论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0584-04

大鼠全脑缺血再灌注后 HAX-1 蛋白与皮质神经元凋亡的关系

范沁林[1],焦　岩[1],刘国军[1],周振华[1],张　波[1],陈　林[1],甘立霞[2],陈康宁[1]　(400038 重庆,第三军医大学:西南医院神经内科[1],基础医学部生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的**　探讨大鼠全脑缺血再灌注后皮质组织中 HAX-1 蛋白(HS1-associated protein X-1, HAX-1)与皮质神经元凋亡的关系。**方法**　建立大鼠四血管法全脑缺血模型,将实验动物分为 5 组($n=5$):正常组,缺血 6、24、48、72 h 组。采用 HE 染色,观察大鼠皮层组织病理变化;采用免疫组化、TUNEL 法检测大鼠全脑缺血再灌注后 HAX-1 蛋白的表达以及皮质神经元凋亡蛋白 Caspase-3 的表达情况。**结果**　HAX-1 蛋白在缺血后 6 h 表达最高(37.60±3.45),24、48、72 h 降低[分别为(11.40±1.14)、(10.40±1.52)、(9.80±1.30)],且低于正常水平($P<0.01$);Caspase-3 蛋白随着缺血时间的延长逐渐增高[6、24、48、72 h 分别为(72.80±5.49)、(106.20±6.91)、(129.00±19.74)、(166.20±15.32)]($P<0.01$),并伴随神经元凋亡的数目逐渐增加[(92.00±9.06)、(133.80±10.64)、(157.00±10.83)、(187.80±14.96)]。**结论**　全脑缺血再灌注后皮质神经元中 HAX-1 蛋白在短期缺血中表达升高,可能参与神经元的抗凋亡,随着缺血时间延长,其表达水平降低,与神经元的凋亡增强相关。

[关键词] 大鼠;全脑缺血再灌注;HAX-1;Caspase-3;神经元凋亡

[中图法分类号] R743.31;R322.81;R329.2　　**[文献标志码]** A

Relationship between HAX-1 expression and neuron apoptosis after cerebral ischemia reperfusion injury in rats

Fan Qinlin[1], Jiao Yan[1], Liu Guojun[1], Zhou Zhenhua[1], Zhang Bo[1], Chen Lin[1], Gan Lixia[2], Chen Kangning[1] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective**　To investigate the relationship between HS1-associated protein X-1 (HAX-1) expression and neuron apoptosis in rats after global cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods**　Rats were subjected to global cerebral ischemia reperfusion injury through four-vessel occlusion, and then the experimental rats were divided into 5 groups, normal group (NC), 6, 24, 48 and 72 h post injury groups ($n=5$ for each group). Immunohistochemistry and TUNEL were used to detect HAX-1 expression and activated Caspase-3, and cell apoptosis in cortex of rats. **Results**　The expression level of HAX-1 in ischemic cortex was peaked at 6 h (37.60±3.45), then decreased at 24, 48 and 72 h (11.40±1.14, 10.40±1.52, and 9.80±1.30 respectively), to an extend lower than the normal level ($P<0.01$). The expression of Caspase-3 in ischemic cortex was up-regulated after global cerebral ischemia reperfusion injury in rats with the prolongation of injury time (72.80±5.49, 106.20±6.91, 129.00±19.74, and 166.20±15.32 respectively for 6, 24, 48 and 72 h post injury). The number of apoptotic cells was increased obviously with the elapse of time (92.00±9.06, 133.80±10.64, 157.00±10.83, and 187.80±14.96 respectively for 6, 24, 48 and 72 h post injury, $P<0.01$). **Conclusion**　The expression of HAX-1 reachs a peak in a short time after global ischemia reperfusion injury, suggesting it may be involved in the anti-apoptosis of neuron apoptosis. With the elapse of injury time, its expression is decreased and associated with the increase of apoptotic cells.

