

短暂前脑缺血小鼠海马脑红蛋白表达的动态变化

陈秀莲^{①②} 陈瑞^{①*} 高春锦^③ 徐世明^④ 张丽娟^④ 王宏娟^④

(①首都医科大学基础医学院生化与分子生物学系 北京 100069; ②山东省济南市中心血站 济南 250001;

③首都医科大学附属北京朝阳医院高压氧科 北京 100020;

④首都医科大学燕京医学院生化教研室 北京 101300)

摘要: 研究了小鼠短暂前脑缺血再灌注后不同时相点脑红蛋白表达的动态变化及其意义。用夹闭双侧颈总动脉的方法建立 C57Bl/6 小鼠缺血再灌注动物模型; 采用 RT-PCR 及 Western blotting 方法检测各组小鼠海马组织中脑红蛋白在转录和翻译水平表达的动态变化。结果显示, 脑红蛋白在 mRNA 水平表达的动态变化为: 与假手术对照组 (100 ± 0.00) 比较, 再灌注后 6 h (132.59 ± 28.26 , $P < 0.05$) 开始升高; 24 h (157.36 ± 13.85 , $P < 0.001$) 达高峰; 48 h (146.55 ± 23.17 , $P < 0.01$) 开始下降; 72 h (118.42 ± 34.23 , $P > 0.05$) 基本恢复至正常水平。脑红蛋白在蛋白水平表达的动态变化为: 与假手术对照组 (100 ± 0.00) 比较, 再灌注后 6 h (111.46 ± 23.54 , $P > 0.05$) 轻微升高, 24 h (141.25 ± 32.12 , $P < 0.01$) 达高峰, 48 h (138.02 ± 19.68 , $P < 0.05$) 开始下降, 72 h (119.29 ± 35.18 , $P > 0.05$) 基本恢复至正常水平。结果提示, 脑缺血再灌注各时相点的脑红蛋白 mRNA 及蛋白表达水平均增加, 可能是机体的应激反应, 但持续时间较短(48 h 以内)。

关键词: 脑红蛋白; 缺血再灌注; 表达; 小鼠; 海马

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)01-147-06

Kinetic Change in the Expression of Neuroglobin in Mouse Hippocampus after Transient Forebrain Ischemia

CHEN Xi-rLian^{①②} CHEN Rui^{①*} GAO Churr Jin^③ XU Shi-Ming^④
ZHANG Li-Juan^④ WANG Hong Juan^④

(①Department of Biochemistry and Molecular Biology, Capital Medical University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100069;

②Jinan Blood Center, Jinan 250001;

③ Department of Hyperbaric Oxygen, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020;

④ Department of Biochemistry of Capital Medical University Yajing Medical College, Beijing 101300, China)

Abstract: The kinetic changes in the expression of neuroglobin (NGB) in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia reperfusion at different time points were investigated and the significance of these changes was discussed. The C57Bl/6 mice model of ischemia reperfusion was established by transient occlusion double side carotid artery under micromanipulation. RT-PCR was used to detect the dynamic changes in NGB mRNA expression (transcription level) and Western blotting was used to detect the dynamic changes in NGB protein expression (translation level). The results demonstrated that, compared with sham operated control group (100 ± 0.00), the expression of NGB mRNA

基金项目 北京市教育委员会科技发展基金项目(No. KM200510025004);

* 通讯作者, E-mail: chenrui@comu.edu.cn, chenrui4647@163.com;

第一作者介绍 陈秀莲, 女, 硕士研究生; 研究方向: 脑缺血再灌注损伤机制及防治; E-mail: xlxiancc@163.com.

