文章编号:1000-5404(2008)22-2115-05

论著

抑制UPS对缺血再灌注大鼠心肌Hsp27和TNF-α的影响

戴翠莲[1],罗开良[2],陈章荣[2],赵 静[1] ([1]遵义医学院附属医院心内科,贵州 遵义 563003;[2]重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010)

摘 要:目的 研究泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)对心肌缺血再灌注大鼠热休克蛋白27(heat shock protein,Hsp27)的影响及与肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的关系,探讨抑制UPS后可能的心肌保护作用机制,为降低心肌缺血再灌注损伤提供新的干预途径。**方法** 64只SD大鼠结扎左冠状动脉前降支30 min制作心肌缺血再灌注模型。缺血再灌注+治疗(I/R+T)组于再灌注前5 min静脉注射蛋白酶体抑制剂MG-132 0.75 mg/kg,缺血再灌注(I/R)组、缺血(I)组及假手术(Sham)组注射与之相同容积的生理盐水。观察各组心肌梗死范围、再灌注6 h后各组大鼠心肌组织Hsp27及TNF-α的表达。**结果** 与I/R组相比,I/R+T组大鼠心肌梗死范围明显减少($P<0.05$),Hsp27表达显著增加[mRNA水平分别为(95.37±18.38)和(68.14±17.58),$P<0.01$;蛋白质积分光密度值分别为(82.57±6.39)和(39.96±7.28),$P<0.001$]。TNF-α表达降低[mRNA分别为(45.53±10.65)和(76.52±19.12),$P<0.01$;蛋白质积分光密度值分别为(60.12±9.32)和(42.33±5.95),$P<0.01$]。**结论** 适当抑制UPS能够显著升高Hsp27的水平,抑制TNF-α表达,减少心肌梗死范围,具有心肌保护作用。

关键词: 泛素-蛋白酶体系统;热休克蛋白27;肿瘤坏死因子-α
中图法分类号: R322.11;R362;R654.102 **文献标识码:** A

Influence of inhibited ubiquitin proteasome system to heat shock protein 27 and tumor necrosis factor-α in cardiac ischemia-reperfusion rat

DAI Cui-lian[1], LUO Kai-liang[2], CHEN Zhang-rong[2], ZHAO Jing[1] ([1]Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003; [2]Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the influence on heat shock protein 27 (Hsp27) and tumor necrosis factor α (TNF-α) by inhibiting ubiquitin proteasome system in cardiac ischemia-reperfusion (I/R) rats. **Methods** Left anterior descending (LAD) coronary artery was ligated for 30 min and then released for 6 h in adult Sprague-Dawley rats. Five minutes before reperfusion, MG-132 (N-benzoyloxycarbonyl (Z)-Leu-Leuleucinal) at dose of 0.75 mg/kg was given by vein injection in I/R+T group, but I/R group, I group and sham group were given the same volume of sterile saline. The changes of myocardial infarct size, cardiac protein and mRNA levels of Hsp27 and TNF-α were measured. **Results** Compared with I/R group, the myocardial infarct size was significantly reduced ($P<0.05$), while the protein and mRNA levels of Hsp27 were significantly increased ($P<0.01$) and those of TNF-α were significantly lessened ($P<0.01$) in I/R+T group. **Conclusion** Myocardial reperfusion injury can be inhibited by appropriate inhibition of UPS, during which the level of Hsp27 was increased and the expression of TNF-α was suppressed.

