

- fluences virulence and host inflammatory responses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(8): 2857-2862.
- [7] Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, et al. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells [J]. J Infect Dis, 2008, 198(6): 890-898.
- [8] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates [J]. PLoS ONE, 2007, 2(3): e315.
- [9] Nelson AL, Ries J, Bagnoli F, et al. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Mol Microbiol, 2007, 66(2): 329-340.
- [10] 李先富, 潘秀珍, 韩明月, 等. 2 型猪链球菌锌转运蛋白 A 对小鼠免疫保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2012, 28(1): 42-44.
- [11] Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, et al. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae* [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(5): e1000422.

收稿日期: 2012-06-15

(韩仰欢编辑 周欣琳校对)

· 实验研究 ·

间歇性低氧对大鼠海马区磷酸化 JNK 表达影响*

赵雅宁¹, 郭霞², 王红阳², 李琳², 韩晓庆², 张盼盼²

摘要:目的 探讨间歇性低氧对大鼠海马区磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)表达及学习记忆影响。方法 120 只雄性 SD 大鼠随机分成对照组及轻、重度低氧组, 对照组暴露于空气中, 低氧组分别暴露于不同低氧条件下(100、50 ml/L), 暴露时间 8 h/d, 连续 2、4、6、8 周, Morris 水迷宫检测学习记忆功能, 光镜观察海马区神经细胞形态变化, 免疫印迹和免疫组化法检测海马区磷酸化 JNK 表达。结果 与对照组比较, 随低氧时间延长, 低氧组大鼠海马区脑组织结构损伤, 磷酸化 JNK 表达增多; 水迷宫检测动物逃避潜伏期延长、穿越原平台次数减少, 与轻度低氧组比较, 重度低氧组变化更为明显($P < 0.05$); 轻、重度低氧组暴露后 6、8 周大鼠海马区磷酸化 JNK 表达分别为(5.84 ± 1.17)、(3.58 ± 1.0)和(7.86 ± 1.56)、(9.78 ± 3.41), 与轻度低氧组比较, 重度低氧组大鼠海马区磷酸化 JNK 表达升高, 差异有统计学意义($t = 5.63, P < 0.05$)。结论 间歇性低氧可导致大鼠学习和记忆功能障碍, 其机制可能与磷酸化 JNK 不同时间和强度差异表达有关。

关键词: 低氧; 有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPKs); 学习; 记忆

中图分类号: R 363

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0527-03

Effects of intermittent hypoxia on expression of phosphorylated JNK in rats

ZHAO Ya-ning*, GUO Xia, WANG Hong-yang, et al(* College of Rehabilitation, Hebei Union University, Tang-shan, Hebei Province 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of intermittent hypoxia on phosphorylated JNK expression and learning and memory functions in rats. **Methods** One hundred and twenty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups; control group, mild intermittent hypoxia group, and severe intermittent hypoxia group. The rats in control group were exposed to ambient air and the rats in two intermittent hypoxia groups were exposed to different intermittent hypoxia conditions(100 ml/L and 50 ml/L, 8-hour-intermittent hypoxia a day with the exposure durations of 2, 4, 6, and 8 weeks, respectively). The learning and memory functions were measured with water maze test; the morphological changes were observed with light microscopy; the expression of phosphorylated JNK protein was detected with immunohistochemistry and western-blotting. **Results** Compared with the control group, the hippocampal brain structure was damaged in intermittent hypoxia rats with the increase of hypoxia time, and the phosphorylated JNK expressions increased obviously. Water maze test showed that escaping latency was prolonged and the number of crossing site was reduced. The changes were more significant in severe intermittent hypoxia group($P < 0.05$). Six and eight weeks after the hypoxia exposure, the phosphorylated JNK expressions in mild intermittent hypoxia group and severe intermittent hypoxia group were 5.84 ± 1.17, 3.58 ± 1.0 and 7.86 ± 1.56, 9.78 ± 3.41, respectively, with significant increase in severe intermittent hypoxia group($P < 0.05$). **Conclusion** Intermittent hypoxia can cause learning and memory impairments and the effects might be related to the JNK activation induced by different duration and severity of intermittent hypoxia.

