基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0138-04

海马脑片氧糖剥离模型中血晶素对脑红蛋白表达的影响

王 莉[1],余 刚[2],向德兵[3],朱 洁[2],李光勤[2]

(1. 重庆市肿瘤研究所肿瘤科,重庆 400030;2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;
3. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

【摘 要】目的:观察血晶素(Hemin)对海马脑片氧糖剥离(Oxygen/glucose deprivation,OGD)模型的保护作用及其对脑红蛋白(Neuroglobin,Ngb)表达的影响。方法:取新生 8~10d SD 大鼠,制备厚约 400μm 海马脑片,培养 2 周后筛取完好无特异荧光着色的脑片,随机分为 3 组:正常培养对照组(HOTC),单纯缺氧缺糖组(OGD),预加 Hemin 再缺氧缺糖组(Hemin + OGD)。除 HOTC 组外,其余各组在 5%CO_2、95%N_2 的混合气体中培养 1.5 h,其后恢复培养 24 h。冰冻连续冠状切片,分别作尼氏染色、Ngb 的免疫组织化学染色。应用免疫组织化学染色和图像分析处理技术观察海马脑片 Ngb 蛋白表达,并观察神经元形态学改变。结果:OGD 组锥体细胞发生坏死,锥体细胞数量明显减少;Hemin+OGD 组坏死较前者轻,锥体细胞数较前者多。OGD 组海马脑片中形态结构正常的阳性细胞少,多数阳性神经元结构模糊、肿胀,Ngb 的表达强于 HOTC 组,二者相比有显著性差异($P<0.05$);Hemin+OGD 组海马脑片中大部分细胞形态结构正常,少数阳性神经元结构模糊、肿胀,Ngb 蛋白的表达较 HOTC 组和 OGD 组明显增强($P<0.01$)。结论:血晶素可减轻海马脑片缺糖缺氧性损伤,其机制可能与其诱导神经元表达 Ngb 密切相关。

【关键词】海马脑片;缺氧缺糖;脑红蛋白;血晶素

【中国图书分类法分类号】R741.02 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-26

Neuroprotective of neuroglobin induced by hemin in the hippocampal organotypic tissue cultures after combined oxygen/glucose deprivation

WANG Li, et al

(*Department of Medical Oncology, Chongqing Cancer Institute*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the neuroprotective role of hemin and its effect on the expression of neuroglobin in the hippocampal organotypic tissue cultures (HOTC) after combined oxygen/glucose deprivation(OGD). *Methods*: SD rats, 8~10-days old, were sacrificed for brain. HOTC were made and randomly divided into three groups: HOTC, HOTC undergoing OGD (OGD), HOTC undergoing OGD following pretreatment with hemin (Hemin + OGD). The expression of neuroglobin was detected by immunohisto-

作者介绍:王 莉(1974-),女,主治医师,博士,研究方向:信号传导。

通讯作者:余 刚,男,副教授,E-mail:yugangw@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(NO30500170)。

药突变率略低于国外文献报道的原因[6],可能有地域差异,也说明还有其它位点耐药机制所致。通过荧光显微镜观测发夹 DNA 探针与靶点杂交技术快速鉴定部分结核分支杆菌耐 EMB 基因型,灵敏快速,从扩增到杂交结果判断仅需 1 d,对早期诊断及指导临床用药很有价值。

参 考 文 献

[1] Van Rie A, Warren R, Mshanga I, et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in a high-incidence community[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2):636.

[2] Bratu D P. Molecular beacons: fluorescent probes for detection of endogenous mRNAs in living cells[J]. Methods Mol Biol, 2006, 3(19):1-14.

[3] 吴雪琼.耐药性结核分枝杆菌的分子生物学研究现状[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(12):837-840.

[4] Ahmad S, Mokaddas E, Jaber A A. Rapid detection of ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by PCR-RFLP targeting embB codons 306 and 497 and iniA codon 501mutations[J]. Mol Cell Probes, 2004(18):299-306.

[5] Tan W H, Wang K M. Timothy J D. Molecular beacons[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 5(8):547-553.

