

· 实验研究 ·

褪黑素对大鼠液压脑损伤后 NGF、bcl-2、bax mRNA 表达的影响

Effects of melatonin on expression of NGF, bcl-2 and bax mRNA in rats following traumatic brain injury

高进喜¹, 卢亦成^{2*}, 王如密¹, 王守森¹

(1. 南京军区福州总医院神经外科, 福州 350025; 2. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003)

[摘要] 目的: 观察褪黑素对颅脑损伤后受损脑组织神经生长因子(NGF)、bcl-2、bax mRNA 表达的影响, 探讨褪黑素对创伤性脑损伤的保护作用机制。方法: 采用侧方液压打击法制备大鼠颅脑损伤模型, 应用原位杂交方法和计算机显微图像分析技术, 观察褪黑素(5、10 mg/kg, 皮下注射)对大鼠受损脑组织 NGF、bcl-2、bax mRNA 表达的调节作用。结果: 脑损伤后立即给予褪黑素能够增强伤后 12 h 大鼠受损脑组织 NGF 和 bcl-2 mRNA 表达, 增强效应与剂量呈正相关; 褪黑素对 bax mRNA 表达无明显影响。结论: 褪黑素能够增加液压脑损伤后 NGF 和 bcl-2 mRNA 表达而不改变 bax mRNA 表达, 提示褪黑素可能通过提高受损神经细胞修复和抗凋亡能力发挥脑保护作用。

[关键词] 颅脑损伤; 褪黑素; 神经生长因子; bcl-2; bax

[中图分类号] R 651.15

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)09-1027-02

* 褪黑素(melatonin, Mel)是松果体分泌的一种神经内分泌激素, 可通过清除氧自由基而发挥脑保护作用。由于颅脑损伤后脑组织中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和凋亡相关基因表达与受损神经元的功能修复和生存有着十分密切的关系^[1,2], 本研究试图通过观察褪黑素对液压脑损伤后受损神经细胞 NGF、bcl-2、bax mRNA 表达的影响, 探讨褪黑素的脑保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 褪黑素购自上海晶美科技有限公司, NGF、bcl-2 和 bax mRNA 探针(毛地黄毒苷标记)由第二军医大学基础医学部神经生物学教研室提供。

1.2 动物分组 上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供的雌性健康 SD 大鼠 32 只, 体质量 250~300 g, 动物自由饮水、摄食, 光照/黑暗=12 h/12 h。按随机化原则将实验动物分为 4 组: 假手术组(只做手术准备, 不打击致伤, 5 只), 液压打击脑损伤动物分为: 褪黑素组, 打击伤后立即皮下注射 5 或 10 mg/kg 褪黑素(各 9 只); 对照组(9 只), 打击伤后立即皮下注射等体积生理盐水。

1.3 液压打击脑损伤模型建立和石蜡切片的制备^[3] 采用液压打击脑损伤装置(美国弗吉尼亚大学医学工程部研制)建立侧方液压打击脑损伤模型, 打击强度设为 $(1.52 \pm 0.20) \times 10^5$ Pa, 造成中度脑损伤。各组动物于打击伤后 12 h 腹腔注射 2% 戊巴比妥过量麻醉, 常规灌注 4% 多聚甲醛取脑组织石蜡包埋, 自视交叉向后做连续冠状切片, 片厚 8 μ m。

1.4 原位杂交 切片脱蜡水化, 室温下切片用 0.1 mol/L PBS 液洗涤, 0.2% 焦磷酸乙二酯(DEPC)水防 RNA 酶处理, 4% 多聚甲醛固定, 0.1 mol/L HCl 酸化, 蛋白酶 K (20 μ g/kg) 消化 30 min 后以 0.1 mol/L 甘氨酸终止消化, 再经 0.1 mol/L 三乙醇胺和含 0.25% 乙酸酐的 0.1 mol/L 三乙醇胺缓冲液处理后晾干, 阻水笔划圈, 分别将切片加 100 NGF、bcl-2 或 bax mRNA 探针 50 μ l, Parafilm 膜覆

