维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0007-03

实验性脑缺血再灌流后Bak和Bad基因在脑内的表达

刘颖菊[1]，蒋远明[2]，薛春生[1]，周歧新[1]

（1. 重庆医科大学基础医学院药理教研室 重庆 400016；2. 四川省遂宁市人民医院 遂宁 629000）

【摘 要】目的：观察全脑缺血再灌流后Bak和Bad基因在脑内表达的变化规律和意义。方法：采用大鼠4血管结扎全脑缺血30min再灌流模型，用免疫组织化学染色法观察Bak和Bad基因在脑内的表达。结果：全脑缺血再灌流后12h开始在皮质和海马等缺血易损部位：Bak表达降低，24h达最低点；而Bad则表达升高，24h达最高点；表达变化最明显的时间均是24～48h，此时间与脑缺血后脑细胞凋亡发生的高峰时间一致。结论：脑缺血再灌流可以诱导Bak和Bad基因在脑内表达发生变化，这种变化与脑细胞凋亡的发生关系密切。Bak在脑缺血后表达降低说明其在脑内表达可抑制细胞凋亡。

【关键词】脑缺血；Bak；Bad；基因

【中国图书分类法分类号】R743.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-03-20

Expression of Bak and Bad gene in brain after global ischemia-reperfusion

LIU Ying-ju, et al

（Department of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, 400016）

【Abstract】 *Objective*: To investigate the expression of Bak and Bad gene after ischemia-reperfusion. *Methods*: Ischemia was induced by the four-vessel occlusion for 30 min and followed by reperfusion in rats. The biopsy tissue from brain was immunohistochemically assayed with Bak and Bad genes polyclonal antibody. *Results*: The expression of Bak protein decreased as early as 12h after onset of reperfusion and peaked at 24~48h. At the same time, however, the expression of Bad protein increased and peaked at 24~48h. The expression of Bak and Bad gene was quite clear in cortex and hippocampus CA1 which were the sensitive areas for ischemic injury. *Conclusion*: The ischemia-reperfusion induced the changes of expression of Bak and Bad gene in brain which may accelerate apoptosis of neurons.

【Key words】Cerebral ischemia; Bak; Bad; Gene

Bak和Bad基因是已发现的Bcl-2基因家族成员。Bcl-2基因家族对细胞凋亡有重要的调节作用[1]。近年来报道脑缺血后Bcl-2基因家族在脑内表达有明显的改变[2,3]，因此脑缺血后Bcl-2家族的变化成为新的研究热点。但Bad和Bak在脑缺血后脑内的表达变化及意义尚未见报道。故本研究旨在观察全脑缺血再灌流后Bak和Bad基因在脑内的表达变化，以探讨其意义和脑缺血损伤的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性Wistar大鼠，体重200～280g，由本校实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 Bad及Bak兔多抗购自Santa Cruz Biotechnology, Inc.（USA）S-P组织化学染色试剂盒购自福建迈新公司，其余均为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 采用大鼠4血管结扎全脑缺血模型。参照储国祥等[4,5]方法进行。大鼠全脑缺血30min后进行再灌流。

1.2.2 方法：采用随机区组设计，分缺血30min再灌流6、12、24、48、72h及7天6个时点组、正常对照组和假手术组。每组6只大鼠。假手术组仅做颈总动脉和横突孔分离。各鼠在相应再灌流时相点用4℃ 4%的多聚甲醛活体内固定后断头取脑，大鼠脑定位于Bregma -3.8mm～-6mm处取脑冠状脑片。脑片经梯度乙醇脱水，二甲苯透明后，常规石蜡包埋。从-3.8mm处作连续切片，厚度5mm。切片采用S-P免疫组织化学染色法进行染色。Bak和Bad一抗的工作浓度为1:100，孵育时间2h(37℃)，其余按S-P试剂盒说明书进行。最后DAB显色，苏木精复染，阳性反应细胞胞质呈棕黄色。在光镜下作定性及半定量分析[13]：10×40倍显微镜下在切片双侧皮层及海马CA1分别选择阳性细胞最多的六个视野计数，最后取平均值；并根据显色的深浅确定免疫反应强度，分级表示：-无表达，+弱表达，++中度表达，+++强表达。

