

胰岛素对大鼠局灶缺血脑组织 *c-fos* 基因表达的影响^①

王艺东¹ 黄如训² 邢诒刚¹ 曾木圣³ 李玲²

(中山医科大学 1 孙逸仙纪念医院神经科; 广州, 510120 2 附属第一医院神经科 3 肿瘤研究所)

摘要 目的: 观察胰岛素对局灶缺血脑组织 *c-fos* 基因表达的影响。方法: 30 只肾血管性高血压大鼠(RHR)随机分 4 组, 在大脑中动脉闭塞(MCAO)后即予胰岛素(2.1 IU/kg, A 组)、葡萄糖(2g/kg)和低剂量胰岛素(2.1 IU/kg, B 组)、葡萄糖(4 g/kg)和高剂量胰岛素(4.5 IU/kg, C 组)、生理盐水(D 组), 采用原位杂交技术检测各组 MCAO 后 3 h 脑组织 *c-fos* 基因的表达。结果: 低剂量胰岛素组(A、B 组)*c-fos* mRNA 未出现明显变化($P > 0.05$), 而 C 组 *c-fos* mRNA 则有统计学意义的增加($P < 0.01$)。结论: 胰岛素促进缺血脑组织 *c-fos* 基因表达, 可能是其神经保护作用机制之一。

关键词 胰岛素/药理学; 脑缺血/病理生理学; 基因, *fos*; 基因表达

中图分类号 R 743.3

Insulin Effect on *c-fos* Gene Expression in Focal Ischemic Rat Brain

Wang Yidong Huang Ruxun Xing Yigang Zeng Mushen Li Ling

(Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510120)

Abstract Objective: To investigate the effect of insulin on *c-fos* gene expression in focal ischemic rat brain. **Methods:** The renovascular hypertensive rats (RHR) ($n = 30$) were divided at random into 4 groups which received separately with insulin only (group A, 2.1 IU/kg), insulin and glucose (group B with low dose insulin, 2.1 IU/kg; group C with high dose insulin, 4.5 IU/kg) or normal saline (group D) immediately after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Level of *c-fos* mRNA on brain sections was measured by *in situ* hybridization (ISH) at 3 h after MCAO. **Results:** Little effect on *c-fos* expression was detected in groups with low dose of insulin (group A, B) ($P > 0.05$) and a significant increase was detected in group C ($P < 0.01$). **Conclusions:** These results indicate that the effect of insulin on *c-fos* expression may be one of the mechanisms of neuroprotection of insulin.

Subject headings insulin/pharmacology; cerebral ischemia/physiopathology; genes, *fos*; gene expression

大量资料已显示胰岛素能减轻脑缺血损害。胰岛素的这种作用并不完全依赖于其降血糖效应^[1,2]。原癌基因 *c-fos* 是即早基因(immediate early genes)较具代表性的成员, 脑缺血及再灌流能诱导 *c-fos* 在脑组织快速而短暂地表达。已有报道胰岛素能促进非神经组织细胞 *c-fos* 基因的表达, 但对神经组织的影响仍不清楚。本研究选用具有慢性高血压、脑血管病变基础的肾血管性高血压大鼠(renovascular hypertensive rats, RHR)复制的大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,

MCAO)模型, 在缺血后给予胰岛素, 采用原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)技术观察缺血脑组织 *c-fos* 基因表达的变化。

1 材料和方法

1.1 动物模型的复制

用体质量 80~120 g、鼠龄 2~3 个月的健康雄性封闭群 Sprague-Dawley 大鼠(广东省医用动物场提供), 行双肾双夹肾动脉狭窄术^[3]制备 RHR。

① 广东省医药卫生青年科研基金资助课题(批准编号 96070)

由 RHR 再复制成 MCAO 模型, 其制备条件为: ①双肾动脉狭窄术后、高血压持续 10 周以上; ②血压达 24 kPa 或以上 (1 kPa=7.5 mmHg); ③从未出现脑卒中症状。

采用改良的 Longa 法^[4]制作 MCAO 模型, 过程简述如下: 用 6-0 尼龙线(前端 7 mm 粘上硅橡胶, 直径约 0.3 mm), 经右侧颈外动脉插入, 绕进颈内动脉, 到达大脑前动脉近端, 堵塞大脑动脉主干。插入深度约 18 mm。