盖后放入 42℃ 杂交炉中过夜。第 2 日晨以 $2 \times$ SSC 洗涤 2 次, 每次 30 min, 再用 0.1 mol/L PBS 洗涤后加入地高辛抗体(1:2000)50 μ l, 4℃ 孵育过夜。第 3 日晨用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再用 TBS 以及 Buffer III (0.1 mol/L Tris·HCl, 0.15 mol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂) 洗涤, 最后用 Buffer III + NBT + BCIP 常规比例混合液按每片 50 μ l 显色, 避光 1 h 后观察结果。用计算机显微图像分析系统观察切片原位杂交阳性细胞分布, 每只动物观察相邻 4 张切片, 每片以损伤侧直接致伤部位为中心, 计算 3 个视野的阳性细胞数, 最后以算术平均值作为单位面积阳性细胞数。

1.5 统计学处理 各组阳性细胞计数表示为 $\bar{x} \pm s$, 样本均数间差异的比较以 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 阳性细胞分布 NGF、bcl-2 和 bax mRNA 原位杂交阳性信号呈紫蓝色, 位于细胞质中, 假手术组原位杂交结果为呈阴性(不显色)或弱阳性(海马区可见淡紫蓝色, 细胞不可辨识)。侧方液压打击伤后各组 NGF mRNA 表达显著增强, 以损伤侧大脑皮质打击部位为中心向远处放射, 阳性细胞主要分布于: (1) 损伤侧大脑皮质扣带回、纹状皮质 18 区 17 区以及颞叶听区; (2) 损伤侧海马 CA 1~4 和齿状回均有不同程度的 NGF mRNA 表达, 以 CA 3 最为显著; (3) 伤侧丘脑背外侧核, 甚至对侧扣带回、海马 CA 1 区偶亦可见阳性细胞。液压脑损伤后 bcl-2 和 bax mRNA 表达同 NGF mRNA 类似, 阳性细胞主要分布于: (1) 以打击伤区域为中心的损伤侧大脑皮质; (2) 损伤侧海马 CA 1~4 和齿状回, 以 CA 3 和齿状回为著。但是损伤部位远侧以及对侧 bcl-2 和 bax mRNA 原位杂交结果阴性。液压打击伤不同组间阳性细胞分布无差异。

* [作者简介] 高进喜(1970-), 男(汉族), 博士, 主治医师

E-mail: gaojinxixi@sohu.com

* Corresponding author. Tel: 63610109-73361

2.2 阳性细胞计数 假手术组 NGF、bcl-2、bax mRNA 原位杂交均为阴性或弱阳性(阳性细胞计数 $< 5/\text{mm}^2$),其余各组原位杂交阳性细胞计数见表1。

褪黑素 5 mg/kg 仅可使伤侧 bcl-2 mRNA 表达增加

($P < 0.05$); 10 mg/kg 不仅可使液压打击伤侧皮层 NGF 和 bcl-2 mRNA 表达显著增强($P < 0.05$, $P < 0.01$),还可使伤侧海马 bcl-2 mRNA 表达增强($P < 0.05$); 褪黑素对 bax mRNA 表达无明显影响。

表1 褪黑素对受损脑组织 NGF、bcl-2、bax mRNA 表达的影响

($n = 9, \bar{x} \pm s, \text{cell} \cdot \text{mm}^{-2}$)

指标	大脑皮质			海 马		
	假手术组	5 mg/kg 褪黑素	10 mg/kg 褪黑素	假手术组	5 mg/kg 褪黑素	10 mg/kg 褪黑素
NGF mRNA	652 ± 141	823 ± 115	952 ± 207*	324 ± 78	406 ± 125	517 ± 152
bcl-2 mRNA	468 ± 97	724 ± 134*	1 004 ± 186**	587 ± 144	759 ± 243	904 ± 155*
bax mRNA	313 ± 84	330 ± 102	286 ± 76	376 ± 171	421 ± 165	358 ± 88

