

· 实验研究 ·

新生小鼠缺氧缺血后 p53 的表达 及其抑制剂对脑损伤的影响

徐发林, 朱长连, 王小阳, 邱林, 吉玲, 程秀永, 栾斌

(郑州大学第三附属医院儿科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 p53 诱导的神经细胞凋亡在缺氧缺血性脑损伤及神经系统退行病变的发生中起重要作用, p53 抑制剂 pifithrin- α (PFT- α) 在多种动物实验模型中显示神经保护作用。该研究旨在探讨未成熟脑在缺氧缺血 (HI) 后 p53 表达的时相变化及 p53 抑制剂 PFT- α 干预对脑损伤的影响。方法 新生 9 日龄 C57/BL6 小鼠在 HI 后 3, 8, 24, 72 h 处死取脑组织进行 p53 和细胞微管相关蛋白-2 (MAP-2) 免疫组化染色, 探讨 p53 表达的时相变化及其与神经细胞损伤的关系; 为了探讨 PFT- α 是否对缺氧缺血性脑损伤有保护作用, 新生 9 日龄 C57/BL6 小鼠分别于 HI 后即刻给予不同剂量 (1, 2, 8 mg/kg) 的 PFT- α 腹腔注射以及 2 mg/kg 的 PFT- α 分别在 HI 前 1 h、HI 后即刻及 HI 后 1 h 腹腔注射, 在 HI 后 72 h 灌注取脑, 进行脑损伤的大体形态学评分。结果 正常脑组织 p53 免疫组化染色偶见阳性细胞, HI 后 p53 的免疫反应性增加, 缺氧缺血侧大脑皮层、海马及纹状体的 p53 阳性细胞数明显高于正常对照组及对侧大脑半球 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。p53 阳性细胞数于 HI 后 3 ~ 8 h 达到峰值, 随后逐渐下降, 并且 p53 阳性细胞主要分布在 MAP-2 阴性区域 (脑损伤区)。采用 HI 后不同剂量及 HI 前后不同时间给予 PFT- α , 干预组脑损伤大体形态学评分与对照组相比差异无显著性 (均 $P > 0.05$)。结论 新生小鼠缺氧缺血后早期脑组织 p53 即开始表达; p53 的表达与神经细胞损伤分布区域一致; 单纯应用 p53 抑制剂 PFT- α 对未成熟脑缺氧缺血性损伤无明显保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 137-140]

[关键词] p53; 缺氧缺血, 脑; 小鼠, 新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)01-0-0

Expression of p53 in neonatal mice following hypoxia-ischemia and effects of its inhibitor on neonatal brain injury

XU Fa-Lin, ZHU Chang-Lian, WANG Xiao-Yang, QIU Lin, JI Ling, CHENG Xiu-Yong, LUAN Bin. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: xufalin72@126.com)

Abstract: Objective p53-induced apoptosis is crucial in the development of hypoxic-ischemia (HI) brain damage and neurodegenerative disorders. Some experimental research has shown that a synthetic inhibitor of p53 can protect neurons against apoptosis. This study aimed to explore the expression of p53 in neonatal mice following HI brain damage and the effect of p53 inhibitor (pifithrin- α , PFT- α) on brain damage. **Methods** HI was induced in 9-day-old mice pups by ligation of left carotid artery and 10% oxygen exposure for 55 minutes. The pups were sacrificed and the brains were taken out at 3, 8, 24, and 72 hrs post-HI. The brains were sectioned and stained with antibody against p53 and microtubule-associated protein 2 (MAP-2). PFT- α was injected intraperitoneally: in experiment 1 immediately after HI with different dosages (1, 2 and 8 mg/kg); in experiment 2 2 mg/kg at different HI times (1 hr before HI, and immediately and 1 hr after HI). Control animals without HI received injections of 0.5% dimethyl sulfoxide. Brain damage was evaluated by gross morphology scoring at 72 hrs after HI. **Results** The number of p53 positive cells in the cortex, hippocampus and striatum of the ipsilateral hemisphere increased significantly and peaked at 3-8 hrs post-HI when compared with those of contralateral hemisphere as well as normal controls. The positive cells distributed mainly in the MAP-2 negative area. Both different dosages and different injection time PFT- α treatment did not reduce the extent of brain damage. **Conclusions** The immunoactivity of p53 increased significantly as early as 3 hrs post-HI. The distribution area of p53 expression was consistent with that of brain damage. The p53 inhibitor PFT- α has no protective effects against HI brain damage in neonatal mice. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(1): 137-140]