1.3 统计分析

作者介绍：刘颖菊（1963- ），女，副教授，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

实验结果采用方差分析，实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，显著性检验界值为0.01和0.05。

2 结　果

2.1 Bak表达的变化

正常和假手术组在皮质尤其颞侧皮质有较多Bak阳性细胞，细胞形态象神经元，免疫反应较强；海马及基底节仅见少量阳性细胞；两组比较无显著差异（$P>0.05$），故合并为正常对照组。缺血12h后皮质阳性细胞明显减少，免疫反应强度降低，24h时达最低点。48h开始回升，72h细胞数恢复正常且较正常偏高，但免疫反应强度仍较正常低。见表1。

2.2 Bad表达的变化

正常及假手术组在皮质及海马CA2，CA3区有少量显色较浅的阳性细胞，两组比较无显著差异（$P>0.05$），故合并为正常对照组。缺血再灌流12h后阳性细胞增多，显色加深尤其在大脑皮质；24h达到高峰，海马CA1区也出现显色较深的阳性细胞，48h开始下降，7天恢复正常，见表2及图1～3。



图1　正常皮质中Bad阳性细胞 ABC×200

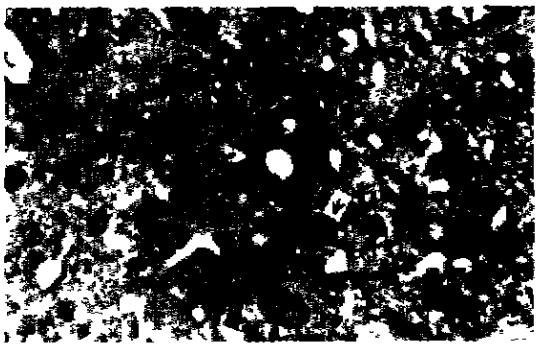


图2　脑缺血再灌流24h皮质中Bad强阳性细胞 ABC×200

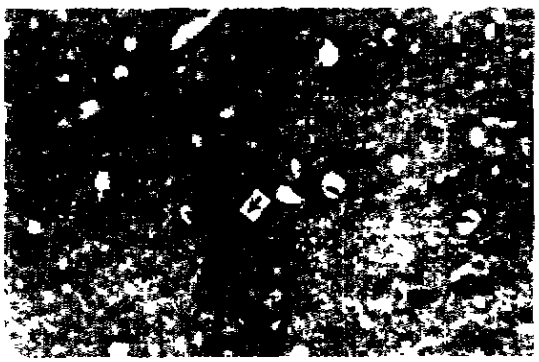


图3　脑缺血再灌流24h海马CA1中Bad阳性细胞 ABC×200

3 讨　论

Bak是Bcl-2基因家族的一位成员，广泛分布于各组织中，尤其在心脏、骨骼肌中有高水平的表达。实验发现Bak的明显表达能使去血清的成纤维细胞快速广泛地凋亡，研究还发现它与抑制凋亡基因Bcl-2和Bcl-xl相互作用，拮抗Bcl-2的保护作用，促进细胞凋亡产生。但Bak同时也显示能抑制EB病毒(EBV)转染的WI-L2细胞系在去除小牛血清后的凋亡发生，此外Bak对细胞毒剂甲萘醌诱导的细胞死亡有抑制作用[6,7]，其机理不清，而Bcl-2蛋白在这些细胞中的保护作用却非常低。在本实验中正常及假手术组Bak在皮质有较高水平的表达，表达细胞的形态象神经元。缺血再灌流12h后皮质表达明显下降，24～48h达到低谷，72h细胞数恢复正常，但免疫反应强度仍较正常低。由于促进凋亡的基因通常在细胞凋亡时伴随表达或表达增强，虽然脑缺血后线粒体功能受损，脑内蛋白质合成普遍受抑制[10]，Bak表达降低不能排除与此有关，但Bak表达下降的时间与凋亡发生的高峰时间24～72h[8,9]极为一致。因此，这个变化与促凋亡基因作用不相吻合。提示Bak在神经系统中的表达与维持神经元的生存相关，表达降低反而促进脑细胞凋亡的发生。有关Bak在神经系统中的作用和表达变化值得进一步探索。

