

转 sTNFR 基因处理对供心缺血 / 再灌注损伤的保护作用

韩从辉¹, 郑巍², 董秉政¹, 郝林¹, 詹鸣², 李怀富², 张明³, 闵志廉³, 郑克立²

(1. 徐州市中心医院泌尿外科, 江苏 徐州 221009; 2. 中山大学第五医院泌尿外科, 广东 珠海 519000;

3. 第二军医大学器官移植研究所, 上海 200003)

摘要:目的 研究可溶性肿瘤坏死因子受体 (sTNFR) 基因直接体外灌注转染供者器官的效果, 利用小鼠异位心脏移植模型探讨 sTNFR 基因转染对供心缺血 / 再灌注损伤的保护机制。方法 实验分 3 组, 每组 C57/BL6(H-2K^b) 供体鼠和 BaB/c(H-2K^d) 受体鼠各 10 只, 在 0~4℃ 溶液中对 3 组 C57/BL6(H-2K^b) 小鼠的供心分别经主动脉缓慢灌注含编码小鼠 sTNFR-p55 基因的复制缺陷重组腺病毒载体 (Adm sTNFR 组)、复制缺陷重组腺病毒载体 AdHCV sp1LacZ (AdmLacZ 组) 的 PBS 和单纯 PBS (对照组), 灌注 1 h 后, 将供心移植给 BaB/c(H-2K^d) 受体鼠。检测各组移植受体鼠外周血清 sTNFR 的表达水平和移植浸润细胞 (GIC) 的数量, 并分析 Adm sTNFR 基因修饰后 GIC 的同种反应活性 (MLR)。结果 以 2×10^{12} pfu/L 的滴度转染移植心脏后, 12 h 即可在 Adm sTNFR 组小鼠的血清中检测到高水平的 sTNFR-p55 表达, 24 h 达到分泌高峰, 为 $(59.5 \pm 6.5) \mu\text{g/L}$; 而 AdmLacZ 组 24 h 的 sTNFR-p55 水平为 $(1.5 \pm 0.56) \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$), 对照组更低; 术后 14 天, Adm sTNFR 组仍持续表达有效高水平的 sTNFR-p55 [$(20.1 \pm 3.7) \mu\text{g/L}$]。Adm sTNFR 组移植心脏的 GIC 数目为 $(0.5 \pm 0.12) \times 10^6$ 孔, 明显低于对照组和 AdmLacZ 组的 $(5.0 \pm 2.2) \times 10^6$ 孔 ($P < 0.05$), 其比例为 1:10~1:20。将不同组的 GIC 与 γ 射线 (20 Gy) 灭活的供体鼠来源的 T 细胞作 72 h MLR, Adm sTNFR 组的 GIC 增殖受到了明显的抑制, AdmLacZ 组和对照组的 GIC 则显示较强的对同种刺激的增殖活性。结论 在低温 (0~4℃) 的条件下可以将编码 sTNFR 基因的腺病毒成功地转入移植心脏, 通过基因表达可长时间维持有效的 sTNFR-p55 的局部浓度, 减轻了受体鼠移植器官内的炎性细胞浸润, 并抑制移植器官内浸润细胞的同种反应活性。

关键词: sTNFR; 转基因; 器官移植; 心脏; 缺血 / 再灌注损伤; 小鼠

中图分类号: R617 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)04-0211-05

Protective effect of sTNFR gene transduction on ischemia-reperfusion injury of donor's heart

HAN Conghui¹, ZHENG Wei², DONG Bingzheng¹, HAO Lin¹, ZHAN Ming²,

LI Huaifu², ZHANG Ming³, MIN Zhilian³, ZHENG Kelí²

(1. Department of Urology Xuzhou Central Hospital Xuzhou Jiangsu 221009, China; 2. Department of Urology, The Fifth Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Zhuhai Guangdong 519000; 3. Center of Organ-Transplantation Affiliated Changzheng Hospital The Second Military Medical University of PLA, Shanghai 200003)