收稿日期: 2007-06-06, 修回日期: 2007-11-28

increased initially at 6 h after reperfusion (132.59 ± 28.26 , $P < 0.05$), reached a peak at 24 h (157.36 ± 13.85 , $P < 0.001$), degraded since 48 h (146.55 ± 23.17 , $P < 0.01$) and the expression of NGB mRNA dramatically dropped down nearly to normal level at 72 h (118.42 ± 34.23 , $P > 0.05$) after reperfusion. A similar tendency was found in the expression of NGB protein compared with sham operated control group (100 ± 0.00). The NGB protein increased little at 6 h after reperfusion (111.46 ± 23.54 , $P > 0.05$), reached a peak at 24 h (141.25 ± 32.12 , $P < 0.01$) and degraded since 48 h (138.02 ± 19.68 , $P < 0.05$). The expression of NGB protein dramatically dropped down to nearly normal level at 72 h (119.29 ± 35.18 , $P > 0.05$) after reperfusion. The results indicate that the increased expression of NGB mRNA and protein at different phase point after reperfusion might be an irritable protective effects against ischemia reperfusion brain damage, but the duration of its expression is short (within 48 h).

Key words: Neuroglobin (NGB); Ischemia reperfusion; Expression; Mouse; Hippocampus

氧是机体新陈代谢和维持生命的必要物质, 脑的能量消耗占全身总能量消耗的 20%, 是机体耗氧量最多的器官, 对缺血缺氧非常敏感。2000 年德国科学家 Burmester 等人发现了一种属于珠蛋白家族但与血红蛋白和肌红蛋白不同的蛋白质, 因其主要在脑组织中表达, 故命名为脑红蛋白(neuroglobin, NGB)^[1]。脑红蛋白与氧的运输和贮存密切相关。NGB 与 O₂ 有很高的亲和力, 即使在血氧浓度较低的情况下, 仍易于转运 O₂ 通过血脑屏障, 提高脑组织氧的利用率, 且 NGB 可以减少局灶性脑缺血的梗死体积^[1]。因此, 推测 NGB 在缺血性脑卒中继发缺氧过程中可能对神经元有重要保护作用。以往对缺血性脑卒中的研究主要集中在氧自由基、细胞内钙超载以及兴奋性氨基酸等方面^[2~4], 脑红蛋白的发现为缺血缺氧性脑病的研究提出了新思路。本实验旨在用分子生物学方法研究小鼠短暂前脑缺血再灌注后不同时相点脑红蛋白表达的动态变化及其意义, 为进一步研究临床防治缺血性脑卒中提供实验和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物分组 根据生物统计学要求, 小鼠每组要 ≥ 8 只才有统计学价值, 同时参照国外同类医学文献报道, 确定该实验 C57BL/6 雌性小鼠样本量为 40 只。实验用 C57BL/6 雌性小鼠体重 18~22 g, 由首都医科大学动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2000-0012。按随机数字表将小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只。其中假手术对照组 (sham operated

control, sham o 组) 1 组; 实验组为脑缺血再灌注组 (ischemia-reperfusion, I/R 组), 以再灌注时间的不同分为 6、24、48、72 h 共 4 组。

1.2 短暂前脑缺血再灌注动物模型的建立 按文献^[5~7]将实验组动物制成短暂前脑缺血再灌注模型。以 6% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 剂量为 300 mg/kg。麻醉后将小鼠仰卧位固定于外科倒置显微镜下, 于镜下将颈部皮肤正中切开, 游离双侧颈总动脉, 以无创性动脉夹夹闭双侧颈总动脉, 造成脑缺血, 准确计时 10 min 后取下动脉夹, 使血流恢复正常, 即为再灌注, 缝合切口并以青霉素消毒。记录再灌注时间, 由血管再通起始到动物被处死为止。假手术对照组也同样手术, 但不夹闭颈总动脉, 于再灌注 24 h 处死。再灌注时间到达设计时间时, 将小鼠断头, 用首都医科大学神经科学研究所建立的分离鉴定海马技术分离海马, 用剪刀和镊子打开颅骨, 小心取出脑组织置于干冰上, 用手术刀沿矢状缝将鼠脑切开, 在切面靠近脑底部位可见到色浅呈半弧形的海马, 即可用刀背轻轻分离出两侧海马 (预实验时用组织切片确认海马组织), 置于冻存管中, 液氮保存备用。