Key words: UPS; Hsp27; tumor necrosis factor-α

抑制泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)能减少缺血再灌注损伤[1],热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的高表达具有心肌保护作用[2],那么抑制UPS后的心肌保护作用是否与HSP相关,特别是对被认为有心肌保护作用的热休克蛋白27(heat shock protein 27, Hsp27)有何影响,以及Hsp27的水平与TNF-α的关系等问题有待进一步研究。本实验以大鼠的心肌缺血再灌注模型为研究对象,选择蛋白酶体抑制剂MG-132[N-benzoyloxycarbonyl (Z)-Leu-Leuleucinal],研究在此模型中Hsp27与炎症因子TNF-α的表达水平,探讨二者之间的可能关系,旨在为

作者简介:戴翠莲,女,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人,博士,副主任医师,主要从事泛素-蛋白酶体系统与心血管疾病方面的研究。E-mail:dai_cui_lian@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-01-23;修回日期:2008-04-10

UPS 的心肌保护机制提供实验基础,并为降低心肌缺血再灌注损伤提供新的干预途径。

1 材料与方法

1.1 动物模型和实验分组

我们前期的研究中观察到缺血再灌注 6 h 时 TNF-α 表达显著增加[1],故采用缺血再灌注 6 h 作为观察时点,MG-132 剂量参照文献[1,3]使用的剂量。

建立动物模型参照文献[3]进行。同窝出生的成熟 SD 大鼠 64 只,体质量(220 ± 50)g,雌雄各半(遵义医学院实验动物中心提供)。以 3.5 % 水合氯醛(10 ml/kg)腹腔注射麻醉后将大鼠接心电图机,气管插管后接小动物呼吸机(浙江医科大学生产)。于胸骨左缘 0.5 cm 切开皮下组织,剪断第 3、4 肋骨,暴露胸腔,于左冠状动脉前降支(left anterior descending, LAD)发出 2 mm 处穿线,打活结以阻断其血流 30 min,造成急性心肌梗死后,松开结扎线,形成再灌注。以心电图改变及心肌颜色变化作为心肌梗死再灌注模型成功的标志。

64 只大鼠分为 4 组,每组 16 只:① 缺血再灌注 + 治疗(I/R + T)组,阻断 LAD 30 min 后再灌注,于 25 min 时股静脉注入 MG-132(Calbiochem 公司,0.75 mg/kg,溶于 2 ml 二甲基亚砜中),5 min 推完;② 缺血再灌注(I/R)组,阻断 LAD 30 min 后再灌注,于 25 min 时股静脉注入 2 ml 生理盐水;③ 缺血(I)组,阻断 LAD 30 min;④假手术(Sham)组,手术过程与 I/R 组相同,但只穿线不打结。

1.2 采集标本及检测指标

1.2.1 采集标本 所有动物在完成前述的实验步骤后关胸,Ⅰ组于阻断 LAD 30 min 后、其他各组于再灌注 6 h 后于腹腔内注入致死量的水合氯醛,处死动物,每组各取 8 只大鼠用于 TTC 染色,另 8 只用于其他检查。于心脏停跳前摘取心脏,迅速分离出左心室,沿左心室长轴横切成 2 mm 的薄片,用于 TTC 染色、HE 染色、免疫组化及 RT-PCR。

1.2.2 TTC 染色 将四氮唑红(TTC)染色大鼠左心室心肌组织薄片后,立即全部置于 1% 的 TTC 磷酸缓冲液(pH 7.4)中,37 ℃水浴 15 min,梗死心肌为灰白色(TTC 染色阴性),非梗死部位心肌呈砖红色(TTC 染色阳性),置 1 mm 直尺于心肌组织旁作为比例尺,尼康 500 万像素专业数码相机照相,输入 Adobe PhotoShop 5.5 系统,利用 NIH 图像分析软件计算各例的左室心肌体积(volume of left ventricular wall, LVWV)、心肌梗死体积(volume of myocardial infarction, MIV)以及心肌梗死体积与左室心肌体积的百分比(MIV / LVWV ×100%)。

1.2.3 组织学观察 每组各取 1 片心肌组织用 10 % 福尔马林浸泡过夜,石蜡包埋后切成 5 μm 薄片,用苏木精-伊红染色后显微镜下观察。

1.2.4 Hsp27 及 TNF-α 的蛋白质表达 用免疫组化 S-P 法(S-P 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠 Hsp27 IgG、山羊抗大鼠 TNF-α IgG 为 Santa Cruz 公司产品,观察心肌细胞 Hsp27 及 TNF-α 的蛋白质表达情况。

