

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01176

脑红蛋白在脑缺血大鼠中的动态表达及脑保护作用

尹 静,张祥建*,李俐涛,杨 毅

河北医科大学第二医院神经内科,石家庄 050000

[摘要] 目的:研究脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)在大鼠脑缺血模型中的动态表达及缺血缺氧后 Ngb 的脑保护作用。方法:将 SD 大鼠随机分为 4 组,即大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组、出血性脑梗死(HI)组、氯化血红素(Hemin)干预组和假手术组,以建模后 3、6、12、24 h 为观察点,测定脑组织含水量、脑梗死体积, H-E 染色观察组织病理学改变,免疫组化染色观察 Ngb 的表达。结果:Hemin 处理组脑组织含水量、脑梗死体积较 MCAO 组和 HI 组有显著性差异($P < 0.01$); HI 组脑水肿在 12 h 显著升高;病理切片观察, Hemin 处理组水肿程度及变性神经元数量较 MCAO 组和 HI 组减轻;免疫组化分析, Hemin 处理组 Ngb 阳性神经元数量较 MCAO 组和 HI 组增多。结论: HI 组脑水肿高峰提前可能导致原有病情的加重,应用 Hemin 诱导 Ngb 的表达,可减轻局灶性脑缺血时脑组织的损伤,从而达到脑保护作用。

[关键词] 大脑中动脉梗死;出血性脑梗死;氯化血红素;脑红蛋白

[中图分类号] R 743.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)10-1176-04

Expression of neuroglobin after focal cerebral ischemia and its neuroprotective effect

YIN Jing, ZHANG Xiang-jian*, LI Li-tao, YANG Yi

Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the expression of neuroglobin (Ngb) in rat cerebral ischemia model and the neuroprotective effect of Ngb after ischemia and hypoxia. **Methods:** Totally 113 Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated group, middle cerebral artery occlusion (MCAO) group, hemorrhagic infarction (HI) group and hemin treatment group. The brain water content, infarcted tissue volume, neuropathologic changes (H-E staining) and expression of Ngb (immunocytochemical staining) were examined 3, 6, 12, and 24 h after model establishment. **Results:** The brain water contents and the infarcted tissue volumes in the hemin treatment group were significantly different from those of the MCAO group and HI group ($P < 0.01$). The brain edema was obviously increased in HI group at 12 h. Neuropathologic examination showed that there were fewer necrotic neurons, milder edema and stronger Ngb expression in the Hemin treatment group than in the MCAO group and HI group. Immunocytochemical staining showed that the Ngb positive neurons in Hemin treatment group were more than those in the MCAO and HI groups. **Conclusion:** Earlier peak of brain edema may lead to aggravation of disease. Hemin-induced Ngb expression may relieve brain damage during focal cerebral ischemia.

[KEY WORDS] middle cerebral artery infarction; hemorrhagic infarction; Hemin; neuroglobin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1176-1179]

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是 2000 年由 Burmester 等^[1]首先发现的一种新的携氧球蛋白,广泛表达于神经组织,急性缺血的情况下表达上调,在脑的适应性保护中起重要作用。研究^[2]表明, Ngb 在 mRNA 和蛋白水平均可被氯化血红素(Hemin)所诱导,并呈时间和浓度依赖性。出血性脑梗死是急性缺血性脑卒中的常见并发症,其确切病理生理机制尚不清楚。本研究拟通过观察大鼠脑梗死模型中

Hemin 对脑组织损伤的影响及其对脑损伤组织中 Ngb 表达的影响,探讨 Ngb 脑保护的可能机制,以期临床采用诱导脑红蛋白表达的药物疗法治疗缺血缺氧性疾病提供理论根据。

1 材料和方法

1.1 实验试剂 Hemin(Sigma 公司),配制方法:先用 NaOH 溶解 Hemin,再用磷酸盐缓冲液调节

[收稿日期] 2008-03-22 **[接受日期]** 2008-05-09

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2006000915). Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province(C2006000915).

[作者简介] 尹 静,硕士. E-mail: yinhaoran1980@163.com. 现在河北省沧州市中心医院神经内一科,沧州 061001.