Abstract: Objective To investigate the transfection effects of sTNFR gene directly perfused to donor hearts in vitro and to explore the protective mechanism of sTNFR gene transduction to donor hearts against ischemia-reperfusion injury using the model of heterotopic heart transplantation in mice. Methods The experiment was carried out in three groups with each group containing 10 donor mice and 10 recipient mice. The donor hearts were infused with iced saline containing replication-defective recombinant adenovirus encoding murine sTNFR-p55 (for AdmLacZ sTNFR gene group), replication-defective adenovirus vector AdHCV sp1LacZ (for AdmLacZ vector group) and PBS (for control group) respectively, for 1 h before the donor hearts were transplanted to the recipients using cervical heterotopic heart transplantation method. The sTNFR-p55 level in serum and the graft infiltrating cell (GIC) count in each recipient group were examined with the allogeneic MLR in GIC analyzed as well. Results High level of sTNFR-p55 was detected in the serum of the Adm sTNFR gene group 12 hours after the transfection at MOI 2×10^{12} pfu/L which reached its peak $(59.5 \pm 6.5) \mu\text{g/L}$ 24 hours after the transfection. In contrast the sTNFR-p55 level in AdmLacZ vector group was staying at a much lower level $(1.5 \pm 0.56) \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$) 24 hours after the transfection. The sTNFR expres-

sion could still be kept at high level in the serum 14 days after transplantation in Adm sTNFR gene group. The GIC count in Adm sTNFR gene groups was $(0.5 \pm 0.12) \times 10^6$ /well, much lower than that in Adm LacZ vector group $(5.0 \pm 2.2) \times 10^6$ /well ($P < 0.05$). When GIC were cocultured with the γ -irradiation-inactivated allogeneic lymphocytes from donor mice for 72 h MLR, the proliferation of GIC was found obviously inhibited in the Adm sTNFR gene group as compared with that in the other two groups. Conclusion: These data indicate that adenovirus-mediated sTNFR-p55 gene can be transferred successfully to cardiac allografts by direct perfusion under hypothermic conditions ($0-4^{\circ}\text{C}$) in vitro, which can bring about sustained high local concentration of sTNFR-p55, decrease of GIC count in the graft heart and inhibition of the proliferation of GIC.

Key words: sTNFR; gene transduction; organ transplantation; heart ischemia/reperfusion injury; mice

器官保存在维持离体器官的功能方面起着最为重要的作用。在器官切取后等待移植手术的时间内,供器官质量的好坏直接影响到外科手术移植器官的功能恢复。缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R)是影响移植器官早期功能恢复的主要因素之一,近期的研究已经证实炎症反应在缺血再灌注损伤中的重要作用,因此我们试图从抑制炎症反应的角度探索防治缺血再灌注损伤的措施。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是此I/R过程中的关键性的致炎因子,其表达增高是该过程的关键环节。本试验利用腺病毒载体分别向切取后低温保存的动物器官组织中转入TNF的可溶性受体(soluble TNF receptor, sTNFR)基因,通过灌洗和保存使供器官局部表达sTNFR,在移植局部抑制和减轻TNF- α 的致炎症反应作用,减少缺血再灌注损伤的风险,从而达到有利于移植器官功能恢复的目的。

1 材料和方法

1.1 动物 8~12周雄性BaB/c(H-2K^d)和C57/BL6(H-2K^b)小鼠,体重20~22 g(± 1.5 g),购自第二军医大学实验动物中心,在无病原的环境中饲养。

1.2 试剂、仪器和细胞系 IFN- γ 、IL-4、IL-10和IL-2的ELISA检测试剂盒购于Endogen公司(Woburn, MA, Co., USA), sTNFR-p55的ELISA检测试剂盒购于BioSource Europe S.A.公司(Belgium),编码小鼠sTNFR-p55基因的复制缺陷重组腺病毒载体(Adm sTNFR-p55)由加拿大McGill大学路遥博士惠赠,复制缺陷重组腺病毒载体AdHCV-sp1LacZ(Adm LacZ)为靶病毒对照。Adm sTNFR-p55和AdHCV-sp1LacZ分别用293肿瘤细胞株(人胚肾肿瘤细胞株)扩增,感染细胞经反复冻融3次,收获上清,置 -70°C 保存,待用。病毒滴度检测由标准病毒滴度检测程序检测,以空斑形成单位

pfu/L表示。IV型胶原酶购于Sigma公司,完全细胞培养液由RPMI 1640加入体积分数为10%的灭活FCS(购于美国Gibco公司)、2 mmol/L谷氨酰胺、 1×10^5 U/L青霉素和100 mg/L链霉素配制,PBS购于上海第一医药公司。所有细胞均在 37°C 、5% CO₂和饱和湿度的环境下,悬浮于完全细胞培养液培养。液闪计数仪购于美国Wallac公司,80-1台式低速离心机购于上海医疗设备公司。