[6] Ramaswamy S V, Amin A G, Goksel S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44:326-336.

(责任编辑:冉明会)

chemical technique and computer-assisted image analysis. Results: In OGD group, hippocampal organotypic tissue lost normal structure and neurons were damaged severely. Pretreatment with hemin could effectively reverse the damage of the neurons. The expression of neuroglobin in the Hemin + OGD group were significantly stronger than that in the OGD group. Conclusion: Hemin has protective effect on injury induced by OGD in rat hippaocampal slices, which is associated with enhanced expression of neuroglobin.

【Key words】Hippocampal organotypic tissue cultures(HOTC); Oxygenl/glucose deprivation(OGD); Neuroglobin; Hemin

脑红蛋白(Neuroglobin,Ngb)是第三类携氧球蛋白,是内源性神经保护因子,增加其表达的药物可预防卒中进展。但 Ngb 调控机制目前尚不清楚,至今未发现可用于临床的 Ngb 诱导剂。血晶素(Hemin)可诱导 HN33 永生化海马细胞表达 Ngb,进一步研究表明血晶素可诱导局灶性脑缺血大鼠 Ngb 表达增多,减轻缺血性损伤[1,2]。目前有关海马脑片缺氧缺糖损伤中 Ngb 表达及血晶素的诱导情况还未见报道,为此,我们建立大鼠海马脑片氧糖剥离模型,以研究氧糖剥离(Oxygen/glucose deprivation,OGD)时海马脑片神经元中 Ngb 的表达和调控,为寻找 Ngb 诱导剂提供依据。

1 材料方法

1.1 材料

新生 8~10 d SD 大鼠,体重 30~50 g(购于第三军医大学大坪动物中心)。血晶素购自美国 Sigma 公司。兔抗 Ngb 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;HBSS、谷氨酰胺和马血清购自美国 GIBCO 公司; D(+)-glucose、HEPES 购自美国 Sigma 公司。ABC 试剂盒为美国 Vector 公司产品。活组织切片机为美国产的 Mcllwain Tissue Chopper;培养箱为德国 HERAEUS;日本产 NIKON 倒置荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 海马脑片氧糖剥离模型的建立及标本处理

1.2.1.1 海马脑片制备及分组 取新生 8~10 d SD 大鼠,乙醚麻醉、无菌条件下断头取脑,置含糖 7.5 mg/ml 的 HBSS 中,剥出海马,活组织切片机上铺消毒滤纸,将海马逐个放在滤纸上纵向切片,约 400 μm。6 孔培养板内各加入 1.2 ml 的海马脑片培养液,然后放入插入式微孔滤膜,将完好的海马脑片分放在各孔内的滤膜上。置 37℃、5% CO_2、平衡湿度的标准培养箱内培养,每周更换培养液 2 次。培养液成分为:50%MEM,25%EBSS,25%马血清,6.5 mg/L 的 D- 葡萄糖,20 mmol/L HEPES,2 mmol/L 谷氨酰胺。

将各孔脑片随机分为 3 组(每组 2 孔),分别为正常培养对照组(HOTC);实验组,单纯缺氧缺糖组(OGD),预加 Hemin 再缺氧缺糖组(Hemin + OGD)。

1.2.1.2 海马脑片缺氧缺糖培养及标本处理 按照 Laake[3] 法,海马脑片培养 2 周时,各孔培养液内均加入 100 μl 0.1mmol/L 的碘化丙锭,置 37℃、5% CO_2、平衡湿度的标准培养箱内孵育 1 h,在荧光显微镜下筛取完好无特异荧光着色的脑片,并记录。筛取后的各组脑片换入正常培养液中,并分别加入 120 μl 培养液、50 μl 的 Hemin,置 37℃、5% CO_2、平衡湿度的标准培养箱内孵育 1 h 之后,除 HOTC 组外,其余各组均换成平衡盐溶液(pH 7.4)。将培养板放入密闭自制容器中,分别充入 5%CO_2、95%N_2 的混合气体,密闭容器充满气体后放入 37℃培养箱,1.5 h 后换入正常培养液,置 37℃、5% CO_2、平衡湿度的标准培养箱内恢复培养 24 h;培养至 23 h 时各组中均加入 100 μl 0.1 mmol/L 的 PI,继续培养 1 h,在荧光倒置显微镜下观察、拍照,最后用 4℃、4%多聚甲醛固定。

