

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.11.023

论著·实验研究

核转录因子 FOXO3a 在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤神经元凋亡中的作用

李德渊 屈艺 李晋辉 张莉 熊涛 母得志

(四川大学华西第二医院儿科 / 华西儿童医学中心,
四川大学妇儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨核转录因子 FOXO3a 在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经元凋亡中的作用及机制。
方法 160只10日龄SD大鼠随机分为缺氧缺血(HI)组和假手术组, HI组在乙醚麻醉下行右侧颈总动脉结扎后缺氧2.5h;假手术组不结扎颈总动脉,不作缺氧处理。两组在HI后0.5h、2h、4h、8h和24h各处死16只大鼠取大脑皮层。应用Western blot定量检测FOXO3a总蛋白、胞核FOXO3a蛋白、胞浆FOXO3a蛋白及Bim蛋白表达。应用TUNEL染色法检测凋亡细胞。**结果** 与假手术组比较, HI组胞核FOXO3a蛋白于HI后0.5h表达开始增高,随HI时间延长表达逐渐增高,24h达高峰($P<0.01$);胞浆FOXO3a蛋白水平在HI后各时间点均低于假手术组($P<0.01$);Bim蛋白在HI后0.5h表达升高,2h达高峰,4h开始降低,至8h开始恢复至基线水平。TUNEL染色结果显示HI后4h,凋亡细胞开始增多,24h达高峰,各时间点凋亡指数均高于假手术组(均 $P<0.01$)。**结论** 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤时FOXO3a自胞浆转位入胞核,诱导靶基因前凋亡蛋白Bim表达,Bim表达上调可能与神经元凋亡有关。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15(11): 1023-1027]

[关键词] FOXO3a; Bim; 缺氧缺血; 凋亡; 神经元; 新生大鼠

Role of the FOXO3a transcription factor in neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

LI De-Yuan, QU Yi, LI Jin-Hui, ZHANG Li, XIONG Tao, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Qu Y, Email: quy712002@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To explore the role and mechanisms of FOXO3a nuclear translocation in neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia (HI). **Methods** One hundred and sixty 10-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: HI and sham-operated. The right common carotid artery was ligated followed by hypoxia exposure for 2.5 hours in the HI group. The sham-operated group rats were not subjected to carotid artery ligation or hypoxia treatment. Rat cerebral cortex was collected at 0.5, 2, 4, 8 and 24 hours after hypoxia. Western blot was used to detect expression of total FOXO3a protein, p-nuclear and cytoplasmic FOXO3a and Bim. TUNEL staining was used to detect apoptotic cells. **Results** The nuclear protein of FOXO3a obviously increased from 0.5 to 24 hours after HI in a time-dependent manner compared with the sham-operated group ($P<0.01$). On the contrary, cytoplasmic protein evidently decreased from 0.5 to 24 hours in the HI group compared with the sham-operated group ($P<0.01$). Bim protein increased from 0.5 hour, peaked at 2 hours, started to decline at 4 hours ($P<0.01$), and returned to baseline level at 8 and 24 hours after HI in the HI group compared with the sham-operated group. TUNEL positive cells started to express at 4 hours, and peaked at 24 hours after HI ($P<0.01$). However, TUNEL positive cells were rarely found in the sham-operated group. **Conclusions** HI induces FOXO3a translocation from cytoplasm to nucleus, and enhances protein expression of its target gene Bim in the neonatal rat brain. The upregulation of Bim expression might be related to neuronal apoptosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(11): 1023-1027]

Key words: FOXO3a; Bim; Hypoxia-ischemia; Apoptosis; Neuron; Neonatal rats

[收稿日期] 2013-05-12; [修回日期] 2013-06-20

[基金项目] 国家重大科学研究计划项目(2013CB967404); 国家自然科学基金(81000262, 31171020, 81172174, 81270724); 教育部长江学者和创新团队基金(IRT0935); 教育部博士学科点专项科研基金(20110181130002); 四川省科技厅科技支撑项目(2010SZ0280); 国家临床重点专科(儿科新生儿专业)建设项目。

