

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)07-0698-04

辅酶 Q10 对脑缺血再灌注损伤大鼠海马区 Bcl-2 的表达增强及 Bax 和 GSK-3 β 表达的抑制

田爽¹, 王迪^{1*}, 李晓东², 唐健杰^{1,3}, 韩光^{1,4}, 戴永逸¹

(¹辽宁医学院基础医学院细胞生物学教研室, 辽宁 锦州 121000; ²解放军第 205 医院重症医学科, 辽宁 锦州 121000; ³锦州市第二医院药剂科, 辽宁 锦州 121000; ⁴盘锦市中心医院神经内科, 辽宁 盘锦 124000)

[摘要] 目的 探索辅酶 Q10 预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠 Bcl-2、Bax 和糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 表达的影响。方法 36 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组(sham)、缺血再灌注组(I/R)和辅酶 Q10 预处理组(Q10)。采用线栓法阻断大脑中动脉制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, HE 染色观察组织学变化, 免疫组化染色和 Western blot 法检测海马区 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白表达情况。结果 免疫组化染色显示海马区 Q10 组较 I/R 组 Bcl-2 蛋白阳性表达率明显升高, Bax 和 GSK-3 β 蛋白阳性表达率明显下降; 与 I/R 组相比, Western blot 法结果表明 Q10 组 Bcl-2 蛋白表达水平升高, Bax 和 GSK-3 β 蛋白表达水平下降, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 辅酶 Q10 增强缺血再灌注损伤大鼠海马区 Bcl-2 蛋白表达, 抑制 Bax 和 GSK-3 β 蛋白表达。

[关键词] 辅酶 Q10; 脑缺血再灌注; Bcl-2; Bax; GSK-3 β

[中图分类号] R392.33, R743.31 **[文献标志码]** A

Coenzyme Q10 enhances the expression of Bcl-2 and inhibits the expressions of Bax and GSK-3 β in the hippocampus of rats exposed to ischemia/reperfusion injury

TIAN Shuang¹, WANG Di^{1*}, LI Xiaodong², TANG Jianjie^{1,3}, HAN Guang^{1,4}, DAI Yongyi¹

¹Department of Cell Biology, Basic Medical College of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000; ²The 205th Hospital of Chinese People's Liberation Army, ICU (intensive care unit) Jinzhou 121000; ³Department of Pharmacy, The Second Hospital, Jinzhou 121000; ⁴Department of Neurology, The Central Hospital, Panjin 124000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of coenzyme Q10 pretreatment on the expressions of Bcl-2, Bax and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) in rats suffering from ischemia/reperfusion injury. **Methods** Thirty-six adult male SD rats were randomly assigned into 3 groups: sham-operated group (sham), ischemia/reperfusion group (I/R) and coenzyme Q10 preconditioning group (Q10). Focal cerebral ischemia/reperfusion models were established in experimental rats by blocking middle cerebral artery with suture. Histological changes of hippocampal neurons were observed by HE staining. The expressions of Bcl-2, Bax and GSK-3 β were detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Immunohistochemistry showed that the percentage of Bcl-2 positive cells increased in the hippocampus, while the percentages of Bax and GSK-3 β positive cells decreased in Q10 group compared with I/R group. Western blotting revealed that the expression level of Bcl-2 was higher and the expression levels of Bax and GSK-3 β were lower in Q10 group than in I/R group. There were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Coenzyme Q10 promoted the expression of Bcl-2 and suppressed the expressions of Bax and GSK-3 β in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion.

