

脑出血后氧化应激对神经细胞凋亡及 c-myc 蛋白表达的影响

汪立松, 章永强, 冯忠, 应小卫, 王希佳, 霍鑫龙

温岭市第一人民医院神经内科, 浙江 温岭 317500

摘要:目的 观察脑出血后氧化应激与神经细胞凋亡的相关性及对凋亡相关蛋白 c-myc 表达的影响。方法 选择 SD 雄性大鼠 84 只, 随机分为假手术组、模型组、MPEG-SOD 组, 每组 28 只, 自体血注入法建立脑出血模型, MPEG-SOD 组建模前腹腔注射 MPEG-SOD; 术后 12 h、1 d、3 d、7 d 不同时间点行神经功能缺陷评分(NDS), 取脑组织测定脑组织含水量, 分光光度法测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD), 免疫组化法测定核因子 κ B (NF- κ B) p65 阳性细胞表达, TUNEL 测定神经细胞凋亡, Western blot 测定 c-myc 蛋白表达水平。结果 与假手术组比较, 模型组各时点 NDS 评分、SOD 活性明显降低, 脑组织含水量、MDA 含量、c-myc 蛋白、NF- κ B p65、TUNEL 阳性细胞表达明显升高 ($P < 0.05$), 术后 3 d 达峰值, 与模型组同时点比较, MPEG-SOD 组 NDS 评分、SOD 活性明显升高, 脑组织含水量、MDA 含量、c-myc 蛋白、NF- κ B p65、TUNEL 阳性细胞表达明显降低 ($P < 0.05$), c-myc 蛋白表达与 TUNEL 阳性细胞数呈正相关(模型组 $r = 0.83$, MPEG-SOD 组 $r = 0.91$, $P < 0.05$)。结论 脑出血后氧化应激诱导神经细胞凋亡可能与启动凋亡相关基因 c-myc 有关。

关键词:脑出血; 神经细胞凋亡; 氧化应激; c-myc 蛋白

中图分类号: R743.34 R329.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2017)04-0608-04

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2017.04.020

Effects of oxidative stress on neuronal apoptosis and protein expression of c-myc after intracerebral hemorrhage WANG Li-song, ZHANG Yong-qiang, FENG Zhong, et al. Department of Neurology, the First People's Hospital of Wenling, Wenling, Zhejiang 317500, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between oxidative stress and neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage (ICH), and the influence of oxidative stress on c-myc expression. **Methods** Eighty-four male SD rats of 7-week-old were selected and randomly divided into sham operation group, model group, MPEG-SOD group, with 28 rats in each group. Intracerebral hemorrhage model was induced by autologous blood injection. Rats in MPEG-SOD group were injected with MPEG-SOD before modeling. The neurological deficit score (NDS) was measured at 12 h, 1 d, 3 d and 7 d after the operation. The water content of brain tissue was measured, and the content of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in brain was measured by spectrophotometric method. The expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 positive cells was detected by immunohistochemistry. The apoptosis of neurons was measured by TUNEL and the expression of c-myc protein was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham-operated group, the NDS score and SOD activity at each time points were obviously decreased, while the water content in the brain tissue, MDA content, c-myc protein expression, NF- κ B p65 and TUNEL-positive cells in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), which reached the peak 3d after the operation. Compared with the model group, the NDS score, SOD activity, water content in the brain tissue, MDA content, c-myc protein expression and TUNEL, NF- κ B p65 positive cells in the MPEG-SOD group were significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of c-myc protein and TUNEL-positive cells in the brain tissue was correlated ($R = 0.83$ in model group, as well as $r = 0.91$ in MPEG-SOD group, $P < 0.05$). **Conclusion** The oxidative stress-induced apoptosis of neurons may be related to the initiation of apoptosis-related gene c-myc after intracerebral hemorrhage.

