

胆红素脑病仔鼠脑组织 S-100 的 mRNA 及其蛋白变化研究*

姜志梅¹ 孙爱萍² 陈炳坤³

摘要 目的:观察胆红素脑病仔鼠脑组织 S-100 蛋白(S-100)的 mRNA 及其蛋白变化,探讨其对胆红素脑病的诊断价值和其分子生物学机制。方法:采用新生 7d 龄清洁级 Wistar 大鼠腹腔注射胆红素 200mg/kg 制备胆红素脑病模型。应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术动态观察胆红素脑病仔鼠不同时间点脑组织 S-100 mRNA 表达变化;应用免疫组织化学方法动态观察不同时间点脑组织 S-100 蛋白表达变化。结果:实验组脑组织 S-100 mRNA 表达 12h 明显升高,48h 达峰值,至 96h 与对照组差异无显著性意义;造模后 12h 海马区脑组织 S-100 阳性表达明显升高,48h 达峰值,至 96h 与对照组无显著性差异;皮质区 6h 明显升高,48h 达峰值,至 96h 与对照组差异无显著性意义;丘脑区 6h 明显升高,72h 下降,至 96h 与对照组无显著性差异;苍白球区 6h 明显升高,48h 达峰值,72h 下降,至 96h 与对照组比较仍有显著性差异。结论:S-100 mRNA 的变化同 S-100 蛋白的变化趋势一致,是判定胆红素脑病的可靠神经生化指标。

关键词 仔鼠;胆红素脑病;神经组织蛋白质 S-100

中图分类号:R493.R722 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-12-1065-03

S-100 mRNA and protein expression in offspring rats brain tissue with bilirubin encephalopathy/JIANG Zhimei,SUN Aiping, CHEN Bingkun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(12):1065—1067

Abstract Objective: To observe the dynamic changes of S-100 mRNA and protein expression bilirubin encephalopathy offspring rats. **Method:** RT-PCR was used to analyze the dynamic changes of S-100 mRNA at 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h in offspring rats brain tissue with bilirubin encephalopathy. Immunohistochemistry was used for evaluation of S-100 protein expression at 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h. **Result:** The expressions of S-100 mRNA were significantly increased in offspring rats brain tissue with bilirubin encephalopathy within 12h and reached peak value at 48h compared with the control groups and then gradually decreased. The expressions of S-100 protein in hippocampus were significantly increased from 12h to 72h compared with the control group and reached peak value at 48h and then gradually decreased. The expressions of S-100 protein in cerebral cortex were significantly increased from 6h to 72h, and reached peak value at 48h and gradually decreased afterward. The expressions of S-100 protein in thalamic and pallidus were significantly increased from 6h to 72h compared with the control groups, and reached peak value at 48h and then gradually decreased. **Conclusion:** The changes trends of S-100 mRNA were identical to those of S-100 protein; S-100 may reflect the degree of injury of neuroglialocyte. It might be a reliable index to detect bilirubin encephalopathy.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Jiamusi University, Jiamusi, 154002

Key words offspring rats; bilirubin encephalopathy; nerve tissue protein S-100

胆红素脑病(bilirubin encephalopathy)是新生儿黄疸所致的最严重的并发症,寻找能早期判断胆红素脑病严重程度的特异性标志物有十分重要的临床意义。已有资料报道中枢神经系统损伤时脑脊液、血液 S-100 蛋白(S-100 protein, S-100)浓度变化可作为脑损伤的敏感性和特异性标记物。本研究对胆红素脑病仔鼠脑组织 S-100 mRNA 及其蛋白表达的变化进行动态观察,进而早期真实地反映神经胶质细胞的损伤状况,并探讨其分子生物学机制,为胆红素脑病防治的临床研究奠定基础。

1 对象与方法

1.1 实验动物与分组

新生 7d 龄清洁级 Wistar 大鼠 120 只,平均体重 14 ± 2 g,为自然分娩,雌雄不拘,由佳木斯大学实

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(10551313)