[Key words] coenzyme Q10; ischemia/reperfusion; Bcl-2; Bax; GSK-3 β

收稿日期: 2013-01-16; 接受日期: 2013-02-21

基金项目: 锦州市科学技术计划(11A1E32); 国家人社部留学人员科技项目(2011LX007)

作者简介: 田爽(1983-), 女, 辽宁锦州人, 助理实验师, 硕士研究生

Tel: 18841697150; E-mail: tianshuangs@yaho.com.cn

*Corresponding author, 王迪, E-mail: tulip_wang@yahoo.com

脑缺血再灌注过程会伴随着神经细胞尤其是对缺血缺氧高度敏感的海马 CA1 区锥体细胞的损伤甚至死亡^[1]。凋亡是脑损伤后细胞死亡的主要机制,凋亡相关蛋白的表达水平决定着细胞的命运。Bcl-2 是最重要的抗凋亡蛋白,它阻断细胞色素 C 释放至胞质,抑制下游凋亡级联反应。Bax 是最重要的促凋亡蛋白,拮抗 Bcl-2 的作用,促进细胞凋亡^[1-4]。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,参与多条细胞信号传导通路,在调节细胞凋亡中起重要作用。它在中枢神经系统特别是海马中富集表达,其活性异常与脑缺血再灌注损伤密切相关^[5-7]。

辅酶 Q10 是线粒体内膜上重要的内源性酶原,参与一系列酶促级联反应,促进氧化磷酸化和 ATP 的产生,是一种天然抗氧化剂和细胞膜稳定剂,具有潜在的神经元保护作用^[8]。目前研究表明辅酶 Q10 对脑缺血再灌注过程中氧自由基诱导的氧化应激损伤和线粒体能量代谢障碍具有缓解作用^[9],但它与脑缺血再灌注损伤后凋亡相关蛋白表达的相关性研究甚少。本实验通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,探讨辅酶 Q10 对海马区凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 220~250 g,由辽宁医学院实验动物中心提供;辅酶 Q10 购自卫材(中国)药业有限公司;兔抗大鼠 Bcl-2 抗体、兔抗大鼠 Bax、兔抗大鼠 GSK-3 β 和兔抗大鼠 β -actin 抗体以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;免疫组化试剂盒和显色试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司和北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 36 只 SD 大鼠随机分为假手术组(sham 组)、缺血/再灌注组(ischemia-reperfusion 组, I/R 组)和辅酶 Q10 预处理组(coenzyme Q 10 组, Q10 组),每组 12 只。辅酶 Q10 溶于生理盐水中, Q10 组于术前 4 周连续灌胃给药,剂量为每天 30 mg/kg 体质量,其余 2 组给予相同体积的生理盐水。

1.2.2 模型建立 参照 Longa 等^[10]、Nagasawa 和 Kogure^[11]报道的方法制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。100 mL/L 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,颈部正中切口,分离并结扎左侧颈总、颈外和颈内动脉。将颈内动脉远心端用动脉夹夹闭,在颈总动脉分叉处剪一小口,插

入碳素鱼线,松开动脉夹,向颈内动脉插入鱼线(20 \pm 2)mm,直至稍感阻力,提示已到大脑中动脉起始部。脑缺血 1 h 后,缓慢拔出鱼线,再灌注 24 h。Sham 组仅将栓线插入颈总及颈内动脉但不阻断大脑中动脉,其余步骤相同。有效模型为大鼠清醒后出现左侧 Horner 征及对侧以前肢为主的瘫痪,神经行为学评分在 1~3 分。

1.2.3 HE 染色及免疫组化染色 取 3 组大鼠左侧大脑组织石蜡包埋做连续冠状切片,厚度为 5 μ m,将其贴附于蛋白甘油处理的载玻片上。切片于二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化,常规 HE 染色。其余切片根据 HE 染色确定切片海马 CA1 区位置,然后选取相邻切片脱蜡、水化,先进行高压修复抗原 2 min,以避免高温高酸环境减弱 H₂O₂ 对内源性过氧化物酶的封闭效果,30 mL/L H₂O₂ 室温孵育 20 min;山羊血清封闭 1 h 后分别滴加兔抗大鼠 Bcl-2 抗体(1:200)、兔抗大鼠 Bax 抗体(1:200)、兔抗大鼠 GSK-3 β 抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C 过夜。次日加生物素标记山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,然后加辣根酶标记链霉卵白素,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封片。对照组以 PBS 代替一抗,其它步骤相同。镜下观察胞质中有棕色颗粒者为阳性细胞,无棕色颗粒为阴性细胞。每张切片随机选取海马 CA1 区的 5 个视野,进行 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白阳性表达细胞计数,并计算阳性百分率。

