

新生大鼠脑白质损伤时 GRP78 和 caspase-12 基因表达变化研究

罗黎力¹,熊英¹,王慧卿¹

(四川大学华西第二医院新生儿科,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 GRP78 被认为是内质网应激的一个敏感标志,caspase-12 是内质网应激诱导凋亡的关键分子。该研究探讨新生大鼠脑白质损伤时 GRP78 mRNA 和 caspase-12 mRNA 表达的变化及 caspase-12 介导的内质网应激在脑白质损伤中的作用。方法 进入实验的大鼠共 96 只,实验组和对照组各 49 只,实验组制备脑白质损伤动物模型,分别于缺氧缺血后 0,2,4,6,12,24 h 及 72 h 处死,苏木精-伊红染色观察脑组织病理学变化,实时 PCR 技术检测 GRP78 mRNA 及 caspase-12 mRNA 表达变化。结果 与对照组相比,实验组 GRP78 mRNA 在缺氧缺血后 2 h 表达开始上升,6 h 达峰值,缺氧缺血后 2,4,6,12,24,72 h 表达均增加($P<0.05$)。实验组 caspase-12 mRNA 在缺氧缺血后 6 h 开始表达上调,缺氧缺血后 6,12,24 h 均增加($P<0.05$)。结论 新生大鼠脑白质损伤时,实验组 GRP78 mRNA 及 caspase-12 mRNA 表达较对照组显著升高,且表达升高有时序性。表明缺氧缺血导致内质网应激反应被激活,内质网应激可能是新生大鼠脑白质损伤的发病机制之一。[中国当代儿科杂志,2009,11(8):691-694]

[关键词] 脑白质损伤;Caspase-12;GRP78;内质网应激;新生大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)08-0691-04

Expression of GRP78 and caspase-12 in neonatal rats with experimental hypoxic-ischemic white matter damage

LUO Li-Li, XIONG Ying, WANG Hui-Qing. Department of Neonatology, West China Second University Hospital of Si Chuan University, Chengdu 610041, China (Xiong Y, Email: xiongying246@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective GRP78 is a sensitive marker of endoplasmic reticulum stress. Caspase-12 is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. This study was designed to explore the changes of GRP78 and caspase-12 mRNA in neonatal rats with experimental hypoxic-ischemic white matter damage (WMD) and investigate the roles of endoplasmic reticulum stress in the WMD. **Methods** Two-day-old rats were randomized to WMD and control groups ($n = 49$ each). The pups were sacrificed at 0, 2, 4, 6, 12, 24 and 72 hrs after hypoxia-ischemia (HI). The light microscope was used to observe the brain pathological changes. Real time PCR was used to detect the expression of GRP78 mRNA and caspase-12 mRNA in the white matter tissue. **Results** The expression of GRP78 mRNA began increasing 2 hrs after HI and peaked at 6 hrs in the WMD group, demonstrating significant differences at 2, 4, 6, 12, 24 and 72 hrs compared with the control group ($P<0.05$). The caspase-12 mRNA expression in the WMD group began increasing 6 hrs after HI and demonstrated significantly increased levels 6, 12 and 24 hrs after HI compared with those in the control group ($P<0.05$). **Conclusions** GRP78 and caspase-12 mRNA expression increased significantly in neonatal rats with WMD. This suggests that endoplasmic reticulum stress may be induced following HI. Endoplasmic reticulum stress seems to be involved in the apoptosis of oligodendrocytes induced by HI in neonatal rats with WMD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (8):691-694]

Key words: White matter damage; Caspase-12; GRP78; Endoplasmic reticulum stress; Neonatal rats

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是早产儿脑白质损伤的一种主要类型,与脑瘫、精神发育迟滞等密切相关^[1]。缺氧缺血是PVL最主要的原因,在脑白质中数量最多的细胞是少突胶质细胞,脑缺血损伤能诱导少突胶质细胞凋

亡。内质网应激启动的凋亡途径是近年才发现的一种新的凋亡途径,内质网与缺氧缺血损伤时的细胞凋亡有密切关系。内质网分子伴侣蛋白质葡萄糖结合蛋白 78 (GRP78)在应激后上调被认为是内质网应激最敏感的标志。半胱氨酸门冬氨酸特异性蛋白

