论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2180-03

脑红蛋白对大鼠局灶性脑缺血组织的保护作用

刘 娟[1], 姚国恩[1], 蒋晓江[1], 陈星云[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]脑三科,[2]第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨增加脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)表达对大鼠在体局灶性脑缺血组织保护作用的影响。**方法** 采用Hemin诱导脑红蛋白表达的方法,将SD大鼠随机分为5组,分别为假手术对照组、手术组、术后1 h Hemin干预组、术后2 h Hemin干预组、术后6 h Hemin干预组。5组大鼠于术后24 h检测脑梗死体积比,通过免疫组织化学及Western blot分析脑红蛋白表达情况。**结果** 术后各时相点Hemin干预组脑梗死体积比较手术组有显著性差异($P<0.05$);各干预组间比较,术后1 h Hemin干预组脑梗死体积比较术后2 h、术后6 h Hemin干预组显著缩小($P<0.05$)。免疫组化分析,各时相点Hemin干预组Ngb阳性神经元数量较手术组增多,以术后1 h Hemin干预组最明显。Western blot分析提示手术组、各时相点Hemin干预组Ngb表达均有非常显著升高($P<0.01$)。与手术组比较,术后1 h Hemin干预组升高非常显著($P<0.01$),术后2 h Hemin干预组升高显著($P<0.05$),术后6 h组无明显差异($P>0.05$)。Ngb表达与脑梗死体积比呈负相关。**结论** 大鼠急性局灶性脑缺血后增加脑红蛋白表达可以减轻缺血脑组织损伤。

关键词: 氯化血红素; 局灶性脑缺血; 脑红蛋白
中图法分类号: R741.05; R743.31; R977.6 **文献标识码:** A

Protective effect of neuroglobin on focal cerebral ischemia in rats

LIU Juan[1], YAO Guo-en[1], JIANG Xiao-jiang[1], CHEN Xin-yun[2] ([1]Third Department of Brain, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the protection of focal cerebral ischemia tissue in rats by increasing the expression of neuroglobin (Ngb). **Methods** Hemin was employed to up-regulate Ngb. Rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established with the method of Zea-Longa. Totally 75 healthy SD rats were randomly and equally divided into 5 groups, that is, sham-operation group, operation group, groups with intraperitoneal injection of hemin (12.5 g/L) in 1, 2 or 6 h after operation. All rats were sacrificed 24 h after operation for volume of cerebral infarct, and the Ngb expression by immunohistochemical method and Western blotting. **Results** The volume of cerebral infarct of operation group was significantly larger than those of hemin treatment groups ($P<0.05$), and that of hemin 1 h postoperatively was significantly smaller than those of the other 2 hemin-treatment groups ($P<0.05$). Immunohistochemical staining showed that more cells positive to Ngb were observed in hemin-treatment group than in operation group, and hemin group of 1 h postoperatively was most distinguished among them ($P<0.01$), followed by the hemin group of 2 h after surgery ($P<0.05$), but there was no difference between the operation group and hemin treatment group of 6 h postoperatively. The Ngb expression was negatively correlated with the volume of cerebral infarct. **Conclusion** Increasing the expression of Ngb attenuates the damage after acute focal cerebral ischemia in rats.

Key words: hemin; focal cerebral ischemia; neuroglobin

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是一种新型携氧球蛋白[1],与血红蛋白(hemoglobin,Hgb)、肌红蛋白(myoglobin,Mgb)功能相似。它主要是促进氧向神经元中的线粒体扩散,或是作为NADH氧化酶促进ATP产生,从而对正常神经细胞的功能维持起重要作用。研究发现,经过氯化血红素(Hemin)诱导的离体神经细胞Ngb在蛋白及mRNA水平均呈增高趋势,并呈时间和浓度依赖性[2]。本实验着重观察大鼠局灶性脑缺

基金项目: 第三军医大学科研基金(2005-2006);重庆市自然科学基金(2006BB5089)
Supported by the Scientific Research Funds of Third Military Medical University (2005-2006) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5089)
作者简介: 刘 娟,女,四川省资阳市人,硕士研究生,医师,主要从事脑缺血、睡眠障碍方面的研究。E-mail: liujuanmm2@yahoo.com.cn
通信作者: 姚国恩,电话:(023)68757863
收稿日期: 2008-05-18;**修回日期:** 2008-09-17

