

细胞外信号调节激酶在局灶性脑缺血中的表达 PDF转换可能丢失图片或格式，建议阅读原文

[https://www.100test.com/kao\\_ti2020/491/2021\\_2022\\_\\_E7\\_BB\\_86\\_E8\\_83\\_9E\\_E5\\_A4\\_96\\_E4\\_c67\\_491791.htm](https://www.100test.com/kao_ti2020/491/2021_2022__E7_BB_86_E8_83_9E_E5_A4_96_E4_c67_491791.htm) 【关键词】 脑缺血；

再灌注；丝裂原激活蛋白激酶类；细胞凋亡；梗塞，大脑中动脉；大鼠

Expression of extracellular signalregulated kinase in focal cerebral ischemia ZHANG XiaoYan , YANG JinSheng , GU YouQuan , SHI XiangQun Department of Neurology , Lanzhou General Hospital , Lanzhou Uilitary Area Command , Lanzhou 730050 , China , Clinical Medical School , Lanzhou Mniversity , Lanzhou 730000 , China 【Abstract】 AIM :

To study the role of extracellular signalregulated kinase ( ERK ) during focal cerebral ischemiareperfusion in hippocampal neurons of rats. METHODS :

Sixty male adult Wistar rats were randomly divided into 2 groups ( n=30 per group ) : the sham operation group and the ischemiareperfusion group ( I/R group ) 。

The rats of I/R group were subjected to 2 h of right middle cerebral artery occlusion ( MCAO ) with introducing a nylon suture to the right internal carotid artery and then 3 , 6 , 24 , 48 and 72 h of reperfusion , respectively ( as 5 subgroups , n=6 in each subgroup ) 。

The histopathologic changes were observed by HE staining. The apoptotic neurons were detected in CA1 area of hippocampus by TUNEL method. ERK phosphorylation was detected by immunohistochemistry. RESULTS :

In I/R group as compared with shamoperation group , after MCAO , the survival neurons in CA1 areas decreased ; a lot of apoptotic cells were observed and

peaked at 48 h ; ERK activity increased 3 h after MCAO and peaked at 6 h and returned to the normal level at 72 h.

**CONCLUSION :** Cerebral ischemiareperfusion may result in the upregulation of ERK activity , and participate in the process of neuron apoptosis. 【Keywords】 brain ischemia ; reperfusion ; mitogen activated protein kinases ; apoptosis ; infarction , middle cerebral artery ; rats 【摘要】 目的：研究细胞外信号调节激酶（ERK）在局灶性脑缺血再灌注海马神经元中的表达。方法：线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞（MCAO）模型。大鼠随机分成假手术组（sham组）、脑缺血再灌注组（I/R组），每组根据再灌注时间不同再分为3，6，24，48和72 h亚组，每亚组各6只鼠。在预定时间点进行HE染色观察组织学变化；TUNEL法检测CA1区细胞凋亡的动态变化规律；免疫组织化学方法研究ERK的表达特征。结果：MCAO后海马神经元存活数量较假手术组明显减少；凋亡细胞大量出现，以48 h为高峰；MCAO后3 h，磷酸化ERK在局灶性脑缺血大鼠脑组织中显著升高，6 h达到最高峰，72 h恢复到正常水平。结论：脑缺血再灌注损伤可能导致ERK活性上调，参与缺血后神经细胞凋亡过程。【关键词】 脑缺血；再灌注；丝裂原活化蛋白激酶类；细胞凋亡；梗塞，大脑中动脉；大鼠

0 引言 近年来人们对脑缺血再灌注损伤进行了广泛研究，认为细胞信号转导参与调节中枢神经系统神经细胞的损伤。丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activation protein kinases，MAPKs）通过磷酸化转录因子而改变基因的表达水平，在细胞信号转导中起着重要作用，参与细胞生长、发育、分化及凋亡等生理、病理过程。MAPKs的3个亚组：ERK，P38和cJun氨基末

端激酶 (cJunNH2terminal kinase, JNK)。他们可被许多因子激活, 并通过调节转录因子活性而控制基因表达 [ 1 ]。研究发现ERK, p38和JNK在心、脑、肝、肾等组织细胞的缺血/再灌注过程中可被激活 [ 2-3 ]。我们选用大鼠大脑中动脉栓塞模型, 测定在再灌注后不同时间点, 缺血脑海马CA1区ERK的活性特征及细胞凋亡的动态变化规律, 试图阐明ERK在大鼠脑缺血再灌注过程中所起的作用和机制。