1.3 NGB 基因 mRNA 表达的 RT-PCR 测定

1.3.1 NGB 基因引物设计 根据文献报道的小鼠 NGB cDNA 序列, 采用 Primer Premier 5 软件设计引物, 用于扩增 C57BL/6 小鼠的 NGB 编码区部分序列。其引物序列为: 上游 5'-TGT TCG CCA GGC TCT TCG-3', 下游 5'-TCG GGA CCC AGG CAC TTC T-3', 扩增片段长度为 292 bp。以 β actin 作为内参照, 其引物序列为: 上游

5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', 下游 5'-CTT CCT TAA TGT CAC GCA CGA TTT G-3', 扩增片段长度为 540 bp。引物由上海生工公司合成, 使用浓度为 20 μ mol/L。

1.3.2 脑组织总 RNA 的提取 用 Trizol 法 (Invitrogen 公司产品) 提取 C57BL/6 小鼠海马总 RNA, 并经过紫外分光光度计定量。

1.3.3 逆转录-单链 cDNA 的合成 等量取每个标本总 RNA 1 μ g, 分别使用 AMV 逆转录酶 (Promega 公司产品) 逆转录成 cDNA。

1.3.4 PCR 反应 分别取上述逆转录获得的 cDNA 2 μ l 作为模板进行 PCR 反应。反应体系: 模板 cDNA 2 μ l, EX Taq 酶 0.1 μ l (5 U/ μ l), $10\times$ buffer 2 μ l, 2.5 mmol/L dNTP mix 1.6 μ l, NGB 上下游引物各 0.5 μ l, 加水补足 20 μ l, 混匀。按下列条件扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。 β actin 另置于反应管扩增, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.3.5 结果分析 取 PCR 产物 5 μ l 进行 1% EB 琼脂糖凝胶电泳, 经 Gel-Doc 紫外凝胶成像仪 (Bio-rad 公司, 分析系统 F1-F2 Fuses type T2A) 扫描记录电泳结果, 计算出条带的总灰度值, 即产物量的相对值。将 NGB 产物量的相对值除以同一样品内参 β actin 产物量的相对值进行校正, 以 sham 组的值为 100%, 用以下公式分别计算出各组 mRNA 的相对表达量: mRNA 相对表达量 = 100% \times (实验组的 NGB/内参) / (假手术组的 NGB/内参)。

1.4 Western blotting 用单去污法裂解海马组织, 提取总蛋白。用 BCA 蛋白分析试剂盒 (Pierce 公司) 测定蛋白质。各组取 40 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 10% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。根据预染蛋白 Marker (普利莱基因技术有限公司) 的位置将膜裁为两片, 分别进行 NGB 和 β actin 的杂交。按 1: 750 稀释小鼠抗大鼠 NGB 单克隆抗体 (NGB 一抗由军事医学科学院张成岗副教授馈赠), 1: 1 000 稀释小鼠抗大鼠 β actin 多

克隆抗体 (Sigma 公司), 封在不同的杂交袋内, 4 $^{\circ}$ C 过夜。TTBS 洗硝酸纤维素膜 5 min \times 6 次。加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 1: 4 000 (山羊抗小鼠 IgG, 中杉生物技术有限公司进口分装), 置室温摇床 1 h。用 TTBS 洗膜 5 min \times 6 次, 室温摇动。滴加化学发光试剂 (CSF 公司), X 光片感光 (感光胶片为 Kodak 产品)。感光后的胶片在 white light 模式下, 经过紫外凝胶成像仪扫描, 采用 BandScan 软件分析结果。NGB 蛋白相对表达量的计算方法同 1.3.5。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件包对所有数据进行处理。数据以均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 进行单因素方差分析。差异显著时, 用 Student-Newman-Keuls 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGB mRNA 的测定 利用设计合成的小鼠 NGB 引物扩增小鼠 NGB 编码区的部分序列, 所扩增片段长度与预期一致 (扩增长度 292 bp, 实测出 250 bp, 图 1: A)。测序结果在 GenBank 中进行比对, 与小鼠 NGB (NM_022414) 的同源性为 100%, 证明产物准确无误。小鼠 β actin 扩增后的产物片段与设计相符 (扩增长度 540 bp, 实测出 502 bp, 图 1: B), 与小鼠 β actin (NM_007393.1) 的同源性为 100%, 保证了实验的可靠性。用 Gel-Doc 紫外凝胶成像仪对条带进行半定量分析发现 (表 1), 与 sham 组比较, 缺血后再灌注 6 h, NGB mRNA 水平开始升高 ($P < 0.05$), 24 h 达高峰 ($P < 0.001$), 48 h 开始下降 ($P < 0.01$), 72 h 恢复至正常水平 ($P > 0.05$)。结果提示, 缺血再灌注时, NGB mRNA 表达上调可能是机体应激性的保护作用, 但持续时间较短 (48 h 之内)。