Key words: Cerebral hemorrhage; Neuronal apoptosis; Oxidative stress; C-myc

脑血管病的发病率、致残率、死亡率呈现逐年升高趋势, 随着人口老龄化, 脑血管病患者进一步增加, 其中血栓闭塞性脑梗死发病率最常见, 占 44%, 短暂性脑缺血发作 (TIA) 占 21%, 脑栓塞占 21%, 脑出血占 12%^[1], 脑出血患者在发病后病死率较高, GBD 2010 显示 2010 年中国卒中死亡率 (126.9/10 万) 高于世界水平 (88.4/10 万)^[2], 目前对于脑出血后脑损伤机制尚未完全阐明, 尚缺乏显著改善患者预后的治疗方法^[3-4]。c-myc (癌基因) 有促进细胞增殖与凋亡双

重作用, 氧化应激状态下活性氧激活 NF- κ B (核转录因子 κ B), NF- κ B 活化凋亡相关基因 c-myc, c-myc 结合 Max 形成二聚体后再结合 DNA 核心序列, 诱导神经细胞凋亡^[5-6]。本研究通过建立大鼠脑出血模型, 观察脑出血后氧化应激与神经细胞凋亡相关性以及对凋亡相关基因 c-myc 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选择 84 只健康雄性 7 周龄 SD 大鼠, 体重 220 ~ 240 g, 由中国医学科学院动物实验中心提供 (许可证号: SYXK-2013-0025)。按照随机

数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、MPEG-SOD组,每组28只,自体血注入法建立大鼠脑出血模型,MPEG-SOD组建模前腹腔注射MPEG-SOD,假手术组、模型组给予等量生理盐水。

1.2 试验药物与试剂 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(购自于南京建成生物工程研究所),水合氯醛、多聚甲醛(购自于天津市科密欧化学试剂有限公司),辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(购自于美国CST公司),c-myc抗体(购自于美国Santa Cruz公司),兔抗NF- κ B抗体(购自于武汉博士德生物工程有限公司),NF- κ B p65(兔核因子 κ B亚基p65亲和肽)免疫组化试剂盒、DAB染色试剂盒(购自于中杉金桥生物科技有限公司),TUNEL试剂盒(购自于美国Roche公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备 模型组、MPEG-SOD组大鼠造模前1h进行神经功能缺陷评分(NDS),原发性神经功能缺陷大鼠排除,建立大鼠脑出血模型^[7],术前大鼠禁食不禁水8h,采用10%水合氯醛腹腔麻醉,仰位固定,头部固定于脑立体定位仪,苍白球定位参考《大鼠脑立体定位图谱》^[6],微量进样器缓慢注射自体尾动脉采集动脉血50 μ l(25 μ l/min),留置10 min,缓慢出针,骨蜡封闭颅骨钻孔,结扎尾动脉,缝合切口,常规消毒,假手术组采用相同定位方法注入等量生理盐水。

1.3.2 给药方式 MPEG-SOD组大鼠于模型建立前20 min腹腔注射MPEG-SOD 100 U,观察时间长者(术后1、3、7 d)6 h/次,假手术组、模型组给予等量生理盐水。

1.4 观察指标 按照 Garcia 评分方法^[8]进行大鼠神经功能障碍评分,最低分3分,最高分18分,分数越低,神经功能障碍越重。大鼠处死取脑,制备10%皮层匀浆,离心10 min取上清液,测定MDA、SOD水平。取血肿侧穿刺点前后各1 mm³脑组织检测含水量=(湿重-干重)/湿重 \times 100%。用Western blot测定脑组织c-myc蛋白表达。TUNEL法测定脑组织神经细胞凋亡。免疫组化法测定核因子 κ B(NF- κ B)p65蛋白表达。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3组比较用方差分析,两两比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及NDS评分 假手术组大鼠术后无明显行为学改变,模型组、MPEG-SOD组大鼠术后出现神经功能缺陷,术后第3天神经功能障碍最重,模型组、MPEG-SOD组与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),术后12 h、1 d、3 d、7 d各时点MPEG-SOD组神经功能评分与模型组、假手术组比较差异均有统

