

缺氧缺血性脑损伤新生大鼠松果体 钟基因表达的变化

李永富¹ 金美芳² 孙斌¹ 冯星^{1,3}

(1. 苏州大学附属儿童医院新生儿科,江苏 苏州 215003; 2. 苏州大学儿科医学研究所,江苏 苏州 215003;
3. 苏州市儿童发育脑损伤防治研究实验室,江苏 苏州 215003)

[摘要] **目的** 观察缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生大鼠松果体中CLOCK、BMAL1蛋白表达的变化,探讨钟基因表达异常在HIBD导致的昼夜节律紊乱中的作用。**方法** 72只7日龄新生Sprague-Dawley大鼠随机分为假手术组与HIBD模型组,每组36只。采用改良Levine法建立HIBD模型,用Western blot方法测定两组新生大鼠术后0、2、12、24、36、48 h松果体中CLOCK、BMAL1蛋白水平。**结果** HIBD模型组松果体的CLOCK及BMAL1蛋白表达水平在HIBD后48 h高于假手术组($P<0.05$),在0、2、12、24、36 h CLOCK及BMAL1蛋白表达水平与假手术组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** HIBD新生大鼠松果体中CLOCK和BMAL1蛋白在损伤48 h后有显著升高,提示两者可能共同参与缺氧缺血时昼夜节律紊乱的发生。

[中国当代儿科杂志,2013,15(1):62-66]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;松果体;钟基因;BMAL1;新生大鼠

Changes of biological clock protein in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

LI Yong-Fu, JIN Mei-Fang, SUN Bin, FENG Xing. Department of Neonatology, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215003, China (Feng X, Email: xing_feng66@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the effects of biological clock protein on circadian disorders in hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) by examining levels of CLOCK and BMAL1 proteins in the pineal gland of neonatal rats. **Methods** Seventy-two 7-day-old Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham-operated and HIBD groups. HIBD model was prepared according to the modified Levine method. Western blot analysis was used to measure the levels of CLOCK and BMAL1 in the pineal gland at 0, 2, 12, 24, 36 and 48 hours after operation. **Results** Both CLOCK and BMAL levels in the pineal gland increased significantly 48 hours after HIBD compared with the sham-operated group ($P<0.05$). There were no significant differences in levels of CLOCK and BMAL proteins between the two groups at 0, 2, 12, 24 and 36 hours after operation ($P>0.05$). **Conclusions** Levels of CLOCK and BMAL1 proteins in the pineal gland of rats increase significantly 48 hours after HIBD, suggesting that both CLOCK and BMAL1 may be involved the regulatory mechanism of circadian disorders in rats with HIBD. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(1):62-66]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Pineal gland; Clock gene; BMAL1; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围产期缺氧导致的缺氧缺血性脑损伤性疾病,它不仅威胁着新生儿的生命,而且存活者也有可能表现出精神运动发育障碍和睡眠-觉醒周期紊乱等问题,严重影响患儿的生存质量。二十多年前,国外研究发现,缺氧会对生物节律造成影响,并认为这种对昼夜节律的调节作用主要发生在分子水平。机体在缺氧的情况下,可产生活性氧(reactive

oxygen species, ROS),后者可破坏细胞膜、DNA和蛋白质,调节一系列基因的转录^[1]。ROS也可影响生物钟,其变化可改变转录因子BMAL1蛋白的表达^[2]。此外,实验发现缺氧可显著上调钟基因(Clock)mRNA的表达,以缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor- α , HIF-1 α)为桥梁可以通过与CLOCK/BMAL1形成功能性的结合物来干预昼夜节律^[3],提示生物钟系统的紊乱亦可能参与HIBD的发病。Clock基因和Bmal1

[收稿日期]2012-06-28;[修回日期]2012-09-31
[基金资助]江苏省卫生厅课题项目(H200519)。
[作者简介]李永富,主治医师。现在苏州市立医院本部新生儿科工作,邮编:215002。
[通信作者]冯星,教授。

基因是核心的钟基因,且与缺氧、缺血密切相关,其蛋白的合成能较好地反映生物钟系统的功能状况。研究表明,缺氧可以导致大鼠和人类的睡眠-觉醒障碍,缺氧后的脑损伤可严重破坏新生儿正常的生物节律^[4]。而在临床上,由窒息导致的缺氧缺血性脑损伤的新生儿中也存在睡眠-觉醒周期颠倒的表现,提示HIBD的发病机制可能与生物钟系统相关。本实验旨在通过观察HIBD新生大鼠松果体中CLOCK蛋白和BMAL1蛋白合成的变化,研究松果体钟基因功能改变在HIBD时昼夜节律紊乱中的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