1.3 供体心脏体外灌注和实验分组 在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 乳酸林格液的冰水混合物中进行供心[C57/BL6(H-2K^b)鼠]的体外灌注。 2×10^{12} pfu/L的Adm sTNFR或Adm LacZ溶于总体积为0.5 ml $0-4^{\circ}\text{C}$ 的PBS中,经供心的主动脉缓慢灌注,1 h后将供心移植给BaB/c(H-2K^d)受体鼠。对照组灌注0.5 ml不含病毒的PBS。

实验分3组,每组10只C57/BL6(H-2K^b)供体鼠和10只BaB/c(H-2K^d)受体鼠,第1组为应用Adm sTNFR灌注过的C57/BL6(H-2K^b)小鼠供心进行移植(Adm sTNFR组),第2组为应用Adm LacZ灌注过的C57/BL6(H-2K^b)小鼠供心进行移植(Adm LacZ组),第3组为不含病毒的PBS灌注过的C57/BL6(H-2K^b)小鼠供心进行移植(对照组)。按照不同的实验目的进行取样和观察。

1.4 小鼠心脏异体移植模型制备 参照文献报道的颈部套管法建立小鼠异位心脏移植模型^[1],并作简要改进。整个操作在手术显微镜下进行,放大倍数为10倍。供鼠以苯巴比妥钠腹腔注射麻醉,开胸后经下腔静脉向心脏注入 5×10^4 U/L的 4°C 肝素生理盐水0.5 ml立即将心脏连同双肺完整切下,置 4°C 生理盐水中修整。切断左肺动脉装套管,游离主动脉至头臂干处切断。其余血管及双肺结扎切除。受体鼠[BaB/c(H-2K^d)]麻醉完成后切开右侧颈部皮肤,在血管夹阻断下切断右侧颈外静脉及颈总动脉,颈总动脉上套管,将供心的左肺动脉套管装入受体颈外静脉,受体颈总动脉套管装入供心主动脉,

分别结扎固定后开放血管夹。术后每天触摸移植心脏观察存活情况。

1.5 移植受体鼠外周血血清 sTNFR-p55 表达水平检测
于移植后的不同时间,从 3 组受体鼠的尾静脉获取外周血清 50 μl 用 sTNFR-p55 的 ELISA 试剂盒检测各组外周血血清 sTNFR-p55 水平。

1.6 移植植物浸润细胞 (grafts infiltrating cells GIC) 的分离
于移植后第 7 天,处死受体小鼠,获取 3 组的移植心脏,浸于质量浓度为 100 mg/L 的 IV 型胶原酶溶液中,37°C 消化 30 min,收集消化后的心肌细胞,用 PBS 洗 2 遍,用 Percoll 细胞分离液进行梯度离心 (80-1 台式低速离心机,2 000 r/min,30 min),收集悬于顶层 (含消化的间充质细胞和残余心肌细胞) 和界面的细胞 (即 GIC)。PBS 洗 2 遍,用 RPMI 1640 完全培养基将收获的细胞计数调至 2 × 10⁹ /L 待用。

1.7 GIC 的同种混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction MLR) 分析
将收获的 GIC 以不同的比例 (分别为 2.5:1、5:1、10:1、20:1) 与 γ 射线 (20 Gy) 灭活的 C57/BL6 鼠脾 T 细胞作 72 h 混合培养。混合培养在圆底 96 孔板内进行,每个比例设 3 个复孔。在培养的最后 12 h 加入 [³H]-胸腺嘧啶脱氧核苷 (TdR) 37 kBq/孔,用液闪计数器测定 [³H]-TdR 掺入,以每分钟脉冲数 (counts/min) 表示。