Key words: hypoxia; mitogen-activated protein kinases(MAPKs); learning; memory

* 基金项目: 河北省科技厅资助项目(09276103D-11)

作者单位: 1. 河北联合大学康复医学院, 河北唐山 063000; 2. 河北联合大学附属医院呼吸内科

作者简介: 赵雅宁(1974-), 女, 河北唐山人, 副教授, 硕士, 研究方向: 呼吸病学研究。

通讯作者: 王红阳, E-mail: Tsmywhy@163.com

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS) 特征性变化是睡眠时反复出现不同程度的低氧血症和 (或) 高碳酸血症, 最终引起全身多系统、多器官的渐进性损害。OSAHS 患者有不同程度的认知障碍, 且 OSAHS 患者认知损伤不随阻塞病因的解除而完全逆转^[1]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 家族成员, 现已证实 JNK 信号活化在多种疾病如动脉粥样硬化、脑卒中、神经退行性疾病等病理过程中具有关键作用^[2-3]。目前关于 JNK 信号在间歇性低氧状态下导致脑功能损伤作用研究较少。本研究利用不同程度间歇性低氧动物模型, 观察海马区活化状态 JNK 表达变化, 探讨 JNK 信号与 OSAHS 后认知功能损害关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 清洁级大鼠 120 只 (北京维通利华公司), 许可证号码: SCXK (京) 2002-003, 体质量 310~350 g, 常规饲养箱内自由饮水与摄食。

1.2 试剂及仪器 多克隆磷酸化 JNK 抗体和内参 β -actin (美国 Cell Signaling 公司); Morris 水迷宫视频跟踪分析系统 (中国医学科学院药物研究所); 测氧仪 (建德市梅城电化分析仪器厂); 低氧控制程序 (天津医科大学总医院呼吸科); 纯氮 (天津六方气体高科技有限公司); 低氧舱 (天津医科大学研制)。

1.3 动物分组和模型制备 将大鼠随机分成对照组及轻、重度低氧组 (暴露低氧条件为 100、50 ml/L), 每组 40 只。低氧组每天 8 h 将动物置于模型舱内, 向舱内循环充入氮气和空气, 每次循环 2 min, 连续给予氮气 30 s, 分别维持舱内氧浓度最低至 10% 和 5% (100 和 50 ml/L), 随后均复氧至氧浓度 21%。对照组持续充入压缩空气。用数字测氧仪监测舱内氧浓度变化, 氧浓度波动范围在 $\pm 0.5\%$ 以内。连续 2、4、6 和 8 周。进行 Morris 水迷宫测试和病理指标等检测。

1.4 指标及方法

1.4.1 脑组织形态结构观察 各组各时间点随机取 5 只动物, 戊巴比妥钠麻醉 (40 mg/kg), 用 40 g/L 多聚甲醛经左心室灌注固定后取脑, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片 5 μ m。二甲苯脱蜡, 梯度乙醇降至水, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色。每只鼠连续 3 张冠状背侧海马切片, 采用图像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司) 计

数正常神经元, 取均值。

1.4.2 免疫组化检测磷酸化 JNK 表达 切片常规脱蜡至水, 枸橼酸盐微波修复, 分别滴加磷酸化 JNK 抗体 (1:200), 湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜, IgG 抗体-酶聚合物多聚体, 37 $^{\circ}$ C 温箱 30 min, 增敏二氨基联苯胺显色, 脱水、透明、封片。以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。镜下观察并摄片。

1.4.3 免疫印迹法测定磷酸化 JNK 表达 各组各时间点分别随机取 5 只动物, 迅速取双侧海马区组织, 称量 0.6 g, 4 $^{\circ}$ C 磷酸盐缓冲液充分洗涤, 加入 3 倍体积 4 $^{\circ}$ C 全细胞裂解液, 冰浴中匀浆, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 12 000 r/min, 取上清。考马斯亮蓝法测各样本蛋白含量, 样本贮存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。检测步骤: 蛋白样品 40 μ g 与等体积上样缓冲液混合, 煮沸 10 min, 100 g/L 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭液室温下震荡 2~3 h, 加入磷酸化 JNK 抗体 (1:1 500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜, 标记二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜, 增强化学发光法显色, 用图像分析仪测定分析。