[收稿日期]2008-11-15;[修回日期]2008-12-24
[作者简介]罗黎力,女,硕士研究生,医师。主攻方向:新生儿疾病。
[通讯作者]熊英,女,教授,四川大学华西第二医院新生儿科,邮编:610041。

酶 12 (caspase-12) 定位于内质网膜, 是内质网应激诱导凋亡的关键分子, 缺血再灌注损伤等作用于内质网时, 被应激因子激活并引发凋亡^[2]。目前脑白质损伤时脑白质区 GRP78 mRNA 和 caspase-12 mRNA 的表达变化及内质网应激反应是否参与脑白质损伤尚不清楚。本研究通过建立新生大鼠脑白质损伤模型, 观察脑白质区 GRP78 mRNA 和 caspase-12 mRNA 的表达变化, 探讨脑白质损伤时内质网应激在神经胶质细胞凋亡的发病机制中的作用, 为 PVL 的防治提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2 日龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由四川省医学科学院实验动物中心提供, 实时 PCR 仪为美国 ABI 公司产品 (ABI 7000); 引物, dNTP, SYBR GREEN (含 ROX, TAQ 酶等) 购自大连 TAKARA 公司。

1.2 动物模型的建立和标本制备

清洁级 2 日龄 SD 大鼠共 117 只, 随机分为两组: 实验组 (脑白质损伤组) 62 只, 对照组 (假手术组) 55 只。实验组因不能耐受手术及缺氧死亡 13 只, 对照组因手术失败死亡 6 只。参照 Back 等^[3]的方法建立新生大鼠脑白质损伤模型。实验组大鼠暴露并结扎右侧颈总动脉, 术后置于缺氧舱内, 输入含 6% 氧气, 94% 氮气的混合气体, 4 h 后取出返回母鼠笼中。对照组仅分离右侧颈总动脉, 不做结扎也不置于缺氧舱内, 余同实验组。进入实验的大鼠共 98 只 (实验组和对照组各 49 只), 分别于缺氧缺血后 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 及 72 h 处死。

于缺氧缺血后的各时间点进行心脏灌注, 冰浴中断头取脑, 取右侧脑组织白质部分, 立即保存于液氮中待用。进行石蜡切片的标本于心脏灌注后用 4℃ 的 4% 多聚甲醛溶液灌注开颅取脑组织, 美蓝标记前囟位置。脑组织置于 4% 多聚甲醛固定 12 h 待用。

1.3 实时 PCR 检测

引物: 内参 (GAPDH) 上游 5'-ATGCTGAAG-GTCGGTGTG-3', GAPDH 下游 5'-AACTGCCC TGGG-TAGAG-3', 扩增片段长度 161 bp; GRP78 上游 5'-AGAGCGCATTGACACCAGGAAT GAA-3', GRP78 下游 5'-CCTCCACTTCCATAGAGTTTGCTGATA-3', 扩增片段长度 248 bp; caspase-12 上游 5'-TCCTGGTCTT-TATGTCCC-3', 扩增片段长度 248 bp; caspase-12 下游 5'-CGATAGCCCAAGGAAGTG-3, 扩增片段长度 180

bp。实验步骤按照 SYBR Green Master Mix 试剂盒说明书操作。

采用 ΔCt 及 $\Delta\Delta Ct$ 值比较法进行相对定量, Ct 值即为实时荧光定量 PCR 仪自动读数得到每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数, Ct 值与该基因 mRNA 的表达水平呈负相关, 即 Ct 值越高, 表示该基因 mRNA 表达水平越低。 $\Delta Ct = (\text{目的基因 } Ct \text{ 值} - \text{GAPDH } Ct \text{ 值})$, $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ GI (实验组样品)} - Ct \text{ GAPDH (实验组样品)}] - [Ct \text{ GI (对照组样品)} - Ct \text{ GAPDH (对照组样品)}]$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组目的基因 mRNA 表达的拷贝数与对照组目的基因拷贝数相比的倍数, 即相对基因表达量。