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0311-66002915, E-mail: zhang6xj@yahoo.com.cn

pH 值至 7.3~7.4, 浓度为 12.5 g/L; 氯化三苯四唑 (TTC, 北京中杉生物试剂有限公司); 2% TTC 配制方法: 0.2 g TTC+0.9% NaCl 5 ml; 羊抗 Ngb 多抗血清 (Sigma 公司); 免疫组织化学染色试剂盒 (北京中杉生物试剂有限公司)。其余试剂为进口和国产分析纯。

1.2 实验动物及分组 成年健康雄性 SD 大鼠, 体重 250~300 g, 由河北医科大学动物实验中心提供。随机分为 4 组: (1) 大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型组 ($n=36$), (2) 出血性梗死 (hemorrhagic infarction, HI) 模型组 ($n=36$), (3) Hemin 干预组 ($n=36$), (4) 假手术组 ($n=5$)。前 3 组动物在模型建立后 3、6、12、24 h 4 个时间点随机分为 4 个亚组, 每个亚组包括 9 只大鼠。

1.3 模型的建立 (1) 参照 Longa 等^[3]的线栓法复制 MCAO 模型, 采用经右侧颈总动脉分叉处插入线栓, 以阻断右侧大脑中动脉血流。(2) 采用本实验室的方法制备 HI 模型: MCAO 模型成功后, 即刻行自体尾动脉血 (50 μ l) 注入^[4]建立 HI 模型。(3) Hemin 干预组于 MCAO 术前 30 min 腹腔注射 Hemin (50 mg/kg)。(4) 假手术对照组仅切开颈部皮肤, 分离颈总动脉及分支, 不行动脉结扎及栓线。

1.4 行为学评分 参照 Longa 评分法^[3]在模型制作成功后相应时间点进行行为学评分。

1.5 取材与组织切片制备 每组各 5 只大鼠在造模成功后相应时间点断头处死, 取出完整脑组织, 去除嗅球及额极前部 4 mm 的脑组织, 以右侧大脑半球注射针眼处冠状位切割脑组织, 针眼前部 3 mm 脑组织用来测量脑含水量, 后部脑组织用 4% 多聚

甲醛固定, 用于 H-E 及免疫组织化学染色。

1.6 脑组织含水量测定 新鲜脑组织立即称取湿质量 (WW) 后, 置于烤箱 (100 \pm 5) $^{\circ}$ C 干燥 24 h 后称取干质量 (DW)。脑含水量 (BW) = [(WW - DW)/WW] \times 100%。

1.7 脑梗死体积测定 每组各 4 只大鼠于术后各相应时间点断头取脑, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 其余以 2 mm 间隔行连续冠状切片, 放入 2% TTC 溶液中, 37 $^{\circ}$ C 水浴恒温箱内避光孵育 30 min, 正常脑组织着深红色, 梗死脑组织呈苍白色。将切片照相, 运行 Photoshop 8.0 软件, 计算脑梗死体积。

1.8 病理学检测 固定后的脑组织经脱水、浸蜡、包埋后制备成石蜡块进行连续冠状切片, 片厚 5 μ m。分别进行 H-E 和免疫组织化学染色。免疫组化染色采用 SP 法。一抗为 Ngb 多克隆抗体 (1:400), 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。染色后经 DAB 显色, 脱水, 透明, 封片后显微镜下观察分析。阴性对照用 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液代替一抗孵育。

1.9 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 多个样本均数之间的两两比较采用 q 检验。数据分析由 SAS 软件完成。

2 结果

2.1 脑含水量测定 缺血早期 MCAO 组、HI 组、Hemin 干预组与 Sham 组比较, 大鼠脑含水量无显著差异 ($P>0.05$); 缺血 12 h 时 HI 组脑含水量高于 MCAO 组 ($P<0.01$), Hemin 干预组脑含水量低于 HI 组 ($P<0.01$); 缺血 24 h 时 Hemin 干预组脑含水量低于 MCAO 组、HI 组 ($P<0.01$, 表 1)。