Key words: p53; Hypoxia-ischemia, brain; Mice, neonatal

[收稿日期] 2005-09-02; [修回日期] 2006-02-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目部分资助 (编号 30470598)。

[作者简介] 徐发林, 男, 博士在读, 医师。主攻方向: 新生儿脑损伤的基础与临床研究。

新生儿缺氧缺血性脑损伤是导致新生儿致死、致残的常见疾病,其发病机制涉及急性能量衰竭、兴奋毒性、氧化应激、炎症反应、凋亡等多个方面^[1,2],其中凋亡在未成熟脑缺氧缺血导致的神经细胞死亡中起重要作用^[3],有报道^[4]显示抑制神经细胞凋亡对未成熟脑损伤动物模型有保护作用,但研究结果不一致。肿瘤抑制蛋白 p53 是体内重要的转录因子和凋亡介质,缺氧/缺血刺激后或神经系统退行病变时表达明显增加,并在凋亡级联反应的上游对细胞死亡发挥重要调控作用^[5]。有研究报道^[6,7]应用 p53 抑制剂 pifithrin- α (PFT- α) 能够有效减轻缺血、谷氨酸兴奋毒性、淀粉样 β 多肽所导致的脑损伤,但对未成熟脑缺氧缺血性脑损伤的影响尚未见报道。本研究从组织学方面探讨新生小鼠在缺氧缺血(HI)后神经细胞 p53 蛋白的表达变化及其与脑损伤的关系,并探讨应用不同剂量或者不同时间应用 p53 抑制剂 pifithrin- α 对新生小鼠缺氧缺血性脑损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 缺氧缺血脑损伤模型的制备

新生 9 日龄 C57/BL6 小鼠,雌雄兼有,经氟烷吸入麻醉,分离并结扎左颈总动脉,缝合皮肤伤口后放回母鼠笼恢复 60 min,而后将其放入充有湿化的含氧 10% 的氮氧混合气 36 °C 恒温箱 55 min 即制成脑缺氧缺血(HI)模型^[8,9]。缺氧后的新生小鼠放回母鼠笼中恢复其环境温度,在缺氧后 3, 8, 24, 72 h 处死进行脑组织学检查。空白对照组动物不进行动脉结扎和缺氧处理,在出生后第 9 天或第 12 天处死进行脑组织学相关检查。

1.2 标本的制备

实验组 32 只新生小鼠在缺氧缺血后 3, 8, 24, 72 h (每个时间点各 8 只)用 50 mg/mL 苯巴比妥 0.2 ~ 0.3 mL 腹腔注射麻醉,暴露心脏后经左心室灌注 5% 副醛-磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L pH 7.2) 5 min,分离取脑并在上述灌注缓冲液中 4 °C 浸润固定 24 h,经过等级乙醇和二甲苯脱水后进行石蜡包埋,冠状切片厚度为 5 μ m,用于免疫组织化学分析。空白对照组动物(生后第 9, 12 天各 6 只)标本的制备同上。

