

脑缺血时半乳糖凝集素-3对大鼠脑皮质中 bcl-2、BAX 及 caspase-3 表达的影响

张秀萍, 翟凤国, 梁启超, 刘佳维
牡丹江医学院, 黑龙江省牡丹江市 157011

摘要:目的 通过脑缺血/再灌注损伤模型,测定脑缺血时半乳糖凝集素-3(Gal-3)对 B 淋巴细胞瘤-2(bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(BAX)及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)表达的影响,从而为脑缺血的发病机制提供一定的实验依据。方法 雄性 SD 大鼠 18 只,建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,缺血 1.5 h,再灌注至 24 h。采用随机分组法分为假手术组(sham)、缺血/再灌注组(I/R)和 Gal-3 RNA 干扰组(siRNA)。采用 real-time PCR 及 western blot 检测大鼠脑皮质中 Gal-3、bcl-2、BAX 及 caspase-3 mRNA 及蛋白表达变化。结果 大鼠脑缺血/再灌注损伤后,脑皮质中 Gal-3 及 bcl-2 mRNA 及蛋白表达明显下调,分别为 0.38、0.47 和 1.310、1.299;BAX 及 caspase-3 mRNA 及蛋白表达明显上调,分别为 1.41、1.55 及 1.076、1.155。而 Gal-3 RNA 干扰后,Gal-3 及 bcl-2 mRNA 及蛋白表达明显下调,分别为 0.24、0.14 及 1.014、1.058;BAX 及 caspase-3 mRNA 及蛋白表达明显上调,分别为 1.76、1.88 及 1.480、1.515。结论 Gal-3 可能通过上调 bcl-2、下调 caspase-3 及 BAX mRNA 及蛋白的表达,参与脑缺血/再灌注损伤的病理过程。

关键词:脑缺血/再灌注损伤;半乳糖凝集素-3;B 淋巴细胞瘤-2;Bcl-2 相关 X 蛋白;含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3;大鼠

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.04.007

Effect of galectin-3 on expression of B-cell lymphoma-2, Bcl-2-associated X protein, and cysteine aspartic acid-specific protease 3 in rat cerebral cortex during cerebral ischemia

ZHANG Xiu-Ping, ZHAI Feng-Guo, LIANG Qi-Chao, LIU Jia-Wei. Mudanjiang University of Medicine, Mu danjiang, Heilongjiang 157011, China

Corresponding author: ZHANG Xiu-Ping, E-mail: zxp0468@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of galectin-3 (Gal-3) on the expression of B-cell lymphoma-2 (bcl-2), Bcl-2-associated X protein (BAX), and cysteine aspartic acid-specific protease 3 (caspase-3) during cerebral ischemia in a model of cerebral ischemia-reperfusion injury, and to provide an experimental basis for the pathogenesis of cerebral ischemia. **Methods** A total of 18 male Sprague-Dawley rats were given ischemic treatment for 1.5 hours followed by reperfusion to 24 hours to establish a model of middle cerebral artery occlusion, and then these rats were randomly divided into sham-operation group, ischemia-reperfusion (I/R) group, and Gal-3 RNA interference (siRNA) group. Real-time PCR and Western blot were used to measure the changes in the mRNA and protein expression of Gal-3, bcl-2, BAX, and caspase-3 in rat cerebral cortex. **Results** After cerebral ischemia-reperfusion injury, the I/R group had significant reductions in the mRNA and protein expression of Gal-3 (0.38 and 0.47) and bcl-2 (1.310 and 1.299) and significant increases in the mRNA and protein expression of BAX (1.41 and 1.55) and caspase-3 (1.076 and 1.155). After Gal-3 RNA interference, the siRNA group had significant reductions in the mRNA and protein expression of Gal-3 (0.24 and 0.14) and bcl-2 (1.014 and 1.058) and significant increases in the mRNA and protein expression of BAX (1.76 and 1.88) and caspase-3 (1.480 and 1.515). **Conclusions** Gal-3 may participate in the pathological process of cerebral I/R injury by upregulating the mRNA and protein expression of Bcl-2 and downregulating the mRNA and protein expression of caspase-3 and BAX.

