

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0043-04

• 实验研究 •

大鼠局灶性脑缺血再灌注后凋亡分子 C/EBP同源蛋白的表达变化

申向民^{1,2}, 杨期东¹, 谭利明², 刘运海¹, 唐震宇¹, 黄清¹, 周琳¹

(中南大学 1. 湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008 2. 湘雅二医院神经内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 脑缺血再灌注; 凋亡; C/EBP同源蛋白

[摘要] 目的 观察大鼠脑缺血再灌注后凋亡分子 C/EBP同源蛋白的表达变化, 探讨该分子对神经细胞凋亡的影响。方法 制备 SD 大鼠大脑中动脉闭塞模型, 逆转录聚合酶链反应法、免疫组织化学染色分别测定大鼠脑缺血半暗带区再灌注后不同时相 C/EBP同源蛋白 mRNA 及蛋白的表达变化; 缺口末端标记法测定神经细胞凋亡。结果 模型组 C/EBP同源蛋白 mRNA 表达于再灌注后 12 h 达高峰, 其蛋白表达于再灌注后 24 h 达高峰, 与神经细胞凋亡变化趋势相平行。结论 大鼠脑缺血再灌注可诱导 C/EBP同源蛋白表达, C/EBP同源蛋白在缺血再灌注所致神经细胞凋亡中可能发挥重要作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Expression Development of Proapoptotic Molecule C/EBP Homology Protein mRNA and Protein Following Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats

SHEN Xiang-Min^{1,2}, YANG Qidong¹, TAN Liming², LIU Yunhai¹, TANG Zhenyu¹, HUANG Qing¹, and ZHOU Lin¹

(1. Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008 2. Department of Neurology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia/Reperfusion; Apoptosis; C/EBP Homology Protein

[ABSTRACT] **Aim** To detect the expression development of proapoptotic molecule C/EBP homology protein (CHOP) mRNA and protein and explore its effect on neuronal apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion in rats. **Methods** Transient focal cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 hours followed by reperfusion in sprague-dawley rats. Then, the expression of CHOP protein and/or mRNA were measured with methods of immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h after reperfusion in cerebral cortex of rats. The neuronal apoptosis was detected by the method of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). **Results** In cerebral ischemia model group, the expression level of CHOP mRNA reached a peak at 12 h after reperfusion and that of CHOP protein reached a peak at 24 h after reperfusion, which paralleled with the tendency of neuronal apoptosis development. **Conclusion** Cerebral ischemia/reperfusion may induce CHOP expression. CHOP may play an important role in neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion.

脑缺血再灌注后存在钙稳态失衡和过氧化损伤, 由此可引起内质网应激^[1], 激活未折叠蛋白反应, 使蛋白质折叠能力提高、蛋白质翻译水平下降以适应应激, 但是长时间过强的应激则诱发细胞凋亡^[2,3]。C/EBP同源蛋白 (C/EBP homology protein, CHOP) 是 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 转录因子家族成员, 非应激条件下 CHOP 的表达水平低下, 但在转录水平应答内质网应激时表达明显增加。

CHOP 是内质网应激的经典标志物, 为介导内质网应激所致细胞凋亡的重要分子之一^[4], 在大鼠局灶性脑缺血再灌注后缺血脑组织表达的动态变化鲜有报道。本研究应用 SD 大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型, 检测局灶性脑缺血再灌注后缺血半暗带 CHOP 的表达变化, 同时在相应部位进行原位凋亡检测, 以探讨两者之间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

144 只 10~12 周龄健康雄性清洁级 SD 大鼠, 体重 230~280 g 随机分为假手术组和模型组, 每组

[收稿日期] 2009-09-28 [修回日期] 2010-01-05

[作者简介] 申向民, 博士, 主治医师, 主要研究方向为脑血管病及痴呆, E-mail 为 sm010001@126.com。通讯作者杨期东, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管病及痴呆。谭利明, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为神经免疫性疾病及脑血管病。

动物按处死的时间点又分为再灌注 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 和 72 h 六个亚组, 每组 12 只动物。

1.2 动物模型的制作

参考 Longa 等^[5]报道的线栓法制备局灶性大脑中动脉闭塞脑缺血模型, 线栓保留 120 min 后拔出即形成再灌注。假手术组线栓插入深度为 8~10 mm, 使大脑中动脉起始部不致阻塞, 余操作同模型组。手术过程及动物苏醒期间, 保持动物体温正常。

