

论著·实验研究

rhIGF-1 对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠 Cyt-C 及 caspase-3 表达的影响

黑明燕¹ 黄维清² 刘芙蓉¹

(1. 中南大学湘雅三医院儿科, 湖南 长沙 410013; 2. 湖南省儿童医院新生儿科, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 探讨人重组胰岛素样生长因子-1 (rhIGF-1) 对缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 新生大鼠细胞色素 (Cyt-C) 及 caspase-3 表达的影响。方法 90 只新生 Spargue-Dawley 大鼠随机分为正常对照、HIBD 和 HIBD + rhIGF-1 组。按照 Rice-Vannucci 法制作 HIBD 模型, HIBD + rhIGF-1 组于 HI 后即刻予腹腔注射 rhIGF-1 (0.2 mg/kg)。应用 RT-PCR 和 Western blot 技术于 HI 后 24 h、48 h、72 h 分别检测 Cyt-C 及 caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达。结果 HIBD 组各时间点的 Cyt-C mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达较正常对照组均明显升高, HIBD + rhIGF-1 组的表达则较正常对照组升高、但较 HIBD 组降低, 3 组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。HIBD 组的 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白表达在各时间点均明显高于正常对照组, HIBD + rhIGF-1 组的表达则较正常对照组升高、但较 HIBD 组降低, 3 组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。Pearson 相关分析显示, HIBD 组和 HIBD + rhIGF-1 组的 Cyt-C 与 caspase-3 mRNA 和蛋白表达为直线相关关系。结论 rhIGF-1 可能通过抑制 Cyt-C 释放、减少 caspase-3 表达, 从而对新生大鼠 HIBD 发挥保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(12): 963-966]

[关键词] 缺氧缺血; 脑损伤; 胰岛素样生长因子 1; 细胞色素 C; Caspase-3; 新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)12-0963-04

Effect of rhIGF-1 on cytochrome C and caspase-3 expression in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage *in vivo*

HEI Ming-Yan, HUANG Wei-Qing, LIU Fu-Rong. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China (Email: heiming_yan@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of rhIGF-1 on the mRNA and protein expression of cytochrome C (Cyt-C) and caspase-3 in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Ninety neonatal Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control, HIBD, and HIBD + rhIGF-1 (rhIGF-1 was given intraperitoneally right after HI). Rat HIBD model was prepared according the Rice-Vannucci method. RT-PCR and Western blot methods were used to measure the mRNA and protein expression of Cyt-C and caspase-3 24, 48 and 72 hrs after HI ($n = 10$ each time point). **Results** At all time points, both Cyt-C mRNA and caspase-3 mRNA expression levels in the HIBD group increased compared with those in the normal control group, and those in the HIBD + rhIGF-1 group also increased compared with that in the normal control group but decreased compared with that in the HIBD group. There were statistical significances among the three groups ($P < 0.01$). At all time points, the changes of both Cyt-C and caspase-3 protein expression in the three groups were similar to those of the mRNA expression; both Cyt-C and caspase-3 protein expression levels increased in the HIBD group compared with those in the normal control group, and those in the HIBD + rhIGF-1 group also increased compared with those in the normal control group but decreased compared with those in the HIBD group. There were statistical significances among the three groups ($P < 0.01$). Pearson correlation analysis showed that mRNA and protein expression of Cyt-C were positively correlated to caspase-3 mRNA and protein expression in the HIBD and the HIBD + rhIGF-1 groups. **Conclusions** rhIGF-1 may inhibit the Cyt-C release and caspase-3 expression, and thus provides neuroprotection against HIBD in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(12): 963-966]

Key words: Hypoxia ischemia; Brain damage; IGF-1; Cytochrome C; Caspase-3; Neonatal rats

围产期窒息引起的缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 严重威胁着新生儿的生命和健康, 其病理基础是脑神经细胞凋亡与坏死。

目前临床针对 HIBD 无特效药物。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一种结构和功能都与胰岛素类似的多肽类神经营养因子,

