

## · 基础研究 ·

亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠细胞骨架蛋白 spectrin  $\alpha$ II 及相关蛋白酶的影响

苏志强 张丽

【摘要】目的 探讨亚低温对脑缺血/再灌注大鼠细胞骨架蛋白血影蛋白  $\alpha$ II (spectrin  $\alpha$ II) 及卡配因 (calpain)、胱冬酶-3 (caspase-3) 等相关蛋白酶的影响。方法 采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞 (MCAO) 及再通模型, 将其随机分为假手术组、常温缺血再灌注组 (常温组) 及亚低温缺血再灌注组 (亚低温组), 分别于再灌注后不同时间点采用免疫组化法检测各组大鼠血影蛋白  $\alpha$ II、卡配因 I 及胱冬酶-3 的表达。结果 脑缺血再灌注组大鼠梗死灶中心区血影蛋白  $\alpha$ II 染色消失; 梗死灶周围缺血区血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量呈动态变化过程; 再灌注 2 h 时, 脑缺血区血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量较假手术组开始减少, 随着再灌注时间延长, 其阳性细胞数量进一步减少, 于 24 h 时达到峰值; 与相应常温组相比, 亚低温组大鼠血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量明显大于前者, 而卡配因 I 及胱冬酶-3 阳性细胞数量则较常温组明显减少。结论 亚低温可以抑制局灶性脑缺血再灌注大鼠蛋白酶卡配因 I、胱冬酶-3 的表达, 减缓细胞骨架蛋白血影蛋白  $\alpha$ II 的降解, 从而发挥一定程度的脑保护效应。

【关键词】亚低温; 脑缺血; 血影蛋白  $\alpha$ II; 卡配因 I; 胱冬酶-3

The effects of mild hypothermia on cytoskeleton protein spectrin  $\alpha$ II and its relative proteases in rats after focal cerebral ischemia reperfusion SU Zhi-qiang, ZHANG Li. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of mild hypothermia (MH) on expression of spectrin  $\alpha$ II, calpain I and caspase 3 in rats after focal cerebral ischemia reperfusion (FCIR). Methods The rat models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion were established by using an intraluminal filament. The rats were randomly divided into a sham-operated group (SO group), a normothermia ischemia reperfusion group (NIR group) and a mild hypothermia ischemia reperfusion group (MHIR group). The expression of Spectrin  $\alpha$ II, calpain I and caspase 3 was detected by using immunohistochemistry. Results Spectrin  $\alpha$ II positive neurons in peri-infarction region were gradually decreased at 2 h after reperfusion, and reached the peaked at 24 h. Compared with those in the NIR group, the expression of spectrin  $\alpha$ II were markedly increased, while the calpain I and caspase 3 expression were decreased greatly in the MHIR group. Conclusion The MH neuro-protective effects on FCIR are partly associated with the inhibition of calpain I and caspase 3 expression, attenuation of spectrin  $\alpha$ II degradation.

【Key words】Mild hypothermia; Cerebral ischemia; Spectrin  $\alpha$ II; Calpain I; Caspase-3

大量研究表明亚低温 (32 ~ 35℃) 对缺血神经元具有保护作用<sup>[1,2]</sup>, 如亚低温可抑制缺血神经元骨架蛋白微管相关蛋白 (microtubule-associated protein, MAP) 的降解, 而关于亚低温对另一种重要的神经元骨架蛋白——血影蛋白  $\alpha$ II<sup>[3]</sup> (spectrin  $\alpha$ II, 亦称 fodrin  $\alpha$  或胞衬蛋白) 影响的研究则鲜见报道。血影蛋白家族是一类肌动蛋白结合蛋白, 是细胞骨架超结构的重要组成部分, 存在于神经系统内的为血影蛋白  $\alpha$ II, 该蛋白表达于神经元的胞体、轴突及树突中, 与神经丝蛋白及 MAP 等共同构成神经元细胞骨架, 在维持神经元的形态及胞膜完整性方面具有重要意义。血影蛋白

