基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0895-04

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在HIE新生兔的表达

林迳苍,朱世泽,杜翠琼,黄 煌,许相洋
(福建省泉州医学高等专科学校,泉州 362000)

【摘 要】目的:探索慢性宫内缺氧时胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-1,IGF-1)在新生兔脑组织和血清中的表达规律。方法:取孕中晚期新西兰兔24只,随机分为对照组、缺氧组以及中药干预缺氧组,对比3组新生兔的脑组织和血清的IGF-1表达与变化。结果:IGF-1在脑组织的表达经χ^2检验,各组间差异均有统计学意义($P<0.01$),缺氧组明显高于中药干预组,且中药干预组高于对照组。ELISA法定量测定血清IGF-1含量,缺氧组的血清IGF-1的含量低于对照($P<0.01$),中药干预组的血清IGF-1的含量低于对照组($P<0.05$)。结论:缺氧缺血性脑病(Hypoxic ischemic encephalopathy,HIE)新生兔的体内IGF-1进行了重新分布。脑组织内为保护神经细胞发生应激反应,调集外周血中的IGF-1进入中枢神经系统,参与内源性保护机制。

【关键词】胰岛素样生长因子-1;HIE;新生兔;脑组织;血清
【中国图书分类法分类号】R722.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-23

The expressions of IGF-1 in HIE neonatal rabbits

LIN Jing-cang, et al
(*Department of Hisology and Embrgdgy, Quanzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: Searching after the regularity of the expressions the insulin-like growth factors (IGF-1) inside the neonatal rabbits with chronic intrauterine anoxemia give to brain Tissues and serums. *Methods*: Choosing 24 Zelanian rabbits that have been in afternoon pregnancy, we divide them into three stochastic contratest group by chance: the control group, the

作者介绍:林迳苍(1969-)男,硕士,
研究方向:围生期发育,缺血缺氧脑病。

基金项目:福建省教育厅基金项目(JB07203);泉州市科技局基金项目(2007Z50)。

产生的。本研究中,辛伐他汀作用K562细胞48 h,实验结果显示细胞内ROS明显升高,突变P53表达水平下降。突变P53蛋白表达下调解除其对正常P53蛋白功能的抑制,正常P53功能得以实现,通过一系列机制诱导K562细胞凋亡[7]。

c-jun编码分子量为39 kD含334个氨基酸残基的蛋白质Jun。在细胞中,Jun与Fos结合形成Fos/Jun异二聚体,即稳定的高活性复合物AP-1转录因子,通过亮氨酸拉链结合于DNA上,参与基因表达的复杂调控网络。Turi等[8]研究表明氧化应激可激活AP-1。Taimor等[9]曾报道AP-1介导NO诱导的心肌细胞凋亡。本研究结果显示,辛伐他汀作用K562细胞72 h,c-jun mRNA表达增强。提示辛伐他汀可能通过增强c-jun表达,激活AP-1诱导K562细胞凋亡。

参 考 文 献

[1] 黄文芳,杨永长,刘 华,等.辛伐他汀诱导K562细胞凋亡过程中Caspase-3、Caspase-9活性变化[J].肿瘤防治研究,2007,34(1):39-41.
[2] 符跃强,许 峰,卢仲毅,等.氧化应激对肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤作用及JNK信号转导机制[J].重庆医科大学学报,2007,32(11):1150-1153.
[3] Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy G H, et al. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias [J]. Leuk Lymphoma, 2000, 40(1-2): 167-178.
[4] Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, et al. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(5): 883-891.
[5] Werner M, Sacher J, Hohenegger M. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells [J]. Br J Pharmacol, 2004, 143(6): 715-724.
[6] Zhou L J, Zhu X Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(3): 982-988.
[7] 周定安,黄文芳,刘 文,等.P53途径在辛伐他汀诱导K562细胞凋亡中的作用[J].第三军医大学学报,2007,29(22):2160-2163.
[8] Turi J L, Jaspers I, Dailey L A, et al. Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(4): L791-L798.
[9] Taimor G, Rakow A, Piper H M. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes[J]. FASEB J, 2001, 15(13): 2518-2520.