[Key words] rats; ischemia; reperfusion; HS1-associated protein X-1; Caspase-3; neuron apoptosis

Corresponding author: Chen Kangning, Tel: 86-23-68754154, E-mail: ckn640827@126.com, Gan Lixia, Tel: 86-23-68752947, E-mail: ganlixia@yahoo.com

[通信作者] 陈康宁,电话:(023)68754154,E-mail:ckn640827@126.com
甘立霞,电话:(023)68752947,E-mail:ganlixia@yahoo.com

脑血管病是导致人类死亡的三大疾病之一,也是中老年致残的主要原因,其中缺血性脑血管病占75%~80%。我国每年新发病例约150万,存活患病人数(500~600)万人,造成严重的社会问题和经济负担。缺血性脑血管病发病后恢复脑血流是治疗脑血管最关键的方法,但再灌注后可加重缺血脑血管的损伤,这种损伤以凋亡为主,因此减少缺血再灌注后神经元凋亡为重要的脑保护机制[1,2]。HS1相关蛋白X-1(HS1-associated protein X-1,HAX-1)是1997年用酵母双杂交技术发现的与造血系统细胞特异性蛋白1(hematopoietic lineage cell-specific protein 1,HS1)结合的蛋白。近年来发现它与细胞内多种蛋白存在相互作用,发挥多种生物学功能[3,4],如体外培养的心肌细胞中发现,该蛋白主要表达于线粒体中,并通过HAX-1与caspase-9结合从而抑制caspase-9的活化[5],在培养的乳腺癌细胞中发现过量表达的HAX-1能抑制Caspase-3的活性[6],提示该蛋白参与线粒体介导的凋亡途径来发挥其抗凋亡功能。本研究组前期利用蛋白质二维电泳技术发现,大鼠大脑局部中动脉缺血后皮质神经细胞内有HAX-1蛋白的表达,且该蛋白的表达水平随缺血时间的长短出现改变[7],但该蛋白在大脑神经元缺血再灌注损伤中的作用尚不清楚。本研究以大鼠全脑缺血再灌注为模型,观察缺血再灌注后不同时相后,皮质组织中HAX-1蛋白的表达水平,及其与皮质神经元凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

健康雄性成年大鼠25只,体质量约250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。HAX-1单克隆抗体(购自BD Transduction Laboratories公司),SABC免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒、活化的Caspase-3抗体(购自武汉博士德生物有限公司),凋亡试剂盒(购自美国ROCHE公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 大鼠随机分为正常组和全脑缺血再灌注组(缺血6、24、48、72 h)($n=5$)。

1.2.2 动物模型制备 参照改良Pulsinelli4血管闭塞法制备[8]。大鼠用水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉。颈部正中切口,分离两侧颈总动脉1 cm将大鼠固定于定位仪上,枕部切口,暴露第1颈椎板及横突板上的寰小孔,用双极电凝针电凝双侧寰小孔内的椎动脉,缝合切口后待动物完全苏醒,将其移至笼内饲养,夜间禁食,此时大鼠行为正常,没有明显脑损伤。24 h后在大鼠完全清醒状态下,用动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉15 min,造成短暂的全脑缺血。大鼠在缺血开始后30~60 s昏迷,双侧瞳孔放大,角膜反射消失,能自主呼吸。脑电图变平。这些症状持续于整个缺血过程,凡未出现以上症状或这些症状未能持续整个缺血过程中的大鼠弃用。缺血15 min后解除动脉夹,恢复脑血流,大鼠即逐渐恢复知觉开始活动,未见明显障碍。术后回笼中继续饲养。

1.2.3 脑组织病理检测 分别取正常组,术后6、24、48、72 h组各5只大鼠,麻醉,开胸,经主动脉插管,依次灌注生理盐水200 ml和4%多聚甲醛300 ml,断头取脑。切取脑块。4%多聚甲醛固定24 h,常规石蜡包埋,冠状切片,片厚40 μm,HE染色,显微镜下观察拍照。

1.2.4 TUNEL法检测细胞凋亡 按照TUNEL试剂盒步骤检测脑组织凋亡细胞。以细胞核为棕黄色者为阳性细胞,阴性对照所加TUNEL反应液中不含末端转移酶。显微镜下定位,取大鼠海马CA1区对应的大脑皮层,每张免疫组化切片中采集5个不重复的高倍视野,计数光镜400倍时的阳性细胞数,最终结果取平均值。

1.2.5 Caspase-3免疫组化 一抗为Caspase-3兔抗大鼠IgG多克隆抗体(1∶100);以0.01 mol/L PBS代替一抗作为阴性对照。阳性细胞:Caspase-3蛋白染色均为棕黄色,呈颗粒状、团块状、弥漫状分布于细胞核中。显微镜下定位,取大鼠海马CA1区对应的大脑皮层,每张免疫组化切片中采集5个不重复的高倍视野,计数光镜400倍时的阳性细胞数,最终结果取平均值。