[收稿日期] 2010-05-21; [修回日期] 2010-06-19

[基金项目] 湖南省科技厅基础研究科研课题 (No. 2008FJ3157)。

[作者简介] 黑明燕, 女, 博士, 副主任医师。

可调节神经细胞的生长和分化,有重要的神经保护作用。有研究显示,外源性给予 IGF-1 不降低内源性 IGF-1 的表达、并可刺激 IGF-1 受体表达的增加^[1],给予外源性 IGF-1 可减轻新生鼠 HIBD,且该神经保护作用可能与 IGF-1 通过 Akt 和 GSK3beta 途径减轻神经细胞凋亡有关^[2],因为 Akt 的激活可抑制 caspase-3 和 caspase-9 等促凋亡因子的合成^[3]。然而目前的研究报道尚未涉及到 IGF-1 的抗凋亡作用是否与其影响细胞色素 (cytochrome C, Cyt-C) 的表达有关。实验研究已证实由线粒体膜释放的 Cyt-C 在神经细胞凋亡过程中起着十分关键的作用,且其改变处于凋亡级链反应的上游水平,与 caspase-3 和 caspase-9 在凋亡过程中的表达有密切的关联^[4]。本研究拟应用 HIBD 模型,观察 IGF-1 对 HIBD 后 Cyt-C 及 caspase-3 表达的影响,探讨 IGF-1 对 HIBD 的神经保护作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及 rhIGF-1 给药

新生 7 日龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 90 只,清洁级,雌雄不限,体重 14.6 ± 1.0 g,由中南大学动物实验部提供,每次实验 9 只新生鼠,随机编号为 1 ~ 9 号,其中 1、4、7 号为对照组,2、5、8 号为 HIBD 组,3、6、9 号为 HIBD + IGF-1 组,参照 Rice-Vannucci 法^[5]制作新生大鼠 HIBD 模型(左颈总动脉结扎离断后,暴露于 92% N₂/8% O₂ 低氧环境中 2 h,用水浴箱控制舱内温度在 37℃ ± 0.5℃,湿度 65% 左右)。HIBD + IGF-1 组在 HI 后即刻给予人重组胰岛素样生长因子-1 (rhIGF-1 100 μg/支,产品编号 4119-100, Lot No: B2029, BioVision 公司生产,美国加州)腹腔注射,剂量为 0.2 mg/kg。3 组在 HI 后 24 h、48 h、72 h 3 个相应的时间点断头取脑($n = 10$)。

1.2 RT-PCR 检测脑组织 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA

用 Trisol 法提取脑组织 RNA,应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测各组脑组织 Cyt-C mRNA (引物:上游 5-AGACTATCCATGGAAGCAAG-3,下游 5-GTTCCACTGTCTGTCTCAATA-3, 478 bp) 和 caspase-3 mRNA (引物:上游 5-AGGTCCAAGTT-GCCGTTTC-3,下游 5-CAGAATGAGGACTGGGTGAG-3, 407 bp) (以 β-actin 为内参照,引物由上海生工公司合成)。共 35 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳后溴化乙锭染色,应用凝胶电泳成像分析仪的图像分

析系统进行扫描,测定产物条带面积的积分光密度值 (IA)。目的基因的相对表达强度用目的片段 (IA)/β-actin (IA) 的相对比值来表示。

1.3 Western blot 检测脑组织 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白

以 Western blot 方法检测各组脑组织 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白表达,一抗分别为兔抗 Cyt-C (SCBT 公司)和兔抗 caspase-3 (ProMab 公司);二抗为山羊抗兔 IgG (SCBT 公司),以 GAPDH 为内参照 (ProMab 公司)。

1.4 统计学分析

全部资料应用 SPSS 13.0 统计软件处理。计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均数比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用秩和检验,两两比较用 Mann-whitney 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cyt-C mRNA 及 caspase-3 mRNA 表达

各组大脑皮层均可见 Cyt-C mRNA 和 caspase-3 mRNA 的表达,其中对照组可见极少量表达,各时间点 HIBD 组表达明显增高,HIBD + rhIGF-1 组与对照组比较表达增高,与 HIBD 组比较表达减弱。见图 1,图 2。各时间点 3 组之间大脑皮层 Cyt-C mRNA 和 caspase-3 mRNA 相对密度值差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 Cyt-C 及 caspase-3 的 Western blot 结果

各组大脑皮层损伤侧均可见 Cyt-C 及 caspase-3 蛋白表达 (图 3),其中对照组各时间点可见少量表达,HIBD 组表达明显增强,HIBD + rhIGF-1 组与对照组比较表达增高,与 HIBD 组比较表达减弱,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

