

# IGF-1 对缺氧缺血性脑损伤新生小鼠脑细胞线粒体 Cyt-C、caspase-3 表达的影响

陈琪<sup>1</sup>, 步仰高<sup>2</sup>, 王杨<sup>1</sup>, 陈志武<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 对缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 新生小鼠脑细胞线粒体细胞色素 C (Cyt-C)、caspase-3 表达的影响。方法 108 只新生 C57/BL 小鼠随机分为正常对照组、缺氧缺血 (HI) 组和 HI + IGF-1 组, 改良 Rice 法制作新生小鼠右脑 HIBD 模型。HI + IGF-1 组于 HI 后即刻予腹腔注射 IGF-1 (50  $\mu$ g/kg), HI 组及正常对照组注射等量的生理盐水。应用 Western blot 和 RT-PCR 法检测各组皮质、海马、丘脑 0、3、6、12、24 和 48 h Cyt-C、caspase-3 蛋白和 mRNA 表达。结果 ① HI 组 Cyt-C、caspase-3 mRNA 及蛋白表达明显增加出现在皮质术后 3 h, 海马术后 6 h, 丘脑出现在术后 12 h, 明显迟于皮质及海马; ② HI + IGF-1 组 Cyt-C、caspase-3 mRNA 及蛋白表达在 HI 组表达明显增加的相应时间点虽较正常对照组升高, 但较 HI 组表达明显降低, 3 组之间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ③ HI 组皮质 Cyt-C、caspase-3 mRNA 及蛋白表达于术后 3 h 表达明显增加, 6 h 有所下降, 12 ~ 24 h 达到另一高峰, 峰值时间点 HI + IGF-1 组的表达较 HI 组均降低 ( $P < 0.05$ )。结论 IGF-1 可能通过抑制 Cyt-C 释放, 减少 caspase-3 表达, 发挥对新生小鼠 HIBD 的神经保护作用, IGF-1 对皮质的保护有两个时

间点。

**关键词** 缺氧缺血; 脑; 胰岛素样生长因子-1; 细胞色素 C; caspase-3; 小鼠; 新生

中图分类号 R 722.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1422-06

新生儿缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 是因围生期窒息导致脑的缺氧缺血性损害, 是新生儿死亡和神经功能后遗症的重要原因, 与成年后的智力、行为障碍密切相关。缺氧缺血 (hypoxic-ischemic, HI) 引起的脑细胞死亡存在复杂的凋亡机制, 且凋亡引起的损伤更严重<sup>[1]</sup>。caspase-3 是凋亡的关键效应蛋白, HI 时细胞线粒体功能受损, 胞质中 Cyt-C 释放入胞质从而激活 caspase-3 引起细胞凋亡。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一种多肽类神经营养因子, 与神经再生有密切关系。IGF-1 可增加 HI 后神经细胞的存活率, 抑制神经细胞凋亡, 对神经细胞有明显的保护作用<sup>[2-3]</sup>。目前关于 IGF-1 的研究多见于成年大鼠, 对新生小鼠 HIBD 神经保护作用的研究报道甚少, 尤其是外源性 IGF-1 的神经保护作用是否与其影响 Cyt-C 的表达有关的报道较少。该研究在 HIBD 模型基础上, 观察了 IGF-1 对 HIBD 后脑组织 Cyt-C、caspase-3 表达的影响, 同时探讨 IGF-1 对 HIBD 的神经保护作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物 新生 7 日龄 SPF 级 C57/BL 小鼠

2014-05-19 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (编号: 1308085MH150); 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2013A167)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院新生儿科, 合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学解放军临床学院妇产科, 合肥 230031

<sup>3</sup>安徽医科大学基础医学院药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈琪, 男, 硕士研究生;

王杨, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: w.yang126@126.com;

陈志武, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wzc-ziong@mail.hf.ah.cn

radiosensitivity. ③ Paeonol could enhance cell radiosensitivity and the sensitizing enhancement ratio (SER) was 1.092. ④ After exposure to 6 Gy X-ray for 48 h, the protein expression of COX-2 and Survivin was up-regulation ( $P < 0.01$ ). On the contrary, pretreatment (using 3.91, 7.81, 15.63 mg/L Paeonol) combined with radiation reduced the protein expression of COX-2 and Survivin in varying degrees, showing significant differences ( $P < 0.01$ ), except the protein expression of COX-2 at 3.91 mg/L. The down-regulation of the two protein expression was positively correlated ( $r = 0.955$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Paeonol improves radiosensitivity of human esophageal carcinoma cell line Eca-109 *in vitro*, perhaps by inhibiting the expression of COX-2 and Survivin.