$\alpha$ II 可被卡配因-I (calpain-I) 及胱冬酶-3 (caspase-3) 等蛋白酶水解, 产生相应的特异性降解产物<sup>[4]</sup>。本研究采用大鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 及再通模型, 观察常温及亚低温条件下, 局部脑缺血再灌注后细胞骨架蛋白血影蛋白  $\alpha$ II 及与之相关的两种蛋白酶卡配因-I、胱冬酶-3 的变化情况, 以探讨局部亚低温对脑缺血再灌注损伤的保护机制。现报道如下。

## 材料与方法

## 一、实验动物与分组

共选取雄性 Wistar 大鼠 130 只 (购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所), 体重 (250 ± 30) g, 将其随机分为常温假手术组 (n = 5)、亚低温假手术组 (n = 5)、

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470585), 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D0309), 黑龙江省教育厅基金资助项目 (10541117)  
作者单位: 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科

常温缺血再灌注组(简称常温组,60 只)及亚低温缺血再灌注组(简称亚低温组,60 只),后两组又根据观察时间点(缺血 2 h 再灌注 2、6、12、24、48 及 72 h)不同各细分为 6 个亚组(每个亚组各有大鼠 5 只);亚低温组大鼠于脑缺血时即给予亚低温作用 2 h。本研究动物实验分两批次完成,一批行冰冻切片,用以检测血影蛋白  $\alpha$ II 水平,另一批行石蜡切片,用以检测卡配因 I 及胱冬酶-3 含量。

## 二、实验动物模型制备

本研究 MCAO 模型采用改良的 Longa<sup>[5]</sup>线栓法建立大鼠局灶脑缺血再灌注损伤模型,具体操作步骤如下:用 10% 水合氯醛按 300 mg/kg 体重行腹腔麻醉,颈部正中纵向切口,暴露并在其近心端结扎右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),分离右侧颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA),在靠近 ECA 根部结扎 ECA,于 ICA 根部打一松结,并在其远端用动脉夹暂时夹闭 ICA,在 CCA 近分叉处剪一小口,将头端烧成球形(直径 0.26~0.30 mm)、直径为 0.18 mm 的单股尼龙线自 CCA 插入 ICA 至感到阻力为止,进线长度距分叉处约(18 $\pm$ 0.5)mm,随后系紧预留的活结并缝合皮肤切口。各组大鼠于脑缺血持续 2 h 后,拔出插线至 ICA 根部实现再灌注。假手术组大鼠进线至距分叉处 10 mm 处,其余过程同脑缺血/再灌注实验组。

## 三、局部亚低温干预及标本制备

本研究采用的亚低温设备为可调控半导体制冷仪(由哈尔滨工业大学热工教研室研制),设定制冷器温度为 6~8℃(先前实验已证实大鼠脑内缺血区温度为 33℃左右)<sup>[6]</sup>。亚低温组大鼠于脑缺血后立即将半导体制冷块紧密接触病灶侧皮肤给予亚低温处理,采用 SL-4 型针型点温度传感器(由上海同济大学研制)于亚低温处理 10 min 内测定大鼠鼓膜温度(正常情况下脑温平均高于鼓膜温度约 0.6 $\pm$ 0.08℃),证实其脑温降至 33 $\pm$ 0.5℃附近,亚低温持续作用 2 h;同时密切监测大鼠直肠温度,术中保持大鼠直肠温度 37 $\pm$ 0.5℃;当亚低温作用结束后,将大鼠置于室温(25℃)环境下自然复温。

按照 Longa 等<sup>[5]</sup>的 5 分法对大鼠模型进行评分,0 分:无神经缺损症状;1 分:左前肢不能完全伸直,提尾试验阳性;2 分:向左旋转;3 分:向左侧倾倒;4 分:不能向左行走或昏迷,其中评分为 1~4 分为制模成功;开颅后见蛛网膜下腔出血者剔除本次研究。各组实验大鼠至预定的再灌注时间点经心脏灌注 4% 多聚甲醛固定、取脑,取视交叉前、后 1 mm 脑组织,于相同固定液中固定 6 h;一批标本分别经 10%、20%、30% 蔗糖溶液梯度脱水后,用冰冻切片行连续冠状切片(片