计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 大鼠术后血肿周围脑组织水肿情况 假手术组脑组织无明显水肿,模型组术后出现脑水肿,术后3 d达高峰,之后逐渐下降,模型组、MPEG-SOD组与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),MPEG-SOD组各时点脑组织含水量明显低于模型组($P < 0.05$),见表2。

表1 各组大鼠术后不同时点神经功能障碍评分($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	术后12 h	术后1 d	术后3 d	术后7 d
假手术组	28	17.63 \pm 2.31	17.64 \pm 2.42	17.62 \pm 2.35	17.63 \pm 2.33
模型组	28	12.24 \pm 2.11 ^a	8.63 \pm 1.27 ^a	6.46 \pm 1.17 ^a	9.76 \pm 1.56 ^a
MPEG-SOD组	28	14.82 \pm 2.54 ^{ab}	12.87 \pm 2.48 ^{ab}	10.45 \pm 2.33 ^{ab}	14.94 \pm 2.47 ^{ab}

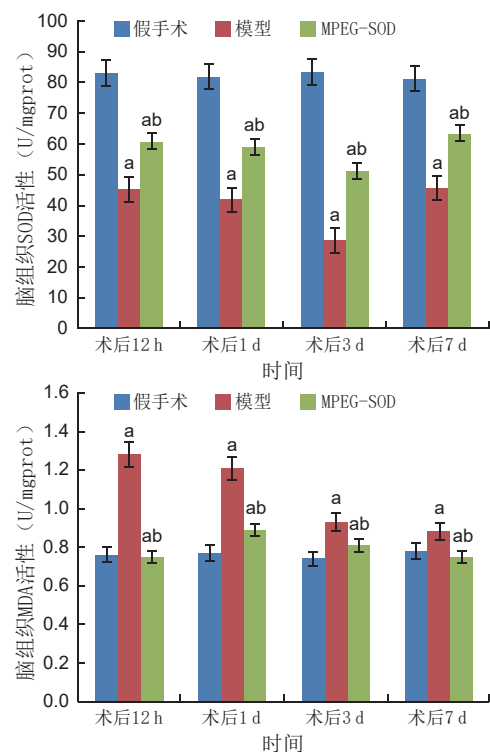
注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠术后血肿周围脑组织水肿情况($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	术后12 h	术后1 d	术后3 d	术后7 d
假手术组	28	74.07 \pm 8.65	74.09 \pm 7.96	74.12 \pm 7.78	74.06 \pm 8.09
模型组	28	83.36 \pm 7.66 ^a	86.01 \pm 6.97 ^a	88.82 \pm 6.67 ^a	87.22 \pm 7.18 ^a
MPEG-SOD组	28	80.24 \pm 7.39 ^{ab}	82.13 \pm 6.92 ^{ab}	84.33 \pm 7.26 ^{ab}	83.11 \pm 6.93 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 脑组织MDA、SOD水平 模型组、MPEG-SOD组与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与假手术组比较,模型组各时点MDA含量明显升高,SOD水平明显降低($P < 0.05$),与模型组比较,MPEG-SOD组各时点MDA含量明显降低,SOD水平明显升高($P < 0.05$),见图1。



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

图1 大鼠术后不同时点脑组织MDA、SOD水平

2.4 脑组织神经细胞凋亡情况 模型组、MPEG-SOD组与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),假手术组TUNEL阳性细胞表达较低,模型组TUNEL阳性细胞表达明显高于假手术组,术后3 d达高峰,随之