**Key words** Paeonol; esophageal carcinoma; radiosensitivity; COX-2; Survivin

108 只 购自安徽医科大学实验动物中心,雌雄不限,体重 4.6~5.0 g 均由体格健壮的母鼠带养。

**1.2 主要的试剂与仪器** IGF-1、TRIzol 试剂购自瑞士 Roche 公司;CY-100 便携式数字测氧仪购自美国 Sigma 公司;一抗为兔抗小鼠 Cyt-C 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)和兔抗小鼠 caspase-3 抗体(CST 公司,美国);二抗为羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);RT-PCR 反转录试剂盒(天根生化科技有限公司)。

**1.3 实验动物分组、模型制备及 IGF-1 给药** 108 只小鼠编号后采用随机数字表法分为 3 组:正常对照组(36 只)、HI 组(36 只)、HI + IGF-1 组(36 只)。正常对照组仅游离右侧颈总动脉后缝合皮肤,不结扎,不行缺氧处理;HI 组小鼠用无水乙醚吸入麻醉后取仰卧位,四肢固定于小手术板上,安尔碘局部消毒后颈部正中切口,逐层分离皮下组织,找到右血管神经束,游离右侧颈总动脉,用 5/0 丝线双线永久性结扎,缝合皮肤后返回母鼠笼中恢复 2 h,然后置于 37 °C 恒温水浴的 1 L 自制有机玻璃缺氧舱中,以 1~2 L/min 的速度输入氧浓度为 8% 氮氧混合气体,持续缺氧 2 h,监测血氧浓度,此方法参照改良 Rice 法<sup>[4]</sup>;HI + IGF-1 组在 HI 后即刻给予腹腔注射 IGF-1 剂量为 50 μg/kg。HI 组和正常对照组予腹腔注射等体积生理盐水。3 组在 HI 后 0、3、6、12、24、48 h 6 个相应的时间点断头取脑( $n=6$ )。

**1.4 RT-PCR 检测大脑皮质、海马、丘脑 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA** 术后 0、3、6、12、24、48 h 取每组存活小鼠各 6 只,实验动物断头后剥离出脑组织,分离出左右大脑半球,取右脑半球,分别取大脑皮质、海马和丘脑组织,置于 DEPC 处理的 EP 管中剪碎脑组织,用液氮预冷的研钵将组织研磨成粉末状,用 TRIzol 法提取相应脑组织总 RNA,应用 RT-PCR 方法检测各组脑组织 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA。PCR 扩增条件:94 °C 2 min 预变性,95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s 为循环体,最后 72 °C 5 min,共 30 个循环。PCR 产物于 1.8% 琼脂糖凝胶电泳后,应用凝胶电泳成像分析仪进行扫描,测定产物条带面积的积分光密度值(integrated optical density, IOD)。目的基因的相对表达强度用目的片段(IOD)/β-actin(IOD)的相对比值来表示(引物序列由华大基因合成)。见表 1。

**1.5 Western blot 法检测大脑皮质、海马、丘脑 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白** 用蛋白提取液提取脑组

表 1 Cyt-C 和 caspase-3 PCR 扩增引物

名称	引物序列(5'→3')	扩增序列	退火温度
		大小(bp)	(°C)
Cyt-C	F:ATGCCAAGTCAAAGAATC	318	55
	R:GAGGGCAGTAAGCATAAC		
caspase-3	F:GGAATGTCATCTCGCTCTG	356	55
	R:GTCCCACTGTCTGTCTCAAT		
β-actin	F:TGAACCCCTAAGGCCAACCGTGAA	476	53
	R:ACCCAAGAAGGAAGGCTGAAAA		

