

大鼠脑缺血 再灌注后海马 CA1区 HSP90的表达^{*}

温相如¹, 关秋华², 张光毅^{2*}

(1. 徐州医学院化学教研室, 江苏 徐州 221002; 2. 江苏省脑病生物信息重点实验室)

摘要:目的 观察大鼠脑缺血 再灌注后海马 CA1区热休克蛋白 90 (HSP90)的表达。方法 应用免疫印迹法观察大鼠脑缺血 再灌注后不同时间点海马 CA1区 HSP90的表达。结果 缺血 再灌注 30 min后 HSP90的表达开始增高, 6 h达最高峰, 持续升高至第 3天, 6 h后 HSP90的表达与对照组相比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 大鼠脑缺血 再灌注早期可诱导海马 CA1区 HSP90的合成及表达增加, 表明 HSP90参与了脑缺血有关的病理及生理过程。

关键词: 脑缺血 再灌注; 热休克蛋白 90; 海马 CA1区

中图分类号: R743.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)12-0774-02

目前普遍认为热休克蛋白 (heat shock protein⁹⁰, HSP90)是一类应激保护性蛋白。有文献表明 HSP90和相当数量的信号分子相互关联, 并通过对底物蛋白的作用, 影响疾病的发生和发展。由于 HSP90属应激反应蛋白, 而海马 CA1区是大鼠脑缺血最敏感的区域, 短暂性的脑缺血 再灌注 (I/R)过程中, HSP90在海马 CA1区锥体细胞内的表达, 是反映缺血敏感而可靠的指标。本实验对脑缺血 再灌注过程中大鼠海马 CA1区 HSP90的表达进行检测并探讨其在缺血性神经元损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料 雄性 SD大鼠, 250~300 g 清洁级, 徐州医学院实验动物中心提供; anti-HSP90由 Santa Cruz公司提供; 二抗和标准牛血清白蛋白均购自美国 Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 参照已建立的大鼠四动脉结扎模型^[1], 动物以 20%水合氯醛 (300~350 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 分离双侧颈总动脉, 电凝椎动脉。手术第 2天动物分别在缺血前随机分为假手术组及脑缺血 再灌注 0 min, 30 min, 3 h, 6 h, 16 h, 1 d, 3 d组, 每组 5只; 于清醒状态下结扎双侧颈总动脉, 全脑缺血 15 min, 然后再灌注。缺血时保持大鼠直肠温度 36.5~37.5℃, 以体征表现判断缺血模型的可靠性。假手术组不结扎双侧颈总动脉。

1.2.2 样品制备 大鼠缺血 15 min再灌注后, 按

照再灌注时间的不同, 断头快速取脑, 分离双侧海马, 沿海马裂将 CA1区分离出来, 置液氮中冻存备用。以下操作均在冰水浴中进行: 从液氮中取出海马 CA1区加 0.8 ml匀浆缓冲液, 用 Glas-Col匀浆器高速匀浆 (10 s×12次), 4℃下 800 g离心 15 min, 移取上清液 (主要为胞质部分), 测蛋白后分装, 置 -80℃冰箱待用。

1.2.3 蛋白含量测定 按 Lowry等^[2]方法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.4 免疫印迹法 按 Hu等^[3]方法, 等量蛋白样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)分离后, 以半干转法电转移至 NC膜上。转移后的 NC膜经 3% BSA封闭后加入稀释好的一抗, 4℃过夜。用洗涤液洗膜, 加入相应的二抗, 室温孵育 2 h以 NBT/BCIP显色, 水洗终止反应, 扫描显色条带并以 LabWorks软件分析处理。

1.3 统计学处理 数据用统计分析软件 Sigma Stat 3.2处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 q检验 (Newman-Keul test), $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

按 I/R时间的不同, 对各组海马 CA1区的 HSP90进行免疫印迹检测, 结果发现从 I/R 30 min开始 HSP90的表达开始增高, 6 h达最高峰, 并持续升高至第 3天, 而且 I/R 6 h组与假手术组相比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。见图 1。

* 基金项目: 国家自然科学基金 (90608015); 江苏省教育厅资助项目 (06KJB180113)

