

脑红蛋白在感染性脑水肿中的表达变化

田 源, 黄 栩, 邓云良, 周胜富(四川省宜宾市第三人民医院外二科 644000)

【摘要】 目的 探讨脑红蛋白(NGB)在脂多糖致感染性脑水肿中的表达。**方法** 60 只大鼠随机分为 3 组:脂多糖(LPS)组、生理盐水组、假手术组。分别向脂多糖组、生理盐水组大鼠颈内动脉注射 LPS 150 μg (0.15 mL)、生理盐水 0.15 mL 建立模型。建模后 12 h 取大鼠脑组织采用干湿重法检测脑组织含水量,甲酰胺法检测血脑屏障通透性,反转录聚合酶链反应检测 NGB mRNA 含量,以及免疫组化法检测 NGB 蛋白表达。**结果** 12 h 后 LPS 组脑组织含水量 $82.14\% \pm 0.43\%$,伊文思蓝含量(10.70 ± 0.36) μg ,NGB mRNA 及蛋白表达量(1.31 ± 0.08)明显高于生理盐水组以及假手术组($P < 0.05$),假手术组和生理盐水组脑组织含水量、伊文思蓝含量、NGB mRNA 以及蛋白表达差异无统计学意义。**结论** 脑红蛋白在 LPS 致感染性脑水肿模型中明显升高,其可能为机体对感染性脑水肿的一种保护机制。

【关键词】 脑红蛋白; 脂多糖; 感染性脑水肿; 保护机制

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.17.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)17-2128-02

The research of NGB expression change in infective brain edema induced by lipid polysaccharide TIAN Yuan, HUANG Xu, DENG Yun-liang, ZHOU Shen-fu(The Department of Second Surgery, The Third People's Hospital of Yibin, Sichuan 644000, China)

【Abstract】 Objective To explore the expression of neuroglobin(NGB) in rats brain edema model induced by lipid polysaccharide(LPS). **Methods** 60 female rats were randomly divided into 3 groups:lipid polysaccharide group (L),saline group(S group),Sham group(C group). Three groups were carotid injected with LPS 150 μg (0.15 mL),saline 0.15 mL,nothing respectively. After 12 hours,all rats were sacrificed,and the brain tissues were harvested. Dry-wet weight,evan blue,RT-PCR,and immunohistochemistry were used to measure the brain tissue water content,the integrity of blood-brain barrier,the gene and protein expression of NGB. **Results** 12 hours after the operation,the brain tissue water contents,EB value,NGB mRNA and protein expression were significantly high in LPS group,and the the brain tissue water contents,EB value,NGB mRNA and protein expression were not statistically significant between C and S group. **Conclusion** The expression of NGB in rats brain edema model induced by lipid polysaccharide(LPS) is obviously high,it maybe the protection mechanism of NGB in rat brain edema.

【Key words】 neuroglobin; lipid polysaccharide; infectious brain edema; protection mechanism

脑红蛋白(NGB)是神经元中重要的携氧蛋白,在神经元缺氧时能加速氧的运输,具有一系列神经元保护作用。此外,NGB 可在缺氧状态下减少细胞间信号转导、降低神经元耗能,发挥还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶的功能,以增加细胞供能,诱导神经营养因子生成,清除活性氧(ROS)以减轻脂质过氧化。本研究通过向大鼠颈内动脉注射脂多糖,建立大鼠感染性脑水肿模型,观察大鼠水肿情况、血脑屏障通透性、NGB 在大脑组织内的表达,以及三者之间的相关性,为阐明 NGB 在感染性脑水肿中的保护作用提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司产品);伊文思蓝(evansblue,英国 Koch-light 公司);去离子甲酰胺(pormamide,美国 Sigma 公司产品);羊抗大鼠 NGB 多克隆抗体(美国 Sigma 公司产品);二氨基联苯胺(DAB,上海碧云天公司);细胞裂解液(上海碧云天公司)。

