

Foxj1 在脑外伤后的表达变化

于志华 李 震 王 伟 陈诗师 王云锋 崔 岗[△]

(苏州大学附属第一医院神经外科 江苏 苏州 215006)

摘要 目的 探讨脑外伤后 Foxj1 在脑组织中的表达变化及其意义。方法 :建立大鼠脑外伤模型,利用 Western blot 和免疫组织化学方法检测脑外伤后 Foxj1 在脑组织中表达的变化。结果 :Western blot 显示大鼠脑外伤后,Foxj1 的表达逐步增高,伤后 3 d 升至最高点,之后逐渐降低。免疫组织化学的结果与 Western blot 一致。结论 脑外伤后 Foxj1 在脑组织中的表达增高,这种增高的表达参与了脑外伤后脑组织的病理生理和生化变化。

关键词 Foxj1 脑外伤 大鼠

中图分类号 RQ95-3,R651.15 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 07-1244-03

The Expression of Foxj1 after Traumatic Brain Injury

YU Zhi-hua, LI Zhen, WANG Wei, CHEN Shi-shi, WANG Yun-feng, CUI Gang[△]

(Department of neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, 215006, China)

ABSTRACT Objective: The goal of this study was to evaluate the expression of Foxj1 in the central nervous system after Traumatic Brain Injury. **Methods:** The brain stab-injury models of rat were performed. Western blot and immunohistochemistry analysis were used to investigate the expression of Foxj1 at various times after injury. **Results:** Foxj1 proteins around lesion site increased gradually and reached its maximum at the 3d post-injury, after that, the expression level began to decline. Immunohistochemistry showed similar results as Western blot. **Conclusions:** The increased expression of Foxj1 may be involved in the pathophysiological and biochemical progression after Traumatic Brain Injury.

Key words: Foxj1; Traumatic brain injury; Rats

Chinese Library Classification(CLC): RQ95-3, R651.15 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1244-03

前言

目前在世界范围内脑外伤是造成致残和致死的主要原因之一,尤其对于儿童和青年人^[1]。很多人已经开始关注脑外伤的病理机制,但是迄今人们对此仍然知之甚少,脑外伤的治疗效果仍然很不令人满意^[2]。研究脑外伤的病理机制和细胞、分子改变对提高临床患者的预后将产生重要的价值。

Foxj1 是叉头框转录因子家族中的一员,对于呼吸道、生殖道和中枢神经系统中纤毛的发生起重要的作用^[3],同时它也影响胚胎期器官发育的左右轴不对称^[4]。在本实验中,我们发现了 Foxj1 在脑外伤后大鼠脑组织中的表达变化,这对研究脑外伤后的病理生理变化和细胞、分子机制具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 动物与模型

健康成年雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠(体重 220-250 g) 36 只,随机分成正常对照组 (3 只)、假手术组 (6 只) 和脑损伤组 (27 只),脑损伤组分成伤后 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、28 d 七个时间点 (伤后 3 d 为 9 只,其余时间点各 3 只)。将脑损伤组大鼠用 10 %的水合氯醛腹腔注射麻醉,将头部固定于立体

定位仪,颅顶剃毛、消毒。切开头皮,暴露颅骨,在前后囟中间、矢状缝右侧 3 mm 的位置,开一长 5 mm、宽 1 mm 的矩形骨窗,在骨窗内垂直插入一长 5 mm、宽 3 mm 的刀片,造成大鼠右侧颅脑损伤,缝合头皮。保持无菌条件下进行整个手术过程。假手术组仅开骨窗,不做损伤。正常对照组不做处理。

1.2 Western blot

在损伤后各时间点解剖分离脑损伤组大鼠伤口周围 3 mm 范围内的脑组织,假手术组和正常对照组大鼠相应范围的脑组织也被分离。将分离的脑组织样品称重,切碎后置于裂解液中,4 °C 条件下离心 20 min,取上清液。6 %SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白。电泳结束后转移槽转移蛋白到 PVDF 膜。转移后的 PVDF 膜用含 5 %脱脂牛奶的 TBST 缓冲液室温下封闭 2 h 后,浸入含 5 %脱脂牛奶的 TBST 稀释的一抗 (Foxj1,1 :1000 ; GAPDH,1:1000,Santa Cruz) 中,4 °C 过夜,TBST 漂洗后转入用 5 %脱脂牛奶的 TBST 稀释的 HRP 偶联的二抗 (Goat-anti-Mouse,1:2000 ;Goat-anti-Rabbit,1:2000) 中,室温 2 h,TBST 充分漂洗后,ECL 发光系统检测 Foxj1 和 GAPDH 的蛋白表达水平。吸光度值测定应用密度扫描仪 (ZEISS 全自动图像分析仪) 测定,以 Foxj1 的光密度值 (OD) 与 GAPDH 的光密度值 (OD) 的比值作为 Foxj1 相对光密度值。