将各组已固定的海马脑片换入 30%蔗糖溶液内,4℃ 12 h。然后冰冻连续冠状切片,片厚 20 mm。每组切片各按顺序分为 3 套,分别作尼氏染色、Ngb 的免疫组织化学染色和阴性对照染色。

1.2.2 免疫组化、Nissl 染色方法

免疫组织化学染色(SP 法):切片于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4) 内冲洗 5 min 后,滴加 3%过氧化氢溶液,室温 30 min;用免疫组化试剂盒封闭液处理 0.5 h,吸去多余封闭液;滴加 Ngb 多克隆抗体 1∶100,48 h(阴性对照组用一抗稀释液 0.3% Triton-PBS 代替一抗);滴加生物素标记二抗,室温 1 h;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,室温 1 h;以上每步之后均用 0.01 mol/L PBS 漂洗,5 min × 3 次;最后入 DAB/H_2O_2 0.05%/ 0.01%) 溶液显色反应 10~15 min。苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

Nissl 染色:切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡至水,蒸馏水浸洗 5 min,1%甲苯胺蓝 60℃浸染 40 min。蒸馏水漂洗 5 min,95%酒精分化 1 min,无水乙醇脱水、透明、封片。

1.3 数据处理和资料分析

免疫组织化学染色切片采用德国 Leica Qwin 图像处理与分析系统进行图像分析。每组中选取 5 张切片进行图像分析,每张切片均选取相同的部位,各部位均选取 3 个测量点(避开细胞缺失区域)以检测其灰度值。测量时,每个测量点测量的象素量基本一致,以上测量的灰度值减去相应区域背景色的灰度值后的平均值为最终灰度值。结果以实验组灰度值 /HOCT 组灰度值 × 100%表示 Ngb 蛋白表达相对水平。

统计学处理:本实验数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示。以 SPSS 10.0 版专用统计分析程序对各组数据进行单因素方差分析。$P<0.05$ 为统计学差异显著,$P<0.01$ 为统计学差异非常显著。