* 通信作者, E-mail: gyzhang@xzu.edu.cn

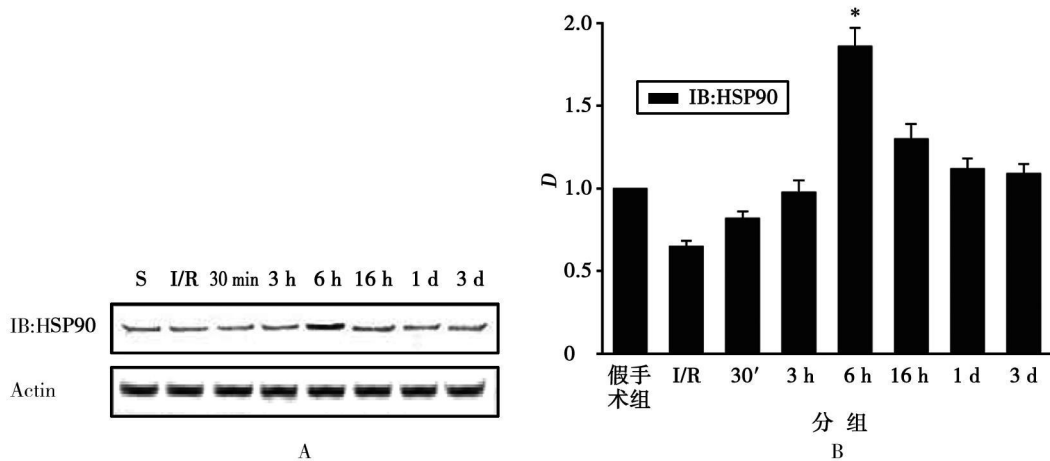


图 1 免疫印迹法测得 I/R 后不同时间点海马 CA1 区 HSP90 的蛋白表达条带 (A) 及扫描图 (B) (n=5) 与假手术组 (sham) 比较: * P<0.05

3 讨论

HSP90 作为分子伴侣中的一员, 在进化上高度保守, 人体细胞内 HSP90 分为 α 型和 β 型, 两者间同源性为 84%, 其共同结构特征为 N 端含有 ATP 酶结合位点, C 端则含有形成 HSP90 同源二聚体所必需的由 190 个氨基酸残基组成的结合亚单位^[4]。HSP90 的底物多为涉及信号传递的蛋白质, HSP90 对其稳定性和活性具有重要的调节作用。有研究表明 HSP90 的分子伴侣功能需要 ATP 的结合和水解, 同时依赖于不同的辅助伴侣分子构成伴侣蛋白复合体^[5]。依结合 ATP/ADP 状态的不同以及辅助伴侣分子的不同, HSP90 对底物蛋白发挥着截然相反的调节作用。当 ATP 与 HSP90 结合时, HSP90 与 p23 和 p50cdc37 形成伴侣复合体, 该复合体有助于 HSP90 底物蛋白的稳定及活性; 而当 HSP90 与 ADP 结合时, HSP90 与 HSP70 以及 p60Hop 形成的伴侣复合体却促进底物蛋白的泛素化并经蛋白酶体通路降解^[6]。新近的研究表明 HSP90 和辅助伴侣分子 p50cdc37 还参与了对 JNK 及 p38 上游激酶 MLK3 (mixed lineage kinase³) 稳定性和活性的调节, 当 HSP90 功能受到抑制时, MLK3 激酶水平明显降低, TNF α 诱导的 MLK3 及 JNK 的活化随之被阻断^[7], 这一结果提示可能一些促进凋亡的蛋白质同样受到 HSP90 伴侣功能的调控。本实验结果表明, 脑缺血 /

再灌注诱导了海马 CA1 区 HSP90 的过表达, HSP90 的过表达参与了脑缺血的病理与生理过程, 其原因可能与促凋亡通路 JNK 信号通路相关, 也可能与脑缺血后神经细胞的内源性保护机制有关。

参考文献:

- [1] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke* 1979, 10(3): 267-272.
- [2] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*. 1951, 193(1): 265-275.
- [3] Hu BR, Wieloch T. Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia [J]. *J Neurochem*. 1994, 62(4): 1357-1367.
- [4] Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool [J]. *J Cell Biol* 2001, 154(2): 267-273.
- [5] Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo [J]. *EMBO J* 1998, 17(16): 4829-4836.
- [6] Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003, 228(2): 111-133.
- [7] Zhang H, Wu W, Du Y, et al. Hsp90/p50cdc37 is required for mixed-lineage kinase (MLK)³ signaling [J]. *J Biol Chem*. 2004, 279(19): 19457-19463.

收稿日期: 2008-10-17 修回日期: 2008-12-10

本文编辑: 程春开