

缺氧缺血性脑病新生大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达与神经元凋亡的关系

周永新¹, 刘俊¹, 李海英², 吴尤佳^{2*}

(¹常熟市第二人民医院儿科, 江苏 常熟 215500; ²南通大学附属医院儿科, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:探讨缺氧缺血性脑病(HIE)新生大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达与神经元凋亡的关系。方法:7 日龄 SD 大鼠制备 HIE 经典模型。分为 HIE 组、HIE+ EphA5-Fc 组和对照组。采用 qRT-PCR 法测定各组新生大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达,原位缺口末端标记(TUNEL)法检测其凋亡的神经元。结果:①HIE 组海马 EphA5 受体 mRNA 表达上调,在 12 h 达高峰,48 h 仍高于对照组($P < 0.05$);与 HIE 组比较,HIE+ EphA5-Fc 组海马 EphA5 受体 mRNA 表达下调($P < 0.05$),已恢复至对照组水平($P > 0.05$);②HIE 组海马神经元凋亡 6 h 开始升高,24 h 达高峰;HIE+EphA5-Fc 组海马神经元凋亡较 HIE 组显著下降 ($P < 0.05$)。结论:阻断 EphA5 受体可抑制 HIE 新生大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达上调及海马神经元凋亡,表明 EphA5 受体活化是缺氧缺血致脑损伤的机制之一。

[关键词] EphA5 受体;凋亡;缺氧缺血性脑病;大鼠;海马

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1521-04

doi:10.7655/NYDXBNS20131107

Relationship between EphA5 Receptor mRNA Expression and Apoptosis of neurons in Hippocampus of Neonatal Rat with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

Zhou Yongxin¹, Liu Jun¹, Li Haiying², Wu Youjia^{2*}

(¹Department of Pediatrics, the Second People's Hospital of Changshou City, Changshou 215500; ²Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mRNA expression of EphA5 receptor in hippocampus of neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) as well as the relationship with apoptosis of neurons. **Methods:** Seven-day-old SD rats were randomly divided into HIE group, HIE+ EphA5-Fc group and control group. The mRNA expression of EphA5 receptor and the apoptosis of neurons in hippocampus of neonatal rats in 3 groups were determined by qRT-PCR and TUNEL staining. **Results:** ①The mRNA expression of EphA5 receptor in HIE group increased and peaked at 12h, which was still higher than that in control group at 48 h ($P < 0.05$). Compared with HIE group, the mRNA expression of EphA5 receptor decreased in HIE+ EphA5-Fc group ($P < 0.05$), which recovered to that in control group ($P > 0.05$). ②In HIE group, apoptosis of hippocampus neurons increased after 6 h, and peaked at 24 h. Apoptosis of hippocampus neurons in HIE+ EphA5-Fc group was remarkably lower than that in HIE group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The up-regulation of EphA5 receptor and apoptosis of hippocampus neurons could be suppressed by inhibitor of EphA5 receptor, which suggests the activity of EphA5 receptor may be one of the mechanisms of brain damage by hypoxic-ischemic.

[Key words] EphA5 receptor; apoptosis; HIE; rat; hippocampus

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1521-1523, 1528]

新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的发病机制不明,细胞凋亡是缺氧缺血性脑损伤后神经细胞受

损的重要机制,抗细胞凋亡成为治疗缺氧缺血性脑损伤的重点^[1-3]。本研究通过研究缺氧缺血性脑病(HIE)新生大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达变化及其影响因素,研究 EphA5 受体表达与缺氧缺血后神经凋亡的关系,探讨缺氧缺血后神经凋亡的发生

[基金项目] 江苏省研究生创新科研计划(CXZZ12-0838);南通市科技计划项目(BK2011051)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: francis_nt@163.com