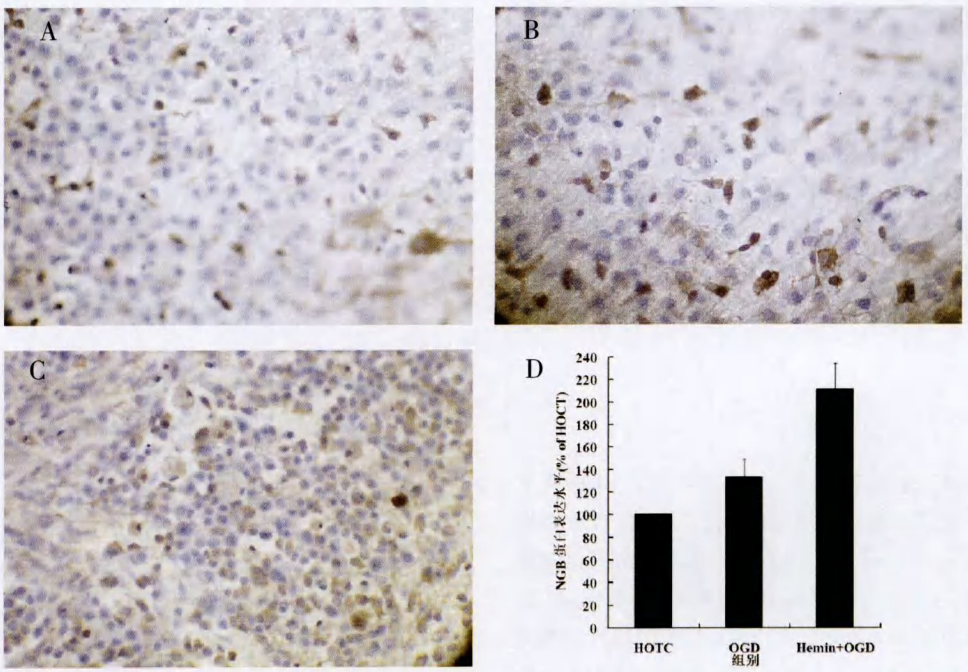
2　结　果

2.1　Ngb 免疫组化染色情况

Ngb 在正常培养海马脑片中有表达，阳性细胞呈棕色，阳性物质定位于神经元的细胞质中，突起中亦有少量着色。OGD 组海马脑片中，形态结构正常的阳性细胞少，多数阳性神经元结构模糊、肿胀，Ngb 的表达强于 HOTC 组，二者相比有显著性差异（$P<0.05$）；Hemin+OGD 组中，大部分细胞形态结构正常，少数阳性神经元结构模糊、肿胀，Ngb 蛋白的表达较 HOTC 组和 OGD 组明显增强（$P<0.01$）（图 1）。

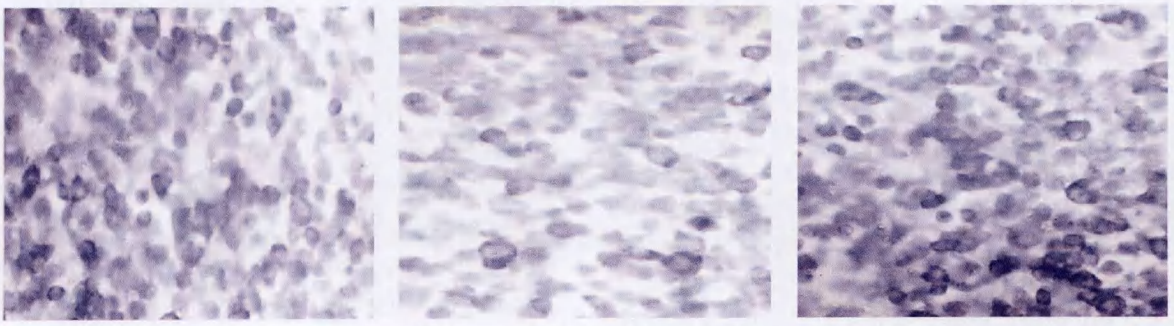
2.2　Nissl 染色情况

对照组海马锥体细胞排列整齐，边缘清晰，呈多角型，中有核仁，顶树突向内层放射状伸展。OGD 组锥体细胞发生坏死：细胞体缩小，变成三角形，Nissl 小体溶解、消失，胞浆呈均匀蓝色，胞核浓缩深染，结构消失。锥体细胞数量较正常对照组明显减少；Hemin+OGD 组海马脑片形态基本正常，锥体细胞数较 OGD 组多（图 2）。



A. HOTC 组；B. OGD 组；C. Hemin+OGD 组；D. Ngb 蛋白表达相对定量

图 2　Nissl 染色(10×20)



A. HOTC 组；B. OGD 组；C. Hemin+OGD 组

图 1　Ngb 免疫组化染色（10×20）

3 讨 论

神经组织的活动需要很高的能量,人脑的重量只有体重的 2%,其耗氧量却高达人体总耗氧量的 20%。脑组织短暂缺血缺氧,必然导致神经元的死亡和部分神经功能的丧失。作为第三类携氧球蛋白,虽然 Ngb 的浓度不高,但与氧有很高的亲和力,即使血氧浓度较低,Ngb 也能转运氧通过血脑屏障,提高脑组织氧的利用率,在一定程度上延缓神经元的死亡,维持神经细胞的正常生理功能。

