

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)03-0214-03

全身亚低温对大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区 *bcl-2*, *bax* 基因表达的影响

王 军^{1,2}, 熊利泽¹, 王警卫², 蔡莉萍², 曹 艳², 杜文涛², 常 江²(¹ 第四军医大学西京医院麻醉科, 陕西 西安 710033, ² 武警陕西总队医院麻醉科, 陕西 西安 710054)

Effect of whole body moderate hypothermia on expression of *bcl-2* and *bax* in hippocampal CA1 after global cerebral ischemia and reperfusion in rats

WANG Jun^{1,2}, XIONG Li-Ze¹, WANG Jing-Wei², CAI Li-Ping², CAO Yan², DU Wen-Tao², CHANG Jiang²¹Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Department of Anesthesiology, Shaanxi Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Xi'an 710054, China

【Abstract】 AIM: To observe the effect and mechanism of whole body moderate hypothermia on the expression of related gene after global cerebral ischemia and reperfusion. **METHODS:** According to the modified procedure of pulsineillis 4-vessel occlusion, we observed the changes of expression of *bcl-2* and *bax* in ischemia group and the influence of hypothermia on these changes using immunohistochemistry assay. **RESULTS:** The level of *bcl-2* expression was low at 6 h post-ischemia injury and it increased gradually with the passage of time. The expression reached peak level at 24 h and reduced at 7 d. Low expression was also observed in hypothermia group but it reached the peak at 3 d. Significant difference in the expression level of *bcl-2* at 3 d was found between ischemia group and hypothermia group ($P < 0.01$). The level of *bax* expression increased at 6 h after ischemia, reached the peak at 5 d and remained high at 7 d. Compared with that in ischemia group, the expression of *bax* were markedly lower at 5 d and 7 d ($P < 0.01$) in hypothermia group and no peak was observed. **CONCLUSION:** Hypothermia can inhibit the expression of *bax*, the gene that promotes neuronal apoptosis. The inhibition of neuronal apoptosis may contribute to the preventive

effect of hypothermia on global ischemia.

【Keywords】 hypothermia; cerebral ischemia; injury after reperfusion; *bcl-2*; *bax*

【摘要】目的 观察全身亚低温对大鼠全脑缺血再灌注损伤相关基因表达的影响及其机制。方法 采用改良的 Pulsinelli-WA 4VO 法, 制备大鼠全脑缺血再灌注模型, 采用 SABC 法观察亚低温对大鼠全脑缺血再灌注后 *bcl-2*, *bax* 基因表达规律。结果 SABC 法观察显示 *bcl-2* 在缺血再灌注后 6 h 有少量表达, 24 h 达峰值, 7 d 时明显减弱。亚低温组再灌注后 6 h 表达较弱, 3 d 时表达增强达峰值, 7 d 时明显减弱。亚低温组与单纯缺血再灌注组比较, 在缺血再灌注后 3 d 时有显著性差异 ($P < 0.01$)。 *bax* 基因在缺血再灌注后 6 h 出现表达, 5 d 时达高峰, 7 d 时仍有较高水平表达。亚低温组各时间点 *bax* 基因呈低表达, 与缺血再灌注组比较, 5 d 和 7 d 时相差最显著 ($P < 0.01$) 并且未见表达高峰出现。结论 亚低温可抑制脑缺血再灌注后促凋亡基因如 *bax* 基因的表达, 从而抑制脑缺血后神经元凋亡的发生。亚低温的脑复苏作用可能与其抑制脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生有关。

【关键词】 亚低温; 脑缺血; 再灌注损伤; *bcl-2*; *bax*

【中图分类号】 R743.31 **【文献标识码】** A

0 引言

全身亚低温对脑缺血再灌注损伤的保护作用已在实验研究及临床治疗中得到肯定, 但其对缺血再灌注所致的神经元凋亡及相关基因是否有影响, 机制如何, 仍不清楚。我们就此问题作了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物选用雄性 SD 大鼠 117 只, 体重 (250 ± 20) g, 动物随机分为假手术组、缺血再灌注组、亚低温组分别与再灌注 6, 12, 24 和 48 h 及 3, 5 和 7 d 相对应的不同时间点共 21 组, 其中 6 h, 5 d 相对应组为 7 只, 其余每组 5 只。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及标本制备 采用改良的 4-VO 法^[1]。大鼠在 20 g/L 戊巴比妥钠 (40 mg/kg ip) 麻醉后, 将动物俯卧位固定于实验台上, 于颈后正中第一、

