

c-Jun、bFGF、HSP70 在丹参改善颞叶缺血大鼠空间记忆障碍中的表达变化

吴卫平 姜树军 张小澍 匡培根 匡培梓 隋南 杨炯炯 胡家芬

【摘要】 目的: 探讨在丹参改善单侧颞叶缺血大鼠空间记忆障碍中 c-Jun、bFGF 和 HSP70 的表达变化。方法: 采用立体定向光化学方法选择性地导致大鼠左侧颞叶皮层缺血, 术前 30 分钟及术后第 3 天分别给丹参组大鼠腹腔注射丹参 10g/kg, 用 Morris 水迷宫及图像自动监视系统监测大鼠行为。然后取脑进行病理学及 c-Jun、bFGF 和 HSP70 免疫组化分析。结果: 经丹参治疗, 颞叶缺血性损害大鼠的空间记忆障碍得到显著改善, 颞叶缺血损害程度显著减轻, 缺血灶内 c-Jun、bFGF 和 HSP70 表达明显减少。结论: 丹参可以明显改善单侧颞叶缺血性损害大鼠的空间记忆障碍, 其机制可能与丹参减轻颞叶缺血损害, 下调 c-Jun、bFGF 和 HSP70 表达有关。

【关键词】 丹参 脑缺血 空间记忆 Morris 迷宫 c-Jun 癌基因

Expression of C-Jun, bFGF and HSP70 with improved spatial memory dysfunction by Radix salviae Miltiorrhizae in rats with left temporal ischemia Wu Weiping, Jiang Shujun, Kuang Peigen et al. Laboratory of Neurotransmitter, Chieses PLA General Hospital, Beijing 100853 Kuang Peizi, Sui Nan, Yang Jiongjiong et al. The Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101 Zhang Xiaoshu The Department of Neurology, Chinese PLA 261 Hospital, Beijing, 100094

【Abstract】 Objective: Effects of Radix Salviae Miltiorrhizae (RSM) on c-Jun, b-FGF and HSP70 were investigated. Methods: Selective left temporal ischemia of rats was induced by the photochemical method and RSM group was treated 30 minutes before and 3 days after the operation. Morris water maze and Morris Maze Experimental Assistant System were used to monitor the behavior. Then the rats brains were analysed by HE and immunochemistry of c-Jun, bFGF and HSP70. Results: PSM significantly improved the spatial memory of rats with left temporal ischemia. RSM reduced the ischemic damage and down-regulated the expression of c-Jun, bFGF and HSP70. Conclusion: RSM could improve spatial memory of rats with temporal ischemia. The down-regulation of the expression of c-Jun, bFGF and HSP70 is probably related to the neuroprotective mechanism.

【Key words】 Radix salviae miltiorrhizae (RSM) Cerebral ischemia Spatial memory Morris water maze C-Jun

丹参除可以减轻脑水肿、抑制血栓形成外, 还可以明显改善大鼠脑缺血后单胺类神经介质的紊乱, 调节神经肽及兴奋性氨基酸的含量, 清除自由基, 降低 NO 含量, 下调 c-fos 基因表达等^[1~3]。但丹参对行为障碍的改善作用尚缺乏系统的研究。我们以前的工作初步显示丹参可以改善颞叶缺血大鼠在 Y 型迷宫和跳台实验中的记忆能力^[4]。本实验采用先进的 Morris 迷宫进一步研究丹参对单侧颞叶皮层缺血性损害大鼠空间记忆障碍的改善作用。

脑缺血后, c-Jun 立即表达。c-Jun 蛋白同 c-Fos 蛋白构成 AP-1, 调节下游基因表达^[5]。bFGF 基因

是 AP-1 的下游靶基因之一^[6]。此外, 脑缺血后, 缺血神经元很快表达 HSP70 蛋白^[7]。因此本文在观察丹参对单侧颞叶缺血大鼠空间认知功能障碍改善作用的同时, 观察了 c-Jun、bFGF 和 HSP70 的表达变化, 以探讨丹参改善颞叶缺血损害大鼠空间记忆障碍的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组: 成年雄性 Wistar 大白鼠 (北京医科大学动物中心提供), 实验起始体重 200 ± 20g, 共 36 只, 随机分为 3 组, 单纯缺血组 (n = 12)、丹参组 (n = 12)、假手术组 (n = 12)。让动物适应实验环境 2 天, 然后进行行为实验 5 天, 实验期间摄食、饮水自由, 全部行为实验都在 10:00am ~ 5:00pm 之间进行。行为实验结束后, 立即取脑进行病

军队医药卫生九五课题资助项目 (96M125)

