

低氧预适应对脑缺血-再灌注大鼠神经元凋亡及 P53 蛋白表达的影响*

李东亮¹ 卢娜¹ 王宝英¹ 魏林郁¹ 杜爱林¹ 李新娟¹ 李成长¹ 程远¹

摘要 目的:探讨低氧预适应对局部缺血-再灌注大鼠脑的保护作用及其分子机制。方法:24只大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注(I/R)组、低氧预适应(HP+I/R)组。用线穿法建立大鼠局灶脑缺血-再灌注模型,脑缺血前12h将HP+I/R组大鼠放在8%低氧舱中完成低氧预适应。分别用免疫组化、原位末端标记法检测P53的表达和神经元凋亡,并进行神经体征观察。结果:缺血3h再灌注24h后HP+I/R组神经行为缺陷计分明显低于I/R组($P<0.05$);HP+I/R组凋亡细胞数明显少于I/R组($P<0.05$);HP+I/R组P53蛋白阳性细胞数明显低于I/R组($P<0.05$)。结论:低氧预适应可降低大鼠脑缺血再灌注后的神经功能缺陷和神经元凋亡。下调神经元中P53蛋白表达可能是低氧预适应脑保护作用的分子机制之一。

关键词 脑缺血-再灌注损伤;低氧预适应;凋亡;P53;神经功能缺陷

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-12-1075-03

The effect of hypoxic preconditioning on neuronal apoptosis and expression of P53 protein in rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury/LI Dongliang, LU Na, WANG Baoying, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(12):1075-1077

Abstract Objective: To explore molecular mechanism of cerebral protection by hypoxic preconditioning in rats model of focal ischemia-reperfusion. **Method:** Twenty-four SD rats were randomly divided into sham operation group, ischemia/reperfusion (I/R) group and hypoxic preconditioning (HP+I/R) group. The model of focal cerebral ischemia-reperfusion was made in rats by reversible inserting a nylon thread into the middle cerebral artery and hypoxic preconditioning was performed 12 hours before ischemia by placing rats in the hypoxic chamber of 8% oxygen. The neuronal apoptosis, expression of P53 and neurological deficit was respectively evaluated by the immunohistochemistry staining and TUNEL reaction and Zea-Longa method at different time (1h, 12h, 13h, 1h, 4h, 8h, 24h) after I/R. **Result:** 24h after reperfusion, the neurological score in the HP+I/R group was markedly lower than that in the I/R group ($P<0.05$); The number of apoptosis cells in HP+I/R group was obviously fewer than that in the I/R group ($P<0.05$); The positive cell numbers of P53 immunostaining was significantly decreased as compared with that in the I/R group ($P<0.05$). **Conclusion:** Hypoxic preconditioning could decrease the neurological deficit and the neuronal apoptosis of rats with ischemia-reperfusion. Down-regulating the expression of P53 protein of neurons would be the one of the molecular mechanism on cerebral protection of hypoxic preconditioning.

Author's address Dept. of Physiology and Neurobiology of Xinxiang Medical College, Xinxiang, 453003

Key words ischemia-reperfusion injury; hypoxic preconditioning; apoptosis; P53; neurological deficit

低氧预适应的脑保护作用已被实验证实,但具体的分子机制尚未阐明。本课题试图通过检测低氧预适应鼠脑组织凋亡及P53蛋白表达的变化,揭示低氧预适应的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 $250\pm 20\text{g}$, 由新乡医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: 2005-056。

1.2 主要试剂

P53 兔抗鼠多克隆抗体(1:160), Santa Cruz 公司

产品;通用型二步法免疫组化检测试剂盒(PV-6001 Pic Ture TM)、DAB 显色系统和 Proteinase K, 购自北京中杉试剂公司;原位细胞死亡检测试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit, POD), 德国宝灵曼公司产品。

1.3 分组

SD 大鼠 24 只, 不分雌雄, 随机分成 3 组。假手

* 基金项目:河南省科技攻关项目(991170318);河南省教育厅自然科学基础研究项目(200510472004)

