

· 论 著 ·

缺血性脑损伤中大鼠海马 CA1 区热休克相关因子变化的研究*

宋远见¹, 刘红芝¹, 温相如², 刘永民²

(徐州医学院:1. 基础学院;2. 公共教育学院, 江苏 221004)

摘要:目的 探明缺血性脑损伤过程中 SD 大鼠海马 CA1 区神经元热休克蛋白 72(HSP72)mRNA 和 HSP72 蛋白的表达情况。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注 30 min 组、缺血再灌注 3 h 组、缺血再灌注 12 h 组、缺血再灌注 1 d 组、缺血再灌注 3 d 组、缺血再灌注 5 d 组和缺血再灌注 7 d 组。采用 PT-PCR 和免疫印迹方法检测 SD 大鼠海马 CA1 区在缺血再灌注后不同时期的 HSP72 mRNA 和 HSP72 蛋白表达情况。结果 HSP72 mRNA 和 HSP72 蛋白在假手术组几乎没有表达,从再灌注 3 h 开始有少许表达,至再灌注 3 d 表达量最大,随后不断下降。结论 缺血性脑损伤过程中 HSP72 mRNA 和 HSP72 蛋白在缺血再灌注不同时期有不同的表达量,在再灌注 3 d 时表达量达到最高峰。

关键词:缺血性脑损伤;HSP72;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.007

中图分类号:R365.743

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2864-02

Study on change of heat shock-related factors in rat hippocampal CA1 region during ischemic brain injury*

SONG Yuan-jian¹, LIU Hong-zhi¹, WEN Xiang-ru², et al.

(1. School of Basic Medical Science; 2. School of Basic Education Sciences, Xuzhou Medical College, Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To clear the expressing of HSP72 mRNA and HSP72 protein in rat hippocampal CA1 region during ischemic brain injury. **Methods** SD rats were divided randomly into 8 groups: sham-operated, cerebral ischemia and reperfusion 30 min, cerebral ischemia and reperfusion 3 h, cerebral ischemia and reperfusion 12 h, cerebral ischemia and reperfusion 1 d, cerebral ischemia and reperfusion 3 d, cerebral ischemia and reperfusion 5 d, cerebral ischemia and reperfusion 7 d. The expressing of HSP72 mRNA and HSP72 protein in hippocampus of rats was detected by PT-PCR and immunoblot assay at different time of reperfusion. **Results** There was no any expressing of HSP72 mRNA and HSP72 protein in sham group, some starting from cerebral ischemia and reperfusion 3 h group, peaking in cerebral ischemia and reperfusion 3 d group, and declining in cerebral ischemia and reperfusion 5 d and 7 d groups. **Conclusion** There is maximal expressing of HSP72 mRNA and HSP72 protein in cerebral ischemia and reperfusion 3 d group although different groups express diversely.

Key words: ischemic brain injury; HSP72; rats

缺血性脑损伤常因脑血液循环障碍所致,患者常表现为猝然昏扑、不省人事或突然发生口歪眼斜、舌强言蹇、半身不遂、智力障碍等临床特征。据报道,每年约 460 万人死于脑卒中,其中约 86% 因缺血所致。因此,积极探索缺血性脑损伤中所涉及关键因子的状况,具有极其重要的医学价值。热休克蛋白 72(heat shock proteins 72, HSP72)是 HSP 家族中最重要的成员,也是应激诱导表达最多的成员。作为重要的分子伴侣, HSP72 能够结合各种变性蛋白,以防这些蛋白遭受免疫细胞的攻击^[1],因此 HSP72 对维持细胞稳态和细胞存活具有重要意义。本实验以大鼠双侧颈总动脉结扎脑缺血动物模型为基础,研究 HSP72 mRNA 和 HSP72 蛋白在缺血再灌注不同时期的表达情况,可望为进一步探讨 HSP72 在缺血性脑损伤中的作用机制提供可靠的实验基础。