1.2.4.1 Hsp27 蛋白质半定量分析 石蜡包埋切片脱蜡,梯度酒精浸泡,PBS 冲洗,5% 山羊血清封闭后,兔抗大鼠 Hsp27 IgG(一抗,1∶100 稀释)孵育 4 ℃过夜。次日分别滴加生物精标记山羊抗兔 IgG(二抗)和辣根酶标记链霉卵白素,DAB 显色,苏木精复染,封片,拍照。高倍镜下(× 400)观察 Hsp27 蛋白质表达情况:每一张切片均随机选 20 个视野,用 HPLAS-1000 图像分析系统计算积分光密度(IOD)值作为半定量参数,计算其均值,测量 Hsp27 的蛋白质表达。

1.2.4.2 TNF-α 蛋白质半定量分析 实验方法同上,但一抗(1∶100 稀释)、二抗分别为山羊抗大鼠 TNF-α IgG 及兔抗山羊 IgG。用 HPLAS-1000 图像分析系统计算 IOD 值作为半定量参数,测量 TNF-α 的蛋白质表达。

1.2.5 RT-PCR 检测 Hsp27 及 TNF-α mRNA 表达 采用两步法进行 RT-PCR(TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0 购于大连宝生物工程有限公司)。提取心肌总 RNA(按照说明书进行),计算 RNA 的纯度。引物设计:Hsp27 (216 bp)上游:5′-GGGGTCGCAGCAGTTGT-3′,下游 5′-CGTCTTGTGCAGGTGGTT-3′;TNF-α(388 bp)上游 5′-AGCAAACCACCAAGCAGAGG-3′,下游:5′-CGGACTCCGTGATGTCTAAG-3′;GAPDH(278 bp)上游:5′-CCTTCATTGACCTCAACTACATG -3′,下游:5′-CTTCTCCATG-GTGGTGAAGAC-3′。制备 cDNA,逆转录体系为 $MgCl_2$ 2 μl,10 × RT Buffer 1 μl,DEPC 水 3.75 μl,4 × dNTP 1 μl,Rnase Inhibitor 0.25 μl,OligodT 0.5 μl,MML-V 0.5 μl,RNA 3 μg。反应参数为 30 ℃ 10 min,50 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min。PCR 反应体系为 cDNA 10 μl,灭菌蒸馏水 28.75 μl,5 × Buffer 10 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,*Taq* 酶 0.25 μl。反应参数为 94 ℃预变性 2 min 后,94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 44 s,30 个循环后;72 ℃延伸 7 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内对照。以 5 μl PCR 产物行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶图像分析系统扫描扩增产物电泳条带的密度,将 GAPDH 的产物设为 100,计算 Hsp27 及 TNF-α 电泳条带密度。

1.3 统计学处理

用 SAS 6.12 软件进行统计学分析,所有的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠生存及死亡分析