[作者简介] 李德渊,男,博士,副主任医师。

[通信作者] 屈艺,研究员。

脑缺氧缺血所诱导的神经元凋亡是引起新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)病理改变及神经系统后遗症的重要原因之一。深入研究缺氧缺血神经元凋亡的分子调控机制,探索干预神经元凋亡的新靶点,对临床预防和治疗新生儿HIE具有重要的指导意义。近年来,对肿瘤的相关研究发现,核转录因子FOXO3a自胞浆转位至胞核,启动前凋亡蛋白Bim表达,是介导肿瘤细胞凋亡的关键信号途径^[1]。然而,新生大鼠缺氧缺血后FOXO3a是否发生核转位,是否参与发育脑缺氧缺血神经元的凋亡过程目前尚不清楚。本实验在建立10日龄新生大鼠缺氧缺血脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型的基础上,观察新生大鼠缺氧缺血后大脑皮层FOXO3a的核转位现象,探讨FOXO3a核转位在HIBD新生大鼠皮层神经元凋亡中的作用及机制,为临床治疗新生儿HIE提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

清洁级新生10日龄SD大鼠160只,雌雄不限,体重18~25g,由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。兔抗大鼠FOXO3a多克隆抗体购自Cell Signaling公司,兔抗大鼠Bim多克隆抗体购自Abcam公司,兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体购自Sigma公司,蛋白分离试剂盒购自Pierce公司,TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒购自Roche公司。

1.2 动物分组与模型制作

160只实验动物按随机数字表法随机分为假手术组和缺氧缺血组,每组80只,将每组按照缺氧缺血后0.5h、2h、4h、8h及24h分为5个不同亚组,每个时间点16只大鼠,其中8只用于Western blot检测,8只用于TUNEL检测。经典Rice法^[2-3]制作HIBD动物模型,缺氧缺血组在乙醚麻醉下行右侧颈总动脉结扎,氧氮混合气(8%氧,92%氮)缺氧2.5h,即为HIBD模型;假手术组仅分离右侧颈总动脉,不结扎,不予缺氧处理。

1.3 标本采集

分别于缺氧缺血后0.5h、2h、4h、8h和24h经乙醚麻醉后处死两组动物取右侧大脑皮层,-80℃冻存。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 Western blot检测FOXO3a及Bim蛋白表达
将冻存脑皮层组织取出,冰上匀浆,低温离心机内14000rpm,离心30min。按Pierce蛋白分

离试剂盒抽提胞核和胞浆蛋白。取上清,BCA法测蛋白浓度,各孔加入100μg蛋白样品电泳,转膜,5%小牛血清封闭液封闭1h,分别加入兔抗大鼠FOXO3a多克隆抗体一抗(1:800)、兔抗大鼠Bim多克隆抗体一抗(1:200)和兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体一抗(1:2000)4℃孵育过夜。TBST洗膜3次,二抗室温孵育1h,TBST洗膜3次,ECL显色,用Gel-pro凝胶成像分析软件测定条带的积分光密度值(IOD),并计算目的蛋白和内参GAPDH的IOD比值,即为相对光密度。

1.4.2 TUNEL染色法检测凋亡细胞
每个实验样本行5μm切片,每隔5张切片选取1张,共取10张切片。按TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(Roche)操作步骤进行。切片常规脱蜡,梯度酒精水化,PBS洗2次,每次5min,3%过氧化氢室温避光10min,蛋白酶K(20μg/mL)消化7min;PBS洗1次,每次5min,滴加Triton X-100 37℃孵育10min,PBS洗3次,每次5min,滴加TUNEL(TdT酶)反应液37℃孵育60min,PBS洗3次,每次3min,滴加Converter-AP,37℃孵育30min,PBS洗3次,每次3min,Fast red显色试剂盒显色,苏木素复染,透明,封片。结果判定以细胞核染成红色为凋亡细胞,每张切片选择5个以上具有代表性的高倍视野(×400)计算凋亡指数。凋亡指数=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件包对数据进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧缺血对新生大鼠大脑皮层核转录因子FOXO3a表达的影响