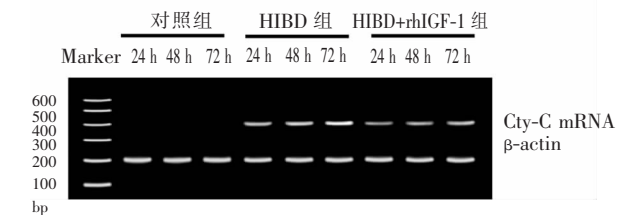


图1 脑皮质区 Cyt-C mRNA RT-PCR 电泳图 对照组大脑皮层有极少量 Cyt-C mRNA 表达,HIBD 组 Cyt-C mRNA 表达明显增高,HIBD + rhIGF-1 组 Cyt-C mRNA 表达亦较明显,但与 HIBD 组比较表达减弱。

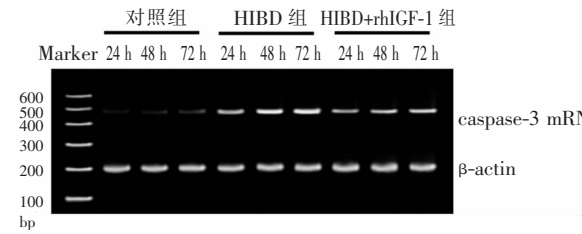


图2 脑皮质区 caspase-3 mRNA RT-PCR 电泳图 各组大脑皮层均可见 caspase-3 mRNA 表达,其中对照组可见少量表达,HIBD 组表达明显增高,HIBD + rhIGF-1 组与对照组比较表达增高,与 HIBD 组比较表达减弱。

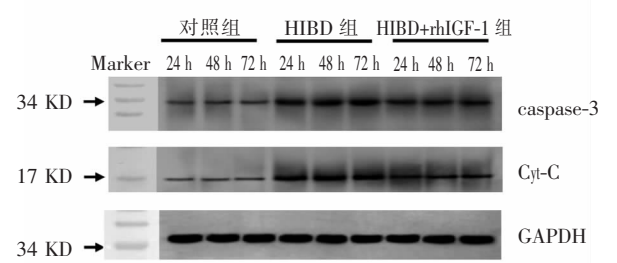


图3 脑皮质区 Cyt-C 及 caspase-3 Western blot 电泳图 各组大脑皮层损伤侧均可见 Cyt-C 及 caspase-3 蛋白表达,其中对照组可见少量表达,HIBD 组表达明显增强,HIBD + rhIGF-1 组与对照组比较表达增高,与 HIBD 组比较表达减弱。

表1 各组不同时间点脑皮质 Cyt-C 及 caspase-3 mRNA 相对密度值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Cyt-C mRNA			caspase-3 mRNA		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.06	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.08	0.17 ± 0.04
HIBD 组	0.61 ± 0.05 ^a	0.52 ± 0.04 ^a	0.45 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.03 ^a	0.54 ± 0.06 ^a	0.40 ± 0.05 ^a
HIBD + rhIGF-1 组	0.47 ± 0.07 ^{a,b}	0.42 ± 0.05 ^{a,b}	0.40 ± 0.04 ^{a,b}	0.49 ± 0.05 ^{a,b}	0.45 ± 0.03 ^{a,b}	0.38 ± 0.06 ^{a,b}
F 值	23.425	31.661	28.127	20.038	19.779	18.543
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 HIBD 组比较, $P < 0.05$

2.3 Cty-C 及 caspase-3 的 mRNA 表达与蛋白印记表达的相关性

2.3.1 Cyt-C 与 caspase-3 mRNA 的相关性分析

HIBD 组大脑皮质区 Cyt-C mRNA 灰度值与 caspase-3 mRNA 灰度值 *Peason* 的相关系数 $r = 0.974, P < 0.001$,提示二者之间为正性直线相关关系。IGF-1 + HIBD 组大脑皮质区 Cyt-C mRNA 灰度值与 caspase-3 mRNA 灰度值 *Peason* 的相关系数 $r = 0.888, P < 0.001$,也提示二者之间为正线直线相关关系。

2.3.2 Cyt-C 与 caspase-3 蛋白的相关性分析

HIBD 组大脑皮质区 Cyt-C 灰度值与 caspase-3 灰度值 *Peason* 的相关系数 $r = 0.955, P < 0.001$,提示二者之间为正线直线相关关系。HIBD + rhIGF-1 组大脑皮质区 Cyt-C 灰度值与 caspase-3 灰度值 *Peason* 的相关系数 $r = 0.877, P < 0.001$,亦提示二者之间为正线直线相关关系。

