

实验研究报告 ·

川芎嗪对新生鼠缺氧缺血性脑损伤 c - fos 基因表达影响的研究

俞海国¹, 赵燕², 汤云珍¹, 丁艳洁¹, 胡勇³

(1. 东南大学医学院附院儿科, 江苏 南京 210009; 2. 焦作市第二人民医院, 河南 焦作 454150; 3. 江苏省妇婴保健中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的 探讨川芎嗪对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)脑组织 c-fos 基因表达的影响。方法 通过结扎左侧颈总动脉后置入氮氧混合气中 2 h 建立 HIBD 模型, 采用 RT-PCR 方法分别半定量检测空白对照组、生理盐水组、及川芎嗪干预组海马及皮质 c-fos mRNA 水平。结果 生理盐水组海马、皮质 c-fos mRNA 明显高于空白对照组 ($P < 0.05$), 川芎嗪干预组海马、皮质 c-fos mRNA 水平明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$)。结论 HIBD 新生鼠经川芎嗪干预后可明显降低脑组织海马、皮质 c-fos 基因的表达水平。

[关键词] 川芎嗪; 缺氧缺血性脑损伤; 即刻早基因; c-fos 基因; 新生鼠

[中图分类号] R - 332 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008 - 8830(2001)02 - 0204 - 02

即刻早基因 (IEGs) 在缺氧缺血性脑损伤中的作用愈来愈受到重视, c-fos 基因是定义最早的即刻早基因。实验研究表明, 缺血缺氧 (HI) 引起细胞内钙超载可促使 c-fos 基因短期内迅速表达, 进而一些后期效应基因被抑制或激活, 最终神经细胞坏死、凋亡。可见 c-fos 基因在 HIBD 发病机制中起着重要作用。中药川芎嗪作为一种典型的钙离子拮抗剂, 可显著减轻细胞内钙超载, 防止脑损伤。我们采用了反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法, 研究新生 HIBD 大鼠在川芎嗪干预后脑组织海马、皮质两部位 c-fos 基因表达的影响, 探讨了川芎嗪在防治 HIBD 中的机制, 为临床上防治 HIE 提供了一个新的切入点。

1 研究对象及方法

1.1 研究对象

动物模型的制作: 购自南京医科大学实验动物中心 SD 7 日龄新生鼠 26 只, 平均体重 120 g, 游离结扎左颈总动脉, 置于密闭容器内, 37 °C 水浴保持温度, 并通以氮、氧混合气体 (92 % 氮气、8 % 氧气), 持续 2 h。

实验分组: 26 只动物随机分为 3 组: 空白对照组 8 只; 只游离左颈总动脉未做结扎; 川芎嗪干预组

8 只; 于行左颈总动脉结扎术前 1 h 经腹腔注射盐酸川芎嗪注射液 30 mg/kg 1 次, 待结扎左颈总动脉后再注射 1 次, 剂量同前; 生理盐水对照组: 10 只, 经腹腔注射同体积的生理盐水, 时间、剂量同川芎嗪干预组。各组动物分别于缺氧后 1 h 断头取脑组织于冰袋上分离海马、皮质, 置于 - 200 °C 液氮中保存待检。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取 购 Boehringer Mannheim 公司 Tripure 液 (RNA 提取液, 50 ~ 100 mg 组织约加 1 ml)。冰浴、匀浆静置后加 1/5 体积氯仿, 剧烈振荡、静置 4 °C 离心 12 000 r/min, 20 min, 转移上清, 加等体积异丙醇 - 20 °C 过夜沉淀 RNA, 再次离心弃上清, 加 75 % 乙醇, 离心后弃上清, 溶于 10 ~ 20 μ l DEPC 水中, - 70 °C 冻存。

1.2.2 RT-PCR 首先反转录合成 C - DNA 第一链: 20 μ l 逆转录体系中分别加入: 1 μ g RNA 模板、MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP 以及随机引物, 混匀后于 37 °C 水浴 55 min, 95 °C 5 min 灭活 MLV, 逆转录产物 - 20 °C 冻存。

聚合酶链反应: 取逆转录产物 10 μ l 在 PE2400 基因扩增仪上反应, 反应总体系为 50 μ l, Taq 酶购于 Promaga 公司产品, 引物序列参照文献^[1], 内参照为 β - actin。详见表 1。

[收稿日期] 2000 - 03 - 01; [修回日期] 2000 - 06 - 20

[作者简介] 俞海国 (1973 -), 男, 现在重庆医科大学攻读博士。

表 1 c-fos β -actin 的 PCR 扩增引物序列

	CDNA	5~3 序列	碱基位置	扩增片段
c-fos	上游引物	CTGTCCGTCCTCTAGTGCCAACTT	156~178	354 bp
	反义引物	ATCCGTCCTCCGCTTGGAGCGTAT	509~487	
β -actin	上游引物	CAATTCCATCATCAAGTGTGAC	847~868	184 bp
	下游引物	CCACACAGAGTACTTGCACTC	1030~1010	

PCR 反应循环参数为:94℃30 s 变性,60℃30 s 退火,70℃90 s 延伸共 35 个循环,扩增产物经琼脂糖电泳、溴乙锭染色后紫外线灯下拍照用激光同位素扫描仪分析电泳结果。