2.2 NGB 蛋白的测定 不同时相点 I/R 组的脑红蛋白的表达情况见图 2。在 white light 模式下用 Gel-Doc 紫外凝胶成像仪对条带进行半定量分析发现, 缺血后再灌注 6 h, 脑红蛋白的表达稍微升高, 但与 sham 组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$), 24 h 达高峰 ($P < 0.01$), 48 h 开

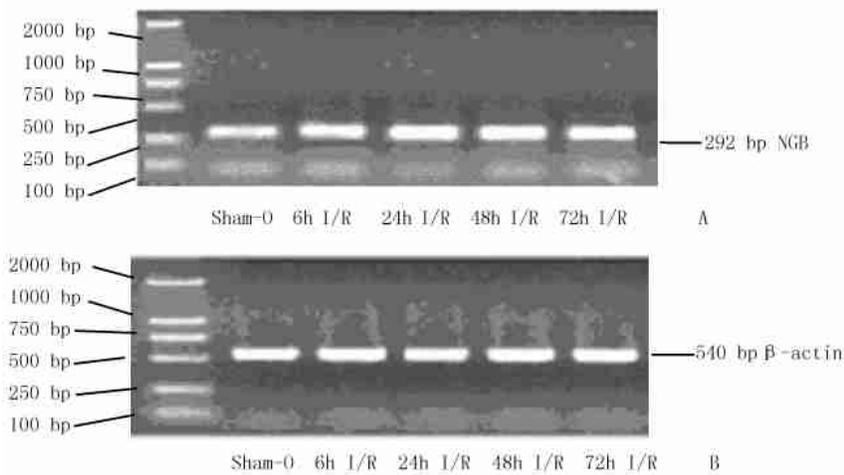


图 1 sham o 组和不同时相点 I/R 组小鼠海马组织 NGB (A)、 β -actin (B) RT-PCR 电泳结果

Fig. 1 Results of RT-PCR gel electrophoresis of NGB (A) or β -actin (B) gene in mouse hippocampus of sham operated control group and the ischemia reperfusion groups at different time points

表 1 短暂前脑缺血小鼠再灌注不同时相点海马组织 NGB mRNA 表达的动态变化

Table 1 Kinetic changes in the expression of neuroglobin (NGB) mRNA in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia reperfusion (I/R) at different time points (Mean \pm SD)

组别 Group	mRNA 相对表达量 (% , n = 8) mRNA relative expressive quantity
假手术对照组 (sham o) Sham operated control group	100.00 \pm 0.00
缺血再灌注组 (I/R) Ischemia reperfusion groups	
6 h I/R	132.59 \pm 28.26*
24 h I/R	157.36 \pm 13.85**
48 h I/R	146.55 \pm 23.17**
72 h I/R	118.42 \pm 34.23

与假手术对照组比较为 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the sham operated control group.