1.2 实验分组与处理

用已符合 MCAO 模型复制条件的 RHR 30 只, 不禁食, 随机分 4 组: A 组 8 只, MCAO 后即予胰岛素 2.1 IU/kg [普通胰岛素(RI)与中性精蛋白锌胰岛素(NPH)] 以 1:2 比例分别腹腔和皮下注射, 保持血糖于 3~4.5 mmol/L; B 组 8 只, MCAO 后即予胰岛素(剂量和用法同 A 组), 同时予葡萄糖约 2 g/kg ($\varphi=0.5$ 的葡萄糖腹腔注射), 保持血糖于正常范围(4.6~10 mmol/L); C 组 8 只, 处理同 B 组, 仅剂量不同: 胰岛素 4.5 IU/kg, 葡萄糖约 4 g/kg, 血糖保持于正常范围; D 组为对照组, 6 只, MCAO 后仅予生理盐水 4 mL/kg 腹腔注射。胰岛素和葡萄糖剂量参考国外文献并进行了摸索。各组于术前 30 min、MCAO 后 1、2、3 h 取尾血用微量血糖计(Bayer, 德国)测血糖, MCAO 前后

30 min 分别测血压(尾筒法^[3])、直肠温度和血气。

1.3 c-fos mRNA 显示与测量

采用 c-fos DNA 探针(1.3 kb, 北京中山生物技术有限公司提供), 地高辛(DIG)标记(DIG DNA 标记和检测试剂盒, Cat, No. 1093657, 购自德国 Boehringer Mannheim 公司)。各组大鼠在 MCAO 后 3 h 时处死, 迅速断头取脑, 尽快冰冻切片, 取经前连合冠状切片(5 μ m)行原位杂交。杂交过程参照 Boehringer Mannheim 公司说明。设空白对照实验。杂交后切片进行图像分析(德国 Kontron IBAS 2.0 全自动图像分析系统), 测定组织中 c-fos mRNA 平均灰度。

1.4 组织病理观察

取与原位杂交切片相邻的切片行 HE 染色, 光镜下观察缺血区组织病理改变。

1.5 统计学处理

所有测量值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间进行比较, 方差齐者作方差分析, 方差不齐者作秩和检验。

2 结果

2.1 生理指标测量结果

各组血糖值见表 1。其它生理指标结果略, 同一指标各组间比较, P 值均大于 0.3。

表 1 4 组 RHR 血糖测量值

Table 1 Blood glucose levels for RHR in four groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

<i>n</i>	30 min before MCAO	1 h after MCAO	2 h after MCAO	3 h after MCAO
Group A(8)	6.1 \pm 0.5	3.8 \pm 0.3 ¹⁾	3.7 \pm 0.3 ¹⁾	3.7 \pm 0.3 ¹⁾
Group B(8)	6.1 \pm 0.4	7.1 \pm 1.1	7.2 \pm 1.1	6.7 \pm 0.9
Group C(8)	6.1 \pm 0.4	7.3 \pm 1.1	7.0 \pm 1.1	6.5 \pm 1.2
Group D(6)	6.1 \pm 0.6	7.1 \pm 1.0	7.1 \pm 1.0	6.7 \pm 0.7

1) significantly lower than other groups ($P < 0.01$)

2.2 c-fos 表达部位和程度

MCAO 后 3 h, c-fos 基因表达被诱导出现于缺血侧广泛大脑皮层(包括主要由大脑前动脉供血的扣带皮层)和尾壳核, 呈紫蓝色。各组 c-fos 表达的程度有差异, 测得的 c-fos mRNA 的平均灰度见表 2。非缺血侧无 c-fos 基因表达。空白对照切片亦未见紫蓝染色。

2.3 组织病理改变

A、B、D 组顶叶皮层及尾壳核细胞水肿, 部分核缩小, 皮层细胞层状结构变紊乱, 而 C 组的病变主要局限于尾壳核。

表 2 RHR MCAO 后 3h 缺血侧的脑组织 c-fos mRNA 平均灰度

Table 2 Mean grey of c-fos mRNA in ipsilateral brain structure after 3 h of unilateral MCAO in RHR ($\bar{x} \pm s$)

Structure	Cortex	Caudoputamen
Group A	145 \pm 10	162 \pm 10
Group B	144 \pm 9	162 \pm 10
Group C	124 \pm 8 ¹⁾	141 \pm 8 ¹⁾
Group D	154 \pm 8	172 \pm 8

1) significantly lower than other groups ($P < 0.01$)

