

论著 ·

脑缺氧缺血后热休克蛋白基因的表达 及地塞米松对其的调节

周伟,吴圣楣,陈惠金

[摘要] 目的 探讨热休克蛋白-70(HSP70)基因在缺氧缺血新生大鼠脑内的表达及地塞米松(DEX)对其影响。方法 通过建立新生大鼠缺氧缺血性脑病动物模型,应用快速竞争性RT-PCR技术,分别对缺氧缺血(HI),DEX预处理后予缺氧缺血(DH),缺氧结束后即刻予DEX(HD),DEX加假手术(DS),正常对照(NS)五组动物的实验侧大脑组织中HSP70 mRNA的表达进行半定量分析。结果 缺氧缺血后新生大鼠脑内HSP70 mRNA的表达明显增强,其表达高峰(3.868 ± 1.421)位于HI后12 h左右,并在12~48 h内维持较高水平(3.186 ± 0.803 , 2.568 ± 0.709)。DEX预处理可使HSP70 mRNA的表达明显下降或几乎完全被抑制,其12 h,24 h,48 h分别为 0.526 ± 0.593 , 0.492 ± 0.450 , 0.434 ± 0.428 。HI后给予DEX对HSP70 mRNA的表达则无明显影响。其12 h,24 h,48 h分别为 3.460 ± 1.309 , 3.020 ± 0.565 , 2.242 ± 0.504 。结论 DEX预处理可抑制HI对HSP70 mRNA过表达的诱导。推测DEX预处理后使HSP70 mRNA的表达下降,可能与DEX抑制了神经元的过度兴奋有关。

[关键词] 脑;缺氧缺血;地塞米松;HSP70;新生大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)02-0086-05

Regulatory Effects of Dexamethasone on the Expression of HSP 70 mRNA in Neonatal Rats Following Cerebral Hypoxia-ischemia

ZHOU Wei, WU Sheng-Mei, CHEN Hui-Jin

Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of HSP70 gene in the brain of neonatal rats following cerebral hypoxia-ischemia (HI) and the effect of dexamethasone (DEX) on the expression of HSP70 mRNA. **Methods** Rapid competitive reverse transcriptase-PCR was used to semi-quantitatively analyze the expression of HSP70 mRNA in the ipsilateral cerebral hemisphere in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia. Groups were divided into those pre-treated with DEX prior to hypoxia-ischemia, those treated with DEX immediately following hypoxia-ischemia, those pre-treated with DEX prior to sham, and normal controls, respectively. **Results** Cerebral HI increased HSP70 mRNA expression. The peak time of overexpression was 12 h after HI (3.868 ± 1.421), and maintained at a higher level during 12~48 h (3.186 ± 0.803 , 2.568 ± 0.709). The intensity of HSP70 mRNA expression was greatly decreased or almost abolished completely by the pretreatment with DEX. At 12 h, 24 h and 48 h after this treatment, HSP 70 mRNA expression were 0.526 ± 0.593 , 0.492 ± 0.450 and 0.434 ± 0.428 , respectively, while the treatment with DEX after the insults had no evident effect on the expression of HSP70 mRNA. At 12 h, 24 h and 48 h, HSP 70 mRNA expression were 3.460 ± 1.309 , 3.020 ± 0.565 and 2.242 ± 0.504 , respectively. **Conclusions** DEX prophylaxis could suppress the overexpression of HSP70 mRNA following cerebral HI. Inhibition of HSP70 mRNA expression by DEX prophylaxis could be related to the suppression of overexcitation of neurons.

[Key words] Cerebra; Hypoxia ischemia; Dexamethasone; HSP70; Neonatal rat

应激蛋白(stress protein)被认为是反映细胞损伤的一个早期的灵敏指标。热休克蛋白(heat shock

[作者简介] 周伟,男,1965年出生,医学博士,主治医师。

[作者单位] 200092 广州第一军医大学珠江医院儿科(周伟); 200092 上海市儿科医学研究所围产医学研究室(吴圣楣,陈惠金)

protein, HSP) 是一组应激蛋白,多种原因所造成的神经元过度兴奋均能诱导其在脑内表达,但其功能尚不十分清楚^[1~3]。本研究应用快速竞争性 RT-PCR 技术检测了缺氧缺血后新生大鼠脑内 HSP70 mRNA 的表达,并观察了地塞米松(DEX)对其表达的影响,以期阐明 HSP70 在缺氧缺血损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 新生大鼠缺氧缺血模型的制作