1 新乡医学院生理学与神经生物学教研室, 新乡, 453003

作者简介:李东亮,男,教授,硕士生导师

收稿日期:2006-04-26

术(Sham)组: 仅切开颈部皮肤, 暴露一侧颈总动脉; 缺血再灌注(I/R)组: 缺血(I)3h后再灌注(R)24h, 不作低氧预处理; 低氧预处理(HP+I/R)组: 低氧预处理(HP)3h, 恢复12h后, 同I/R组方法进行脑缺血再灌注。

1.4 动物模型制作及取材

低氧预适应动物按 Vannucci 等^[1]的方法制作。大鼠置于恒温 37℃ 的密闭低氧舱(1500ml)内, 低氧舱有两个通气孔, 一端为进气, 一端为出气, 用湿化的 8%O₂ 与 92%N₂ 混合气体以 300ml/min 的流量灌入。大鼠放入低氧舱内 3h, 制备低氧预适应动物模型, 此时大鼠呼吸加快, 活动减少。当从低氧舱中取出后, 动物很快恢复常态。低氧预适应 12h 后再行脑缺血-再灌注制作。

线栓法制备脑缺血-再灌注动物模型^[2], 剔除提尾悬空试验阴性动物。缺血和再灌注后不同时间点(I1h、I2h、I3h、R1h、R4h、R8h、R24h) 观察大鼠神经体征, 参照 Longa 神经功能评分标准进行评分^[3]。0分: 正常; 1分: 不能完全伸展前肢; 2分: 行走时转圈; 3分: 行走时跌倒; 4分: 不能行走及意识减弱。

动物于缺血 3h 再灌注 24h 后用乙醚麻醉, 4℃、4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液经心脏灌注固定, 断头取

脑, 鼠脑置于特制大鼠脑分割槽内, 自额极至枕极均等分成 A、B、C、D、E 片, 将 C 片固定过夜, 系列酒精脱水、透明、软蜡包埋。

1.5 细胞凋亡及 P53 蛋白免疫组织化学检测

石蜡包埋的 C 片组织, 连续冠状切片(片厚 4—6μm)3 张, 分别进行 HE 染色、细胞凋亡检测和 P53 免疫组织化学染色, 皆按照试剂盒说明书进行。每张切片均随机观察缺血侧 10 个高倍(40×10)非重叠视野(即: 额顶叶皮质区、海马区、丘脑核团、纹状体苍白球区、纹状体尾壳核区, 各 2 个视野), 计数视野内免疫组织化学或 TUNEL 染色的阳性细胞。

1.6 统计学分析

用 SPSS 软件包进行数据处理。神经功能缺陷分的组间比较用 *t* 检验; 免疫组织化学及凋亡染色阳性细胞数的组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 不同时间点神经功能缺陷计分比较

I/R 组和 HP+I/R 组神经功能缺陷计分随时间推移而逐渐降低(表 1), 再灌注 8h 和 24h, HP+I/R 组神经功能缺陷计分明显低于 I/R 组(*P*<0.05)。

2.2 脑大体标本观察

表 1 三组动物不同时间点神经功能缺陷计分的比较 (x̄±s)

组别	动物数	I 1h	I 2h	I 3h	R 1h	R 4h	R 8h	R 24h
对照组	8	0	0	0	0	0	0	0
缺血再灌注组	8	3.0±0.5	2.4±0.5	2.0±0.5	1.8±0.5	1.5±0.5	1.0±0.8	1.1±0.6
低氧预处理组	8	2.8±0.7	2.1±0.6	1.8±0.5	1.6±0.5	1.4±0.5	0.6±0.7 ^①	0.4±0.5 ^①

①与缺血再灌注组比较 *P*<0.05

在大鼠脑大体标本, 缺血侧大脑中动脉供应区组织苍白、小血管床明显缺失(图 1, 见前置彩色插页 8)。冠状切面上可见缺血侧脑水肿增大、组织苍白。肉眼观察 HP+I/R 组的损伤范围较 I/R 组局限。

