

全脑缺血大鼠原癌基因 c-fos 表达及小檗碱的影响[△]

南京医科大学药理教研室(210029)

吴俊芳* 王 平** 王 洁*** 潘鑫鑫

刘天培

摘 要 采用结扎大鼠双侧颈总动脉合并低血压后再恢复供血造成大鼠脑缺血再灌注模型,运用斑点杂交技术,观察大鼠全脑缺血再灌注中海马 c-fos mRNA 表达的动态变化,并观察小檗碱(Ber)的作用。结果表明,大鼠全脑缺血 30 min 后再灌注 10~180 min,海马 c-fos mRNA 出现一过性高表达,1 h 达高峰,为假手术组的 5.1 倍。Ber 20 mg/(kg·d)×5 d ip 显著抑制脑缺血诱导的 c-fos 高表达,且明显升高 SOD 及 GSH-Px 活力,降低 MDA 含量。这表明,脑缺血过程中 c-fos 原癌基因呈现一过性高表达,Ber 的抗氧化自由基及降低 c-fos mRNA 水平的作用可能是其抗脑缺血作用机制之一。

关键词 小檗碱 脑缺血 原癌基因 c-fos 氧自由基

c-fos 原癌基因是立即早期基因家族中的一员^[1]。正常情况下 c-fos mRNA 在细胞内的水平很低,但在一系列生理或病理刺激因子作用下其水平可在几分钟内瞬时诱导。近年研究表明,脑缺血可诱导和激活脑内立即早期基因的表达^[2]。小檗碱(berberine, Ber)是从毛茛科黄连属 *Coptis chinenses* Franch. 根状茎中提取的一种异喹啉生物碱,其具有抗鼠实验性脑缺血作用^[3]。我们运用斑点杂交技术,观察大鼠全脑缺血再灌注过程中 c-fos 表达的动态变化,并观察 Ber 的作用。

1 材料和方法

1.1 动物:Sprague Dawley 大鼠,雄性,体重 350~450 g,由江苏省实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:硫酸小檗碱由中国药科大学赵守训教授惠赠,纯度>99%,用蒸馏水配制。c-fos cDNA 探针由北京医科大学心肺内分泌研究室惠赠; α -³²P-dCTP (3 000 Ci/

mmol)购自北京福瑞同位素公司;³H CuR (0.1 mL/mCi)购自上海原子能研究所;随机引物试剂盒和异硫氰酸胍购自上海华美生物试剂公司。其它试剂均为分析纯。

1.3 脑组织总 RNA 提取及斑点杂交:取 100 mg 脑组织按 Gough 的改良的异硫氰酸胍一步法^[4]提取总 RNA。总 RNA 以 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水稀释后,用紫外分光光度计测出样本在 λ 260 nm 的吸光度值,以 0.1%DEPC 水作对照,计算 RNA 浓度(μ g/ μ L)。

各斑点样品用量均为 5 μ g 总 RNA。点样后将尼龙膜 80℃烘干 2 h,置入 58℃预热的含预杂交液塑料袋中,除气并热封口,于 85℃水浴中反应 2 h,再将含有标记 c-fos 基因探针和杂交液的混合液加入塑料袋内,在 58℃水浴反应 16~24 h,取出尼龙膜,将其浸浴在 100 mL 2×SSC(柠檬酸钠和氯化钠的缓冲液)中室温漂洗 2 次,每次 5 min,然

* Address: Wu Junfang, Department of Pharmacology, Nanjing University of Medical Sciences, Nanjing

吴俊芳 女,33岁,1986年获医学学士学位,1992年获医学硕士学位,1995年获医学博士学位,1997年8月从中国医学科学院药理学博士后流动站出站,同时留药物研究所工作,被聘为副研究员。主要研究方向为:神经药理学。至今已发表及已接受待发表的文章有40篇,参与编写的著作4部,承担过江苏省科委资助基金项目、国家自然科学基金重大项目、国家科委1035项目、“九·五”攻关项目等。

** 江西省上饶地区传染病院

*** 中国医学科学院药物研究所药理室

[△]本研究为江苏省科委资助项目(No. BS94021)

后再将膜浸浴在 100 mL 2×SSC/0.1% SDS(十二烷基硫酸钠)液中,于 65℃水浴中漂洗 2 次,每次 10 min,最后将膜浸浴在 100 mL 0.1×SSC 液中于 65℃水浴漂洗 2 次,每次 30 min,取出尼龙膜,晾干后进行放射自显影,通过图像分析仪对胶片进行光密度扫描,以测量各斑点相应的灰度(IOD)值。