织蛋白,加入等量的 2 × SDS-PAGE 缓冲液,并于 100 °C 煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳,300 mA 转膜 1 h,封闭液中室温封闭 2 h,一抗(1:2 000 稀释)4 °C 孵育过夜,TBS-T 洗膜 3 次,FITC 标记的二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 2 h,TBS-T 洗膜 3 次,ECL 试剂盒显色,X 线片压片,曝光 20 s~5 min,显影至条带出现,定影 5 min,拍照并保留底片。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 16.0 统计软件分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差不齐时采用秩和检验,两两比较用  $q$  检验。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 检测 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA

**2.1.1 皮质 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达** 检测 HI 组皮质部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 不同时间段的表达水平,结果表明 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达在术后 3 h 显著增加而后降低,24 h 又出现表达增加,见图 1。检测 HI + IGF-1 组 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达,结果表明在 HI 组 3、24 h 表达显著增加时,HI + IGF-1 组 mRNA 表达较 HI 组明显降低(3 h  $F_{\text{Cyt-C}}=48.384$ ,3 h  $F_{\text{caspase-3}}=28.052$ ,

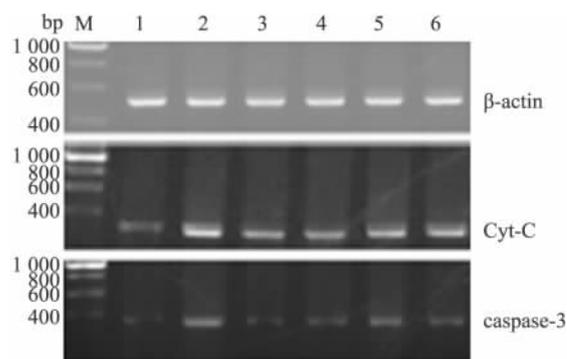


图 1 皮质部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA HI 组不同时间段的表达水平

M:Marker;1:0 h;2:3 h;3:6 h;4:12 h;5:24 h;6:48 h

24 h  $F_{Cyt-C} = 41.797$ , 24 h  $F_{caspase-3} = 26.667$ ,  $P < 0.05$ )。见图 2。相对密度值见表 2。

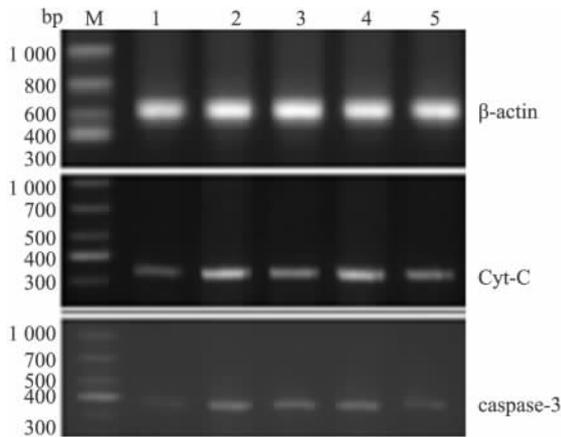


图 2 皮质部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA HI 组与 HI + IGF-1 组 3、24 h 表达水平

M:Marker;1: 正常对照组; 2: HI 组 3 h; 3: HI + IGF-1 组 3 h; 4: HI 组 24 h; 5: HI + IGF-1 组 24 h

表 2 皮质正常对照组、HI 组和 HI + IGF-1 组 3、24 h Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 相对密度值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Cyt-C mRNA		caspase-3 mRNA	
	3 h	24 h	3 h	24 h
HI	0.47 ± 0.05*	0.41 ± 0.04*	0.27 ± 0.03*	0.26 ± 0.03*
HI + IGF-1	0.24 ± 0.04* <sup>△</sup>	0.22 ± 0.03* <sup>△</sup>	0.15 ± 0.03* <sup>△</sup>	0.14 ± 0.03* <sup>△</sup>
正常对照	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.03