参照 Rice 方法^[4],生后 7 d 的 SD 大鼠(购自中科院上海实验动物中心),取仰卧位,四肢固定于手术板上,颈正中切口,游离右侧颈总动脉,用丝线结扎,缝合切口后置于 2 000 ml 密闭容器,该容器置于 37 °C 水浴中。以 1~2 L/min 的速度输入含 8 %氧气和 92 %氮气的混合气体,持续 2.5 h。

1.2 实验动物分组

将 200 只新生大鼠随机分为 5 组,每组 40 只。

5 组分别为缺氧缺血组(HI);预给药组(DH,即腹腔注射 DEX 后 12 h 予缺氧缺血处理);后给药组(HD,即缺氧结束后即刻予腹腔注射 DEX);假手术给药组(DS,即仅作颈正中切口,游离右侧颈总动脉,但不结扎。假手术前注射 DEX);正常对照组(NS)。分别于缺氧结束后不同时间点(DS 组及 NS 组于相对应的时间点)0,2,6,12,24,48,72 h 及 7 d 断颈处死(每个时间点 5 只)。自丘脑中 1/3 水平取缺氧缺血侧(右侧)大脑半球组织约 50 mg 冻存于 -80 °C 冰箱备用。DEX 剂量为 0.5 mg/kg,注射时浓度为 0.05 mg/ml,相当于每 10 g 体重 0.1 ml,对照组相应注射 0.9 %氯化钠注射液。

1.3 引物的设计与合成

从基因文库中查到大白鼠 HSP70 基因 cDNA 序列,应用 Oligo 5.0 软件程序设计有意义、反意义引物,另设计一个反意义竞争引物(包含反意义引物另加 19 个碱基序列),其扩增片段比目的片段短 81 bp(见表 1)。引物由美国 CyberSyn 生物工程公司合成。

表 1 引物序列及其在 HSP70 基因组中的位置
Table 1. Sequences of primers and their location in HSP70 genomes

引物名称	核酸序列	位置	产物大小
HSP mRNA	Sense (a) 5'-TGCCCGCCTACTTCAACGA-3'	614-632	461bp
	Antisense (b) 5'-CCGCGTGATGGACGTGTAG-3'	1074-1056	
HSP competitor	Sense (a) 5'-TGCCCGCCTACTTCAACGA-3'	614-632	380bp
	Antisense (c) 5'-CCGCGTGATGGACGTGTAG	1074-1056 +	
	CTCTTGGCCCTCTCGCAG-3'	974-956	

1.4 特定竞争性内参照的制备

特定竞争性内参照(internal standard, IS)的制备参照文献^[5]。利用 HI 后 2 h 的大鼠脑组织标本提取 RNA,逆转录成 cDNA;然后用引物 a,c 进行 PCR 扩增(逆转录-PCR 方法见下文),2 %琼脂糖凝胶电泳,胶回收(采用上海华舜生物工程公司生产的柱离心式胶回收试剂盒);再利用引物 a,b 对稀释后的回收产物进行第 2 次 PCR 扩增,以提高纯度、增加得率。电泳、回收后定量。制备 IS 后用不同稀释度的 IS(16,8,4,2,1,0.5,0.25 fg)与一定量的目的 cDNA 竞争,以选择 IS 的最佳竞争浓度。

1.5 快速竞争性 RT-PCR

采用柱离心式组织/细胞 RNA 抽提试剂盒提取 RNA,PE Lamda 10 紫外/可见分光光度计定量及电泳确定 RNA 质量。取 2 μg 总 RNA 按逆转录试剂盒(Bioneer, Korea)说明进行逆转录,然后在 Gene Amp PCR System 2400 上行 PCR。总反应体系为

50 μl,其中包括:10 ×PCR 缓冲液(内含 15 mmol/L MgCl₂) 5 μl,4 ×10 nM dNTP 2 μl,12.5 pmol 的引物 a,b 各 2 μl,Taq DNA 聚合酶 2 μl(1 u/μl),目的 cDNA 4 μl(0.4 μg),IS 1 μl(2 fg),灭菌去离子水 32 μl。覆盖一滴轻质石蜡油后离心,94 °C 预变性 5 min,继之以 94 °C 变性 45 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后一个循环后 72 °C 再延伸 7 min,4 °C 保存。取 6 μl PCR 产物 2 %琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 溴乙锭)电泳,紫外灯下拍照。用凝胶成像仪观察结果。测定 PCR 产物 HSP cDNA 与 IS 的荧光密度比作为 HSP70 基因的相对表达强度。每样本测量 2 次,取均值。