1.4 急性不完全性脑缺血实验:参照文献^[5]方法结扎大鼠双侧颈总动脉合并低血压 30 min 后再恢复供血,分别在再灌注 0、10、20、30、60、90、120、180 min 后断头处死,每次处死 6 只,取海马组织 100 mg 提取总 RNA,并与 α -³²P 标记的 c-fos cDNA 探针进行斑点杂交,计算各斑点的灰度值。假手术组(6 只)除不夹闭血管外,处理同缺血对照组。

另取 SD 大鼠 18 只,分为 3 组。药物组: Ber 20 mg/(kg·d)×5 d ip,缺血对照组: ip 生理盐水。二组均于末次给药后 30 min 施以缺血手术,于缺血 30 min 后再灌注 60 min 断头处死,同前提取海马组织中总 RNA,斑点杂交。假手术组(6 只)除不夹闭血管外,其余处理同缺血对照组。

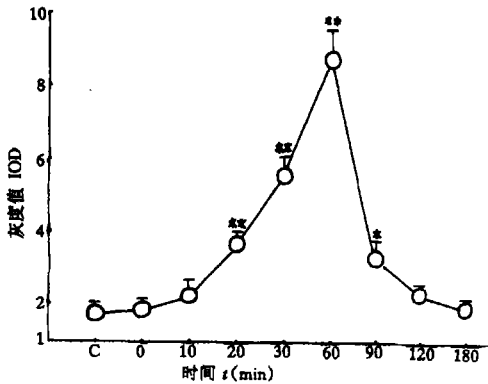
1.5 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量的测定:取海马组织约 0.2 g,制成 10%匀浆,经分级离心后取上清液,按 Mizuno 的方法^[6]测定 SOD 及 GSH-Px 活力;按硫代巴比妥酸法^[7]测定 MDA 含量。蛋白质定量用 Folin 酚法^[8]。

2 结果

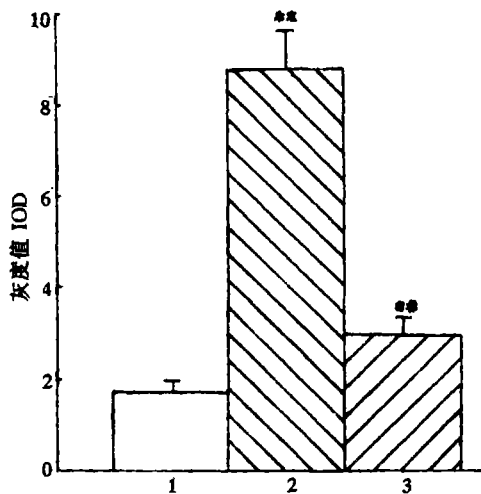
2.1 大鼠全脑缺血再灌注时海马 c-fos 基因的表达:由图 1 可见,大鼠脑缺血 30 min 后再灌注 10 min,海马组织 c-fos mRNA 水平即有升高趋势,60 min 达高峰,为假手术组的 5.1 倍。60 min 后 c-fos mRNA 水平渐渐降低,90~180 min 降至假手术组水平。

2.2 Ber 对大鼠全脑缺血时海马组织 c-fos 基因表达的影响:Ber 20 mg/(kg·d)×5 d ip 显著抑制大鼠全脑缺血 30 min 后再灌注 60 min 时海马组织 c-fos mRNA 的表达,与缺血对照组比较有显著差异($P<0.01$),但

与假手术组相比没有明显差异(图 2)。



与假手术组(C)比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
图 1 大鼠急性不完全性脑缺血 30 min 再灌注不同时间海马 c-fos mRNA 表达的动态变化($n=6, \bar{x} \pm s$)



1-假手术组;2-对照组;3-Ber 20 mg/(kg·d)×5 d
与假手术组比较: ** $P<0.01$;与对照组比较: ** $P<0.01$
图 2 Ber 对大鼠脑缺血 30 min 再灌注 60 min 时海马 c-fos mRNA 表达的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

2.3 Ber 对大鼠全脑缺血时海马组织 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响:大鼠全脑缺血 30 min 后再灌注 60 min 时海马组织的 SOD 及 GSH-Px 活力明显降低,MDA 含量明显升高,而 Ber 20 mg/(kg·d)×5 d ip 能显著提高 SOD、GSH-Px 活力,降低 MDA 含量,但不能达到假手术组水平(表 1)。