1.3 缺血半暗带 C/EBP 同源蛋白 mRNA 表达的测定

取缺血侧顶叶大脑皮质约 100 mg (冠状面距额极 7~11 mm, 扇形分出缺血半暗带, 即大脑纵裂到大脑外侧沟皮质上 1/3), 迅速放入已编号的冻存管中, 于液氮中保存备用。用异硫氰酸胍法提取缺血半暗带脑皮质内的总 RNA, 按 100 g/L 的比例加 Trizol 后进行组织匀浆, 室温放置 5 min 后按总体积的 1/5 加入氯仿, 用力震荡 30 s, 室温静置 10 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 加等体积异丙醇上下颠倒数次, 室温静置 10 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液; 用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 4℃ 7 500 r/min 离心 5 min, 用 DEPC 水溶解沉淀, 测 OD 值符合要求后分装置入 -70℃ 冰箱保存。然后取 1 μg 的总 RNA 进行逆转录反应分析大鼠缺血半暗带 CHOP mRNA 的表达, RT-PCR 的反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 30 个循环; 72℃ 终末延伸 10 min。实验用 β-actin 作内参, CHOP 与 β-actin 的引物根据 GeneBank 提供的模版, 由上海英骏生物公司合成。CHOP 引物序列为上游 5'-CCTTCAC-TACTCTTGACCCTG-3', 下游 5'-CTCATTCTCCT-GCTCCTTCT-3'; β-actin 引物序列为上游 5'-AGAGG-GAAATCGTGCGTGAC-3', 下游 5'-CGGACTCATCG-TACTCCTGCT-3'。在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳观察 PCR 产物。将电泳后的凝胶置于 Tanon2020 凝胶成像分析系统中成像分析, 测量各产物的光密度, 目的基因与 β-actin 光密度比值即为目的基因 mRNA 的相对值。

1.4 免疫组织化学染色测定缺血半暗带 C/EBP 同源蛋白表达

在再灌注相应时间点将大鼠用 10% 水合氯醛麻醉, 自心尖灌注 0.9% 生理盐水 250 mL, 至右心耳流出的液体清亮后灌注 4% 多聚甲醛 300 mL, 断头取脑, 自额极至枕叶分为 A、B、C、D、E 五等分, 取 C 脑片石蜡包埋, 制备 4 μm 厚连续切片。CHOP 兔抗鼠多克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司, 抗体效

价 1: 100。SABC 免疫组织化学试剂盒系武汉博士德生物工程有限公司产品。采用 SABC 法, 所有操作均按免疫组织化学试剂盒说明书进行。每只大鼠在缺血侧皮质随机采集 5 个视野 (×400), 取平均值作为测定值, 采用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像分析系统对切片进行图像分析, 测定蛋白阳性表达灰度值并进行统计学分析。

1.5 末端标记法原位细胞凋亡检测

凋亡试剂盒为德国 Roche 公司产品。操作步骤按试剂盒说明书进行, 凋亡细胞核呈棕黄色或棕褐色。每个标本在高倍镜 (×400) 下随机观察梗死灶周边区域 4 个不重叠的视野, 计算不同时间点的凋亡阳性细胞均数; 假手术组观察部位取与模型组相对应部位。

1.6 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 成组设计多个样本均数比较用 one-way ANOVA 方差分析, 组间比较采用双尾 Student's *t* 检验。所有数据均使用 SPSS 11.5 统计软件包进行处理。

2 结果

2.1 缺血再灌注后半暗带区 C/EBP 同源蛋白 mRNA 表达变化

假手术组相应侧顶叶皮质可检测到少量的 CHOP mRNA 表达, 组内各时间点经 ANOVA 检验差异无统计学意义。模型组组内再灌注各时间点 CHOP mRNA 表达经 ANOVA 检验差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 再灌注 1 h 模型组大鼠缺血侧顶叶皮质 CHOP mRNA 表达增加, 随再灌注时间延长 mRNA 表达逐渐增加, 再灌注 12 h 达高峰, 与其它时间点比差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 1 和图 1)。

表 1 C/EBP 同源蛋白 mRNA 在顶叶皮质表达的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

