

## • 研究报告 •

大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤后  
早期生长反应基因-1 mRNA 的表达

毕国荣 白丽娟 张贺敏 张辉 海虹 周慧杰

【关键词】 缺血/再灌注损伤, 脑; 早期生长反应基因-1; 原位杂交; 基因表达

采用大鼠可逆性大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,应用原位杂交和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)观察大鼠局灶性脑缺血/再灌注(I/R)损伤后早期生长反应基因-1(Egr-1)mRNA 动态变化,旨在探讨缺血损伤后 Egr-1 mRNA 表达的细胞种类及规律,为脑 I/R 损伤的病理生理机制提供实验依据。

## 1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:健康雄性 SD 大鼠 200~250 g,由中国医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为假手术组、局灶性脑缺血 2 h 组及再灌注 2、4、22、46、70、118 和 166 h 组,每组 10 只。采用栓线法阻塞大鼠大脑中动脉(MCA)制备 I/R 损伤模型<sup>[1]</sup>。用体积分数为 10%的水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,颈正中切口,分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),用动脉夹暂时阻断 ICA 血流,结扎 ECA 及 CCA,在 CCA 分叉处切一小口,插入顶端加热成球面的尼龙单丝线,放开动脉夹,沿 CCA 分叉部和 ICA 轻柔推进,经 CCA 分叉部通过 ICA 入颅至大脑前动脉(ACA),可阻断流入 MCA 的所有血流。尼龙线插入深度距离分叉处(18.5±0.5)mm,然后结扎 ICA,缝合皮肤,外留 2 cm 长尼龙线线头并固定。缺血 2 h 后用 200 mg/kg 的水合氯醛麻醉大鼠,提拉留于体表的尼龙线头端至 CCA 分叉处使血流再通。假手术组除不插尼龙线外其余步骤同上。

1.2 苏木素-伊红(HE)染色:取每组不

基金项目:辽宁省博士启动、自然科学基金资助项目(20032058);辽宁省高等学校科学研究计划项目(20060937)

作者单位:110004 辽宁沈阳,中国医科大学附属盛京医院神经内科

作者简介:毕国荣(1964-),女(汉族),辽宁省人,医学博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向为神经肽与神经系统疾病 (Email:biguorongcmu@sina.com)。

同时点 5 只大鼠于冰盘上处死快速取脑,固定,常规石蜡包埋,以距前额 2 mm 到视交叉为取材部位制作厚 5 μm 切片。切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,苏木素染色 5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化 30 s。自来水浸泡 15 min,置于伊红液中 2 min,常规脱水、透明、封片,于显微镜下观察制成的切片标本。

1.3 Egr-1 mRNA 表达检测及方法:按不同时间点分别处死 5 只大鼠取脑,用两种方法检测 Egr-1 mRNA 表达,按文献[2]方法实验所用试剂均购自武汉博士德生物有限公司。

1.3.1 原位杂交检测 Egr-1 mRNA 的表达规律:以距前额 2 mm 到视交叉为取材部位制备厚度约 5 μm 的冷冻切片。常规脱蜡至水,滴加体积分数为 3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(37 °C 10 min)灭活内源性酶,暴露 mRNA 核酸片段,预杂交(37 °C, 4 h),Egr-1 mRNA 的多相寡核苷酸探针序列如下:5'-GAGGA GATGA TGCTG CTGAG CAACG GGGCT-3', 5'-GCCTT TGCCA CTCAG TCGGG CACCC AGGAC-3', 5'-CCTTT TCTCC CAGGA CAATT GAAAT TTGCT-3', 37 °C 杂交 24 h 后,用 37 °C 水洗洗涤[标准枸橼酸盐缓冲液(SSC)浓度不同],封闭(37 °C)30 min,滴加生物素化鼠抗地高辛(37 °C, 60 min)、链霉素-抗生物素蛋白-过氧化物酶(SABC, 37 °C, 20 min)、生物素化过氧化物酶(37 °C, 20 min)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,显微镜下观察其控制时间,常规脱水、透明、封片。阴性对照采用 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.4)代替探针杂交液进行杂交,其余步骤相同。组织切片置于 MetaMorph (美国)图像分析系统中测定 Egr-1 mRNA 阳性表达反应物的平均吸光度(A)值,染色越深,表明平均 A 值越大(范围为 0~1)。