1.4 统计学分析方法

实验数据为计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 为克服系统误差, 排除在 RNA 提取和逆转录过程中出现的变异, 以 ΔCt 来比较两组间基因表达是否有差异, 而不是 Ct 值, 两样本均数采用 t 检验。相关分析采用 Speraman 秩相关分析, SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 有显著性意义。

2 结果

2.1 动物模型

2.1.1 行为改变 新生鼠缺氧缺血过程中主要表现为全身发绀、躁动不安、四肢强直抽动, 缺氧缺血完成后, 有反应差、吃奶减少、活动减少、睁眼时间延迟等异常表现。

2.1.2 大鼠脑组织病理学改变 苏木精-伊红染色光学显微镜下发现: 对照组纹状体细胞排列整齐、胞核大、胞浆少。实验组缺氧缺血后 12 h 见纹状体内细胞胞体肿胀、细胞稀疏、间隙增宽 (图 1A)。缺氧缺血后 12 h 脑白质区胼胝体细胞走行紊乱, 组织结构欠清晰, 出现白质疏松 (图 1B)。缺氧缺血后 24 h 见纹状体内细胞稀疏及间隙增宽更明显 (图 1C)。缺氧缺血后 72 h 可见缺氧缺血侧侧脑白质区细胞走行紊乱, 组织结构欠清晰, 脑室周围白质出现广泛的疏松及筛网状坏死 (图 1D)。

2.2 GRP78 mRNA 和 caspase-12 mRNA 的表达变化

实验组的 GRP78 mRNA 在缺氧缺血后 2 h 表达开始上升, 于 12 h 达到高峰, 并持续至 72 h; 对照组其表达无明显变化。实验组 GRP78 mRNA 的相对表达在 2, 4, 6, 12, 24, 72 h 均升高, 与对照组比较, ($P < 0.05$ 或 0.01), 差异有显著性 (表 1)。

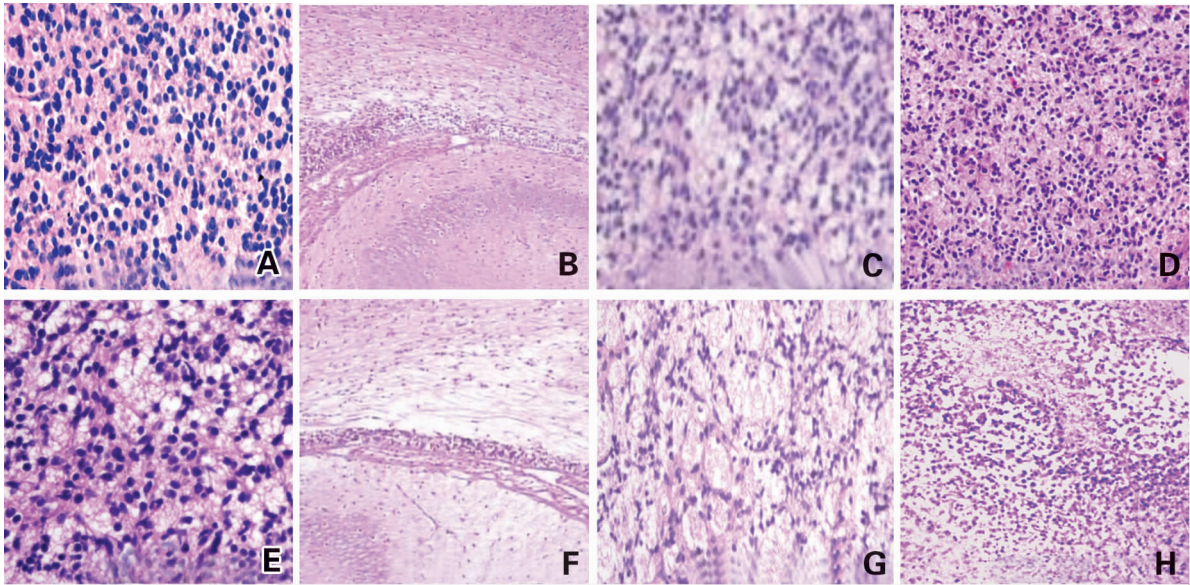


图1 实验组与对照组脑组织病理改变(苏木精-伊红染色) **A**:对照组 12 h 白质细胞排列整齐(×400); **B**:对照组 12 h 胼胝体白质致密(×100); **C**:对照组 24 h 白质细胞致密(×400); **D**:对照组 72 h 白质细胞整齐(×400); **E**:实验组缺氧缺血后 12 h 白质细胞紊乱、细胞间隙增宽(×400); **F**:实验组缺氧缺血后 12 h 胼胝体白质疏松(×100); **G**:实验组缺氧缺血后 24 h 白质细胞间隙明显增宽(×400); **H**:实验组缺氧缺血后 72 h 白质筛网状坏死(×400)。

