文章编号:1000-5404(2008)23-2247-02

经验交流

大鼠脑缺血后脑组织脑红蛋白 mRNA 的动态表达及保护机制研究

尹 静,张祥建,李俐涛,杨 燚 (河北医科大学第二医院神经内科,石家庄 050000)

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是 2000 年由 Burmester 等[1]首先发现的一种新的携氧球蛋白,广泛表达于神经组织,急性缺血的情况下表达上调,在脑的适应性保护中起重要作用。免疫共沉淀实验[2]证明 Ngb 与钠钾 ATP 酶 β_2 亚基存在相互作用。本研究拟采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对大鼠缺氧缺血性脑损伤时脑组织中 Ngb 及钠钾 ATP 酶 α 亚基 mRNA 水平的变化进行观察,以期为 Ngb 所具有的神经保护功能机制的阐明提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

72 只成年健康雄性 SD 大鼠(河北医科大学实验动物中心),体质量 250 ~ 300 g,分为 3 组:大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型组(n = 32),氯化血红素(Hemin)干预组(n = 32)和假手术组(n = 8)。MCAO 组和 Hemin 干预组在模型建立后 3、6、12、24 h 4 个时间点各随机分为 4 个亚组,每个亚组 8 只大鼠。参照 Longa 评分法取行为学评分在 2 ~ 4 分者进行分析。

1.2 实验试剂

Hemin(Sigma 公司):先用 NaOH 溶解,再将 pH 值调至 7.3 ~ 7.4,浓度为 12.5 g/L;RT-PCR 试剂盒(Promega 公司);超微量 ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所);Bradford 蛋白质定量试剂盒(天根生化科技有限公司)。

1.3 模型的建立

参照 Longa 线栓法复制 MCAO 模型,经右侧颈总支动脉分叉处插入线栓,阻断右侧大脑中动脉血流;Hemin 干预组于术前 30 min 腹腔注射 Hemin(50 mg/kg);假手术组仅切开颈部皮肤,分离颈总动脉及分支,不行结扎及栓线。

1.4 钠钾 ATP 酶活性测定

低温下取右侧大脑半球梗死区域脑组织约 0.2 g,制成 10% 的组织匀浆。Bradford 法测定组织蛋白含量,无机磷法测定钠钾 ATP 酶活性。

1.5 RT-PCR 测定

低温下取右侧大脑半球脑组织(去除额极及低位脑干、小脑),Trizol 提取总 RNA,测定其浓度及纯度,进行反转录及产物扩增。引物序列参考 GenBank 核苷酸序列资料,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成纯化,以 β-actin 作为内参照。RT-PCR 反应条件分别为:Ngb:94 ℃,2 min,1 个循环; 94 ℃,30 s;55 ℃,40 s;72 ℃,50 s,28 个循环;72 ℃,7 min,1 个循环;4 ℃ 1 个循环;钠钾 ATP 酶 α_1、α_3 亚基:94 ℃,2 min,1 个循环;95 ℃,30 s; 58 ℃,30 s;72 ℃,40 s,33 个循环;72 ℃,7 min,1 个循环;4 ℃ 1 个循环。采用 2% 琼脂糖电泳观察 PCR 产物,经凝胶成像处理系统拍摄图像,记录积分光密度值。

产物的含量(%) = 扩增产物的光密度值/β-actin 扩增产物的光密度值 ×100%

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 软件进行单因素方差分析,多个样本均数之间的两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 钠钾 ATP 酶活性测定

3 h 时 3 组之间比较差别无统计学意义($P > 0.05$),6、12、24 h 时 MCAO 组与 Hemin 组、假手术组比较差异均有显著性($P < 0.05$,表 1)。

