

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00055

## 脑缺血预处理对沙鼠前脑缺血再灌注后 HSP70 表达水平及学习记忆能力的影响

李建民<sup>1\*</sup>, 赵雅宁<sup>2</sup>, 安超旺<sup>1</sup>, 陈长香<sup>1</sup>, 朱 军<sup>2</sup>, 付爱军<sup>1</sup>

1. 华北煤炭医学院附属医院神经外科, 唐山 063000

2. 华北煤炭医学院护理系, 唐山 063000

**[摘要]** **目的** 研究脑缺血预处理对沙鼠前脑缺血再灌注后热休克蛋白 70(HSP70)表达水平及动物学习记忆能力的影响。**方法** 100 只蒙古沙鼠随机分成假手术(Sham)组、前脑缺血再灌注(I/R)组、脑缺血预处理(IP)组、放线菌酮+脑缺血预处理(Cycloheximide+IP)组, 每组 25 只。后 3 组参照 Kirino 法制备前脑缺血动物模型, Kitagawa 法制备脑缺血预处理动物模型。再灌注后 1、2、3 d 取各组动物脑组织行 H-E 染色, 观察海马 CA1 区神经元形态变化; 用 TUNEL 法检测神经细胞凋亡情况; 用免疫组织化学和蛋白质印迹法检测 HSP70 的表达水平。再灌注后 3、4、5、6、7 d 用 4-PTT 旱路迷宫法对沙鼠的学习记忆能力进行评定, 各取均值。**结果** 与 Sham 组比较, I/R 组沙鼠海马 CA1 区存活神经元密度降低( $P < 0.05$ ), 神经细胞凋亡数量增多( $P < 0.05$ ), HSP70 表达量增加( $P < 0.05$ ), 学习记忆能力下降( $P < 0.05$ ); 与 I/R 组比较, IP 组中沙鼠海马 CA1 区存活神经元密度增加( $P < 0.05$ ), 凋亡神经细胞数量回降( $P < 0.05$ ), HSP70 表达水平进一步增加( $P < 0.05$ ), 学习记忆能力得到改善( $P < 0.05$ ); 而 Cycloheximide+IP 组基本消除了 IP 组中的上述改变, 神经细胞形态及密度, 神经细胞凋亡数量, HSP70 表达水平、学习记忆能力与 I/R 组相似。**结论** 缺血预处理对脑缺血性损伤具有保护作用并可改善脑缺血后的学习记忆功能障碍。这可能是通过促进 HSP70 表达增加, 启动内源性的神经保护机制而加强了对再次缺血损伤的保护作用。

**[关键词]** 缺血预处理; 脑缺血; 热休克蛋白 70; 缺血耐受

**[中图分类号]** R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0055-05

### Effect of ischemic preconditioning on HSP70 expression and learning/memory after cerebral ischemia-reperfusion in gerbils

LI Jian-min<sup>1\*</sup>, ZHAO Ya-ning<sup>2</sup>, AN Chao-wang<sup>1</sup>, CHEN Chang-xiang<sup>1</sup>, ZHU Jun<sup>2</sup>, FU Ai-jun<sup>1</sup>

1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Northern China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei, China

2. Department of Nursing, Northern China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of ischemic preconditioning on heat-shock protein 70 (HSP70) expression and the learning, memory functions after forebrain ischemia-reperfusion injury in gerbils. **Methods** Gerbils ( $n=100$ ) were evenly randomized into four groups: Sham group, ischemia-reperfusion (I/R) group, ischemia preconditioning (IP) group, and Cycloheximide + IP group (Cycloheximide was administered 30 min before IP). Transient forebrain ischemia-reperfusion model was established by bilateral common carotid artery occlusion according to the method described previously, and ischemia preconditioning model was established as described by Kitagawa. Changes of neuron morphous in hippocampus CA1 region were observed by H-E staining 1, 2, and 3 days after reperfusion. The expression of HSP70 was examined by immunohistochemistry and Western blotting assay. Neuron apoptosis was detected by TUNEL method. The learning/memory functions of gerbils were examined using 4-PTT dry path maze 3, 4, 5, 6, and 7 days after reperfusion. **Results** Compared with Sham group, I/R group had significantly decreased survival neurons ( $P < 0.05$ ), increased neuron apoptosis ( $P < 0.05$ ), increased expression of HSP70 ( $P < 0.05$ ), and decreased learning/memory functions ( $P < 0.05$ ). Compared with I/R group, IP group had significantly increased survival neurons ( $P < 0.05$ ), decreased neuron apoptosis ( $P < 0.05$ ), and increased expression of HSP70 ( $P < 0.05$ ), and improved learning/memory functions ( $P < 0.05$ ). However, cycloheximide almost totally abolished the effect of ischemia preconditioning, with the neuron morphology, density, apoptosis, HSP70 expression, and learning/memory functions similar to