1.3 取材与切片

将大鼠麻醉后固定在工作台上,经左心室向升主动脉插管后,先灌入生理盐水 500 毫升,再灌入固定液 4 %多聚甲醛 500 ml。取全脑置于 4 %多聚甲醛固定液中 3 h 后依次置于 20 %蔗

作者简介 于志华,Tel: 15906203557,

E-mail: zhenyuzhihua@163.com

[△]通讯作者 崔岗, E-mail: cuigang33@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-10-06 接受日期 2011-10-31)

糖、30%蔗糖溶液中梯度脱水。全脑 OCT 包埋,取冠状切面,用冰冻切片机连续切片制成厚度为 10 μm 的切片。

1.4 免疫组织化学

切片用山羊血清封闭液 37℃ 下封闭 2 h 后,用一抗 (Foxj1,1:100,Santa Cruz) 37℃ 下孵育过夜,PBS 液洗 5 min/次×3 次;二抗 37℃ 下孵育 30 min。DAB 液显色,脱水,风干,封片。显微镜下观察,每个视野下观察至少 200 个细胞,分别进行阳性和阴性计数,每次至少检测 2-3 张相邻的切片。

1.5 统计分析

Stata7.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验,数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 P 值表示统计学的差异,P<0.05

认为有统计学意义。每组实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 脑外伤后 Foxj1 蛋白水平在脑组织中随时间而改变

Western blot 显示脑外伤后 Foxj1 的蛋白水平在损伤后开始升高,伤后 3 d 达到高峰,然后逐渐下降,在 28 d 时 Foxj1 的水平仍然高于假手术组。

2.2 Foxj1 在脑外伤后脑组织中表达分布的变化

取脑损伤后 3 dFoxj1 蛋白表达最多时的切片进行免疫组织化学检测,可以清晰地发现,此时 Foxj1 在损伤同侧的脑组织中蛋白的表达明显高于损伤对侧,也明显高于假手术组。

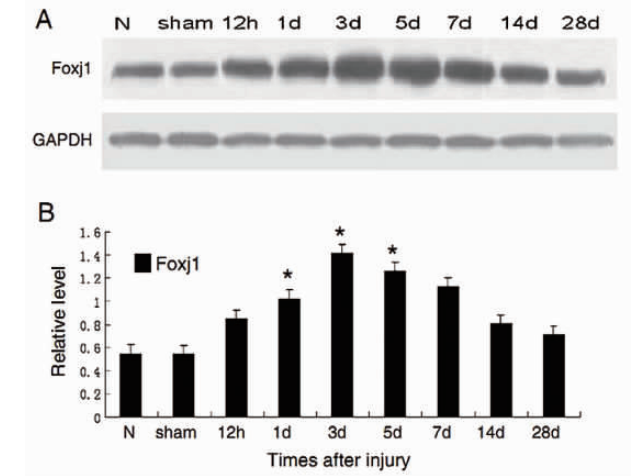


图 1 大鼠脑损伤后 Foxj1 表达水平的 Western blot 分析。1 d、3 d、5 d 组与 normal、sham 组相比 P<0.05

Fig.1 Western blot analyses of Foxj1 expression in rat brain after injury. *P<0.05 Group 1 d, 3 d, 5 d vs Group normal and sham

3 讨论

不仅在工业国家而且在发展中国家,脑外伤给社会造成了沉重的负担。脑损伤的病理机制多种多样、错综复杂,包括脑血流代谢时间和区域的变化^[5];导致脑水肿的血脑屏障的破坏^[6];进行性的损伤周围神经细胞等^[7]。脑外伤诱发性神经炎症因子、氧自由基、细胞因子产物、一氧化氮合酶、II 型环加氧酶等物质的释放以及白细胞的渗透,这些将导致脑水肿^[8]。由于导致脑外伤后脑组织生理和病理变化的机制还不十分清楚,因此迄今没有提高脑外伤患者预后的特效方法。在本实验中,我们使用了可控性的立体定位的大鼠脑组织刀切伤模型来研究脑损伤后的病理机制。

我们发现了 Foxj1 在脑损伤后脑组织中的表达变化。Western blot 显示 Foxj1 在脑损伤后表达增高,在损伤后 3 d 达到高峰。免疫组织化学表明 Foxj1 在损伤后 3 d 的脑组织损伤同侧的表达明显高于损伤对侧和假手术组脑组织的相应部位。在我们的实验中,Foxj1 在脑外伤后脑组织中的表达明显增高,这些发现有力地证明了 Foxj1 参与了脑外伤后中枢神经系统发生的病理生理变化。我们的发现可能为研究脑外伤后发生的细胞和分子水平的病理机制提供重要的线索。

