

·论著·

胰岛素样生长因子21 (IGF21) 对缺氧缺血 脑损伤新生鼠内源性 IGF21 和 IGF21 受体基因表达的影响

王楸,陈超,刘登礼,杨毅,陈莲

(复旦大学儿科医院新生儿科,上海 200032)

[摘要] 目的 胰岛素样生长因子21 (IGF21) 对损伤的神经组织有修复作用,但外源性 IGF21 是否会抑制内源性 IGF21、IGF21 受体的生成,从而减弱 IGF21 的神经保护作用尚不明确。本文通过观察 IGF21 治疗新生大鼠缺血缺氧脑损伤 (HIBD) 后脑 IGF21 和 IGF21 受体 mRNA 水平的变化,研究 IGF21 对 HIBD 新生大鼠内源性 IGF21、IGF21 受体的影响。方法 制作新生大鼠 HIBD 模型,用原位杂交方法观察 HIBD 后各时间点海马和大脑皮层 IGF21 和 IGF21 受体基因表达的动态变化,并比较 IGF21 治疗组与未治疗组 HIBD 后 12 h、72 h IGF21、IGF21 受体 mRNA 的表达水平。结果 HIBD 后 48h 海马 IGF21 和 IGF21 受体 mRNA 开始升高,72h 达高峰。损伤后 120h, IGF21 mRNA 降至正常水平,而 IGF21 受体 mRNA 仍处于较高水平。在皮层,IGF21 和 IGF21 受体 mRNA 开始升高时间稍早于海马,24 h 上升,96 h 降至正常,但是上升幅度相对较小。与未治疗组比较,IGF21 治疗后内源性 IGF21 表达无明显变化。IGF21 受体的表达在治疗后 12 h 无明显差别,但在 72 h 时显著增加。结论 HIBD 后皮层、海马等脑损伤区的 IGF21 和 IGF21 受体表达均升高。给予外源性 IGF21 后并不降低内源性 IGF21 的表达,还能刺激 IGF21 受体表达增加。
[中国当代儿科杂志,2004,6(6):470-473]

[关键词] 胰岛素样生长因子21;受体,胰岛素样生长因子;缺氧缺血,脑;大鼠,新生

[中图分类号] R722.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)06-0470-04

Effects of insulin2like growth factor21 (IGF21) on the expressions of IGF21 and IGF21 receptor in neonatal rats with hypoxic2ischemic brain damage

Qiu WANG, Chao CHEN, Deng2Li LIU, Yi YANG, Lian CHEN. Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China (Email:chenchao115@hotmail.com)

Abstract : Objective The insulin2like growth factor21 (IGF21) can protect damaged neurological system, but it is unknown whether exogenous IGF21 can inhibit the productions of endogenous IGF21 and IGF21 receptor. This study aims to observe the changes of the expressions of IGF21 and IGF21 receptor mRNA in neonatal rats with hypoxic2ischemic brain damage (HIBD) and to explore the effects of IGF21 treatment on endogenous IGF21 and IGF21 receptor. **Methods** Seven2day2old rats were subjected to unilateral carotid artery ligation and hypoxia exposure to establish a HIBD model. In situ hybridization was used to observe the changes of the expressions of IGF21 and IGF21 receptor mRNA in the injured regions of neonatal rats at different time points following HIBD. The expressions of endogenous IGF21 and IGF21 receptor mRNA between the HIBD group and the IGF212treated group at 12 hrs and 72 hrs following HIBD were compared by semi2quantitative analysis. **Results** The expressions of IGF21 and IGF21 receptor mRNA in the hippocampus began increasing at 48 hrs following HIBD, and reached a peak at 72 hrs. At 120 hrs post2damage, the expression of IGF21 mRNA decreased to normal, while the expression of IGF21 receptor mRNA maintained at a high level. In the cortex, the expressions of IGF21 and IGF21 receptor mRNA began increasing at 24 hrs post2damage, and decreased to normal at 96 hrs but their increased extent was less than that in the hippocampus. The expression of

[收稿日期] 2004-06-22; [修回日期] 2004-08-30

[基金项目] 国家自然科学基金(编号39770774)和上海市卫生局“百人计划”(编号98BR041)资助课题。

[作者简介] 王楸(1970-),女,硕士,主治医师,现在温州医学院附属第一医院新生儿科,邮编:325000。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者] 陈超,上海市枫林路183号复旦大学儿科医院新生儿科,邮编:200032。

endogenous IGF21 mRNA was not changed after IGF21 treatment compared with the untreated HIBD group. The expression of endogenous IGF21 receptor mRNA remained unchanged 12 hrs after IGF21 treatment, but significantly increased at 72 hrs. **Conclusions** IGF21 and IGF21 receptor mRNA in the cortex and the hippocampus increase after HIBD. Exogenous IGF21 has no effect on the expression of endogenous IGF21, but can upregulate the expression of IGF21 receptor. [Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(6): 470 - 473]