78只无特定病原体级别的7日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠[许可证号:SCXK(沪)2007-0005]由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,雌雄不限,体重15~20 g。在光照-黑暗交替条件下饲养,由母鼠自由哺养。凡同一窝新生大鼠须随机分配到模型组和假手术组中,每组36只;2组新生大鼠建立模型后48 h内按0、2、12、24、36、48 h 6个时间点,每组各取6只大鼠进行实验。另随机取6只7日龄新生SD大鼠作为对照组,正常饲养,不做任何处理,仅作为Western blot时实验条件控制,不进行数据分析。

1.2 仪器与试剂

常压低氧舱(上海儿科研究所陈惠金等^[5]研制);8%氮氧混合气(上海基量标准气体有限公司);MT-01型氧气浓度监测仪(南京明通医疗仪器有限责任公司);-60℃超低温冰箱(日本SANYO公司);电泳系统(170-3930 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell,美国BIO-RAD公司);蛋白提取试剂盒(英国BIPEC BIOPHARMA公司);CLOCK多克隆一抗及二抗及BMAL-1多克隆一抗及二抗(SANTA CTUZ公司);GAPDH一抗及二抗(康城生物工程公司);一抗及二抗稀释液、Western blot一抗及二抗去除液、Beyo ECL Plus(BEYOTIME生物技术公司);PVDF膜(Millipore公司)。

1.3 模型制作与采样

模型制作参照改良Levine法制作HIBD模型^[6],在颈部正中作1 cm左右的纵型切口,分离出左颈总动脉,以3-0号丝线双层永久性结扎,缝合切口,手术结束后将大鼠放在32℃暖箱中恢复1~2 h,然后进入32℃密闭常压低氧舱,给予湿化的8%氮氧混合气2 h,流量为1.5 L/min,模型制作完毕后回母

鼠身边饲养。假手术组在制作模型时仅分离出左颈总动脉,不予结扎,缝合皮肤后放入相同恒温箱中饲养,不予低氧处理。

参照Kuszek法^[7]摘除松果体,动物短暂乙醚麻醉后俯卧在冰台上,在头顶两耳根之间切开皮肤,以矢状缝为纵轴剪开颅顶骨及硬脑膜,用眼科镊轻提起联合窦、矢状窦静脉并与脑平面成45~60度角,用另一眼科镊从联合窦下取出松果体,放在冰上预冷的Eppendorf管中,-60℃冰箱保存备用。

1.4 蛋白提取及Western blot过程

将保存的松果体组织从低温冰箱中取出后置冰上,按照试剂盒说明书操作,两次上清液混匀后至-60℃冰箱保存。将所有蛋白样品调至等浓度,按比例加入5×Loading Buffer,沸水浴5~7 min;采用10%分离胶,上样后先用65 V电压电泳,待蛋白到浓缩胶和分离胶交界处时改为90 V电压,当蛋白已经到达分离胶的2/3处时电泳结束。100 V恒压转膜1.5 h;取下膜,5%脱脂奶粉摇床封闭2 h,加入1:400一抗,4℃过夜;弃去一抗液,TBST漂洗4次,每次10 min;加入1:1000二抗摇床孵育1 h;弃去二抗液,TBST漂洗4次,每次10 min;采用Beyo ECL Plus暗室曝光。将曝光后的胶片用数码相机转换成数字图像,在Image Pro-Plus 6.0图像分析系统进行扫描分析,测定条带灰度值,以GAPDH作为内参照作比值,半定量分析CLOCK和BMAL1蛋白含量。

1.5 统计学分析

采用SAS 8.2统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIBD模型建立情况

假手术组和对照组实验大鼠活动情况基本良好、食欲旺盛、营养状况佳。大鼠HIBD模型制作前均肤色红润、活动自如、呼吸均匀,缺氧结束后动物普遍全身苍白、呼吸浅慢、自主活动减少、阵发性抽搐、对外界刺激反应迟钝。缺氧结束回笼1~2 h后多数大鼠逐渐恢复。手术中及术后均无大鼠死亡。

2.2 各组松果体中CLOCK蛋白含量的变化

模型组CLOCK蛋白含量在HIBD后48 h高于假手术组($P < 0.05$),0、2、12、24、36 h CLOCK蛋白水平与假手术组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图1、表1。