1.6 统计学方法

数据以均数 ±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。结果分析采用 Kruskal-Wallis 秩和检验在微机上利用 Statistica 5.0(Statsoft Inc., Tulsa, OK, U.S.A.)软件进行。

2 结果

2.1 RNA 抽提、cDNA 逆转录及 PCR 扩增的效率

用柱离心式组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒提取的总 RNA 的 A260 nm/A280 nm 为 1.9~2.0, 变性电泳 28S 与 18S 之比约为 2:1, 说明 RNA 未发生明显的降解。各样本相同量 cDNA 用 β -actin 引物进行 PCR 扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳显示各样本 β -actin mRNA 水平相近(电泳条带荧光密度相近), 表明样本间反转录效率基本一致。对缺氧缺血后 2h 的大鼠脑组织提取得到的总 RNA 进行逆转录并经 PCR 扩增, 分别在 461 bp (HSP70) 及 380 bp (HSP70 competitor) 处出现一条背景清晰的条带, mRNA 表达无基因组 DNA 干扰。在 25~32 个 PCR 循环内, PCR 产物与循环圈数呈平行扩增, 且目的基因与内参照的比率基本保持恒定。比较组织中特异 mRNA 的相对含量应在其指数扩增区内进行。

2.2 特定竞争性内标量的确定

选择目的条带与竞争条带均较明显的电泳泳道含量(第 4 泳道, 2 fg), 即为较合适的竞争水平(图 1)。

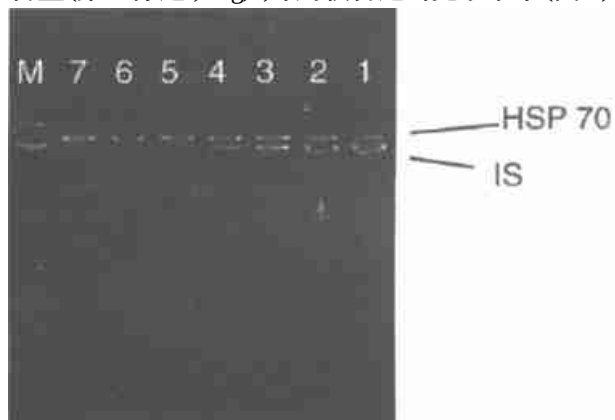


图 1 HSP70 竞争内标量的确定

自右向左泳道内标 (IS) 的量分别为 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 fg, 目的 cDNA 为 0.4 μ g。HSP, 大鼠 HSP PCR 产物条带 (461 bp); IS, 内标 (380 bp)。取第 4 泳道对应的 IS 量 (2 fg) 作为竞争内标量

Fig 1. Quantitative determination of competitive internal standard of HSP70

2.3 缺氧缺血后新生大鼠脑内 HSP70 mRNA 的表达

NS 组及 DS 组新生大鼠, HSP70 mRNA 的表达低于可检测水平。缺氧结束后即刻, 可见 HSP70 mRNA 的表达明显增强, 脑 HI 后 12 h 达高峰, 并在 12~48 h 之间维持较高的表达水平, 此后其表达量开

始下降, 至 7 d 时已回落至低于可检测水平(图 2)。

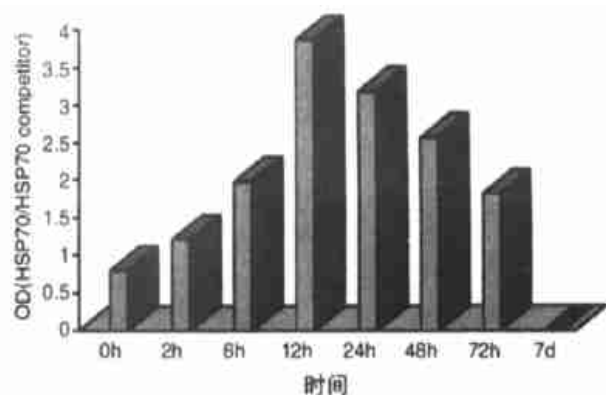


图 2 缺氧缺血后新生大鼠脑内 HSP70 mRNA 表达的时间变化

Fig 2. Time course of HSP70 mRNA expression at the ipsilateral cerebral hemisphere in neonatal rats following hypoxia-ischemia

