DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.020
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
1664 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)18-1664-03

# 大鼠脑缺血再灌注后DNA单链断裂与XRCC1的表达变化

方传勤,周华东,高长跃,邓 娟 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察脑缺血再灌注损伤中XRCC1表达、DNA单链断裂,探索它们的关系。方法 应用线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型;免疫组化检测XRCC1蛋白表达;单细胞凝胶电泳检测细胞DNA单链断裂。结果 基底节XRCC1在缺血再灌注10 min后即出现降低,1 h后整个大脑中动脉供血区XRCC1进一步下降,一直持续到48 h。单细胞凝胶电泳显示缺血再灌注10 min基底节区出现DNA单链断裂,12 h达到高峰,48 h仍有DNA单链断裂。结论 在脑缺血再灌注中,XRCC1早期降低是DNA单链断裂无法修复的机制之一。

关键词:XRCC1;DNA单链断裂;脑缺血
中图法分类号:R394.3;R743.310.2 文献标识码:A

# Changes of XRCC1 expression and DNA single-strand break following local cerebral ischemia/reperfusion in rats

FANG Chuan-qin, ZHOU Hua-dong, GAO Chang-yue, DENG Juan (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract**: Objective To investigate the expression of x-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and DNA single-strand break (DNA ssb) and their relation with cerebral ischemia/reperfusion in rats. Methods Adult Wistar rats were subjected to focal cerebral ischemia for 2 h, and then reperfused for 10 min and 1, 4, 12, 24, and 48 h. XRCC1 protein expression was analyzed by immunohistochemistry. DNA ssb was evaluated by comet assay. Results The XRCC1 level decreased markedly in the basal ganglia at 10 min, further decreased in the entire middle cerebral artery territory at 1 h, and remained decreasing until 48 h. DNA ssb appeared at 10 min after ischemia/reperfuion and peaked the value at 12 h after ischemia/reperfusion. Conclusion Early decrease of XRCC1 is one of the mechanisms in DNA ssb.

**Key words**: XRCC1; DNA single-strand break; cerebral ischemia

XRCC1(DNA蛋白X线修复互补组1)在DNA单链断裂修复中发挥核心作用[1],在脑缺血中其变化规律,以及XRCC1和DNA单链断裂关系尚不清楚。本实验在于研究脑缺血再灌注中XRCC1变化规律以及与DNA单链损伤的时空关系,探索DNA单链断裂机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

XRCC1单克隆抗体(美国Newmarker公司)、S-P免疫组化试剂盒(北京中山),溴化乙啶(EB)、低熔点琼脂糖、正常熔点琼脂糖由美国Sigma公司提供。

### 1.2 实验方法

动物模型和分组:健康、雄性,Wistar大鼠70只,体质量250~300 g,3~4月龄,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。应用线栓法[2]建立大鼠右侧大脑中动脉缺血再灌注模型,分为缺血2 h再灌注10 min、1、4、12、24、48 h组(每组动物10只)、假手术对照组(10只)。术后动物清醒后出现右侧horner征,爬行时向左旋转,提尾时左前肢内收屈曲为入选标准。假手术对照组,仅将大鼠右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉分离,不结扎、栓塞血管。

### 1.3 单细胞凝胶电泳

参照张建平等[3]的方法。在相应时点断头处死,快速取脑,分离大脑中动脉供血区皮质、基底节区,机械研磨法制备单细胞悬液,调细胞浓度为$1\times10^6$/ml。制胶、裂解、电泳、EB染色,在荧光显微镜下观察拖尾细胞,迁移距离>70 μm的细胞为拖尾细胞,每张玻片计数200个细胞中拖尾细胞所占的百分比作为评价DNA单链断裂的指标。

### 1.4 XRCC1免疫组化

在预定时相点戊巴比妥钠麻醉动物,用4%多聚甲醛100 ml 4℃通过左心室灌注固定,断头取脑组织,入4%多聚甲醛固定12 h,常规石蜡包埋、石蜡切片;免疫组化染色采用S-P法,DAB显色,苏木精复染。阴性对照使用PBS代替一抗,其余步骤同前。显微镜观察图像,XRCC1阳性细胞为细胞核被染成棕黄色或褐色,在200倍视野下,分别随机观察计数7个不重复视野的阳性细胞数,求阳性细胞数的百分比。