2.3 各组松果体中 BMAL1 蛋白含量的变化

模型组 BMAL1 蛋白含量在 HIBD 后 48 h 高于假手术组 ($P < 0.05$), 0、2、12、24、36 h BMAL1 蛋白

水平与假手术组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2、表 2。

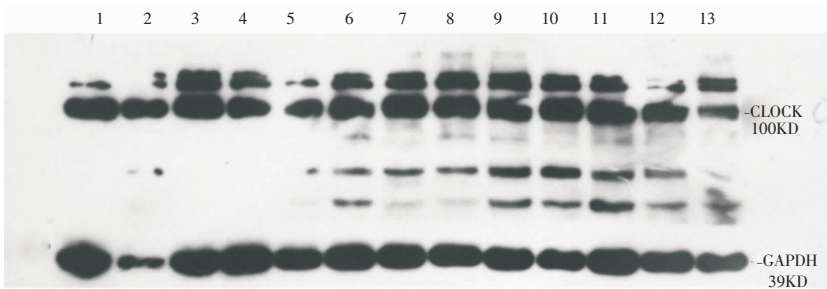


图1 Western blot 检测各组不同时间点 CLOCK 蛋白表达水平 ($n=6$) 1:对照组; 2、4、6、8、10、12:分别为假手术组 0、2、12、24、36、48 h 时间点; 3、5、7、9、11、13:分别为 HIBD 组 0、2、12、24、36、48 h 时间点。

表1 各组新生大鼠不同时间点松果体中 CLOCK 的含量水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	0 h	2 h	12 h	24 h	36 h	48 h
假手术组	6	1.008 ± 0.114	0.600 ± 0.007	0.798 ± 0.382	0.578 ± 0.513	0.624 ± 0.323	0.250 ± 0.079
模型组	6	1.332 ± 0.514	0.754 ± 0.286	0.561 ± 0.251	0.604 ± 0.471	0.812 ± 0.507	0.777 ± 0.122
<i>t</i> 值		0.87	0.76	-0.73	0.05	0.44	5.14
<i>P</i> 值		0.4759	0.5862	0.5391	0.9626	0.7013	0.0359

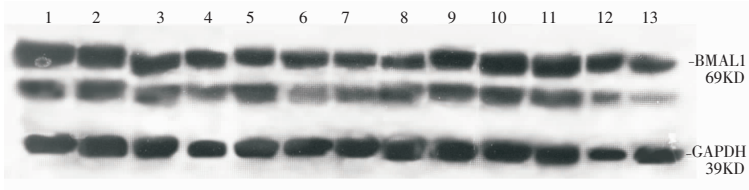


图2 Western blot 检测各组不同时间点 BMAL1 蛋白表达水平 ($n=6$) 1:对照组; 2、4、6、8、10、12:分别为假手术组 0、2、12、24、36、48 h 时间点; 3、5、7、9、11、13:分别为 HIBD 组 0、2、12、24、36、48 h 时间点。

表2 各组新生大鼠不同时间点松果体中 BMAL1 的含量水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	0 h	2 h	12 h	24 h	36 h	48 h
假手术组	6	1.07 ± 0.08	1.01 ± 0.23	0.76 ± 0.15	1.02 ± 0.19	1.22 ± 0.04	0.51 ± 0.14
模型组	6	1.17 ± 0.19	1.00 ± 0.13	1.03 ± 0.28	0.83 ± 0.27	1.11 ± 0.11	1.22 ± 0.16
<i>t</i> 值		0.64	-0.03	1.22	-0.84	-1.38	4.72
<i>P</i> 值		0.5883	0.9805	0.3473	0.4895	0.3014	0.0421

3 讨论

机体从分子、细胞、器官、系统乃至行为各种不同水平的生命活动均按一定的时间顺序发生振荡性变化,这种变化的节律称为生物节律 (circadian rhythm)^[8]。生物节律紊乱可引起多种疾病,如昼夜节律紊乱可导致失眠等精神性疾病^[9],而采取合适的昼夜光照疗法以及周期性运动锻炼可以加强和重建正常生物节律,治疗临床上的一些神经、精神性疾

病^[10-11]。生物钟基因是指参与生物节律调节的一些重要基因。哺乳动物的生物钟基因最早在下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 中发现,称为中枢生物钟;其后在心脏、肝脏、肺脏、肾上腺及淋巴细胞等外周器官组织也有发现,称为外周生物钟。中枢生物钟通过自主神经网络、内分泌激素和行为对外周震荡器组织进行信号传递和节律协调^[12]。已发现的钟基因有 Bmal1、2, Clock, Per1、2、3, Cry1、2, Rev-erba 和 Dbp 等^[13]。其中, Clock、Bmal1 作为重要钟基因,其编码蛋白 CLOCK 和 BMAL1 的具有 bHLH-PAS 域的转录因子,通过“转