1.2 动物模型建立以及标本制备 60 只雌性 8 周龄 SD 大鼠(购自重庆医科大学动物中心),随机分为 3 组:LPS 组,游离颈总动脉以及颈内外动脉,注入脂多糖 150 μg (0.15 mL);假手术组,游离颈总动脉以及颈内外动脉,不注入任何东西;生理盐水组,游离颈总动脉以及颈内外动脉,注入生理盐水 0.15 mL。12 h 后采用断头法处死大鼠,取大鼠脑组织,沿中轴线切开,

1/4 用于大脑含水量测定,1/4 用于检查血脑屏障通透性,一半取出后放于液氮罐中保存用于反转录聚合酶链反应(RT-PCR)以及免疫组化。

1.3 干湿重法检测脑组织含水量 大鼠脑组织取出后,用电子天平称大脑湿重。将称重后的脑组织放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘干 24 h,再次用电子天平称大脑干重。脑组织相对含水量 = [(脑组织湿重 - 脑组织干重) / 脑组织湿重] $\times 100\%$ 。

1.4 甲酰胺法检测血脑屏障通透性 处死大鼠前 4 h,通过颈外动脉注射 2%伊文思蓝 0.1 mL(浓度 2 mg/mL)。4 h 后取大脑组织,研磨后加入 2 mL 生理盐水制作细胞悬液,在 345 nm 波长下测定吸光度。倍比稀释法制作标准曲线,根据标准曲线得出脑组织伊文思蓝含量,间接反映血脑屏障通透性。

1.5 RT-PCR 检测脑组织内 NGB mRNA 含量 根据 GenBank 查找大鼠 NGB 基因序列,设计引物序列上游 5'-GAG GGT CCC ATC ACT GCG-3',下游 5'-TAG GGG CTC TGG CTT GCG-3',扩增片段为 523 bp。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, β -actin 引物序列上游 5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3',下游 5'-CGTCAT ACT CCT GCT TGC TG-3'。用 TRIzol 提取组织总 RNA,方法参照产品说明书,取 0.5 μg 总 RNA 用于 RT-PCR,方法参照 RT-PCR 试剂盒,RT 反应条件为:42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;PCR 反应条件:

94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共 35 个循环;72 ℃ 5 min。取 5 μL PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μg/mL)电泳,180 V,电泳 10 min,然后在 BIO-RAD 成像仪上成像分析。

1.6 免疫组化检测大鼠脑组织内 NGB 蛋白表达 免疫组化采用 SP 法,每个蜡块取 4 mm 厚连续切片做免疫组化染色,具体染色方法按试剂盒说明书进行。羊抗大鼠 NGB 多克隆抗体购自美国 Sigma 有限公司,SP 免疫组化试剂盒和抗体稀释液购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.7 统计学处理 所有数据均采用 SPSS10.5 统计软件进行方差分析和 *t* 检验,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑组织含水量 采用干湿重法检测脑组织含水量,结果显示 LPS 组大鼠脑组织含水量显著升高(见表 1)。与假手术组和生理盐水组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),生理盐水组和假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 脑组织含水量及伊文思蓝含量测定($\bar{x} \pm s$)

组别	标本量(个)	含水量(%)	伊文思蓝含量(μg)
假手术组	10	78.96±0.86 ^a	7.17±0.21 ^a
生理盐水组	10	79.02±0.13 ^b	7.24±0.49 ^a
LPS 组	10	82.14±0.43	10.70±0.36

注:与 LPS 组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 脑组织中伊文思蓝含量检测 注入伊文思蓝后 4 h,去大鼠脑组织,可见大鼠脑组织蓝染。结果显示 LPS 组大鼠脑组织内伊文思蓝含量最高(表 1)。与假手术组以及生理盐水组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),生理盐水组和假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明注射 LPS 能够显著破坏大脑的血脑屏障通透性,而假手术组和生理盐水组大脑屏障破坏不明显。