(责任编辑:冉明会)

anoxic group and the group interfered with Chinese traditional medicine. Then we contrast the expressions and changes of these groups with IGF-1 in brain tissues and in serums. *Results*: Contrasting IGF-1 in brain tissues, checked up with χ^2. In three different groups, we have found that the differences of their expressions have some statistical significance ($P<0.01$); IGF-1 in brain tissues of the anoxic group is higher than the group interfered with Chinese traditional medicine and IGF-1 in brain tissues of the group interfered with Chinese traditional medicine is higher than the control group. Determined the contents of IGF-1 in serums on rabbits by ELISA, the contents of IGF-1 in serums of the anoxic group is extremely remarkably lower than the control group ($P<0.01$), while the contents of IGF-1 in serums of the group interfered with Chinese traditional medicine is extremely remarkably lower than the anoxic group. *Conclusion*: In this article, there occurs the mentions: IGF-1 has been redistributed in the bodies of HIE neonatal rabbits; Irritable reactions inside brain tissues have been brought into existance in order to protect nerve cells, then IGF-1 from the peri-islet extro-blood all assembled into the central nervous system, then participate in the intrinsic protection mechanism.

【Key words】 Insulin-like growth factor-1(IGF-1); Hypoxic ischemic encephalopathy(HIE); Neonatal rabbits; Brain tissues; Serums

因围生期缺氧引起的缺氧缺血性脑病(Hypoxic ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期的常见病、多发病,也是造成智力落后和永久性神经损伤的重要原因之一[1]。临床上许多新生儿期 HIE 常见为慢性宫内缺氧,为深入探索围生期缺氧致新生儿 HIE 发生的分子机制,作者参考 Williams 等[2]的方法建立实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 动物来源、分组以及试验方法

选取试验动物为健康孕中晚期新西兰孕兔 24 只。随机分为对照组、缺氧组以及中药干预组 3 组。对照组:模拟放进缺氧箱,但不予缺氧处理;缺氧组:放置于缺氧箱进行缺氧,将怀孕 10 d 的母兔置于自制玻璃缺氧舱内,舱内用小风扇不断将空气混匀,舱内氧浓度由 S-450 型氧气监测仪(美国 IST-AIM 公司)持续监测,实时调节氧氮的流量,使混合气氧浓度为 12%±0.1%。舱内二氧化碳与水蒸气分别用钠石灰与氯化钙吸收。缺氧舱壁留有小缝隙与舱外相通,使舱内气压与大气压平衡。饲料及饮水同常。舱内 CO_2 浓度始终 <3%,温度保持于 19℃~23℃,每天分 2 次缺氧,1 次 4 h,共 20 d,直到孕 30 d 分娩为止;中药干预组:孕兔放置于缺氧箱进行缺氧,并给予中药川穹嗪注射液(北京第四制药厂,批号 21206,剂量 0.04 ml/100 g)腹腔注射。出生后,每组各随机取雌雄兔崽,断头取血与脑组织[3]。

1.2. 免疫组织化学

1.2.1 取材 缺氧缺血性脑损伤(Hypoxic ischemic brain damage, HIBD)后新生兔开颅取脑组织于多聚甲醛固定液中后固定 8 h,经梯度酒精脱水,二甲苯透明后石蜡包埋,行冠状切片裱于经 APES 防脱片剂处理的载玻片上。

1.2.2 石蜡切片 石蜡切片脱蜡至水。蒸馏水冲水,PBS 浸泡 5min。3% H_2O_2 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,PBS 冲洗,2 min×3 次。滴加适当比例稀释的一抗工作液,37℃孵育 1~2 h。PBS 冲洗,2 min×3 次。滴加试剂 1(Polymer Helper),37℃孵育 20 min,PBS 冲洗,2 min×3 次。滴加试剂 2(Polyperoxidase-antirabbit IgG),37℃孵育 20~30 min,PBS 冲洗,2 min×3 次。DAB 显色试剂盒显色,自来水充分冲洗,复染,常规脱水,透明,封片。IGF-1 抗体购自上海富众生物科学有限公司(美国 Santa-cruz)。用低倍镜和高倍镜(×400)观察切片,阳性细胞为镜下组织结构清晰,胞浆内有棕黄色颗粒,染色明显高于背景。阳性等级采用 Sinicrope 改良半定量法。显微镜下观察采用双盲法:记录各切片中染色细胞的百分数,按 4 级法计分,0 分:染色细胞 <5%;1 分:染色细胞 5%~25%;2 分:染色细胞 26%~75%;3 分:染色细胞大于 75%。同时,将染色强度亦分成 4 级,0 分:不显色或显色不清;1 分:浅黄色:2 分:棕黄色;3 分:深棕色。最后,综合计分 =(染色细胞分数 + 染色强度分数)/2,所得分数 <0.5 分为阴性;0.5~1.5 分为弱阳性 (+);1.6~2.5 分为中性阳性(2+);大于 2.5 分为强阳性(3+)。