1.2.6 HAX-1免疫荧光双标检测 切取脑块,含25%蔗糖的多聚甲醛固定24 h,冰冻切片,加一抗(HAX-1单克隆抗体1∶100)37 ℃温箱孵育1 h、4 ℃过夜,加绿色荧光二抗(羊抗小鼠、FITC 1∶50) 37 ℃ 1 h;加一抗(小鼠Neun N神经元标志蛋白1∶200)37 ℃温箱孵育1 h,4 ℃过夜,加红色荧光二抗(兔抗小鼠/CY3 1∶50)37°孵育,4 ℃过夜。甘油封片。在激光共聚焦显微镜下进行观察,拍照。

1.3 统计学处理

用计算机图像分析系统软件Image-Pro Plus 5.1分析图像。数据以$\bar{x}\pm s$表示,用Graphad Prism软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠全脑缺血模型的制备

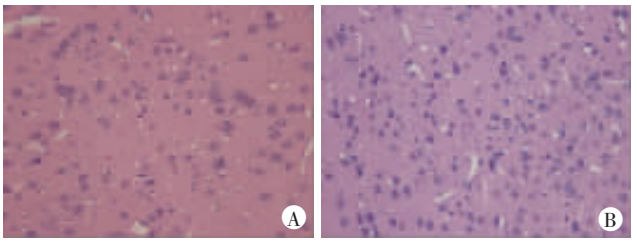
夹闭大鼠双侧颈总动脉的过程中脑电图变平,表明全脑缺血模型制备成功。

2.2 全脑缺血后大鼠皮质组织结构的病理变化

正常组脑组织结构清晰,细胞排列规则,细胞轮廓正常,细胞核居中,核仁清楚。缺血再灌注后72 h组可见神经细胞肿胀,局灶性细胞核固缩(图1)。

2.3 全脑缺血后大鼠皮质神经元HAX-1蛋白表达水平

全脑缺血再灌注后6 h组HAX-1蛋白表达量最高,24、48、72 h降低,且低于正常水平(表1)。



A:正常组; B:缺血再灌注72 h组

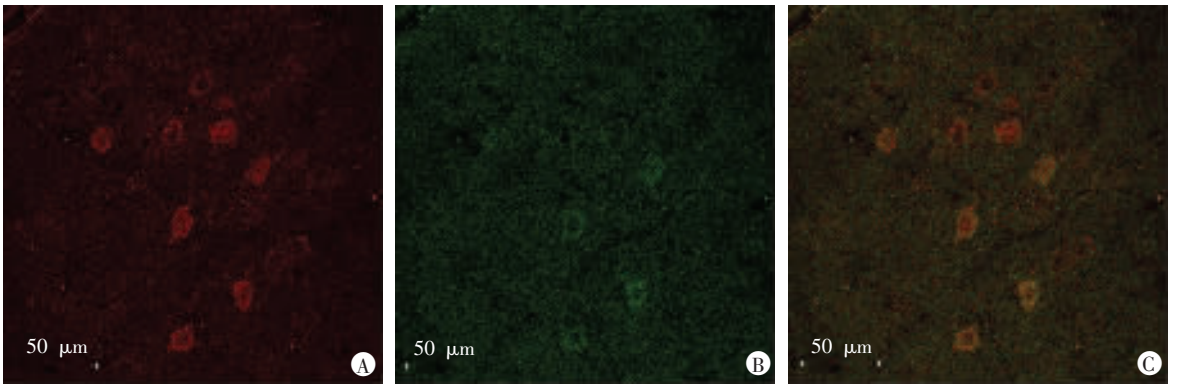
图1 2组大鼠皮质细胞病理变化(HE ×400)