1 佳木斯大学康复医学院/佳木斯大学儿童神经康复实验室,佳木斯市德祥街 419 号,154002

2 北京同仁医院康复科

3 佳木斯大学康复医学院特聘教授

作者简介:姜志梅,女,医学硕士,教授,主任医师

收稿日期:2006-09-18

验动物中心提供。将实验动物随机分为对照组(60只)和实验组(60只),每组再按6个时间点(6h,12h,24h,48h,72h,96h)分为6组,各组均为10只仔鼠。

1.2 方法

1.2.1 胆红素溶液的配制及模型制作: 避光称取胆红素,每50mg胆红素溶于1ml 0.5M NaOH中,加入双蒸水9ml,用0.5M HCl调至pH8.5,并在1h内使用。实验组仔鼠给予腹腔注射胆红素200mg/kg,对照组仔鼠给予腹腔注射生理盐水0.5ml,所有仔鼠于恒湿、避光环境中自然哺育至所需时间点。

1.2.2 标本采集: 对照组和实验组分别在腹腔注射生理盐水和胆红素后6个时间点(6h,12h,24h,48h,72h,96h),断头处死采取脑组织,将脑组织矢状缝切开,一侧迅速放入液氮中冷冻保存,以备S-100 mRNA水平表达变化检测;另一侧放入-4℃10%福尔马林溶液中固定以备S-100蛋白水平表达检测。

1.2.3 脑组织总RNA的提取: 取大脑组织50—100mg置入1.5ml EP管,加入1ml Trizol振荡,室温放置5min使样品充分裂解;加入0.2ml氯仿猛烈晃动15s,室温静置2—3min离心取上清;加入0.5ml异丙醇,颠倒数次混匀,室温沉淀10min,离心弃上清;加入DEPC酒精,再离心弃上清,待RNA略干后加入30μl DEPC水溶解,60℃孵育10min,用核酸蛋白分析仪检测OD260/280,确定RNA纯度及浓度。

1.2.4 逆转录反应(CDNA)的合成: 反应体系为提取的总RNA1μl,Oligo1μl,MgCl₂4μl,10×RNA buffer2μl,dNTP1μl,RNase inhibitor0.5μl,AMV(5U/μl)1μl,ddH₂O9.5μl,总体积20μl。在超净工作台中预混上述溶液于EP管中,1000r/min离心1min;放入PCR仪中,按30℃,10min→45℃,60min→99℃,5min→5℃,5min条件转录。

1.2.5 PCR扩增: 根据NCBI Genebank中大鼠S-100的基因序列引物设计如下:

S-100上游引物:5'-GAG CTG GAG AAG GCC ATG GTT G-3'(262bp)下游引物:5'-TCA AAG AAC TCA TGA CAG GCT GTG G-3'

β-actin,上游引物:5'-ACA TCA GTG AAG AGG AGC TG-3'(385bp)下游引物:5'-ACA AGA TGA CCA ATT GTCGTG-3'

取各实验组逆转录产物5μl,按以下条件进行扩增:①94℃预变性4min;②94℃变性30s;③S-100 55℃解链45s,其β-actin 54℃解链45s;④72℃退变45s;⑤返回反应2,进行29个循环,最后一个循环72℃延伸7min。