**[收稿日期]** 2009-05-12 **[接受日期]** 2009-08-16

**[基金项目]** 河北省卫生厅重点课题(07347). Supported by Key Subject of Health Bureau of Hebei Province(07347).

**[作者简介]** 李建民, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0315-3725385, E-mail:lijianmints@sina.com

those of I/R group. **Conclusion** Ischemic preconditioning can protect against cerebral ischemia injury and improve the learning/memory functions after forebrain ischemia-reperfusion damage, which is possibly through promoting HSP70 expression and starting endogenous neuroprotective mechanism, subsequently reinforcing the protective effect against ischemia.

**[Key words]** ischemia preconditioning; cerebral ischemia; heat-shock protein 70; ischemic tolerance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1): 55-59]

研究表明,短暂性脑缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)对神经细胞具有保护作用,可诱导机体抵抗后发生的较为严重甚至致死性的脑缺血事件,减轻脑缺血病变,此种现象称脑缺血耐受(ischemic tolerance, IT)<sup>[1]</sup>。目前,对IP神经保护作用的研究大多集中于脑缺血后的病理形态学改变以及行为运动能力方面,较少涉及学习记忆功能的变化。热休克蛋白70(HSP70)是一应激蛋白,研究发现它对脑缺血损伤具有保护作用<sup>[2]</sup>。但HSP70是否与脑缺血耐受过程中学习记忆变化有关,目前报道较少。本研究利用蛋白合成抑制剂放线菌酮阻断HSP70蛋白的合成,观察了缺血预处理后前脑缺血沙鼠学习记忆功能的变化,旨在进一步探讨HSP70在脑缺血耐受中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 动物分组及模型制作** 100只雄性健康蒙古沙鼠(购自上海生物制品有限公司实验动物中心),体重60~80g,9~12周龄,随机分成4组:假手术(Sham)组,脑缺血再灌注(I/R)组,脑缺血预处理(IP)组,放线菌酮+脑缺血预处理(Cycloheximide+IP)组,每组25只。Sham组只暴露血管,不夹闭颈总动脉;参照Kirino<sup>[2]</sup>的方法制作沙鼠前脑缺血再灌注模型(无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉,缺血10min后松开动脉夹,再灌注);根据Kitagawa等<sup>[3]</sup>的方法制作脑缺血预处理模型(短暂夹闭双侧颈总动脉2min,24h后再夹闭双侧颈总动脉10min后松开动脉夹,再灌注);Cycloheximide+IP组在脑缺血预处理前30min腹腔注射放线菌酮(2.5mg/kg)。整个操作过程在显微镜下进行,术中监测肛温,维持体温于36.8~37.2℃。因脑缺血预处理诱导脑缺血耐受的时间为1~7d,故本实验选择观察沙鼠再灌注后1、2、3d的脑组织形态变化、凋亡神经细胞情况及HSP70蛋白表达水平,同时对再灌注后3、4、5、6、7d的动物进行学习记忆能力的评定。

**1.2 脑组织形态结构观察** 各组动物以戊巴比妥钠麻醉(40mg/kg),用40g/L多聚甲醛经左心室灌注固定后取脑,后固定24h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片,片厚5μm。切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,H-E染色。每只沙鼠取连续3张

冠状背侧海马切片,采用美国Bio-Rad公司图像分析仪,计数正常神经元,取均值。

**1.3 TUNEL法观察神经细胞凋亡情况** 标本多聚甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,按TUNEL检测试剂盒(Roche公司)说明书操作,BCIP/NBT显色。阳性率的定量分析:每个标本取3张切片,每张切片在海马区随机选取4个视野,200倍光镜下应用目镜网格测试系统,计数阳性细胞,取均值。

## 1.4 HSP70蛋白表达水平的检测

**1.4.1 免疫组化法检测** 标本多聚甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,按SABC试剂盒说明书进行HSP70免疫组化染色:0.3%过氧化氢室温孵育5~10min。蒸馏水洗3次。滴加正常山羊血清封闭液,室温20min,甩去多余液体,不洗。滴加兔抗鼠HSP70抗体(1:150, Santa Cruz公司),4℃过夜,0.1mol/L PBS洗2min×3次。滴加生物素化山羊抗兔IgG(武汉博士德生物工程有限公司),20~37℃,20min,0.1mol/L PBS洗2min×3次。滴加SABC,20~37℃,20min,0.1mol/L PBS洗5min×4次。DAB显色,不复染。利用多媒体彩色病理分析系统计数,取均值。