表 1 各组大鼠不同时间点脑组织含水量比较

Tab 1 Brain water content at different time points in three groups

($n=5, \bar{x}\pm s, \%$)

Group	Time after MCAO			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham	79.17 \pm 0.50	79.17 \pm 0.50	79.17 \pm 0.50	79.17 \pm 0.50
MCAO	80.61 \pm 1.09	80.61 \pm 0.59	82.72 \pm 1.02**	85.36 \pm 1.23**
HI	80.78 \pm 1.23	81.67 \pm 1.58**	85.28 \pm 0.64** $\Delta\Delta$	85.19 \pm 1.00**
Hemin	80.30 \pm 0.76	80.46 \pm 0.96	81.27 \pm 1.25 $\blacktriangle\blacktriangle$	82.18 \pm 1.06** $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$

** $P<0.01$ vs sham group; $\Delta\Delta$ $P<0.01$ vs MCAO group; $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$ vs HI group

2.2 脑梗死体积测定 MCAO 组、HI 组、Hemin 处理组大鼠脑组织行 TTC 染色后, 均出现右侧大脑半球皮质、皮质下苍白区。结果显示, Hemin 处理

组脑梗死体积较 MCAO 组和 HI 组间差异有显著性 ($P<0.01$); MCAO 组和 HI 组比较无显著差异 (表 2)。

表 2 各组大鼠不同时间点脑梗死体积比较

Tab 2 Cerebral infarction volumes at different time points in three groups

($n=4, \bar{x} \pm s, V/\text{mm}^3$)

Group	Time after MCAO			
	3 h	6 h	12 h	24 h
MCAO	42.92±7.82	173.78±29.96	346.78±27.89	384.21±29.77
HI	40.57±8.09	178.92±30.72	357.88±18.25	394.23±24.08
Hemin	35.79±5.66** $\Delta\Delta$	96.78±13.84** $\Delta\Delta$	255.29±33.91** $\Delta\Delta$	313.69±25.51** $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs MCAO group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HI group

2.3 组织病理学改变 MCAO 早期可见轻度缺血性改变,至 6 h 神经元细胞水肿,细胞核浓染、固缩,细胞质呈嗜酸性,局部可见少量散在深染单核淋巴细胞浸润(图 1A);随着缺血时间的延长,细胞破损明显,细胞体收缩呈三角形或多角形,体积缩小,梗死周围组织明显水肿及染色质边集等坏死表现,炎性细胞浸润以单个核细胞为主,并可见少量中性粒细胞,缺血局部可见神经元水肿变性、坏死,细胞周

围间隙增大,白质间隙增大,呈疏松状态(图 1B)。HI 组除上述表现还可见梗死中心区水肿,周围脑组织存在水肿、坏死,可见炎细胞浸润(图 1C)。Hemin 处理组显示轻度缺血水肿改变,缺血范围减小,染色无明显变淡;可见少量变性的神经元,细胞周围间隙增大不明显,白质间隙略增大(图 1D)。

2.4 免疫组织化学染色结果 各组大鼠脑切片免疫组织化学染色如图 2 所示。

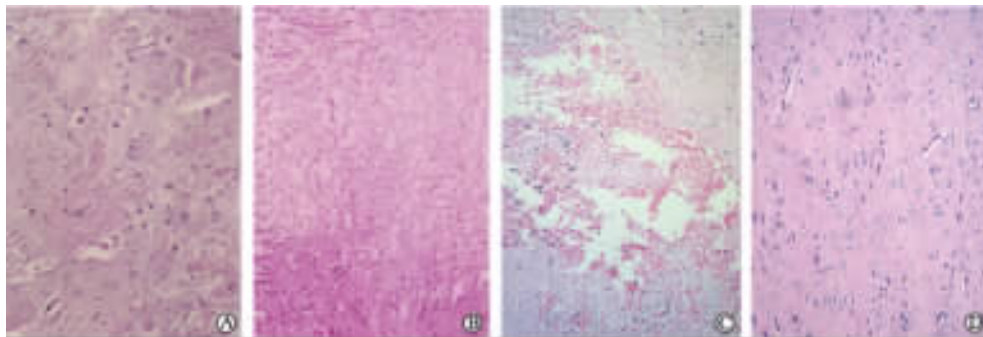


图 1 脑组织 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of the cerebral cortex