厚 5  $\mu$ m),另一批标本则用石蜡包埋,采用石蜡切片机行连续冠状切片(片厚 4  $\mu$ m)。

## 四、生化指标检测及数据处理

1. 血影蛋白  $\alpha$ II 检测:血影蛋白  $\alpha$ II 山羊抗大鼠单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,SP 法免疫组化试剂盒购自北京中山公司。将冰冻切片(5  $\mu$ m)置于 4℃ 丙酮中固定 10 min,用 0.3% 过氧化氢室温下孵育 30 min,再用正常兔血清封闭 20 min,倾去血清,滴加 1:150 稀释的血影蛋白  $\alpha$ II 一抗于 4℃ 环境下过夜,滴加生物素标记兔抗山羊 IgG 二抗室温下反应 15 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素室温下反应 15 min,DAB 显色,蒸馏水终止反应,苏木素复染,常规酒精梯度脱水,二甲苯透明、中性树脂封片。

2. 卡配因 I、胱冬酶-3 检测:卡配因 I、胱冬酶-3 兔抗大鼠单克隆抗体购于武汉博士德公司,PV 法免疫组化试剂盒购于北京中山公司。标本经石蜡切片、脱蜡、水化后,置入 3%  $H_2O_2$  内灭活内源性过氧化物酶,高压抗原修复,滴加 1:50 稀释的卡配因 I 及 1:100 稀释的胱冬酶-3 一抗,置于 4℃ 湿盒内过夜,滴加试剂 1(polymer helper),室温孵育 20 min,滴加试剂 2(多聚过氧化物酶 IgG),37℃ 孵育 30 min,DAB 显色,用蒸馏水终止反应,苏木素复染,常规酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

标本图像分析采用 Motic Images Advanced 3.0 版图像处理系统,每张切片于脑梗死灶周围缺血区随机选取 10 个高倍视野,计数每个视野内阳性细胞数量;无论细胞染色程度如何,凡显色者为阳性,取每张切片平均值。采用 SPSS 11.0 版统计软件对数据进行分析,所有计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析及成组资料  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

一、各组实验大鼠血影蛋白  $\alpha$ II 免疫组化结果比较

本实验研究发现,血影蛋白  $\alpha$ II 免疫组化阳性染色见于神经元的轴突及胞体。假手术组及缺血灶对侧脑组织中的血影蛋白  $\alpha$ II 阳性表达神经元轴突、胞体突起较粗壮,染色均一(图 1);脑缺血/再灌注组梗死灶周围缺血区血影蛋白  $\alpha$ II 表达异常,细胞突起弯曲、断续;脑缺血/再灌注组梗死灶中心区于再灌注 2 h 后即未见到血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞(图 2)。脑梗死灶周围缺血区血影蛋白  $\alpha$ II 的动态变化过程如下:再灌注 2 h 时,血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量即较假手术组明显减少( $t = 8.45, P < 0.01$ );随着再灌注时间延长,血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量逐渐减少,于

24 h 时达到峰值。亚低温组与常温组大鼠血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量间存在明显差异 ( $P < 0.05$ ), 亚低温各亚组大鼠血影蛋白  $\alpha$ II 阳性细胞数量均较相应常温组明显增多, 且细胞突起增粗, 异常程度也明显轻于常温组 (图 3、4)。各组大鼠血影蛋白  $\alpha$ II 免疫组化定量分析结果详见表 1。