1.3 统计学处理方法

c-fos 基因光密度值与内参 β -actin 光密度相比较得到 c-fos 基因的相对含量值,其结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析。

2 实验结果

反转录聚合酶链反应检测 HIBD 新生鼠脑组织皮质、海马部位以及经川芎嗪干预后 c-fos 基因 mRNA 的相对含量如表 2。生理盐水组海马、皮质部位 c-fos mRNA 表达量明显高于空白对照组,而川芎嗪干预组的海马、皮质 c-fos mRNA 表达量虽然高于空白对照组,但较生理盐水组显著降低 ($P < 0.05$; $P < 0.01$)。

表 2 3组动物脑组织海马、皮质部位 c-fos mRNA 的相对含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	例 数	海 马	皮 质
空白对照组	8	1.31 $\pm$ 0.45	1.97 $\pm$ 0.53
生理盐水组	10	4.24 $\pm$ 1.82	4.10 $\pm$ 2.23
川芎嗪干预组	8	1.79 $\pm$ 0.28	2.05 $\pm$ 1.08

3 讨论

即刻早基因 (IEGS) 是在以多种刺激下短期内表达的一族基因,在生理状态下为低表达,其中包括 FOS, JUN 家族以及其他基因。FOS 家族和 JUN 家族成员的蛋白产物具有特殊的亮氨酸拉链结构 (leucine zipper) 可相互联接形成杂二聚体 AP-1 复合物,并可与后期效应基因特异性 AP-1 位点 (-TCAC-CA) 结合,启动后期效应基因的表达^[1]。即将细胞外的短暂的刺激转成长程的细胞效应。c-fos 基因是被人们最早定义的即刻早基因,许多实验^[2,3]证实 在缺血缺氧 1 h 左右大鼠脑组织中探索到 c-fos 基因 mRNA 含量成倍的增加,随后又逐渐恢复到正常水平。c-fos 基因在缺氧缺血状态下高表达的意义尚未十分明确,但国外一些实验认为 c-fos 基因在缺血缺

氧诱导神经细胞凋亡的机制中起着重要作用。Gillordon F^[4]等人在实验中观察到缺血缺氧后 c-fos 基因水平升高,同时检测到抗凋亡基因 bcl-2 mRNA 水平下调,推测 c-fos 蛋白、jun 蛋白形成的转录因子可抑制其下游基因 bcl-2 的表达,最终导致神经细胞变性以及凋亡。向神经元细胞内注射 c-fos 蛋白抗体可抑制其凋亡,故有人认为 c-fos jun 等基因的表达可看成是迟发性神经元死亡 (凋亡) 的一种标志^[5]。

川芎嗪是从伞形科藻本属植物川芎中分离提纯的一种生物碱单体,其基本化学组成是四甲基吡嗪,具有钙离子拮抗剂特性^[6],而细胞内钙超载在 HIBD 中占有重要地位,动物实验和临床都证实川芎嗪对缺氧缺血性脑损害的预防和保护作用即清除自由基,增强 GSH 活力,保护 ATP 酶活性,增加大脑中动脉、前动脉血流量等,然而川芎嗪与 c-fos 基因表达之间的关系国内外尚未见报道,本实验观察到川芎嗪干预后可降低脑组织 c-fos 基因的表达,其机制可能为早期川芎嗪干预可阻断钙通道,抑制了缺氧缺血触发的钙离子内流,从而切断了如下 c-fos 基因启动途径:细胞内钙聚集激活蛋白激酶 C,促使某些 DNA 结合蛋白磷酸化,识别并结合 DNA 启动子区域的特异性位点,从而调节 c-fos 基因的表达。川芎嗪诱发的内源性保护机制启动有待进一步探讨,在临床上由于脑缺氧缺血治疗时窗短,故应及早用药干预,从上游阻断、翻转神经细胞坏死、凋亡的途径,增强神经元对缺血缺氧的耐受性,促使其存活。

[参 考 文 献]

[1] Akins PT, Liu PK, Hsu CY, et al. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia friend or foe? [J]. Stroke, 1996, 27(9): 1682 - 1687.

[2] Gang AN, Lin TN, Liu JS. et al. Expression of c-fos and c-jun family gene after focal ischemia [J]. Ann of Neuro, 1993, 33 (5): 457 - 464.

[3] Ruth M, Gubits, Robert E. et al. Immediate early gene induction after neonatal hypoxia-ischemia [J]. Mol Brain Res, 1993, 18(3): 228 - 238.

[4] Gillardon F, Baurle J, Wickert J, et al. Differential regulation of bcl-2, bax, c-fos, jun-b, and krox-24 expression in the cerebellum of purkinje cell degeneration mutant mice [J]. J Neuro Res, 1995, 41(5): 708 - 715.

[5] Honkanieni J, State BA, Weinstein PR. et al. Expression of zizic finger immediate early gene in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(6): 636 - 646.

[6] 王玉良,巴彦坤. 川芎嗪对心血管组织的药理和电生理作用——一种新的钙拮抗剂? [J]. 中西医结合杂志, 1985, 5(5): 291 - 294.

(本文编辑:吉耕中)