A: MCAO 6 h; B: MCAO 24 h; C: HI group 24 h after MCAO; D: Hemin group 24 h after MCAO. Original magnification: $\times 200$

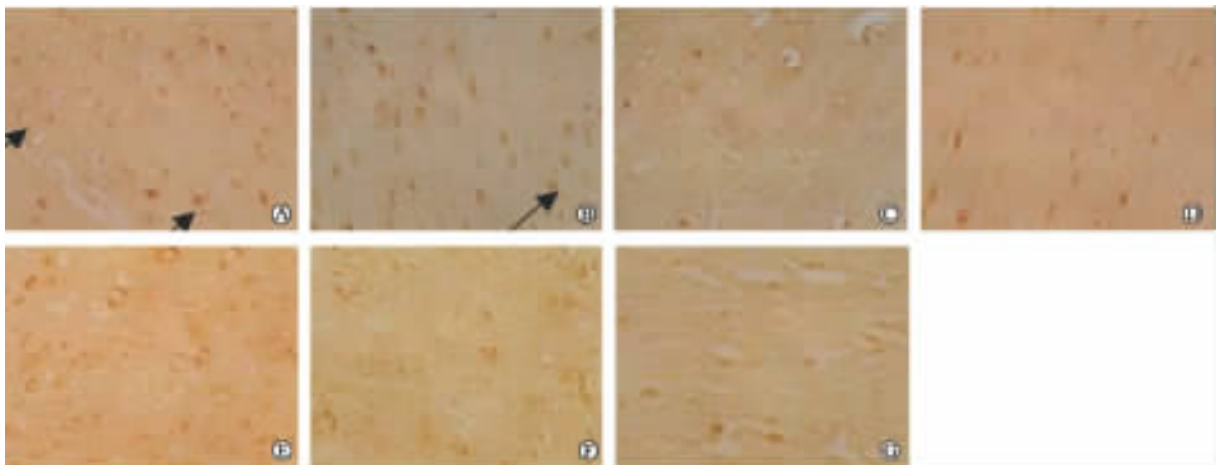


图 2 免疫组化观察 NgB 在脑组织中的表达

Fig 2 Immunohistochemistry staining of NgB protein in the cortex

A: Hemin group 3 h after MCAO (Arrows showing NgB⁺ cells); B: Hemin group 12 h after MCAO (Arrow showing NgB⁺ cell); C: MCAO 3 h; D: MCAO 12 h; E: HI group 3 h after MCAO; F: HI group 12 h after MCAO; G: MCAO 24 h. Original magnification: $\times 400$

由图 2 可见, Ngb 免疫阳性细胞呈棕黄色, 阳性物质主要定位于形态正常的神经元的细胞质中, 突起中亦有少量着色。MCAO 组、HI 组缺血区 Ngb 阳性神经元数量较 Hemin 处理组对应区域明显减少。HI 组早期 Ngb 阳性细胞数较 MCAO 组有一过性升高。随着缺血时间的延长, 正常形态结构的阳性细胞数少, 多数阳性神经元结构模糊, 胞体大量破裂, 阳性物质出现于胞外。阴性对照切片未见着色。

3 讨论

Ngb mRNA 定位于神经元细胞质内, 并广泛存在于大鼠脑内各个区域。Ngb 能增强低氧情况下神经元的存活能力, 具有明显的保护神经元的功能。最新研究^[5]表明, 在大鼠 MCAO 模型中梗死面积同 Ngb 表达呈负相关, 过表达 Ngb 的转基因小鼠心肌及脑组织对缺氧性损害的耐受性显著提高, 进一步证实了 Ngb 对脑的保护作用^[6]。