再灌注时间 (h)	假手术组	模型组
1	0.475 ± 0.054	0.732 ± 0.043 ^a
3	0.473 ± 0.046	0.855 ± 0.041 ^a
6	0.488 ± 0.065	1.153 ± 0.078 ^a
12	0.477 ± 0.073	1.412 ± 0.037 ^{ab}
24	0.463 ± 0.060	1.268 ± 0.073 ^a
72	0.487 ± 0.065	0.797 ± 0.094 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组内其它时间点比较。

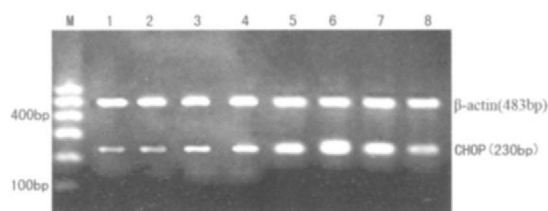


图 1 C/EBP同源蛋白 mRNA 在缺血侧顶叶皮质的表达

1 和 2 分别为假手术组 1 h 和 24 h, 3~8 分别为模型组 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h。

2.2 缺血再灌注后半暗带区 C/EBP同源蛋白表达

假手术组大鼠相应侧顶叶皮质未见 CHOP 蛋白免疫反应阳性细胞表达。再灌注后 1 h 模型组大鼠缺血侧顶叶皮质可见 CHOP 蛋白表达, 随再灌注时间延长其蛋白表达平均灰度值逐渐下降, 表明其蛋白阳性细胞数目逐渐增多, 24 h 达高峰, 与同组其它时间点比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 至再灌注 72 h 仍可见免疫反应阳性细胞 (表 2 和图 2)。

表 2 模型组 C/EBP同源蛋白在顶叶皮质表达的平均灰度值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

再灌注时间 (h)	CHOP 蛋白
1	151.88 ± 12.53
3	135.32 ± 6.93
6	125.03 ± 8.06
12	123.07 ± 7.43
24	106.81 ± 8.08 ^a
72	158.98 ± 11.21

a 为 $P < 0.01$, 与其它时间点比较。

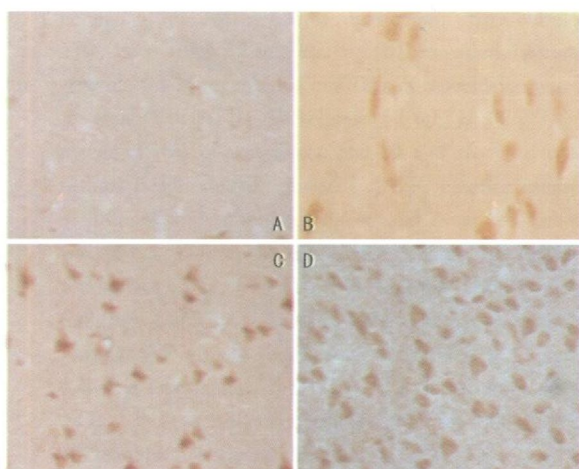


图 2 缺血侧顶叶皮质 C/EBP 同源蛋白阳性细胞表达 (SABC, $\times 400$) A 为假手术组, B、C 和 D 分别为模型组再灌注 1 h, 6 h 和 24 h。

2.3 缺血再灌注后神经元凋亡的变化

假手术组大鼠相应侧顶叶皮质未见明显的凋亡细胞。再灌注 1 h 模型组大鼠缺血侧梗死灶周围可以观察到凋亡细胞, 随再灌注时间延长, 凋亡细胞逐渐增多, 至 24 h 达高峰, 与同组其它时间点比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 再灌注 72 h 仍可见到凋亡细胞。凋亡细胞主要分布在梗死灶周围, 表现为细胞体积减小、收缩变形、细胞核染色阳性 (表 3 和图 3)。

