

眼镜蛇毒对大鼠丘脑腹后外侧核 c-fos、c-jun 蛋白表达的影响^①

刘敏,赵健,熊克仁^②

(皖南医学院解剖学教研室,安徽 芜湖 241001 E-mail:89397329@qq.com)

摘要:目的 探讨眼镜蛇毒对大鼠丘脑腹后外侧核(VPL)c-fos、c-jun 蛋白表达的影响。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、生理盐水组和眼镜蛇毒组,每组 8 只。眼镜蛇毒按 0.5 μl/kg 注入大鼠左后肢外侧复制蛇伤模型,观察 30 min 后处死,采用免疫组织化学方法,检测 VPL 的 c-fos、c-jun 的表达。结果 眼镜蛇毒组大鼠 VPL 区 c-fos、c-jun 免疫阳性细胞数量及表达强度与正常对照组和生理盐水组比较均显著增高($P < 0.05$)。结论 眼镜蛇毒组大鼠 VPL 区的 c-fos 和 c-jun 表达显著增加,可能参与了眼镜蛇毒神经毒性的病理过程。

关键词: 眼镜蛇毒;丘脑腹后外侧核;c-fos;c-jun

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2015)03-0363-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.03.006

The effects of cobra venom on expression of c-fos and c-jun protein in ventral posterolateral thalamic nucleus of rats

Liu Min,Zhao Jian,Xiong Keren

(Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China

E-mail:89397329@qq.com)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Naja (N. atra, Chinese cobra) venom on the expression of c-fos and c-jun protein in ventral posterolateral thalamic nucleus(VPL) of rats. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into groups of normal control, normal saline and Naja venom (n=8 for each group). Rat poisoning models were developed by injection of the crude venom of cobra at dosage of 0.5 μl/kg via left posterolateral limb, and killed 30 minutes after observation. An immunohistochemistry technique was used to measure the expression of c-fos and c-jun in VPL. **Results** The number of c-fos and c-jun immuno-positive cells in the VPL of rats intervened with Naja venom group was increased and more intensively expressed as compared with those from the control and normal saline groups($P < 0.05$).

Conclusion The c-fos and c-jun expression were up-regulated in VPL of rats treated with Naja venom, suggesting that these proteins may be involved in the pathological process of neurotoxicity of Naja venom.

Key words: cobra venom; ventral posterolateral thalamic nucleus;c-fos;c-jun

眼镜蛇是我国剧毒蛇中分布最广的蛇种之一,其毒素是以神经毒素为主的混合毒素。一旦咬伤,局部出现剧烈疼痛,肿胀明显,以及全身多器管功能衰竭,目前仍是医学界治疗难题之一^[1]。c-fos 和 c-jun 基因均是即刻早基因的成员,在中枢神经系统广泛分布,正常情况下,有着低水平的表达,在受到伤害性刺激后,表达立即增加,因此,可作为中枢神经系统对伤害性刺激反应的标志物^[2]。丘脑腹后外侧核(ventral posterolateral thalamic nucleus, VPL)是丘脑核团之一,是痛觉传导通路上的重要中继站,可接受脊髓灰质后角 Rexed 第 IV~VI 板层的纤维投射,将痛觉、触觉及伤害性刺激等信息上传至大脑皮层 SI 区,从而在痛觉的调发挥重要作用^[3]。本实验旨在探讨眼镜蛇毒中

毒后大鼠 VPL 区 c-fos、c-jun 表达变化,为临床节中治疗提供一些动物实验研究的形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只成年 SD 大鼠,雌雄不限,体重 250 g 左右,由皖南医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 眼镜蛇毒(干毒)由安徽省黄山市屯溪县毒蛇养殖研究所提供,c-fos 抗体和 c-jun 抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及蛇伤动物模型的建立 将 24 只 SD 大鼠随机分成 3 组,眼镜蛇毒组、生理盐水组和正常对照组,每组 8 只。眼镜蛇毒组:大鼠左后肢外侧常

① 基金项目:皖南医学院中青年科研基金(WK200929)

② 通讯作者,E-mail:xkrn@sohu.com

规消毒后,将干粉状眼镜蛇毒与生理盐水按 1 : 3 稀释,按 0.5 μl/kg 量于左后肢外侧肌肉注射,观察 30 min 后,发现眼镜蛇毒组大鼠左后肢红肿,烦躁不安,嘴唇和四肢紫绀,呼吸困难等明显中毒症状即确定模型成功;生理盐水组:在相同部位注入等量生理盐水;正常对照组不作任何处理。

