

瘦素在小鼠脑缺血/再灌注损伤神经元凋亡中的作用

颜光涛 司艺玲 张金英 邓子辉 薛辉

【摘要】 目的 研究瘦素(Leptin)在脑缺血性损伤神经元凋亡中的作用及机制。方法 按照完全随机数字表法将 75 只小鼠均分为 3 组,通过大脑中动脉闭塞(MCAO)2 h 后再灌注方式制作小鼠局灶性脑缺血/再灌注(I/R)损伤模型。Leptin 干预组于缺血即刻腹腔注射 Leptin 1 $\mu\text{g/g}$;模型组腹腔注射等量磷酸盐缓冲液。于再灌注 24 h 采用原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡神经元,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化法检测凋亡相关基因天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)和 bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达。结果 模型组脑缺血中心区神经元以坏死为主。与假手术组比较,模型组半影区神经元凋亡率显著增高,caspase-3、bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高[凋亡率:(68.65 \pm 0.79)%比(4.40 \pm 0.00)%, caspase-3 mRNA:2.563 \pm 0.250 比 0.153 \pm 0.020, bcl-2 mRNA:0.337 \pm 0.100 比 0.125 \pm 0.030, caspase-3 蛋白(吸光度值, A 值):0.57 \pm 0.05 比 0.37 \pm 0.03, bcl-2 蛋白(A 值):0.51 \pm 0.04 比 0.35 \pm 0.01, 均 $P < 0.01$]。与模型组比较,Leptin 干预组半影区神经元凋亡率显著降低[(42.30 \pm 8.45)%比(68.65 \pm 0.79)%, $P < 0.01$]。与模型组比较,Leptin 干预组半影区神经元凋亡率显著降低[caspase-3 mRNA:2.267 \pm 0.040 比 2.563 \pm 0.250, caspase-3 蛋白(A 值):0.45 \pm 0.04 比 0.57 \pm 0.05, $P > 0.05$ 和 $P < 0.01$]。bcl-2 mRNA 和蛋白表达显著升高[bcl-2 mRNA:0.662 \pm 0.040 比 0.337 \pm 0.100, bcl-2 蛋白(A 值):0.76 \pm 0.09 比 0.51 \pm 0.04, 均 $P < 0.01$]。结论 Leptin 能够通过下调促凋亡基因 caspase-3 表达、上调抑凋亡基因 bcl-2 表达,从而抑制神经元凋亡,在脑缺血性损伤中发挥神经保护作用。

【关键词】 瘦素; 缺血/再灌注损伤,脑; 神经元; 凋亡; 神经保护

The role of Leptin on neuron apoptosis in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury YAN Guang-tao, SI Yi-ling, ZHANG Jin-ying, DENG Zi-hui, XUE Hui. Research Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
Corresponding author: YAN Guang-tao, Email: yan301@263.net