2.3 HE 染色观察

Sham 组大鼠脑组织未见异常。I/R 组和 HP+I/R 组缺血区中心神经组织结构破坏, 神经元、神经胶质细胞和血管内皮细胞大部坏死, 细胞数量明显减少, 细胞间隙明显增宽(图 2—3, 见前置彩色插页 8)。缺血“半暗带区”神经元肿胀、着色淡, 形态变为角形或扇形, 神经元周神经纤维呈空泡状或海绵状, 神经胶质细胞肿胀。在缺血区可发现红色神经细胞和鬼影细胞。缺血损伤程度以纹状体、视前区为最重, 其次是皮质、海马区。HP+I/R 组损伤程度轻于 I/R 组。

2.4 免疫组织化学和 TUNEL 染色观察

见表 2。Sham 组大鼠大脑组织极少 P53 蛋白表达, I/R 组在缺血侧大脑皮质、基底核及海马发现

表 2 各组动物每个视野 P53 阳性神经元和凋亡神经元数目的比较 (x̄±s, n=6)

组别	凋亡神经元数/视野	P53 阳性神经元数/视野
对照组	0.5±0.7	1.87±0.46
缺血再灌注组	39.4±2.4 ^②	26.25±3.54 ^②
低氧预处理组	23.1±4.4 ^{①②}	10.38±1.69 ^{①②}

①与缺血再灌注组比较 *P*<0.05; ②与对照组比较 *P*<0.05

P53 蛋白染色阳性细胞, 其位置多位于缺血边缘区。免疫阳性细胞核呈黄褐色, 高倍镜下 P53 表达强的细胞受损严重, 形态变化明显, 但结构尚完整。HP+I/R 组皮质无明显 P53 蛋白表达, 在基底核有少量 P53 阳性细胞, 着色较浅, 阳性细胞数显著少于 I/R 组(*P*<0.05), 见图 4—5(见前置彩色插页 8)。

Sham 组较少检测到凋亡细胞。I/R 组缺血侧大脑皮质、基底核可见大量凋亡细胞, 缺血中心区散在, 缺血区边缘内侧成簇。阳性细胞呈核固缩深染的棕色颗粒, 胞质浓缩, 轮廓清晰, 不显示正常的胞浆结构, 细胞体积小, 且可见少量大小不等的深染黄褐色圆形凋亡小体。HP+I/R 组缺血侧半球亦可检测到

凋亡细胞, 凋亡细胞形态与 I/R 组相似, 但数量少于 I/R 组 ($P < 0.05$), 见图 6—7 (见前置彩色插页 8)。

3 讨论

大量研究表明, 缺血性脑损伤引起的细胞死亡可能通过凋亡和坏死两条途径^[4]。神经元的死亡在缺血灶中心区域以坏死为主, 而在“半暗带区”以凋亡为主。脑缺血后有相当部分的血管能自然再通或经溶栓治疗后恢复再通, 但随之而来的是出现再灌注损伤。目前, 再灌注损伤受到人们广泛关注, “半暗带区”的脑保护治疗也是治疗再灌注损伤的重点。许多研究发现再灌注损伤与细胞凋亡有密切的联系^[5-9], 尤其是迟发性神经元死亡, 凋亡是脑缺血/再灌注后神经元死亡的重要方式^[7]。脑缺血/再灌注后神经元凋亡的发生与缺血的类型、严重程度、再灌注时间的长短有关。许多研究证实神经元在经历了短暂轻度缺血后会发生细胞凋亡, 发生的区域是缺血敏感区 (如纹状体、海马 CA1 区等), 并且是这些区域迟发性神经元死亡的主要方式^[8]。大鼠局灶性脑缺血后, 在缺血“半暗带”(penumbra)和缺血中心区检测到“DNA 梯”, 同样在这些区域检测到 TUNEL 阳性细胞。缺血再灌注后 0.5h 可出现凋亡细胞, 24—48h 达高峰, 最长可持续到 28d。凋亡细胞的数量随缺血时间的延长而增多, 凋亡细胞出现在“半暗带区”, 免疫组化方法证实凋亡细胞大部分为神经细胞 (90%—95%), 细胞凋亡时有多种基因转录和蛋白质合成的增加。