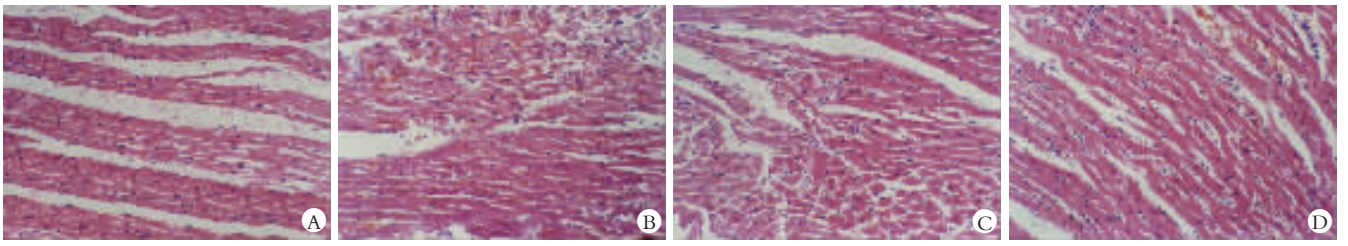
64 只大鼠中 9 只于实验中死亡,存活率为 86 %。用于组织学检查的 32 只大鼠存活 26 只,Sham 组、Ⅰ组、I/R 组及 R/I + T 组分别存活 8、5、6、7 只,存活率为 81.5 %;用于检测 Hsp27 及 TNF-α 的大鼠共存活 29 只,Sham 组、Ⅰ组、I/R 组及 R/I + T 组分别存活 8、6、7、8 只,存活率为 90.6 %。死亡情况:心律失常占 54 %,其中室速 2 只,室颤 2 只,三度房室传导阻滞 1 只;麻醉意外及大出血分别死亡 1 只和 2 只;其他原因死亡 1 只。将以上各组存活大鼠实验数据进行统计学分析。

2.2 HE 染色结果

结扎 LAD 30 min 后,心肌细胞大片凝固性坏死,心肌细胞水肿,炎症细胞浸润(图 1B);再灌注后 6 h,心肌细胞坏死减轻,炎症细胞浸润减少(图 1C);与 I/R 组相比,I/R + T 组心肌细胞水肿显著减轻,肌纤维排列较整齐(图 1D)。

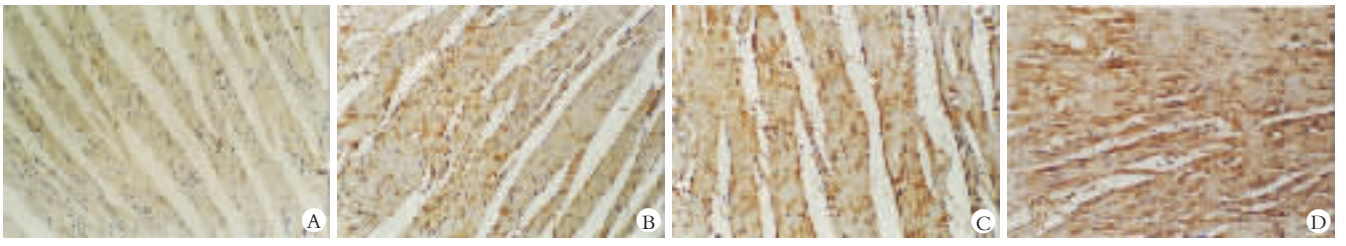
2.3 心肌梗死体积变化

心肌梗死后再灌注使心肌梗死体积显著减少,MIV/LVWV 由 37% 降至 27%,与 I/R 组相比,抑制 UPS 后,心肌梗死体积进一步减少至 16%($P < 0.05$,表 1)。