录-翻译-抑转录”反馈环输出节律,并使下游基因 E-box 发生昼夜节律性的振荡,进而表现出昼夜节律或作用于其他基因并使其发生昼夜节律性的表达改变^[14]。

为了探讨新生大鼠 HIBD 时松果体是否存在 CLOCK 和 BMAL1 含量的变化,本实验复制 HIBD 模型,观察不同时间点 CLOCK 和 BMAL1 蛋白含量。结果表明,在假手术组和模型组新生大鼠松果体中都存在 CLOCK 和 BMAL1,且 CLOCK 在 HIBD 后 48 h 升高。推测其中可能的原因:(1) HIBD 可引起细胞膜通透性增加、氧自由基增多、钙超载、谷氨酸的增加及血糖水平的变化等病理改变,其中血糖水平可作为一种独立的因素影响机体的昼夜节律,且 Clock mRNA 和 Bmal1 mRNA 的表达与血糖水平呈正相关^[15]。HIBD 36 h 后血糖水平开始升高,故 Clock mRNA 表达增加,相应 CLOCK 合成亦增加。(2) 缺氧缺血可以激活下丘脑-垂体-肾上腺轴,升高神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 的水平^[16],从而增加 CLOCK 的合成^[17]。(3) CLOCK 属于 PAS 蛋白家族,在缺氧情况下,HIF-1 α 可通过以 PAS 为基础的数个 HIF 作用位点^[18]介导 Clock 的转录激活。(4) 机体缺氧时可通过改变细胞的氧化还原状态,使活性氧生成减少,NAD(P)H/NAD(P)的比率增高。缺氧后 NAD⁺ 浓度升高,激活多功能的 NAD⁺ 依赖性的蛋白脱乙酰基酶 (sirtuin type 1, SIRT1),影响 Clock 的转录及蛋白合成^[19]。课题组前期研究发现,新生大鼠松果体中 CLOCK 的负性调节因子 Per2 mRNA 在 HIBD 后 24 h 开始下降,36 h 降至低谷,并持续到 48 h^[20],因此解除了对 Clock 转录的抑制效应,CLOCK 合成增加。

同时 BMAL1 在 HIBD 后 2、12、24、36 h 水平较假手术组无明显变化,而在 48 h 时水平升高。推测可能的原因:(1) BMAL1 蛋白和 CLOCK 一样,与 HIF-1 α 都属于 PAS 蛋白家族,在缺氧情况下,HIF-1 α 可能通过 Bmal1 启动子上存在的以 PAS 为基础的数个 HIF 作用位点,介导 Bmal1 mRNA 的转录激活。(2) 机体缺氧时可产生 ROS,使细胞内的氧化还原缓冲系统发生改变,从而改变 NADH 依赖性转录因子 BMAL1 的表达^[21]。在 HIBD 发生后,这些反应可能同时或序贯存在,正负机制互相作用而表现出 BMAL1 蛋白水平的变化。(3) 作为 CLOCK/BMAL1 异二聚体的一部分,BMAL1 的合成也受 CLOCK 合成的影响,二者的变化基本同步^[22]。对照 CLOCK 和 BMAL1 均存在一个近似 24 h 波动变化的趋势,符合其作为钟基因蛋白的节律振荡

规律。

此外本实验有两点需要注意:(1) 模型组 CLOCK 和 BMAL1 在 0、2、12、24、36 h 均未发生明显变化,可能是由于这 2 个基因均为生物节律的核心基因,相对其他生物钟基因更为保守^[23],代偿机制在 HIBD 早期发挥作用或改变非常细微,尚不足以测出;(2) 模型组 CLOCK 和 BMAL1 的改变在 48 h 才比较明显,至于在这之后的变化,尚不明了,有待于进一步深入研究。

综上所述,缺血缺氧可以引起新生大鼠松果体中钟基因蛋白 CLOCK 和 BMAL1 发生改变,破坏 CLOCK/BMAL1 节律振荡的周期性,提示 HIBD 可引起生物钟系统的紊乱。至于生物节律紊乱是否对 HIBD 的转归及预后产生影响,我们将在以后的实验中进一步深入探讨,以深化生物钟系统紊乱在 HIBD 发病机制中作用的认识。

[参 考 文 献]