**1.4.2 蛋白质印迹法检测** 沙鼠处死后,迅速取双侧海马CA1区组织,称量0.6g,4℃PBS充分洗涤,加入3倍体积的4℃全细胞裂解液,冰浴中匀浆,4℃离心5min,12000r/min(离心半径3.5cm),取上清液。考马斯亮蓝法测各样本的蛋白含量后,取蛋白样品40μg与等体积上样缓冲液混合,煮沸10min,100g/L SDS-PAGE分离蛋白,转膜,封闭液室温下震荡2~3h,加入HSP70单克隆抗体(1:2000),4℃孵育过夜,TBST洗膜,标记二抗,37℃孵育1h,TBST洗膜,ECL显色,图像分析仪测定光密度,作定量分析。

## 1.5 4-PTT早路迷宫法测试沙鼠学习记忆能力

4-PTT早路迷宫是日本山形大学医学部神经机能研究室研制开发的评价学习记忆能力的实验装置(主要用于评价不悉水性的蒙古沙鼠),通过记录沙鼠自然环境下进入迷宫的摄食情况,可以同时测试动物的活动状况、紧张状态、行动反应及学习记忆等情况<sup>[4]</sup>。本实验主要采用的检测指标为:(1)达到完成标准所需的实验次数(Qualified experiment);(2)每

次完成实验所用的时间 (Single test time); (3) 每次实验中从开始到吃掉第一个食物所用的时间 (First food time); (4) 每次实验中的非正确错误数 (Faulty experiment)。动物在进入测试的前 1 d 均进入迷宫训练 3 次。指标(1)、(2)、(3) 主要观察动物通过训练后能正确完成实验的情况, 反映动物参照记忆的形成, 指标(4) 主要观察动物进入无食物盒次数、重复进入已吃掉食物食盒次数, 反映动物工作记忆的形成。动物再灌注后 3~7 d 进行检测, 上、下午各 1 次, 连续 5 d 测试结果的总均值进行统计。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件包进行方差分析或 *t* 检验, 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 单侧

$P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 H-E 染色示脑组织形态学结果 实验结果如图 1 所示, Sham 组动物海马 CA1 区神经元结构完整, 排列整齐致密, 未见变性坏死的神经元; I/R 组各时间点均可见海马 CA1 区变性坏死神经元, 表现为细胞间隙加大, 细胞核浓缩、深染, 溶解、消失, 神经元密度均明显减少 ( $P < 0.05$ ); IP 组海马 CA1 区存活的神经元较 I/R 组明显增多, 神经元大部分结构完整, 神经元密度均明显增加 ( $P < 0.05$ ); Cycloheximide+IP 组神经元改变与 I/R 组相似。

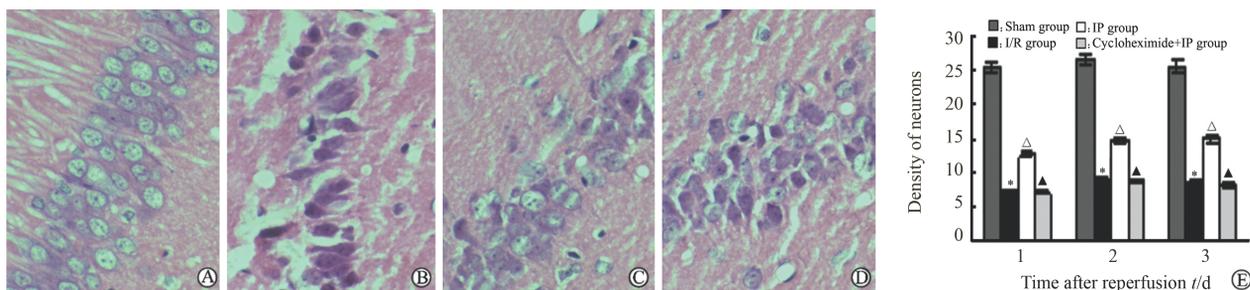


图 1 再灌注后 1 d 各组神经元形态变化 (A-D) 及随时间变化图 (E)

Fig 1 Morphological changes of neurons in each group 1 d after reperfusion (A-D) and its time course (E)