2.3 脑组织中 NGB mRNA 含量检测 脑组织中 mRNA 含量由 RT-PCR 技术检测。RT-PCR 结果显示所有标本在 543 bp 处均出现 β-actin 特异性扩增条带,LPS 组、生理盐水组以及假手术组均在 523 bp 处出现特异性扩增条带(图 1)。各标本经过凝胶成像系统分析(以特意扩增条带比内参)LPS 组 NGB mRNA 表达水平为 1.31 ± 0.08 ,假手术组 NGB mRNA 表达水平在 0.44 ± 0.05 ,生理盐水组 NGB mRNA 表达水平在 0.46 ± 0.01 ,LPS 组与生理盐水组以及假手术组比较差异具有统计学意思($P < 0.05$)。



图 1 NGB mRNA 在各组脑组织中的表达

2.4 免疫组化检测 NGB 在脑组织中的表达 免疫组化分析显示 LPS 组 30 只大鼠 NGB 在细胞膜上表达呈阳性表达,胞核膜为棕色或者棕黄色,阳性表达率为 100%。生理盐水组 10 只大鼠中 1 只表达阳性,阳性表达率为 10%,见图 2;假手术组 2 只大鼠表达阳性,阳性表达率为 20%。

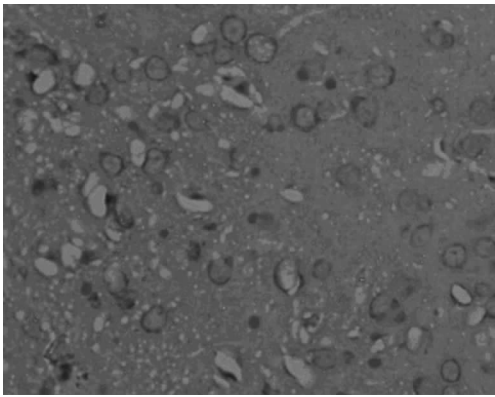


图 2 NGB 在脑组织中的表达(SP×200)

3 讨 论

病理学上,感染性脑水肿是一种由感染引起的急性弥散性混合性脑水肿,其两大特征为脑细胞水肿以及血脑屏障的破坏^[1-2]。正常情况下,经静脉注射伊文思蓝,伊文思蓝不能够通过完整的血脑屏障到大脑组织。当感染缺血等病理因素存在时,血脑屏障的完整性受到破坏,静脉注射的伊文思蓝可以通过血脑屏障进入到脑组织中,且伊文思蓝进入脑组织的量和血脑屏障的破坏呈正相关关系。本实验通过颈内静脉注射 LPS 建立感染性脑水肿模型,在注射后 12 h 可以明显观察到,脑细胞出现水肿,且脑细胞出现蓝染。LPS 以及 LPS-LPS 结合蛋白形成抗原抗体复合物,可以促使巨噬细胞合成大量炎症细胞因子,诱导血管内皮细胞、巨噬细胞和中性粒细胞产生大量诱导型活性氮进一步引起机体抗氧化酶特别是超氧化物歧化酶活性降低。机体活性氧离子增高,超氧化物增多对机体的神经元细胞造成损伤。

珠蛋白家族是一类广泛存在于细菌、真菌、动植物中的氧合亚铁血红素蛋白,其功能包括:结合氧及转运氧、清除一氧化氮(NO)活性成分或解毒作用、氧感受器功能等。NGB 属于珠蛋白家族的成员,具有珠蛋白的基本结构,即 1 个血红素结构和蛋白质肽链,主要存在于大脑中^[3]。自从 2000 年 Burmester 等^[4]在脑组织中报告 NGB 以来,大量科学家对 NGB 进行了研究。目前研究认为,NGB 通过别构调节特异性结合并还原过多的 NO,从而清除神经组织中的 ROS。NGB 表达上调可显著延长缺氧环境中神经元的耐缺氧时限并提高神经元的存活率^[5-9]。此外目前研究还表明,NGB 能保护细胞抵抗非低氧性损伤,可能和阿尔茨海默病以及遗传性 rritinopathy 病有关^[10]。