作者单位: 100853 北京中国人民解放军总医院神经介质实验室 (吴卫平 姜树军 匡培根) 北京中国科学院心理研究所 (匡培梓 隋南 杨炯炯 胡家芬) 北京中国人民解放军 261 医院神经科 (张小澍)

理检查及 c-Jun、b-FGF 和 HSP70 免疫组化分析。

1.2 动物模型的制备: 采用立体定向光化学诱导脑缺血技术。将大鼠麻醉后,固定在立体定位仪上,从尾静脉注射玫瑰红(RB,20mg/kg),切开头皮,确定颞叶位置,用光导纤维引导冷光,定向照射与左侧颞叶相应的裸露颅骨 20 分钟,造成局灶性颞叶缺血^[8]。术前 30 分钟,给丹参组大鼠腹腔注射丹参(10g/kg,北京第四制药厂生产),单纯缺血组则注射同等剂量的生理盐水。术后第 3 天给丹参组大鼠追加注射同等剂量的药物。假手术组大鼠仅进行了麻醉和手术切口。术后局部抗感染。

1.3 Morris 水迷宫行为实验: 行为实验具体过程我们将另文报道。

1.4 取脑固定: 行为实验结束后,即在实验开始后的第 8 日,将每组大鼠依然用 10%水合氯醛经腹腔麻醉(0.3g/kg 体重),开胸暴露心脏,夹闭腹主动脉。经主动脉,用生理盐水 20ml 迅速冲洗干净脑部血液,再缓慢灌注 4%多聚甲醛 40ml,对大鼠脑进行内固定。然后迅速取脑,置于 4%多聚甲醛中在 4℃下保存不超过 3 个月。

1.5 HE 染色: 每组取 6 只鼠脑,梯度酒精脱水,石蜡包埋,在石蜡切片机上从视交叉后 2mm 开始切片,片厚 5μm,每隔 50μm 取一片,共取 80 片。HE 染色后,在光镜下观察脑组织病理学改变。每只鼠脑取经缺血灶中心 5 张切片,在光镜下(10 目镜×10 物镜)数出每张切片缺血灶内缺血神经细胞数,计算出每组 6 只鼠脑的缺血神经细胞数平均值及标准差。然后组与组之间进行比较,用 t 检验。

1.6 免疫组化分析: 每组取 6 只鼠脑,20%蔗糖脱水,在冰冻切片机上经梗死部位行 30μm 厚连续冠状切片。取每只鼠脑经缺血灶相同层面切片行 c-Jun、bFGF 和 HSP70 免疫组化染色,c-Jun、bFGF 和 HSP70 抗体和试剂盒(包括抗血清、二抗和三抗)均为美国 Santa Cruz 公司产品,二胺基联苯胺(DAB)-镍呈色液,是在 0.05M Tris-HCL(pH7.4)中加入 0.05%DAB(中山公司)2.5%硫酸镍胺和 0.01%过氧化氢配制而成。具体步骤(1)在室温下将拟染切片放入 1% TritonX-100 中孵育 20min。(2)每张切片加入 1:100 的 c-Jun 或 1:100 的 bFGF;1:100 的 HSP70 单克隆抗体 200μl 和抗血清 50μl,在 4℃下孵育 48 小时。(3)每张切片加入二抗 200μl,在 4℃下孵育 24 小时。(4)每张切片加入三抗 200μl,在 4℃下孵育 12 小时。(5)室温下每片用二胺基联苯胺(DAB)-镍呈色液 1000μl 呈色 5min。(6)1%明胶贴片,在空气中干燥,酒精梯度脱水,二甲苯透明,D.P.X 封面。在以上各步骤转换间均用 PBS 漂洗(5min×3 次)。

取每只鼠脑经缺血灶的 5 张 c-Jun、bFGF 和 HSP70 免疫组化切片,在光镜下(10 目镜×10 物

镜),数出色免疫染色阳性细胞数,计算出每组 6 只大鼠的免疫染色阳性细胞平均值及标准差,然后组与组之间进行比较。

2 结果

2.1 行为实验结果: 关于行为实验的详细结果我们在另文报道。简言之,单纯颞叶缺血损害大鼠的空间记忆能力降低。丹参组颞叶缺血性损害大鼠的空间记忆功能障碍得到显著改善。而且丹参的改善作用在第二天即可出现。