表 1 不同时段两组大鼠 GRP78 mRNA 表达的比较						($\bar{x} \pm s$)
时间(h)	鼠数(只)	对照组 Δ Ct	实验组 Δ Ct	$-\Delta\Delta$ Ct	$2-\Delta\Delta$ Ct(95%可信区间)	<i>P</i>
0	6	9.52 ± 0.23	9.43 ± 0.09	0.09 ± 0.09	1.06(0.92 ~ 1.17)	>0.05
2	6	9.44 ± 0.55	8.78 ± 0.45	0.65 ± 0.45	1.34(1.07 ~ 1.65)	<0.05
4	6	9.28 ± 0.26	7.64 ± 0.41	1.65 ± 0.40	3.36(2.72 ~ 4.01)	<0.01
6	6	9.65 ± 0.18	6.30 ± 0.17	3.35 ± 0.18	10.16(9.15 ~ 11.18)	<0.01
12	6	9.44 ± 0.32	5.14 ± 0.72	4.30 ± 0.72	25.94(19.72 ~ 32.15)	<0.01
24	6	9.11 ± 0.15	6.05 ± 0.52	3.06 ± 0.52	9.62(7.37 ~ 11.86)	<0.01
72	6	9.19 ± 0.24	6.74 ± 0.46	2.45 ± 0.46	5.43(3.98 ~ 6.88)	<0.01

实验组的 caspase-12 mRNA 在缺氧缺血后 4 h 开始上升,于 6 h 达到高峰,72 h 下降;实验组 caspase-12 mRNA 在 4,6,12,24 h 相对表达均升高,而对照组其表达无明显变化,两组差异有显著性(表 2)。

表 2 不同时段两组大鼠 caspase-12 mRNA 表达的比较						($\bar{x} \pm s$)
时间(h)	鼠数(只)	对照组 Δ Ct	实验组 Δ Ct	$-\Delta\Delta$ Ct	$2-\Delta\Delta$ Ct(95%可信区间)	<i>P</i>
0	6	15.82 ± 0.39	15.82 ± 0.89	-0.008 ± 0.89	0.97(0.44 ~ 1.50)	>0.05
2	6	15.78 ± 0.26	15.77 ± 0.45	0.01 ± 0.45	1.05(0.81 ~ 2.89)	>0.05
4	6	15.66 ± 0.45	15.00 ± 0.52	0.66 ± 0.52	1.49(1.02 ~ 2.01)	<0.05
6	6	16.16 ± 0.73	13.65 ± 0.79	2.51 ± 0.79	5.15(1.51 ~ 8.79)	<0.01
12	6	15.92 ± 0.50	13.84 ± 0.30	2.08 ± 0.30	4.42(3.73 ~ 5.11)	<0.01
24	6	15.51 ± 0.66	14.41 ± 0.34	1.11 ± 0.34	2.58(1.86 ~ 2.66)	<0.01
72	6	15.64 ± 0.61	15.01 ± 0.49	0.63 ± 0.49	1.63(1.24 ~ 2.03)	>0.05

3 讨论

Craig 等^[4]研究显示 2~3 日龄的新生鼠神经发育尚未成熟,相当于人类胎龄 23~32 周水平,是晚

期少突胶质细胞前体细胞占主导时期,而晚期少突胶质细胞前体细胞对缺氧缺血的易感性是脑白质损伤发生的重要条件^[5]。本研究采用 Back 等^[3]的方法建立新生大鼠脑白质损伤模型。实验中观察到实验组大鼠出现抽搐,吸吮差,活动减少等异常表现,