1.2.2 免疫组织化学染色法 用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,暴露心脏,经左心室一升主动脉插管 4% 甲醛灌注固定。取丘脑节段放入 4%多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,组织切片,片厚 5 μm,切片脱蜡脱水后,滴加新鲜配制的 0.3% H₂O₂ 室温(18 ~ 25 °C)7 ~ 12 min;微波修复,高火加热 2 min,低火 12 min,自然冷却;滴加封闭液(37 °C)1 h,不洗;滴加兔抗 c-fos 抗体(1 : 150)、兔抗 c-jun 抗体(1 : 1200)4 °C 过夜;37 °C 复温,滴加生物素化羊抗兔 IgG(37 °C)2 h;滴加 SABC(37 °C)1 h;DAB 显色 10 ~ 30 min;以上各步骤之后均用 0.02 MPBS 洗 5 分/次 × 3 次。流水冲洗阻断反应。常规脱水、透明、封片。

1.2.3 图片分析 每只大鼠选取相同冠状切面切片各 2 张,参照王平宇的脑切片图谱,定位后利用黑马病理图像分析系统对每张切片相同区域在高倍(400 倍)视野下进行细胞计数和细胞平均灰度值测量。平均灰度值降低说明表达增强,反之,减弱。

1.3 统计学方法 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 18.0 统计软件对结果进行统计学分析。多组间比较采用 F 检验,组间两两比较采用 q 检验,以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

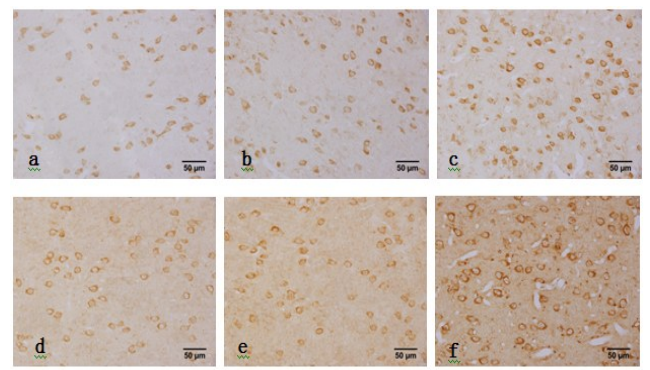
2 结果

免疫组织化学结果显示,c-fos、c-jun 免疫阳性产物呈棕黄色颗粒状,主要表达于细胞膜及胞浆。正常对照组、生理盐水组和眼镜蛇毒组 VPL 区均可见 c-fos、c-jun 免疫阳性细胞,细胞轮廓清晰,呈圆形或椭圆形。三组 VPL 区 c-fos、c-jun 免疫阳性细胞数量及平均灰度值比较差异均有统计学意义($F_{c-fos} = 250.79, P < 0.01; F_{c-jun} = 63.08, P < 0.01; F_{c-fos} = 93.82, P < 0.001; F_{c-jun} = 40.63, P < 0.001$)。生理盐水组 VPL 区 c-fos、c-jun 免疫阳性细胞数量及平均灰度值与正常对照组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$);眼镜蛇毒组 VPL 区 c-fos、c-jun 免疫阳性细胞数量与正常对照组和生理盐水组比较明显增多($P < 0.05$),染色变深,平均灰度值明显降低($P < 0.05$),见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠 VPL 的 c-fos、c-jun 阳性细胞数及平均灰度值($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	c-fos		c-jun	
	细胞数(个/400 倍视野)	平均灰度值	细胞数(个/400 倍视野)	平均灰度值
正常对照组	57.75 ± 2.12	145.91 ± 7.75	63.63 ± 1.69	142.92 ± 6.11
生理盐水组	58.63 ± 1.85	144.07 ± 6.35	63.50 ± 2.45	138.1 ± 7.11
眼镜蛇毒组	78.63 ± 2.33 ^a	116.41 ± 1.88 ^a	75.75 ± 1.98 ^a	119.41 ± 1.79 ^a

注:与正常对照组比较,a: P < 0.05



a 为正常对照组 c-fos 蛋白的表达;b 为生理盐水组 c-fos 蛋白的表达;c 为眼镜蛇毒组 c-fos 蛋白的表达;d 为正常对照组 c-jun 蛋白的表达;e 为生理盐水组 c-jun 蛋白的表达;f 为眼镜蛇毒组 c-jun 蛋白的表达