1.2.2 RT-PCR 检测 Egr-1 mRNA

表达规律:取缺血侧及缺血对侧脑组织,按异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取脑组织总 RNA,采用紫外线吸收法进行 RNA 定量,各组 RNA 样品的 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 比值范围均为 1.8~2.0,将 2 μg 总 RNA 反转录为相应 cDNA。大鼠 Egr-1 前体正义引物为 5'-GAA CCT GGA AAC CAC CCT-3',反义引物为 5'-GCG AAC AAC CCT ACG AGC-3',扩增产物片段长度为 474 bp;以 β-actin 为内参照,正义引物为 5'-GAT TGC CTC AGG ACA TTT CTG-3',反义引物为 5'-GAT TGC TCA GGA CAT TTC TG-3',扩增产物片段长度为 690 bp。Egr-1 mRNA 扩增条件为 94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,35 个循环。取扩增产物 7 μl 电泳,经溴酚蓝染色后检测并计算出各组 Egr-1 mRNA 电泳条带与内参照 β-actin 条带表达量(用灰度比值表示)。

1.4 统计学方法:采用 SPSS 统计分析软件,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析及 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 组织病理学观察:假手术组大脑皮质细胞层次分明、形态结构正常。I/R 组缺血侧大脑皮质、皮质下白质及基底节区神经元减少、排列紊乱,细胞周围间隙增宽,有大量坏死神经元,胞体肿胀、胞浆淡染、胞核溶解、结构不清,梗死边界区可见大量固缩神经元,而且 I/R 组缺血病灶范围随时间延长逐渐扩大。

2.2 原位杂交(表 1,彩色插页图 1):假手术组神经元及胶质细胞有轻度阳性表达,主要为细胞核着色。缺血 2 h、再灌注 2 h 后,缺血侧细胞核 Egr-1 mRNA 细胞阳性表达反应明显增强,平均 A 值显著高于假手术组(P<0.01)。再灌注 4 h Egr-1 mRNA 细胞阳性表达最高,除胞核外胞质亦着色增强,呈棕褐色颗粒状,其平均 A 值显著高于其他各组(P 均 <

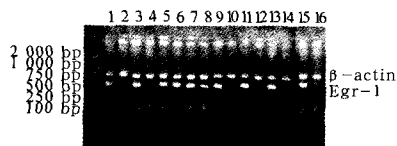
表 1 两组大鼠再灌注不同时间点原位杂交检测 Egr-1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	2 h	4 h	22 h	46 h	70 h	118 h	166 h
假手术组	0.191 7±0.014 0	0.191 7±0.014 0	0.191 7±0.014 0	0.191 7±0.014 0	0.191 7±0.014 0	0.191 7±0.014 0	0.191 7±0.014 0
I/R 组	0.370 7±0.002 9*	0.390 7±0.003 1*	0.352 9±0.002 5*	0.341 0±0.001 7*	0.289 2±0.001 1*	0.283 5±0.000 4*	0.253 5±0.003 3*

注:与假手术组比较: \* $P < 0.01$ ; I/R 组内比较:  $F = 11.01$  (各时间点间两两比较  $P$  均  $< 0.01$ )

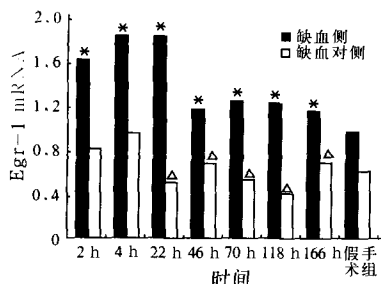
0.01)。再灌注 22 h 时 Egr-1 mRNA 平均 A 值呈下降趋势,至 166 h 下降更明显,但仍显著高于假手术组 ( $P < 0.01$ )。