Bad是另一Bcl-2同源基因，可与Bcl-xl和Bcl-2二聚化结合使与之结合的Bax置换出来，形成Bax的同源二聚体，逆转Bcl-xl和Bcl-2对凋亡的抑制作用促进细胞凋亡的发生[11]。本实验中发现脑缺血后12hBad表达即开始明显升高尤其在皮质较为明显；24h达到高峰，CA1区也出现明显的阳性细胞；48h开始下降，7天后恢复正常水平。Bad的表达高峰与Bax的表达高峰重迭并略早[12]，有利于增强Bax的促凋亡作用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 脑缺血30min再灌流后Bak阳性细胞数和免疫反应强度变化（/10×40，$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	正常对照组	缺血30min再灌流后			
		12h	24h	48h	72h
皮质	10.6±2.91(+++)	3.3±1.32(++~+)**	1.6±0.57(+)**	3.8±3.17(+)**	14.1±5.57(+~++)**
海马CA1	3.0±0.82(+++)	1.3±1.15(++~+)	1.6±0.71(+)*	2.0±0.56(+)*	12.6±9.45(+~++)*

与正常对照组比较 * $P<0.05$，** $P<0.01$

表2 脑缺血30min再灌流后Bad阳性细胞数和免疫反应强度变化（/10×40，$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	正常对照组	缺血30min再灌流后			
		12h	24h	48h	72h
皮质	2.6±2.91(+)	4.5±1.31(++)	8.6±3.92(+++~++)**	6.8±2.19(++)**	6.3±3.17(++~+)**
海马CA1	0(+)	1.3±0.95(++)*	4.8±1.52(+++~++)**	3.6±3.22(++)**	3.2±2.50(++~+)**

与正常对照组比较 * $P<0.05$，** $P<0.01$

综上所述，脑缺血再灌流后Bcl-2基因家族成员出现明显表达变化，这种变化使细胞基因表达的稳态平衡被打破，影响了神经元机能，导致凋亡发生。

参 考 文 献

[1] 章军建，阮旭中，张苏明，等. 大鼠局灶性脑缺血后bcl-2、Bax的表达与细胞凋亡的关系[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志，1998;5(4):245-247.

[2] Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, et al .Altered expression of bcl-2, bcl-x, Bax and c-fos colocalizes with fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rat[J]. Brain Res Mol Brain Res.1996;40(2):254-260.

[3] Krajewski S, Mai JK, Krajewsksa M, et al. Upregulation of bax protein level in neurons following cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 1995;15:6364-6369.

[4] 徐叔云，卞如濂，陈 修. 药理实验方法学[M]. 第2版，北京：人民卫生出版社，1991:946-947.

[5] Pulsinelli WA, Brierley JB. An new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979;10(3):267-271.

[6] Chittenden T, Harrington EA, O'connor R, et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak[J]. Nature, 1995;374:733-736.

[7] Kiefer MC, Braner MJ, Powers Vc, et al. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak[J]. Nature, 1995;374:736-739.

[8] Sei Y, Von-Lubitz KJ, Basile AS, et al. Internucleosomal DNA fragmentation in gerbil hippocampus following forebrain ischemia[J]. Neurosci Lett, 1994;171:179-182.

[9] Li Y, Chopp M, Jing N, et al. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995;15:389-397.

[10] Thilmann R, Xie Y, Kleihues P, et al. Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus[J]. Acta Neuropathol, 1986;71:88-93.

[11] Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric parter for Bcl-XL and bcl-2 displaces bax and promotes cell Death[J]. Cell. 1995;80:285-291.

[12] 苏志强，刘亢丁，饶明俐. 实验性局灶性脑缺血再灌流后bcl-2蛋白的表达[J]. 中风与神经疾病杂志，1998;15(1):6-7.

[13] 钱采韵，周伯荣，胡芹权，等. Fas抗原与阿尔茨海默病神经细胞凋亡的研究[J]. 中国神经精神疾病杂志，1999;25(1):10-12.