表 3 模型组缺血侧顶叶皮质凋亡细胞数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

再灌注时间 (h)	凋亡细胞数 (个)
1	6.33 ± 2.42
3	11.67 ± 2.66
6	17.83 ± 2.48
12	29.17 ± 4.92
24	45.83 ± 7.01 ^a
72	21.83 ± 6.15

a 为 $P < 0.01$, 与其它时间点比较。

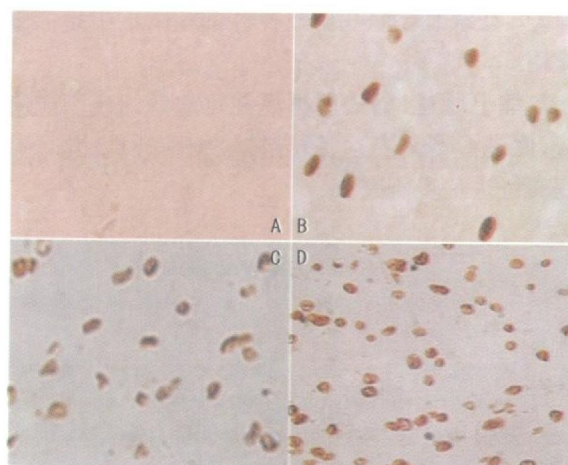


图 3 缺血侧顶叶皮质 TUNEL 阳性细胞表达 (TUNEL, $\times 400$) A 为假手术组, B、C 和 D 分别为模型组再灌注 1 h, 6 h 和 24 h。

3 讨论

CHOP 是 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 转录因子家族成员, 在应激细胞中能同 C/EBP β 形成异源二聚体, 而 CHOP 与 C/EBP β 蛋白的比率决定 C/EBP β 调控基因的转录是增强还是抑制。过表达 CHOP 促进细胞周期停滞和/或细胞凋亡^[6], 而 CHOP 缺陷则能保护细胞对抗内质网应激诱导的凋亡^[7,8]。CHOP 调节包括 Bcl-2 家族在内的许多基因表达^[9,10], 并能通过耗竭细胞内谷胱甘肽^[11] 促进细

胞内活性氧簇的产生;然而,这些与凋亡有关的靶基因表达如何变化仍知之甚少。

本研究发现,脑缺血再灌注 1 h 缺血侧顶叶皮质 CHOP mRNA 表达增加,随再灌注时间延长 mRNA 表达逐渐增加,再灌注 12 h 达高峰,再灌注 72 h 仍可见 CHOP mRNA 的表达;假手术组大鼠顶叶皮质未见 CHOP 蛋白免疫反应阳性细胞表达,模型组大鼠脑缺血再灌注后 1 h 缺血侧顶叶皮质可见 CHOP 蛋白表达,随再灌注时间延长其蛋白表达平均灰度值逐渐下降,表明其蛋白阳性表达细胞数目逐渐增多,24 h 达高峰,至再灌后 72 h 仍可见免疫反应阳性细胞。上述发现提示脑缺血再灌注可诱导 CHOP 的表达,而作为内质网应激经典标志物的 CHOP 在脑缺血再灌注后表达增加,证实脑缺血再灌注诱发了内质网应激。再灌注 12 h 缺血侧顶叶皮质 CHOP mRNA 表达达高峰,其蛋白水平在再灌注 24 h 达高峰,与该处神经细胞凋亡变化相平行,结合 Tajiri 等^[12]报道在受损神经元胞核内检出 CHOP 蛋白表达,而 CHOP^{-/-}小鼠海马和纹状体的神经细胞死亡较野生型有实质性的减少,说明 CHOP 在缺血再灌注所致神经细胞凋亡中发挥重要作用。

综上所述,脑缺血再灌注可启动内质网应激反应,促进 CHOP 表达,诱导神经细胞凋亡,其具体机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张红菊,赵忠新. 内质网应激在缺血性脑血管病中的作用 [J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6 (8): 862-864
- [2] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7 (9): 880-885
- [3] 王旭,王绿娅. 内质网应激与动脉粥样硬化研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (4): 323-326
- [4] Wang XZ, Lawson R, Brewer JW, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153) [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16 (8): 4 273-280
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91
- [6] Friedman AD. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D cl3 myeloid cells [J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (14): 3 250-256
- [7] Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the CHOP gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109 (4): 525-532
- [8] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum [J]. *Genes Dev*, 1998, 12 (7): 982-995
- [9] Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription [J]. *Genes Dev*, 1992, 6 (3): 439-453
- [10] Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim [J]. *Cell*, 2007, 129 (7): 1 337-349
- [11] Martinelli GPT, Friedrich JVL, Holstein GR. L-citulline immunostaining identifies nitric oxide production sites within neurons [J]. *Neuroscience*, 2002, 114 (1): 111-122
- [12] Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (4): 403-415

(此文编辑 许雪梅)