收稿日期 2004-10-04; 修回日期 2004-12-14

基金项目 国家自然科学基金 (39670699)

通讯作者 熊利泽. Tel. (029) 83375337 Email. lxiong@fmmu.edu.cn

作者简介 王 军 (1970-) 男 (汉族) 陕西省乾县人. 硕士, 主治医师.

Tel. (029) 82245812 Email. WJWWJYY@sina.com

二颈椎处切开皮肤,剥离显露双侧翼小孔。显微镜下将电凝插入翼孔约 0.5 mm 烧灼,使双侧椎动脉闭塞。24 h 后再用同法麻醉动物,将动物仰卧位固定于手术台,于双侧顶部及颞部头皮下插入针状电极,动态监测脑电变化。在颈前正中切开皮肤暴露双侧颈总动脉并游离,用微型动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成全脑缺血,以出现静息脑电波为准,否则弃之。20 min 后松开动脉夹,再灌注于预定时间点。假手术组不行椎动脉凝闭和颈总动脉夹闭,余过程同缺血再灌注组。亚低温治疗组连接 509 监护仪肛温探头持续监测肛温,于再灌注开始同时用冰袋全身降温法迅速将大鼠直肠温度降至 33℃ 左右,严密观察大鼠生命体征,维持 3 h 后,将大鼠置于恒温箱缓慢复温至 37℃,观察 1 h 后放回笼中饲养。

大鼠存活于预定时间点时,分别以 20 g/L 戊巴比妥钠麻醉,经主动脉灌注 40 mL/L 多聚甲醛(PB, pH 7.4)固定 1 h,断头取脑。于前囟处以美蓝标记,冠状切取前囟后 2~5 mm 组织块,置于上述灌注液内固定过夜,常规系列脱水,石蜡包埋,行系列冠状切片。每间隔 200 μm 收取 6 μm 切片一张,HE 染色,选取前囟后 3.8 mm 处之切片,光镜下观察。

1.2.2 免疫组织化学染色(SABC)法 按 SABC 试剂盒(武汉博士德生物试剂公司)程序进行。切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇至水。 H_2O_2 甲醇封闭 30 min,显微波处理液中微波处理 10 min,滴加一抗(用 PBS 及 10 mL/L 正常羊血清稀释),兔抗 *bcl-2* 为 1:100,兔抗 *bax* 为 1:100,湿盒内孵育 4℃ 24 h,加

PBS 液稀释二抗(1:100 羊抗兔抗体)孵育 37℃,60 min 加 PBS 稀释 1:100,后加 DAB 显色 2~5 min, PBS 浸洗后核复染或不复染,水洗、脱水、透明、PPX 封固,阳性对照为已知 *Bcl-2*, *Bax* 蛋白染色阳性标本切片,阴性对照为空白对照(PBS 取代一抗)。光镜下观察结果,用图像分析仪进行分析,统计每一组,每只动物随机选取相同平面 4 张切片,对海马 CA1 区 *Bax*, *Bcl-2* 免疫阳性细胞的灰度值进行测定,灰度值越大,表明阳性细胞越少,灰度值越小,表明阳性细胞越多。

统计学处理:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较组间差别,两两比较行 LSD-*t* 检验进行统计分析。

2 结果

光镜下观察海马 CA1 区 *bcl-2*, *bax* 基因表达阳性为细胞染成棕黄色颗粒状。*bcl-2* 在假手术组海马 CA1 区几乎没有染色阳性细胞。缺血再灌注 6 h 组开始有少量的阳性细胞出现,随再灌注时间延长,海马 CA1 区阳性细胞数逐渐增多,24 h 达峰值,与假手术组比较, $P < 0.01$ 随后又逐渐减少,再灌注 7 d 时仅有少数散在阳性细胞。亚低温 6 h 组开始表达较弱,从 12 h 开始表达逐渐增强,直至 3 d 时达高峰,与假手术组比较, $P < 0.01$ 随后阳性表达明显减弱,7 d 组时仅有少量的着色细胞出现。亚低温组与缺血再灌注组比较只有 3 d 组有显著性差异,其余各组无统计学意义($P > 0.05$, Tab 1)。