2.4 地塞米松对 HSP70 mRNA 表达的调节作用

NS 组及 DS 组新生大鼠脑内 HSP70 mRNA 的表达均低于可检测水平。与 HI 组或 HD 组比较, DH 组在 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 h 等观察时间点 HSP70 mRNA 的表达均呈明显下降或几乎完全被抑制 ($P < 0.01$); HD 组 HSP70 mRNA 的表达亦受到部分抑制, 但与 HI 组比较其差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。在 7 d 时各组 HSP70 mRNA 的表达均已低于可检测水平。不同处理组各观察时间点 HSP70 mRNA 的表达情况见表 2 及图 3, 4。

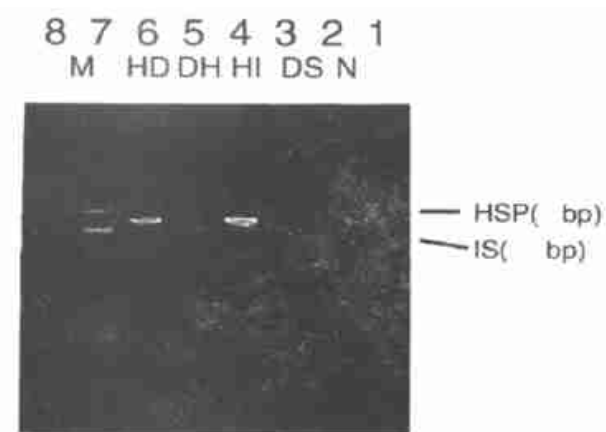


图 3 脑缺氧缺血后 12h 时不同处理组 HSP70 mRNA 的快速竞争性 RT-PCR 扩增产物电泳图

泳道: 1. 空白对照, 2. NS 组, 3. DS 组, 4. HI 组, 5. DH 组, 6. HD 组, 7. 分子量标志 pGEM-7Zf/Hae III markers, 8. 阴性对照

Fig 3. Agarose gel electrophoresis of rapid competitive RT-PCR products of cerebral HSP70 mRNA at 12 h following hypoxia-ischemia

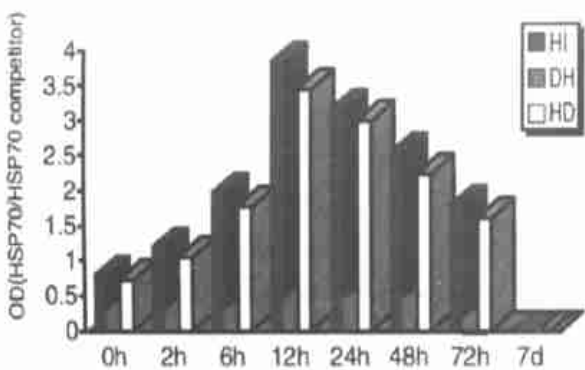


图 4 不同处理组各观察时间点 HSP70 mRNA 的相对表达量
Fig 4 Time course of HSP70 mRNA expression in the ipsilateral brain in different groups

3 讨论

HSP 是一类在进化上高度保守,因高温、病原体或理化等有害因素的刺激所诱导产生的一组应激蛋白,广泛存在于原核及真核细胞内。HSP 按其分子量的大小主要分为 HSP90,HSP70,HSP60 及小分子 HSP 四个家族。有关神经元兴奋性损伤的研究大多集中在 HSP70 家族。据报道 HSP70 的主要功能是维持细胞蛋白自稳,提高细胞对应激原的耐受性,使细胞维持正常的生理功能^[6]。HSP 功能的抑制会导致对代谢应激的高度敏感性,在心肌细胞过度表达 HSP70 的转基因小鼠对心肌缺血更具耐受性^[7]。然而,尚无直接证据表明 HSP70 能保护脑缺血。Lowenstein 等^[8]发现,HSP70 表达多出现在易因过度兴奋而产生损伤的神经元内,因此认为 HSP70 表达是神经元过度兴奋导致受损的一个有用的早期指标。