1.8 统计学处理
应用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验和方差分析检验各组均数间的差异,检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 受体鼠 sTNFR-p55 表达水平
以 2 × 10¹² pfu/L 的滴度转染移植心脏后, sTNFR-p55 的表达水平较为理想,12 h 即可在 Adm sTNFR 组的血清中检测到高水平的 sTNFR-p55 的表达,24 h 达到分泌高峰 (59.5 ± 6.5) μg/L; Adm LacZ 组 24 h 产生 sTNFR-p55 的水平仅为 (1.5 ± 0.56) μg/L 而对照组结果更低; Adm sTNFR 组与 Adm LacZ 组、对照组相比差异有显著性 (P < 0.05)。Adm sTNFR 组

sTNFR-p55 的表达在 24 h 达到高峰后呈不断下降趋势,但术后 14 天仍持续表达有效水平的 sTNFR-p55,为 (20.1 ± 3.7) μg/L。Adm LacZ 组和对照组术后 1 周内一直呈低水平的表达,但在第 8~10 天有一个数值较高的峰值 [(57.7 ± 6.4) μg/L],提示 sTNFR-p55 与 TNF-α 水平明显相关,排斥以后恢复至正常水平 (图 1)。

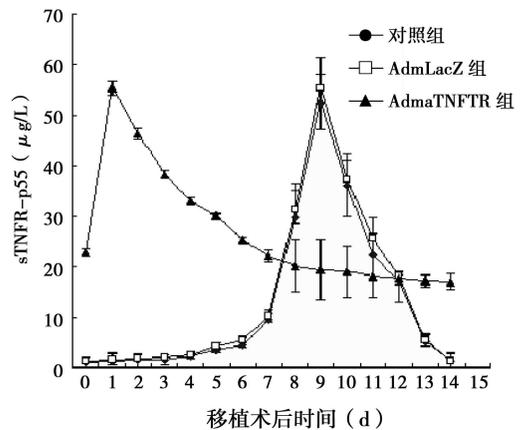


图 1 各组受体鼠外周血 sTNFR-p55 表达水平

2.2 Adm sTNFR 基因转染对 GIC 的 MLR 抑制作用
移植各组的 GIC 的数目存在明显差别, Adm sTNFR 组移植心脏的 GIC 数目为 (0.5 ± 0.12) × 10⁶ /孔,明显低于对照组和 Adm LacZ 组的 (5.0 ± 2.2) × 10⁶ /孔 (P < 0.05),其比例为 1:10~1:20。用 FACS 分析移植植物浸润细胞 MHC-II 分子 Ia^d 抗原的阳性率,表明 90% 的细胞为受体来源的 Ia^b (+) 细胞。Adm LacZ 组和对照组的 GIC 以 T 细胞为主, CD4 (+) T 细胞与 CD8 (+) T 细胞的比例为 4:1~5:1; Adm sTNFR 组的 T 细胞在 GIC 中的比例明显下降。

将不同组的 GIC 与 γ 射线 (20 Gy) 灭活的供体鼠来源的 T 细胞作 72 h 的 MLR (表 1), Adm sTNFR 组的 GIC 增殖受到了明显的抑制, Adm LacZ 组和对照组的 GIC 显示较强的对同种刺激的增殖活性。说明 Adm sTNFR 基因转染通过减少炎性细胞浸润和抑制 GIC 同种特异性反应性来抑制局部免疫应答反应。

表 1 Adm sTNFR 基因转染对 GIC 的 MLR 抑制作用 (n = 10, counts/min)

比例	对照组	AdmLacZ 组	Adm sTNFR 组	F	P
20:1 (G:T)	3.39 ± 0.5	3.20 ± 0.6	2.02 ± 0.5	7.258	<0.05
10:1 (G:T)	9.87 ± 1.2	8.60 ± 1.2	3.40 ± 0.8	12.975	<0.05
5:1 (G:T)	15.70 ± 2.0	16.58 ± 1.5	6.43 ± 1.1	17.102	<0.05
2.5:1 (G:T)	20.98 ± 2.2	22.98 ± 2.0	8.53 ± 1.2	17.389	<0.05

3 讨论

缺血再灌注损伤的本质是一种炎症反应,促进炎症反应的细胞因子有白细胞介素-1(IL-1)、TNF、IL-6等。TNF- α 在缺血再灌注损伤炎症反应的多个环节上起着至关重要的作用^[2],细胞因子中,TNF- α 是对炎症最有影响的起直接作用的物质之一。许多炎症都可通过TNF- α 受体拮抗剂来预防和消除,通过阻断TNF- α 的释放、抑制TNF- α 的生成能防止或消除炎症^[3-4]。在无免疫反应的情况下,器官缺血再灌注后早期组织内TNF- α 的mRNA表达即迅速升高,其中一部分是由缺血再灌注诱导组织产生,另一部分则是由浸润的炎性细胞所产生^[5]。因此,在移植局部抑制TNF- α 的作用将会极大地有利于缺血再灌注损伤的防治^[6]。