**2.3 RT-PCR 结果 (图 2, 图 3):** 假手术组脑组织有 Egr-1 mRNA 表达。脑 I/R 组各时间点缺血侧 Egr-1 mRNA 表达明显高于假手术组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。动态观察发现,再灌注 2 h 后 Egr-1 mRNA 即高表达,4 h 达高峰,46 h 已明显下降,但仍高于假手术组 ( $P < 0.05$ ); 但随 I/R 时间延长, Egr-1 mRNA 表达又逐渐增多,至再灌注 166 h 表达仍明显高于假手术组 ( $P < 0.05$ )。同时缺血侧 Egr-1 mRNA 表达成双向增强,而缺血对侧 Egr-1 mRNA 表达与缺血侧 Egr-1 mRNA 表达无相同的规律。



1, 2 为假手术组, 3~16 依次为 I/R 组再灌注 2, 4, 22, 46, 70, 118 和 166 h; 奇数为缺血同侧, 偶数为缺血对侧

图 2 Egr-1 mRNA 的 RT-PCR 检测结果



注:与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与同时点缺血侧比较:  $\Delta P < 0.05$

图 3 大脑皮层 Egr-1 mRNA 表达

**3 讨论**

I/R 损伤是一种牵涉多因素参与的复杂的病理过程。Yan 等<sup>[3]</sup>通过肺 I/R 损伤模型首先提出了 Egr-1 与 I/R 的关系,证实了 I/R 可明显诱导 Egr-1 表达,认为构成再灌注损伤多种因素中的共同分子基础可能是 Egr-1,它在缺血性组织损伤的病理过程中通过协调各种损伤因子的表达而发挥了中心调控作用,成为启动缺血性损伤的分子开关。

Egr-1 是一种具有锌指蛋白结构的转录因子,它在缺血激活后启动了一系列与炎症、凝血、血管通透性相关的基因表达。在 I/R 过程中通过上调 Egr-1 的表达引起内皮细胞功能紊乱,凝血机制被激活,形成微血栓,加剧无复流现象,并激活炎症细胞,产生大量的氧自由基,对神经细胞造成损害。他同时在野生型小鼠与 Egr-1 基因缺陷型小鼠的对照研究中又进一步明确了 Egr-1 与某些由 I/R 诱导的损伤过程中起重要作用的各种相关因子有密切关系。

本实验表明,在持续性局灶性脑缺血 2 h、再灌注 2 h 后,原位杂交结果显示,缺血侧 Egr-1 mRNA 表达增强,再灌注 4 h 时 Egr-1 mRNA 表达最高,22 h Egr-1 mRNA 表达减弱,至 166 h 时减弱更加明显,但仍显著高于假手术组;同样,RT-PCR 结果也发现,缺血 2 h、再灌注 2 h Egr-1 mRNA 即高表达,4 h 达高峰,46 h 后有所下降。表明 Egr-1 mRNA 表达成双向增强,可能是缺血损伤刺激 Egr-1 诱导的蛋白转录合成增加,具体机制待进一步研究。

研究表明, Egr-1 参与多种基因调控,这些基因包括生长因子基因、信号转导基因、转录因子基因和癌基因等,在细胞的生长、发育和分化等调控方面发挥作用。同时, Egr-1 的表达还受多种因素的诱导,当细胞受到应激、缺血、缺氧、细菌、内毒素、细胞因子、离子射线、肿瘤等刺激后,可引起膜去极化,使本来处于休眠状态的 Egr-1 很快被激活,细胞由 G0 期进入 G1 期,导致细胞增殖,对细胞损伤修复起重要作用<sup>[4,5]</sup>。本研究中所观察到的缺血、缺氧损伤神经元和神经胶质细胞 Egr-1 mRNA 高表达及蛋白合成,对缺血脑组织可起到积极的保护作用。Maass 等<sup>[6]</sup>研究发现,如果仅有 Egr-1 mRNA 转录但不翻译成蛋白,细胞不增殖;如果 Egr-1 mRNA 不仅转录而且翻译成蛋白,则细胞会出现增殖,提示蛋白翻译水平调控的存在及其作用。另外, Egr-1 基因表达产物作为转录因子调控着诸多靶基因表达;在调控靶基因的表达中, Egr-1 能单独或与其