基金项目:牡丹江医学院科学技术研究项目(ZS201316)

收稿日期:2016-12-19;修回日期:2017-07-01

作者简介:张秀萍(1980-),女,讲师,博士,主要从事中药脑缺血机制研究。

通信作者:刘佳维(1985-),女,讲师,博士,主要从事中药抗肿瘤作用研究。

Key words: ischemia/reperfusion injury; galectin-3; B-cell lymphoma-2; Bcl-2-associated X protein; cysteine aspartic acid-specific protease 3; rat

半乳糖凝集素-3 (galectin-3, Gal-3) 广泛分布于正常组织和疾病组织中,参与多种生理和病理过程,包括细胞生长和分化、免疫调节、细胞黏附、炎症反应、肿瘤侵袭、转移以及细胞凋亡等^[1]。大量研究证实, Gal-3 蛋白直接参与调节细胞凋亡,其具有促进细胞凋亡及抗细胞凋亡双重作用,但其在脑缺血/再灌注缺血/再灌注组 (ischemia /reperfusion, I/R) 损伤中的作用机制尚未见报道。同时,有研究表明, Gal-3 缺乏可抑制 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, bcl-2) 的表达,促进线粒体凋亡通路主要成员 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, BAX) 及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cysteine aspartic acid-specific protease 3, caspase-3) 的表达变化。

基于以上原因,通过脑缺血/再灌注损伤大鼠模型,确定 Gal-3 是否可以通过调控 bcl-2、BAX 及 caspase-3 的表达,参与脑缺血的病理过程,从而为脑缺血的发病及治疗机制提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物、分组及给药

SPF 级雄性 SD 大鼠 18 只,体重 270 ~ 320 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠随机分为 3 组,即假手术组 (sham),假手术 5 min 后经侧脑室注射等容量生理盐水;缺血/再灌注组 (I/R),脑缺血 5 min 后经侧脑室注射等容量生理盐水;Gal-3 RNA 干扰组 (siRNA),脑缺血 5 min 后经侧脑室注射 Gal-3 siRNA 10 μg ^[2]。

1.2 主要试剂及仪器

生物素标记的蛋白分子量标准 (KangChen, KC-410);HRP 标记的二级抗体;Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国);组织总蛋白提取试剂盒 (KangChen, KC-415);BCA 蛋白质定量试剂盒 (KangChen, KC-430);KCTM 化学发光试剂盒 (KangChen, KC-420);逆转录试剂盒 (Invitrogen);sybergreen I 试剂盒 (Invitrogen);PCR 仪 (BIO-RAD);real-time PCR 仪 (Applied biosystem);NanoDrop ND-1000 紫外分光光度计。

1.3 大鼠大脑中动脉阻塞模型制备

采用线栓法^[3]制备大鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型,以 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 对大鼠进行麻醉,仰卧位固定,颈部正中切开皮肤,暴露并分离右侧的颈总、

颈内及颈外动脉。于颈内、颈外动脉的分叉处以动脉夹夹闭,将颈外动脉近心端及远心端结扎,中间剪断。将尼龙线栓由颈外动脉的游离端插入到颈内动脉,深度大约为 (18.5 \pm 0.5) mm,直至产生阻力感,使线头端通过大脑中动脉起始处,结扎颈内动脉用以固定尼龙线并防止出血,将切口逐层缝合,线残端留 1 cm 长于皮外。1.5 h 后,将尼龙线拔出并进行再灌注至 24 h,期间大鼠肛温保持 37 $^{\circ}\text{C}$ 。假手术组大鼠不阻塞大脑中动脉,其他步骤同 I/R 组。

1.4 real-time PCR 检测 Gal-3、bcl-2、bax 和 caspase-3 mRNA 表达

取各组大鼠脑皮质组织,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。使用 NanoDrop[®] ND-1000 测定 RNA A260/A280 的比值范围在 1.8 ~ 2.1 之间。按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,具体引物序列如下:

bcl-2 (F: 5' TGGGATGCCTTTGTGGAAC3'; R: 5' CATATTTGTTTGGGGCAGGTC3');

caspase-3 (F: 5' GAGCTGGACTGCGGTATTGAG3'; R: 5' ACACGGGATCTGTTTCTTTGC3');