2.4 全脑缺血后大鼠皮质神经细胞凋亡情况

正常组区有少量凋亡细胞,脑缺血6、24、48、72 h皮质凋亡细胞数随着缺血时间的延长逐渐增加(表1,图2、3)。

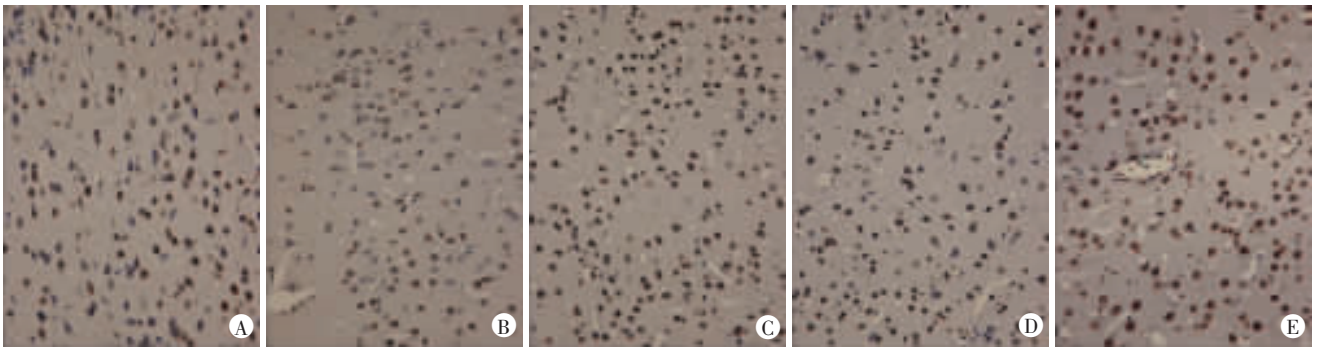
2.5 全脑缺血后不同时间大鼠皮质神经元中Caspase-3活性蛋白水平的检测

正常组有少量活化的Caspase-3蛋白表达,缺血6 h组其表达水平显著高于正常组,并随着缺血时间延长(24、48、72 h)呈逐渐递增的趋势(表1),其表达水平与形态学所见凋亡阳性细胞数量变化一致(图4)。



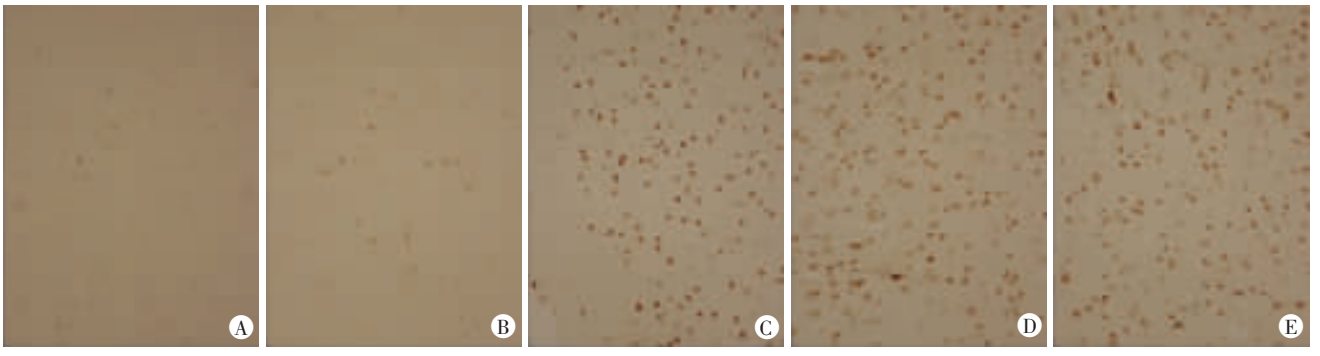
A:Neu N荧光标记;B:HAX-1荧光标记;C:Neu N/HAX-1双重标记

图2 全脑缺血再灌注后6 h大脑皮层Neu N(红色)与HAX-1(绿色)免疫荧光标记 (激光共聚焦显微镜)



A:正常组;B:缺血再灌注6 h组;C:缺血再灌注24 h组;D:缺血再灌注48 h组;E:缺血再灌注72 h组

图3 检测各组大鼠皮质组织凋亡神经元 (TUNEL ×400)



A:正常组;B:缺血再灌注6 h;C:缺血再灌注24 h;D:缺血再灌注48 h E:缺血再灌注72 h

图4 各组大鼠皮质组织Caspase-3蛋白表达 (SABC ×400)

表1 全脑缺血再灌注大鼠皮质组织HAX-1蛋白表达、凋亡阳性细胞数、Caspase-3阳性细胞数表达变化（$\bar{x} \pm s, n=5$）

组别	HAX-1阳性细胞吸光度值	TUNEL阳性细胞数	Caspase-3阳性细胞数
正常组	19.20±1.79	51.00±18.38	35.40±7.96
6 h组	37.60±3.45[a]	92.00±9.06[a]	72.80±5.49[a]
24 h组	11.40±1.14[ab]	133.80±10.64[ab]	106.20±6.91[ab]
48 h组	10.40±1.52[abc]	157.00±10.83[abc]	129.00±19.74[abc]
72 h组	9.80±1.30[abcd]	187.80±14.96[abcd]	166.20±15.32[abcd]

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与6 h组比较；c：$P<0.01$，与24 h组比较；d：$P<0.01$，与48 h组比较

3 讨论

脑梗死是脑血管病的主要病种，脑血管病中70%为脑梗死，寻找对脑梗死有效的治疗途径，是目前国内外学者共同关心的课题。脑组织皮层对脑缺血较敏感，即使短暂的脑缺血也可造成神经细胞延迟性死亡。神经细胞延迟性死亡主要机制为细胞凋亡[9]。