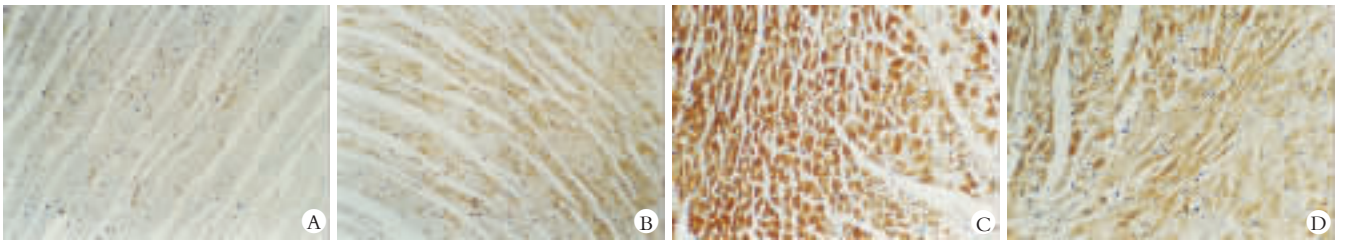
A：Sham 组；B：Ⅰ组；C：I/R 组；D：I/R + T 组

图 1　心肌组织 HE 染色结果　（×200）



A：Sham 组；B：Ⅰ组；C：I/R 组；D：I/R + T 组

图 3　Hsp27 的免疫组化观察　（**S-P** ×200）



A：Sham 组；B：Ⅰ组；C：I/R 组；D：I/R + T 组

图 4　TNF-α 的免疫组化观察　（S-P ×200）

表 1　心肌梗死体积变化情况（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	LVWV（cm^3）	MIV（cm^3）	MIV/LVWV（%）
Sham 组	8	2.98 ± 0.37	–	–
Ⅰ组	5	3.24 ± 0.21	1.19 ± 0.15	37.42 ± 15.20
I/R 组	6	3.03 ± 0.14	0.84 ± 0.06	27.98 ± 12.95
I/R + T 组	7	3.21 ± 0.24[a]	0.49 ± 0.96[b]	16.83 ± 9.49[c]

a：$P = 0.8716$，b：$P < 0.05$，c：$P < 0.05$，与 I/R 组比较

2.4　Hsp27 及 TNF-α 的 mRNA 表达

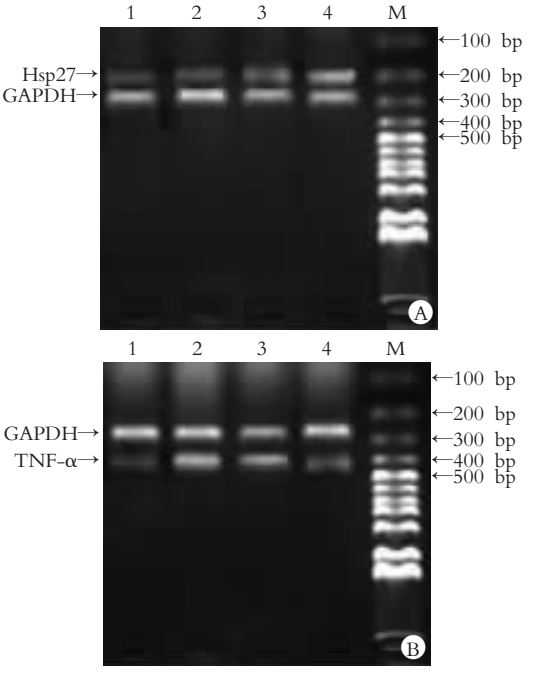
2.4.1　Hsp27 的 mRNA 表达　　与Ⅰ组相比，I/R 组的 Hsp27 表达量增加，但显著低于 I/R + T 组（$P < 0.001$，图 2A、表 2）。

2.4.2　TNF-α 的 mRNA 表达　　Sham 组仅有低水平的TNF-α 表达，与 I/R 组及 I/R + T 组相比，缺血 6 h 后 TNF-α 的mRNA 水平最高；与 I/R 组相比，I/R + T 组的 TNF-α 的 mRNA 表达显著降低（$P < 0.01$，图 2B、表 2）。

2.5　Hsp27 及 TNF-α 的蛋白质表达

2.5.1　Hsp27 的蛋白质表达　　Sham 组中，Hsp27 的蛋白质在细胞质中低量表达，缺血/再灌注后细胞质及细胞核中表达量显著增加，但与 I/R 组相比，I/R + T 组 Hsp27 水平最高，IOD 值由 40 增加到 82（$P < 0.001$，图 3、表 3）。

2.5.2　TNF-α 的蛋白质表达　　与 Sham 组相比，Ⅰ组 TNF-α 的 IOD 值开始增加，但是无显著差异；再灌注后其明显增加，但与 I/R 组相比，I/R + T 组的 TNF-α 的 IOD 值显著下降（$P < 0.01$，图 4、表 3）。