Gal-3 (F: 5' AGCCCAACGCAAACAGTATC3'; R: 5' GGCTTCAACCAGGACCTGTA3');

BAX (F: 5' TTTTGTCTACAGGTTTCATCCAGG3'; R: 5' CCATATGCTGTCCAGTTCATCTCC3');

GAPDH (F: 5' GGAAAGCTGTGGCGTGAT3'; R: 5' AAGGTGGAAGAATGGGAGTT3');

Gal-3 siRNA^[4] (F: 5' -GCAAUACAAAAGCUGGAUAA dTdT-3'; R: 5' -PUUAUCCAGCUUUGUAUUGCdTdT-3')。

将 dNTP 2.5 μl 、10 \times PCR 缓冲液 2.5 μl 、MgCl₂ 溶液 1.5 μl 、Taq 聚合酶 1U、2 \times Sybergreen、Gal-3、bcl-2、caspase-3、bax 或 GAPDH 上下游引物各 1 μl 及 cDNA 模板 1 μl ,加无 RNA 酶水补足 25 μl ,轻弹管底将溶液混合。按 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s (40 个循环);95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 反应条件进行 real-time PCR 反应。

1.5 Western blot 检测 Gal-3、bcl-2、BAX 和 caspase-3 蛋白表达

按蛋白提取试剂盒说明书提取各组大鼠皮质

蛋白(组织称重,切小块,加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂,匀浆器匀浆,14,000 xg 预冷离心 15 min),BCA 蛋白质定量试剂盒进行定量,SDS-PAGE 电泳,转膜,脱脂奶粉封闭 1 h,将封闭过的膜加一级抗体 4℃ 过夜,TBST 洗 3 次,每次 5 min。分别加兔抗鼠 Gal-3 多克隆抗体、兔抗鼠 bcl-2 多克隆抗体、兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体和兔抗鼠 bax 多克隆抗体(稀释度为 1:3000),4℃ 摇床过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔二级抗体,室温摇床孵育 2 h,充分漂洗,按照 KCTM 化学发光试剂盒说明曝光。 β -actin 做内参重复以上步骤。ImageJ 分析软件分析特异条带灰度值。

1.6 统计学分析

数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用

SPSS 17.0 及 Graphpad 5.0 统计软件,组间比较用 *t* 检验进行分析。real-time PCR 结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (即表达升高或降低的倍数)表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑缺血/再灌注损伤时 Gal-3 对 bcl-2、BAX 和 caspase-3 mRNA 表达的影响

与 sham 组比较,I/R 组 Gal-3 和 bcl-2 mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$);BAX 及 caspase-3 mRNA 表达均上调 ($P < 0.05$)。与 I/R 组比较,siRNA 组 Gal-3 及 bcl-2 mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$);BAX 及 caspase-3 mRNA 表达均上调 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 脑缺血时 Gal-3 对 bcl-2、BAX 和 caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	Gal-3	bcl-2	BAX	caspase-3
sham 组	6	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01
I/R 组	6	0.38 \pm 0.08 *	0.47 \pm 0.19 **	1.41 \pm 0.24 *	1.55 \pm 0.17 **
siRNA 组	6	0.24 \pm 0.05 ▲▲	0.14 \pm 0.04 ▲	1.76 \pm 0.12 ▲	1.88 \pm 0.13 ▲

注: * 为与 sham 组比较, $P < 0.05$; ** 为与 sham 组比较, $P < 0.01$; ▲ 为与 I/R 组比较, $P < 0.05$; ▲▲ 为与 I/R 组比较, $P < 0.01$ 。