Key words: Insulinlike growth factor21; Receptor, insulinlike growth factor21; Hypoxia2ischemia, brain; Rat, neonatal

缺氧缺血性脑病(hypoxic2ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期死亡和致残的重要原因之一。目前HIE的治疗缺乏特别有效的手段,寻找新的治疗HIE的药物,对降低新生儿的死亡率和致残率,有十分重要的临床意义。近年发现,一些神经营养因子和生长因子能促进神经生长发育及受损神经细胞再生修复,如胰岛素样生长因子(insulin2like growth factor, IGF)。转基因鼠研究发现,IGF21过度表达的鼠出生后神经细胞和少突胶质细胞数目增加,髓磷脂和脑重也明显升高^[1]。脑缺血损伤后,IGF21治疗可明显缩小脑皮层梗死范围,减少神经元缺失,改善躯体感觉功能^[2]。但IGF21的治疗是否会影响内源性IGF21及其受体表达,目前还不清楚。本实验采用新生大鼠缺氧缺血脑损伤(hypoxic2ischemic brain damage, HIBD)模型,经侧脑室注射IGF21,观察其对内源性IGF21和IGF21受体的影响。

1 材料和方法

1.1 实验分组

54只7日龄SD大鼠(购自中科院实验动物中心),性别不拘,随机分为9组,每组6只,分别为缺血缺氧后3、6、12、24、48、72、96、120 h组和假手术组。观察新生鼠HIBD后IGF21和IGF21受体表达的变化规律。24只7日龄SD大鼠制成HIBD模型,随机分成IGF21治疗组和非治疗组,每组又分为HIBD后12 h和72 h两亚组,每亚组各6只。

1.2 模型制备和取材

参照Rice^[3]方法制备HIBD模型:将大鼠乙醚麻醉后切开颈部皮肤,结扎右侧颈总动脉,2.5 h后放入缺氧罐中,吸入8%氧气2 h,制成新生大鼠HIBD模型。假手术组大鼠仅切开颈部皮肤,分离右侧颈总动脉,不结扎不缺氧,作为正常对照。缺血时限到后处死大鼠,断头取脑,OCT包埋后放入-70℃保存。用冰冻切片机在视交叉水平后2 mm处冠状切片,切片厚10 μm,进行原位杂交。

侧脑室注射:治疗组大鼠于HIBD后2 h进行

IGF21侧脑室注射。rhIGF21由Promega公司提供。立体定位注射采用Haley方法^[4],经过改良。动物经乙醚吸入麻醉后,用自制的两个相连的纸板盒固定大鼠,暴露颅顶部位,取两耳连线前4 mm,颅骨中线旁开2 mm为进针点,用微量注射器进针3.5 mm,进入侧脑室,向内缓慢推注IGF21 10 μg(5 μl)。非治疗组不注射药物。

1.3 原位杂交

IGF21和IGF21受体cDNA探针由德国Kies博士惠赠,采用Boehringer Mannheim公司DIG2 dUTP标记的RNA探针试剂盒标记探针。冰冻切片用4%多聚甲醛固定,PBS洗涤,5×SSC平衡,58℃预杂交2 h(预杂交液:50%甲酰胺,5×SSC,40 μg/ml鱼精蛋白DNA),58℃杂交过夜(杂交液:上述预杂交液中加入标记好的探针)。杂交后处理:依次用2×SSC室温、2×SSC 65℃、0.1×SSC 65℃洗涤,加入地高辛抗体(1:5000),室温2 h,再用缓冲液洗涤,NBT、BCIP显色后,封片。用德中公司提供的临床病理图象分析系统进行光密度测定。

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0软件进行组间t检验。

2 结果

2.1 HIBD后新生大鼠脑内IGF21及其受体mRNA变化

HIBD后48 h海马IGF21和IGF21受体mRNA开始升高,72 h达高峰,IGF21 mRNA 120 h降至正常水平,而IGF21受体mRNA仍处于较高水平。在皮层,IGF21和IGF21受体mRNA开始升高时间稍早于海马,24 h上升,96 h降至正常,但是上升幅度相对较小。见图1(封二)和图2。