A：Hsp27；B：TNF-α　1～4：Sham 组、Ⅰ组、I/R 组、I/R + T 组；M：DNA 标准

图 2　Hsp27 及 TNF-α 的 mRNA 表达

表 2 Hsp27 及 TNF-α 的 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hsp27	TNF-α
Sham 组	8	23.67 ± 7.98	10.34 ± 1.26
Ⅰ组	6	30.98 ± 11.22	98.43 ± 15.50
I/R 组	7	68.14 ± 17.58	76.52 ± 19.12
I/R + T 组	8	95.37 ± 18.38[a]	45.53 ± 10.65[b]

a:$P < 0.01$,b:$P < 0.001$,与 I/R 组比较

表 3 Hsp27 及 TNF-α 的蛋白质表达情况(IOD 值,$\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hsp27	TNF-α
Sham 组	8	6.02 ± 1.98	5.22 ± 0.89
Ⅰ组	6	7.19 ± 1.14	6.12 ± 1.10
I/R 组	7	39.96 ± 7.28	60.12 ± 9.32
I/R + T 组	8	82.57 ± 6.39[a]	42.33 ± 5.95[b]

a:$P < 0.01$,b:$P < 0.01$,与 I/R 组比较

3 讨论

3.1 抑制 UPS 减少了心肌梗死范围

本实验结果证明,于心肌缺血后再灌注前短期、适量抑制 UPS,能够显著减少心肌坏死范围,具有心肌保护作用,这与以前的研究结果类似[3]。

3.2 抑制 UPS 显著增加了 Hsp27 的表达

研究表明,心肌缺血 30 min 再灌注 6 h 后,心肌组织中 Hsp27 的表达显著升高,且在心肌缺血再灌注前静脉内注入蛋白酶体抑制剂抑制 UPS,进一步使 Hsp27 的水平增加。可能的机制为:Hsp27 是心肌缺血再灌注损伤中的治疗性蛋白质[4],如在动脉粥样硬化斑块的酯质核心中,Hsp27 的表达显著降低;Hsp27 表达越少,细胞越容易死亡,细胞生成就越少[5];高 Hsp27 水平能对抗房颤患者的心肌肥大[6];当给大鼠腹腔内注射 TAT-Hsp27,则显著减少再灌注 7 d 后大鼠心肌梗死面积并保护心脏功能[7],其中可能与调节细胞凋亡有关;并发现动脉粥样硬化斑块周围接近正常区域,Hsp27 的表达增加[5],这些增高的 Hsp27 保护组织细胞免受损伤。新近研究表明,将纯化重组 TAT-Hsp27 蛋白质有效地转入 H9c2 细胞后,H9c2 细胞具有了对抗细胞缺氧的作用[7]。Pantos 等[8]将心肌梗死 2 周的大鼠阻断心脏循环 30 min 后再进行 45 min 的再灌注,发现心脏的热休克蛋白水平仍能升高,且具有抗心肌缺血再灌注损伤的作用。

缺血再灌注时,泛素化蛋白质聚集,蛋白酶体活性降低,蛋白酶体降解损伤蛋白质的能力下降。这些异常蛋白质的聚集与 HSP 表达有关。当蛋白酶体抑制剂阻断细胞内蛋白质降解后,异常聚集的蛋白质将启动热休克蛋白的表达[9],且能延长 HSPs 的半衰期。本实验证明这种抑制 UPS 后的心肌保护作用可能与上调 Hsp27 的水平相关。Doll 等[10]的结果和我们的一致,他们将 MG-132 处理过的新生大鼠的心肌细胞进行蛋白质组学分析,结果表明,MG-132 诱导了小热休克蛋白如 Hsp27、αB 晶体蛋白等抗氧化蛋白的表达。其中可能的机制是蛋白酶体抑制剂能够特异性地激活热休克诱导因子-1 ~4,这些热休克因子是与热休克基因转录调节相关的转录因子[11],将上调 HSP 水平。