- [1] Kondratova AA, Kondratov RV. The circadian clock and pathology of the ageing brain[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(5): 325-335.
- [2] Khapre RV, Kondratova AA, Susova O, Kondratov RV. Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence in vivo[J]. Cell Cycle, 2011, 10(23): 4162-4169.
- [3] Ghorbel MT, Coulson JM, Murphy D. Cross-talk between hypoxic and circadian pathways: cooperative roles for hypoxia-inducible factor 1alpha and CLOCK in transcriptional activation of the vasopressin gene[J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 22(3): 396-404.
- [4] Phillips CI, Smith VM, Antle MC, Dyck RH. Neonatal medial frontal cortex lesions disrupt circadian activity patterns[J]. Dev Neurosci, 2009, 31(5): 412-419.
- [5] 陈惠金,周泽汉,周建德,周伟,吴圣楣. 新生大鼠缺氧实验装置的研制[J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(1): 45-46.
- [6] Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, et al. Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats[J]. Behav Brain Res, 2002, 136(1): 161-170.
- [7] Kuzak J, Rodin M. A new technique of pinealectomy for adult rats[J]. Experientia, 1977, 33(2): 283-284.
- [8] Kalsbeek A, Buijss RM. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting[J]. Cell Tissue Res, 2002, 309(1): 109-118.
- [9] Ebben MR, Narzhnaya M. Cognitive and behavioral treatment options for insomnia[J]. Mt Sinai J Med, 2012, 79(4): 512-523.
- [10] Krysta K, Krzystanek M, Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I. Bright light therapy in the treatment of childhood and adolescence depression, antepartum depression, and eating disorders[J]. Neural Transm, 2012, 19. [Epub ahead of print].
- [11] van Oosterhout F, Lucassen EA, Houben T, Vanderleest HT, Antle MC, Meijer JH. Amplitude of the SCN Clock Enhanced by the Behavioral Activity Rhythm[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39693.
- [12] Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Taku-

mi T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues[J]. BMC Mol Biol, 2004, 9(5): 18-27.

[13] Mazzocchi G, Francavilla M, Giuliani F, Aucella F, Vinciguerra M, Paziienza V, et al. Clock gene expression in mouse kidney and testis: analysis of periodical and dynamical patterns[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2012, 26(2): 303-311.

[14] Huang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo SH, Partch C, et al. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK: BMAL1 transcriptional activator complex[J]. Science, 2012, 337(6091): 189-194.

[15] Dickmeis T, Lahiri K, Nica G, Vallone D, Santoriello C, Neumann CJ, et al. Glucocorticoids play a key role in circadian cell cycle rhythms[J]. PLoS Biol, 2007, 5(4): e78.

[16] 冯国祝, 冯星, 杨林, 齐文辉, 张文祥, 童小艳, 等. 窒息新生儿血浆神经肽 Y 测定及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 314-316.

[17] Hyun Jung Kim, Mary E. Harrington. Neuropeptide Y-deficient mice show altered circadian response to simulated natural photoperiod[J]. Brain Research, 2008, 46(12): 96-100.

[18] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(2): 247-254.

[19] Masri S, Zocchi L, Katada S, Mora E, Sassone-Corsi P. The circadian clock transcriptional complex: metabolic feedback intersects with epigenetic control[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 26. [Epub ahead of print].

[20] 丁欣, 冯星. 新生大鼠脑损伤后松果体 Clock mRNA, Per2 mRNA 表达和血浆褪黑素水平变化[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(7): 590-593.

[21] Razorenova OV. Brain and muscle ARNT-like protein BMAL1 regulates ROS homeostasis and senescence: a possible link to hypoxia-inducible factor-mediated pathway[J]. Cell Cycle, 2012, 11(2): 213-214.

[22] Valenzuela FJ, Torres-Farfan C, Richter HG, Mendez N, Campino C, Torrealba F, et al. Clock gene expression in adult primate suprachiasmatic nuclei and adrenal: Is the adrenal a peripheral Clock responsive to melatonin? [J]. Endocrinology, 2008, 149(4): 1454-1461.

[23] Ripperger JA, Schibler U. Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions[J]. Nat Genet, 2006, 38: 369-374.

(本文编辑:万静)

· 消息 ·

中国医师协会新生儿专业委员会 暨中国医师协会第三次全国新生儿科学术会议 征文通知

经中国医师协会新生儿专业委员会常委会研究决定,并报中国医师协会学术会员部批准,中国医师协会第三次全国新生儿科医师大会定于2013年3月22~24日在北京召开。现开始征文,与新生儿各专业有关的论文(基础研究、临床研究、护理及管理)均可投稿,参加会议者将授予国家级继续教育学分6分。请将论文电子版全文及800字以内的结构式摘要发至新生儿专业委员会办公室电子邮箱:xinshengerwyh@126.com,格式按照正式发表论文摘要写。请务必附通讯地址、联系电话(单位、住宅)、手机、E-mail,以便联系。投稿截止日期为2013年2月20日。

联系人:张倩,联系电话:010-84024716。

中国医师协会新生儿专业委员会
2012年10月20日