1.2.4 Western blot 法检测海马区 Bcl-2、Bax、GSK-3 β 表达

将 3 组大鼠左侧海马组织剪碎,加预冷组织裂解液并超声破碎细胞,4 $^{\circ}$ C 离心,吸取上清液,用分光光度计进行蛋白定量。分别取约 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转至 PVDF 膜上,然后在含 40 g/L BSA 的 TBST 中室温封闭 1 h,分别加入兔抗大鼠 Bcl-2 抗体、兔抗大鼠 Bax 抗体、兔抗大鼠 GSK-3 β 抗体(1:500)和兔抗大鼠 β -actin 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 过夜。次日加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000)室温孵育 1 h, ECL 试剂发光成像,软件分析目的条带进行吸光度(A)值监测,并用 β -actin 进行标化。蛋白相对表达水平 = $A_{目的蛋白条带}/A_{\beta-actin}$ 。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马区病变 HE 染色光镜下观察发现, sham 组海马 CA1 区神经细胞胞质丰富,核仁清楚,细胞结构完整,轮廓清晰,未见损伤的神经元。而 I/R 组海马 CA1 区神经细胞体积变小,胞核收缩呈不规则的多角形,核固缩深染,结构不清。Q10 组海马 CA1 区神经细胞损伤较 I/R 组有所减轻,仅见少量神经细胞变性坏死,存活细胞数量较多(图 1)。

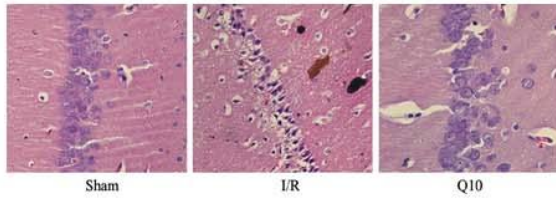


图1 海马 CA1 区神经细胞变化(HE 染色, $\times 400$)

2.2 免疫组化染色观察海马 CA1 区神经细胞 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白表达 Sham 组海马 CA1 区神经细胞胞质仅见少量阳性表达细胞,与 sham 组相比, I/R 组海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白阳性表达率均显著上升($P < 0.01$);与 I/R 组相比, Q10 组海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白阳性表达率进一步升高,而 Bax 和 GSK-3 β 蛋白阳性表达率明显下降,差异均具有统计学意义(图 2, 表 1, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

