

脑血疏通对实验性血管性痴呆大鼠脑内 P53mRNA 和 HSP70mRNA 表达的影响

项宝玉 谢道珍 史大卓 尹太英(中国中医研究院西苑医院 北京 100091)

摘要 用左心室注射石蜡油造成多发性梗塞(VaD)的动物模型,采用组织原位杂交技术及生物医学图像分析技术,测定了 VaD 大鼠脑内 P53mRNA、HSP70mRNA 的表达水平。结果显示脑血疏通可通过减弱

P53mRNA 的表达,促进 HSP70mRNA 表达,起到加速修复,保护脑缺血神经元的作用。

关键词 脑血疏通 原位杂交 基因表达

The Effect of Naoxie Shutong Oral Liquid on P53 and HSP70 Gene Expression in Brain Tissue in Rats with Experimental Vascular Dementia

Xu Baoyu, Xie Daozhen, Shi Dazhuo, Yin Taiying

(Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing, 100091)

Abstract: The in situ hybridization and biomedical image pattern analysis were applied in this experiment to examine P53 mRNA and HSP70 mRNA expression level in vascular dementia (VaD) of brain tissue in rats with MID produced by injecting paraffin oil to left ventricle. The result showed that Naoxie Shutong oral liquid (NXST) can improve the expression of HSP70 mRNA by diminishing the expression of P53 mRNA, leading to accelerating recovery and protecting the ischemic neuron of brain tissue.

Key words: NXST, in situ hybridization, gene expression

脑血疏通口服液是在谢道珍教授经多年临床研究的有效验方基础上研制而成,该方由生黄芪、水蛭、生大黄、石菖蒲、川芎等 7 味药组成,以益气活血化瘀为主要功效,临床治疗血管性痴呆,每日 2 次,每次 20ml,疗程 2 个月,总有效率为 55.6%,与都可喜组无差异。对不同证型 VaD 患者疗效分析:符合证型者总有效率明显高于非符合证型者,显示中医辨证论治的重要性。为了探讨该药的作用机理,本研究采用左心室注射液体石蜡油的方法,建立血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 的动物模型。用组织原位杂交技术及图像分析技术测定了 VaD 大鼠脑内热休克蛋白 (heat shock protein 70, HSP70) 基因和抑癌基因 P53mRNA 的表达水平,从分子水平探讨脑血疏通治疗 VaD 的作用机理。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠,雄性,体重(260.1±20.1)g,由中国药品生物制品检定所动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 地高辛-dUTP 标记试剂盒、RNase:德国 Boehringer Mannheim 公司产品;焦碳酸二乙酯 (DEPC, 4℃ 保存)、硫酸葡聚糖 (Dextran Sulphate Na)、甘氨酸、氮蓝

四唑 (BNT):Sigma 产品;鲑精 DNA、蛋白酶 K、热休克蛋白 (HSP70) 基因探针 (2.3Kb)、λDNA (EcoRI/Hind III Mark):华美生物工程公司产品;限制性内切酶 (EcoRI/Hind III):均为美国 Promega 公司产品;抑癌基因 P53 探针 (1.8Kb):北京中山生物技术有限公司产品;琼脂糖、溴酚蓝:北京化学试剂公司产品;二甲苯靛蓝:Eastman Kodak 公司产品;其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 材料及仪器 冰冻切片机: SLEE 型,英国;高速冷冻离心机, Sigma 3K 30 德国; Quantime-970 型图像分析仪:英国剑桥公司产品。

1.2 方法

1.2.1 组织切片制备 实验动物选用 SD 大鼠,雄性,体重(260.1±20.1)g,按解放军总医院老年医学研究所的方法建立血管性痴呆动物模型。本实验选经 Bederson JB 分级^[1] 属大于或等于 I 级以上的动物,按瘫痪程度均等原则分为(1)模型组:生理盐水;(2)脑血疏通 8.58g/kg 组;(3)脑血疏通 17.16g/kg 组;(4)西药对照组:都可喜 11.43mg/kg;(5)正常对照组:生理盐水。以上动物连续口服给药 14d,腹腔麻醉后,无菌断头取脑,迅速取前脑组织块分别于 0℃、-20℃、-70℃

各放置 30min 后,置于液氮内冻存。原位杂交前从液氮中取出,室温下复温 30~60min,用冰冻切片机(恒定低温-20℃)在前脑作 5~6 μ m 厚冠状连续冰冻切片,将其贴于涂有 0.1%APEC 的载玻片上,充分晾干,4℃冰箱保存备用。