血模型中通过不同时相点在体注射 Hemin 诱导 Ngb 表达,观察 Ngb 对缺血脑组织的保护作用,初步探讨 Ngb 诱导表达的可能机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验试剂　　Hemin 购自上海丽珠生物技术有限公司,先用 NaOH 溶解 Hemin,再用磷酸盐缓冲液调节 pH 值至 7.4,浓度为 12.5 g/L。羊抗 Ngb 多抗血清购自 Santa Cruz 公司,免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉生物试剂有限公司,DAB 为美国 Sigma 产品,牛血清白蛋白、甘氨酸、丙烯酰胺、SDS、TEMED 购自美国 Sigma 公司,PVDF 膜购自重庆纽派科技有限公司,增强型化学发光显影药盒购自美国杜邦 NEN 公司。

1.1.2　动物及分组　　成年健康 SD 大鼠 75 只,来源于第三军医大学野战外科研究所动物中心,雌性,2 ~ 3 月龄,体质量(250 ± 25)g,随机分为 5 组(每组 15 只),即假手术对照组、手术组、术后 1 h Hemin 干预组、术后 2 h Hemin 干预组、术后 6 h Hemin 干预组。除假手术对照组、手术组外,其余各组于术后相应时相点腹腔注射浓度为 12.5 g/L 的 Hemin。每组大鼠均于术后 24 h 断头处死,分别进行脑含水量测定,脑梗死体积比测定,免疫组化染色,Western blot 分析。

1.2　方法

1.2.1　麻醉　　予 1% 戊巴比妥钠腹腔注射(40 mg/kg),术中观察呼吸及心率。

1.2.2　MCAO 模型建立　　参照 Longa 法[3]复制右侧大脑中动脉闭塞模型,具体方法:大鼠麻醉后,仰卧固定,颈部皮肤消毒,行颈部正中切口,钝性分离甲状腺,将其上翻并加以保护,分离右侧颈总动脉(common carotid artery,CCA),颈外动脉(external carotid artery,ECA)和颈内动脉(internal carotid artery,ICA),CCA 近心端、ICA 远端置动脉夹,丝线穿过 ICA、ECA,于 ECA 近分叉处结扎,用眼科剪在 CCA 近分叉处剪一“V”形切口,小心将自制线栓(市售尼龙鱼线,头端清漆包裹,控制头端直径在 0.25 ~ 0.30 mm,酒精消毒,肝素浸泡后备用)自切口插入至颈内动脉,插入长度 1.8 ~ 2.0 cm,以阻断右侧大脑中动脉血流。假手术对照组大鼠手术步骤同前,最后插入长度为 1.5 cm。各组大鼠均于 24 h 后断头处死。

1.2.3　模型验证　　参照 Longa 5 分制评分标准[3],于大鼠术后 6 h 进行评分。0 分:无神经功能缺损;1 分:不能完全伸展左侧前爪;2 分:向左侧转圈;3 分:行走时向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,有意识障碍。除假手术组评分均为 0 分外,其余各组评分为 0 分或 4 分者淘汰。

1.2.4　脑梗死体积测定　　每组随机选取 5 只大鼠,于术后 24 h 断头取脑,冻至适当硬度,去除嗅球、小脑和低位脑干,其余以 2 mm 间隔行连续冠状切片共 6 片,放入 2% TTC 磷酸盐缓冲液中(pH 7.4),37 ℃水孵育恒温箱内避光孵育 30 min 后置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 观察,正常脑组织着深红色,梗死脑组织呈苍白色。将切片扫描入扫描仪中,运行 Image Pro Plus 4.5(IPP)图像处理软件,计算脑梗死体积及全脑体积,并得出脑梗死体积比(脑梗死体积/全脑体积)。