1.4.4 学习和记忆功能检测 按照文献[4], 采用 Morris 水迷宫进行检测。每组大鼠 20 只, 每只动物晨起训练 5 次后分别在上午、下午各测试 6 次, 分别记录各组大鼠逃避潜伏期 (s) 及撤去平台后动物穿越原平台位置次数, 取均值。

1.5 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 16.0 统计分析软件对数据进行处理, 组间比较采用重复设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间歇性低氧对海马神经元结构影响 (表 1)

对照组大鼠海马神经细胞形态结构正常。轻度和重度低氧组中, 海马区神经元出现细胞变性水肿和死亡。与对照组比较, 轻、重低氧组海马区存活神经细胞密度随缺氧时间延长均减少 ($P < 0.05$); 其中轻度低氧组存活神经细胞密度 6 周最低, 而重度低氧组 8 周最低, 2 组差异有统计学意义 ($t = 4.54, P < 0.05$)。

表 1 低氧对大鼠海马区存活神经细胞密度影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	2 周	4 周	6 周	8 周
对照组	28.42 \pm 4.28	28.52 \pm 4.40	29.10 \pm 4.30	28.84 \pm 4.28
轻度低氧组	25.12 \pm 3.20 ^a	22.86 \pm 3.57 ^{ac}	18.10 \pm 3.08 ^{ad}	22.28 \pm 3.34 ^{ae}
重度低氧组	20.86 \pm 3.26 ^{ab}	18.14 \pm 3.18 ^{abc}	15.22 \pm 2.68 ^{abd}	13.02 \pm 2.32 ^{abc}

注: 与对照组比较, a $P < 0.05$; 与轻度低氧组比较, b $P < 0.05$; 与 2 周比较, c $P < 0.05$; 与 4 周比较, d $P < 0.05$; 与 6 周比较, e $P < 0.05$ 。

2.2 间歇性低氧对海马神经细胞磷酸化 JNK 表达影响 (图 1) 磷酸化 JNK 阳性表达主要位于细胞核, 少量表达在细胞浆。对照组大鼠海马区只有极少量阳性细胞, 染色较淡。轻度和重度低氧组中海

马区磷酸化 JNK 表达呈不同程度增加,阳性细胞主要分布在海马 CA1、CA2、CA3 区。于低氧 2、4、6、8 周时,对照组及轻、重度低氧组大鼠海马区磷酸化 JNK 表达分别为 (0.52 ± 0.15)、(0.48 ± 0.12)、(0.64 ± 0.18)、(0.44 ± 0.18) 及 (1.96 ± 0.82)、(2.49 ± 0.96)、(5.84 ± 1.17)、(3.58 ± 1.02) 和 (2.98 ± 1.09)、(4.68 ± 1.56)、(7.86 ± 1.56)、(9.78 ± 3.41),组间差异有统计学意义 ($F = 8.32, P < 0.05$);轻度低氧组磷酸化 JNK 表达 6 周达高峰,8 周表达减少;重度低氧组 JNK 表达 8 周达高峰,与轻度低氧组比较,重度低氧组磷酸化 JNK 表达增多,2 组比较差异有统计学意义 ($t = 5.63, P < 0.05$)。