3 讨论

线粒体是细胞的“能量制造者”,线粒体功能障碍在神经细胞凋亡和坏死中起着初始的重要作用^[6]。Cyt-C 由线粒体释放^[7],在激活 caspase、诱导细胞凋亡方面起重要作用^[8-9]。本研究应用 RT-

PCR 及 Western blot 方法证实 Cyt-C 及 caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平在 HIBD 后 24 h 均明显增高,HIBD 后 3 d 均维持较高水平。且二者的表达之间存在正相关关系,提示二者在 HIBD 发病机制中有紧密的关联。Chandra 等^[10]也报道,当细胞受到凋亡刺激时,Cyt-C mRNA 表达上调,编码合成 Cyt-C 增多。刘薇等^[11]利用局灶性脑梗死大鼠模型的研究发现,IGF-1 的增加与减轻局灶性脑梗死导致的缺血性损伤之间存在正相关关系。本研究结果与这两项研究结果相吻合。Cyt-C 从线粒体释放到胞浆中,激活 caspase 酶导致凋亡而活化的 caspase-3 可以反过来作用于线粒体,引发线粒体 Cyt-C 的释放,Cyt-C 经 caspase 级联反应又可以激活 caspase-3,构成 Cyt-C 释放的正反馈调节机制^[12]。

在应用动物模型进行 IGF-1 神经保护作用的研究报道中,分别有不同的 IGF-1 给药途径。李玉红等^[13]研究采用经尾静脉注射 IGF-1,发现 HIBD 后损伤部位脑组织神经细胞总数、病变神经细胞数等在 IGF-1 干预后明显增多,提示 IGF-1 静脉给药对 HIBD 新生大鼠的脑损伤具有保护作用,推测可能与新生动物血脑屏障未成熟、损伤后通透性增高等有关。Lin 等^[14]应用侧脑室注射的方法证实,IGF-1 可通过改善脑室周围少突胶质细胞前体细胞的功能而减轻缺氧缺血大鼠脑白质损伤。刘新峰等^[15]利

用大鼠大脑中动脉闭塞脑缺血再灌注模型,应用¹²⁵I标记和放射自显影技术,证实经鼻嗅觉通路给予IGF-1,其脑神经保护作用优于静脉给药途径。但对于新生大鼠,经侧脑室注射给药对新生大鼠的机械损伤较大,经尾静脉静脉给药难度较大、经鼻吸入给药较难控制准确的吸入药量,实际可操作性均较差。Sizonenko等^[16]通过比较大鼠HI后侧脑室和腹腔注射这两种不同的给药方式,认为IGF-1腹腔注射神经保护范围更大,疗效更佳。因此,本实验选择腹腔注射给药途径。

动物实验研究结果显示,大脑缺氧缺血损伤后给予经鼻吸入IGF-1,损伤部位的IGF-1浓度较未损伤部位明显增高,提示缺氧缺血损伤可以促进IGF-1透过血脑屏障,但机制尚不清楚^[17]。该研究还发现HIBD后0h及1h给与IGF-1可减轻脑损伤,而HIBD后2h给予IGF-1则没有神经保护作用,提示IGF-1的治疗窗可能在HIBD后1h内。本研究采用的给药时间为HIBD后0h,符合上述研究报道的IGF-1治疗窗。IGF-1作为非选择性神经营养因子,作用于中枢神经系统发育和成熟的全过程,参与神经系统的增生、分化和神经功能的维持和调节,对缺血损伤后的凋亡有明显的抑制作用^[18],一直是HIBD研究中的热点之一。有临床研究报道,对于急性脑梗死患者给予外源性IGF-1能缩小脑梗死范围,改善神经功能,具有神经保护^[19],同时,IGF-1还可降低脑血管阻力从而增加脑的血供,阻止神经元和胶质细胞的凋亡^[20]。本研究发现HIBD+IGF-1组与HIBD组Cyt-C及caspase-3 mRNA及蛋白表达均下调,且差异具有统计学意义($P<0.01$),提示IGF-1可以通过抑制线粒体Cyt-C的释放,从而抑制caspase-3的表达,使神经细胞凋亡的减少,发挥对HIBD的神经保护作用。