2.2 颞叶缺血损害比较: 行为实验结束后,在显微镜下观察鼠脑系列 HE 染色切片发现:大鼠的缺血灶位于左侧(光照侧)皮层 Teaud 区及相邻 Str118 区部分,缺血灶中心层面位于视交叉后 4.8±0.5mm。缺血灶局限于颞叶皮层,同侧海马未受任何损伤。右侧(非光照侧)相应区域皮层放射状分布着神经元和神经胶质细胞,高倍镜下可见神经元大而圆,透明,有 1~2 个明显的核仁。而左侧(光照侧)皮层缺血灶中有大量缺血细胞,形状不规则,核固缩深染,胞浆嗜伊红。

单纯颞叶缺血大鼠的缺血神经元数最多;而丹参治疗组缺血神经元数减少;假手术组大鼠颞叶相应部位几乎无缺血损害(n=6,0~2 个),见表 1。表明丹参对颞叶皮层缺血有改善作用。

表 1 各组大鼠缺血神经细胞数比较

	n	缺血细胞(X±S)
单纯缺血组	6	1109±177.39
丹参组	6	225.83±57.45**
假手术组	6	0-2

注:两实验组比较:t=11.60,因方差不齐,按 t' 检验判断,**P<0.01。

2.3 c-Jun、bFGF 和 HSP70 免疫组化分析: 行为实验结束后,大鼠脑免疫组化检测发现,各组颞叶缺血灶 c-Jun、bFGF、HSP70 免疫阳性细胞数有显著差异。单纯缺血组 c-Jun、bFGF、HSP70 免疫阳性细胞表达最多,丹参治疗组三种免疫阳性细胞数减少,假手术且和单纯缺血组右侧相应部位有少量 c-Jun 表达,无 bFGF、HSP70 免疫阳性细胞表达,见表 2 和图 1~3(见封 2)。

表 2 各组大鼠 c-Jun、bFGF、HSP 免疫阳性细胞数比较

例数	免疫阳性细胞数 X±S		
	c-Jun	bFGF	HSP70
缺血组	6 52.33±9.18	44.83±4.45	55.50±6.62
丹参组	6 28.33±6.05	21.33±4.67*	22.5±4.41△
假手术组	6 12.83±3.76	0-3	0-3

注:c-Jun 三组比较 F=52.23, P<0.01; q 检验相互比较,三组间差异均有极显著意义,△P 均<0.01。bFGF 两实验组比较:t=8.92, P<0.01。HSP70 两实验组比较:t=10.16, *P<0.01。

3 讨论

我们的行为实验结果另文报道显示:单纯颞叶缺血损害大鼠的空间认知能力低下。而经丹参治疗,颞叶缺血性损害大鼠的空间认知功能障碍得到显著改善。而且丹参的改善作用在早期即可出现。此次的病理学结果显示,单纯颞叶缺血大鼠的缺血神经元数最多;而丹参治疗组缺血神经元数减少。丹参显著减轻颞叶缺血损害程度是丹参改善颞叶缺血损害大鼠记忆障碍的病理学证据。行为实验结束后,取脑进行的免疫组化分析显示,单纯颞叶缺血组 c-Jun、bFGF 和 HSP70 表达最多,丹参治疗组居中,假手术组最少或不表达。说明丹参显著下调了大鼠颞叶缺血脑区 c-Jun、bFGF 和 HSP70 的表达。

c-Jun 基因是哺乳动物细胞内基因的一个家族,原来它被叫作原癌基因,因为在组织癌变过程中 c-Jun 基因进行表达,而且它与 RNA 病毒转换癌基因 v-Jun 有相同的 DNA 序列。后来在研究细胞增殖时发现,细胞受到创伤或刺激时,c-Jun 基因也表达,而且是细胞中最早表达的基因之一,因此它又被称做即早基因(immediate early genes, IEGs)。离体实验发现,在培养的细胞中,c-Jun 基因能被神经递质、去极化和离子内流、谷氨酸受体激动剂、生长因子等诱导表达。在体实验发现,c-Fos 和 c-Jun 基因能被一系列刺激,包括创伤、缺血、抽搐和感觉刺激诱导表达。c-Jun 基因表达,转录生成 mRNA,核糖体以 mRNA 为模板翻译成 c-Jun 蛋白。c-Jun 蛋白和同时表达的 c-Fos 蛋白通过亮氨酸拉链区结合构成异构二聚体 AP-1。AP-1 通过与靶基因 promotor 区 TGAC/GTCA 序列结合,刺激靶基因表达。AP-1 的靶基因有脑啡肽前体基因、强啡肽基因、神经营养因子基因、碱性成纤维细胞生长因子基因^[5]。AP-1 通过靶基因将环境信号转变为细胞长时相反应。在本实验中,丹参显著下调大鼠颞叶缺血脑区 c-Jun 表达;而我们实验室以前的工作也发现经丹参下调缺血脑区 c-Fos 基因表达^[2],提示经丹参治疗后,光照颞叶受到的缺血、缺氧、兴奋性氨基酸、自由基、去极化和离子内流等损害性刺激减轻。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种多肽物质,其由 154 个氨基酸组成,分子量为 18kDa。bFGF 对中枢神经系统细胞具有强力营养作用和神经保护作用。通过与细胞表面高亲和力受体结合,bFGF 能促进神经元、胶质细胞以及血管内皮细胞存活;并在脑缺血后保护神经元免受缺氧、低血糖、兴奋性氨基酸、自由基、和一氧化氮损伤^[1]。在正常性况下,bFGF 在成熟的中枢神经系统内表达水平很低,在大部分脑区 bFGF 检测不到。在脑缺血后 2 周内,缺血脑组织中 bFGF 含量明显增加。深入研究显示,缺血脑区神经