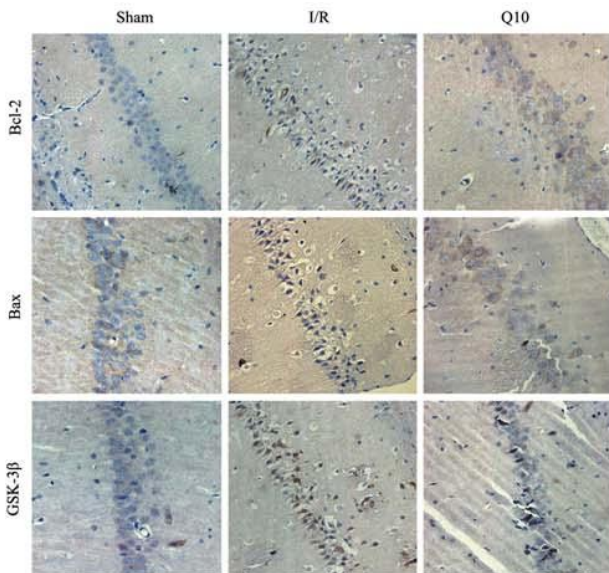


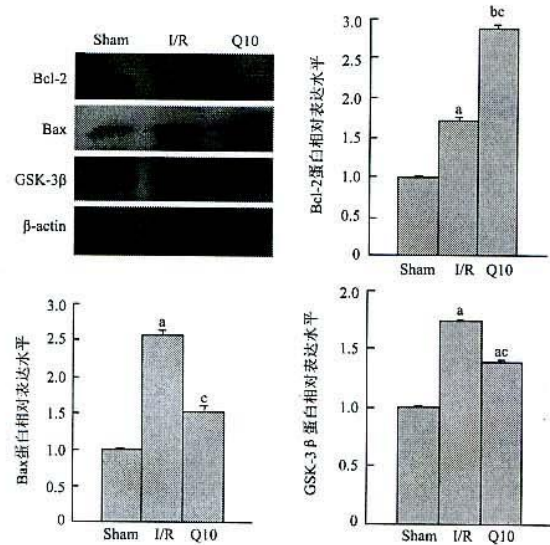
图2 免疫组化检测海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白的表达($\times 400$)

表1 大鼠海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白的表达率 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白 (%)	Bax 蛋白 (%)	GSK-3 β 蛋白 (%)
sham	2.22 \pm 0.81	2.57 \pm 0.79	6.08 \pm 0.95
I/R	19.58 \pm 6.04 ^b	23.15 \pm 2.92 ^b	27.22 \pm 5.19 ^b
Q10	25.34 \pm 2.22 ^{bd}	19.85 \pm 3.64 ^{bd}	14.87 \pm 3.31 ^{bo}

^b $P < 0.01$ vs sham 组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs I/R 组。

2.3 Western blot 法检测海马组织 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白的表达 与 sham 相比, I/R 组 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白表达水平均有所升高;而 Q10 组较 I/R 组 Bcl-2 蛋白表达水平进一步升高,但 Bax 和 GSK-3 β 蛋白表达水平有所降低,差异均具有统计学意义(图 3)。



* $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs sham 组; ^c $P < 0.05$ vs I/R 组。

图3 Western blot 法检测海马组织 Bcl-2、Bax 和 GSK-3 β 蛋白的表达

3 讨论

辅酶 Q10 是线粒体呼吸链上关键的电子传递体,具有维持线粒体膜完整性和抗脂质过氧化作用^[8]。研究指出辅酶 Q10 能够抵抗氧化应激损伤和提高线粒体能量代谢,对脑缺血再灌注损伤^[9]、阿尔茨海默病^[12]、帕金森病^[13]、亨廷顿病^[14]等神经退行性疾病具有潜在的治疗意义。然而当线粒体损伤时,辅酶 Q10 是否能够影响凋亡相关蛋白的表达水平仍是未知。

脑缺血再灌注损伤与细胞凋亡的发生密切相关,而线粒体损伤介导的细胞凋亡信号转导通路是脑缺血后神经细胞凋亡的主要途径,它受到一系列凋亡相关蛋白的调节。Bcl-2 家族中的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 被认为是最重要的调节子。许多证据表明在脑缺血再灌注损伤中 Bcl-2 过表达能抑制由氧化应激和毒性刺激所诱导的细胞凋亡,但敲除 Bcl-2 或抑制内源性 Bcl-2 表达则会加剧缺血神经元的死亡。Bax 通过与 Bcl-2 的同源结构域结合形成异源二聚体,封闭 Bcl-2 活性,促进细胞色素 C 穿过线粒体内膜,参与凋亡启动复合体的形成,导致细胞凋亡^[1-4]。本实验免疫组化和 Western blot 结果显示 Q10 组 Bcl-2 阳性细胞率和蛋白表达水平高于 I/R 组,而 Bax 阳性细胞率和蛋白表达水平低于 I/R 组,与文献报道一致。这表明辅酶 Q10 对脑缺血损伤神经元中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平具有调节作用。GSK-3 β 是一种多功能调节酶,通过多条信号转导通路参与神经细胞凋亡过程。研究发现在脑缺血再灌