Western blot结果显示,与假手术组比较,胞核FOXO3a于缺氧缺血后0.5h表达开始增高,且随缺氧缺血时间延长表达逐渐增高,24h达高峰,与内参GAPDH校对后,缺氧缺血后0.5h和24h,胞核FOXO3a表达量比假手术组分别增加1.7倍和2.9倍(均 $P < 0.01$)。与胞核FOXO3a表达增加相反,胞浆FOXO3a于缺氧缺血后不同时间点表达降低,与内参GAPDH校对后,缺氧缺血后0.5h和24h,胞浆FOXO3a表达量比假手术组分别降低42%和64%(均 $P < 0.01$)。FOXO3a总蛋白的表达于缺氧缺血后各时间点无明显变化见图1~2。

2.2 缺氧缺血对新生大鼠大脑皮层 Bim 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与假手术组比较, Bim 蛋白表达于缺氧缺血后 0.5 h 升高, 2 h 达高峰, 4 h 开始降低但仍维持在高水平, 8~24 h 恢复至基线水平(图 3)。与内参 GAPDH 校对后, 缺氧缺血后 0.5 h 和 2 h, Bim 蛋白表达量比假手术组分别

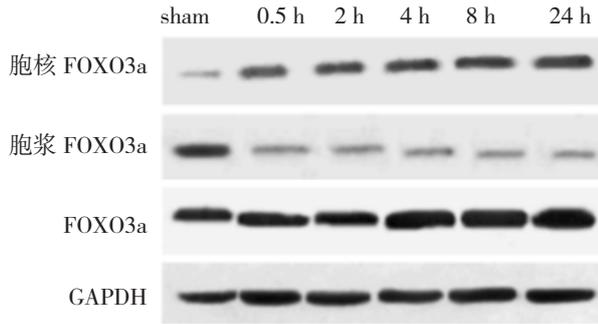


图 1 Western blot 检测缺氧缺血新生大鼠大脑皮层 FOXO3a 表达水平

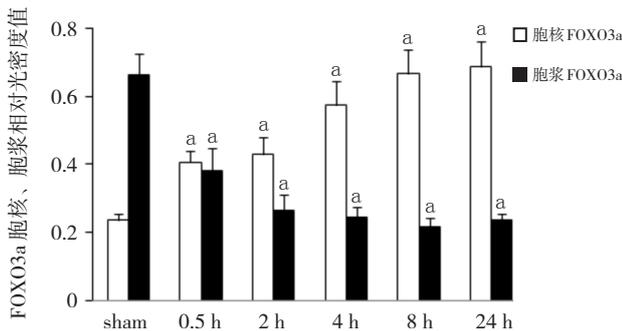


图 2 两组胞核与胞浆 FOXO3a 蛋白的相对表达量比较 (n=8) a: 与假手术组比较, P<0.01。

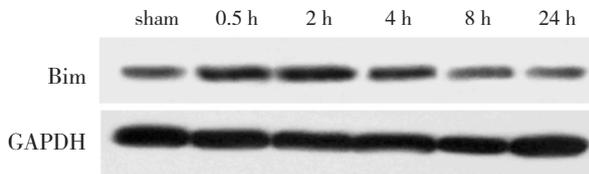


图 3 Western blot 检测缺氧缺血新生大鼠大脑皮层 Bim 表达水平

增加 1.3 倍和 2.1 倍 (均 P<0.01), 见图 4。

2.3 新生大鼠缺氧缺血后神经细胞凋亡的变化

TUNEL 染色结果显示, 缺氧缺血组凋亡细胞于缺氧缺血后 4~8 h 增加, 24 h 达高峰, 假手术组偶见凋亡细胞(图 5)。随缺氧缺血时间延长, 细胞凋亡指数 (AI) 增加, 24 h 达峰值, 见表 1。