机制及通过阻断信号转导及控制基因表达以减少细胞凋亡的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

7日龄SD大鼠54只,体质量12~18g,雌雄不限(南通大学动物实验中心提供),随机分为3组,对照组6只、HIE组和HIE+EphA5-Fc组各24只。EphA5/Fc Chimera rat (E8402, Sigma公司, 美国), 以无菌PBS配制成高浓度母液, 分装保存于-20℃, 使用前以无菌PBS稀释, 脑室内注射量为10 μl, 含1 μg EphA5/Fc。CYS型测氧仪(上海嘉定学联仪表厂)。8%O₂+92%N₂混合气体由北京东方气体有限公司提供。恒温水浴箱(北京长风仪器仪表公司)。动物缺氧实验装置(上海儿科研究所)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备^[4-5]

结扎大鼠左侧颈总动脉, 然后置于缺氧仓内, 通入含8%O₂+92%N₂的特种标准气体, 由顶部插入测氧仪监测箱内氧体积分数, 缺氧仓下部浸泡在恒温水浴箱中, 使仓温保持在(36±1)℃, 2h后取出。HIE+EphA5-Fc组大鼠在缺氧缺血(HI)前15min从侧脑室给予EphA5/Fc。对照组和HIE组同时注射与HIE+EphA5-Fc组相同液量的生理盐水。对照组置于缺氧仓内, 缺氧仓与外界相通, 氧体积分数与空气相同。

1.2.2 标本采集

对照组大鼠于模型制备后6h、HIE组和HIE+EphA5-Fc组分别于模型制备后6、12、24、48h断头处死大鼠6只, 分别取出海马组织, 3只立即放入中性福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 余3只立即放入-

80℃冰箱保存。

1.2.3 TUNEL 染色

常规石蜡切片, 采用TUNEL试剂盒(ROCH公司, 瑞士), 按照试剂盒说明书行TUNEL染色, 显微镜下观察凋亡细胞, 用图像分析仪计数凋亡细胞数。

1.2.4 实时逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)

从-80℃冰箱中取出海马, 用Trizol(Invitrogen公司, 美国)提取总RNA, 按照PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa公司, 日本)说明书步骤合成cDNA。使用SYBR Green染料(Fermentas公司, 美国), 经Eppendorf Mastercycler ep realplex实时PCR仪(Eppendorf公司, 美国)检测EphA5受体mRNA表达水平。设计引物如下: EphA5上游: 5'-AAGCCA-GATTCCCATCATTG-3', 下游: 5'-ATCCTGCTTTGCT-TTGCTGT-3'; GAPDH上游: 5'-GGCATCCTGGGCT-ACACT-3', 下游: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGT-3'。

1.3 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件进行处理, 数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较用单因素方差分析, 各组均数比较采用LSD法; 两组间均数比较采用t检验, 双侧P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 染色

TUNEL标记阳性凋亡神经元为细胞核呈现棕黑色, 主要位于海马CA1区。模型制备后6h对照组海马CA1区未见阳性凋亡神经元; HIE组海马CA1区出现散在的凋亡神经元, 至24h达高峰, 48h凋亡神经元仍然存在, 但有所减少; HIE+EphA5-Fc组在各时间点海马CA1区神经元凋亡较HIE组均显著下降(P<0.05, 表1, 图1)。



A: 对照组 TUNEL 染色未见阳性凋亡细胞; B: HIE 组 24 h TUNEL 染色见大量阳性凋亡细胞; C: HIE+EphA5-Fc 组 24 h TUNEL 染色见散在阳性凋亡细胞。

图1 三组大鼠海马CA1区TUNEL染色(×40)

Figure 1 TUNEL staining in hippocampal CA1 region of neonatal rats of 3 groups (×40)

2.2 三组大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达水平

HIE 组海马 EphA5 受体 mRNA 表达上调,在 6 h 已显著高于对照组($P < 0.05$),12 h 达高峰,48 h 仍高于对照组($P < 0.05$);与 HIE 组比较,EphA5-Fc 组海马 EphA5 受体 mRNA 在各时间点表达均显著下调($P < 0.05$),已恢复至对照组水平($P > 0.05$,表 1)。