始下降 ($P < 0.05$), 72 h 几乎恢复至正常水平 ($P > 0.05$), 结果见表 2。结果提示, 缺血再灌注后, NGB 蛋白质的表达上调, 可能是机体应激性的保护作用, 但持续时间较短 (≤ 48 h), 如寻找到可提高 NGB 表达的物理方法或某些药物, 可能是治疗缺血性脑卒中的一种新思路。

表 2 小鼠缺血再灌注不同时相点海马组织 NGB 蛋白表达的动态变化

Table 2 Kinetic changes in the expression of neuroglobin (NGB) protein in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia reperfusion (I/R) at different time points (Mean \pm SD)

组别 Group	蛋白相对表达量 (% , n = 8) Relative expressive quantity of protein
假手术对照组 (sham o) Sham operated control group	100.00 \pm 0.00
缺血再灌注组 (I/R) Ischemia reperfusion groups	
6 h I/R	111.46 \pm 23.54
24 h I/R	141.25 \pm 32.12*
48 h I/R	138.02 \pm 19.68*
72 h I/R	119.29 \pm 35.18

与假手术对照组比较组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Compared with the sham operated control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

缺血易感性有种族特异性。文献^[5-7]报道 C57BL/6 小鼠对结扎双侧颈总动脉造成的短暂前脑缺血较其他种系小鼠敏感, 因为 C57BL/6 小鼠 Willis 环先天不发达, 后交通支发育不全, 基底动脉难以向颈动脉系统补充血流, 因此仅结扎双侧颈总动脉就可以造成完善的短暂前脑

缺血。此方法稳定可靠,为理想的缺血再灌注模型,故本研究选用 C57BL/6 小鼠。

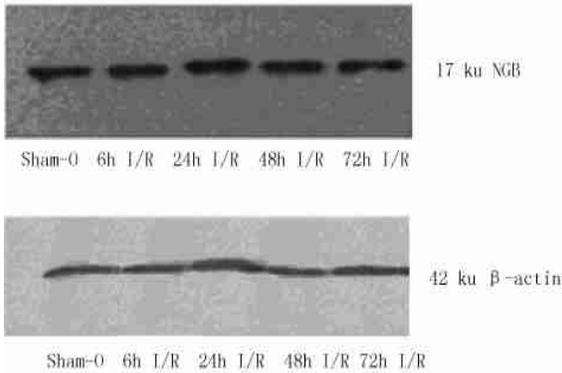


图2 sham o组和不同时间相点 I/R 组小鼠海马组织 NGB β -actin Western blotting 结果

Fig.2 Western blotting results of NGB or β -actin protein in mouse hippocampus of sham operated control group and the ischemia reperfusion groups at different time points

上图为 NGB, 下图为 β -actin。

The above figure represents the protein expression of neuroglobin (NGB) and the lower figure represents the protein expression of β -actin.

在本研究中,缺血再灌注组(I/R组)各时间相点的NGB在mRNA水平和蛋白水平的表达均有增高,6h开始升高,24h达到高峰,48h开始下降,72h恢复至正常水平。这些结果表明,NGB对缺血缺氧非常敏感,机体产生了保护性应激反应,但持续时间较短(48h以内)。此结论得到下列文献报道的支持,文献^[1,8-11]报道NGB的功能如下:①脑红蛋白的携氧能力高于血红蛋白,稍低于肌红蛋白^[1],NGB可能在缺氧条件下加速了O₂的释放,以供有氧氧化产生ATP;②作为末端氧化酶,在微氧环境下通过NADH以加速糖酵解产生ATP;③作为氧敏感蛋白活化其他蛋白,起调节作用,如上调SOD、下调Caspase 3等;④可能起目前尚未知晓的酶活性;⑤可能参与NO代谢,有利于清除自由基。在缺氧或缺血性脑损伤的研究方面,Sun等^[12]的研究发现,对培养的大脑皮层细胞进行持续24h的缺氧,随着缺氧时间的增加,NGB的表达呈逐渐增高的趋势,与对照组比较,细胞存活