3 讨论

缺血诱导 c-fos 基因在同侧广泛大脑皮层和尾壳核表达可能与脑缺血后出现扩展性抑制 (spreading depression)^[5]、谷氨酸的释放和 Ca^{2+} 的内流^[6] 以及自由基的产生^[7] 有关。本实验除血糖外,其它可能影响结果的生理指标如实验时血压、直肠温度、血气等在各组间的差异均无统计学意义,保证了各组之间具有可比性。而采用 Longa 法复制 MCAO 模型,可避免由于脑的直接手术损害对脑组织 c-fos 表达的影响。考虑到 c-fos 基因表达的特点和胰岛素的起效时间,我们选择 MCAO 后 3 h 作为观察胰岛素影响 c-fos 表达的时间点;由于经济方面原因,本实验没有作更多的分组。实验结果显示,低剂量胰岛素不论是在轻度低血糖状态(A组)还是在正常血糖时(B组)对 c-fos 表达均未显示有统计学意义的改变,而增加胰岛素剂量(C组),始见 c-fos mRNA 有统计学意义的增加。邻近切片的 HE 染色显示,低剂量胰岛素组与对照组的组织缺血病变波及皮层和尾壳核,而高胰岛素组则主要局限于尾壳核。这些结果表明,一定剂量的胰岛素对脑缺血有保护作用,c-fos 基因可能参与了这一过程。

既往研究发现,高血压持续 10 周的 RHR,脑内小动脉出现玻璃样变,微动脉闭塞、退化,毛细血管网稀疏,皮层吻合支血管减少^[8]。MCA 主干堵塞后,外周胰岛素能经发生病变的侧枝循环进入缺血区的较少,而剂量过少,胰岛素的作用就可能显示不出来,使用较高剂量胰岛素,进入缺血区的胰岛素达到一定浓度,其作用始显示出来。周成业等在类似的动物模型中观察到较低剂量的胰岛素即能减轻脑缺血损害^[2],这可能与他们在缺血前已使用胰岛素、胰岛素较易进入缺血区起作用有关,而本实验在缺血后始予胰岛素,胰岛素需经发生病变的侧枝循环进入缺血区才能起作用。

细胞外刺激诱导 c-fos 表达的过程被认为是这样的:刺激作用于受体,激活第 2 信使系统,使胞浆内 DNA 结合蛋白磷酸化,后者入核结合于 c-fos 基因启动区,促使 c-fos 转录。c-fos 表达产物被认为是细胞信息传递通路上的“第 3 信使”,通过激发后反应基因(late response genes)的表达,将细胞外短

时间的刺激转换成成长时程的细胞效应。脑缺血早期,脑的总体蛋白合成被严重抑制,c-fos 等特殊基因的早期诱导可能对细胞的生存和恢复有重要意义,这些基因的成功诱导有利于神经元耐受缺血和生存下来,若不能诱导或诱导后中途夭折,则可能导致神经元死亡和长时间的变性与退化^[9]。大脑皮层和尾壳核中的神经元和胶质细胞均分布较多的胰岛素受体。从血循环转运来的胰岛素,可能通过上述途径促进 c-fos 表达。结合组织病理的变化,可看出胰岛素促进缺血脑组织 c-fos 基因表达是其神经保护作用的可能机制之一。

参 考 文 献

- 1 Voll CL, Auer RN. Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1991, 11(6): 1006
- 2 周成业,黄如训,曾进胜,等.葡萄糖及胰岛素对高血压大鼠脑梗塞的影响. *中国神经精神疾病杂志*, 1997, 23(1): 4
- 3 曾进胜,黄如训.易卒中肾血管性高血压大鼠模型及其应用. *中山医科大学学报*, 1996, 17(4): 241
- 4 李玲,苏镇培,黄如训.高血压大鼠局部脑缺血再灌注边缘区超微结构改变. *中国神经精神疾病杂志*, 1996, 22(4): 193
- 5 Welsh F A, Moyer D J, Harris V A. Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992, 12(2): 204
- 6 Kinouchi H, Sharp F R, Chan P H, *et al*. MK-801 inhibits the induction of immediate early genes in cerebral cortex, thalamus and hippocampus but not in substantia nigra following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett*, 1994, 179(1-2): 111
- 7 Kamii H, Kinouchi H, Sharp F R, *et al*. Expression of c-fos mRNA after a mild focal cerebral ischemia in SOD-1 transgenic mice. *Brain Res*, 1994, 662(1-2): 240
- 8 彭英,黄如训,李湘平,等.高血压致脑血管损害及其对脑梗塞影响的实验研究. *中华医学杂志*, 1994, 74(2): 100
- 9 Kogure K, Kato H. Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke*, 1993, 24(12): 2121

(1998-02-27 收稿 1998-09-09 修回)