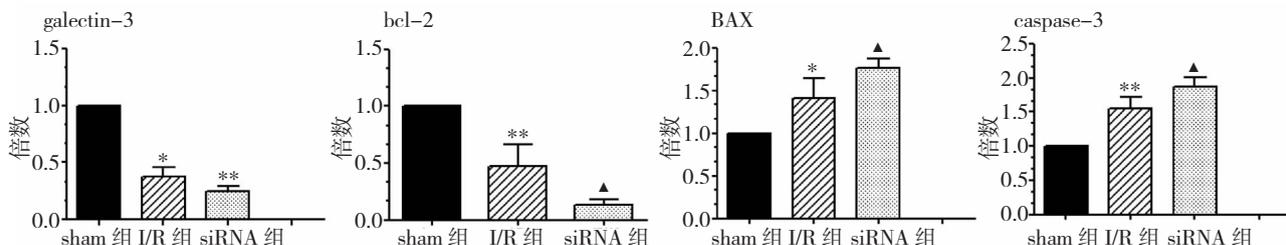


图 1 脑缺血时 Gal-3 对 bcl-2、bax 和 caspase-3 mRNA 表达的影响

2.2 脑缺血/再灌注损伤 Gal-3 对 bcl-2、BAX 和 caspase-3 蛋白表达的影响

与 sham 比较,I/R 组 Gal-3 及 bcl-2 蛋白表达均下调 ($P < 0.05$);BAX 及 caspase-3 蛋白表达均上调

($P < 0.05$)。与 I/R 组比较,siRNA 组 Gal-3 及 bcl-2 蛋白表达下调 ($P < 0.05$);而 BAX 及 caspase-3 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

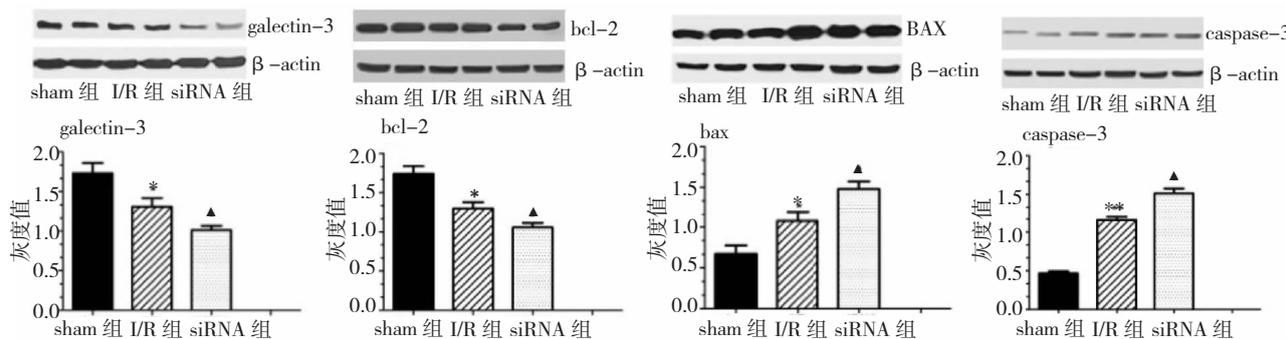


图 2 脑缺血时 Gal-3 对 bcl-2、BAX 和 caspase-3 蛋白表达的影响

表2 脑缺血时 Gal-3 对 bcl-2、BAX、caspase-3 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$; $n=6$)

组别	Gal-3	bcl-2	BAX	caspase-3
sham 组	1.732 ± 0.262	1.743 ± 0.192	0.672 ± 0.208	0.468 ± 0.053
I/R 组	1.310 ± 0.215*	1.299 ± 0.160*	1.076 ± 0.246*	1.155 ± 0.083**
siRNA 组	1.014 ± 0.109 [▲]	1.058 ± 0.111 [▲]	1.480 ± 0.184 [▲]	1.515 ± 0.124 [▲]

注: * 为与 sham 组比较, $P < 0.05$; ** 为与 sham 组比较, $P < 0.01$;

▲ 为与 I/R 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

我国最新的全国公民死亡原因调查结果显示, 脑缺血已成为我国公民致死、致残最主要的疾病之一^[5]。我国现存脑血管病患者 700 余万人, 其中约有 80% ~ 85% 的脑血管病患者为脑缺血^[6]。

脑缺血发病机制非常复杂, 目前研究认为, 与脑缺血发生发展相关的病理机制包括: 能量耗竭、兴奋性毒性、钙超载、氧化应激、炎症和细胞凋亡等。脑缺血再灌注损伤会产生大量活性氧, 引发一系列的事件, 包括细胞凋亡及坏死^[7]。而细胞凋亡是脑缺血的一个突出特点, 在延迟梗死中起着重要的病理作用^[8]。