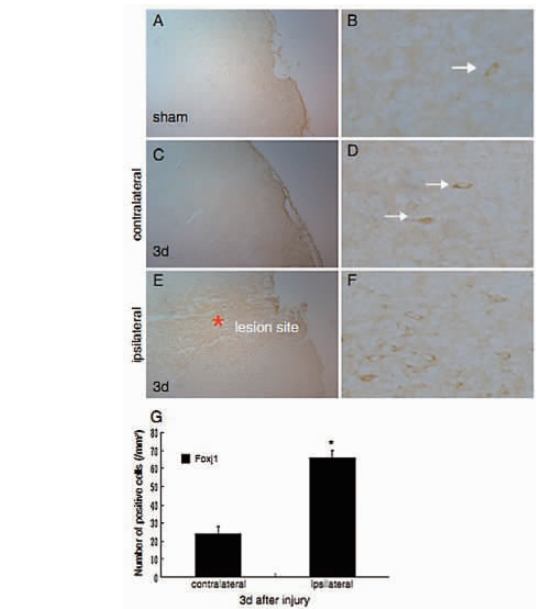


图 2 大鼠脑损伤后 Foxj1 表达水平的免疫组织化学分析。损伤同侧与损伤对侧、假手术组相比 P<0.05 (40×)

Fig.2 Immunohistochemistry analyses of Foxj1 expression in rat brain after injury. *P<0.05 Group ipsilateral vs contralateral and sham (40×)

脑外伤可以导致运动、行为、认知功能的缺损,这些都是由于脑组织损伤和脑细胞死亡引起的。脑损伤以后,脑组织中的细胞会发生相应的反应来对抗这种损伤和帮助损伤功能的恢复。神经元可以被齿状回和室管膜下层的神经干细胞代偿性增生^[9-10]。星形胶质细胞通过胶质疤痕的形成来支持神经元存活和防止更进一步的组织损伤^[11]。小胶质细胞增生能够清除细胞残骸,促进脑功能的恢复^[12]。Foxj1 是叉头状转录因子家族中的一员,在胚胎期的纤毛形成、器官左右轴的不对称、抑制 T 细胞的活性^[13]、抑制 B 细胞的体液免疫反应^[14]等方面发挥了重要的作用。我们的实验发现,Foxj1 在脑外伤后脑组织中的表达明显升高,这说明了 Foxj1 参与了脑外伤后发生的生理和病理变化。Foxj1 在脑外伤后脑功能恢复中发挥的作用有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

[1] Plesnila N, von Baumgarten L, Retiounskaia M. Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-κ B

- transcriptional activity[J]. Cell Death Differ, 2007, 14: 1529-1541
- [2] McKee JA, Brewer RP, Macy GE, Borel CO, Reynolds JD, Warner DS, Magnesium neuroprotection is limited in humans with acute brain injury[J]. Neurocrit Care, 2005, 2: 342-351
- [3] Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23: 45-51
- [4] Chen J, Knowles HJ, Hebert JL. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry [J]. J Clin Invest, 1998, 102: 1077-1082
- [5] Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis[J]. Acta Neurochir Suppl, 1998, 71: 289-292
- [6] Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma[J]. Neuroscience, 2004, 129: 1021-1029
- [7] Cervos-Navarro J, Lafuente JV. Traumatic brain injuries: structural changes[J]. J Neurol Sci, 1991, 103(Suppl): S3-S14
- [8] Paghupathi R, Graham D, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17: 927-938
- [9] Peterson DA. Stem cells in brain plasticity and repair [J]. Curr Opin Pharmacol, 2002, 2: 34-42
- [10] Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain[J]. Brain Res. Bull, 2002, 57: 751-758
- [11] Smith C, Berry M, Clarke WE. Differential expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 in a scanning and non-scanning model of CNS injury in the rat [J]. J Neurosci, 2001, 13: 443-456
- [12] Glulian D, Frederickson R, McGaugh J. Microglia-neuron interactions after injury to the central nervous system [J]. Högrefe and Huber, Lewiston, NY, 2001, pp 73-82
- [13] Srivatsan S, Peng SL. Cutting edge: Foxj1 protects against autoimmunity and inhibits thymocyte egress [J]. J Immunol, 2005, 175: 7805-7809
- [14] Lin L, Brody SL, Peng SL. Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF- κ B and IL-6 [J]. J Immunol, 2005, 175: 951-958

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。