1.2.2 组织原位杂交 操作过程:①杂交预处理:冰冻切片用 4%多聚甲醛溶液固定 5min,梯度乙醇脱水入 PBS 和 HCl 液作用各 10、20min,蛋白酶 K (1 μ g/ml) 37℃消化 15min,2 \times SSC 洗 5min,4%多聚甲醛固定 10min,PBS 洗 15min,每张切片上滴加预杂交液(50%去离子甲酰胺、6 \times SSC、5 \times Denhert's 液、0.5%SDS、100 μ g/ml 变性鲑精 DNA、100 μ g/ml tRNA) 50 μ l、42℃预杂交 2h;②杂交:弃去预杂交液,每片滴加 40 μ l 杂交液(预杂交液中探针浓度 1 μ g/ml)于湿盒中 42℃温箱杂交并过夜。次日取出玻片,经 6 \times SSC(室温)、45%甲酰胺 42℃、2 \times SSC(室温)各洗片 2 次,每次 15min,缓冲液 I (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5) 浸泡 1min,缓冲液 II (缓冲液 I 中加 0.3% Triton-100) 中浸泡 30min,再用缓冲液 I 浸泡 1min,滴加缓冲液 I 稀释的抗体结合物(1:2500),室温反应 30min,缓冲液 I 洗 2 次,每次 15min,再用缓冲液 III (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, pH9.5) 平衡 2min;③显色反应:加入显色液(含缓冲液 III 10ml、左旋咪唑终浓度 0.24mg/ml、NBT 液 45 μ l、X-磷酸盐液 35 μ l)避光显色 6h,用 TE 缓冲液终止反应,然后脱水、透明、封片,紫蓝色或兰色产物为核酸杂交阳性信号。以上两种探针进行组织原位杂交时,皆设立 RNase 消化及无探针阴性对照组。

1.2.3 图像分析 在 Polyvar 光学显微镜下,观察实验性 VaD 大鼠脑组织的原位杂交基因表达结果。将光镜下脑组织图像直接输入 Quantime-970 型自动图像分析仪,定量测定单位面积阳性反应颗粒的光密度值

(MOD)和积分光密度值(IOD)。

1.2.4 统计学处理 所有资料均 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 P53 mRNA 的表达 以地高辛标记的 P53 探针与脑组织 mRNA 原位杂交,阳性杂交信号为紫蓝色细颗粒状,均位于脑组织细胞胞浆内。经图像分析:模型组及脑血疏通小剂量组和都可喜组的 MOD 值和 IOD 值均明显高于正常对照组;而脑血疏通大剂量组的 MOD 和 IOD 值又明显低于模型组,见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织 P53mRNA 原位杂交图像分析结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MOD	IOD
正常对照组	5	0.05810 \pm 0.01081	29174.4 \pm 5402.50
VaD 模型组	5	0.12447 \pm 0.03134 $\Delta\Delta$	62359.2 \pm 15671.77 $\Delta\Delta$
脑血疏通(小)	5	0.08404 \pm 0.01169 $\Delta\Delta^*$	42040.6 \pm 5931.77 $\Delta\Delta^*$
脑血疏通(大)	5	0.07104 \pm 0.01571 **	34643.4 \pm 7323.13 **
都可喜组	5	0.08768 \pm 0.00429 $\Delta\Delta^*$	43961.0 \pm 2145.6 $\Delta\Delta^*$

注:与正常对照组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;

与模型组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 HSP70mRNA 的表达 图像分析结果:VaD 模型组及各给药组脑组织 HSP70mRNA 阳性反应颗粒的 MOD 和 IOD 均明显高于正常对照组。尤其以脑血疏通大剂量组更为明显,见表 2。

表 2 各组 VaD 大鼠脑组织 HSP70 mRNA 原位杂交图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MOD	IOD
正常对照组	5	0.10648 \pm 0.01698	53361.00 \pm 8488.29
VaD 模型组	5	0.12948 \pm 0.00434 Δ	60790.20 \pm 23969.80 Δ
脑血疏通(小)	5	0.14456 \pm 0.01354 $\Delta\Delta^*$	72921.00 \pm 6767.84 $\Delta\Delta^*$
脑血疏通(大)	5	0.22310 \pm 0.02426 $\Delta\Delta\Delta^{**}$	111916.4 \pm 10669.75 $\Delta\Delta\Delta^{**}$
都可喜组	5	0.19359 \pm 0.05506 $\Delta\Delta^*$	91153.69 \pm 16381.19 $\Delta\Delta^*$