1.3 免疫组化染色

组织切片经过固定及脱石蜡处理后再在 10 mmol/L pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液煮沸 10 min,冷却后用 PBS 洗涤,以 4% 马正常血清阻断非特异性反应 30 min,与抗 p53 单克隆抗体(Sigma, 10 mg/

mL)或抗 MAP-2 单克隆抗体(Sigma, 2 mg/mL)4 °C 过夜孵育,PBS 洗涤后与生物素标记的马抗鼠二抗(Vector, 2 mg/mL)室温孵育 60 min,3% H_2O_2 阻源性过氧化物酶 5 min,显色用 ABC Elite 试剂盒(Vector)及 0.5 mg/mL 二氨基联苯胺(DAB), 15 mg/mL 硫酸镍胺, 2 mg/mL β -D-葡萄糖, 0.4 mg/mL NH_4Cl 和 0.01 mg/mL b-葡萄糖氧化酶(Sigma)。

1.4 细胞计数

免疫组化用 Nikon 光学显微镜观察,分别计数大脑皮层、海马 CA1 及纹状体的 p53 阳性细胞数,其中在大脑皮层损伤区(MAP-2 阴性)计数三个高倍视野下(40 $\times$ 10)p53 阳性细胞数,取其平均值。

1.5 p53 抑制剂(PFT- α)干预实验

1.5.1 方案一 新生 9 日龄 C57/BL6 小鼠分为 4 组,每组 8 只,按照上述方法进行动脉结扎和缺氧处理,于缺氧后即刻分别用 1 mg/kg, 2 mg/kg, 8 mg/kg PFT- α (剂量的选择参照文献^[6,7]略加改动)及 0.5% 二甲亚砜(DMSO)腹腔注射。

1.5.2 方案二 新生 9 日龄 C57/BL6 小鼠分为 4 组,每组 7 ~ 8 只,分别于缺氧前 1 h、缺氧后即刻及缺氧后 1 h 用 2 mg/kg PFT- α 腹腔注射,对照组于缺氧后即刻以 0.5% 二甲亚砜(DMSO)腹腔注射。上述动物于 HI 处理后 72 h 经灌注后取脑,对脑损伤程度进行评分。

1.6 脑损伤大体形态学评分标准

参照修改后的 Yager^[10,11]评分标准,通过检查脑表面来判断脑损伤程度:0 分:正常,两侧大脑半球大小一致,无可见的白色损伤区;1 分:可见一个小的白色空斑;2 分:病变侧大脑半球脑萎缩并出现较大的囊性变;3 分:病变侧仅近中线前半部分留有正常脑组织;4 分:病变侧大脑半球全部出现软化或缺失。

1.7 统计学处理

阳性细胞数以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$),显著性差异用 ANOVA Post Hoc 检验,各组间脑损伤评分用非参检验 Kruskal-Wallis 法,用 StatView 软件处理。

2 结果

2.1 p53 免疫组化染色

正常脑组织 p53 免疫组化染色偶见阳性细胞,缺氧缺血后 p53 的免疫反应性在脑损伤区域细胞核部位明显增加并呈现促颗粒状或片状致密染色(图 1)。HI 后缺氧缺血侧大脑皮层、海马及纹状体的

p53 阳性细胞数明显高于正常对照组及对侧大脑半球 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。对 HI 后 3 h 脑组织连续切片分别进行 MAP-2 和 p53 免疫组化染色发现, p53 阳性细胞主要分布在 MAP-2 阴性区域(图 2)。对 p53 阳性细胞计数显示在 HI 后 3 h 阳性细胞已经显著增加,在 8 h 达到峰值,此后显著下降,海马齿状回 p53 阳性细胞在 3 h 即达到峰值。见表 1。

表 1 小鼠缺氧缺血后不同时间点 p53 阳性细胞数的变化

($\bar{x} \pm s$)				
组别	大脑皮层	海马 CA ₁ 区	海马齿状回	纹状体
对照组(P9)	0.37 ± 0.99	0.22 ± 0.34	1.44 ± 1.81	1.44 ± 3.28
对照组(P12)	0	0	0	0
HI 后 3 h	93.45 ± 38.91	67.09 ± 25.98	196.18 ± 67.42	68.45 ± 53.91
HI 后 8 h	116.08 ± 47.11	68.58 ± 26.31	105.33 ± 50.48	75.55 ± 44.07
HI 后 24 h	57.13 ± 13.16	35.75 ± 28.07	51.38 ± 21.92	21.25 ± 10.57
HI 后 72 h	19.25 ± 10.71	5.63 ± 3.70	22.00 ± 16	32.29 ± 13.33