【Abstract】 **Objective** To study the effect of Leptin on neuron apoptosis in mice with cerebral ischemia injury and its mechanism. **Methods** Seventy-five mice were randomly divided into three groups. Focal cerebral ischemia/reperfusion injury model in mice was reproduced by middle cerebral artery occlusion for 2 hours followed by reperfusion. In Leptin intervention group mice were given Leptin 1 $\mu\text{g/g}$ during cerebral ischemia by intraperitoneal injection. Mice in the model group were given equal amount of phosphate buffer saline. After reperfusion for 24 hours, the neuron apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The mRNA and protein expression of apoptosis relative gene caspase-3 and bcl-2 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry. **Results** Most of neuron necrosis was observed in cerebral ischemia center in model group. Compared with sham-operation group, neuron apoptosis rate, mRNA and protein expression of caspase-3 and bcl-2 in model group increased significantly [apoptosis rate: (68.65 \pm 0.79)% vs. (4.40 \pm 0.00)%, caspase-3 mRNA: 2.563 \pm 0.250 vs. 0.153 \pm 0.020, bcl-2 mRNA: 0.337 \pm 0.100 vs. 0.125 \pm 0.030, caspase-3 protein (absorbance value, A value): 0.57 \pm 0.05 vs. 0.37 \pm 0.03, bcl-2 protein (A value): 0.51 \pm 0.04 vs. 0.35 \pm 0.01, all $P < 0.01$]. The apoptosis rate of penumbra neurons was reduced in Leptin intervention group significantly compared with model group [(42.30 \pm 8.45)% vs. (68.65 \pm 0.79)%, $P < 0.01$]. Compared with model group, the mRNA and protein expression of caspase-3 in Leptin intervention group were reduced significantly [caspase-3 mRNA: 2.267 \pm 0.040 vs. 2.563 \pm 0.250, caspase-3 protein (A value): 0.45 \pm 0.04 vs. 0.57 \pm 0.05, $P > 0.05$ and $P < 0.01$], and the mRNA and protein expression of bcl-2 in Leptin intervention group upregulated significantly [bcl-2 mRNA: 0.662 \pm 0.040 vs. 0.337 \pm 0.100, bcl-2 protein (A value): 0.76 \pm 0.09 vs. 0.51 \pm 0.04, both $P < 0.01$]. **Conclusion** Leptin could reduce apoptosis of neurons through down-regulation of the expression of caspase-3 and up-regulation of the expression of bcl-2. The results suggest that Leptin plays a neuroprotective role in cerebral ischemia injury.

【Key words】 Leptin; Cerebral ischemia/reperfusion injury; Neuron; Apoptosis; Neuro-protection

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.008 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670821)

作者单位:100853 北京,解放军总医院基础医学研究所生物化学研究室

通信作者:颜光涛,Email:yan301@263.net

瘦素(Leptin)是由 ob 基因编码的一种脂源性多肽分子,在机体能量调节方面有重要作用。大量证据表明,Leptin 与脑发育关系密切,啮齿类动物出生第 2 周 Leptin 水平显著升高,此时 Leptin 并不是作为能量调节因子在起作用,而是作为营养因子促进下丘脑摄食控制环路的发育^[1-4]。此外,大脑皮质、海马、神经元细胞和胶质细胞的成熟及运动能力均需要 Leptin 存在,Leptin 缺陷的 ob/ob 小鼠脑组织较小,而且髓磷脂水平显著降低,给予外源性 Leptin 后可明显增加脑的重量,纠正神经发育的缺陷^[5]。那么,Leptin 在脑缺血性损伤中能发挥怎样的作用?目前,关于 Leptin 对缺血性脑损伤的神经保护作用已屡见报道,但其作用机制至今还不清楚。本研究建立小鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)2 h 后再灌注致局灶性脑缺血/再灌注(I/R)模型,研究 Leptin 在脑缺血性损伤神经元凋亡中的作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及试剂:雄性昆明小鼠 75 只,体重 20~25 g,由中国医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK-2007-004。小鼠 Leptin 购自美国 PEPROTECH 公司;氯化三苯四唑(TTC)购自美国 Sigma 公司;原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;TRIzol 购自美国 Promega 公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;兔抗鼠天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、bcl-2 多克隆抗体购自美国赛默飞世尔公司;羊血清、链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计:根据 GeneBank 数据库公布的小鼠 caspase-3、bcl-2 和 β -肌动蛋白(β -actin) cDNA 序列,应用 Primer 5.0 软件设计相应的引物,由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.3 动物分组及局灶性脑 I/R 模型制备:按完全随机数字表法将小鼠分成假手术组、模型组、Leptin 干预组 3 组,每组 25 只。戊巴比妥腹腔注射麻醉小鼠,采用改良的 Longa 线栓法^[6]制备动物模型,于脑缺血 2 h 后实现再灌注;假手术组仅插入线栓 0.5 cm。Leptin 干预组于缺血即刻(0 min)腹腔注射 Leptin(1 μ g/g);模型组腹腔注射等量磷酸盐缓冲液(PBS)。小鼠清醒 2 h 后参照 Longa 等^[6]方法进行评分,评为 1~3 分且解剖取脑时未发现蛛网膜下腔出血者为制模成功。本实验中动物处置方法符合