3.3 抑制 UPS 能够上调 Hsp27 的水平,抑制 TNF-α 的表达,具有心肌保护作用

抑制 UPS 显著升高了缺血再灌注心肌 Hsp27 的表达,降低了 TNF-α 的水平,减少了心肌梗死范围,具有心肌保护作用。

Hsp27 水平增加与 TNF-α 表达降低关系如何,目前的研究尚不多,其中有无分子关联还需要进一步研究。推测相关联机制之一为 MG-132 通过抑制 NF-κB 的核转录,从而降低炎症因子 TNF-α 的表达,而降低的 TNF-α 又升高了 Hsp27 的水平[12]。正如 Niwa 等[12]观察到的用 TNF-α 处理外周血单核细胞显著降低了 Hsp27 的表达,并证实此作用是通过蛋白激酶 C 途径完成。

本研究证明蛋白酶体抑制剂 MG-132 能够诱导心肌组织快速合成 Hsp27。故于心肌再灌注前短期、适量静脉注入 MG-132,通过上调 Hsp27 的水平,并降低炎症因子表达,能够抑制心肌的缺血再灌注损伤,具有心肌保护作用,为缺血再灌注损伤的预防提供了新思路。

参考文献:

[1] 戴翠莲, 罗开良. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 下调炎症因子表达抑制大鼠心肌再灌注损伤[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 129 - 133.

[2] 刘 莉, 张小进, 姜苏蓉, 等. 人心肌热休克蛋白 27 基因克隆及其高表达对大鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23(12): 879 - 882.

[3] 戴翠莲, 罗开良. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(4): 528 - 531.

[4] Kwon J H, Kim J B, Lee K H, *et al*. Protective effect of heat shock protein 27 using protein transduction domain-mediated delivery on ischemia/reperfusion heart injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(2): 399 - 404.

[5] Martin-Ventura J L, Nicolas V, Houard X, *et al*. Biological significance of decreased HSP27 in human atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(6): 1337 - 1343.

[6] Brundel B J, Henning R H, Ke L, *et al*. Heat shock protein upregulation protects against pacing-induced myolysis in HL-1 atrial myocytes and in human atrial fibrillation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(3): 555 - 562.

[7] Voss O H, Batra S, Kolattukudy S J, *et al*. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation [J]. J Biol Chem, 2007, 282(34): 25088-25099.
[8] Pantos C, Mourouzis I, Dimopoulos A, *et al*. Enhanced tolerance of the rat myocardium to ischemia and reperfusion injury early after acute myocardial infarction[J]. 2007, 102(4): 327-333.
[9] Bush K T, Goldberg A L, Nigam S K. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance [J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 9086-9092.
[10] Doll D, Sarikas A, Krajcik R, *et al*. Proteomic expression analysis of cardiomyocytes subjected to proteasome inhibition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(2): 436-442.
[11] Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995, 11: 441-469.
[12] Niwa M, Hotta K, Hara A, *et al*. TNF-alpha decreases hsp 27 in human blood mononuclear cells: involvement of protein kinase c[J]. Life Sci, 2006, 80(3): 181-186.

(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2008)22-2119-01

个案与短篇

缺氧缺血性脑损伤后丰富环境刺激对大鼠海马CA1区神经元凋亡的影响

宋远见[1],刘红芝[1],裴冬生[1],孙亚峰[1],张 芳[1],张兆成[2]
([1]徐州医学院基础学院,江苏 徐州 221004;[2]徐州市中小学生卫生保健所,江苏 徐州 221002)

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)相关疾病迄今为止尚无理想的治疗方法。本实验通过研究丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠海马CA1区JNK、bad(ser 128)和神经元的影响及其可能机制,为临床缺氧缺血性脑病的治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