率增加;反义寡聚脱氧核酸转染培养细胞组NGB表达比未进行转染组明显下降,下降的NGB表达在缺氧环境下加速了神经细胞的死亡。进一步进行动物实验,将NGB mRNA反义寡聚脱氧核糖核苷酸直接注入大鼠侧脑室,24h后诱导了局灶性脑缺血,这些大鼠与对照组相比,梗死体积增加56%~60%($P < 0.05$),神经功能缺损更严重。当给予NGB表达的腺相关病毒(AAV)载体后,皮质神经元NGB表达增加;在大脑中动脉闭塞后,与对照组相比,梗死灶体积减小一半^[13],提示NGB对急性脑缺血大鼠具有神经保护作用,增加其表达的药物可预防卒中进展。在本实验中,缺血再灌注小鼠NGB mRNA和蛋白质表达水平在短时间内(6~48h)均升高,与文献报道一致,提示NGB对脑组织可能起应激性保护作用,但持续时间较短。如果采取某种物理或药物的方法使缺血性脑卒中继发缺氧后NGB的表达水平大幅度提高或延长其表达时间,可能将会在很大程度上保护神经元,减轻其损伤,进而提高临床治疗水平和生活质量,造福人类。

本实验结果为临床用物理(如临床高压氧治疗)和药物等综合方法治疗缺血性脑卒中提供了实验与理论依据(高压氧治疗的实验结果另文发表),具有潜在的经济及社会效益。因为脑卒中是造成人类死亡的三大疾病之一,具有发病率、致残率和死亡率均高的特点,且近年其发病率呈不断上升并有年轻化的趋势。根据卫生部相关学术会议报告,我国每年缺血性脑卒中的新发病例为 $120 \times 10^5 \sim 150 \times 10^5$,其中死亡例数达 $80 \times 10^5 \sim 120 \times 10^5$,随着我国老龄化社会的到来,形势将更加严峻。

参 考 文 献

- [1] Bumester T, Weich B, Reinhardt S, *et al.* A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, **407**(6 803): 520~ 523
- [2] Takahashi M, Iwatsuki N, Ono K, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy accelerates neurologic recovery after 15-minute complete global cerebral ischemia in dogs. *Crit Care Med*, 1992, **20**(11): 1 588~ 1 594.

[3] Juurlink B H, Sweeney M I. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997, **21**(2): 121~ 128.

[4] Mary A, Angeles A, Juan P, *et al.* Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 2005, **39**(10): 1 291~ 1 304

[5] Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, *et al.* A model of global cerebral ischemia in C57BL/6 mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, **24**(2): 151~ 158.

[6] Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, *et al.* C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 1997, **752**(1- 2): 209~ 218.

[7] Wellons J C 3rd, Sheng H, Laskowitz D T, *et al.* A comparison of strain related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia. *Brain Res*, 2000, **868**(1): 14~ 21.

[8] Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*, 2003, **278**(38): 36 505~ 36 512.

[9] Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Association of human neuroglobin with cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor. *Biochemistry*, 2004, **43**(18): 5 119~ 5 125.

[10] Wakasugi K, Nakano T, Kitatsuji C, *et al.* Human neuroglobin interacts with flotillin 1, a lipid raft micro domain associated protein. *Bioch Biophys Res Com*, 2004, **318**(2): 453~ 460

[11] 徐文琳, 王春丽, 张成岗等. 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. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**(9): 823~ 828.

[12] Sun Y J, Jin K L, Mao X O, *et al.* Neuroglobin is up regulated by and protects neurons from hypoxic ischemic injury. *PNAS*, 2001, **98**(26): 15 306~ 15 311.

[13] Sun Y J, Jin K L, Peel A, *et al.* Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*. *PNAS*, 2003, **100**(6): 3 497~ 3 500.

《动物学杂志》第十届编辑委员会

主 编: 马 勇

副主编: 宋延龄 赵 勇 彭景 徐延恭 顾亦农

编 委: (以姓氏笔画为序)

马 勇 马建章 王祖望 王跃招 王德华 方盛国 计 翔 孙青原 孙悦华
 刘 发 许木启 李 宁 李 明 李进华 李枢强 李新正 张正旺 张春光
 张树义 张瑾峰 吴孝兵 陈佩惠 宋大祥 宋延龄 宋林生 杨 光 杨增明
 孟安明 宛新荣 郑光美 赵 勇 费 梁 钟文勤 桂建芳 夏国良 顾亦农
 徐存拴 徐宏发 徐延恭 曹 焯 彭贤锦 彭景 蒋志刚 魏辅文

责任编辑: 顾亦农 梁 冰