注:与正常对照组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与模型组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

3.1 脑血疏通对 VaD 大鼠脑内 P53 基因表达的影响 P53 基因有两种,即野生型 P53 基因(正常的)和突变型 P53 基因(异常的)。正常的 P53 监测基因组的完善。如果 DNA

受到损伤, P53 便累积, 关闭 DNA 复制, 使之有额外的时间得到修复, 如果修复失败, P53 便可通过“细胞凋亡”诱发细胞自杀^[8]。目前认为: 细胞凋亡并不仅仅是一种自身保护性机制, 它可能与许多病理状态, 诸如肿瘤、衰老、痴呆及缺血等的发病机制有密切关系^[3~5]。过去一直认为脑缺血后大部分神经细胞的死亡形式是坏死, 但是从 1993 年以来大量研究已证实脑缺血后神经细胞凋亡参与梗塞灶形成, 迟发性神经元死亡中有凋亡成分。目前认为: 细胞凋亡受多种基因的调控, 其中 P53 基因被认为是细胞凋亡的主要因素之一^[6, 7], 两种不同 P53 基因(突变型和野生型)对细胞凋亡的调节作用不同。野生型 P53 基因诱导细胞凋亡的发生, 而突变型 P53 基因抑制细胞凋亡过程^[8]。

本研究用组织原位杂交技术观察了实验性 VaD 模型大鼠脑内野生型 P53mRNA 表达情况, 结果 VaD 模型组, 脑血疏通大小剂量组及都可喜组的 P53mRNA 表达明显高于正常对照组, 提示野生型 P53 基因参与缺血过程的损伤, 其原因可能与野生型 P53 基因促进细胞凋亡有关。脑血疏通大小剂量组及西药都可喜组的 P53mRNA 表达又明显低于模型组, 提示脑血疏通能通过减弱 P53mRNA 的表达, 对实验性 VaD 大鼠脑缺血性损害起到一种保护作用。

3.2 脑血疏通对实验性(VaD)大鼠脑内 HSP70 基因表达的影响 热休克蛋白(HSP)是细胞受热或因缺血、感染、创伤等理化因素刺激后, 诱导产生的一组应激蛋白, 根据其分子量大小分为 HSP30、HSP70、HSP90 等, 其中 HSP70 是大多数生物中含量最多的 HSP。HSP 的功能主要是维持细胞蛋白自稳, 一般认为 HSP70 保护细胞的作用主要体现在两个方面: 抵抗损伤和加速修复^[9]。目前

认为 HSP70 具有保护脑细胞, 增加脑细胞对缺血缺氧的耐受性, 抵抗进一步致死性损伤的作用。本研究结果表明: 模型组及各给药组 VaD 大鼠脑内 HSP70mRNA 的 MOD 和 IOD 值明显高于正常组, 提示 HSP70mRNA 具有抵抗损伤作用, 而脑血疏通大小剂量组 HSP70mRNA 表达又明显高于模型组, 提示脑血疏通能通过促进 HSP70mRNA 表达, 起到加速修复, 保护脑缺血神经元的作用, 而这种作用以脑血疏通大剂量组更为明显。

参考文献

- 1 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M. Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of Model and Development of a Neurological Examination. *Stroke*, 1986, 17: 472
- 2 林万明. 核酸探针杂交实用技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 80~84
- 3 李卫平, 刘晓加, 林宏川, 等. 老年期痴呆患者脑内细胞凋亡现象的研究. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6): 340
- 4 许长庆, 钱采韵. 细胞凋亡与 Alzheimer 病. *国外医学 老年医学分册*, 1996, 17(6): 241
- 5 冯建芳, 章静波. 程序性细胞死亡及细胞凋亡. *生理科学进展*, 1995, 26(4): 373
- 6 阎水忠, 赵晓航, 吴昊. 细胞凋亡与癌基因. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21(3): 222
- 7 王立生, 吴祖泽, 贺福初. 程序性细胞死亡相关基因及调节作用. *生理科学进展*, 1996, 27(2): 153
- 8 Yonish-Rouach E, Resnitzky J, Lotern J, et al. Wild-type P53 Induced Apoptosis of Myeloid Leukaemic Cells that is Inhibited by Interleukin 6. *Nature*, 1991, 352: 345~347
- 9 王燕如. 细胞保护与热休克蛋白. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 1995, 15(3): 198~200

(收稿: 1997-10-27)