1.2.5　免疫组织化学染色　　采用 ABC 法进行免疫组织化学反应。具体步骤为:切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡后,置于 3% 过氧化氢中孵育 10 min,封闭内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗,0.01 mol/L PBS 浸泡 5 min,抗原热修复后,于正常山羊血清工作液 37 ℃孵育 15 min,倾去血清,加入工作浓度为 1∶750 的山羊抗 Ngb 多抗血清,4 ℃中孵育过夜,0.01 mol/L PBS 中漂洗,5 min × 3 次,加入辣根过氧化物酶活性标记的兔抗羊 IgG 工作液,37 ℃孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 中漂洗,5 min × 3 次,DAB 显色液显色 3 ~ 5 min,苏木精复染,盐酸酒精分化,梯度脱水,中性树胶封片后照相分析。

1.2.6　Western blot 分析　　通过蛋白定量,电泳,电转印,杂交,检测,对 Ngb 进行半定量分析,可见相对分子质量约 1.7×10^3 处各样品显示出 1 条特异性蛋白质条带,将各样品条带行积分光密度扫描,对各组光密度值比值进行统计学分析。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计学软件对实验数据进行单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　MCAO 模型

手术组、各 Hemin 干预组大鼠均于术后出现右侧 Horner 征,左前爪不能前伸,向左侧转圈或向左侧倾倒。假手术对照组未出现上述神经系统缺损症状。

2.2　脑梗死体积比测定

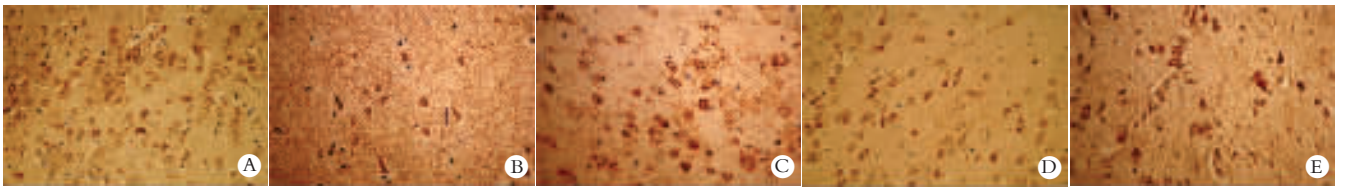
手术组、各时相点 Hemin 干预组大鼠行脑组织 TTC 染色后,均出现右侧大脑半球皮质、皮质下苍白区,假手术组未见苍白区。单因素方差分析提示术后 1 h Hemin 干预组脑梗死体积比(25.36 ± 1.60)较手术组(31.76 ± 1.75)缩小非常显著($P < 0.01$),术后 2 h、术后 6 h Hemin 干预组脑梗死体积比分别为(28.49 ± 1.26)、(28.89 ± 1.42)较手术组均显著缩小($P < 0.05$);各 Hemin 干预组间比较,术后 1 h Hemin 干预组脑梗死体积比较术后 2 h、术后 6 h Hemin 干预组缩小显著($P < 0.05$),术后 2 h 与术后 6 h Hemin 干预组脑梗死体积比无显著差异($P > 0.05$)。

2.3　Ngb 免疫组织化学染色

各组大鼠脑组织切片免疫组织化学染色显示,Ngb 免疫阳性细胞呈棕色颗粒,阳性物质定位于神经元细胞质中,阴性对照照片未见着色。其中,手术组、各时相点 Hemin 干预组缺血区 Ngb 阳性神经元数量较假手术对照组对应区域明显减少,各时相点 Hemin 干预组缺血区阳性神经元数量较手术组增多,以术后 1 h Hemin 干预组明显。见图 1。

2.4　Western blot 分析

与假手术对照组(1.0)比较,手术组、各时相点 Hemin 干预组均有非常显著升高($P < 0.01$)。各组两两比较后,术后 1 h Hemin 干预组(2.95 ± 0.40)较手术组(2.08 ± 0.38)升高非常显著($P < 0.01$),术后 2 h Hemin 干预组(2.79 ± 0.44)较手术组升高显著($P < 0.05$),术后 6 h 组(2.27 ± 0.40)与手术组比较无明显差异($P > 0.05$)。



A：假手术对照组；B：手术组；C：术后 1 h Hemin 干预组；D：术后 2 h Hemin 干预组；E：术后 6 h Hemin 干预组

图 1 各时相点大鼠脑组织免疫组织化学染色 （ABC×400）

2.5 Ngb 与脑梗死体积相关性分析

将 Western blot 分析中 Ngb 表达量与脑梗死体积比进行一元线性回归分析，得 $R^2=0.851$，示 Ngb 表达与脑梗死体积比呈负相关，Ngb 表达越多，脑梗死体积比越小。