### 1.5 统计学方法

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS10.0行方差分析及均数

作者简介:方传勤(1970- ),男,安徽省淮南市人,硕士,主治医师,主要从事缺血性脑血管病方面的研究。电话:(023)68772983

收稿日期:2004-01-10;修回日期:2004-05-18

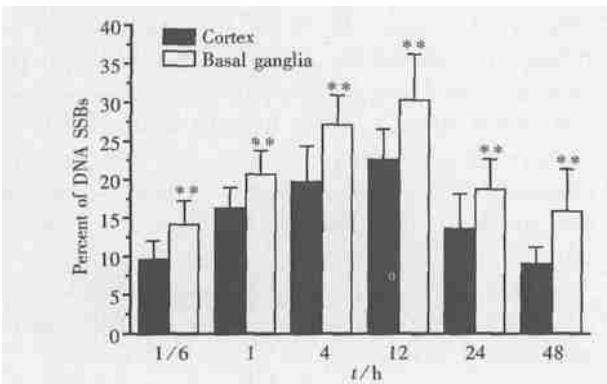
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

间多重比较。

## 2　结果

### 2.1　皮质和基底节 DNA 单链断裂情况

假手术组和缺血对侧皮质、基底节仅见极少量拖尾细胞, 缺血侧基底节区 10 min 出现少量拖尾细胞, 再灌注 1 h 后皮质和基底节区都出现较多的拖尾细胞, 再灌注 12 h 拖尾细胞达到高峰, 一直到 48 h 仍有拖尾细胞, 在缺血再灌注各时点检测中发现基底节区的拖尾细胞多于皮质区(图 1)。



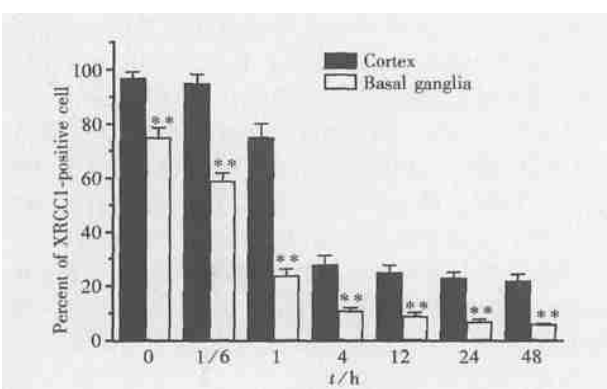

**: $P<0.01$, *vs* cortex

图 1　脑缺血再灌注 **DNA** 单链断裂百分比变化

**Fig 1　Changes of percentages of DNA SSB after cerebral ischemia-reperfusion**

### 2.2　XRCC1 免疫组化

XRCC1 免疫组化染色阳性细胞表现为棕黄色或黄色核染, 假手术对照组显示 XRCC1 蛋白在正常大鼠整个脑区表达, 而且在海马呈强阳性表达。缺血再灌注组染色发现再灌注 10 min 缺血侧基底节区阳性细胞数有所下降, 再灌注 1 h 缺血侧基底节区和皮质都发现阳性细胞下降, 阳性细胞减少持续到 4、12、24 h, 48 h 整个脑缺血区仍表现出阳性细胞数下降(图 2)。