体外实验^[7]证实, 在缺血或缺氧条件下, Ngb 的表达可以上调。但体内实验^[8-9]表明, 单纯缺氧并不能诱导 Ngb 表达增加。本实验通过 Hemin 干预 MCAO 模型大鼠发现, 缺血缺氧后 Ngb 阳性细胞数较单纯 MCAO 和 HI 组增多, 且表达时间相对较长, 与文献报道一致^[10], 证实 Hemin 确实能诱导在体 Ngb 表达。同时发现, HI 组大鼠缺血 3 h 时 Ngb 出现一过性表达增加, 可能是由于缺血半暗带区血肿释放的化学物质通过某种途径刺激了 Ngb 的表达, 但其具体机制还有待于进一步研究。

HI 又称脑梗死后出血性转变 (hemorrhagic transformation, HT), 是指在脑梗死后, 由于缺血区血管重新恢复血流灌注导致的梗死区内继发性出血, 颅脑 CT 显示在原有的低密度区内出现散在或局限性高密度影。在所有 HI 病例中, 大部分不造成严重的临床后果, 但 6%~10% 的患者会因此加重症状, 甚至死亡。

脑组织缺血缺氧后最常见、最早期的表现为细胞内水肿, 严重的脑水肿造成神经元的急性肿胀、变性和坏死而影响预后。本实验发现, HI 大鼠脑含水量在 6 h 时高于假手术组和 MCAO 组, 12 h 明显升高, 一直持续至 24 h, 早于并高于 MCAO 大鼠的脑含水量变化, 提示临床上 HI 患者病情加重可能与脑水肿的发生提前及严重程度有关。HI 组水肿高峰较 MCAO 组提前, 可能与血肿压迫周围脑组织以及梗死后出血血红蛋白及其分解产物高铁血红素等催化的各种氧化反应和过氧化反应, 形成继发性脑

水肿有关, 临床上导致原有病情的加重。

本实验中, Hemin 干预后缺血早期大鼠的脑含水量、梗死体积较单纯 MCAO 组和 HI 组无显著变化, 6 h 开始脑梗死体积出现显著性下降, 12 h 后脑组织含水量也有明显降低, 考虑可能与缺血 3 h 时梗死体积尚不稳定, 水肿表现亦不明显有关。组织病理学观察 Hemin 干预组呈轻度缺血水肿改变, 缺血范围减小; MCAO 组与 HI 组比较, 脑组织水肿程度及缺血范围无明显差别。推测 Hemin 可能通过诱导脑红蛋白表达, 减轻局灶性脑缺血时脑组织的损伤达到脑保护作用。有研究^[2]表明, Hemin 对 Ngb 的诱导作用可能是通过 SGC-PKG (soluble guanylate cyclase-protein kinase G) 通路介导的, 阻断 SGC-PKG 信号转导途径, 能够明显抑制 Hemin 对 Ngb 基因表达的诱导。但是否还存在其他信号途径及寻找有效的刺激表达物质仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407: 520-523.
- [2] Zhu Y, Sun Y, Jin K. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells[J]. *Blood*, 2002, 100: 2494-2498.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-89.
- [4] 张祥建, 刘春燕, 祝春华, 胡书超, 刘瑞春, 李春岩. 大鼠自体动脉血脑出血动物模型的建立[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2003, 11: 3411.
- [5] Hundahl C, Kelsen J, Kjaer K, Weber R E, Geuens E, Hay-Schmidt A, et al. Does neuroglobin protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of neuroglobin expression following transient MCAO in spontaneously hypertensive rats[J]. *Brain Res*, 2006, 1085: 19-27.
- [6] Khan A A, Wang Y, Sun Y. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17944-17948.
- [7] Schmidt-Kastner R, Haberkamp M, Schmitz C, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture[J]. *Brain Res*, 2006, 1103: 173-180.
- [8] Hundahl C, Stoltenberg M, Fago A, Weber R E, Dewilde S, Fordel E, et al. Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31: 610-617.
- [9] Li R C, Lee S K, Pouranfar F, Brittan K R, Clair H B, Row B W, et al. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain[J]. *Brain Res*, 2006, 1096: 173-179.
- [10] 刘娟, 姚国恩, 蒋晓江, 叶红, 胡银. 氯化血红素对大鼠局灶性脑缺血组织的作用探讨[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28: 1035-1038.

[本文编辑] 孙岩