表 1 亚低温对大鼠全脑缺血再灌注不同时间海马 CA1 区 *bcl-2* 基因表达免疫阳性细胞灰度值

Tab 1 Effects of moderate hypothermia on the expression of *bcl-2* positive cell gray scale in rat hippocampal CA1 after global cerebral ischemia and reperfusion for different times ($\bar{x} \pm s$)

Group	6 h (n=7)	12 h (n=5)	24 h (n=5)	48 h (n=5)	3 d (n=5)	5 d (n=7)	7 d (n=5)
Control	242 ± 8	239 ± 7	240 ± 6	242 ± 5	241 ± 7	240 ± 6	240 ± 7
Ischemia and reperfusion	226 ± 7	188 ± 7 ^a	165 ± 10 ^b	187 ± 8 ^a	206 ± 6 ^a	218 ± 7	229 ± 7
Treatment with moderate hypothermia	212 ± 7	183 ± 8 ^a	174 ± 8 ^b	173 ± 7 ^b	163 ± 5 ^{bd}	204 ± 7 ^{ac}	218 ± 8

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs control; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs ischemia and reperfusion.

bax 基因在假手术组可见少量的阳性细胞出现。再灌注 6 h 组开始就有 *bax* 基因的表达,并随再灌注时间延长 *bax* 表达逐渐增强,5 d 时达高峰期,与假手术组比较, $P < 0.01$ 持续到 7 d 时仍有较高水平表达。亚低温各组 *bax* 基因呈低表达,与缺血再灌注组比较,5 d 和 7 d 组相差最明显($P < 0.01$),并且未见表达高峰期出现。与假手术组相比,各组相差不显著($P > 0.05$, Tab 2)。

3 讨论

同其他有核细胞一样,神经细胞凋亡的发生也是多个基因参与调控的结果^[2],也存在着抗凋亡基因与促凋亡基因的相互制衡,*bcl-2* 和 *bax* 的表达强度决定细胞命运,*bax* 占优势时促进细胞死亡,*bcl-2* 占优势是阻止细胞死亡^[3]。本实验结果提示 *bcl-2* 在缺血再灌注后 6 h 表达较弱,随后逐渐增强,24 h 表达最强,7 d 时明显减弱与 Hong 等^[4]实验结果一致。亚

表2 亚低温对大鼠全脑缺血再灌注不同时间海马 CA1 区 *bax* 基因表达免疫阳性细胞灰度值Tab 2 Effects of moderate hypothermia on the expression of *bax* positive cell gray scale in rat hippocampal CA1 after global cerebral ischemia and reperfusion for different times ($\bar{x} \pm s$)

Group	6 h (n=7)	12 h (n=5)	24 h (n=5)	48 h (n=5)	3 d (n=5)	5 d (n=7)	7 d (n=5)
Control	202 ± 6	199 ± 5	198 ± 5	196 ± 6	197 ± 6	199 ± 8	202 ± 5
Ischemia and reperfusion	190 ± 7	182 ± 6	179 ± 9 ^a	172 ± 10 ^a	167 ± 10 ^b	146 ± 9 ^b	163 ± 10 ^b
Treatment with moderate hypothermia	209 ± 9 ^c	206 ± 6 ^c	197 ± 9 ^c	192 ± 8 ^c	188 ± 6 ^c	193 ± 7 ^d	198 ± 8 ^d

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs control; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs ischemia and reperfusion.