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 HI 组同一时间点比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

**2.1.2 海马 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达** 检测 HI 组海马部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 不同时间段的表达水平,结果表明 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达在术后 6 h 后有显著增加,见图 3。检测 HI + IGF-1 组 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达,结果表明在 HI 组 6 h 表达显著增加时,HI + IGF-1 组 mRNA 表达较 HI 组明显降低 ( $F_{Cyt-C} = 68.120$ ,  $F_{caspase-3} = 54.729$ ,  $P < 0.05$ )。见图 4。相对密度值见表 3。

**2.1.3 丘脑 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达** 检测 HI 组丘脑部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 不同时间

表 3 海马正常对照组、HI 组和 HI + IGF-1 组 6 h Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 相对密度值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Cyt-C mRNA	caspase-3 mRNA
HI	0.48 ± 0.05*	1.53 ± 0.08*
HI + IGF-1	0.21 ± 0.03* <sup>△</sup>	0.82 ± 0.04* <sup>△</sup>
正常对照	0.11 ± 0.02	0.52 ± 0.06

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 HI 组同一时间点比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

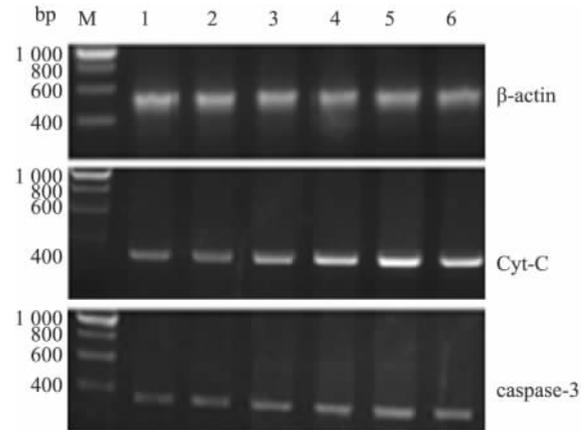


图 3 海马部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA HI 组不同时间段的表达水平

M:Marker;1: 0 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h

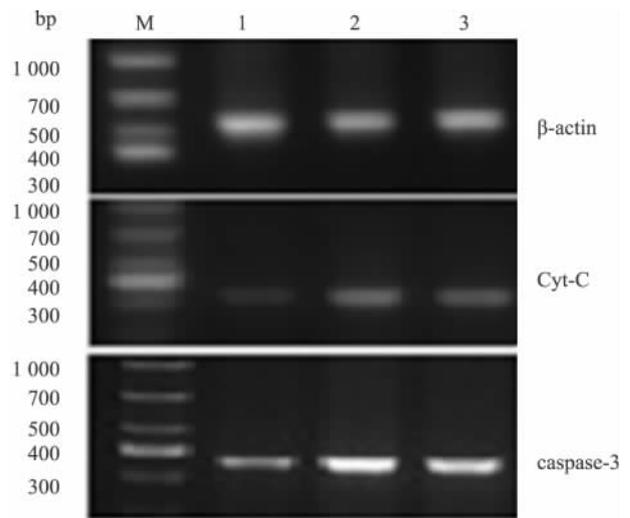


图 4 海马部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA HI 组与 HI + IGF-1 组 6 h 表达水平

M:Marker;1: 正常对照组; 2: HI 组; 3: HI + IGF-1 组

间段的表达水平,结果表明 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达在术后 12 h 后有显著增加,见图 5。检测 HI + IGF-1 组 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 的表达,结果表明在 HI 组 12 h 表达显著增加时,HI + IGF-1 组 mRNA 表达较 HI 组明显降低 ( $F_{Cyt-C} = 72.674$ ,  $F_{caspase-3} = 80.557$ ,  $P < 0.05$ )。见图 6。相对密度值见表 4。

表 4 丘脑正常对照组、HI 组和 HI + IGF-1 组 12 h Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 相对密度值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Cyt-C mRNA	caspase-3 mRNA
HI	0.47 ± 0.05*	0.52 ± 0.05*
HI + IGF-1	0.22 ± 0.03* <sup>△</sup>	0.27 ± 0.03* <sup>△</sup>
正常对照	0.15 ± 0.04	0.21 ± 0.04