1.3 ELISA 法定量测定血清 IGF-1 含量

采血,3 000 r/min 离心 5 min,分别留取血清,置 -20℃冰箱保存待测。应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中 IGF-1 水平。ELISA 试剂盒购自福州 - 冠生物科技有限公司。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件进行数据统计,率的比较用 χ^2 检验,表达强度用 Kruskal-Wallis 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。计量数据采用均数($\bar{x}\pm s$,%)表示。两组间比较用 t 检验,相关分析采用直线回归。设定检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

IGF-1 在 HIE 新生兔对照组、中药干预组、缺氧组的脑组织表达(图 1~3)。IGF-1 在缺氧组的脑组织表达率为 90.0%,在中药干预组的脑组织表达率为 65.0%,在对照组的脑组织表达率为 30.0%(见表 1)。经 χ^2 检验,各组间差异均有统计学意义($P<0.01$)。HIE 新生兔对照组、中药干预组、缺氧组 3 组

间的脑组织表达强度经 Kruskal-Wallis 检验差异有统计学意义。缺氧组明显高于中药干预组，且中药干预组高于对照组（HC=24.087，$P<0.01$）（注：IGF-1 DAB 显色后表现为黄褐色，脑组织大脑皮层及海马处均可见其表达，细胞定位主要表达于神经细胞的胞浆）。

缺氧组的血清 IGF-1 的含量低于对照组（$P<0.01$），中药干预组的血清 IGF-1 的含量低于中药干预组（$P<0.05$）（见表 2）。

表 1　IGF-1 在不同实验组新生兔的脑组织免疫组化的表达（n）

组别	总例数（n）	IGF-1 表达				阳性率（%）
		-	+	++	+++	
对照组	10	0	3	0	0	30.0
中药干预组	20	0	8	3	2	65.0
缺氧组	20	0	7	6	5	90.0

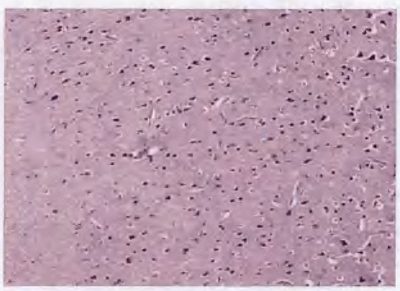


图 1　IGF-1 在对照组脑神经元胞体的表达（免疫组化×400）

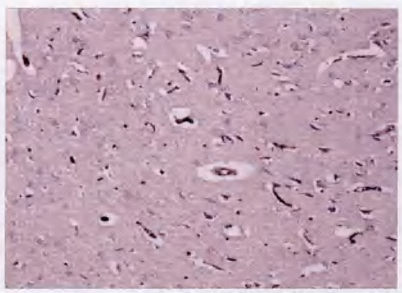


图 2　IGF-1 在中药干预组脑神经元胞体的表达（免疫组化×400）

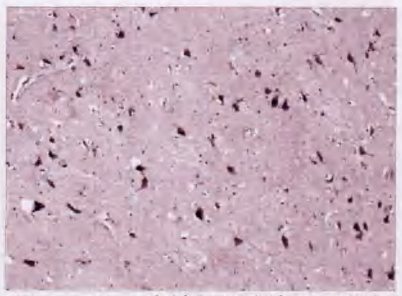


图 3　IGF-1 在缺氧组脑神经元胞体的表达（免疫组化×400）

表 2　IGF-1 血清含量

组别	n	IGF-1 含量（$\bar{x}\pm s$，ng/ml）
对照组	35	17.2 ± 3.8
缺氧组	32	10.4 ± 2.1*
中药干预组	30	13.8 ± 3.3▲