本研究证实,LPS 可以使血管内皮细胞肿胀,从而降低脑血流的灌注。大脑低灌注可引起大量活性氧离子的释放。活性氧离子的释放会加重血管的损伤,引起血管内物质外溢,造成脑水肿。脑水肿进一步造成颅内微环境变化,引起神经元的损伤。在造成神经元损伤过程中会激发机体启动神经元自身的保护机制,作为神经系统中最重要携氧蛋白和主要的超氧化物歧化酶清除者,NGB 很有可能参与神经元保护。在颈内动脉注入 LPS 后 12 h,大鼠出现明显脑水肿,以及血脑屏障的严重破坏。同时 NGB 的基因以及蛋白的表达量出现升高,提示 NGB 可能作为一种保护机制参与 LPS 所致感染性脑水肿。

综上所述,作者认为 LPS 可以通过改变脑血管灌注压,从而改变脑血流情况,出现脑细胞水肿,血脑屏障破坏。在 LPS 注入大鼠颈内静脉后 12 h,作者用 RT-PCR(下转第 2131 页)

表 2 肝硬化患者血小板 4 项参数的比较($\bar{x}\pm s$)					
组别	n	PLT($\times 10^9/L$)	PCT(%)	MPV(fL)	PDW(%)
有出血组	54	49.67 $\pm$ 28.53	0.06 $\pm$ 0.04	11.64 $\pm$ 1.31	14.50 $\pm$ 2.99
无出血组	60	93.71 $\pm$ 43.56	0.09 $\pm$ 0.06	12.39 $\pm$ 1.08	17.01 $\pm$ 3.20
t(t')		6.48	2.11	3.33	4.31
P		<0.01	<0.05	<0.01	<0.01

3 讨 论

肝硬化对血小板的影响也是一个复杂的问题,涉及血小板的形态、结构、生理、生化性质等多方面的改变,带有数量和功能异常,引起凝血功能障碍。一般认为,血小板减少有 3 种原因:骨髓生成不良、血小板破坏过多和分布异常。其数量和体积的大小可反映骨髓中巨核细胞增生、代谢及血小板生成情况,同时也反映血小板的寿命与功能。

由表 1 结果可知,PLT 和 PCT 低于对照组,MPV 和 PDW 高于健康对照组,说明肝硬化患者血小板数量减少为血小板消耗过多,破坏增加或分布异常,并且血小板有质量的改变。由表 2 结果可知,肝硬化有出血组 PLT、PCT 低于无出血组,MPV 和 PDW 也低于无出血组,说明有出血组患者血小板消耗更多,且其消耗速度大于骨髓巨核系统代偿增生的速度。其原因可归结为以下几个主要方面:(1)HBV 对骨髓巨核细胞系统有明显的抑制使用,骨髓增生不良导致 PLT 数量减少^[2-3]。(2)慢性活动性乙型肝炎伴自身免疫功能紊乱,血小板相关免疫球蛋白水平升高,使血小板免疫破坏增加,致血小板减少。(3)脾脏是储存血小板的主要场所,肝硬化患者常伴有脾脏功能亢进,使 PLT 在网状内皮系统破坏增多,半衰期缩短,消耗增加,是外周血 PLT 总数减少的重要原因^[4-5]。另外,血小板在病理过程中逐步消耗,促使骨髓巨核系统代偿性增生,大体积血小板生成增多。同时由于机体适应性的需求,使血小板在脾脏的停留时间缩短,成熟受抑制,寿命缩短,血小板参数表现为 MPV、PDW 增加。(4)肝硬化患者可有不同程度的低蛋白血症,MPV 作为应激性反应指标,随着血液中蛋白质浓度的下