降低, MPEG-SOD 组 TUNEL 阳性细胞表达明显低于同时点模型组, 见表 3。

表 3 各组大鼠脑组织 TUNEL 染色阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	术后 12 h	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
假手术组	28	2.76 ± 0.67	2.79 ± 0.66	2.31 ± 0.72	2.77 ± 0.69
模型组	28	44.23 ± 4.44 ^a	78.12 ± 4.68 ^a	94.55 ± 5.39 ^a	88.22 ± 5.69 ^a
MPEG-SOD 组	28	24.55 ± 2.77 ^{ab}	43.11 ± 3.56 ^{ab}	72.14 ± 4.12 ^{ab}	62.33 ± 3.78 ^{ab}
F 值		21.749	39.461	47.852	44.705
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.5 脑组织 c-myc 蛋白表达情况 模型组、MPG-SOD 组与假手术组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 各时点模型大鼠脑组织 c-myc 蛋白表达高于假手术组, 模型组 c-myc 蛋白表达术后 3 d 达峰值, MPEG-SOD 组大鼠脑组织 c-myc 蛋白表达低于同时点模型组, 见图 2。

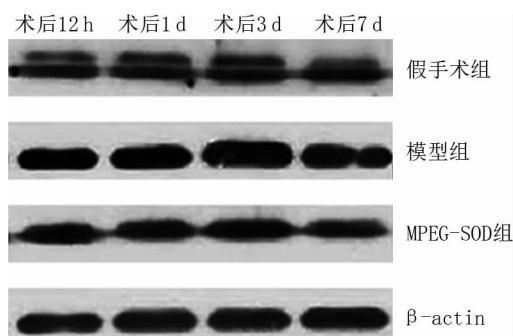
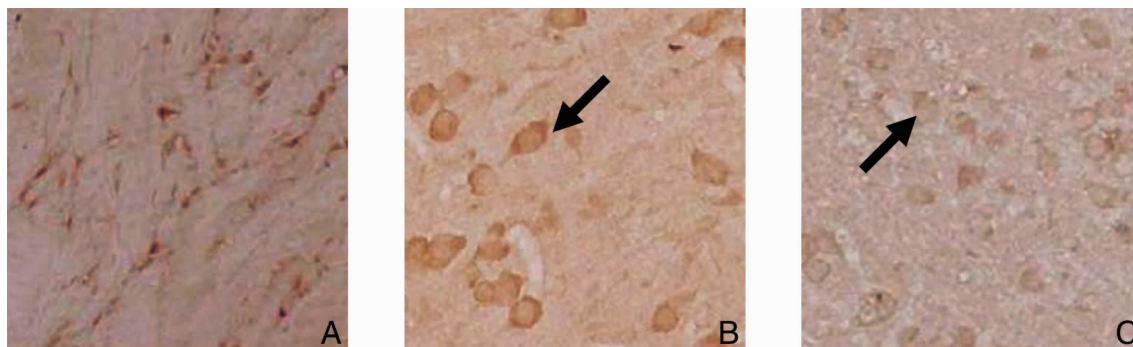


图 2 Western blot 测定脑组织 c-myc 蛋白表达



注: 图 3A 为假手术组, 图 3B 为模型组, 图 3C 为 MPEG-SOD 组。

图 3 各组大鼠 NF-κB p65 蛋白表达情况

有研究显示脑出血后脑组织 MDA 含量升高, Mn-SOD 活性降低^[13-15], 与本研究结果中模型组不同时点大鼠脑组织内 MDA 水平升高, SOD 水平降低相一致, 与模型组比较, MPEG-SOD 组各时点 MDA 水平降低, SOD 水平升高, 提示 SOD 可通过抑制机体氧化应激水平, 提高抗氧化酶活性, 减轻大鼠脑出血损伤, 其作用机制可能与线粒体 ATP 敏感性钾通道及线粒体膜稳定相关。

本研究还发现模型组术后 NF-κB p65 阳性表达增加, MPEG-SOD 组 NF-κB p65 阳性表达低于模型组, 提示脑出血后血肿周围组织由于缺血缺氧, 炎症细胞、神经元细胞等被激活, 促进 NF-κB 活化, 加重损伤, 导致继发性脑组织损伤。而且, 本组中大鼠脑出血后模型