研究表明大鼠大脑皮质 Ngb 蛋白及其 mRNA 在持续缺氧过程中表达连续上调,而在间歇缺氧模型中,只在早期表达增加[4]。在严重低氧 24 h(0~1% O_2)的神经细胞系中,Ngb mRNA 表达增加,但在大鼠短暂全脑缺血后并未发现 Ngb mRNA 表达增加[5]。在小鼠大脑短暂缺氧(7.6%O_2)2 h 后并未使 Ngb 表达增强和表达范围增加,Ngb mRNA 也无变化,提示在活体内单纯缺氧并不能诱导 Ngb 的表达[6]。也有研究认为 Ngb 只能在急性缺血缺氧时发挥作用。由于体外细胞培养不能反应神经系统正常的生理学和形态学特征,而在体缺血-再灌注模型不容易控制干预因素,因而导致研究结果出现一定的争议。为了克服细胞培养和在体模型的缺陷,我们利用海马脑片制备缺氧缺糖模型,模拟在体脑缺血以研究 Ngb 在缺血性脑损伤中的作用及调控。研究结果发现,Ngb 蛋白在正常海马脑片的神经元中有表达,位于胞浆,呈棕黄色。Ngb 蛋白在 OGD 组海马脑片的表达强于 HOTC 组,二者相比有显著性差异($P<0.05$)。提示脑缺血可诱导 Ngb 蛋白表达,发挥神经保护作用。

大量研究证实了 Ngb 在脑缺血中的神经保护作用。证据包括缺氧神经元和脑缺血可诱导 Ngb 表达,增强 Ngb 表达可减轻低氧神经元损伤及脑缺血性损伤,反之,敲除 Ngb 表达则促进损伤。Ngb 过表达的转基因鼠可耐受脑梗塞[7-9]。

虽然 Ngb 在神经保护中有着至关重要的作用,但目前还未发现可用于临床的 Ngb 诱导剂。血晶素(Hemin,又名氯高铁血红素)可诱导血红蛋白和其他红细胞系统特异蛋白激酶的基因转录、翻译,并提供铁和血红素以供组装血红蛋白,已用于治疗间歇性血卟啉病[10]。Ngb 是脊椎动物体内的 4 种球蛋白之一,与血红蛋白、肌红蛋白以及细胞球蛋白均属于血红素蛋白家族的一员[11]。Ngb 含有一个铁卟啉环结构,有 6 个配位键,其近端组氨酸残基是辅基血红素的结合位点,远端组氨酸残基含有结合辅基血红素结合配体的位点,苯丙氨酸残基和辅基血红素相互作用,使 Fe^{2+}可稳定在血红素分子中,并避免 Fe^{2+}氧化为无携氧能力的 Fe^{3+}。Zhu 等[1]发现血晶素在体外可促进 Ngb 表达。本实验证实海马脑片 OGD 时,血晶素诱导神经元表达 Ngb 增加,明显减轻缺氧缺糖损害,为防治缺血性脑卒中提供新思路。

研究提示血晶素通过 sGC-cGMP-PKG 通路诱导正常海马神经元表达 Ngb[1],但具体机制目前还不十分清楚。进一步明确 Ngb 的调控机制,以此为切入点探索有效的诱导剂,将是一项特别有吸引力的脑保护新策略。

参 考 文 献

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

[2] 刘 娟,姚国恩,蒋晓江,等.氯化血红素对大鼠局灶性脑缺血组织的作用探讨[J].第三军医大学学报,2006,28(10):1035-1037.

[3] Laake J H, Haug F M, Wieloch T, et al. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 1999, 4(2):173-184.

[4] Li R C, Lee S K, Pouranfar F, et al. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain[J]. Brain Res, 2006, 1096(1): 173-179.

[5] Schmidt-Kastner R, Haberkamp M, Schmitz C, et al. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture [J]. Brain Res, 2006, 1103(1):173-180.

[6] Hundahl C, Stoltenberg M, Fago A, et al. Effects of short2term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005, 31(6):610-617.

[7] Wang X, Liu J, Zhu H, et al. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2008, 39(6):1869-1874.

[8] Greenberg D A, Jin K, Khan A A. Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant [J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(1):20-24.

[9] Burmester T, Gerlach F, Hankeln T. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(47): 17944-17948.

[10] Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. Possible protective mechanisms of heme oxygenase-1 in the brain[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 977: 501-506.

[11] Fordel E, Thijs L, MoensL, et al. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging [J]. FEBS J, 2007, 274(5):1312-1317.

(责任编辑:冉明会)