综上所述,rhIGF-1能减少新生大鼠HIBD大脑皮层Cyt-C及caspase-3 mRNA和蛋白表达,从而减少神经细胞凋亡,对新生大鼠HIBD发挥神经保护作用。

致谢:衷心感谢中南大学湘雅三医院中心实验室高长青老师、向红老师、黄利华老师及中南大学基础医学院解剖教研室雷得亮老师给予本课题的实验指导和无私帮助。

[参 考 文 献]

[1] 王楸,陈超,刘登礼,杨毅,陈莲. 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)对缺氧缺血脑损伤新生鼠内源性IGF-1和IGF-1受体基因表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2004,6(6):470-473.
[2] Bryve KG, Mallard C, Gustavsson M, Hedtj rn M, Leverin AL, Wang X, et al. IGF-1 neuroprotection in the immature brain after

hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(6): 1489-1502.
[3] Fukunaga K, Kawano T. Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult [J]. J Pharmacol Sci, 2003, 92(4): 317-327.
[4] Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Wang X. Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria [J]. J Child Neurol, 2009, 24(9): 1141-1146.
[5] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neuro, 1981, 19(2): 131-141.
[6] Greenwood SM, Mizielinska SM, Frenguelli BG, Harvey J, Connolly CN. Mitochondrial dysfunction and dendritic beading during neuronal toxicity [J]. J Biol Chem, 2007, 282(36): 26235-26244.
[7] 朱玉山,陈佳. 线粒体与细胞凋亡调控[J]. 生命科学,2008,8(20):507-513.
[8] Eldering E, Mackus WJ, Derks IA, Evers LM, Beuling E, Teeling P, et al. Apoptosis via the B cell antigen receptor requires Bax translocation and involves mitochondrial depolarization, cytochrome C release, and caspase-9 activation [J]. Eur J Immunol, 2004, 34(7): 1950-1960.
[9] Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, et al. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis [J]. Cell, 2005, 121(4): 579-591.
[10] Chandra D, Liu J, Tang DG. Early mitochondrial activation and cytochrome C up-regulation during apoptosis [J]. Biol Chem, 2002, 277(52): 50842-50854.
[11] 刘薇,张祥建,狄楠,胡明,崔海英,闫国华,等. BRF对局灶性脑梗死大鼠脑组织IGF-1表达的影响[J]. 脑与神经疾病杂志,2008,16(4):328-331.
[12] Xia T, Jiang C, Li L, Wu C, Chen Q, Liu SS. A study on permeability transition pore opening and cytochrome C release from mitochondria, induced by caspase-3 in vitro [J]. FEBS Lett, 2002, 510(1-2):62-66.
[13] 李玉红,田兆方. 不同途径应用胰岛素样生长因子-1对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的影响[J]. 临床神经病学杂志,2005,18(4):285-287.
[14] Lin S, Fan LW, Pang Y, Rhodes PG, Mitchell HJ, Cai Z. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitor cells and improves neurological functions following cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat [J]. Brain Res, 2005, 1063(1):15-26.
[15] 刘新峰,管亚东,周国庆,William H Frey II. 胰岛素样生长因子-1经鼻给药可进入中枢神经系统并有效治疗实验性脑梗死[J]. 中华神经科杂志,2004,37(2):149-152.
[16] Sizonenko SV, Sirimanne ES, Williams CE, Gluckman PD. Neuroprotective effects of the N-terminal tripeptide of IGF-1, glycine-proline-glutamate, in the immature rat brain after hypoxic-ischemic injury [J]. Brain Res, 2001, 922(1):42-50.
[17] Lin S, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. Exp Neurol, 2009, 217(2): 361-370.
[18] 刘红峰,孙若鹏,范秀芳,郝素媛,田丽萍. 新生儿窒息及缺氧缺血性脑病胰岛素样生长因子1水平变化及临床意义[J]. 中国新生儿科杂志,2007,22(2):95-96.
[19] 宋洪波,彭广军,张淑艳,曹国辉. 胰岛素样生长因子-1在急性进展性脑梗死中的神经保护作用[J]. 第四军医大学学报,2009,30(6): 576-578.
[20] 苏军,章翔,吴景文. 损伤大鼠脑皮层胰岛素样生长因子-1及其受体的表达改变[J]. 中国临床康复,2003,7(7): 1078-1080.

(本文编辑:王霞)