2.6 NF-κB p65 蛋白表达情况 NF-κB p65 蛋白阳性表达位于细胞的胞核和胞浆, 呈棕色, 假手术组大鼠脑组织 NF-κB p65 阳性表达较少, 模型组术后 3 d NF-κB p65 阳性表达增加, MPEG-SOD 组 NF-κB p65 阳性表达低于模型组, 见图 3。

3 讨论

脑出血损伤为临床常见病理变化, 出血性脑损伤严重影响患者生存质量, 减轻脑出血损伤对于降低患者病死率具有重要作用, 脑出血后占位效应导致原发性损伤, 水肿导致继发性损伤, 细胞凋亡、氧化应激、自由基损伤等参与了脑出血后继发性损伤^[9-10]。脑出血后 1~2 h 即可发生脑水肿, 2~3 d 达峰值, 随后逐渐减轻, 有研究结果显示临床脑出血后死亡高峰期与脑水肿形成期一致^[11-12]。本研究结果中模型组术后 12 h 出现脑水肿及神经功能障碍, 随时间延长, 神经损伤加重, 术后 3 d 达高峰, 之后逐渐改善, 术后 3 d 病理损伤最严重, MPEG-SOD 组各时点脑组织含水量明显低于模型组, 脑组织损伤较同时点模型组有所减轻, 提示减轻出血后继发性脑水肿有助于减轻出血后脑组织损伤, 改善神经功能障碍。有研究显示脑出血后 48 h 血肿周围脑组织损伤最重, 炎症细胞浸润显著^[10], 提示脑出血后脑组织损伤 2~3 d 达峰值。

组 TUNEL 阳性细胞表达明显升高, 术后 3 d 达高峰, 随之降低, 脑组织 c-myc 蛋白表达变化趋势与 TUNEL 阳性细胞数基本一致, MPEG-SOD 组 TUNEL 阳性细胞及 c-myc 蛋白表达明显低于同时点模型组。

综上所述, 脑出血后氧化应激诱导神经细胞凋亡可能与激活 NF-κB 活性, 启动凋亡相关基因 c-myc 有关。

参考文献

[1] Chen Q, Tang J, Tan L, et al. Intracerebral Hematoma Contributes to Hydrocephalus After Intraventricular Hemorrhage via Aggravating Iron Accumulation[J]. Stroke, 2015, 46(10): 2902-2908.

[2] Akoudad S, Portegies ML, Koudstaal PJ, et al. Cerebral Microbleeds Are Associated With an Increased Risk of Stroke; The Rotterdam Study[J]. Circulation, 2015, 132(6): 509-516. (下转第 676 页)

- [28] Alcolado JC, Alcolado R. Importance of maternal history of non-insulin dependent diabetic patients [J]. *BMJ*, 1991, 302 (6786): 1178-80.
- [29] Gerbitz KD, van den Ouweland JM, Maassen JA, et al. Mitochondrial diabetes mellitus: a review [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1271 (1): 253-260.
- [30] Morten KJ, Poulton J, Sykes B. Multiple independent occurrence of the 3243 mutation in mitochondrial tRNA(LeuUUR) in patients with the MELAS phenotype [J]. *Human Molecular Genetics*, 1995, 4 (9): 1689-1691.
- [31] Vandana VP, Bindu PS, Sonam K, et al. Audiological manifestations in mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS) syndrome [J]. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2016, 148: 17-21.
- [32] Poulton J, Brown MS, Cooper A, et al. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life [J]. *Diabetologia*, 1998, 41 (1): 54-58.
- [33] Chinnery PF, Elliott HR, Patel S, et al. Role of the mitochondrial DNA 16184-16193 poly-C tract in type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2005, 366 (9497): 1650-1651.
- [34] Poulton J, Luan J, Macaulay V, et al. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study [J]. *Human Molecular Genetics*, 2002, 11 (13): 1581-1583.
- [35] 张宇宁, 杨训俊, 沈飞霞, 等. 线粒体 DNA 12026A/G 多态性与 2 型糖尿病的相关性研究以及 Meta 分析 [J]. *温州医科大学学报*, 2015, 45 (10): 713-717.
- [36] Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, et al. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics [J]. *Forensic Science International*, 2007, 168 (1): 1-13.
- [37] Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35 (Database issue): D823-828.
- [38] Behar DM, Vilems R, Soodyall H, et al. The dawn of human matrilineal diversity [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2008, 82 (5): 1130-1140.
- [39] van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation [J]. *Human Mutation*, 2009, 30 (2): E386-394.
- [40] Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, et al. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1993, 53 (3): 563-590.
- [41] Palanichamy MG, Sun C, Agrawal S, et al. Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2004, 75 (6): 966-978.
- [42] Hudjashov G, Kivisild T, Underhill PA, et al. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (21): 8726-8730.
- [43] Kenney MC, Hertzog D, Chak G, et al. Mitochondrial DNA haplogroups confer differences in risk for age-related macular degeneration: a case control study [J]. *BMC Medical Genetics*, 2013, 14: 4.
- [44] Liou CW, Chen JB, Tiao MM, et al. Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2012, 61 (10): 2642-2651.
- [45] Hwang S, Kwak SH, Bhak J, et al. Gene expression pattern in trans-mitochondrial cytoplasmic hybrid cells harboring type 2 diabetes-associated mitochondrial DNA haplogroups [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (7): e22116.