表 2 不同处理对新生大鼠脑内 HSP70 mRNA 的相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effect of different treatment on cerebral HSP70 mRNA expression in neonatal rats ($\bar{x} \pm s$)

分组	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d
NS	0	0	0	0	0	0	0	0
DS	0	0	0	0	0	0	0	0
HI	0.790 $\pm$ 0.198	1.206 $\pm$ 0.375	1.978 $\pm$ 0.306	3.868 $\pm$ 1.421	3.186 $\pm$ 0.803	2.568 $\pm$ 0.709	1.808 $\pm$ 0.414	0
DH	0.084 $\pm$ 0.123 ¹⁾	0.172 $\pm$ 0.205 ¹⁾	0.194 $\pm$ 0.203 ¹⁾	0.526 $\pm$ 0.593 ¹⁾	0.492 $\pm$ 0.450 ¹⁾	0.434 $\pm$ 0.428 ¹⁾	0.174 $\pm$ 0.206 ¹⁾	0
HD	0.722 $\pm$ 0.208	1.040 $\pm$ 0.319	1.792 $\pm$ 0.326	3.460 $\pm$ 1.309	3.020 $\pm$ 0.565	2.242 $\pm$ 0.504	1.624 $\pm$ 0.400	0

注:1)与缺氧缺血组及后给药组比较, $P < 0.01$

许多刺激,包括热休克、肿瘤、缺氧和缺血等均能在中枢神经系统内诱导 HSP70 基因表达的增加^[9]。本研究也表明缺氧缺血(HI)损伤可诱导新生大鼠脑 HSP70 mRNA 的表达。HSP70 mRNA 为细胞应激的一种标志。DEX 预处理导致 HSP70 mRNA 表达发生了显著改变,与缺氧缺血组或后给药组比较,这种表达明显下降或几乎完全被抑制。从而提示,DEX 预处理可能对新生大鼠脑 HI 后 HSP70 基因的表达起着重要作用。

有证据表明,DEX 预处理能显著减轻新生动物缺氧缺血侧半球脑组织的损伤^[10],但这种作用的机制尚不十分明确。电生理研究显示糖皮质激素可抑制中枢神经系统神经元活性;Liu^[11]等也观察到,经 DEX 预处理的新生大鼠缺氧缺血后,其缺血侧运动皮质神经元成熟及髓鞘形成均延迟,但不久可恢复

至正常水平,因而认为 DEX 对缺氧缺血新生大鼠的保护作用乃是由于暂时抑制神经元的成熟所致。上述 DEX 对 HSP70 mRNA 表达的调节作用似也证实了这一点。鉴于 HSP70 mRNA 的表达是神经元过度兴奋导致损伤的一个早期标志,DEX 预处理抑制了 HSP70 mRNA 的表达,提示神经元的过度兴奋被抑制,从而使神经元受到保护,免遭 HI 损伤。而缺氧缺血后给予 DEX,由于一些细胞因子如 IL-1 β 、TNF α 等的迅速产生可抑制 DEX 的效应,因而 DEX 对缺氧缺血诱导的 HSP70 mRNA 过表达无显著影响。我们另外的研究还显示,DEX 预处理可显著减少新生大鼠脑缺氧缺血后细胞凋亡的数目,而脑缺氧缺血后应用 DEX 对凋亡的发生则无明显影响。DEX 只有在先于脑缺氧缺血之前给予才能起到防止脑损伤的作用,这在临床应用中显然不大切

合实际,因为是否发生缺氧缺血很难事先预料。但对于高危妊娠在分娩前怀疑有可能造成胎儿宫内窘迫或产时窒息时,对孕母在产前预防应用 DEX,可能有利于减轻新生儿脑缺氧缺血损伤,尽管上述措施的可行性还有待进一步探讨。