元、星形细胞和血管内皮细胞强列表达 bFGF,表达持续时间最长可达 21 天。因为 bFGF 基因是 AP-1 的下游靶基因之一^[6],c-Jun、c-Fos 表达增多,AP-1 合成就要增多,则 bFGF 表达必将增多,以发挥对缺血细胞的保护作用 and 修复作用。反之,若细胞缺血损害减轻,c-Jun、c-Fos 表达减少,AP-1 合成减少,bFGF 表达必将减少。本实验显示经丹参治疗,缺血颞叶 bFGF 表达显著下调,进一步说明颞叶缺血损害显著减轻。

热休克蛋白是细胞内蛋白的一个家族,之所以被称为热休克蛋白,是因为细胞在热休克条件下(42°C, 20min)表达这些蛋白。除热休克条件外,缺血、缺氧、氧自由基、变性蛋白等刺激均能诱导热休克蛋白表达。热休克蛋白表达后具有积极的生物意义,因则被广泛研究。其中研究最多且生物意义最为肯定的热休克蛋白是 hsp70。任何脑区缺血后,缺血脑组织的神经元、星形细胞和血管内皮细胞均有表达 hsp70 的能力^[9]。本实验发现,单纯缺血颞叶 hsp70 蛋白表达最多,说明颞叶神经元受到的缺血打击最重,而经丹参治疗缺血颞叶 hsp70 蛋白表达明显减少,提示颞叶神经元受到的缺血缺氧应激打击明显减轻。

颞叶缺血大鼠经丹参治疗,c-Jun、bFGF 及 HSP70 三种细胞因子均下调,从三个角度说明颞叶神经元缺血损害明显减轻,因而大鼠空间认知障碍程度显著改善。提示丹参有助于改善缺血性脑血管病引起的记忆障碍。

参考文献

- 1 Kuang PG, Wu WP, Liu JX, et al. The effect of radix salviae miltiorrhizae on substance pin cerebral ischemia - animal experiment. *J Trad Chin Med*. 1991, 11:123~127
- 2 吴卫平,李振洲,匡培根. 脑缺血再灌注后脑组织 c-fos 基因表达及丹参的影响. *中国神经免疫学及神经病学杂志*. 1995, 2:1~3
- 3 陶沂,匡培根. 缺血再灌注时脑组织中 NO 含量的变化及腺苷的影响. *卒中与神经疾病*. 1995, 2:115~118
- 4 姜树军,吴卫平,匡培根,等. 丹参对颞叶梗死大鼠学习记忆能力影响的研究. *心理学报*. 1997, 29(增刊):75~77
- 5 Lun HM, Chen HH. C-fos protein expression and ischemic changes in neurons vulnerable to ischemia/hypoxia, corred with basic fibroblast growth factor immunoreactivity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994, 53:598~605
- 6 Huang Z, Chen K, Huang PL, et al. bFGF ameliorates focal ischemic injury by blood flow-independed mechanisms in eNOS mutant mice. *Am J Physiol*. 1997, 272(3pt2):H1401~1405
- 7 Sloviter RS, Lowenstein DH. Heat shock protein expression in vulnerable cells of the rat hippocampus as an indicator of excitation-induced neuronal stress. *J Neurosci*. 1992, 12:3004~3009
- 8 向敬,匡培根. 选择性白鼠感觉运动区梗塞模型建立与缺血损伤定量分析技术. *中华医学杂志*. 1994, 26:417~422
- 9 Aoki M, Abe K, Kawagoe J, et al. Temporal profile of the inductio of heat shock protein 70 and heat shock. *Brain Res*. 1993, 601:185~192

(1999-06-10 收稿 1999-07-20 修回)