图 1 正常对照组、生理盐水组和眼镜蛇毒组大鼠丘脑腹后外侧核 c-fos 和 c-jun 蛋白的表达(SABC 法 × 400)

3 讨论

眼镜蛇毒是由眼镜蛇的毒腺分泌的一种天然毒性物质,其中含有神经毒素和细胞毒素。当人被眼镜蛇咬伤后,毒液经血液和淋巴传送,迅速与神经突触结合,导致细胞溶解、神经细胞信息传导阻滞,从而影响正常的神经细胞功能。即刻早期基因 c-fos 和 c-jun,生理情况下,在神经细胞中可有基础水平的表达,主要参与神经细胞的生长、分化和信息传递等过程,当神经细胞受到伤害性刺激后,表达明显增加,这与中枢神经系统损伤后的病理过程有着密切关系^[4]。c-fos 蛋白是神经细胞受损程度的标记物,表达水平的高低,能间接反映神经元的损害程度^[5]。本研究结果显示,与正常组或生理盐水组比较,眼镜蛇毒组大鼠 VPL 区 c-fos 和 c-jun 阳性细胞数明显增加且平均灰度值明显下降,提示 c-fos 和 c-jun 表达显著增强,说明眼镜蛇毒可导致神经细胞不同程度的功能损伤。当神经细胞受到外界刺激后,兴奋性氨基酸或 NMDA 受体等被激活,导致细胞内钙离子浓度的增加激活 Ca²⁺ - 磷脂依赖性蛋白激酶途径,进而快速诱导 c-jun 和 c-fos 转录,使其细胞浆中的 mRNA 数量快速增加,翻译出的 Fos 和 Jun 蛋白进入胞核内并形成异源(Fos/Jun)或同源(Fos/Jun)二聚体,与基因中的转录因子-1(AP-1)调节位点结合,从而进一步激活靶基因,使神经元的结构与功能出现改变^[6-7]。资料报道,c-fos、c-jun 都是促凋亡基因,脑损伤动物实验进行 c-fos、c-jun 基因表达与凋亡神经元在时程、分布和数量上的相关性分析,发现 c-fos 和 c-jun 高表达区域与细胞凋亡区域一致,提示 c-fos 和 c-jun 的表达可能在脑损伤导致细胞凋亡的过程中起一定调控作用^[8]。本实验中眼镜蛇毒组大鼠 VPL 区 c-fos 和 c-jun 的高表达是否参与了眼镜蛇毒中毒后引起的细胞凋亡过程的调控,有待于进一步的研究。

大鼠的 VPL 是传导外周神经疼痛的核团之一,当外周神经末梢受到刺激时,此信息经痛觉传入纤维传至脊神经节,再经脊髓丘脑侧束、脊髓丘系传至 VPL,

(下转第 367 页)

者接受 PKP 手术治疗前,完善实验室检查,排除了出血倾向或无法纠正的凝血功能障碍的病例,从而避免出现出血或局部血肿的情况。

在本组研究中,我们对 21 例共 50 个病椎的转移瘤进行 PKP 手术治疗,手术后的疼痛缓解以及功能恢复情况较手术前差异有统计学意义,证明手术获得较理想的效果,能够很快缓解患者痛楚以及改善部分其生活质量。综上所述,PKP 适用于高 Tomita 评分的脊柱转移瘤患者,手术安全、可靠。采用本手术方式治疗,可以使无法耐受全麻或常规切开手术的晚期脊柱转移瘤患者得到合理的医治,减轻患者疼痛、恢复病椎强度及稳定性,改善患者活动功能,提高其生活质量。

参考文献:

- [1] 燕太强,郭卫. 脊柱转移瘤的微创外科治疗进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(3): 244-247.
- [2] Tomita K, Kawahara N, Kobayashi T, et al. Surgical strategy for spinal metastases [J]. Spine, 2001, 26(3): 298-306.
- [3] Calmels V, Vallee JN, Rose M, et al. Osteoblastic and mixed spinal metastases: evaluation of the analgesic efficacy of percutaneous vertebroplasty [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2007, 28(3): 570-574.
- [4] Gerszten PC. The role of minimally invasive techniques in the management of spine tumors: percutaneous bone cement augmentation, radiosurgery, and microendoscopic approaches [J]. Orthop Clin North Am, 2007, 38(3): 441-450.
- [5] Oken MM, Creech RH, Toney DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group [J]. Am J Clin Oncol, 1982, 5(6): 649-655.
- [6] Kilmo P, Schmidt MH. Surgical management of spinal metastases [J]. Oncologist, 2004, 9(2): 188-196.
- [7] 中华医学会骨科学分会骨肿瘤学组. 骨转移瘤外科治疗专家共识[J]. 中华骨科杂志, 2009, 29(12): 1177-1184.
- [8] 杨明, 邓忠良. 椎体成形缓解脊柱转移瘤疼痛研究进展 [J]. 重庆医学, 2014, 43(16): 2083-2086.
- [9] Fourney DR, Schomer DF, Nader R, et al. Percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty for painful vertebral body fractures in cancer patients [J]. Journal of Neurosurgery Spine, 2003, 98(1): 21-30.
- [10] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Katonis PG, et al. Percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty for the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures and osteolytic tumours [J]. Journal of Bone & Joint Surgery (Br), 2005, 87(12): 1595-1604.
- [11] Singh K, Samartzis D, Vaccaro AR, et al. Current concepts in the management of metastatic spinal disease: the role of minimally-invasive approaches [J]. Journal of Bone & Joint Surgery (Br), 2006, 88(4): 434-442.
- [12] 燕太强, 郭卫, 杨荣利, 等. 骨水泥椎体成形在治疗脊柱转移瘤中的临床应用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2012, 22(4): 318-323.

收稿日期:2015-04-08;修回日期:2015-05-20

(上接第 364 页)

最后投射到大脑皮层感觉区,产生痛觉。各种伤害性刺激如疼痛、创伤等传入脊髓后,痛感受神经元被激活,启动原癌基因 *c-fos* 合成 Fos 蛋白,进而导致痛觉的发生^[9]。最近研究显示,减少 *c-fos*、*c-jun* 的表达,可抑制痛觉信息的传递^[10]。本实验对大鼠注射眼镜蛇毒造成一种伤害性刺激,通过免疫组化观察到,眼镜蛇毒可以上调大鼠 VPL 区 *c-fos* 和 *c-jun* 的表达,提示眼镜蛇毒可能通过上调 VPL 区的 *c-fos* 和 *c-jun* 表达从而在伤害性信息的传导过程中发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Simpson ID, Norris RL. Snakes of medical importance in India: is the concept of the "Big 4" still relevant and useful [J]. Wilderness Environ Med, 2007, 18(1): 2-9.
- [2] Wei Zheng, Lijian Niu, Chunpu Zhang, et al. Brain edema and protein expression of *c-Fos* and *c-Jun* in the brain after diffused brain injury [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(6): 2809-2817.
- [3] 梁思泉. VPL/VPM 联合 PAG/PVG 脑深部电刺激治疗神经性疼痛的疗效分析[J]. 中华神经外科杂志, 2012, 28(8): 802-805.
- [4] Ichikawa H, Kano M, Shimizu Y, et al. Increase of *c-Fos* and *c-Jun* expression in spinal and cranial motoneurons of the degenerating muscle mouse (*Scn8a(dmu)*) [J]. Cell Mol Neurobiol, 2010, 30(5): 737-742.
- [5] Gao YJ, Ji RR. *c-Fos* and *pERK*, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury [J]. Open Pain J, 2009, 2: 11-17.
- [6] Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions [J]. Learn Mem, 2007, 14(11): 758-770.
- [7] 何绘敏, 王滨, 马晓凯, 等. Morris 水迷宫训练后即早基因 *c-Fos* 及 *c-Jun* 在大鼠丘脑前核的表达 [J]. 解剖科学进展, 2012, 18(3): 255-258.
- [8] Zhang L, Yang YJ, YU SZ, et al. Apoptosis and altered expression of *c-fos* following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Stroke and Nervous Diseases, 2000, 7(2): 71-74.
- [9] HUI LI, QING LI, KELIANG XIE, et al. Expression of *c-Fos* and *c-Jun* in adjacent cervical spinal cord segments following C7 nerve root rhizotomy in rats: Indication of a neural pathway between adjacent cervical spinal cord segments [J]. Exp Ther Med, 2013, 6(2): 373-377.
- [10] 刘斌, 符艳松, 王彩霞. 头痛宁胶囊对偏头痛模型大鼠中脑和下丘脑 *c-fos*、*c-jun* 基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 195-198.

收稿日期:2014-08-04;修回日期:2014-10-22