注:缺氧缺血后各时间点 p53 阳性细胞数与对照组相比,均 $P < 0.01$ (P9 生后 9 日龄鼠, P12:生后 12 日龄鼠)

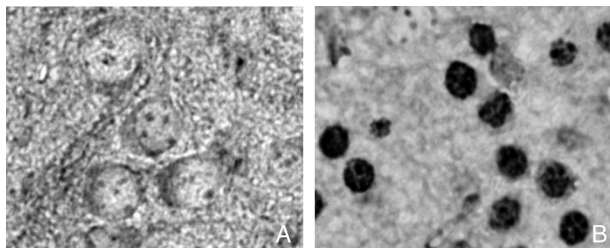


图 1 正常及缺氧缺血后神经细胞 p53 的表达 ($\times 400$)。A:正常神经细胞胞浆呈现散在点状的 p53 免疫反应性,偶见阳性细胞;B:缺氧缺血后 3 h p53 的免疫反应性在脑损伤区域细胞核部位明显增加并呈现颗粒状或片状致密染色。

3 讨论

对窒息所致的缺氧缺血性脑损伤的实验研究目前广泛采用的是 Rice-Vannucci 动物模型^[8,9],即通过结扎单侧颈总动脉并吸入低浓度的氧,导致结扎侧脑半球在缺氧期间血流减少,而在缺氧结束后血流恢复正常,因此该模型实际上是一种再灌注脑损伤模型,所造成的脑损伤包括大脑皮层、海马、丘脑及纹状体,与临床新生儿窒息所导致的脑损伤病理改变类似,而单纯结扎单侧颈总动脉或单纯吸入低浓度的氧对结扎侧脑半球的血流无明显影响,也无脑组织损伤,目前该模型已经被广泛用来研究缺氧缺血性脑损伤的发病机制以及脑损伤防治的实验研究。随着转基因技术的广泛应用,应用转基因小鼠进行脑损伤发病机制的研究具有很大优势,目前该模型已经成功用于小鼠进行脑损伤发病机制的研

2.2 p53 抑制剂 PFT- α 干预结果

本研究中首先采用不同剂量的 PFT- α 在 HI 后即刻腹腔注射,并在 72 h 进行脑损伤程度的形态学评分,发现脑损伤程度与对照组相比无明显差别 ($F_1 = 1.643, P_1 = 0.202$)。此后采用 2 mg/kg PFT- α 分别在缺氧前 1 h,缺氧后即刻和缺氧后 1 h 腹腔注射,HI 后 72 h 脑损伤程度与对照组相比也无明显差别 ($F_2 = 0.187, P_2 = 0.904$) 见表 2。

表 2 HI 后不同剂量及 HI 前后不同时间点给予 p53 抑制剂干预后脑损伤评分比较

组别	鼠数 (只)	肉眼评分	组别	鼠数 (只)	肉眼评分
对照组	8	2.88 ± 0.44	对照组	7	2.36 ± 0.69
缺氧后(1 mg/kg)	8	2.94 ± 0.42	缺血前 1 h	8	2.56 ± 0.73
缺氧后(2 mg/kg)	8	2.69 ± 0.37	缺血后 0 h	8	2.44 ± 0.56
缺氧后(8 mg/kg)	8	3.13 ± 0.35	缺氧后 1 h	8	2.38 ± 0.35
<i>F</i>		1.643			0.187
<i>P</i>		0.202			0.904