注损伤过程中,可以通过激活 PI3K/Akt 途径促使 GSK-3 β 的表达减少或活性降低,以此来保护神经元免于凋亡^[5-6]。本实验结果与文献报道相一致,当神经元受到脑缺血损伤后 GSK-3 β 阳性细胞率和蛋白表达水平升高,但在缺血前经辅酶 Q10 预处理则表现为 GSK-3 β 阳性细胞率和蛋白表达水平下降。同时也有文献指出在神经发育过程中,它作为 Wnt 信号通路的主要组件,可通过直接与 Bax 相互作用或间接影响 Wnt 途径靶基因转录促进细胞凋亡^[15]。本实验结果显示 GSK-3 β 的表达趋势与 Bax 相似,都在 L/R 组上调,而在 Q10 组下调,这说明二者之间可能存在着某种关联,但二者之间的相互作用是直接的还是间接的,还有待进一步研究。

综上所述,辅酶 Q10 能够使海马区受损神经元中 Bcl-2 的表达升高,而 Bax 和 GSK-3 β 的表达下降,为理解辅酶 Q10 对缺血再灌注损伤的作用机制提供了新的视角。

参考文献:

- [1] Li Z, Pang L, Fang F, et al. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2[J]. Brain Res, 2012, 1450: 116-124.
- [2] Xi HJ, Zhang TH, Tao T, et al. Propofol improved neurobehavioral outcome of cerebral ischemia-reperfusion rats by regulating Bcl-2 and Bax expression[J]. Brain Res, 2011, 1410: 24-32.
- [3] 张强,熊婷,张其梅,等. 缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(3): 329-330.
- [4] 林小惠,刘楠,肖迎春,等. 脂肪来源的干细胞抑制对大鼠脑缺血后神经细胞凋亡及 Bcl-2、caspase-12 表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 40-43.
- [5] Simão F, Matté A, Pagnussat AS, et al. Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3 β and CREB through PI3-K/Akt pathways[J]. Eur J Neurosci, 2012, 36(7): 2899-2905.
- [6] Sun B, Chen L, Wei X, et al. The Akt/GSK-3 β pathway mediates flurbiprofen-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 409(4): 808-813.
- [7] Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, et al. Treatment with the glycogen synthase kinase-3beta inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus[J]. Shock, 2008, 30(3): 299-307.
- [8] Young AJ, Johnson S, Steffens DC, et al. Coenzyme Q10: a review of its promise as a neuroprotectant[J]. CNS Spectr, 2007, 12(1): 62-68.
- [9] Horecký J, Gvozdíková A, Kucharská J, et al. Effects of coenzyme Q and creatine supplementation on brain energy metabolism in rats exposed to chronic cerebral hypoperfusion[J]. Curr Alzheimer Res, 2011, 8(8): 868-875.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(8): 1037-1043.
- [12] Dumont M, Kipiani K, Yu F, et al. Coenzyme Q10 decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2011, 27(1): 211-223.
- [13] Sutachan JJ, Casas Z, Albarracín SL, et al. Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease[J]. Nutr Neurosci, 2012, 15(3): 120-126.
- [14] Hickey MA, Zhu C, Medvedeva V, et al. Evidence for behavioral benefits of early dietary supplementation with coenzyme Q10 in a slowly progressing mouse model of Huntington's disease[J]. Mol Cell Neurosci, 2012, 49(2): 149-157.
- [15] Jaeger A, Baake J, Weiss DG, et al. Glycogen synthase kinase-3beta regulates differentiation-induced apoptosis of human neural progenitor cells[J]. Int J Dev Neurosci, 2013, 31(1): 61-68.

版权许可声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。作者向本刊提交文章发表的行为,均视为同意在本编辑部网站及 CNKI 中国期刊全文数据库等数据库出版,使用费不再另行支付。