苏木精-伊红染色光镜下观察到大鼠右侧胼胝体内细胞胞体肿胀、细胞稀疏、间隙增宽,病变程度随时间加重,72 h 胼胝体内细胞排列紊乱、结构不清,白质筛网状坏死,这与国内外文献报道相同模型的结果一致,表明本实验新生鼠脑白质损伤模型制作成功。

内质网分子伴侣 GRP78 定位于内质网,是内质网稳态的中心调节剂^[6]。机体应激情况下,通过内质网未折叠蛋白反应可使 GRP78 大量表达,GRP78 可与内质网中错误折叠和未折叠蛋白结合,恢复蛋白质的正确构象,使蛋白质能够在细胞应激状态下继续正确合成,维持内环境的稳定^[7]。Ito 等^[8]观察大鼠短暂性大脑中动脉闭塞后 GRP78 表达随时间的变化情况,认为内质网应激与缺血后神经细胞损伤有关。从本实验中观察到缺氧缺血后 2 h GRP78 开始表达,于 12 h 达高峰,随后逐渐下降。GRP78 mRNA 在缺氧缺血后早期即开始上升,以协助变性蛋白进行重新折叠、装配及跨膜转运,缓解内质网压力,同时将无法恢复的蛋白质转移给蛋白降解系统进行降解,避免细胞进一步受到伤害。GRP78 表达下降,表明缺血细胞可能由于损伤严重,已发生了内质网功能障碍,它不能通过促进 GRP78 表达增加来结束内质网应激状态,内质网自稳调节系统遭到破坏,使缺血细胞启动了一系列死亡通路,最终导致细胞死亡^[9]。

Nakagawa 等^[10]提出 caspase-12 的激活特异性地由内质网所介导。在本实验中发现, caspase-12 mRNA 在缺氧缺血后 4 h 表达开始上升,其升高可能与持续缺血、受损细胞首先选择程序性细胞死亡有关^[11]。此过程中脑组织的病理改变从轻微到逐渐严重,表现为组织疏松水肿,基质模糊不清,细胞排列紊乱,这可能是由于细胞从出现凋亡相关基因的蛋白表达至出现形态学改变需要一定的时间。缺氧缺血 24 h 后 caspase-12 mRNA 表达下降可能与内质网应激后蛋白合成受阻,使 caspase-12 的转录及蛋白表达减少,在持续性损害因素存在下,凋亡是一短暂过程,一般持续数小时,随即被邻近的细胞或巨噬细胞吞噬。

研究表明,当缺氧缺血导致新生鼠脑白质损伤

时,GRP78 在缺氧后表达增加,随着 GRP78 的表达上升,仅由内质网应激所激活的 caspase-12 也于缺氧缺血后表达升高,GRP78 与 caspase-12 的表达呈正相关($r = 0.793, P < 0.01$),提示脑白质损伤时,内质网应激反应的激活,内质网应激可能参与了缺氧缺血导致的脑白质损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Blumenthal I. Periventricular leucomalacia: a review [J]. Eur J Pediatr, 2004, 163(8):435-442.
- [2] Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat [J]. Neuroreport, 2003, 14(2):183-186.
- [3] Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia [J]. J Neurosci, 2002, 22(2):455-463.
- [4] Craig A, Ling Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, et al. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human [J]. Exp Neurol, 2003, 181(2):231-240.
- [5] Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(15):5688-5697.
- [6] Back SA. Perinatal white matter injury: The changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2006, 12(2):129-140.
- [7] Li F, Hayashi T, Jin G, Deguchi K, Nagotani S, Nagano I, et al. The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers [J]. Brain Res, 2005, 1048(1-2):59-68.
- [8] Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuchi Y. Up-regulation of the Ire1-mediated signaling molecule, Bip, in ischemic rat brain [J]. Neuroreport, 2001, 12(18):4023-4028.
- [9] Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Smyth CA, Jenkins S, Thompson JA, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis [J]. Surgery, 2005, 138(2):342-351.
- [10] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. Nature, 2000, 403(6765):98-103.
- [11] Reijonen S, Putkonen N, Nørremølle A, Lindholm D, Korhonen L. Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(5):950-960.

(本文编辑:徐福兰)