2.3 低氧对大鼠学习记忆能力影响(表 2) 与对照组比较,轻度和重度低氧组大鼠逃避潜伏期延长、

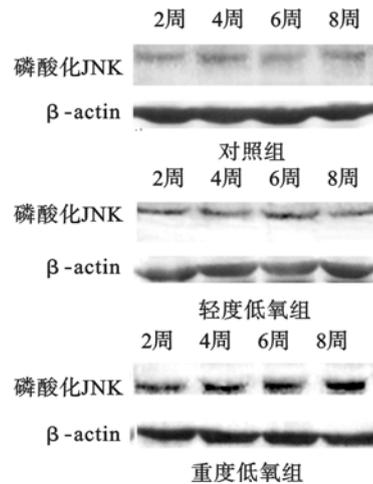


图 1 各组大鼠海马区磷酸化 JNK 蛋白表达

穿越原平台次数均减少;与轻度低氧组比较,重度低氧组逃避潜伏期延长、穿越原平台次数均减少($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠逃避潜伏期及穿越原平台次数比较($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	逃避潜伏期时间(s)				穿越原平台次数(次)
	2 周	4 周	6 周	8 周	
对照组	25.66 ± 2.97	25.40 ± 3.00	24.96 ± 2.98	25.29 ± 3.07	10.78 ± 1.70
轻度低氧组	32.76 ± 2.02 ^a	38.86 ± 3.18 ^{ac}	49.64 ± 4.71 ^{ad}	34.65 ± 3.25 ^{ac}	7.58 ± 1.14 ^a
重度低氧组	49.17 ± 8.87 ^{ab}	56.47 ± 6.98 ^{abc}	62.15 ± 7.44 ^{abd}	68.42 ± 7.91 ^{abc}	4.28 ± 1.36 ^b

注:与对照组比较, a $P < 0.05$;与轻度低氧组比较, b $P < 0.05$;与 2 周比较, c $P < 0.05$;与 4 周比较, d $P < 0.05$;与 6 周比较, e $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究结果显示,间歇性低氧可直接造成海马区神经细胞结构损伤,学习记忆能力下降,并与低氧程度相关;另外,轻度低氧组海马区存活神经元密度与低氧时间不呈线性关系,其在第 6 周最低,而重度低氧组海马区存活神经元密度随低氧时间延长进行性降低。其原因可能与轻度间歇性诱导了低氧耐受,启动大脑内部某些内源性保护机制有关^[5]。

研究显示,JNK 信号与学习记忆损伤有关。如阿尔茨海默病动物模型中,JNK 活化与磷酸化 Tau 蛋白和淀粉样沉积有关,且 JNK 激活呈时间依赖性,并随淀粉样沉积的增加而增加^[6]。研究认为 JNK 信号可通过调控炎症因子白介素 - 1 受体表达,或通过突触前膜神经递质释放,提高突触传递效能、兴奋性递质受体等机制,从而诱导与维持长时程增强,调控学习记忆形成^[7-8]。本研究结果表明,随间歇性低氧时间延长,轻度和重度低氧组大鼠海马区磷酸化 JNK 阳性细胞及其蛋白表达均增高,磷酸化 JNK 表达及海马区神经元密度变化和动物学习记忆变化趋势基本一致,且重度低氧组变化更为明显。提示 JNK 活化参与了间歇性低氧对神经损伤的病理过程。本研究结果还显示轻度低氧组大鼠海马磷酸化 JNK 表达于 6 周达高峰,重度低氧组 8 周达高峰。推测可能与不同程度间歇性低氧时,脑内

氧化应激状态不同,脑内某些信号差异激活,当重度低氧时氧化应激持续,导致脑内转导信号持续处在紊乱状态,JNK 信号持续活化有关。

参考文献

- [1] McNicholas WT, Bonsignore MR. Management Committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities [J]. Eur Respir J, 2007, 29(1): 156 - 178.
- [2] 张颖, 王瑞敏, 刘斌, 等. AKT 及 JNK 激酶在大鼠脑缺血预处理后线粒体中的表达 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(23): 2742 - 2743.
- [3] 汪军兵, 胡景鑫. JNK 信号转导通路在 NGF 抗 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(2): 277 - 281.
- [4] 陈长香, 李建民, 李淑杏, 等. 睡眠剥夺对大鼠海马区 c-fos 和 IL-1 β 表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(10): 1314 - 1315.
- [5] 王赞峰, 代冰, 康健, 等. 慢性间断低氧对大鼠脑内缺氧诱导因子 - 1 α 表达和神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(3): 593 - 595.
- [6] Wilhelm M, Xu Z, Kukekov NV, et al. Proapoptotic Nix activates the JNK pathway by interacting with POSH and mediates death in a Parkinson disease model [J]. Biol Chem, 2007, 282(2): 1288 - 1295.
- [7] 袁辉, 杨胜, 周文霞, 等. MAPK 级联信号通路与长时程增强 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 769 - 774.
- [8] Nolan Y, Martin D. Evidence of a protective effect of phosphatidyl-serine-containing liposomes on lipopolysaccharide-induced impairment of long-term potentiation in the rat hippocampus [J]. J Neuroimmunol, 2004, 151(1-2): 12 - 23.