(本文编辑: 陈子康)

收稿日期: 2016-05-03

(上接第 610 页)

- [3] Kotłęga D, Goła b-Janowska M, Masztalewicz M, et al. Potential role of statins in the intracerebral hemorrhage and subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2015, 49 (5): 322-328.
- [4] 代全德, 司金春, 徐忠海, 等. 急性脑出血患者血清炎症因子和氧化应激产物的动态监测及其临床意义 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2014, 8 (3): 398-402.
- [5] Li J, Cai D, Yao X, et al. Protective Effect of Ginsenoside Rg1 on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells through Attenuating Oxidative Stress and the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in a Mouse Model of Galactose-induced Aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (6): E849.
- [6] 梁慧. 脑出血后继发性脑损伤及其保护作用机制的实验研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [7] Marinkovic I, Strbian D, Mattila OS, et al. A novel combined model of intracerebral and intraventricular hemorrhage using autologous blood-injection in rats [J]. *Neuroscience*, 2014, 272 (8): 286-294.
- [8] 张泽立. 脑出血患者血肿周围脑组织中 NF- κ B 的表达及其与细胞凋亡关系研究 [D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [9] 陈志颖. 大鼠脑出血后 Nrf2-ARE 信号通路对灶周神经保护作用及内源性神经干细胞激活的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [10] 严永兴, 梁丽贞, 袁艳蓉, 等. 大鼠脑出血后脑红蛋白在脑组织中的表达及其对细胞凋亡的影响 [J]. *心脑血管病防治*, 2014, 14 (5): 375-377, 381.
- [11] Shang H, Yang D, Zhang W, et al. Time course of Keap1-Nrf2 pathway expression after experimental intracerebral haemorrhage: correlation with brain oedema and neurological deficit [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47 (5): 368-375.
- [12] Ueda Y, Masuda T, Ishida A, et al. Enhanced electrical responsiveness in the cerebral cortex with oral melatonin administration after a small hemorrhage near the internal capsule in rats [J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92 (11): 1499-1508.
- [13] Wakai T, Sakata H, Narasimhan P, et al. Transplantation of neural stem cells that overexpress SOD1 enhances amelioration of intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34 (3): 441-449.
- [14] Llombart V, Dominguez C, Bustamante A, et al. Fluorescent molecular peroxidation products: a prognostic biomarker of early neurologic deterioration after thrombolysis [J]. *Stroke*, 2014, 45 (2): 432-437.
- [15] 马宝林, 林吴用, 高丽丽. 依达拉奉对大鼠脑出血后脑水肿及脂质过氧化的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36 (8): 40-42.

(本文编辑: 谢飞凤)

收稿日期: 2016-10-15