注：▲$P<0.05$；*$P<0.01$（与对照组比较）

3　讨　论

IGF-1 属于胰岛素样生长因子家族成员，是一种与组织代谢和细胞分化、增殖有关的细胞因子。对于维持神经细胞的生存、生长和损伤后的修复具有极其重要的作用[4-6]。IGF-1 与胰岛素原 60%同源，由 70 个氨基酸残基组成，是具有内分泌、自分泌和旁分泌特性的单链多肽，相对分子质量约为 7 500。IGF-1 是一类具有胰岛素样调节代谢又具有生长激素样促生长作用的蛋白。生理状态下 IGF-1 具有胰岛素样抑制蛋白质分解作用，同时又促进蛋白质的合成，对正常组织细胞的增殖、分化、再塑及维护十分重要，对于神经细胞正常生长、发育的调节具有重要作用。Stewart 等[7] 研究发现，IGF-1 是大脑发育所必需的生长调节因子，通过细胞培养已经证实减少或去除 IGF-1，神经细胞数量减少，它对树突快速生长、突触形成和髓鞘生成具有重要作用，可以影响不同类型神经细胞及相关细胞的生存能力，提高神经细胞的分化和发育，是剂量依赖型营养因子。

IGF-1 对于神经系统的保护作用可能与以下因素有关：（1）降低血管阻力，改善微循环，改善局部组织灌流不足的情况，防止神经细胞的进一步损伤。（2）抑制一氧化氮酶（NOS）活性，减少合成[8]。（3）类似血管内皮生长因子，IGF-1 在体内、外均可促进血管平滑肌细胞增殖，从而起到营养损伤区神经细胞、减少细胞凋亡的作用。（4）影响细胞周期蛋白依赖激酶 5 及调节亚基的活性[9]。（5）损伤后 Ca^{2+} 内流加重神经细胞的损害，Chik 等在研究松鼠体细胞时发现，IGF-1 通过调节酪氨酸磷酸化过程阻止 L 型 Ca^{2+} 通道的开放，从而减少内流、降低神经细胞继发损害。（6）IGF-1 可以抑制神经细胞凋亡。IGF-1R 抗凋亡目前公认的主要有两条细胞信号转导通路：PI3-K 途径它是 IGF-1R 与胰岛素受体的共同通路，通过 PI3-K 以及激酶结合蛋白（Akt/PKB）活化来发挥作用[10]。另一条通路涉及胞外信号相关激酶丝裂原活化蛋白激酶的活化。近来有研究发现，14-3-3 蛋白在 IGF-1 介导的抗细胞凋亡途径中也发挥着一定的作用。14-3-3 蛋白是丝/苏氨酸结合蛋白

家族的总称，在真核细胞中共包括 7 种同型异构体，它们通过调节与其相互作用的信号转导分子在胞浆和胞核中的分布来发挥抗细胞凋亡的作用。信号转导通路最终都使 Bcl-2 家族的调节蛋白 BAD 发生磷酸化反应，BAD 随即与死亡抑制因子 Bcl-xl 分离，Bcl-x1 即 caspase 的活化物 Apaf-1 结合形成复合物，从而阻止了 caspase 的活化 。而 caspase 是细胞凋亡中的关键酶，它可以同时作为细胞凋亡过程的始动物和效应物。该酶的作用具有天冬氨酸特异性，它可以在底物的天冬氨酸残基后切断底物，引起某些蛋白质的裂解和 DNA 的断裂，最终导致细胞凋亡。

本研究结果显示，缺氧组的血清 IGF-1 的含量低于对照组($P<0.01$)，中药干预组的血清 IGF-1 的含量低于对照组 ($P<0.05$)。据此认为 HIE 发作时，体内的 IGF-l 进行了重新分布。脑组织内为保护神经细胞发生应激反应，调集外周血中的 IGF-1 进入中枢神经系统，参与内源性保护机制。外周循环的 IGF-1 在缺氧缺血性脑损害后，可通过血脑屏障迁移至大脑。在脑部的生长发育期间，所有 IGF 分子体系的转录水平，对于脑缺氧缺血有关的代谢紊乱非常敏感，IGP- 1 基因表达的迅速减少可能与促使围生期神经元的死亡和线粒体的损伤有关。当脑内 IGF-1 基因表达被抑制，就会导致 IGF-1 含量和下游信号分子的激酶活力下降，使正常膜电位不能维持，钙通道异常，可能引发 HIE 的一系列病理改变。另有报告在新生儿 HIE 过程中，IGF 体系的平衡被破坏，血糖代谢亦随之紊乱，持续的低血糖或高血糖状态可能加重 HIE 对神经系统的损伤。颈动脉结扎的新生鼠脑缺氧缺血模型也证明，在缺氧后短时间内，大脑半球 IGF-1 的 mRNA 表达水平开始下降，24 h 后明显降低，72 h 后星形细胞中 IGF-1 的基因表达才逐渐被激活。