表 1 各组大鼠脑缺血再灌注后血影蛋白  $\alpha$ II、卡配因 I 及 胱冬酶-3 阳性表达细胞数量比较 (个/每高倍镜视野,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别       | 只数 | 血影蛋白 $\alpha$ II               | 卡配因 I                          | 胱冬酶-3                          |
|-----------|----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 常温假手术组    | 5  | 20.8 $\pm$ 1.18                | 1.5 $\pm$ 0.36                 | 2.4 $\pm$ 1.14                 |
| 亚低温假手术组   | 5  | 19.9 $\pm$ 2.04                | 1.4 $\pm$ 0.46                 | 2.4 $\pm$ 2.07                 |
| 常温缺血再灌注组  | 60 |                                |                                |                                |
| 再灌注 2 h   |    | 13.6 $\pm$ 1.33                | 8.2 $\pm$ 1.04                 | 11.6 $\pm$ 3.04                |
| 再灌注 6 h   |    | 12.8 $\pm$ 1.02                | 6.3 $\pm$ 1.20                 | 20.8 $\pm$ 3.56                |
| 再灌注 12 h  |    | 8.7 $\pm$ 1.10                 | 14.5 $\pm$ 1.11                | 33.6 $\pm$ 4.87                |
| 再灌注 24 h  |    | 7.7 $\pm$ 0.86                 | 18.1 $\pm$ 1.52                | 39.8 $\pm$ 5.21                |
| 再灌注 48 h  |    | 10.9 $\pm$ 1.14                | 15.3 $\pm$ 1.03                | 26.8 $\pm$ 3.11                |
| 再灌注 72 h  |    | 12.0 $\pm$ 1.58                | 9.6 $\pm$ 1.19                 | 16.8 $\pm$ 2.59                |
| 亚低温缺血再灌注组 | 60 |                                |                                |                                |
| 再灌注 2 h   |    | 16.2 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>   | 6.6 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>    | 6.8 $\pm$ 1.92 <sup>* *</sup>  |
| 再灌注 6 h   |    | 14.9 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>   | 4.4 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>    | 13.6 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>   |
| 再灌注 12 h  |    | 12.1 $\pm$ 1.59 <sup>* *</sup> | 12.1 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>   | 21.8 $\pm$ 3.56 <sup>a</sup>   |
| 再灌注 24 h  |    | 11.3 $\pm$ 1.98 <sup>* *</sup> | 15.5 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>   | 29.0 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>    |
| 再灌注 48 h  |    | 12.8 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>   | 13.0 $\pm$ 0.79 <sup>* *</sup> | 18.6 $\pm$ 3.51 <sup>a</sup>   |
| 再灌注 72 h  |    | 14.4 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>   | 7.0 $\pm$ 0.79 <sup>* *</sup>  | 11.6 $\pm$ 4.03 <sup>* *</sup> |

注: 与常温缺血再灌注组相应时间点比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>\* \*</sup> $P < 0.01$

## 二、各组实验大鼠卡配因 I 免疫组化结果比较

卡配因 I 免疫组化阳性染色见于神经元细胞浆, 主要分布在缺血侧顶叶皮质及基底节区; 在假手术组

及脑缺血对侧半球均极少表达, 其阳性细胞主要见于缺血侧脑半球, 且主要位于脑梗死周围缺血神经元内, 而在脑梗死核心区中的表达较少。与假手术组比较, 常温组大鼠卡配因 I 阳性细胞数量于脑缺血/再灌注 2 h 后开始增加 ( $t = 8.6, P < 0.001$ ), 于再灌注 6 h 时短暂降低, 后又逐渐增加, 于再灌注 24 h 时达到峰值, 随后又逐渐降低, 直到脑缺血/再灌注 72 h 时仍显著高于正常水平。亚低温组大鼠与常温组卡配因 I 阳性细胞数量间存在明显差异 ( $P < 0.05$ ), 在亚低温各亚组中, 其卡配因 I 阳性细胞数量均较各相应常温亚组明显减少 (图 5、6)。各组实验大鼠卡配因 I 免疫组化定量分析结果详见表 1。

## 三、各组实验大鼠胱冬酶-3 免疫组化结果比较

胱冬酶-3 免疫组化阳性染色见于神经元的细胞浆, 主要分布于缺血侧大脑皮质 II ~ V 层及基底节区, 假手术组及缺血灶对侧脑半球均极少表达。胱冬酶-3 阳性细胞主要位于梗死灶周围缺血神经元内, 在脑缺血核心区的表达较少。与假手术组比较, 胱冬酶-3 免疫阳性细胞于脑缺血/再灌注 2 h 后即开始增加 ( $t = 6.32, P < 0.01$ ), 随着再灌注时间的延长, 其阳性细胞数量进一步增加, 于再灌注 24 h 时达到峰值, 随后逐渐下降, 到脑缺血/再灌注 72 h 时仍高于正常水平。亚低温各亚组大鼠与各相应常温亚组大鼠胱冬酶-3 阳性细胞数量间存在明显差异 ( $P < 0.05$ ), 前者胱冬酶-3 阳性细胞数量均较后者明显减少 (图 7、8)。各组实验大鼠胱冬酶-3 免疫组化定量分析结果详见表 1。