1 材料与方

1.1 动物及分组 雄性健康 SD 大鼠 80 只,体质量为 250~300 g,均为清洁级。将大鼠随机均分为甲、乙两组,甲组用于检测 HSP72 mRNA 的表达,乙组用于检测 HSP72 蛋白的表达。甲、乙每个组又分别分为 8 组,即假手术组(Sham)、缺血再灌注 30 min 组(I/R30 min)、缺血再灌注 3 h 组(I/R3 h)、缺

血再灌注 12 h 组(I/R12 h)、缺血再灌注 1 d 组(I/R1 d)、缺血再灌注 3 d 组(I/R3 d)、缺血再灌注 5 d 组(I/R5 d)和缺血再灌注 7 d 组(I/R7 d),每组 5 只。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 腹腔注射 20% 水合氯醛(300~350 mg/kg)麻醉动物后,分离双侧颈总动脉并以宽松绳线套住但不结扎,电凝双侧椎动脉^[2-3]。手术第 2 天在动物清醒状态下结扎双侧颈总动脉,全脑缺血 15 min,然后再灌注不同的时间。缺血时保持直肠温度为 36.5~37.5 °C。假手术组实施与实验组相同的处理,但不结扎双侧颈总动脉。

1.2.2 样品制备和免疫印迹检测 甲组参照 Nikaido 等^[4]使用的方法,使用 Trizol 试剂盒抽提样品中总 RNA,使用 RT-PCR 试剂盒进行检测,引物序列为:5'-CCG GAG AGA AGG AGT AAC TTG ATA AG-3', 5'-TGG ATT AGA GGC TTT TCT GGC TC-3'。以 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照,引物序列为:5'-TGA ACA CGG CAT TGT AAC CAA C-3', 5'-CAG TGG TAC GAT GTA ACC AAC-3'。扩增产物经 2% 琼脂糖电泳,利用 Sensiansy 凝胶图像分析软件进行拍照并进行电泳图像分析。以 I/R3 h 组为基准(假设为 1),其余各组与之相除

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800446);江苏省高校自然科学基金研究项目(09KJB310016);徐州医学院院课题(08KJ110)。

表 1 海马 CA1 区 HSP72 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

检测指标	Sham	I/R30 min	I/R3 h	I/R12 h	I/R1 d	I/R3 d	I/R5 d	I/R7 d
HSP72 mRNA	0.12±0.12	0.25±0.13	1	1.51±0.23	2.34±0.15	5.66±0.19	3.13±0.24	1.89±0.17

所得比值见表 1。

乙组于大鼠快速断头取脑后,分离出双侧海马 CA1 区,置液氮中冻存。下面步骤中的操作均在冰水浴中实施。由液氮中取出海马 CA1 区,注入 1.5 mL 内含蛋白酶抑制剂的匀浆缓冲液,匀浆(10 s×6 次)后,800×g 离心 10 min,弃去上清液,加入 0.6 mL buffer B 振荡摇匀,12 000×g 离心 10 min,取上清液,按改良 Lowry 法,用牛血清清蛋白作为标准蛋白测蛋白后分装,置于-80℃冰箱备用。按宋远见等^[5]的方法,等量蛋白样品经 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,电转移至 NC 膜上。转移后的 NC 膜经 3% BSA 室温封闭 3 h 后加入 HSP72 一抗,4℃过夜。用洗涤缓冲液洗膜 3 遍,加入二抗 IgG,37℃孵育 2 h,再用洗涤缓冲液洗膜 3 遍。用 NBT/BCIP 显色,双蒸水冲洗以终止反应。结果用图像处理仪(Gene Company)分析处理。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

