[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

早期 HK2 细胞中 NF-κB 的活化,进而下调 ICAM-1 等诸多炎性介质的过度表达,减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞损伤及 PMNs 的聚集浸润。提示 PD 对 H/R 诱导的肾小管上皮细胞损伤可能具有一定的保护作用,其作用机制可能与其抑制 NF-κB 的活化,下调 HK2 细胞中 ICAM-1 mRNA 及蛋白的过度表达,减少白细胞的浸润有关。

参考文献:

[1] Basnakian A G, Ueda N, Hong X, *et al*. Ceramide synthase is essential for endonuclease-mediated death of renal tubular epithelial cells induced by hypoxia-reoxygenation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(2): F308 - F314.

[2] Taekema-Roelvink M E, Kooten C, Kooij S V, *et al*. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(5): 932 - 940.

[3] Combe C, Burton C J, Dufourco P, *et al*. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule-1 on cultured human tubular cells[J]. Kidney Int, 1997, 51(6): 1703 - 1709.

[4] Christman J W, Sadikot R T, Blackwell T S. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases[J]. Chest, 2000, 117(5): 1482 - 1487.

[5] Xie J, Guo Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(12): 3336 - 3346.

[6] 陈建粮. 细胞间粘附分子 1 表达的调控[J]. 国外医学:免疫学分册, 2000, 23(5): 272 - 274.

[7] Zhou T, Sun G Z, Zhang M J, *et al*. Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia-reperfusion injury and anti-adhesive intervention with anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(7): 1005 - 1010.

[8] Tian X F, Yao J H, Li Y H, *et al*. Effect of nuclear factor kappa B on intercellular adhesion molecule-1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3): 388 - 392.

[9] Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys[J]. Am J Pathol, 2005, 166(6): 1895 - 1905.

[10] Shu S Y, Wang X Y, Ling Z Y, *et al*. Effect of polydatin on phospholipase A2 in lung tissues in rats with endotoxic shock[J]. Chin J Traumatol, 2004, 7(4): 239 - 243.

[11] 黄　斌, 王兴勇, 匡凤梧, 等. 白藜芦醇苷对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中国急救医学, 2005, 25(3): 192 - 193.

(编辑　吴培红)

(上接 2119 页)

采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

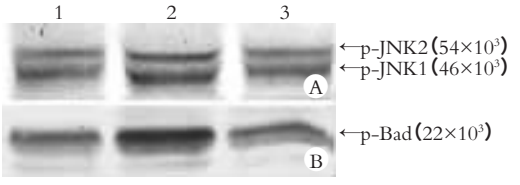
2　结果

2.1　海马 CA1 区组织中 JNK1/2 和 Bad(ser128)的磷酸化情况

Western blot 检测的结果显示:缺氧缺血后第 3 天 JNK1/2 和 Bad(ser128)的磷酸化水平 B 组明显高于 A 组($P<0.05$);C 组明显低于 B 组($P<0.05$,图 1)。

2.2　海马 CA1 区神经元数量

光镜观察焦油紫染色方法检测的结果显示:缺氧缺血后第 20 天海马 CA1 区 1 mm 距离内神经元数量 B 组(25.2 ± 11.4)明显少于 A 组(208.1 ± 18.5)($P<0.05$);C 组(136.8 ± 13.7)明显多于 B 组($P<0.05$),但少于 A 组($P<0.05$)。



A:JNK1/2 的磷酸化情况;B:Bad(128)的磷酸化情况。1:正常对照组;2:缺氧缺血非刺激组;3:丰富环境刺激组

图 1　Western blot 分别显示各组大鼠脑海马 CA1 区组织中 JNK1/2 和 Bad(ser128)的磷酸化情况

3　讨论

脑海马 CA1 区是对缺氧缺血最为敏感而发生大量细胞凋亡的区域之一[3]。本实验证实了丰富环境刺激组海马 CA1 区神经元数量明显多于缺氧缺血非刺激组,说明在大鼠比较幼小时的早期给予丰富环境刺激可以起到抑制海马 CA1 区神经元凋亡的作用。本研究结果证明:脑缺血再灌注激活 JNK,JNK 活性激活与神经元凋亡有关[1]。JNK 的天然底物是 c-Jun,它已被生物学家看成细胞杀手。Bad 上有一位点是丝氨酸 128 位点(ser 128),JNK1/2 可以直接作用于这个位点且有协同效应,即 JNK1/2 磷酸化的升高可以促使 Bad(ser128)磷酸化升高,进而促进细胞凋亡[3]。在实验中我们使用免疫印迹方法检测各组大鼠脑海马组织中 JNK1/2 和 Bad(ser128)磷酸化水平,发现刺激组的磷酸化水平明显低于非刺激组,因而推测 JNK 信号通路可能介导了丰富环境刺激对神经元的修复作用。是否与 JNK 通路以外的其他信号通路也有关,还有待于进一步证实。

关键词: 缺氧缺血性脑损伤;丰富环境;海马;JNK1/2;Bad(ser128)

中图法分类号: R741.02　　**文献标识码:** B

参考文献:

[1] Zhang Q G, Wu D N, Han D, *et al*. Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury[J]. FEBS Lett, 2007, 581(3): 495 - 505.

[2] Sale A, Putignano E, Cancedda L, *et al*. Enriched environment and acceleration of visual system development[J]. Neuropharmacology, 2004, 47(5): 649 - 660.

[3] Wang X T, Pei D S, Xu J, *et al*. Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK1/2 on ischemic brain injury[J]. Cell Signal, 2007, 19(9): 1844 - 1856.

(编辑　龙　亮)