90只健康7 d龄清洁级雄性SD大鼠,体质量14~18 g,分为3组,每组30只。A组:正常对照组,不建立模型,不刺激;B组:缺氧缺血非刺激组,建立缺氧缺血性脑损伤模型,但不给丰富环境刺激。C组:丰富环境刺激组,采用Sale法建立缺氧缺血性脑损伤模型[1],给以丰富环境刺激(2 h/次,1次/d)共20 d。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 大鼠无水乙醚吸入麻醉后,取颈部正中切口,分离结扎左侧颈总动脉,然后置于37 ℃有机玻璃缺氧箱中,持续充以气流量为0.5 L/min的8%氧氮混合气体2 h,制成HIBD动物模型,术后夹尾左旋者纳入实验[2]。

1.2.2 丰富环境 参照Sale等[2]设计丰富环境。丰富环境刺激组在术前20 d及术后24 h即开始实施。放入丰富环境笼内4次/d,每次10 min。每周将环境改变2次,以造成新异的刺激,总刺激时间为20 d。B组和A组分别饲养于无特殊刺激的标准环境中,C组在非刺激时间亦饲养于标准环境中。3组大鼠均提供昼夜光变化(12 h光/12 h暗),自由进食进水,定期换笼。

1.2.3 样品制备 每组各取10只于缺氧缺血后的第3天将大鼠快速断头取脑,冰上用薄刀片从中央把脑纵向分开,在左脑中能明显看到1个月牙形的结构即海马,用专用小勺速取海马,取出的海马在纵向上有1道裂痕,用专用小勺顺着这道裂痕把海马分成两部分,即CA1区和CA3/DG区,将CA1区置液氮速冻。使用时,复温至-5~0 ℃,按1∶10(质量体积比)加入冰冷的匀浆液,Teflon匀浆器高速匀浆20次,匀浆液1 000×*g*、4 ℃离心10 min,取上清液按改良Lowry法,以牛血清白蛋白为标准蛋白测蛋白后分装,置-80 ℃贮存备用。

1.2.4 Western blot 等量蛋白样品经7.5% SDS-PAGE分离后,以湿转法电转移至NC膜上,转移条件电流40 A,时间60 min。转移后的NC膜经3% BSA室温封闭3 h后加入适当稀释的一抗,4 ℃过夜。用洗涤液洗膜3遍,加入二抗,37 ℃反应2 h,洗膜。以NBT/BCIP显色,水洗终止反应。结果用图像处理仪(Gene Company)分析处理。

1.2.5 焦油紫染色 以水合氯醛麻醉大鼠后,开左胸暴露心脏,将针头自心尖穿过左心室插入主动脉,先用38 ℃左右的生理盐水约100 ml快速灌洗,然后在灌入冰冷的10%中性福尔马林溶液250 ml。灌毕4 ℃放置数小时后取脑,脑组织置于同样固定液中后固定12 h左右。流水冲洗,冲洗时间同固定时间。然后梯度酒精脱水、二甲苯透明(2 h)、60 ℃浸蜡(1 h共2次)。取出包埋,4 ℃保存。石蜡切片机切片,5 μm厚。45 ℃温水中贴片于明胶处理过的载玻片上,40 ℃烘烤过夜。切片经3次二甲苯脱蜡,100%、90%、70%梯度酒精脱水,晾干。0.1%焦油紫(Cresyl violet)染色10~20 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片后光镜(×400)观察神经元细胞数目。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,两组间比较

(下转2123页)

基金项目:国家自然科学基金(30800446);江苏省自然科学基金(BK2006035,BK2006536);江苏省普通高等学校"青蓝工程"
Supported by the National Natural Science of China(30800446), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(BK2006035, BK2006536) and Qinglan Project of Ordinary Universities of Jiangsu Province

作者简介:宋远见,男,江苏省沛县人,硕士,讲师,主要从事缺氧缺血性脑病方面的研究。电话:(0516)80888046, E-mail: biosongyuanjian@126.com

收稿日期:2008-06-18;修回日期:2008-07-30