**: $P<0.01$, *vs* cortex

图 2　脑缺血再灌注 **XRCC1** 阳性细胞百分比

**Fig 2　Percentages of XRCC1 postive cells after cerebral ischemia-reperfusion**

## 3　讨论

脑缺血再灌注时可扰乱脑组织的氧供和能量代谢, 产生大量具有强烈生物活性的自由基并引起级联式连锁反应[4], 导致最初几个小时内活性氧产生的高峰。活性氧族及其激发的毒性产物攻击脂质、蛋白、核酸, 神经元 DNA 是脑内氧自由基最主要的攻击目标, 可以导致 DNA 损伤[5]。DNA 断裂主要有 DNA 单链断裂和 DNA 双链断裂。通常认为双链断裂是细胞凋亡的生物学特征, 是不可逆的; 而 DNA 单链断裂可逆的, 可以通过 DNA 修复酶得以修复。但是大量 DNA 单链断裂可通过转化为 DNA 双链断裂或直接导致细胞凋亡。研究认为脑缺血再灌注 DNA 修复功能降低参与 DNA 的损伤, XRCC1 在 DNA 单链断裂修复中发挥核心的作用[6]。但是脑缺血再灌注 XRCC1 的变化规律, 以及在脑缺血再灌注中 XRCC1 与 DNA 单链断裂关系鲜见研究。

免疫组化和彗星电泳实验显示 XRCC1 阳性细胞改变和 DNA 单链损伤在时间上续惯性和空间变化的一致性。缺血再灌注中, 在时间上 XRCC1 减少早于 DNA 单链断裂; 在空间上, XRCC1 减少的部位正是 DNA 单链断裂较多的部位。这些结果提示 XRCC1 降低是导致 DNA 损伤的机制之一。XRCC1 能够修复由于活性氧族、烷化剂引起的 DNA 单链损伤和碱基破坏, 在保持遗传稳定中发挥重要作用。Kubota 等[7] 研究认为 XRCC1 的功能是作为"蛋白脚手架", 其它碱基修复酶锚在上面, 能够与多种修复酶结合并且明显缺乏内源性的接触反应。XRCC1 通过与 DNA 连接酶 3 和 DNA 聚合酶的相互作用来修复包括氧化应激在内的各种损害引起的 DNA 损伤[8]。进一步研究表明 XRCC1 作为碱基切除修复中介, 不仅通过交互作用, 而且调节酶的活性, XRCC1 上调 DNA 连接酶 3、脱嘌呤嘧啶核酸内切酶、多核苷酸激酶, 抑制 PARP-1、2 和 DNA 聚合酶 β 的活性[7,9]。因此, XRCC1 通过影响所有参与 DNA 碱基切除修复的关键酶, 在细胞对 DNA 损伤反应中发挥极其重要的作用。缺乏 XRCC1 的细胞增加 10 倍细胞死亡率, 降低 5 倍 DNA 单链损伤的修复率, 可以被转染野生性 XRCC1 纠正[10]。

缺血后选择性 XRCC1 下降的确切机制不清。但是缺血后 XRCC1 选择性的合成减少、蛋白降解增加是可信的。文献[11] 报道 APE/Ref-1(DNA 碱基切除修复酶)在脑缺血后迅速下降, 过度的表达内源性抗氧化酶 SOD1 的突变鼠与野生鼠相比在脑缺血再灌注中 APE/Ref-1 的下降明显减少。因此我们有理由相信选择性的 XRCC1 下降与氧化应激有关。事实上短暂性局灶性脑缺血再灌注模型与活性氧族有关, 正如 Chan 等[12] 研究中 SOD 转基因鼠和 SOD 基因敲除鼠与野生型鼠相比可以保护脑组织减轻缺血再灌注损伤。

总之, 本实验结果显示缺血再灌注后 XRCC1 迅速

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

下降并且这一降低早于 DNA 单链损伤的发生，而且 XRCC1 和 DNA 单链损伤的具有一定的空间关系。这些结果说明早期 XRCC1 下降可能是 DNA 修复机制障碍的部分原因。

参考文献：

[1] Cappelli E, Taylor R, Cevasco M, *et al*. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair[J]. Biol Chem, 1997, 272(38): 23970—23975.

[2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.

[3] 张建平，陈道达. 单细胞凝胶电泳技术及其应用[J]. 国外医学遗传学分册, 1997, 20(5): 231—234.

[4] Facchinetti F, Dawson V L, Dawson T M. Free radical as mediators of neuronals injury[J]. Cell Mol Neurobio, 1998, 18(6): 667—682.