2.2 IGF21对HIBD新生大鼠脑内IGF21及其受体mRNA的影响

rhIGF21治疗组的海马IGF21 mRNA表达在HIBD后12 h和72 h较非治疗组略有下降,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。IGF21治疗组IGF21受体的表达比较在HIBD后12 h无明显差别;但在

HIBD 后 72 h 显著比未治疗组增加 ($P < 0.05$)。 见表 1 和封二图 3。

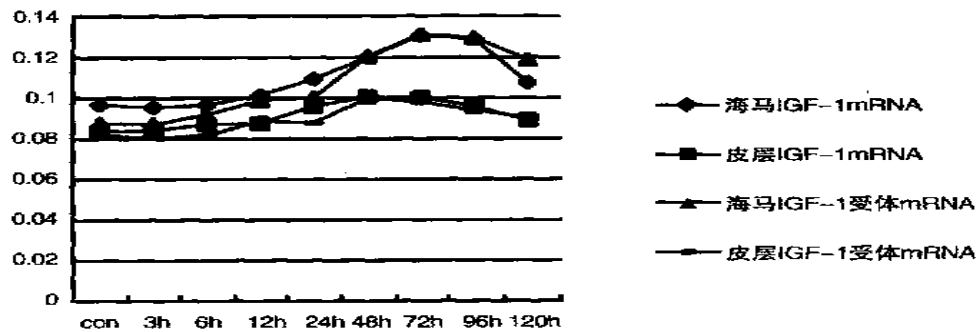


图 2 HIBD 后大鼠皮层和海马的 IGF21 及其受体 mRNA 的表达变化

Figure 2 Changes of IGF21 and IGF21 receptor mRNA expressions in the cortex and hippocampus of the rats following HIBD

表 1 IGF21 治疗组与非治疗组 IGF21 和 IGF21 受体 mRNA 的表达

Table 1 Expressions of IGF21 and IGF21 receptor mRNA in the IGF21treated and untreated groups

(n = 6 , $\bar{x} \pm s$)

	IGF21 mRNA		IGF21 受体 mRNA	
	HIBD 后 12 h	HIBD 后 72 h	HIBD 后 12 h	HIBD 后 72 h
非治疗组	0.101 ±0.010	0.131 ±0.016	0.098 ±0.008	0.131 ±0.010
治疗组	0.096 ±0.013	0.129 ±0.017	0.103 ±0.009	0.147 ±0.013
t 值	1.536	0.584	0.895	2.786
P 值	0.185	0.585	0.412	0.039

3 讨论

IGF 是一类既有胰岛素样合成代谢作用,又有促生长作用的多肽,包括 IGF21 和 IGF22。IGF21 的结构与胰岛素相似,是一种含 70 个氨基酸的碱性多肽,分子量为 11 kD,主要由肝脏产生,通过胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)转运至组织,与其受体结合产生多种生理效应。与胰岛素不同的是 IGF21 可以由体内大多数组织产生,如肝、肺、脑等,既通过内分泌,又通过自分泌/旁分泌机制起作用。IGF21 受体属细胞膜受体酪氨酸激酶系统,与 IGF21 有高度亲和力。本实验发现 IGF21 及其受体在脑中的分布广泛,大脑皮层、海马、纹状体和下丘脑等部位均有表达(结果未显示),与文献报道一致^[5]。

近年研究发现 IGF21 在调节神经生长,促进神经细胞的再生、修复方面同样有重要作用^[4,6]。本实验显示,脑缺血缺氧后 48 h IGF21 的表达开始上升,72 h 达高峰,与病理损伤基本同步,提示随着损伤的加重,IGF21 及其受体的合成增多,促进受损区神经胶质细胞分化、增生,轴突的修复,参与神经元的修复和再生工作,发挥神经保护作用。海马区对缺氧耐受程度高于皮层区^[3],其 IGF21 mRNA 及