低温组从 12 h 开始表达, 随后逐渐增强, 3 d 达高峰, 随后表达又明显减弱. 亚低温组延迟了 *bcl-2* 的表达高峰期. Plesnila 等^[5] 研究证明 *bcl-2* 家族与脑缺血时神经元和星形胶质细胞的死亡有紧密关系, 并应用干预因素可上调 *bcl-2* 的表达, 从而减小梗死面积. *bax* 在缺血再灌注后 6 h 开始就有较强的表达, 随时间延长 *bax* 基因表达逐渐增强, 5 d 时达高峰, 7 d 组仍有较高水平表达. 而亚低温各组 *bax* 基因均呈低表达, 并且未见表达高峰期出现. 结果显示亚低温对 *bcl-2* 基因表达影响较弱, 而对 *bax* 基因表达有明显的抑制作用, 证明亚低温可对缺血后细胞凋亡的基因调控产生影响, 主要通过抑制促凋亡基因如 *bax* 的表达, 从而对缺血后细胞凋亡发挥抑制作用.

脑缺血后细胞是否发生凋亡, 是抗凋亡基因与促凋亡基因相互制衡的结果. *bcl-2* 和 *bax* 便是这样一对基因, 两者表达比例是决定神经元凋亡抑制强弱的关键因素. 研究发现 *bax* 基因是 p53 的下游基因, 它单独不足以启动细胞凋亡途径, 多与 *bcl-2*, p53 共同参与并调节细胞凋亡, 其作用具有二重性, *bax* 不仅能和 *bcl-2* 形成二聚体 (*bcl-2-bax*) 抑制凋亡, 而且其自身还能形成二聚体 (*bax-bax*) 诱导凋亡^[6]. 本研究表明亚低温对 *bcl-2* 基因表达影响较弱, 而对 *bax* 的表达有抑制作用, 在脑缺血后 *bax* 基因表达减弱, *bcl-2* 基因蛋白浓度相对增高. *bcl-2* 与 *bax* 可结合成杂二聚体, 以抑制 *bax* 的促凋亡作用. 但 Yenari 等^[7] 认为低温并不能影响 *bcl-2* 表达, 其保护缺血脑组织的作用与抑制凋亡途径无关, 而与抑制细胞色素 C 的释放有关, Ferrer 等^[8] 也发现对照组 CA1 区 *bcl-2* 免疫活性较弱, 且主要位于濒临死亡的细胞, *bcl-2* 高表达并不足以阻止细胞死亡. 全身亚低温如何影响 *bax*

和 *bcl-2* 基因表达, 可能与亚低温引起 *bax* 基因转录率下降有关. 总之, 脑缺血后细胞凋亡是多个基因参与调控的结果, 亚低温对细胞凋亡的基因调控机制目前还不十分清楚, 有待进一步研究.

【参考文献】

- [1] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the Unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979; 10(3): 267-272.
- [2] Wyllie AH. Apoptosis: An overview [J]. *Br Med Bull*, 1997; 53: 451-465.
- [3] Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability [J]. *Cell Death Differ*, 2000; 7: 1182-1191.
- [4] Hong KW, Kim KY, Lee JH, et al. Neuroprotective effect of (2s, 3s, 4R)-N-cyano-N-(6-amino-3, 4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-2-dimethoxy methyl-2 H-benzopyran-4-yl)-N-benzylguanidine (K R-31378), a benzopyran analog, against focal ischemia brain damage in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 301: 210-216.
- [5] Plesnila N, Zinkel S, Amin-Hanjanis, et al. Function of BID-amolecule of the bcl-2 family in ischemic cell death in the brain [J]. *Eur Surg Res*, 2002; 34: 37-41.
- [6] Kaneda K, Kashii, Kurosawa T, et al. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina [J]. *Brain Res*, 1999; 815: 11-20.
- [7] Yenari MA, Iwayama S, Cheng D, et al. Mild hypothermia attenuates cytochrome C release but does not alter Bcl-2 expression or caspase activation after experimental stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002; 22(1): 29-38.
- [8] Ferrer J, Lopez E, Blanco R, et al. Bcl-2, Bax and Bcl-x expression in CA1 area of the hippocampus following transient forebrain ischemia in the adult gerbil [J]. *Exp Brain Res*, 1998; 121: 167-173.

编辑 袁天峰