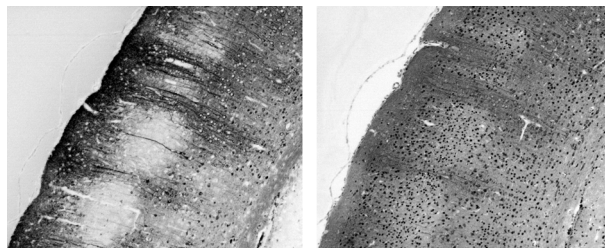


图 2 脑组织连续切片 MAP-2 和 p53 免疫组化染色 ($\times 100$)。缺氧缺血后 3 h 脑组织连续切片分别进行 MAP-2 和 p53 免疫组化染色发现,大脑皮层 p53 阳性细胞的分布(右图)与 MAP-2 阴性区域(左图)一致(MAP-2 阴性区代表脑损伤区)。

究^[4]。生后 9~12 d 小鼠脑发育程度类似足月儿。缺氧时间的长短与脑损伤的程度有关,重度脑损伤不利于脑保护作用的研究,本研究采用缺氧 55 min 所导致的脑损伤为轻中度脑损伤^[9]。

HI 后神经细胞凋亡通过外源性、内源性两条信号传导途径来完成,前者与细胞表面受体有关,后者与位于线粒体内的细胞色素 C、凋亡诱导因子的释放与转移有关。p53 对两条信号传导途径上的关键性调节点均有调控作用,但主要作用于内源性信号传导途径^[5]。研究表明 p53 既能从转录水平调节作用于线粒体上游的因子,而且影响到对凋亡起执行作用的半胱天冬酶, p53 在线粒体的重新分布早于细胞色素 C 的释放和半胱天冬酶的激活^[12]。本研究利用免疫学的方法首次证实了新生小鼠缺氧缺血性脑损伤后 p53 的表达及其时相变化,正常脑组织 p53 免疫活性较低,缺氧缺血后 p53 的免疫反应性在细胞核部位明显增加,并且 p53 阳性细胞主

要分布在脑损伤区域(MAP-2 阴性区域);在海马齿状回凋亡发生较早的区域,p53 在缺氧缺血后3 h 即达峰值;在大脑皮层、纹状体及海马 CA1,p53 在缺氧缺血后8 h 即达峰值;表明 p53 在新生鼠脑缺氧缺血后的早期即开始表达并迅速达到高峰。Leker 等^[7]发现在脑缺血后4h 内即出现 p53 的核转移,与本研究结果基本一致。在外伤性动物模型以及脑挫伤病人的标本中发现存在 p53 依赖的神经细胞损伤,p53 基因敲除大鼠在缺血后脑梗塞体积较野生型明显减少,提示 p53 在神经损伤中起重要作用^[13~15]。

p53 抑制剂 pifithrin- α (PFT- α) 系稳定的小分子亲脂类物质,经小鼠腹腔给药 30min 后即可在脑脊液中检测到^[6]。细胞培养及体内实验证明 PFT- α 对致 DNA 突变剂、缺血、淀粉样 β 多肽、谷氨酸等诱导的神经细胞凋亡,其机制与抑制 p53 核转移与 DNA 的结合、降低 p53 靶基因 Bax 的表达、保护线粒体功能、抑制半胱天冬酶的活性、加强 NF- κ B 诱导的存活信号有关^[6,16]。Culmsee^[6] 等发现在大脑中动脉结扎前 1 h 经外周应用 PFT- α (2mg/kg) 能使小鼠脑梗塞体积下降 50%,而对血压、心率、脑血流、脑部温度、血气、pH 值等却无影响。Leker 等^[7] 利用成年大鼠脑缺血动物模型进一步证实 PFT- α 不仅能抑制缺血半影区神经细胞发生凋亡、降低脑梗塞体积(主要是缺血周边区),而且能明显改善大鼠运动、行为功能。本研究采用 PFT- α 对新生小鼠脑缺氧缺血性脑损伤进行干预,参照上述文献^[6,7] 中 PFT-a 干预治疗的时间窗(缺血后 0~3 h) 及量效关系(呈 U 型曲线,剂量 2 mg/kg 时脑保护作用最明显),我们设计了缺氧后即刻不同剂量给药方式、缺氧缺血前后不同时间点给药方式等干预方案,并试图延长或缩短缺氧时间(未显示),但均未发现 PFT- α 对脑损伤有明显影响。推测可能与以下因素有关:①在动物脑发育的不同阶段,缺氧缺血所导致的神经细胞死亡的机制并不完全相同^[3]。②p53 对未成熟脑起双相调节作用,一方面促进受损神经元修复,另一方面促进不能恢复的神经元凋亡;即使对成熟脑研究结果也不完全一致,有研究^[17] 表明 p53 基因缺失动物缺血后脑损伤较野生组加重,且与 p53 缺失程度相关,提示 p53 能预防缺血后脑损伤而并非加重其发生。③p53 主要影响半胱天冬酶依赖性凋亡途径,而先前研究^[18] 发现单一应用半胱天冬酶抑制剂并不能减轻未成熟脑缺氧缺血性脑损伤。