3 讨论

脑卒中是严重威胁人类健康的重大疾病之一,但由于对其发病机制尚未弄清,临床上一直缺乏有效的防治措施。近年来,国内外对

表 1 Ber 对海马 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	SOD (U/mg 蛋白)	GSH-Px (U/mg 蛋白)	MDA (nmol/mg 蛋白)
假手术组	—	4.85±0.53	44.6±7.8	8.27±1.04
对照组	—	1.13±0.22**	10.7±3.2**	23.6±6.1**
Ber	20	3.87±0.38△△	32.9±6.1△△	10.8±2.5△△

与假手术组比较: ** P<0.01 与对照组比较: △△ P<0.01

脑缺血诱导和激活脑内立即早期基因(如 c-fos, c-jun) 和晚期基因(如神经生长因子、脑源性神经营养因子)等基因表达的研究十分活跃, 试图从基因水平阐述脑卒中后继发性神经元损伤的机制, 并从基因调控上寻找新的防治方法和措施。

研究证实, 脑缺血可促使 c-fos 基因表达, 且这种表达是快速而一过性的。以结扎双侧颈总动脉合并低血压致大鼠急性不完全性脑缺血为模型, 运用斑点杂交技术观察大鼠脑缺血过程中 c-fos 基因表达的动态变化。结果显示, 大鼠脑缺血 30 min 后再灌注 10 min 海马组织即出现 c-fos 表达增强, 60 min 达高峰, 90 min 以后降至假手术组水平。目前对 c-fos 基因在中枢神经元内表达的功能意义还缺乏足够的认识, 但 c-fos 基因表达作为一种标识物, 反映了脑内神经元受到缺血损伤后的功能活动状态, 同时, 脑缺血诱导的 c-fos 表达编码一种核磷酸蛋白(fos), 后者作为第三信使与同激活的另一核磷酸蛋白

jun 构成二聚体, 调节靶基因的表达, 产生功能蛋白, 对促进神经细胞生长、分化和对损伤的修复、重塑起着重要的作用。

目前认为^[9], 脑缺血后 c-fos 基因表达增强可能与脑内兴奋性氨基酸受体激活和胞内钙超载有关, 并与氧自由基之间存在某种必然的联系^[10]。本实验结果表明, 大鼠脑缺血 30 min 后再灌注 60 min, 海马 SOD 及 GSH-Px 活力明显降低, MDA 含量明显升高, Ber 能显著提高 SOD 及 GSH-Px 活力, 降低 MDA 含量, 具有抗氧自由基作用。Ber 还能显著降低新生大鼠脑细胞内游离钙浓度^[11]。提示 Ber 可能通过抗氧自由基和降低胞内钙水平而抑制 c-fos 表达, 这可能是其抗脑缺血作用机制之一。

参考文献

1 Sagar S M, *et al.* Sci, 1988, 240: 1328
2 Wessel T C, *et al.* Brain Res, 1991, 567: 231
3 吴俊芳, 等. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 100
4 Gough N M. Anal Biochem, 1988, 173: 93
5 潘鑫鑫, 等. 南京医学院学报, 1992, 12: 237
6 Mizuno Y. Exp Neurol, 1984, 84(1): 58
7 Yoshida S, *et al.* J Neurochem, 1985, 44: 1593
8 Lowry O H, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265
9 黄旭晃, 等. 国外医学-脑血管疾病分册, 1995, 3: 3
10 Rao G N, *et al.* Cir Res, 1992, 70: 593
11 Wu J F, *et al.* Chin J Pharmacol Toxicol, 1997, 11(1): 7

(1998-03-03 收稿)

Effects of Berberine on Proto-oncogene c-fos Expression Induced by Global Cerebral Ischemia in Rats

Wu Junfang, Wang Ping, Wang Jie, *et al.* (Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

Abstract Dot blotting assay was employed in this study to observe dynamic changes of c-fos mRNA expression during reperfusion after cerebral ischemia in rats, and effect of berberine (BER) on c-fos expression induced by global cerebral ischemia was studied. The results showed that c-fos gene expression was temporally increased in global cerebral ischemia by 5.1 times, as compared with sham-operated group. However, the changes of c-fos gene expression could be inhibited dramatically by BER 20 mg/(kg·d)×5 d ip. The same dosage of BER significantly increased activities of SOD and GSH-Px and reduced content of MDA of brain tissues. The results suggested that the inhibitory actions of BER on c-fos expression induced by global cerebral ischemia may be related to its protective action against brain ischemia.

Key words berberine cerebral ischemia proto-oncogene c-fos oxygen free radical