NGF: 神经生长因子; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与假手术组比较

3 讨论

发现褪黑素具有清除自由基的作用以来^[4],大量研究报道褪黑素对各种应激模型有保护作用,其脑保护作用也受到更为广泛的关注。许多研究表明,在缺血、缺氧、癫痫和外伤之后 NGF 表达的增加可能是中枢神经系统用以维持神经元的功能和存活的内源性保护机制;另外,在创伤性脑损伤后存在着细胞凋亡现象,凋亡抑制因子 bcl-2 和凋亡促进因子 bax 基因的表达与受损神经细胞的转归密切相关。

本实验发现褪黑素 10 mg/kg 能够显著提高伤侧皮层 NGF mRNA 的表达,这提示褪黑素可能通过增强受损神经细胞的修复和生存能力而起脑保护作用。本实验还发现褪黑素可在显著提高 bcl-2 mRNA 表达的同时不改变 bax mRNA 表达,因此褪黑素能够提高 bcl-2/bax mRNA 比率,由此可以推断褪黑素具有抑制受损神经细胞凋亡的作用。

研究^[5]表明褪黑素在正常生理浓度下对脑损伤就有保护作用,体外试验提示褪黑素在 $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ mol/L}$ 浓度下有抗凋亡作用,小于 10^{-11} mol/L 无作用^[6]。本实验发现褪黑素 5 mg/kg 皮下注射仍具有使 bcl-2 mRNA 表达增高的作用,这一发现与 Ling 等^[7]的结果有一定的一致性。褪黑素 5 mg/kg 对 NGF mRNA 表达增强不明显,而 10 mg/kg 则显著增强,这表明褪黑素对 NGF mRNA 表达可能存在剂量依赖效应^[8]。褪黑素的给药时机一般认为越早越好,甚至提前预防性给药效果更好,也有研究认为伤后 3 h 给药依然有效^[9]。由于 NGF、bcl-2 和 bax 基因均属于即早基因,因此本实验选择脑损伤后即刻给药,选择脑损伤后 12 h 为观察点是因为上述 3 种基因的早期表达是影响神经细胞转归的关键因素^[3]。

褪黑素对脑损伤后 NGF、bcl-2、bax mRNA 表达的影响是通过一系列复杂的信号转导过程实现的^[10],作为一种具有多种功能的光信号,褪黑素首先与特异性褪黑素受体结合,然后通过第二信使系统进行信号传递,可能的途径有:(1)抑制 G 蛋白通路,抑制 cAMP 的合成;(2)通过调节 Ca^{2+} 通道电压闸门,减少脑细胞及其亚细胞因去极化而致 Ca^{2+} 摄入;(3)通过磷酸肌醇通路发挥生物效应。

[参考文献]

- [1] Semkova I, Kriegstein J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors [J]. *Brain Res Rev*, 1999, 30(2): 176-188
- [2] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(6): 1575-1583
- [3] 高进喜, 卢亦成, 江基尧, 等. 幼龄和老龄大鼠液压脑损伤后 NGF、bcl-2、bax 蛋白的表达 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(5): 496-498
- [4] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reaction and products [J]. *Bio Signals Recept*, 2000, 9(3-4): 160-171
- [5] Reiter RJ, Sainz RM, Lopez BS, et al. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 993(1): 35-47
- [6] Sainz RM, Mayo JC, Uria H, et al. The pineal neurohormone melatonin prevents *in vivo* and *in vitro* apoptosis in thymocytes [J]. *J Pineal Res*, 1995, 19(4): 178-188
- [7] Ling X, Zhang LM, Lu SD, et al. Protective effect of melatonin on injured cerebral neurons is associated with bcl-2 protein over-expression [J]. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 1999, 20(5): 409-414
- [8] Pongsana sawapaiboon A, Savatikrai P, Wityachum narkul B, et al. Melatonin increases nerve growth factor in mouse submandibular gland [J]. *J Pineal Res*, 1998, 24(2): 73-77
- [9] Mesenge C, Margaill I, Verrecchia C, et al. Protective effect of melatonin in a model of traumatic brain injury in mice [J]. *J Pineal Res*, 1998, 25(1): 41-46
- [10] Pang SF, Dubocovich ML, Brown GM, et al. Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research [J]. *Bio Signals*, 1993, 2(4): 177-180

[收稿日期] 2004-01-08

[修回日期] 2004-04-30

[本文编辑] 孙岩