TNF- α 的生物学功能由膜型TNF受体(TNFR)所介导,对应于膜型TNFR,存在2种可溶性TNF受体(sTNFR),即sTNFR-p55和sTNFR-p75,主要功能是中和以及拮抗过多的TNF,减少TNF造成的损伤,中止炎症反应。sTNFR与多种疾病,如肿瘤、感染、自身免疫性疾病、移植排斥反应等的诊断和治疗密切相关^[7]。炎症反应时,机体通过膜受体脱落及蛋白合成机制产生sTNFR。膜受体脱落产生的sTNFR可调节炎症反应的强度和区域,起机体自我保护作用。sTNFR-p55的基因转移已被证明可通过阻断TNF- α 毒性抑制各种炎症反应^[8-9],并可延长同种异体胰岛移植物的存活,同时阻断抗腺病毒的免疫应答^[10]。但是这种转基因治疗在大器官移植中的研究及其在抗移植器官缺血/再灌注损伤中保护效果的研究都比较少。

本实验结果表明,在低温(0~4℃)的条件下可以将编码sTNFR基因的腺病毒成功地转入心脏移植植物,通过基因表达可以长时间维持局部有效的sTNFR-p55的浓度。通过对Adm sTNFR基因转染后移植心脏内浸润细胞的数目和活性的分析发现,Adm sTNFR组的移植心脏内的炎性细胞浸润明显减少。通过分析GIC同种刺激下的增生活性,提示Adm sTNFR基因表达对浸润的CD4(+)T和CD8(+)T细胞活性均产生了抑制作用。因此,sTNFR作为TNF- α 拮抗剂在移植器官的基因转染可以于局部微环境中抑制针对同种抗原的免疫应答反应,表现为减轻移植植物内的炎性细胞浸润、抑制GIC的同种反应活性。

我们认为,利用灌洗和保存供器官转基因方法

具有与其他转基因治疗方法不同的特点:供器官缺血再灌注损伤导致的炎症反应范围局限在供器官内,基因表达产物大量表达在供器官局部,随血流散布全身的产物极少,使得维持较长时间的转基因治疗成为可能,避免其他转基因治疗全身给药在局部往往尚未达到应有浓度时副作用已大得难以承受的缺陷。在下一步的研究中,我们还将对直接基因载体灌注修饰供器官后对移植局部的免疫调节和宿主系统免疫反应状态产生的影响和受体小鼠移植存活状况进行进一步的观察,以便更加深入地探讨Adm sTNFR基因直接灌注转染供器官的免疫学机制。

参考文献:

- [1] Luo H, Chen H, Qi S, et al. De novo-developed T cells have compromised response to existing alloantigens using L^d-specific transgenic 2C T cells as tracers in a mouse heart transplantation model [J]. *J Immunol* 1998, 161(1): 73-82.
- [2] Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, et al. Ischemic proximal tubular injury primes mice to endotoxin-induced TNF- α generation and systemic release [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, 289(2): F289-F297.
- [3] Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, et al. The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- α production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(38): 13622-13627.
- [4] Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, et al. The role of TNF- α in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera [J]. *Rheumatology* 2002, 41(3): 329-337.
- [5] Zhang C, Xu X, Potter BJ, et al. TNF- α contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26(3): 475-480.
- [6] Gao X, Xu X, Behadani S, et al. TNF- α contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27(6): 1269-1275.
- [7] Rosenberg JJ, Martin SW, Seely JE, et al. Development of a novel nonimmunogenic soluble human TNF receptor type I (sTNFR-I) construct in the baboon [J]. *J Appl Physiol* 2001, 91(5): 2213-2223.
- [8] Wang Q, Liu Y, Wang J, et al. Induction of allospecific tolerance by immature dendritic cells genetically modified to express soluble TNF receptor [J]. *J Immunol* 2006, 177(4): 2175-2185.
- [9] Rogy MA, Auffenberg T, Espat NJ, et al. Human tumor necrosis factor receptor (p55) and interleukin 10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory responses [J]. *J Exp Med* 1995, 181(6): 2289-2293.
- [10] Liang H, Yin B, Zhang H, et al. Blockade of TNFR1-mediated

ted TNF- α signaling protected Wistar rats from diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *Endocrinology* 2008, 13 [Epub ahead of print].