1材料和方法

1.1材料凋亡检测试剂盒、ERK试剂盒、DAB显色剂均购于武汉博士德公司。健康雄性Wistar大鼠60只, 体质量200 ~ 250 g, 由兰州大学试验动物中心提供。

1.2方法

1.2.1实验动物分组大鼠于术前在22 ~ 25 环境中饲养1 ~ 2 d, 术前夜禁食, 随意进水。随机分成假手术组 (sham组)、缺血再灌注组 (I/R组), 根据再灌注时间不同每组再分为3, 6, 24, 48和72 h, 5个亚组, 每亚组各6只鼠。

1.2.2模型制作根据Nagasawa等 [ 4 ] 的改良线栓法制成大鼠大脑中动脉缺血模型。用水合氯醛腹腔麻醉大鼠后, 将其仰卧固定, 分离右侧颈总动脉 (CCA), 颈内动脉 (ICA) 及颈外动脉 (ECA), 结扎ECA与CCA, 用动脉夹夹闭ICA远心端后, 迅速于ECA与ICA分叉下方剪一切口, 将一预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线插入颈内动脉, 插入深度为 (18.5 ± 0.5) mm, 直到有轻微阻力感为止, 实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。结扎入口处, 尼龙线外留约1 cm, 缝合皮肤。2 h后轻轻提拉所留线头至略有阻力, 实现大脑中动脉再灌注, 造模完成。在缺血2 h和再灌注1 h内, 用白炽灯加热维持大鼠的体温, 体温维持在肛温36.5 ~ 37.5 。假手术组只分离CCA与ECA.动物模型建立成功后按Longa等 [ 5 ] 法对动物的神经功能进行评

分，均在2~3分，即以动物清醒后，爬行时向左转圈（追尾现象），提尾时左前肢内收屈曲。未达到上述标准者视为模型制作失败，不计入实验组。因麻醉未清醒和经解剖发现存在蛛网膜下腔出血者均视为模型制作失败，不计入实验组。

1.2.3组织切片的制备大鼠再灌注后于3, 6, 24, 48和72 h各时间点，用水合氯醛深度麻醉动物后开胸暴露心脏，经升主动脉插管剪开左心耳，用生理盐水250 mL快速冲洗，随后用多聚甲醛磷酸盐缓冲液（4%，pH 7.4）先快后慢灌注约250 mL固定，断头取脑后，在多聚甲醛中固定6~8 h，取视交叉后1~4 mm脑块进行石蜡包埋，冠状面切片，取齿状回与海马互包平面的切片，片厚3  $\mu\text{m}$ 。1.2.4 HE染色、组织学观察3  $\mu\text{m}$ 切片贴片，空气中干燥，入二甲苯脱脂，乙醇梯度脱水，苏木素伊红（HE）染色，二甲苯透明，中性树脂封片，取24, 48, 72 h组大鼠切片在400倍光镜下计数海马CA1区中段100单位长度内存活神经元数目。

1.2.5免疫组织化学采用免疫组化SABC法进行染色。切片上滴加1:200兔抗ERK抗体，4℃孵育过夜，接着用生物素连接的羊抗兔二抗在室温下反应90 min，再用卵白素生物素复合物室温下反应90 min，最后用DAB溶液显色，苏木素复染细胞核。贴片，空气中干燥，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，在显微镜下计数海马CA1区中段100单位长度内ERK染色阳性细胞数。

1.2.6原位细胞凋亡检测取海马冠状石蜡切片，常规二甲苯、乙醇脱蜡至水。蛋白酶K（20 mg/L）室温消化，用甲醇配制的过氧化氢消除内源性辣根过氧化物酶活性，加末端脱氧核糖核酸转移酶（TdT）与地高辛标记的dUTP混合反应液进行孵育，再加辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体孵育，用DAB显

色，核呈深棕黄色者为凋亡细胞，最后脱水透明封片。在40×10倍Olympus显微镜下摄像观察各组间细胞凋亡变化趋势。在400倍光镜下计数海马CA1区中段100单位长度内TUNEL染色阳性细胞数。统计学处理：所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用SPSS10.0统计软件分析，两组资料不同的时间测量值比较采用重复测量的方差分析，检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问 [www.100test.com](http://www.100test.com)