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 HI 组同一时间点比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

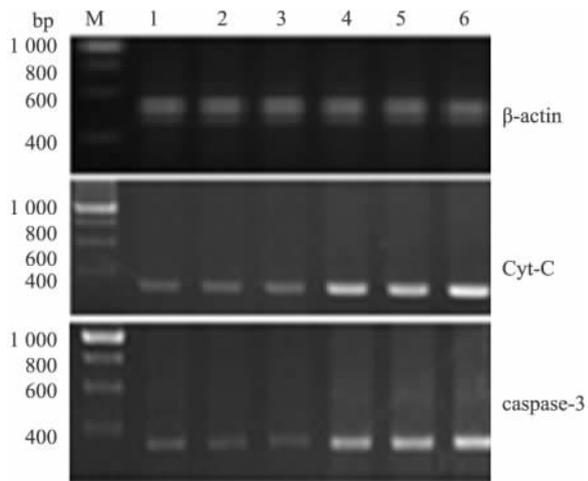


图5 丘脑部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA HI 组不同时间段的表达水平

M:Marker;1: 0 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h

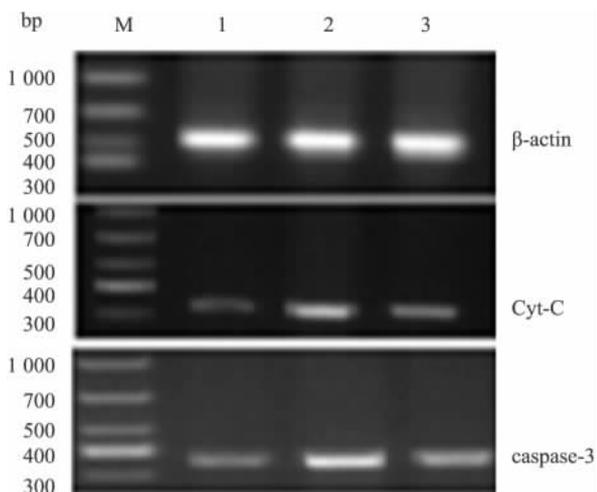


图6 丘脑部位 Cyt-C 和 caspase-3 mRNA HI 组与 HI + IGF-1 组 12 h 表达水平

M:Marker;1: 正常对照组; 2: HI 组; 3: HI + IGF-1 组

## 2.2 Western blot 法检测 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白

**2.2.1 皮质 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达** 检测 HI 组皮质部位 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白不同时间段的表达水平 结果表明 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达在术后 3 h 显著增加而后降低 24 h 又出现表达增加,见图 7。检测 HI + IGF-1 组 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白表达 结果表明在 HI 组 3、24 h 表达显著增加时,HI + IGF-1 组蛋白表达较 HI 组明显降低,见图 8。

**2.2.2 海马 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达** 检测 HI 组海马部位 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白不同时间段的表达水平,结果表明 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表

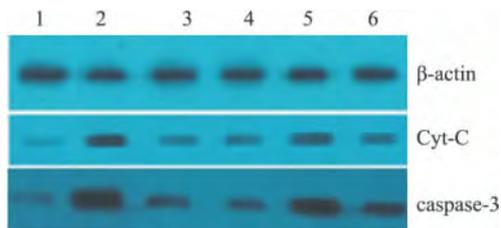


图7 皮质 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白 HI 组不同时间段的表达水平

1: 0 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h

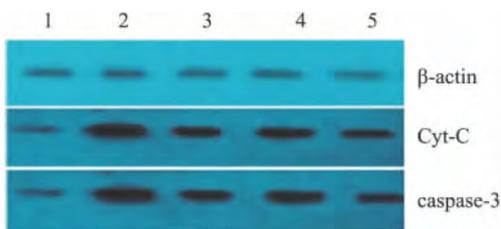


图8 皮质 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白 HI 组与 HI + IGF-1 组 3、24 h 表达水平