IGF21 受体 mRNA 的表达水平亦高于皮层,提示 IGF21 合成越多,可能神经元的保护效应越好。

不仅内源性 IGF21 有神经保护作用,离体和在体实验都发现外源性 IGF21 也能减少神经细胞坏死和凋亡,促进神经再生和修复^[7,8],可能是一种有效的治疗脑损伤的药物。但是给予外源性的 IGF21 后是否会负反馈地抑制内源性的 IGF21 的表达而抵消或削弱它的作用?本实验显示给予外源性 IGF21 后 12 h、72 h,海马神经元 IGF21 的基因表达略有下降,但差异无显著性意义,提示 IGF21 的治疗并不会抑制内源性 IGF21 基因的表达。有报道外周循环中 IGF21 浓度增加伴有 IGF21 受体数目减少;IGF21 受体基因表达和结合力增加继发于 IGF21 的下降,提示 IGF21 对 IGF21 受体可能有负反馈调节作用^[9],而 Merrill 等^[10]却认为 IGF21 受体虽广泛分布于脑组织中,但其 α 亚基较其它组织的小 15 kD,使其失去了负反馈功能,因而脑组织中 IGF21 的含量升高不能抑制 IGF21 受体。本实验显示给予 IGF21 治疗后 72 h 海马神经元 IGF21 受体的表达明显增多,提示外源性 IGF21 反而能刺激 IGF21 受体上调,随着脑脊液和脑血管中 IGF21 浓度的增加,需要与更多的受体结合,以发挥更大的生物学效应。这个结果与 Merrill 等的观点相一致。本实验显示

在给药后 12 h, IGF21 治疗组受体的表达与对照组无明显差异, 72 h 才明显高于对照组, 这提示 IGF21 受体上调需要一定的时间。

这些结果提示给予外源性 IGF21 治疗新生大鼠 HIBD 时并不削弱内源性 IGF21 的神经保护作用, 为 IGF21 治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床应用提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. Mutant mouse models of insulinlike growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides*, 2002, 36(2-3): 209-220.
- [2] Guan J, Miller OT, Waugh KM, McCarthy DC, Gluckman PD. Insulinlike growth factor21 improves somatosensory function and reduces the extent of cortical infarction and ongoing neuronal loss after hypoxiaischemia in rats. *Neuroscience*, 2001, 105(2): 299-306.
- [3] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxicischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [4] Haley TJ, McCormick WG. Pharmacological effects produced by

intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol*, 1957, 12(1): 12-15.

- [5] Yamaguchi F, Itano T, Mizobuchi M, Miyamoto O, Janjua NA, Nastui H, et al. Insulinlike growth factor21 distribution in the tissue and extracellular compartment in different regions of rat brain. *Brain Res*, 1990, 533(2): 344-347.
- [6] Glazner GW, Morrison AE, Ishii DN. Elevated insulinlike growth factor (IGF) gene expression in sciatic nerves during IGF2supported nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 25(3-4): 265-272.
- [7] Caroni P, Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulinlike growth factors. *J Cell Biol*, 1990, 110(4): 1307-1317.
- [8] Guan J, Williams C, Gunning M, et al. The effects of IGF21 treatment after hypoxicischemic brain injury in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13(4): 609-616.
- [9] LeRoith D, Werner H, BeitnerJohnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulinlike growth factor I receptor. *Endocr Rev*, 1995, 16(2): 143-163.
- [10] Merrill MJ, Edwards NA. Insulinlike growth factor21 receptors in human glial tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71(1): 199-209.

(本文编辑:钟乐)

消息

《中国小儿血液》杂志征稿征订启事

《中国小儿血液》杂志是经国家科技部和新闻出版署批准,由中华人民共和国卫生部主管,中日友好医院和全国小儿血液研究中心主办的国家级学术期刊。本刊设有专家述评、论著、实验研究、论著摘要、临床经验交流、病例报告、临床病理(例)讨论、综述等栏目。该杂志在科学性、实用性的基础上,主要反映我国小儿血液与肿瘤临床、科研及预防医学的动态和成果,传递国内外小儿血液与肿瘤研究进展的最新信息,推广小儿血液与肿瘤研究的新技术和新方法。读者对象为儿科及与儿科相关学科医务人员以及从事小儿血液及肿瘤的各级临床医生、实验室研究人员及相关研究人员,并兼顾基层。《中国小儿血液》杂志 1996 年 2 月创刊,国内统一刊号为 CN 11-3740/R,国际刊号为 ISSN 1006-9526。邮发代号 92-794,国外发行代号 BM6560。该杂志为双月刊,16 开 48 页标准开本,双月 17 日出版,国内外发行。每期定价:5.00 元,全年:30.00 元。

本刊欢迎以下专业的各种形式的论文:小儿血液专业、小儿肿瘤(包括部分实体瘤)的临床、实验室研究以及与之相关的免疫学、遗传学、细胞与分子生物学等方面的基础与临床研究;小儿血液与肿瘤相关造血干细胞移植的临床与基础研究;对从事小儿血液与肿瘤治疗的各级临床医生具有较强实用性与指导意义的各种讲座、诊疗方案、诊疗新技术新方法,经验、体会及特殊个案等方面的文章。论文书写格式及具体要求请参照 2004 年第 1 期第 47 页《中国小儿血液》稿约,论文一式两份,有条件者请附 3.5 英寸软盘(word 或纯文本格式)。来稿请寄北京市中日友好医院内《中国小儿血液》编辑部,勿寄给个人。

欢迎投稿,欢迎订阅!