本研究还表明,NS 组新生大鼠的 HSP70 mRNA 表达通常低于可检测水平。这与其他一些学者的报道相吻合,即在未受应激刺激的动物脑中,其 HSP70 mRNA 的表达相接近或低于可检测水平^[12,13]。全脑缺血后,在所有主要的海马神经元群以及皮质、纹状体和丘脑的某些神经元均有 HSP70 mRNA 的表达,而其编码的蛋白质通常在对缺氧缺血耐受的神经元中出现^[14,15]。轻度全脑缺血其存活的 CA1 神经元内有 HSP70 蛋白的合成,但重度缺血可导致 CA1 神经元死亡时,在这些神经元内也可检测到 HSP70 的免疫反应性^[16,17]。与全脑缺血 CA1 神经元 HSP70 的表达类似,在局部脑缺血有死亡危险的神经元中,其 HSP70 的表达可能反映了细胞对缺血性损伤的易感性,HSP70 的产生试图保护这些受损伤的细胞,但是这些细胞仍避免不了死亡的命运,在随后几天内,全脑缺血的 CA1 神经元及皮质半影区的神经元都将出现迟发性死亡^[18]。因此,HSP70 的表达是一个可逆性神经元损害的标志还是起着神经元的保护作用,尚需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, et al. Heat shock proteins as markers of neuronal injury[J]. *Mol Brain Res*, 1989, 6(1): 93~100.
- [2] Gonzalez MF, Lowenstein D, Hisanaga K, et al. Induction of heat shock protein 72-like immunoreactivity in the hippocampal formation following transient global ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 1991, 26(2): 241~250.
- [3] Nowak TS. Synthesis of heat shock/ stress proteins during cellular injury. In Johannessen JN(Ed.). *Markers of Neuronal Injury and Degeneration*[M]. Vol 679, Ann NY Acad Sci, Raven Press, New York: 1993, 142~156.
- [4] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131~141.
- [5] Jiang YH, Davidson LA, Lupton JR, et al. Rapid competitive PCR determination of relative gene expression in limiting tissue samples[J]. *Clin Chem*, 1996, 42(2): 227~233.
- [6] Schlesinger MJ. Heat shock proteins[J]. *J Biol Chem*. 1990, 265(21): 12111~12114.
- [7] Marber MS, Mestrlil R, Chi S-H, et al. Overexpression of the rat inducible 70-kDa heat stress protein in transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(4): 1446~1456.
- [8] Lowenstein DH, Simon RY, Sharp FR. The pattern of 72-kDa heat stress protein-like immunoreactivity in the rat following flurothyl-induced status epilepticus[J]. *Brain Res*, 1990, 531(1-2): 173~182.
- [9] Murphy SJ, Song D, Welsh FA, et al. The effect of hypoxia and catecholamines on regional expression of heat-shock protein-72 mRNA in neonatal piglet brain[J]. *Brain Res*, 1996, 727(1-2): 145-152.
- [10] Ekert P, MacLusky N, Luo X-P, et al. Dexamethasone prevents apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) by a reactive oxygen species-independent mechanism[J]. *Brain Res*, 1997, 747(1): 9~17.
- [11] 周伟,吴圣楣. 地塞米松与围产期缺氧缺血性脑损伤[J]. *国外医学妇幼保健分册*, 1997, 8(4): 166~168.
- [12] Nowak TS Jr, Bond U, Schlesinger MJ. Heat shock mRNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia[J]. *J Neurochem*, 1990, 54(2): 451~458.
- [13] Welsh FA, Moyer DJ, Harris VA. Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992, 12(2): 204~212.
- [14] Murphy SJ, Song D, Welsh FA, et al. The effect of hypoxia and catecholamines on regional expression of heat-shock protein-72 mRNA in neonatal piglet brain[J]. *Brain Res* 1996. 727(1-2): 145~152.
- [15] Wu C, Clos J, Giorgi G, et al. Structure and regulation of heat shock transcription factor. In Morimoto RI, Tissier A and Georgopoulos C(Eds). *The Biology of Heat Shock Protein and Molecular Chaperones*[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 395~416.
- [16] Aoki M, Abe K, Kawagoe J, et al. Acceleration of HSP70 and HSC70 heat shock gene expression following transient ischemia in the preconditioned gerbil hippocampus[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13(5): 781~788.
- [17] Chopp M, Li Y, Dereski MO et al. Neuronal injury and expression of 72-kDa heat-shock protein after forebrain ischemia in the rat[J]. *Amta Neuropathol Berl*, 1991, 83(1): 66~71.
- [18] Koistinaho J and Hokfelt T. Altered gene expression in brain ischemia[J]. *Neuro Report*, 1997, 8(2): i - viii.

(收稿日期:1999 - 11 - 15 修回日期:2000 - 01 - 20)

(本文编辑:黄志强)