3 讨论

脑血管病（cerebral vascular disease，CVD）以其高发病率、高致残率、高死亡率成为严重威胁人类健康的一大类重要疾病。寻找有效的治疗急性脑缺血的神经保护药物成为脑血管病研究的重要内容之一。

Ngb 是德国学者 Burmester 等[1]于 2000 年首次发现的第三类携氧球蛋白，因其主要在脑组织中表达，故称“脑红蛋白”。原位杂交发现 Ngb mRNA 定位于神经元细胞质中，免疫组织化学技术提示大鼠 Ngb 阳性物质广泛分布于脑中，其在不同脑区分布密度不同，在缺氧耐受性越强的区域其 Ngb 表达越多[1]。目前关于 Ngb 生理功能假说较多，推测它主要是促进氧向神经元中的线粒体扩散，或是作为 NADH 氧化酶促进 ATP 产生，从而对正常神经细胞的功能维持起重要作用[4]。

近年来，动物实验证实，在急性脑缺血缺氧状态下，Ngb 在 mRNA 水平和蛋白水平表达增高，其中 6 h 开始增高，24 h 达到高峰，48 h 开始下降，72 h 恢复正常水平，这些结果表明 Ngb 对缺血缺氧非常敏感，对机体产生了保护性应激反应[5]。在慢性脑供血不足动物模型中，Ngb 也有部分性代偿性增高[6]。Sun 等[7]发现在培养的海马神经元中，Ngb 的过度表达能使神经元在缺氧状态下存活率增高，他们还以腺病毒相关载体将 Ngb cDNA 转染入急性缺血状态下的大鼠脑神经元中，发现脑梗死体积较对照组缩小约 50%，而利用反义寡核苷酸技术减少 Ngb 表达时，脑梗死体积较对照组增加 60%[8]，提示在急性脑缺血缺氧损伤中诱导 Ngb 表达对神经元有重要保护作用。但在体增加 Ngb 表达能否对缺血脑组织有保护作用，尚少见报道。

实验证实，Hemin 对离体 Ngb 呈显著增强作用[2]，在局灶性脑缺血大鼠中给予在体注射 Hemin 可以起到神经元保护作用[9]。对于在体 Hemin 干预能否诱导 Ngb 表达，尚少见报道。

本实验结果显示，在大鼠急性局灶性脑缺血状态下，Ngb 表达明显增加。通过 Hemin 术后在体注射，可以增加 Ngb 表达。通过观察不同时相点给药后 Ngb 表达情况发现，术后干预时间越早，Ngb 表达增加越显著。通过观察不同时相点给药后脑梗死体积变化情况发现，干预时间越早，脑梗死体积越小，相关分析提示 Ngb 表达与其脑梗死体积呈负相关，说明在急性脑缺血状态下，Ngb 表达越多，脑梗死体积越小，其脑保护作用越显著，进一步证实了 Ngb 的缺血脑保护作用。关于 Hemin 诱导 Ngb 表达的具体机制及 Ngb 的具体信号转导通路还不十分清楚，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, *et al*. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. Nature, 2000, 407(6803): 520-523.

[2] Zhu Y, Sun Y, Jin K, *et al*. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells[J]. Blood, 2002, 100(7): 2494-2498.

[3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[4] Sowa A W, Duff S M, Guy P A, *et al*. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17): 10317-10321.

[5] 陈秀莲，陈 瑞，高春锦，等. 短暂前脑缺血小鼠海马脑红蛋白表达的动态变化[J]. 动物学杂志, 2008, 43(1): 147-152.

[6] 胡志兵，孙卫文，陆雪芬，等. 慢性脑供血不足大鼠脑中脑红蛋白的表达[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(2): 131-133.

[7] Sun Y, Jin K, Mao X O, *et al*. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(26): 15306-15311.

[8] 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): 3497-3500.

[9] Takizawa S, Hirabayashi H, Matsushima K, *et al*. Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum, but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(5): 559-669.

（编辑 王 红）