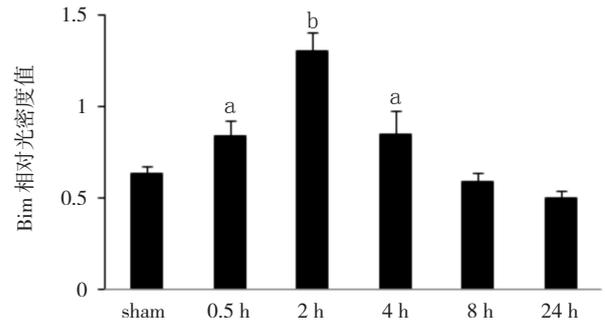


图 4 两组 Bim 蛋白的相对表达量比较 (n=8) a: 与假手术组比较, P<0.05; b: 与假手术组比较, P<0.01。

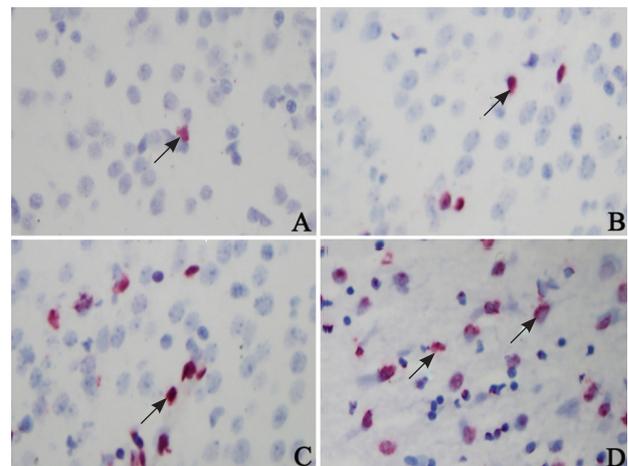


图 5 两组凋亡细胞表达情况 (TUNEL 染色, ×400) A: 假手术组偶见 TUNEL 阳性细胞表达; B: 缺氧缺血后 4 h, TUNEL 阳性细胞表达开始增加; C: 缺氧缺血后 8 h, TUNEL 阳性细胞表达明显增加; D: 缺氧缺血后 24 h, TUNEL 阳性细胞表达达高峰。细胞核染成红色为凋亡细胞 (箭头所示)。

表 1 两组不同时间细胞凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	0.5 h	2 h	4 h	8 h	24 h	F 值	P 值
假手术组	8	0.55 ± 0.23	0.56 ± 0.21	0.55 ± 0.18	0.61 ± 0.19	0.55 ± 0.25	0.33	>0.05
缺氧缺血组	8	0.78 ± 0.35	0.90 ± 0.32	2.35 ± 0.83	9.56 ± 3.42	30.75 ± 8.54 ^a	36.58	<0.01
t 值		0.48	0.51	3.35	5.70	6.34		
P 值		>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01		

a: 与同组其他时间点比较, 均 P<0.01。

3 讨论

神经元凋亡的发生为高度精密的调节过程, 涉及信号转导、基因调控和凋亡效应的执行三个阶段^[4-5]。信号转导过程的激活, 存活和死亡调控基因之间的启动和平衡, 决定细胞的存亡。核转录因子 FOXO3a 是磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 K (phosphoinositid 3 kinase/Akt, PI3K/Akt) 信号通路下游底物^[6-7], 作为新近发现的促凋亡基因, 其表达活性及核转位与细胞的增殖、衰老、凋亡、分化及肿瘤的发生密切相关^[8-11], 近年来已成为医学界研究的热点。然而, 发生脑缺血缺氧后, FOXO3a 的表达及活性是否改变, 是否诱导 FOXO3a 发生核转位以及 FOXO3a 的核转位在缺氧缺血诱导的神经元凋亡中发挥怎样的作用, 目前尚不清楚, 也是本课题研究的核心所在。

本研究选择生后 10 日龄大鼠为研究对象是因为其大脑解剖生理发育与人类足月新生儿相近^[12], 采用经典 Rice 法^[2-3]建立 HIBD 模型。本研究通过分离大脑皮层胞浆与胞核蛋白发现, 与假手术组比较, 缺氧缺血组胞核 FOXO3a 的表达于缺氧缺血后 0.5 h 开始增高, 随缺氧缺血时间延长表达逐渐增高, 24 h 达高峰; 与胞核 FOXO3a 表达呈时间依赖性增加相反, 胞浆 FOXO3a 于缺氧缺血后 0.5~24 h 表达降低; 而 FOXO3a 总蛋白的表达于缺氧缺血后各时间点无明显变化。以上结果表明, 缺氧缺血虽未引起新生大鼠大脑皮层 FOXO3a 的蛋白表达量发生改变, 但促进了 FOXO3a 自胞浆转位入胞核。