HAX-1抗凋亡蛋白由279个氨基酸组成，相对分子质量为35×10^3，广泛表达于多种组织、细胞及细胞株中，激光共聚焦观察HAX-1蛋白主要呈点状分布于线粒体内，少量分布于内质网和核膜，在体内可以形成同源二聚体，发挥强大的抗凋亡作用[10,11]。Cilenti等[12]通过酵母双杂交实验证实HAX-1是线粒体丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2的一个新底物蛋白，细胞凋亡过程中，通过Omi/HtrA2对HAX-1的抗凋亡作用进行调节。当细胞凋亡被诱导时，线粒体中HAX-1发生裂解，释放出Omi/HtrA2，后者被转运到细胞质内，结合并裂解凋亡抑制蛋白（inhibitor of apoptosis protein，IAP），导致依赖Caspase-3的凋亡途径的活化。研究表明Caspase-3是细胞凋亡的敏感指标和细胞凋亡蛋白酶级联反应的最终通路[13]。研究发现在依托泊苷（ETO）诱导乳腺癌细胞凋亡发生时抗凋亡蛋白HAX-1被Caspase-3裂解，并且过量表达的HAX-1蛋白抑制了Caspase-3的活性及ETO诱导的细胞凋亡[6]。2006年Yuchi等[5]发现在心肌细胞中有HAX-1蛋白的表达，并且高表达HAX-1可以降低30%的心肌细胞的凋亡发生，通过基因沉默降低心肌细胞中HAX-1蛋白的表达导致了细胞的急剧死亡。

本研究发现，HAX-1蛋白在6 h表达量最高，而24、48、72 h表达量降低，且均低于正常组（$P<0.01$）；而Caspase-3蛋白在正常组表达量少，随着缺血时间的延长，Caspase-3蛋白表达水平逐渐增高（$P<0.01$），提示HAX-1蛋白作为抗凋亡蛋白，虽然不能完全阻止凋亡的发生，但可对缺血引起神经元的凋亡有保护作用。提示如能通过药物来提高HAX-1蛋白的表达，可为有效地治疗缺血再灌注损伤提供一个新的思路和途径。

参考文献：

[1] Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, *et al*. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia[J]. Nat Med, 1999, 5(5): 554-559.

[2] Nurmi A, Lindsberg P J, Koistinaho M, *et al*. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia[J]. Storke, 2004, 35(4): 987-991.

[3] Shaw J, Kirshenbaum L A. HAX-1 represses postmitochondrial caspase-9 activation and cell death during hypoxia-reoxygenation [J]. Circ Res, 2006, 99(4): 336-338.

[4] 翟志芳，郝飞. HAX-1的研究进展[J]. 重庆医学，2007，36(12)：1206-1208.

[5] Han Y, Chen Y S, Liu Z, *et al*. Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition [J]. Circ Res, 2006, 99(4): 415-423.

[6] Lee A Y, Lee Y, Park Y K, *et al*. HS 1-associated protein X-1 is cleaved by caspase-3 during apoptosis[J]. Mol Cells, 2008, 25 (1): 86-90.

[7] 杨涌涛，陈康宁，贺伟峰，等. 正常与脑缺血大鼠脑皮质线粒体的比较蛋白质组学研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(10)：964-968.

[8] 刘文博，门晓丽，李娟，等. 一种改良大鼠四血管阻塞法脑缺血模型[J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2009，8(4)：297-300.

[9] 陈江君，刘宁，陈军，等. 大鼠脑缺血再灌注后NF-κB的表达与神经细胞凋亡的关系[J]. 兰州大学学报：医学版，2009，35(3)：11-13.

[10] Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, *et al*. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases[J]. J Immunol, 1997, 158 (6): 2736-2744.

[11] Sharp T V, Wang H W, Koumi A, *et al*. K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function[J]. J Virol, 2002, 76 (2): 802-816.

[12] Cilenti L, Soundarapandian M M, Kyriazis G A, *et al*. Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death[J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 50295-50301.

[13] Denes L, Szilagyi G, Gal A, *et al*. Talampanel a non-competitive AMPA-antagonist attenuates caspase-3 dependent apoptosis in mouse brain after transient focal cerebral ischemia[J]. Brain Res Bull, 2006, 70(3): 260-262.

（**收稿**：2009-11-24；**修回**：2009-12-25）

（编辑 龙 亮）