表 1 三组大鼠海马 CA1 区凋亡细胞数及 EphA5 受体 mRNA 表达水平

Table 1 Apoptosis of neurons in hippocampal CA1 region and the mRNA expression of EphA5 receptor of rats in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡细胞数	EphA5 受体 mRNA
对照组	6	0	102.01±2.15
HIE 组			
6 h	6	30.07±22.54*	125.41±2.25*
12 h	6	36.25±2.06*	157.81±2.74*
24 h	6	49.52±2.55*	132.68±3.42*
48 h	6	42.53±1.89*	137.19±3.36*
HIE+ EphA5-Fc 组			
6 h	6	11.12±1.70	99.45±2.48
12 h	6	18.24±1.30	104.55±2.09
24 h	6	22.51±1.91	105.46±1.80
48 h	6	22.18±2.00	103.42±1.68

与对照组和 HIE+EphA5-Fc 组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺氧缺血导致新生儿脑损伤最关键的环节是继发性能量衰竭,即迟发性细胞损伤阶段^[4]。细胞凋亡在这一阶段中发挥重要作用,目前对缺血性神经细胞凋亡的确切机制仍不明确^[5-6]。

Eph-ephrin 系统主要参与机体的发育过程,如细胞迁移、轴突导向、血管形成,特别是神经系统发育过程中神经网络的形成^[7-9],其中 EphA5 受体以其在神经系统表达的高度特异性引起了研究者的关注^[10-12]。EphA5 受体在小鼠神经系统时空定位表达的研究表明 EphA5 受体是神经系统正常发育程序中不可缺少的分子之一^[11]。本研究发现,HIE 组大鼠在 HI 后 6 h,海马区 EphA5 受体 mRNA 表达水平开始升高且在 12 h 达高峰,此阶段凋亡细胞开始逐渐增多,提示二者在时间上可能存在着某种特定的关系,EphA5 受体 mRNA 的高表达可能导致胞浆 Ca^{2+} 超载而启动神经元凋亡^[13-14]。同时 EphA5 受体 mRNA 表达的上调,胞浆 Ca^{2+} 含量上升等因素都可能进一步激活凋亡相关基因而诱导细胞凋亡,导致细胞的迟发性损伤。HIE 组大鼠 TUNEL 染色显示,HI 后 24 h 细胞凋亡达高峰且 48 h 仍维持在较高水

平,从侧面证明了这一推论的正确性。

由 IgG 连接的可溶性 EphA5-Fc 可与其配体结合,但这种外源性的 EphA5-Fc 未锚定于膜上,从而阻断了内源性 EphA5 与配体结合并活化及完成相应的信号转导。因此可将这种可溶性蛋白用作受体的拮抗剂^[15]。对 HIE+ EphA5-Fc 组新生大鼠 HI 发生前 15 min 通过脑室内注射 EphA5-Fc,TUNEL 结果显示 EphA5-Fc 可使 HIE+ EphA5-Fc 组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡显著减少,在 HI 后 6 h 已发挥作用,且一直持续至 48 h。此外,HIE+ EphA5-Fc 组 EphA5 受体 mRNA 在各时间点表达较 HIE 组均显著下调,考虑可能的原因是 Eph 受体/ephrin 配体信号转导具有双向性^[16],EphA5 的配体因被外源性的 EphA5-Fc 结合而反馈性地引起 EphA5 受体表达下降,但有关双向信号的具体分子机制尚不明确。