FOXO3a 的活性在多种水平上受到调节。磷酸化 / 去磷酸化对调节 FOXO3a 的亚细胞定位及其转录活性发挥核心作用^[13]。体外培养交感神经元的研究表明, 在生长因子等细胞外刺激信号作用下, FOXO3a 被 Akt 磷酸化后不能转位入细胞核, 失去其转录活性; 与之相反, 去除生长因子, 解除 Akt 磷酸化抑制后, 胞浆 FOXO3a 与穿梭蛋白 14-3-3 蛋白结合, 促进 FOXO3a 自胞浆转位至细胞核, 促进 FOXO3a 活化, 启动前凋亡蛋白 Bim 及 Fas 配体表达, 诱导细胞凋亡^[14]。为进一步研究 FOXO3a 的核转位是否诱导靶基因前凋亡蛋白 Bim 表达, 本研究采用免疫印迹定量检测缺氧缺血后 Bim 的表达。结果表明 HI 后 0.5 h, 随 FOXO3a 发生核转位, Bim 蛋白表达增加, 2 h 达高峰, 4 h 仍维持在较高水平, 缺氧缺血后 0.5 h 和 2 h, Bim 蛋白表达量比假手术组分别增加 1.3 倍和 2.1 倍。上述研究结果表明, 缺氧缺血诱导了前凋亡蛋白 Bim

的表达, Bim 的早期表达增加可能与 FOXO3a 的核转位有关。同时, 本研究发现, Bim 蛋白表达与 FOXO3a 的核转位并非完全一致, 缺氧缺血后 24 h, FOXO3a 的核转位达高峰, 而靶基因 Bim 蛋白表达量低于基线水平, 其不一致的原因可能与 Bim 蛋白经泛素蛋白酶途径降解有关^[15-16]。

前凋亡蛋白 Bim 的活化是诱导神经元凋亡的启动因素之一^[17-18]。成年动物脑卒中模型研究发现, 大鼠大脑中动脉闭塞后 3 h, 缺血区神经元及少突胶质细胞 Bim 表达增高伴 Bim 转位至线粒体, 促进细胞色素 C 自线粒体释放, 活化凋亡蛋白 Caspase-9, 诱导神经细胞凋亡^[19]。为研究缺氧缺血后早期 Bim 表达增加是否与发育期神经元的凋亡相关, 本研究采用 TUNEL 染色法检测凋亡细胞。结果显示, TUNEL 阳性细胞于缺氧缺血后 4~8 h 增加, 24 h 达高峰, 随缺氧缺血时间延长, 细胞 AI 值增加, 24 h 达峰值。与神经细胞凋亡表达相比较, 前凋亡蛋白 Bim 的表达在缺氧缺血后 0.5 h 即出现明显增加, 2 h 达高峰, 早于神经细胞凋亡高峰出现时间。以上结果表明, 缺氧缺血诱导的前凋亡蛋白 Bim 表达增加可能与神经元凋亡有关。

综上, 本研究发现缺氧缺血促进新生大鼠大脑皮层核转录因子 FOXO3a 发生核转位, 诱导前凋亡蛋白 Bim 表达增加, Bim 表达增加与神经元凋亡有关。抑制 FOXO3a 核转位可能成为治疗新生儿 HIE 的一个新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 20(23): 8969-8982.
- [2] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [3] Xiong T, Tang J, Zhao J, Chen H, Zhao F, Li J, et al. Involvement of the Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway in axonal injury after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rat[J]. *Neuroscience*, 2012, 216(2): 123-132.
- [4] Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia[J]. *NeuroRx*, 2004, 1(1): 17-25.
- [5] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2009, 40(5): e331-e339.
- [6] Lam EW, Francis RE, Petkovic M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate[J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 5): 722-726.
- [7] Santo EE, Stroeken P, Sluis PV, Koster J, Versteeg R, Westerhout EM. FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT

- signaling in aggressive neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2189-2198.
- [8] Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N. FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(5-6): 752-760.
- [9] Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2479-2487.
- [10] Monsalve M, Olmos Y. The complex biology of FOXO[J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(9): 1322.
- [11] Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(2): 83-97.
- [12] Hagberg H, Ichord R, Palmer C, Yager JY, Vannucci SJ. Animal models of developmental brain injury: Relevance to human disease. A summary of the panel discussion from the Third Hershey Conference on Developmental Cerebral Blood Flow and Metabolism[J]. *Dev Neurosci*, 2002, 24(5): 364-366.
- [13] Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span[J]. *Cell*, 2006, 125(5): 987-1001.
- [14] Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons[J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(4): 613-622.
- [15] Meller R, Cameron JA, Torrey DJ, Clayton CE, Ordonez AN, Henshall DC, et al. Rapid degradation of Bim by the ubiquitin-proteasome pathway mediates short-term ischemic tolerance in cultured neurons[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(11): 7429-7436.
- [16] Meller R. The role of the ubiquitin proteasome system in ischemia and ischemic tolerance[J]. *Neuroscientist*, 2009, 15(3): 243-260.
- [17] Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, et al. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis[J]. *Neuron*, 2001, 29(3): 615-628.
- [18] Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, Ma C, Thiel G, et al. Egr-1 transactivates Bim gene expression to promote neuronal apoptosis[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(13): 5032-5044.
- [19] Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y. Temporal profiles of the subcellular localization of Bim, a BH3-only protein, during middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(7): 810-820.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

“国际儿科肾脏病学会培训中心（中国 - 北京 / 香港）” 招募学员通知

2010 年 4 月北京大学第一医院儿（肾）科联合香港玛嘉烈医院青少年部被国际儿科肾脏病学会（International Pediatric Nephrology Association, IPNA）正式批准为中国首家国际儿科肾脏病学会培训中心（IPNA Training Center），中心主任为丁洁教授（北京）。按照 IPNA 规定，学员在培训中心经过系统培训期满后，经中心评估、IPNA 审查后可以获得“IPNA Fellow”的称号，并享有 IPNA 给予的如下待遇：（1）获得 IPNA 颁发的“IPNA Fellow”证书；（2）获得 IPNA 赠送的一部 Pediatric Nephrology 专著；（3）由 IPNA 资助（免会议注册费，提供交通费和住宿费）参加一次亚洲或国内学术会议、或继续医学教育（CME）课程。

IPNA 培训中心（中国 - 北京 / 香港）将于 2014 年继续招收培训学员，预计招收 2-4 名学员，培训时间约 9 个月（部分培训在香港玛嘉烈医院青少年部进行）；IPNA 将资助学员在培训期间的食宿费用、学员所在地至北京及北京至香港的往返机票。

申请者条件：医学本科以上学历、有儿内科执业医师证书并有三年以上儿科临床工作经验、有一定英语基础的儿科医生。

申请程序：（1）申请者将个人简历（包括性别、年龄、学历、职称、英语水平以及肾脏领域的医、教、研经历和联系方式等）、所在单位（科室）负责人和一位正高级职称医师的书面推荐信寄往北京大学第一医院儿（肾）科，请在简历中表明申请目的，如本人或本单位的发展规划，希望借助培训达到的目标等；（2）IPNA（中国 - 北京 / 香港）培训中心将对申请者材料进行审核；（3）获准学员的资料将被报送 IPNA 备案；（4）由 IPNA（中国 - 北京 / 香港）培训中心通知被批准学员具体事宜。

申请材料邮寄地址：北京市西城区西安门大街 1 号，北京大学第一医院儿科（信封外面标注“IPNA 培训中心”字样）；邮编 100034；收件人钟旭辉医师。申请截止日期为 2014 年 2 月 15 日。

联系人：钟旭辉医师；联系电话：010-83572168；Email: xuhui7876@126.com。

北京大学第一医院儿（肾）科
2013 年 10 月 15 日