收稿日期: 2007-12-30 修回日期: 2008-03-31

本文编辑: 孙立杰

大鼠视上核和室旁核神经元钾离子氯离子共转运体 2 表达探讨

王德广^{1,2*}, 张静³, 陈菲菲³, 郑殿杰³, 陈幽婷²

(1. 徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院解剖学教研室;
3. 徐州医学院神经生物学教研室)

摘要:目的 观察神经元特异性标记物钾离子氯离子共转运体 2 在成年大鼠下丘脑视上核和室旁核的表达。方法 成年 SD 大鼠, 4% 多聚甲醛灌注固定, 取脑, 冰冻切片, 下丘脑部进行钾离子氯离子共转运体 2 和神经细胞核抗原免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察。结果 钾离子氯离子共转运体 2 在视上核和室旁核神经元中表达很弱。结论 下丘脑视上核和室旁核部分神经元缺少神经特异性的钾离子氯离子共转运体 2 表达。

关键词: 下丘脑; 视上核; 室旁核; 钾离子氯离子共转运体 2

中图分类号: R322.81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)04-0215-03

Absence expression of neuronal specific potassium chloride ion cotransporter 2 in supraoptic and paraventricular nuclei

WANG Deguang^{1,2*}, ZHANG Jing³, CHEN Feifei³, ZHENG Dianjie³, CHEN Youting²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Anesthesiology Xuzhou Medical College Xuzhou Jiangsu 221002, China;
2. Department of Anatomy Xuzhou Medical College; 3. Department of Neurobiology, Xuzhou Medical College)

Abstract: Objective To observe the neuronal specific expression of potassium chloride ion cotransporter 2 in adult rat supraoptic and paraventricular nuclei. Methods The adult SD rats were sacrificed and fixed with 4% paraformaldehyde to remove the brain for frozen-sectioning. The expression of potassium chloride ion cotransporter 2 and NeuN revealed by immunofluorescence were studied in the photos taken under laser confocal microscope. Results The expression of potassium chloride ion cotransporter 2 was absent from the supraoptic and paraventricular nuclei. Conclusion The neuronal specific potassium chloride ion cotransporter 2 is absent in the supraoptic and paraventricular nuclei.

Key words: hypothalamus; supraoptic nucleus; paraventricular nucleus; potassium chloride ion cotransporter 2

钾离子氯离子共转运体 2 (potassium chloride ion cotransporter 2, KCC2) 是成年哺乳动物脑内神经元特异性表达的膜蛋白^[1-2], 其对成熟神经元胞内的氯离子外排作用是维持成熟神经元胞内低氯离子浓度的重要因素, 而神经元胞内低氯离子浓度的维持是抑制性神经递质 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 离子型受体发挥抑制性作用的前提^[3-4]。我们以前的研究表明, 成年哺乳动物脑内的缰内侧核缺少 KCC2 蛋白的表达, 同时缺少 GABA 的 A 型 (GABA_A) 受体信号系统介导的抑制性作用^[5]。

正常脑功能的维持需要保持脑内兴奋性和抑制

性神经元活动的稳态平衡^[6], GABA_A 受体介导的抑制作用是中枢神经系统内主要的抑制性信号系统。下丘脑的视上核和室旁核的神经元既具有神经元的特点, 也具有分泌神经递质这一不同于神经元的特点, 他们分泌的催产素和加压素对调节生殖器官活动和水电介质平衡等起到重要作用。本研究使用免疫荧光双标并结合激光共聚焦显微镜成像技术检测神经元特异性的 KCC2 在下丘脑视上核和室旁核中的表达。

1 材料和方法

1.1 实验动物和切片制备 雄性 SD 大鼠, 体重

基金项目: 江苏省教育厅资助课题 (06KJD310188), 江苏省麻醉医学研究所开放课题 (卫 WK200601)

* 通讯作者, E-mail: deguangwang@xzu.edu.cn