他核蛋白结合构成复合体而起作用,上调或下调这些靶基因的表达,并介入外界信号与靶基因表达的耦联,这种对靶基因表达的调控有重要生物学意义<sup>[7]</sup>。

**参考文献:**

- 1 邓娟,周华东,陈曼娥,等.局灶性脑缺血/再灌注大鼠神经元 DNA 氧化损伤的研究[J].中国危重病急救医学,2001,8,13(8):478-480.
- 2 毕国荣,张辉,周慧杰,等.肾上腺髓质素对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠神经元凋亡及早期生长反应基因-1 的影响[J].中国危重病急救医学,2007,19(6):353-357.
- 3 Yan S F, Fujita T, Lu J, et al. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress [J]. Nat Med, 2000, 6(12):1355-1361.
- 4 Mechtcheriakova D, Wlachos A, Holz-muller H, et al. Vascular endothelial cell growth factor - induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1 [J]. Blood, 1999, 93(11):3811-3823.
- 5 Huang R P, Adamson E D. A biological role for Egr-1 in cell survival following ultra-violet irradiation [J]. Oncogene, 1995, 10(3):467-475.
- 6 Maass A, Grohe C, Oberdorf S, et al. Mitogenic signal control translation of the early growth response gene - 1 in myogenic cells [J]. Biochem biophys Res Commun, 1994, 202(3):1337-1346.
- 7 Cao X, Mathendran R, Guy G R, et al. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site [J]. J Biol Chem, 1993, 268(23):16949-16957.

(收稿日期:2006-10-27)

(本文编辑:李银平)

**• 广告目次 •**

- ①深圳迈瑞:监护仪……………(封二)
- ②天津生化制药:琥珀氧可……(插图)
- ③天津红日药业:心血净注射液……………(封三)
- ④广东天普药业:天普洛安 ……(封底)

## 乌司他丁对肝脏冷保存损伤的保护作用研究

(正文见398页)

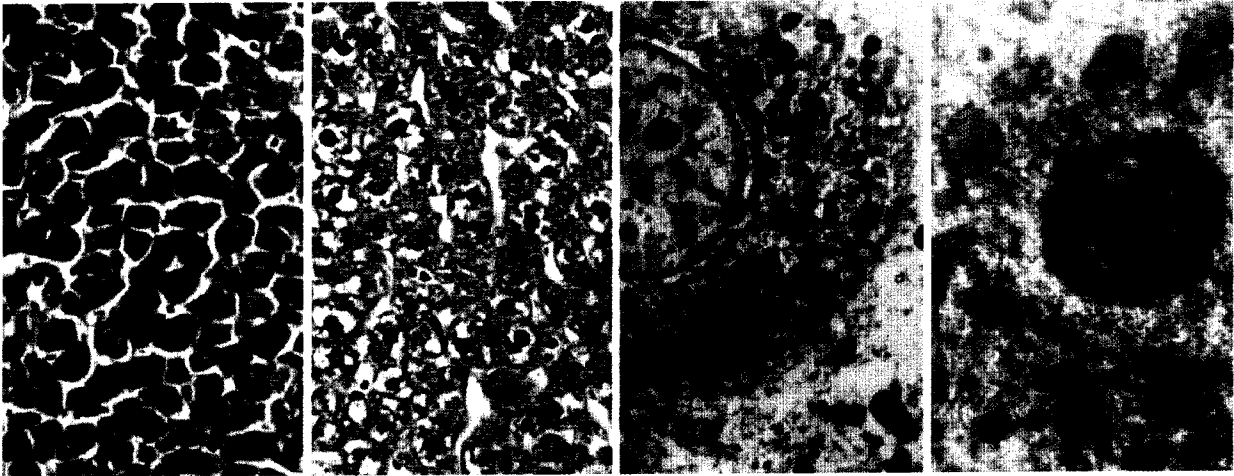


图1 实验组肝组织病理学变化 (HE, × 400)