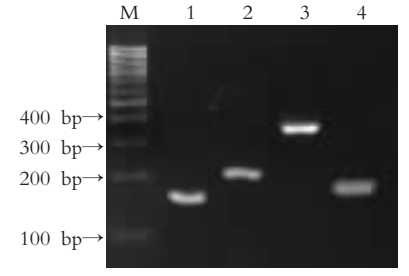
表 1 各组之间钠钾 ATP 酶活性比较($\bar{x} \pm s$, U/mg)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
MCAO 组	4.565 ± 0.776	4.384 ± 0.849[a]	3.889 ± 0.525[a]	3.002 ± 0.442[a]
Hemin 干预组	5.539 ± 1.366	6.064 ± 0.699[b]	5.057 ± 0.610[b]	4.793 ± 1.310[b]

假手术组:(5.612 ± 0.615)U/mg; a:$P < 0.05$,与假手术组比较; b:$P < 0.05$,与 MCAO 组比较

2.2 RT-PCR 分析

2.2.1 凝胶电泳及图像分析结果 Ngb,钠钾 ATP 酶 α_1、α_3 亚基 β-actin 扩增后的产物片段与设计相符(图 1),测量电泳后的 IOD 值,分别计算与 β-actin 的 IOD 值比值(表 2 ~ 4)。



M: 标准; 1: α_1 亚基; 2: α_3 亚基; 3: β-actin; 4: Ngb

图 1 Ngb,钠钾 ATP 酶 α_1、α_3 亚基 mRNA 的表达

基金项目:河北省自然科学基金(C2006000915)
Supported by the Natural Science Foundation of Hebei(C2006000915)
作者简介:尹 静,女,河北省南皮县人,硕士研究生,主要从事脑血管疾病方面的研究。E-mail:yinhaoran1980@163.com
通信作者:张祥建, E-mail:Zhang6xj@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-29;修回日期:2008-04-27

表2 各组之间 Ngb 与 β-actin IOD 值比值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
MCAO 组	0.436 ± 0.077	0.294 ± 0.031[b]	0.282 ± 0.032[b]	0.248 ± 0.028[b]
Hemin 干预组	0.544 ± 0.075	0.462 ± 0.063[a]	0.394 ± 0.057[a]	0.396 ± 0.032[a]

假手术组：0.567 ± 0.051；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与 Hemin 组比较

表3 各组之间钠钾 ATP 酶 α_1 亚基与 β-actin IOD 值比值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
MCAO 组	0.718 ± 0.073	0.685 ± 0.059[b]	0.612 ± 0.029[a]	0.507 ± 0.046[a]
Hemin 干预组	0.867 ± 0.095	0.700 ± 0.071[b]	0.585 ± 0.088[a]	0.522 ± 0.088[a]

假手术组：0.844 ± 0.082；a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与假手术组比较

表4 各组之间钠钾 ATP 酶 α_3 亚基与 β-actin IOD 值比值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
MCAO 组	0.809 ± 0.199	0.774 ± 0.136	0.440 ± 0.072[a]	0.506 ± 0.033[b]
Hemin 干预组	0.652 ± 0.212	0.537 ± 0.071[bc]	0.624 ± 0.103[c]	0.522 ± 0.127[b]

假手术组：0.731 ± 0.082；a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与假手术组比较；c：$P<0.01$，与 MCAO 组比较

2.2.2 缺血后 Ngb，钠钾 ATP 酶 α_1、α_3 亚基 mRNA 表达变化

3 h 时 Ngb mRNA 神经元的表达在 3 组之间无明显差异，6、12、24 h 时 3 组之间比较差异均有显著性($P<0.01$)，MCAO 组和 Hemin 干预组的表达均低于假手术组，MCAO 组低于 Hemin 干预组(表2)。缺血 3 h，钠钾 ATP 酶 α_1 亚基 mRNA 的表达在各组之间无明显差异，6 h 后模型组较假手术组表达均显著减少($P<0.01$、$P<0.05$)(表3)。α_3 亚基 mRNA 早期无明显变化，6 h 时 MCAO 组的表达高于 Hemin 干预组，12 h 时 Hemin 干预组的表达较 MCAO 组高($P<0.01$)，至 24 h 时两组之间无明显差别，但低于假手术组($P<0.05$)(表4)。