总之,本研究首次阐明了未成熟脑缺氧缺血后

p53 表达的时相变化及其与神经细胞损伤的关系,并发现单一应用 p53 抑制剂对未成熟脑无明显保护作用,提示 p53 依赖性细胞凋亡在未成熟脑缺氧缺血性脑损伤发生过程中相当复杂。进一步研究须阐明不同发育阶段脑缺氧缺血后 p53 的表达及其 p53 抑制剂对脑损伤的影响。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 97-98.
- [2] Ferriero DM. Neonatal brain injury[J]. N Engl J Med, 2004, 351(19): 1985-1995.
- [3] Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia [J]. Cell death Differ, 2005, 12(2): 162-176.
- [4] Wang X, Zhu C, Wang X, Hagberg H, Korhonen L, Sandberg M, et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2004, 16(1): 179-189.
- [5] Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53[J]. Oncogene, 2003, 22(56): 9030-9040.
- [6] Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, et al. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid β -peptide [J]. J Neurochem, 2001, 77(1): 220-228.
- [7] Leker RR, Aharonowiz M, Greig NH, Ovadia H. The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin alpha[J]. Exp Neurol, 2004, 187(2): 478-486.
- [8] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.
- [9] Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model[J]. Dev Neurosci, 2005, 27(2-4): 81-86.
- [10] Yager JY, Heitjan DF, Towfighi J, Vannucci RC. Effect of insulin-induced and fasting hypoglycemia on perinatal hypoxia-ischemia brain damage[J]. Pediatr Res, 1992, 31(2): 138-142.
- [11] Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schratzenholz A, Sandberg M, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin [J]. J Neurochem, 2004, 91(4): 900-910.
- [12] Mihara M, Moll UM. Detection of mitochondrial localization of p53 [J]. Methods Mol Biol, 2003, 234(6): 203-209.
- [13] Hughes PE, Alexi T, Schreiber SS. A role for the tumor suppressor gene p53 in regulating neuronal apoptosis [J]. Neuroreport, 1997, 8(15): v-xii.
- [14] Crumrine RC, Thomas AL, Morgan PF. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14(6): 887-891.
- [15] Komarova EA, Gudkov AV. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of p53 inhibitors [J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(6): 657-667.
- [16] Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camandola S, et al. Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor- κ B transcriptional activities determines cell survival or death in neurons [J]. J Neurosci, 2003, 23(24): 8586-8595.
- [17] Maeda K, Hata R, Gillardon F, Hossmann KA. Aggravation of brain injury after transient focal ischemia in p53-deficient mice [J]. Mol Brain Res, 2001, 88(1-2): 54-61.
- [18] Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain [J]. J Neurochem, 2003, 86(2): 306-317.

(本文编辑: 吉耕中)