1.2.6 PCR产物检测: PCR扩增产物5μl和上样缓冲液0.3μl点样于1%琼脂糖凝胶后,50V电泳2h后照相。用凝胶成像系统扫描,测定光并计算S-

100/β-actin光密度比值。

1.2.7 S-100免疫组织化学检测: 按照SABC试剂盒操作,采用OLYMPUS多功能显微镜系统及摄像装置采图,每张切片于镜下随机选取3个视野计数阳性细胞,棕黄色为阳性表达。

1.3 统计学分析

数据结果以均数±标准差表示,采用SPSS10.0统计软件进行统计,两样本均数比较采用t检验,多个样本均数比较采用F检验。

2 结果

2.1 脑组织S-100 mRNA表达的动态变化

造模后脑组织S-100 mRNA表达6h开始升高,12h明显升高,48h达峰值,72h下降,96h与对照组比较无显著性差异。见表1。电泳结果见图1。

组别	对照组		实验组		P'
	动物数	S-100 mRNA	动物数	S-100 mRNA	
6h	9	0.89±0.09	10	0.99±0.14	<0.05
12h	10	0.92±0.13	7	1.11±0.07	<0.05
24h	8	0.92±0.06	8	1.23±0.14	<0.01
48h	9	0.94±0.09	7	1.42±0.12	<0.01
72h	8	0.85±0.08	6	1.02±0.11	<0.01
96h	8	0.83±0.13	6	0.93±0.11	>0.05
<i>F</i>		1.49		15.63	
<i>P</i>		>0.05		<0.01	

262bp
385bp
500pb

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
1—6 分别为 S-100 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h 的结果
7—12 为其 β-actin 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h 的结果

图1 实验组S-100与其β-actin PCR扩增电泳图

2.2 脑组织S-100阳性表达的动态变化

2.2.1 海马、皮质区S-100阳性表达的动态变化: 造模后12h海马区脑组织S-100阳性表达明显升高,48h达峰值,72h下降,至96h与对照组比较无显著性差异。皮质区脑组织S-100阳性表达6h明显升高,48h达峰值,72h下降,至96h与对照组比较无显著性差异。见表2,图2(见前置彩色插页8)。

2.2.2 丘脑、苍白球区S-100阳性表达的动态变化: 造模后6h丘脑区脑组织S-100阳性表达明显升高,72h下降,96h与对照组比较无显著性差异。苍白球区脑组织S-100阳性表达6h明显升高,48h达峰值,72h下降,至96h与对照组比较仍有显著性差异。见表3。

表2 海马、皮质区S-100阳性细胞表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$,个)

组别	动物数	海马区			皮质区		
		对照组	实验组	P	对照组	实验组	P
6h	9	48.44±3.00	51.04±4.56	>0.05	16.33±4.00	22.67±4.12	<0.01
12h	9	46.44±4.45	53.70±3.89	<0.01	17.63±4.64	24.33±3.95	<0.01
24h	8	47.63±7.22	56.37±5.17	<0.05	17.62±6.38	29.87±5.17	<0.01
48h	8	46.67±9.33	61.54±4.96	<0.05	17.00±5.95	36.12±7.15	<0.01
72h	8	43.00±8.59	52.12±4.41	<0.05	17.50±5.19	26.12±4.55	<0.01
96h	8	43.71±13.26	51.25±8.40	>0.05	18.37±5.04	22.42±2.81	>0.05
F		0.58	4.59		0.15	9.95	
P		>0.05	<0.01		>0.05	<0.01	

表3 丘脑、苍白球区S-100阳性细胞表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$,个)

组别	动物数	丘脑区			苍白球区		
		对照组	实验组	P	对照组	实验组	P
6h	9	39.55±4.09(9)	52.89±5.78(9)	<0.01	20.78±2.29(9)	32.56±2.99(9)	<0.01
12h	9	42.00±6.42(9)	52.93±5.14(9)	<0.01	22.00±5.83(9)	34.78±6.40(9)	<0.01
24h	8	42.12±4.86(8)	53.87±5.71(8)	<0.01	22.13±6.49(8)	34.00±3.49(8)	<0.01
48h	8	38.54±8.51(8)	56.38±4.76(8)	<0.01	22.75±8.90(8)	7.37±5.64(8)	<0.01
72h	8	40.50±5.53(8)	52.88±4.93(8)	<0.01	22.25±5.26(8)	33.12±4.35(8)	<0.01
96h	8	37.38±7.43(8)	42.50±3.88(8)	>0.05	25.88±5.39(8)	31.25±2.22(8)	<0.05
F		0.75	7.13		0.69	14.29	
P		>0.05	<0.01		>0.05	<0.01	

3 讨论

S-100蛋白是一种神经组织蛋白,由 α 、 β 两个亚单位组成, β 亚单位具有高度神经特异性,表现为三种不同的形式,S-100B蛋白水平的变化可反映星形胶质细胞损伤的严重程度^[1]。