本文推测,在缺血缺氧事件发生之前给予针对 EphA5 受体 mRNA 的特异性拮抗剂,也许能有效减少迟发性细胞死亡的发生,为缺氧缺血性脑病的治疗提供了新的思路与方法。至于 HI 后 EphA5 受体的表达是如何诱导神经元凋亡的,以及如何通过阻断 Eph 受体/ephrin 配体信号传导及控制基因表达以减少神经元凋亡有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Khurshid F, Lee KS, McNamara PJ, et al. Lessons learned during implementation of therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in a regional transport program in Ontario [J]. Paediatr Child Health, 2011, 16(3): 153-156
- [2] Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. J Perinat Neonatal Nurs, 2009, 23(1): 59-70
- [3] 陆超,陈吉庆,吴升华,等. 新生大鼠缺氧缺血后不同部位脑组织中 Par-4 基因的表达 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010, 26(10): 1040-1042
- [4] Allen KA, Brandon DH. Hypoxic ischemic encephalopathy: pathophysiology and experimental treatments [J]. Newborn Infant Nurs Rev, 2011, 11(3): 125-133
- [5] 刘新建,刘丽娜,温慧敏,等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马区脑红蛋白、凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达及其相关性 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(10): 1040-1042
- [6] Sun Y, Zhang Y, Wang X, et al. Apoptosis-inducing factor downregulation increased neuronal progenitor, but not stem cell, survival in the neonatal hippocampus after cerebral hypoxia-ischemia [J]. Mol Neurodegener, 2012, 7(1): 17

(下转第 1528 页)

- cells[J]. *J Clin Oncol*,2008,26(17):2806-2812
- [9] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*,2007,1(3):313-323
- [10] Yu Y, Ramena G, Elble RC, The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012,4:1528-1541
- [11] Grotenhuis BA, Wijnhoven BP, van Lanschot JJ. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors[J]. *J Surg Oncol*,2012,106(2):209-215
- [12] Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? [J]*Cancer Res*, 2008,68(11):4018-4021
- [13] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*,2007,67(3):1030-1037
- [14] 黄鹏,王春友,吴河水,等. 胰腺癌细胞株 PANC-1 中肿瘤干细胞生物学行为的研究 [J]. *中国普通外科杂志*,2008,17(9):865-869
- [15] Pardo M, Lang B, Yu L, et al. An expanded Oct4 interaction network: Implications for stem cell biology, development, and disease [J]. *Cell Stem Cell*,2010,6(4):382-395
- [16] Silva J, Nichols J, Theunissen TW, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state [J]. *Cell*,2009,138(4):722-737
- [17] Hu T, Liu S, Breiter DR, et al. Octamer-4 small Interfering RNA result in cancer stem cell-like cell apoptosis[J]. *Cancer Res*,2008,68(16):6533-6540

[收稿日期] 2013-05-09

(上接第 1523 页)

- [7] Cowan CW, Shao YR, Sahin M, et al. Vav family GEF link activated Ephs to endocytosis and axon guidance[J]. *Neuron*,2005,46(2):205-217
- [8] Bush JO, Soriano P. Eph/ephrin signaling: genetic, phosphoproteomic, and transcriptomic approaches [J]. *Semin Cell Dev Biol*,2012,23(1):26-34
- [9] Kamitori K, Tanaka M, Okuno-Hirasawa T, et al. Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2005,330(2):446-453
- [10] Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, et al. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development [J]. *PLoS ONE*,2010,5(8):e12486
- [11] Cooper MA, Crockett DP, Nowakowski RS, et al. Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system [J]. *J Comp Neurol*, 2009,514(4):310-328
- [12] Abdual-Aziz NM, Turmaine M, Greene ND. EphrinA-EphA receptor interactions in mouse spinal neurulation: implications for neural fold fusion [J]. *Int J Dev Biol*,2009,53(4):559-568
- [13] Momeni HR, Jarahzadeh M. Effects of a voltage sensitive calcium channel blocker and a sodium-calcium exchanger inhibitor on apoptosis of motor neurons in adult spinal cord slices[J]. *Cell J*,2012,14(3):171-176
- [14] Song J, Lee JH, Lee SH, et al. TRPV1 activation in primary cortical neurons induces calcium-dependent programmed cell death[J]. *Exp Neurobiol*,2013,22(1):51-57
- [15] Bi C, Yue X, Zhou R, et al. EphA activation overrides the presynaptic actions of BDNF [J]. *J Neurophysiol*,2011,105(5):2364-2374
- [16] Aoto J, Chen L. Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions[J]. *Brain Res*,2007,1184(1):72-80

[收稿日期] 2013-04-29