1: 正常对照组; 2: HI 组 3 h; 3: HI + IGF-1 组 3 h; 4: HI 组 24 h; 5: HI + IGF-1 组 24 h

达在术后 6 h 后有显著增加,见图 9。检测 HI + IGF-1 组 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达,结果表明在 HI 组 6 h 表达显著增加时,HI + IGF-1 组蛋白表达较 HI 组明显降低,见图 10。

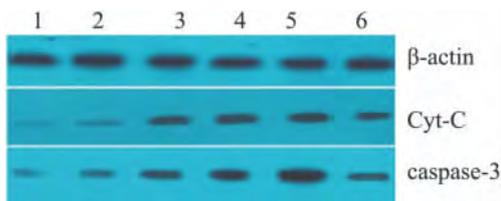


图9 海马 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白 HI 组不同时间段的表达水平

1: 0 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h

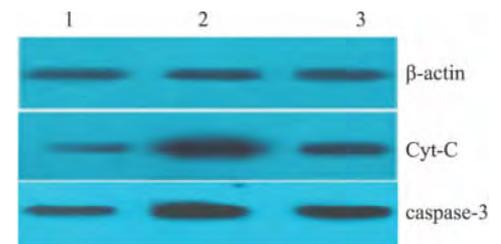


图10 海马 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白 HI 组与 HI + IGF-1 组 6 h 的表达水平

1: 正常对照组; 2: HI 组; 3: HI + IGF-1 组

## 2.2.3 丘脑 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达 检测

HI 组丘脑部位 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白不同时间段的表达水平,结果表明 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达在术后 12 h 后有显著增加,见图 11。检测 HI + IGF-1 组 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白的表达,结果表明在 HI 组 12 h 表达显著增加时,HI + IGF-1 组蛋白表达较 HI 组明显降低,见图 12。

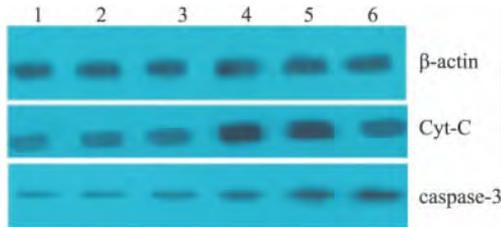


图 11 丘脑 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白 HI 组不同时间段的表达水平

1: 0 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h

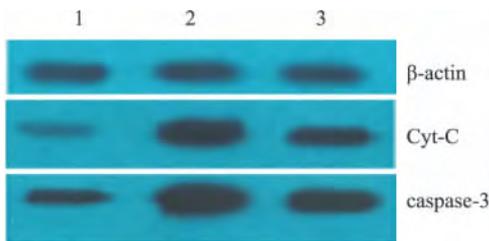


图 12 丘脑 Cyt-C 和 caspase-3 蛋白 HI 组与 HI + IGF-1 组 12 h 表达水平

1: 正常对照组; 2: HI 组; 3: HI + IGF-1 组

### 3 讨论

HIBD 是引起新生儿死亡和神经系统后遗症的主要原因之一。文献<sup>[1]</sup>报道 HIBD 所致的迟发性神经细胞死亡(即凋亡)引起的损伤更严重。HI 后可激活细胞膜上 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体,引起钙离子内流增加,使细胞内钙离子超载,膜发生去极化,使线粒体膜电势降低,最终导致线粒体功能丧失和细胞凋亡。线粒体功能受损后,通过释放 Cyt-C 参与细胞凋亡的发生、发展。Cyt-C 是线粒体呼吸链上的必须组成成分,当线粒体功能受损时,Cyt-C 由线粒体膜释放到细胞质中,激活 caspase-3 引起细胞凋亡<sup>[5-7]</sup>。本研究显示,HI 组小鼠脑皮质 Cyt-C、caspase-3 蛋白和 mRNA 在术后 3 h 表达明显增高,海马 Cyt-C、caspase-3 蛋白和 mRNA 于术后 6 h 出现表达增高,丘脑 Cyt-C、caspase-3 蛋白和 mRNA 于术后 12 h 出现表达增加。朱长连等<sup>[8]</sup>指出 Cyt-C 通过激活