3 讨论

实验证实，Ngb 在 mRNA 和蛋白水平均可被 Hemin 所诱导，且呈浓度和时间依赖性[3]。直接给药于短暂性前脑缺血的大鼠，可以起到神经保护作用，提高皮质和纹状体的神经元存活数目。本实验通过 Hemin 干预 MCAO 模型大鼠发现，Ngb mRNA 的表达在 Hemin 干预组高于单纯 MCAO 组，随着缺血时间延长，诱导 Ngb 表达的作用逐渐减弱。有研究表明，Hemin 对 Ngb 的诱导作用可能是通过 SGC -PKG(solube guanylate cyclaseprotein Kinase G)通路介导的，阻断 SGC-PKG 信号转导途径，明显抑制 Hemin 对 Ngb 基因表达的诱导。

免疫共沉淀实验证明，钠钾 ATP 酶 β_2 亚基与 Ngb 存在相互作用。陈婷芳[4]在此基础上发现于细胞内外 Ngb 均能抑制钠钾 ATP 酶活性，且存在明显的时间与剂量依赖关系，提示 Ngb 在缺氧条件下的表达上调，通过与钠钾 ATP 酶 β_2 亚基的相互作用，一定程度的抑制钠钾 ATP 酶活性，在缺氧早期减少细胞的能耗，降低细胞对氧的需求，保护细胞耐受缺氧，进而发挥神经保护作用。

本实验对钠钾 ATP 酶活性的测定表明，MCAO 大鼠钠钾 ATP 酶活性较假手术组显著降低，用 Hemin 干预后，其活性比 MCAO 组明显升高。实验中并未显示 Ngb 对钠钾 ATP 酶活性明显的抑制作用，可能是由于这种抑制作用在 3 h 时已不明显。缺血后钠钾 ATP 酶活性显著下降，Hemin 干预后其活性明显升高，提示 Hemin 通过诱导 Ngb 的表达可以提高钠钾 ATP 酶缺血后的活性，发挥神经保护作用。

脑组织钠钾 ATP 酶对缺血缺氧非常敏感，脑缺血缺氧后可致其活性降低[5]，必然会反映在其功能单位—α 亚基的改变。本实验结果显示，Hemin 干预后钠钾 ATP 酶活性与 α_1、α_3 亚基 mRNA 的表达并不完全相一致，可能由于二者对缺血缺氧的敏感性不同。α_1 亚基 mRNA 的表达与 MCAO 组比较未见明显变化；α_3 亚基 mRNA 缺血 6 h 时在 Hemin 干预组的表达低于 MCAO 组，但其活性却未见明显下降，可能由于 Hemin 干预后脑组织局部缺血缺氧的程度不足以诱导其表达。12 h 时表达已明显高于 MCAO 组，至 24 h 时与 MCAO 组无明显差别。α_3 亚基 mRNA 的表达较 MCAO 组维持于较高水平，可能有利于减少细胞的能耗，保护细胞耐受缺氧，提示钠钾 ATP 酶 β_2 亚基与 Ngb 的相互作用可以调节 α_3 亚基 mRNA 的表达及钠钾 ATP 酶的活性，从而保护细胞耐受缺氧的损伤。

本研究表明，Hemin 可能通过增加 Ngb 表达，在一定程度上升高钠钾 ATP 酶活性，保护细胞耐受缺氧，减轻缺血性脑损伤。

关键词：脑缺血；脑红蛋白；氯化血红素；钠钾 ATP 酶
中图法分类号：R743.310.2 **文献标识码**：B

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] 徐文琳，王春丽，张永亮，等. 脑红蛋白与 Na^+，K^+-ATP 酶 β2 亚基的相互作用及作用位点的鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报，2003，35（9）：823 - 828.
[3] Zhu Y, Sun Y, Jin K, *et al*. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells [J]. Blood, 2002, 100(7): 2494 - 2498.
[4] 陈婷芳. 脑红蛋白(Ngb)神经保护机理与表达调控及其应用的初步研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院，2005：40 - 43.
[5] 文玉杰，李晓玫. 钠钾 ATP 酶的信号转导功能新进展[J]. 生理科学进展，2005，36（2）：159 - 162.

（编辑 吴培红）