本研究显示,造模后脑组织S-100 mRNA表达12h明显升高,48h达峰值,72h下降,至96h与对照组比较无显著性差异。海马区脑组织S-100阳性表达,12h明显升高,皮质区6h明显升高,48h均达峰值,72h下降,至96h与对照组比较无显著性差异。丘脑区6h明显升高,72h下降,至96h与对照组比较无显著性差异。苍白球区6h明显升高,48h达峰值,72h下降,至96h与对照组比较仍有显著性差异。S-100 mRNA表达同其蛋白变化趋势一致。分析其升高原因可能与胆红素对神经细胞的毒性机制有关。胆红素进入脑组织后,影响神经传导细胞上 Na^+-K^+ -ATP酶的活力,致使 Na^+-K^+ 耦联障碍,神经元对冲动的反应性降低,神经传导延长。同时依赖 Na^+-K^+ 泵供能的 $3\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 耦联障碍, Ca^{2+} 在细胞内堆积。随脑组织中胆红素绝对量的增加,突触膜 Na^+-K^+ -ATP酶活力明显下降,两者呈直线负相关,说明胆红素对 Na^+-K^+ -ATP酶具有抑制作用,抑制程度的大小与胆红素的量有关^[2]。

S-100B蛋白被认为是一种钙传感器蛋白,在细胞增殖、分化、能量代谢、传导胞内信号及细胞凋亡中发挥重要作用^[3-4]。体外实验证明S-100B蛋白多通过与钙结合发挥其生理作用^[5]。其能激活脑果糖1,6-磷酸醛缩酶和葡萄糖磷酸变位酶,从而调节细胞的能量代谢;脑内生理量的S-100B蛋白主要由星形细胞产生,作用于神经元及其生长环境,成为胶质细胞和神经元之间相互作用的桥梁。因此,胆红素

脑病时,脑组织S-100水平的升高原因:^①其转录、翻译水平增高。脑损伤时,大量S-100释放到脑脊液和血液中,促使脑组织S-100 mRNA代偿性表达增加,进而其转录、翻译的蛋白增加,以修复损伤组织,且随损伤程度不同,S-100 mRNA表达水平亦不同。^②神经星形胶质细胞过度增生、活化,其合成、分泌的S-100蛋白增多。当CNS损伤后,会出现反应性神经星形胶质细胞的增生和肥大,以及胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)的合成和大量堆积。GFAP是胶质细胞的中间丝蛋白,是神经星形胶质细胞最重要的细胞骨架成分,其含量或结构的改变会引起神经星形胶质细胞的形态和功能改变,S-100B本身也促进神经星形胶质细胞的增生和肥大,提高GFAP的水平,从而形成正反馈的放大效应^[6-7]。S-100水平的升高促进神经的生长和修复,可反映神经星形胶质细胞损伤严重程度,是判定胆红素脑病的可靠神经生化指标。

参考文献

- Lamers KJ, Vos P, Verbeek MM, et al. Protein S-100 β , neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients [J]. Brain Res Bull, 2003, 61(3):261—264.
- 周艳,陈吉庆,邵小松.高胆红素血症新生大鼠脑组织 Na^+-K^+ -ATP酶活力的研究[J].中国当代儿科杂志,2001,3(6):636—638.
- Michetti F,Gazzolo D. S100B protein in biological fluids:a tool for perinatal medicine[J]. Glin Ghem, 2002, 48(2): 2097—2104.
- 李守霞,邓群颖,赵瑞月,等.S100-B蛋白检测对神经系统损伤早期诊断临床应用进展[J].中国误诊学杂志,2002,2(8):1156—1158.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins [J]. Microse Res Tech,2003,60(6):540—551.
- Kim JS, Yoon SS, Kim YH, et al. Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke[J]. Stroke, 1996, 27:1553—1557.
- Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson MP. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation [J]. Brain Res, 1995, 677:167—170.