降和血小板数量的减少,导致新生血小板反应性增多,形成“应激性大血小板”致使 MPV 升高^[6-7]。(5)上消化道出血是肝硬化最常见的并发症,出血患者体内 PLT 消耗加剧,暂时超过了骨髓巨核系统代偿增生的能力,故 MPV、PDW 低于无出血组,但仍高于健康对照组($P<0.05$)。

综上所述,多种因素的综合使用可导致血小板各项参数改变,随着肝硬化病程的进展,血小板 4 项参数均发生了质和量的显著改变,数量减少、质量降低都可引起消化道出血。所以,动态、联合检测、观察血小板参数的变化,可作为对患者病情观察,疗效指导及预后判断的补充性指标,具有一定的临床价值。

参考文献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.

[2] Chai T, Prior S, Cooksley WG, et al. Infection of human bone marrow stromal cells by hepatitis B virus: implications for viral persistence and the suppression of hematopoiesis[J]. J Infect Dis, 1994, 169(4): 871-874.

[3] 王征, 张世斌. 肝炎肝硬化患者血小板急剧下降病因分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(8): 725-726.

[4] 金述满. 肝硬化患者凝血指标与血小板参数检测的临床意义[J]. 中国慢性病预防与控制, 2010, 18(1): 90.

[5] 霍洁茹, 常敏凤. 血小板参数和凝血指标检测在肝硬化诊疗中的临床意义[J]. 医学综述, 2011, 17(21): 3358-3359.

[6] 于宠升, 包旗, 张媛媛. 凝血指标和血小板参数与肝硬化 child-pugh 分级的关系[J]. 中国初级卫生保健, 2010, 24(3): 100.

[7] 王东霞, 张卫群, 张菁菁. 肝硬化患者肝功能与凝血指标检测结果的对比分析[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(4): 31-32.

(收稿日期:2012-05-14)

(上接第 2129 页)

以及免疫组化技术检测大鼠脑组织中 NGB, 呈现高表达。据此作者推测, NGB 的高表达是机体神经元细胞的一种保护机制, 可参与 LPS 所致感染性脑水肿, 保护神经元细胞, 增强神经元细胞的缺血、缺氧耐受性。

参考文献

[1] Davis DP, Idris AH, Sise MJ, et al. Early ventilation and outcome in patients with moderate to severe brain injury [J]. Cdt Care Med, 2006, 34(4): 1202-1208.

[2] 王震, 李刚, 祁晓平, 等. 维拉帕米对 LPS 诱导的大鼠淋巴细胞凋亡及促炎/抗炎细胞因子比例的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(11): 1054-1055.

[3] 贺建勋, 雷鹏. 脑红蛋白: 内源性神经保护因子[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2008, 13(6): 287-288.

[4] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain [J]. Nature, 2000, 407(6803): 520-523.

[5] 王海波, 秦水伟, 程纯, 等. LPS 对大鼠雪旺氏细胞 iNOS 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(9): 815-818.

[6] 秦豪杰, 张录顺, 武娜, 等. 脑红蛋白在人体组织细胞的定位分布及意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2008, 39(4): 609-611.

[7] 尹时华, 龚树生, 鄢开胜, 等. 水杨酸钠给药对小鼠下丘核 NGB mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(23): 2130-2132.

[8] 陈秀莲, 陈瑞, 于培兰, 等. 高压氧对短暂前脑缺血小鼠额叶皮质脑红蛋白表达的影响[J]. 解剖学报, 2007, 38(3): 286-290.

[9] Araki E, Forster C, Dubinsky JM, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor ns-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity [J]. Stroke, 2001, 32(10): 2370-2375.

[10] Powers JM. p53-mediated apoptosis, neuroglobin overexpression, and globin deposits in a patient with hereditary ferritinopathy [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(7): 716-721.

(收稿日期:2012-04-10)