大量研究证实, Gal-3 蛋白直接参与调节细胞凋亡。其具有促进细胞凋亡及抗细胞凋亡双重作用。Huang 等^[9] 发现人脑垂体腺瘤组织中 Gal-3 及 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达均明显升高, 认为 Gal-3 可能通过与 Bcl-2 协同产生抗凋亡作用。Fukumori 等^[10] 采用人前列腺癌 LNCaP 细胞系, 转染 Gal-3, 之后发现, 用抗癌药物处理后, Gal-3 间接抑制细胞色素 c 的释放和 caspase-3 的激活; 表明 Gal-3 可能抑制抗癌药物诱导的细胞凋亡。Yang 等^[11] 通过人白血病 T 细胞转染 Gal-3 后发现, Gal-3 可能通过 bcl-2 相关细胞死亡抑制通路成为抑制细胞凋亡的调节子。Okamura 等^[12] 发现慢性阻塞性肾小管慢性损伤细胞内 Gal-3 可抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 的活力、抑制肾小管上皮细胞的凋亡, 从而可通过抑制细胞凋亡而保护肾小管慢性损伤。以上研究均表明, Gal-3 具有一定的抑制细胞凋亡的作用。而本研究发现, 大鼠 I/R 后, 脑皮质中 Gal-3 及 bcl-2 mRNA 及蛋白表达下调; BAX 及 caspase-3 mRNA 及蛋白表达上调; 而 Gal-3 RNA 干扰后, Gal-3 及 bcl-2 mRNA 及蛋白表达下调更显著, BAX 及 caspase-3 mRNA 及蛋白表达上调更显著。表明 Gal-3 可能通过上调 bcl-2、下调 caspase-3 及 BAX mRNA 及蛋白的表达, 参与脑缺血/再灌注

损伤的病理过程。

参 考 文 献

- [1] 林芳, 任阳, 冯琳, 等. 2 型糖尿病患者基质金属蛋白酶-12 基因多态性与缺血性卒中的相关性研究 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44 (1): 44-48.
- [2] 韩江全, 卢俊江, 向灿辉, 等. MicroRNA-155 对糖尿病大鼠脑缺血损伤血管再生的调控 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (2): 354-358.
- [3] Calloni RL, Winkler BC, Ricci G, et al. Transient middle cerebral artery occlusion in rats as an experimental model of brain ischemia [J]. Acta Cir Bras, 2010, 25 (5): 428-433.
- [4] 魏杨辉. Galectin-3 siRNA 和 pIRES-IL-24-TRAIL 的构建及其对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 南方医科大学, 2013.
- [5] Nagakannan P, Shivasharan BD, Thippeswamy BS, et al. Protective effect of hydroalcoholic extract of Mimosa elengi Linn. flowers against middle cerebral artery occlusion induced brain injury in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140 (2): 247-254.
- [6] 王虹虹, 曾红. 缺血性脑血管病概述 [J]. 中国临床医生, 2011, 39 (6): 7-10.
- [7] Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P, et al. Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo [J]. FASEB J, 2000, 14 (3): 418-429.
- [8] Cheng CY, Lin JG, Su NY, et al. Electroacupuncture-like stimulation at Baihui and Dazhui acupoints exerts neuroprotective effects through activation of the brain-derived neurotrophic factor-mediated MEK1/2/ERK1/2/p90RSK/bad signaling pathway in mild transient focal cerebral ischemia in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 92.
- [9] Huang CX, Hou YH, Liu YS. Expression of galectin-3 correlates with apoptosis in pituitary adenoma cells [J]. Neurosci Bull, 2008, 24 (1): 34-38.
- [10] Fukumori T, Oka N, Takenaka Y, et al. Galectin-3 Regulates Mitochondrial Stability and Antiapoptotic Function in Response to Anticancer Drug in Prostate Cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66 (6): 3114-3119.
- [11] Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis [J]. Proc Nat Acad Sci, 1996, 93 (13): 6737-6742.
- [12] Okamura DM, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, et al. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300 (1): F245-F253.