本动物模型显示 IGF-1 在 HIE 发生后对脑部神经细胞具有重要的保护作用。IGF-1 通过各种信号转导途径发挥营养和神经调节作用。IGF-1 可降低脑血管阻力，减少一氧化氮含量，由酪氨酸激酶介导迅速而特异地调控细胞的离子流向和钙通道活性，从而防止神经细胞凋亡和 HIE 对脑组织的进一步损伤。HIE 新生兔对照组、中药干预组、缺氧组 3 组间的脑组织表达强度经 Kruskal-Wallis 检验差异有统计学意义，缺氧组明显高于中药干预组，且中药干预组高于对照组(HC=24.087，$P<0.01$)。中药川穹嗪对缺氧有一定保护意义[11]。由此推测，新生儿 HIE 急性期，血清 IGF-1 向脑部的聚集，导致外周循环中 IGF-1 含量大幅下调，在 HIE 的病理生理过程中具有极其重要的生物学意义[12]。在检测中 HIE 程度越严重，相应血清的 IGF-1 含量降低越明显，因而 IGF-1 可作为病情严重程度的监控指标，为临床的针对性治疗提供有益的参考依据。

参 考 文 献

[1] 吴婉芳.新生儿缺氧缺血性脑病动物实验研究[J].中国实用儿科杂志,1995,15(10):69-72.

[2] Robinson S M, Barker D J. Coronary heart disease: a disorderof growth[J]. Proc Nutr Soc,2002,61(2):537-542.

[3] 林迳苍.ICAM-1 及 VCAM-1 等在 HIE 新生兔的表达[J].重庆医科大学学报,2008,33(12):1499-1501.

[4] Arsenijevic Y,Weiss S. Insulin-likegrowth factor-I is a difierentiation factor for postmitotic CNS stein cell-derived neuronal precursors:distinct actions from those of brain-derived neurotrophic facto[J]. JNeurosci,1998,18(9):2118-2128.

[5] D'Ercole A J,Ye P,O'Kusky J R.Mutantinouse models of insulin-like growth factoractions in the central nervous system[J]. Neu-ropeptides,2002,36(6):209-220.

[6] Tschopp J,Imder M,Thome M.Inhibition of fas death signals by FLIPs[J].Curr Opin hn.inunol,1998,10(2):552-558.

[7] Stewart C E,Rotwein P.Growth,differentiation,and survival:multiple physiological flmctions for insulin-likegrowth 1hctom[J]. Physiol Rev,1996,76(4):1005-1026.

[8] Shanna H S,Nyberg F,Westman J,et al.Brain derived neruotrophic factor and insu1in like growth factor-1 attenuate upregulation of nitric oxide synthase and cell injuryfillowing trauma to the Spinalcord Animnmnohistochemical study,in therat[J]. AminoAcids,1998,14(8):121-129.

[9] Wang J M,Haashi T,Zhang W R,et al.Insulin-like growth factor-1 affects expressions of cyclin - dependent kinase 5and its activator p35 in repefused ratbrain[J].Neurosci Lett,1999,277(6):17-20.

[10] Dudek H,Datta S R,Franke T F,et al.Regulation of neurunal survival by the serine threonine protein kinase Akt[J]. Science,1997,275(5):661-665.

[11] 文 俊.丹参、川芎、当归对脑缺血/灌注损伤的保护作用[J].中华实用中西医杂志, 2006,19(21):2513-2515.

[12] 高燕勤.胰岛素样生长因子-Ⅰ、生长抑素在新生儿窒息脐血中水平变化的观察[J].江苏医药杂志,2000,26(6):447-448.

(责任编辑:冉明会)