caspase-3 引起 DNA 断裂,说明凋亡的早期改变是 Cyt-C 的释放,与本研究结果一致。

一些生长因子和营养因子对受损的神经细胞有保护作用。IGF-1 作为一种多肽类神经营养因子,既有合成代谢作用,又有促生长作用。IGF-1 及其受体在脑组织内分布广泛,大脑皮层、海马及下丘脑均有表达,能调节神经细胞的生长和分化,抑制细胞凋亡,对细胞受损后的恢复有重要作用<sup>[9]</sup>。其还能激活多种具有神经保护作用的信号传导通路,IGF-1 可降低脑血管阻力、阻止钙通道开放、抑制 NO 和兴奋性氨基酸的毒性和促炎因子的表达、抑制神经细胞凋亡等多种途径对神经系统起保护作用<sup>[10-12]</sup>。李智勇等<sup>[13]</sup>研究发现 IGF-1 通过调控 p-JNK、p-P38 及 caspase-3 的表达抑制缺血、缺氧神经细胞的凋亡而对神经细胞有一定的保护作用,与本研究一致。P13K/Akt 信号通路与细胞损伤后的抗凋亡有关,此信号通路在体内广泛表达,在细胞的凋亡、增殖、生长、分化和代谢方面起调控的作用<sup>[14]</sup>。Lin et al<sup>[15]</sup>指出经鼻给予 IGF-1 后通过激活 Akt 蛋白激酶抑制细胞凋亡而有神经保护作用,该研究也指出 IGF-1 对神经系统的保护作用可能在 HI 后 1 h 内,而本研究选择给药时间为 HI 后 0 h,符合 IGF-1 的治疗时间。本研究显示 HI + IGF-1 组皮质 Cyt-C、caspase-3 蛋白和 mRNA 表达在术后 3、24 h 较 HI 组减弱,差异有统计学意义,HI + IGF-1 组海马两者的表达在术后 6 h 较 HI 组减弱,HI + IGF-1 组丘脑两者的表达在术后 12 h 较 HI 组减弱,提示 IGF-1 可以通过减少线粒体 Cyt-C 的释放,抑制 caspase-3 的表达,表明应用外源性 IGF-1 后对急性期皮质、海马和丘脑有一定的神经保护作用。但丘脑因其解剖位置的关系,HIBD 后脑血流出现重新分配,血液优先供应代谢旺盛的器官,如丘脑、脑干等,故丘脑出现损伤和修复的时间均较迟(术后 12 h)。

### 参考文献

[1] Greijir A E, van der wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 157(10): 1009 - 14.

[2] Lin S, Rhodes P G, Cai Z. Whole body hypothermia broadens the therapeutic window of intranasally administered IGF-1 in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Brain Res*, 2011, 1385: 246 - 56.

[3] Bryve K G, Mallard C, Gustavsson M, et al. IGF-1 neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of