动物伦理学标准。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 TUNEL 检测细胞凋亡:各组取 5 只小鼠,于再灌注 24 h 后取脑,根据苏木素-伊红(HE)染色结果判定缺血梗死灶部位并进行切片。分别取 1 μ l 寡核苷酸末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)及地高辛标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(DIG-dUTP)加至 18 μ l 标记缓冲液中,加入 SABC,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素轻度复染;常规脱水、透明封片。显微镜下观察,细胞核固缩、浓染的棕褐色颗粒为 TUNEL 阳性细胞,每张切片取 5 个相互不重叠的高倍视野($\times 400$),计数阳性细胞数及神经细胞总数,并计算阳性率。

1.4.2 RT-PCR 检测凋亡相关基因 caspase-3、bcl-2 的表达:各组取 15 只小鼠,颈椎脱臼处死后迅速取脑,按照 TRIzol 说明书提取缺血侧脑组织总 RNA, RNA 纯度和完整性符合实验要求。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s(β -actin 56 $^{\circ}$ C 30 s),72 $^{\circ}$ C 30 s,36 个循环(β -actin 40 个循环);72 $^{\circ}$ C 7 min。取 5 μ l PCR 产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下用 Gel-ProImagerKit 成像系统拍照,半定量分析产物的吸光度(A)值,以其与内参照 β -actin 比较的相对 A 值来评定表达水平。

1.4.3 免疫组化检测凋亡相关蛋白 caspase-3、bcl-2 的表达:根据 HE 染色结果判定缺血梗死灶部位并进行切片,按试剂盒说明书采用 SABC 法进行免疫组化染色。显微镜下观察,胞质呈棕黄色着色为阳性细胞。光镜下每张切片随机选取 5 个视野,采用真彩色病理图像分析系统 4.0 测定平均 A 值,并进行半定量分析。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行方差齐性检验和正态分布检验,采用 *t* 检验和单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经元凋亡情况(表 1;图 1):假手术组仅见少量凋亡细胞;模型组凋亡细胞较假手术组明显增多($P<0.01$),主要分布于缺血梗死灶周边区(即半影区),在缺血中心区较少;Leptin 干预组凋亡细胞较模型组显著减少($P<0.01$)。

2.2 脑组织凋亡相关基因 caspase-3 和 bcl-2 的 mRNA 表达(表 2;图 2):RT-PCR 扩增产物电泳结果显示,caspase-3、bcl-2 所对应的条带大小正确。对各组条带进行 A 值分析,结果模型组再灌注 12、24、

36 h 促凋亡基因 caspase-3 表达显著高于假手术组 (均 $P < 0.01$); Leptin 干预组 caspase-3 表达较模型组降低, 再灌注 12 h 和 36 h 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。模型组再灌注 12、24、36 h 抑凋亡基因 bcl-2 表达明显高于假手术组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Leptin 干预组再灌注 12 h bcl-2 表达较模型组稍有减弱, 再灌注 24 h 和 36 h bcl-2 表达水平较模型组显著增强 (均 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠脑缺血/再灌注 24 h 神经元凋亡细胞数及凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	凋亡细胞数(个)	凋亡率(%)
假手术组	5	1.00 ± 0.00	4.40 ± 0.00
模型组	5	12.83 ± 1.77 ^a	68.65 ± 0.79 ^a
Leptin 干预组	5	7.38 ± 1.36 ^{ab}	42.30 ± 8.45 ^{ab}

注, Leptin, 瘦素; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$

图 1 光镜下观察瘦素(Leptin)对小鼠脑缺血 2 h、再灌注 24 h 后脑组织缺血半影区神经元凋亡的影响 原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞呈核固缩、浓染的棕褐色颗粒; 假手术组(a)仅见少量凋亡细胞; 模型组(b)凋亡细胞较假手术组明显增多; Leptin 干预组(c)凋亡细胞较模型组显著减少 TUNEL × 400