低氧预适应是指 1 次或多次短暂的轻度缺氧后, 可触发机体内源性的保护机制, 对随后发生的严重缺血缺氧产生耐受性。低氧预适应可诱导机体产生多种保护性因子, 如: 低氧诱导因子-1 (hypoxic inducible factor-1, HIF-1)^[9]、促红细胞生成素 (Erythropoietin, Epo)^[10]、神经生长因子诱导 A 基因 (nerve growth factor induced-A gene, NGFI-A)、血管内皮细胞生长因子等^[11], 这些细胞因子能通过不同途径提高神经细胞的耐缺氧能力。另外, 低氧可诱发内源性 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶抑制剂释放, 从而降低脑内能量代谢, ATP 敏感性钾通道 ($\text{K}^+ - \text{ATP}$) 开放, 减少兴奋性氨基酸释放^[12], 从而起到脑保护作用。然而, 低氧预适应是否能通过细胞凋亡途径起到减轻缺血再灌注脑损伤的作用及其内在机制如何尚不十分清楚。

目前公认 P53 基因是最常见的促凋亡基因, 通过激活一系列下游靶基因而发挥促凋亡作用。P53 基因及其蛋白在局灶性脑缺血后神经元凋亡中起重要作用^[13]。正常脑组织 P53 蛋白含量极低, 用普通的免疫组化方法几乎测不出。有研究报道, 大鼠

MCAO 2h 再灌注 1h, 可见 P53 mRNA 及其蛋白的表达和凋亡细胞, 表达高峰在缺血再灌注后 24h, 细胞凋亡数高峰在再灌注 24—48h, P53 mRNA 及其蛋白表达的时间与细胞凋亡的时序一致^[14]。

本实验发现假手术组和非缺血区可见 P53 蛋白的微弱表达, 推测是由于手术创伤刺激引起。I/R 组缺血侧额顶叶皮质、纹状体和海马均有 P53 表达, 但相应部位 P53 阳性细胞数均高于 HP+I/R 组, 提示 P53 是参与脑缺血再灌注损伤的一个重要因素; 低氧预适应可能通过抑制局灶缺血后半暗区 P53 激活, 从而抑制神经元凋亡、发挥脑保护作用。

本实验还发现 Sham 组脑组织偶见凋亡细胞, 而 I/R 和 HP+I/R 组均可见明显神经细胞凋亡, 这与以往结果一致^[12]。HP+I/R 组细胞凋亡数目明显少于 I/R 组, 表明低氧预适应可有效减少脑缺血再灌注后细胞凋亡的发生, 减轻脑损伤^[15]。

另外, 分析各组神经功能缺陷计分的观察结果, 可以看出各组动物神经功能缺陷计分随时间推移而逐渐降低, 说明缺血再灌注损伤动物随时间推移在自行恢复, HP+I/R 组恢复速度较 I/R 组快, 表明低氧预适应可促进大鼠 MCAO 后神经功能缺陷的恢复。

4 结论

低氧预适应可降低大鼠脑缺血再灌注后的神经功能缺陷和神经元凋亡。下调 (或抑制) 促凋亡基因 P53 蛋白表达可能是低氧预适应脑保护作用的分子机制之一。脑缺血/再灌注后细胞凋亡的发生是一个多因素、多环节、多途径的复杂过程, 各种可能机制在神经元凋亡中所占的比重及相互关系有待进一步研究。

参考文献

- [1] Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates [J]. *J Neurochem*, 1998, 71: 1215.
- [2] 卢娜, 李超, 李东亮. 黄体酮防治大鼠缺血再灌注脑损伤中细胞凋亡及 P53 蛋白的变化 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 9: 1041—1045.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84—91.
- [4] Hill HE. DNA flag mutation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia ischemia in the neonatal rat [J]. *Brain Res*, 1995, 676: 398—403.
- [5] Xia CF, Yin H, Yao YY, et al. Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis [J]. *Hum Gene Ther*,