A: Sham group; B: I/R group; C: IP group; D: Cycloheximide+IP group; E: Changes of neuron density at different time points after reperfusion in each group; \*  $P < 0.05$  vs Sham group;  $\Delta P < 0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs IP group.  $n = 20, \bar{x} \pm s$ . Original magnification:  $\times 200$  (A-D)

2.2 神经细胞凋亡结果 TUNEL 法检测神经细胞凋亡结果如图 2 所示, 与 Sham 组比较, I/R 组 TUNEL 阳性细胞显著增多 ( $P < 0.05$ ); 与 I/R 组比

较, IP 组 TUNEL 阳性细胞减少 ( $P < 0.05$ ); Cycloheximide+IP 组 TUNEL 阳性细胞与 I/R 组表现相似。

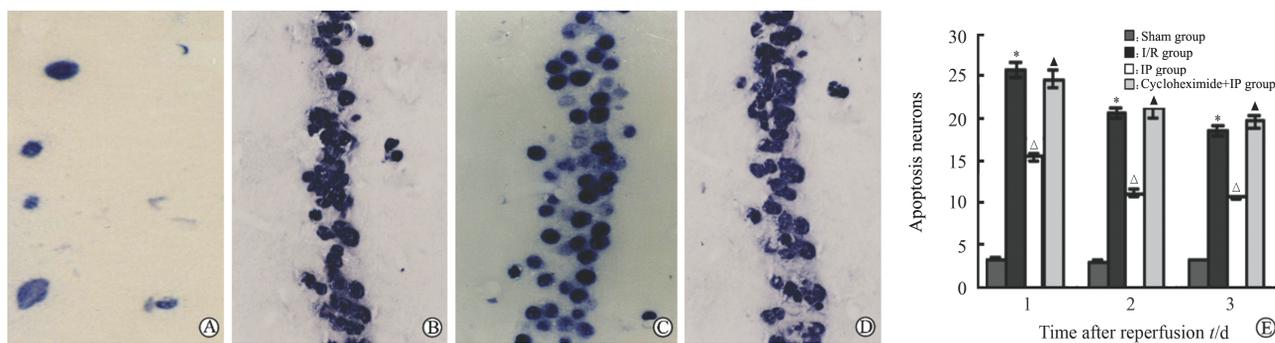


图 2 再灌注后 1 d 神经细胞凋亡情况 (A-D) 及随时间变化图 (E)

Fig 2 Apoptosis of neurons 1 d after reperfusion (A-D) and its time course (E)

A: Sham group; B: I/R group; C: IP group; D: Cycloheximide+IP group; E: Neuron apoptosis at different time points after reperfusion in each group. \*  $P < 0.05$  vs Sham group;  $\Delta P < 0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs IP group.  $n = 20, \bar{x} \pm s$ . Original magnification:  $\times 200$  (A-D)

## 2.3 HSP70 蛋白的表达

2.3.1 免疫组化检测结果 SABC 法中 HSP70 阳性染色呈棕黄色, 实验结果如图 3 所示, Sham 组, 未见 HSP70 阳性细胞; I/R 组中, HSP70 阳性细胞明

显增多, 染色棕黄; IP 组 HSP70 阳性细胞数目显著增多, 染色更深; Cycloheximide+IP 组 HSP70 阳性细胞数目及染色与 I/R 组相似。

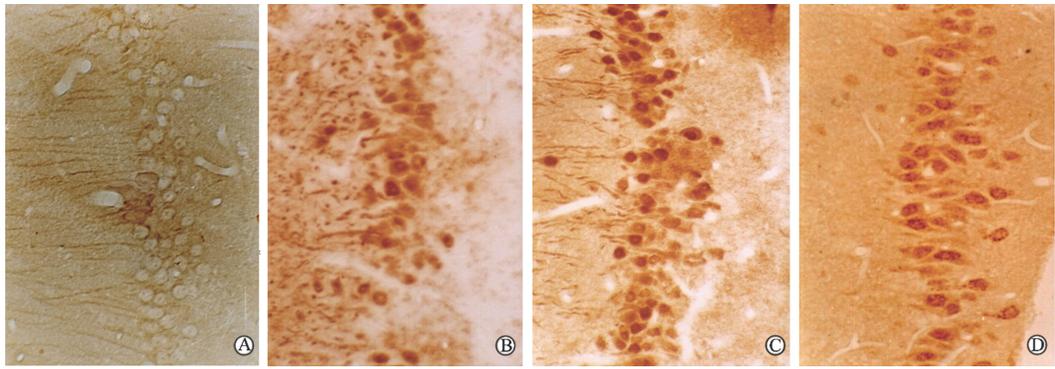


图3 再灌注后1 d各组 HSP70 蛋白免疫组化检测结果

Fig 3 HSP70 protein by immunohistochemistry 1 d after reperfusion(SABC)