表 2 各组小鼠脑缺血/再灌注 24 h 脑组织 caspase-3 和 bcl-2 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	caspase-3 mRNA	bcl-2 mRNA
假手术组	15	0.153 ± 0.020	0.125 ± 0.030
模型组	15	2.563 ± 0.250 ^a	0.337 ± 0.100 ^a
Leptin 干预组	15	2.267 ± 0.040 ^a	0.662 ± 0.040 ^{ab}

注, caspase-3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Leptin, 瘦素; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$

图 3 光镜下观察各组小鼠脑缺血半影区天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)和 bcl-2 的蛋白表达 细胞质呈棕黄色为阳性细胞; 假手术组有少量 caspase-3(a)、bcl-2(b)蛋白表达; 模型组 caspase-3(c)和 bcl-2(d)蛋白表达较假手术组显著增加; 瘦素(Leptin)干预组 caspase-3(e)蛋白表达较模型组显著减少, 但仍明显高于假手术组, bcl-2(f)蛋白表达较模型组进一步增强 免疫组化 × 200

caspase-3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin, β -肌动蛋白, M, Marker, 1~3 依次为: 假手术组、模型组、瘦素干预组再灌注 12 h, 4~6 依次为: 假手术组、模型组、瘦素干预组再灌注 24 h, 7~9 依次为: 假手术组、模型组、瘦素干预组再灌注 36 h

图 2 逆转录-聚合酶链反应检测各组小鼠脑缺血/再灌注后不同时间点凋亡相关基因的 mRNA 表达

2.3 脑缺血半影区凋亡相关蛋白 caspase-3、bcl-2 的表达 (表 3; 图 3): 假手术组 caspase-3 和 bcl-2 的蛋白表达较少。模型组 caspase-3 和 bcl-2 蛋白表达较假手术组显著增加 (均 $P < 0.01$)。Leptin 干预组 caspase-3 蛋白表达较假手术组明显增加 ($P < 0.01$), 但较模型组则显著减少 ($P < 0.01$); bcl-2 蛋白表达较模型组进一步增加 ($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠脑缺血/再灌注 24 h 脑组织 caspase-3 和 bcl-2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	caspase-3 蛋白(A 值)	bcl-2 蛋白(A 值)
假手术组	5	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.01
模型组	5	0.57 ± 0.05 ^a	0.51 ± 0.04 ^a
Leptin 干预组	5	0.45 ± 0.04 ^{ab}	0.76 ± 0.09 ^{ab}

注, caspase-3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Leptin, 瘦素; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$

3 讨论

有研究显示, 大鼠脑 I/R 损伤有细胞凋亡的参与, 24 h 后大脑中动脉和基底节区梗死灶边缘见大量 TUNEL 染色阳性细胞^[7-8]。大量研究认为, 凋亡

可能决定了缺血脑组织最终的梗死体积,针对凋亡环节的干预可减轻 I/R 损伤程度,改善卒中的预后^[9-10]。本研究中通过 TUNEL 染色观察凋亡神经元形态变化,发现脑 I/R 模型小鼠损伤侧脑组织缺血中心区主要以细胞坏死为主,周围的半影区存在较多的神经元凋亡,而 Leptin 干预组缺血半影区的凋亡细胞数量较模型组显著减少,提示 Leptin 的神经保护作用可能与抗凋亡作用有关。

