

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)22-2029-02

慢性复合应激对大鼠胃幽门 HAP1 表达的影响

廖义林¹, 廖家万¹, 刘能保², 李晓恒²(¹井冈山大学医学院组织胚胎学教研室, 江西 吉安 343000, ²华中科技大学同济医学院组织胚胎学教研室, 湖北 武汉 430030)

Effect of chronic multiple stress on the expression of HAP1 in the stomachus pyloricus of rats

LIAO Yi-Lin¹, LIAO Jia-Wan¹, LIU Neng-Bao², LI Xiao-Heng²

¹Department of Histology and Embryology, Medical School, Jinggangshan University, Ji'an 343000, China, ²Department of Histology and Embryology, Tongji Medical School, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 AIM: To investigate the changes of the expression of HAP1 in the stomachus pyloricus of the rats exposed to chronic multiple stress and its significance. **METHODS:** Twelve adult rats were randomly divided into 2 groups: Chronic multiple stress group and control group. Rats in the multiple stress group were irregularly and alternatively exposed to the situation of vertical revolve, sleep deprivation, restraint (6 h/d), and night illumination for 6 weeks to prepare chronic multiple stressed model. The expression of HAP1 protein in the stomachus pyloricus of rats was detected by immunohistochemistry. **RESULTS:** HAP1 was mainly distributed in the gastrin-secreting endocrine cells. Compared with control group, the immunoreactivities of HAP1 in the stomachus pyloricus increased in multiple stressed group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Chronic multiple stress increases the expression of HAP1 protein in the stomachus pyloricus of the rat.

【Keywords】 chronic multiple-stress; HAP1; pylorus; rats

【摘要】目的: 探讨慢性复合应激大鼠胃幽门内分泌细胞亨廷顿蛋白相关蛋白 1(HAP1)表达的变化及其意义。方法: 大鼠 12 只随机分为慢性复合应激组和正常对照组。应激组动物进行 6 wk 的垂直旋转、睡眠剥夺、捆绑(6 h/d)和夜间光照等慢性复合性应激试验。实验结束后, 所有动物采用免疫组织化学和 Western Blot 等方法检测胃幽门内分泌细胞内 HAP1 蛋白表达的变化。结果: HAP1 在大鼠胃幽门主要表达在胃泌素细胞中。与对照组相比, 慢性复合应激组大鼠胃幽门内分泌细胞内 HAP1 的表达增强($P < 0.05$)。结论: 慢性复合性应激大鼠 HAP1 在胃幽门胃泌素细胞的表达加强。

收稿日期 2007-07-11; 接受日期 2007-08-30

基金项目 国家自然科学基金(30270446)

通讯作者: 廖义林, 本科, 副教授。Tel: (0796) 8852844 Email:

LJW8892325@sohu.com

【关键词】慢性复合应激; 亨廷顿蛋白相关蛋白 1; 幽门; 大鼠
【中图分类号】R34 **【文献标识码】**A

0 引言

亨廷顿蛋白相关蛋白 1(Huntingtin-associated protein 1, HAP1)因与亨廷顿病(Huntington's disease, HD)基因产物亨廷顿蛋白(Huntingtin, Htt)相互作用而备受关注。早期研究认为, HAP1 是一个脑特有的蛋白质, 广泛分布在大鼠脑神经元中, 随后的研究显示, HAP1 在内分泌系统中也有表达^[1], 但其功能尚不明确^[2]。目前还未见有文献报道慢性应激对胃幽门 HAP1 表达的影响。我们采用形态学和分子生物学相结合的方法, 以多种应激原对大鼠进行长达 42 d 的慢性复合应激, 观察慢性复合应激大鼠胃幽门内 HAP1 蛋白含量变化, 探讨慢性复合应激大鼠胃幽门 HAP1 表达变化可能的功能意义。

1 材料和方法

1.1 材料 成年雄性 Wistar 大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)12 只, 体质量 200 g 左右, 将动物随机分为: 正常对照组(简称对照组, $n = 6$)、慢性复合应激组(简称应激组, $n = 6$)。自制应激原: 电动垂直旋转旋转器, 其上挂载多个小的金属网鼠笼, 每笼只置 1 只大鼠; 圆锥形金属网筒捆绑器; 睡眠剥夺水池: 长 × 宽 × 高为 120 cm × 120 cm × 120 cm, 池内水深 50 cm, 池中有多个立柱, 间距 10 ~ 20 cm, 柱顶面积为 16 cm², 离水面 15 cm, 单个大鼠置柱顶上; 自控时间的夜间光照器。

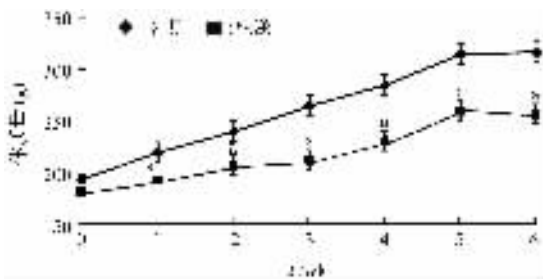
1.2 方法 应激组动物每天无规律交替暴露于垂直旋转旋转器上旋转(转速 30 r/min, 每次 20 ~ 60 s, 间隔 4 ~ 10 min), 金属网筒捆绑器中捆绑、水池中睡眠剥夺或夜间间歇性光照 4 种应激原中, 持续 6 wk; 前 3 种白天进行, 每天 6 h; 后者晚间进行, 光照呈间歇式(每光照 1 ~ 1.5 h, 间隔 10 ~ 15 min); 正常对照组动物平行常规喂养。应激 42 d 后, 两组大鼠中各取 6 只进行灌流固定、取胃幽门, 经常规脱水、透明、石蜡包埋后, 行连续切片(厚 5 μm)。所有动物均依次间断选取切片, 每 10 张取 1 张, 每个动物共取 5 张,