A:Sham group;B:IR group;C:IP group;D:Cycloheximide+IP group. Original magnification:×200

2.3.2 蛋白质印迹法检测结果 结果如图4所示:与 Sham 组比较,I/R 组中 HSP70 蛋白表达增加 ( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,IP 组中 HSP70 蛋白表

达进一步增高 ( $P<0.05$ );放线菌酮抑制了 HSP70 蛋白表达 ( $P<0.05$ )。

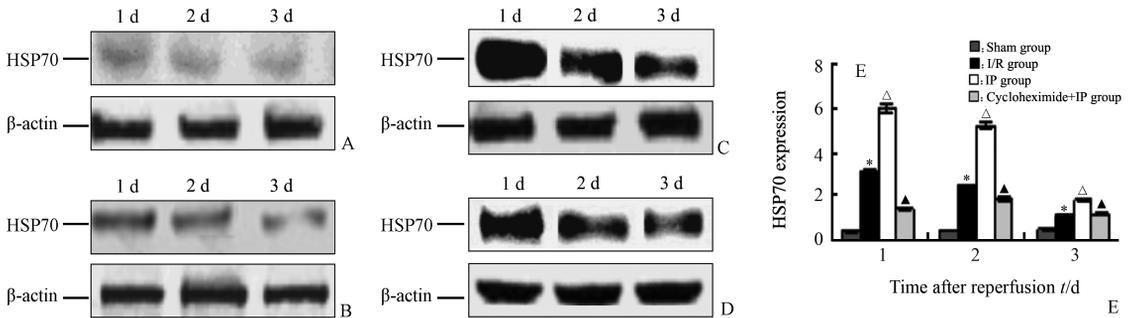


图4 再灌注后各组 HSP70 蛋白质印迹检测结果

Fig 4 Expression of HSP70 by Western blotting analysis after ischemia-reperfusion

A:Sham group;B:I/R group;C:IP group;D:Cycloheximide+IP group;E:HSP70 expression at different time points after reperfusion in each group. \*  $P<0.05$  vs Sham group;  $\triangle P<0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle P<0.05$  vs IP group.  $n=20, \bar{x} \pm s$

2.4 学习记忆能力测试结果 与 Sham 组比较,I/R组沙鼠的各项学习记忆指标都有明显差异 ( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,IP 组沙鼠的学习记忆指标有

较大的改善 ( $P<0.05$ );Cycloheximide+IP 组沙鼠各项指标则接近 I/R 组,具体数据见表1。

表1 各组学习记忆能力指标的变化

Tab 1 Comparison of learning/memory parameters in different groups

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Qualified experiment	Single test time t/s	First food time t/s	Faulty experiment
Sham	2.50±2.80	65.77±16.72	157.63±34.37	1.87±0.75
I/R	9.38±0.41*	117.73±20.08*	340.80±57.94*	7.36±2.97*
IP	8.48±1.74* $\triangle$	87.73±18.61* $\triangle$	189.09±35.68* $\triangle$	3.28±1.45* $\triangle$
Cycloheximide+IP	3.08±0.92* $\blacktriangle$	110.29±18.8* $\blacktriangle$	319.48±54.8* $\blacktriangle$	6.31±1.10* $\blacktriangle$

\*  $P<0.05$  vs Sham group;  $\triangle P<0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle P<0.05$  vs IP group. First food time: The time to finish eating the first food

### 3 讨 论

1990 年, 日本学者首次提出脑缺血耐受现象, 此后的 10 多年间, 缺血耐受对脑缺血性损的保护作用日益为人们重视。陈立英等<sup>[5]</sup>报道, 缺血预处理 10 min 可缩小局灶性脑缺血 24 h 后脑梗死体积的 53.2%, 并可显著改善大鼠的神经运动功能症状。缺血预处理的脑保护机制包括: (1) 抑制内源性毒性产物对神经细胞的损伤作用; (2) 调节脑缺血后信号通路的活性, 促进缺血再灌注后期内源性保护因子或蛋白的合成; (3) 改变遗传信息传递, 减少促凋亡蛋白的转录或表达, 减少脑细胞的死亡; (4) 抑制脑缺血后的氧化应激和炎性反应等<sup>[6-8]</sup>。但目前, 对缺血预处理脑保护作用的研究大多集中在脑缺血后的病理形态学改变, 或其对神经运动功能影响方面, 较少涉及缺血预处理与脑缺血后认知功能关系的方面。本研究发现, 沙鼠前脑缺血前 2 min 缺血预处理后, 沙鼠的参照记忆和工作记忆显著高于缺血组, 这说明缺血预处理对脑缺血后的学习记忆功能损伤有一定的保护作用, 这与国外的研究相符合<sup>[9]</sup>。