Figure 1 Pathological change of liver tissues in test group(HE, × 400)

图2 对照组肝组织病理学变化 (HE, × 400)

Figure 2 Pathological change of liver tissues in control group (HE, × 400)

图3 实验组电镜下肝超微结构 (TEM, × 10 000)

Figure 3 Ultrastructure of liver tissues in test group(TEM, × 10 000)

图4 对照组电镜下肝超微结构 (TEM, × 10 000)

Figure 4 Ultrastructure of liver tissues in control group (TEM, × 10 000)

## 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响

(正文见428页)

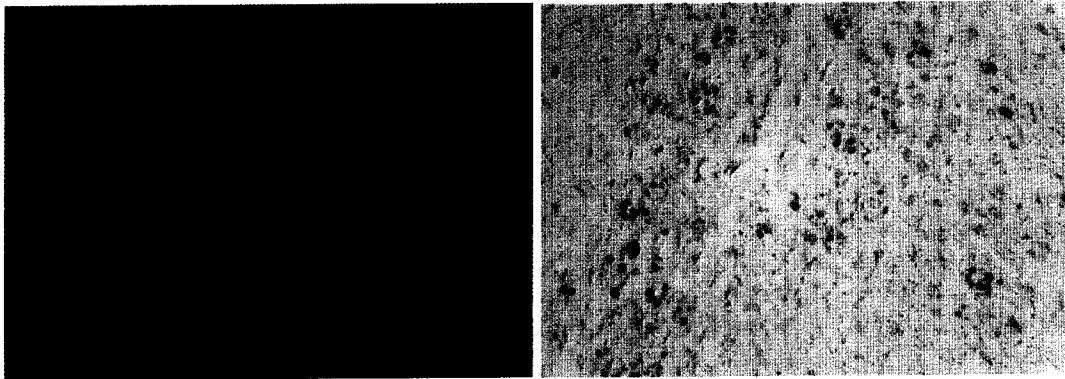


图1 体外原代培养的MSCs(× 100)

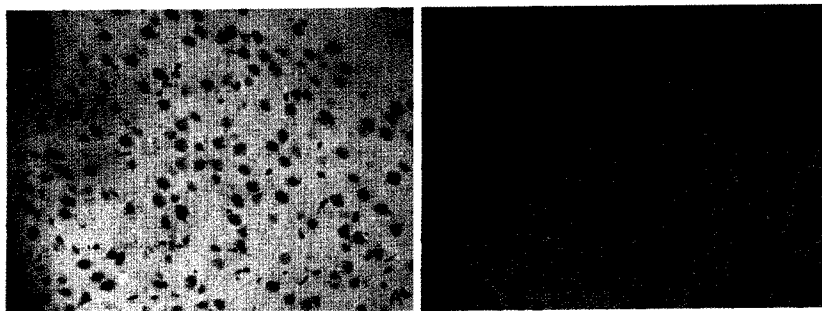
Figure 1 Primary culture of MSCs in vitro (× 100)

图2 MSCs组心肌细胞阳性表达(免疫组化, × 400)

Figure 2 Positive expression of cardiac muscle cell in MSCs labeled with BrdU (immunohistochemistry, × 400)

## 大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤后早期生长反应基因-1 mRNA的表达

(正文见436页)



A:假手术组; B:I/R组2 h

图1 各组脑组织Egr-1mRNA阳性表达(原位杂交, × 400)

Figure 1 Positive expression of Egr-1 mRNA in brain tissue in each group (In situ hybridization, × 400)

ym=21