地址:北京市中日友好医院内《中国小儿血液》编辑部,邮编:100029,电话:010-64284327,010-84205165,网址:zgxy.chinajournal.cn, zgexy.periodicals.net.cn; Email:zgxy@chinajournal.net.cn, zgexy@periodicals.net.cn.

Insulin-like growth factor-1 reduces β -amyloid precursor protein expression after ischemic white matter damage in nearterm fetal sheep

(These figures refer to the paper on page 449)



Figure 1 Brain white matter ($\times 1$)

Note: The GFAP, IB4 and APP positive cells and MBP densities were measured in the areas 1, 2 and 3.

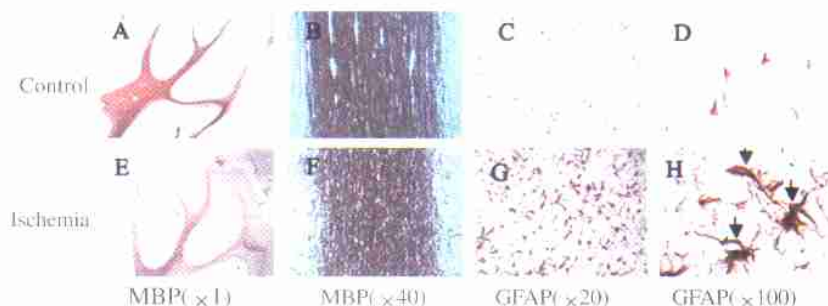


Figure 2 MBP and GFAP immunohistochemistry

Note: MBP staining was compact in normal white matter (A) and its arrangement was consistent with axons under high magnification (B). Ischemia led to a marked loosening of MBP staining (E, F). GFAP positive cells could be found in the white matter of the Normal group (C, D), while the cells markedly increased and became hypertrophy after ischemia (G, H).



Figure 3 Double immunofluorescence showed the β -APP and GFAP double positive cells.

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

(正文见第 470 页)

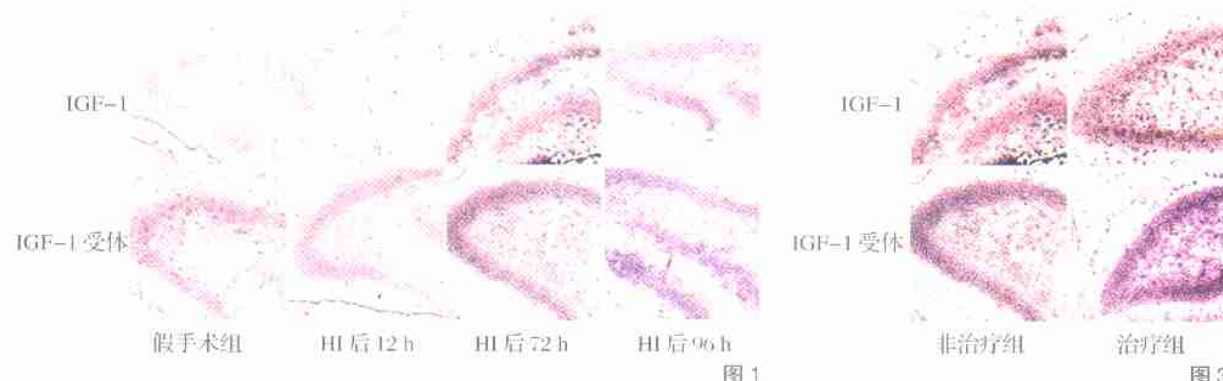


图 1 HIBD 后海马 IGF-1 和 IGF-1 受体 mRNA 表达的变化 (原位杂交, $\times 100$)

Note: Expressions of IGF-1 receptor and IGF-1 receptor mRNA in the hippocampus increased after HI, and reached a peak at 72 hrs post-damage.

图 3 缺氧缺血后 72 小时, IGF-1 治疗组与非治疗组 IGF-1 和 IGF-1 受体 mRNA 表达 (原位杂交, $\times 100$)

Note: After rhIGF-1 treatment, the expression of IGF-1 mRNA in the hippocampus slightly decreased, while IGF-1 receptor mRNA expression significantly increased at 72 hrs post-damage as compared with the untreated group.