[5] Antunes F, Cadenas E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of $H_2O_2$: submicromolar levels of $H_2O_2$ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(9): 1008—1018.

[6] Miki Fujimura, Yuiko Morita-Fujimura, Nobuo Noshita, *et al*. Reduction of the DNA base excision repair protei, XRCC1, may contribute to DNA fragmentation after cold injury-induced brain trauma in mice[J]. Brain Res, 2000, 869(1—2): 105—111.

[7] Kubota Y, Nash R A, Klungland A, *et al*. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein[J]. EMBO J, 1996, 15(23): 6662—6670.

[8] Nash R A, Caldecott K W, Barnes D E, *et al*. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III[J]. Biochemistry, 1997, 36(17): 5207—5211.

[9] Masson M, Niedergang C, Schreiber V, *et al*. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(6): 3563—3571.

[10] Thompson L H, Brookman K W, Jones N J, *et al*. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(12): 6160—6171.

[11] Fujimura M, Mortia-Fujimura Y, Kawase M, *et al*. Early decrease of apurinic/apyrimidinic endonuclease expression after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(5): 495—501.

[12] Chan P H, Epstein C J, Li Y, *et al*. Transgenic mice and knockout mutants in the study of oxidative stress in brain injury[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(5): 815—824.

（编辑 陈聪连）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)18-1666-01

## Amplatzer 偏心性封堵器治疗膜周部室间隔缺损

## Transcatheter closure of ventrialar septal defects with Amplazer

迟路湘，宋治远，何国祥，史光鉴 （第三军医大学西南医院心血管内科，重庆市介入心脏病学研究所，重庆 400038）

Amplatzer 封堵器治疗先天性心脏病动脉导管未闭(patent ductus arteriosus, PDA)、房间隔缺损(atrial septal defect, ASD)已取得了成功的经验。室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)约占先天性心脏病的20%。膜部VSD由于解剖结构上的特殊性，对其进行堵塞易引起严重的并发症[1]。因此，VSD封堵器的安置远较PDA、ASD困难。近来，我们采用Amplatzer偏心性封堵器(美国AGA公司)成功地治疗了4例膜周部VSD患者，初步结果报告如下。

### 1 材料和方法

患者4例，男2例，女2例，年龄6~20岁。经临床体检、心脏超声检查诊断为先天性心脏病，VSD。入选标准：年龄>4岁，体质量>15 kg，缺损位置在膜周部，且室缺上缘距主动脉瓣(右冠瓣)>3 mm，缺损<10 mm，伴有膜部瘤，轻度三尖瓣返流的可选择，无中度以上肺动脉高压，无其它需外科手术治疗的疾病。本组超声测量缺损直径分别为4、5、6、6、6 mm。

1例行2%奴夫卡因局部麻醉，3例行全身麻醉，穿刺右侧股动脉、股静脉。经股动脉穿刺成功后，静脉推注肝素100 U/kg，全身肝素化。插入猪尾巴导管至左心室，取左前斜位60°加头位20°行左心室造影，确定室间隔缺损的大小及位置。

造影后经股动脉送入Judkin右冠状动脉造影导管至左心室，经左心室将导管通过室间隔缺损处进入右心室，送入导引钢丝至肺动脉，再经股静脉送入圈套器，套住导引钢丝，并拉出体外，建立股动脉-股静脉轨道。

沿导丝经股静脉侧送入8F Amplatzer传送系统后，将Amplatzer偏心性封堵器前送至室缺处，边进封堵器边回撤右冠状动脉导管，使封堵器通过缺损处进入左心室，撤出右冠状动脉导管。在左室面缓慢释放封堵器第1个伞，超声显示无心室水平左向右分流，听诊杂音消失，再在右室面缓慢释放封堵器第2个伞，可见明显压迹，超声显示无分流，再次行左心室造影无残

（下转1669页）

作者简介：迟路湘(1962—)，男，河北省承德市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事心血管病介入诊断和治疗方面的研究，发表论文46篇。电话：(023)68754154

收稿日期：2003-03-18；修回日期：2003-09-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net