本研究结果显示, 脑缺血再灌注后海马 CA1 区神经元数目显著减少, TUNEL 阳性细胞增加, 缺血预处理可明显减少凋亡和坏死的神经元数量, 提高存活神经元密度; 与此相对应, HSP70 表达显著提高, 应用其抑制剂放线菌酮后 HSP70 的表达水平下降, 缺血预处理的保护作用基本被消除, 存活神经元密度、神经细胞凋亡数量以及学习记忆指标与缺血组相似。由此我们分析, 脑缺血预处理可通过增加 HSP70 表达水平, 激活其下游效应, 减少再发致死性脑缺血后的神经细胞凋亡, 改善脑缺血后的学习记忆功能障碍。

Brown 等<sup>[10]</sup>认为哺乳类动物脑缺血预处理可提高突触丰富区域的 HSP70 表达水平, 不仅依赖神经元自身 HSPs 的表达, 还能被邻近的神经胶质细胞表达的 HSPs 所补充。我们分析认为脑缺血预处理可使 HSP70 表达增加, 从而提高脑组织抗氧化能力、增强神经细胞拮抗兴奋性氨基酸毒性作用, 延缓细胞死亡; 也可能调节了 ATP 酶及某些信号转导激酶活性水平, 降低了蛋白质的分解, 降低凋亡蛋白的活性, 使神经元抵抗凋亡蛋白酶的作用, 易于存活, 从而减少神经细胞凋亡, 缩小脑梗死体积, 改善神经功能损伤程度<sup>[11-13]</sup>。缺血预处理通过增加 HSP70

蛋白表达, 诱导脑组织对缺血再灌注的保护效应, 这种间接保护缺血脑组织的继发性损害的规律可为临床治疗提供一条有效途径。

### [参 考 文 献]

- [1] Xu G P, Dave K R, Vivero R, Schmidt-Kastner R, Sick T J, Pérez-Pinzón M A. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures[J]. *Brain Res*, 2002, 952: 153-158.
- [2] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia[J]. *Brain Res*, 1982, 239: 57-69.
- [3] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Ninobe M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain[J]. *Brain Res*, 1990, 528: 21-24.
- [4] Fujii S, Kuroda Y, Li J, Ito K, Kaneko K, Sasaki H, et al. The temperature-dependent modulation of an inhibitory circuit in hippocampal slices as revealed by a population spike recording is mediated by extracellular adenosine[J]. *Jpn J Physiol*, 2001, 51: 545-554.
- [5] 陈立英, 廖仁昊, 苏立凯, 王 敬. 缺血预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的探讨[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27: 133-134.
- [6] Chu K, Lee S T, Sinn D I, Ko S Y, Kim E H, Kim J M, et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1(EAAT2) upregulation[J]. *Stroke*, 2007, 38: 177-182.
- [7] 王耀岐, 李 军, 曹 红, 李广明, 曾因明. ERK 和 JNK 通路在沙土鼠脑缺血预处理中的表达及作用[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22: 337-340.
- [8] Steiger H J, Hänggi D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2007, 149: 1-10.
- [9] Moncayo J, de Freitas G R, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect [J]? *Neurology*, 2000, 54: 2089-2094.
- [10] Brown I R. Heat shock proteins and protection of the nervous system[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2007, 1113: 147-158.
- [11] Soncin F, Zhang X, Chu B, Wang X, Asea A, Ann Stevenson M, et al. Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303: 700-706.
- [12] 胡 玲, 许喜泳. 缺血后处理联合预处理对大鼠脑组织 HSP70 的表达和脑缺血再灌注损伤的影响[J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2009, 10: 153-155.
- [13] 朴钟源, 江新梅, 罗守滨, 白春燕, 凌 丽, 殷 飞. 左归丸对老年性痴呆模型鼠脑神经元 HSP70 及超微结构的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29: 161-163.

[本文编辑] 陈 波