线索。

参考文献:

[1] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review)[J]. Int J Oncol, 2004, 25(5): 1495-1500.

[2] Hanashima C, Li S C, Shen L, *et al*. Foxg1 suppresses early cortical cell fate[J]. Science, 2004, 303(5654): 56-59.

[3] Dou D L, Li S, Lai E. Dual role of brain factor-1 in regulating growth and patterning of the cerebral hemispheres[J]. Cereb Cortex, 1999, 9(6): 543-550.

[4] 李禄全,余加林,官晓清, 等. 鼠骨髓间充质干细胞在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内的分布及分化[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 327-330.

[5] Hanashima C, Shen L, Li S C, *et al*. Brain factor-1 controls the proliferation and differentiation of neocortical progenitor cells through independent mechanisms[J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6526-6536.

[6] Dou C, Lee J, Liu B, *et al*. BF-1 interferes with transforming growth factor beta signaling by associating with Smad partners[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(17): 6201-6211.

[7] Panchision D M, Pickel J M, Studer L, *et al*. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate[J]. Genes Dev, 2001, 15(16): 2094-2110.

[8] Ahlgren S, Vogt P, Bronner-Fraser M. Excess FoxG1 causes overgrowth of the neural tube[J]. J Neurobiol, 2003, 57(3): 337-349.

(编辑 吴培红)