- Akt and GSK3beta? [J]. *Eur J Neurosci* 2005 ,21(6) : 1489 – 502.
- [4] 王璐璐,王 杨,宣桂华等. 新生小鼠脑缺血缺血损伤模型的建立[J]. *安徽医科大学学报*, 2004 ,39(4) : 259 – 61.
- [5] Graham S H ,Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia [J]. *Cereb Blood Flow Metab* ,2001 ,21(2) : 99 – 109.
- [6] Knoblach S M ,Nikolaeva M ,Hung X L , et al. Multiple caspase are activated after traumatic brain injury:evidence for involvement in function outcome[J]. *Neurotrauma* ,2002 ,19(10) : 1155 – 70.
- [7] Li P ,He Q P ,Ouyang Y B , et al. Early release of cytochrome C and activation of caspase-3 in hyperglycemic rats subjected to transient fore brain ischemia[J]. *Brain Res* ,2001 ,896(1 – 2) : 69 – 76.
- [8] 朱长连,王小阳,邱 林等. 新生大鼠脑缺血缺血后细胞色素 C 释放与凋亡的关系 [J]. *中华儿科杂志* ,2004 ,42(6) : 437 – 40.
- [9] Rubovitch V ,Edut S ,Sarfein R , et al. The intricate involvement of the insulin-like growth factor receptor signaling in mild traumatic brain injury in mice[J]. *Neurobiol Dis* ,2010 ,38(2) : 299 – 303.
- [10] Ye F ,Xi G M ,Chen T , et al. Role of insulin-like growth factor-1 in proliferation migration and differentiation of neural stem cells in cerebral infarction rats[J]. *CRTER* ,2010 ,14(6) : 1125 – 9.
- [11] Sundberg M ,Hyysalo A ,Skottman H , et al. A xeno -free culturing protocol for pluripotent stem cell-derived oligodendrocyte precursor cell production[J]. *Regen Med* ,2011 ,6(4) : 449 – 60.
- [12] Pérez -Martín M ,Cifuentes M ,Grondona J M , et al. IGF -I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats [J]. *Eur J Neurosci* ,2010 ,31(9) : 1533 – 48.
- [13] 李智勇,夏 鹰,陈晓东等. IGF-1 对大鼠缺血、缺氧神经元 p-JNK 及 p-P38 表达的影响[J]. *重庆医学* ,2012 ,4(16) : 1572 – 4.
- [14] Brazil D P ,Yang Z Z ,Hemmings B A. Advances in protein kinase B signalling AKTion on multiple fronts[J]. *Trends Biochem Sei* ,2004 ,29(5) : 233 – 42.
- [15] Lin S ,Fan L W ,Rhodes P G , et al. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Exp Neurol* ,2009 ,217(2) : 361 – 70.

## Effect of IGF-1 on cytochrome C and caspase-3 expression of brain mitochondria in neonatal mouse with hypoxic-ischemic brain damage

Chen Qi<sup>1</sup> ,Bu Yanggao<sup>2</sup> ,Wang Yang<sup>1</sup> , et al

(<sup>1</sup>Division of Neonatology Dept of Pediatrics ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology ,The Clinical College of PLA Affiliated Anhui Medical University Hefei 230031)

**Abstract Objective** To discuss the effect of IGF-1 on the expression of cytochrome C (Cyt-C) and caspase-3 in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** One hundred and eight C57/BL neonatal mice were randomly divided into normal control group ( $n = 36$ ) and HI group ( $n = 36$ ) and HI + IGF-1 group ( $n = 36$ ). Mouse HIBD model was prepared according to the Rice-Vannucci method. HI + IGF-1 group was immediately injected with 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  IGF-1 after HI; HI group and normal control group were injected with the same amount of saline solution. RT-PCR and Western blot methods were used to measure the mRNA and protein expression of Cyt-C and caspase-3 0 ,3 ,6 ,12 ,24 and 48 h after HI. **Results** ① In HI group ,the increase of Cyt-C and caspase-3 mRNA and protein expression intensity appeared at 3 h in cerebral cortex ,at 6 h in hippocampus and at 12 h in thalamus ,delayed compared with cortex and hippocampus; ② HI group Cyt-C and caspase-3 mRNA and protein expression increased compared with those in the normal control groups at the same point ,and those in the HI + IGF-1 group also increased compared with that in the normal control groups ,but decreased compared with that in the HI group. There was statistical significance among the groups ( $P < 0.05$ ); ③ The Cyt-C and caspase-3 mRNA and protein expression of Cortex significantly increased after 3 hours ,and then decreased after 6 hours ,and reached another peak value in 12 ~ 24 hours. The expressions of Cyt-C and caspase-3 mRNA in HI + IGF-1 group were lower in the two peak time than HI group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** IGF-1 may inhibit the release of Cyt-C , and reduce the expression of caspase-3 ,and provide neuroprotection against HIBD in neonatal mice. IGF-1 has two time points to protect the cortex.

**Key words** hypoxia-ischemia; cerebral; insulin-like growth factor-1; cytochrome C; caspase-3; mouse; neonatal