HSP72 mRNA 表达见表 1, HSP72 蛋白表达见图 1。

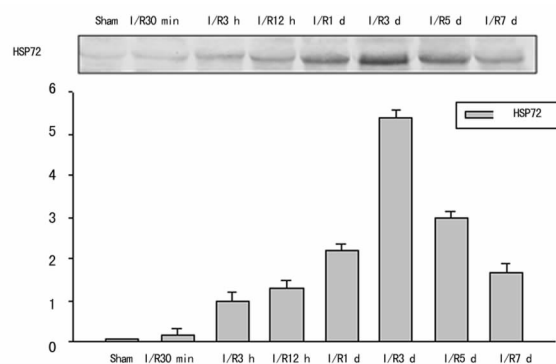


图 1 海马 CA1 区 HSP72 蛋白表达情况

3 讨 论

HSP72 是 HSP 家族中最重要的成员,也是应激诱导表达最多的成员。正常情况下, HSP72 主要位于细胞浆中,当细胞遭受感染或氧化应激时, HSP72 有一部分向细胞核内移位,发挥细胞保护和免疫调节作用^[6]。有研究发现, H₂O₂ 和 HS (heat shock) 等刺激能够促进巨噬细胞 HSP72 发生核移位,核聚集的 HSP72 能够与多种核蛋白发生相互作用,随着刺激时间延长, HSP72 又能够回到细胞浆中^[7]。HSP72 中存在一个重要结构域即 PBD 结构域,通过该结构域 HSP72 能够与蛋白激酶 C 和 JNK1、Akt 等多种蛋白结合,进而发挥生物学功能。另外,该结构域可以通过基因重组方法去除,从而影响 HSP72 的功能,但并不影响 HSP72 的核移位^[8-9]。作为重要的分子伴侣, HSP72 能够结合各种变性蛋白,以防这些蛋白遭受免疫细胞的攻击^[10],因此 HSP72 对维持细胞稳态和细胞存活具有重要意义。

以 SD 大鼠脑缺血模型为基础研究 HSP72 mRNA 和蛋白的表达时间窗,是研究缺血性脑损伤中热休克作用机制的重要实验基础。本研究结果显示, HSP72 mRNA 和蛋白在假手术组和缺血再灌注早期没有表达,从再灌注 3 h 开始有少许表达,至再灌注 3 d 表达量达到最高峰,随之渐渐下降。这一结果初步提供了 HSP72 mRNA 和蛋白在缺血性脑损伤过程中表达的时间趋势,可望为进一步研究热休克作用的相关机制提供一定的依据。

参考文献:

- [1] Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Nature, 1996, 381(6583): 571.
- [2] 宋远见,刘红芝,裴冬生,等. Akt 信号通路介导脑缺氧缺血后丰富环境对幼鼠海马神经元的影响[J]. 江苏医药, 2009, 35(3): 299.
- [3] 宋远见,刘红芝,裴冬生,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2119.
- [4] Nikaido H, Tsunoda H, Nishimura Y, et al. Potential role for heat shock protein 72 in antagonizing cerebral vasospasm after rat subarachnoid hemorrhage[J]. Circulation, 2004, 110(13): 1839.
- [5] 宋远见,刘红芝,裴冬生,等. 一氧化氮对大鼠脑缺血再灌注后 JNK3、Bad (ser128) 和 c-Jun 磷酸化的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(12): 1817.
- [6] Cowan KJ, Diamond MI, Welch WJ, et al. Polyglutamine protein aggregation and toxicity are linked to the cellular stress response[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(12): 1377.
- [7] Lee WC, Wen HC, Chang CP, et al. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke[J]. J Appl Physiol, 2006, 100(6): 2073.
- [8] Mariucci G, Tantucci M, Giuditta A, et al. Permanent brain ischemia induces marked increments in HSP72 expression and local protein synthesis in synapses of the ischemic hemisphere [J]. Neurosci Lett, 2007, 415(1): 77.
- [9] Gao T, Newton AC. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of HSP70 to protein kinase C[J]. J Biol Chem, 2002, 277(35): 31585.
- [10] Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. Nature, 1996, 381(6583): 571.

(收稿日期:2010-06-21 修回日期:2010-07-30)