caspase 是凋亡信号转导的共同通路,各种引起细胞凋亡的因素如 Fas、P53 等均须激活 caspase 才能导致细胞凋亡,caspase 家族中的 caspase-3 被认为是凋亡级联反应中的关键酶,其水平可间接反映细胞凋亡程度,对 caspase-3 的干预可减少凋亡发生。bcl-2 基因家族中的 bcl-2 具有抑制凋亡、促进细胞存活的作用^[11-12]。因此,细胞是否发生凋亡,依赖 caspase-3 和 bcl-2 表达的相对浓度。为探讨 Leptin、在脑 I/R 损伤中的抗凋亡机制,本研究中检测了在 Leptin 干预下,凋亡相关基因 caspase-3、bcl-2 mRNA 表达的变化。结果发现,假手术组再灌注 12 h caspase-3、bcl-2 在 mRNA 水平存在微量表达,再灌注 24 h、36 h 明显减弱,可能为机体对手术创伤的一过性应激反应所致;模型组脑组织 caspase-3、bcl-2 mRNA 表达升高;Leptin 干预组 caspase-3 mRNA 表达较模型组降低,此趋势于再灌注 24 h 最显著,bcl-2 mRNA 表达较模型组进一步升高。免疫组化法进一步分析发现,Leptin 对 caspase-3、bcl-2 蛋白表达的影响与 mRNA 表达一致,提示 Leptin 可通过抑制促凋亡基因 caspase-3 表达活化、诱导抑凋亡基因 bcl-2 表达,从而抑制脑缺血性损伤诱导的凋亡反应,促进神经细胞的存活。

目前在脑 I/R 损伤模型中针对 Leptin 和凋亡相关基因间关系的研究国内外尚未见报道。本研究初步明确了 Leptin 通过抑制促凋亡基因 caspase-3 表达活化、诱导抑凋亡基因 bcl-2 表达,在脑缺血性损伤中发挥抗凋亡的神经保护作用。此结果与 McGaffin 等^[13]观察到 Leptin 在心肌梗死模型小鼠中可通过信号转导和转录激活因子-3(STAT-3)信号途径上调 bcl-2 和 survivin(存活素)基因表达,下调 caspase-3 表达,从而起到心肌保护的作用相似。

虽然对 Leptin 诱导细胞凋亡的详细过程尚不十分清楚,但是越来越多的研究证据支持 Leptin 在损伤修复过程具有重要作用,提示其可能作为一个核心,以细胞能量调节为基础,以复杂的网络方式发挥着保护作用。

参考文献

- [1] Proulx K, Richard D, Walker CD. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology*, 2002, 143:4683-4692.
- [2] Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*, 2004, 24:2797-2805.
- [3] Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 2004, 304:108-110.
- [4] Udagawa J, Hashimoto R, Suzuki H, et al. The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. *Endocrinology*, 2006, 147:647-658.
- [5] Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, et al. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin, implications for brain development. *Endocrinology*, 1999, 140:2755-2762.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [7] 周宏锋,程多今,黄怀,等. 高压氧大鼠脑缺血/再灌注损伤细胞凋亡的作用研究. *中国危重病急救医学*, 2002, 14:692-694.
- [8] 邓焰,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. *中国危重病急救医学*, 2001, 13:478-480.
- [9] Blomgren K, Leist M, Groc L. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis*, 2007, 12:993-1010.
- [10] Liu XB, Wang JA, Yu SP, et al. Therapeutic strategy of erythropoietin in neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008, 7:227-234.
- [11] Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia, multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol*, 2008, 37:7-38.
- [12] 谭永星,王迪芬,李雪梅,等. 神经生长因子预处理对沙土鼠全脑缺血/再灌注损伤脑神经细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19:358-360.
- [13] McGaffin KR, Zou B, McTiernan CF, et al. Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res*, 2009, 83:313-324.

(收稿日期,2010-10-15) (本文编辑,李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞;监护仪 (封二)
- ②广东天普药业;天普洛安 (插页)
- ③珠海健帆;血液灌流器 (插页)
- ④天津生化制药;琥珀氢可 (插页)
- ⑤天津红日药业;血必净注射液 (插页)
- ⑥北京极远;美国萨勃心肺复苏器 (插页)
- ⑦廊坊爱尔;炭肾 (插页)
- ⑧德尔格;Smart Care™智能化自动脱机系统 (插页)
- ⑨恩华药业;力月西 (插页)
- ⑩赛诺菲安万特(北京)制药;注射用替考拉宁 (插页)
- ⑪南京臣功药业有限公司 (插页)
- ⑫第一制药;克倍宁 (封三)
- ⑬江苏新晨医药有限公司 (封底)