用于 HAP1 免疫组织化学染色。主要步骤:兔抗 HAP1 多克隆抗体(1:10000,华中科技大学李和教授馈赠)室温下孵育切片过夜;生物素化羊抗兔 IgG (1:200,北京中山)室温下孵育 1 h;SP(1:200,北京中山)室温下孵育 1 h。用抗体稀释液替代兔抗 HAP1 多克隆抗体作为阴性对照,反应呈阴性。对胃幽门胃泌素阳性细胞进行计数。

统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计学软件 SPSS12.0 进行统计学分析,两组间均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般行为变化 应激组动物在开始接受复合应激后因恐惧紧张而出现稀便排泄物增多,到实验后期呈现攻击性趋势、警惕性提高和相互打斗等暴躁行为。应激组动物的体质量增长趋势不明显,增长幅度明显低于正常对照组 ($P < 0.05$, 图 1)。



* $P < 0.05$ vs 对照. ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

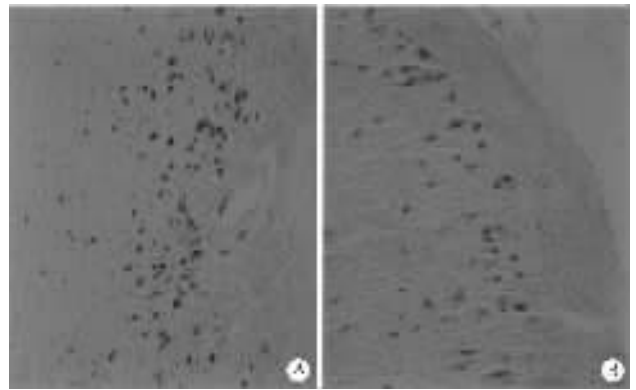
图 1 慢性复合应激对大鼠体质量的影响

2.2 HAP1 免疫组织化学定量分析 HAP1 的免疫反应产物呈棕黄色细小颗粒,分布在胃泌素细胞中。与正常对照组比较,应激组阳性细胞增多(图 2)。细胞计数结果显示,与正常对照组(33.8 ± 4.2)比较,慢性复合应激组(39.9 ± 3.1)HAP1 的免疫反应细胞明显增多 ($P < 0.05$)。

3 讨论

HAP1 是一个功能尚未完全明了的新蛋白,在脑内分布广泛。有研究提示,HAP1 参与了神经元内物质的运输,与细胞内的分子和细胞器转运以及膜受体的胞吞作用等有关^[3-5]。最近研究显示,HAP1 在内分泌系统中也有广泛的表达,如垂体、甲状腺、胰腺、肾上腺、胃幽门等内分泌器官内^[1]。而 HAP1 在胃幽门内的表达具有何种意义,目前尚未见有明确报道。

慢性复合应激,可模拟人们的活动或活动空间受到限制等所引起的应激^[6]。我们的观察到,HAP1 免



A: 应激 B: 对照。

图 2 HAP1 在胃幽门阳性细胞的表达 SP $\times 400$

疫阳性产物,表达在大鼠胃幽门的胃泌素细胞内^[7-8]。慢性复合应激组大鼠胃幽门内胃泌素 HAP1 免疫反应阳性细胞多于正常对照组大鼠,表明慢性复合应激可引起大鼠胃幽门 HAP1 蛋白的表达增加。胃泌素细胞分泌的激素为胃泌素,属于含氮激素分泌细胞,提示 HAP1 可能参与了慢性应激调节胃泌素细胞分泌胃泌素的过程。

【参考文献】

- [1] Dragatsis I, Dietrich P, Zeitlin S. Expression of the Huntingtin-associated protein 1 gene in the developing and adult mouse [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 282(1-2): 37-40.
- [2] Bowman RE, Zrull MC, Luine, VN. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats [J]. *Brain Res*, 2001, 904(2): 279-289.
- [3] Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by BDNF vesicular transport along microtubules [J]. *Cell*, 2004, 118(1): 127-138.
- [4] Kitler JT, Thomas P, Tretter V, et al. Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(34): 12736-12741.
- [5] Tang TS, Tu H, Chan EY, et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1 [J]. *Neuron*, 2003, 39(2): 227-239.
- [6] 刘能保,李辉,刘向前,等.慢性复合应激增强大鼠空间学习和记忆能力 [J]. *生理学报*, 2004, 56(5): 615-619.
- [7] Liao M, Shen JY, Zhang YN, et al. Immunohistochemical Localization of Huntingtin-associated Protein 1 in Endocrine System of the Rat [J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(12): 1517-1524.
- [8] 刘晶晶,陈樱花,陈小伟,等.链脲佐菌素敏感的胰岛细胞表达亨廷顿蛋白相关蛋白 1 [J]. *解剖学报*, 2006, 37(3): 299-302.

编辑 袁天峰