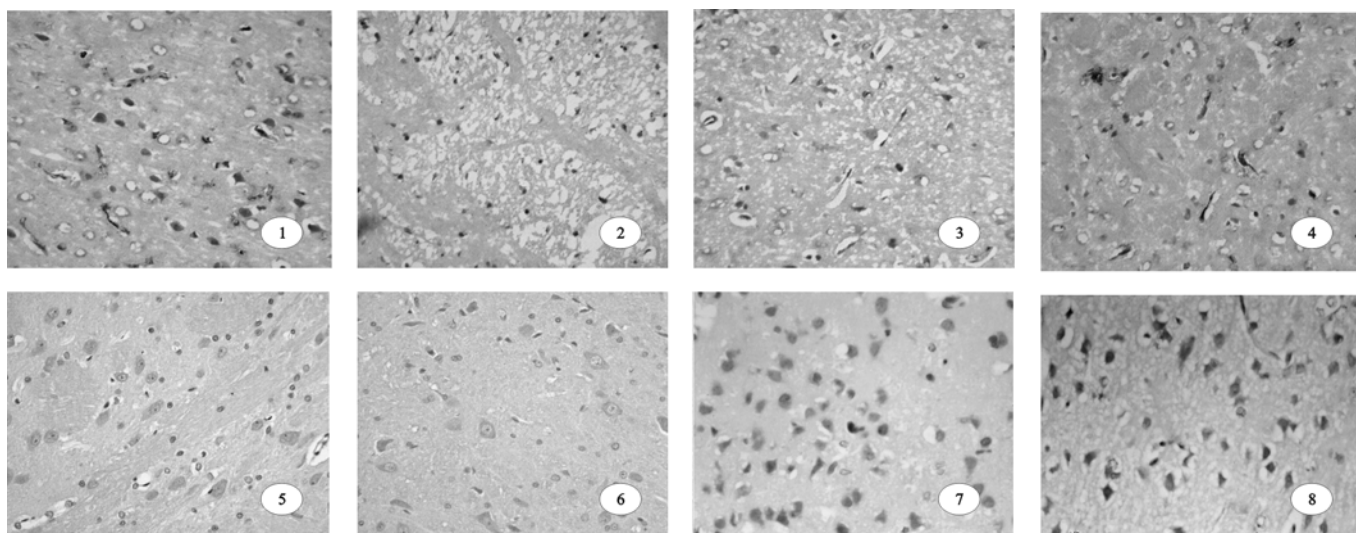


图 1 常温假手术组血影蛋白  $\alpha$ II 的表达 ( $\times 400$ ); 图 2 脑缺血/再灌注大鼠梗死灶中心区血影蛋白  $\alpha$ II 的表达 ( $\times 400$ ); 图 3 常温再灌注 24 h 脑梗死周围缺血区血影蛋白  $\alpha$ II 的表达 ( $\times 400$ ); 图 4 亚低温再灌注 24 h 脑梗死周围缺血血影蛋白  $\alpha$ II 的表达 ( $\times 400$ ); 图 5 常温再灌注 24 h 时卡配因 I 阳性神经细胞表达 ( $\times 400$ ); 图 6 亚低温再灌注 24 h 时卡配因 I 阳性神经细胞表达 ( $\times 400$ ); 图 7 常温再灌注 24 h 时胱冬酶-3 阳性神经细胞表达 ( $\times 400$ ); 图 8 亚低温再灌注 24 h 时胱冬酶-3 阳性神经细胞表达 ( $\times 400$ )

## 讨 论

近年来大量研究证实亚低温( $32 \sim 35^{\circ}\text{C}$ )对脑缺血损伤具有保护作用,但其具体作用机制尚未完全明了。Liebetrau 等<sup>[7]</sup>对 MCAO 大鼠进行延迟亚低温(于脑缺血 2 h 后给予亚低温)处理,与常温组比较,发现前者神经元骨架蛋白 MAP 的降解明显减少。构成神经元的细胞骨架蛋白除 MAP 外,还包括血影蛋白  $\alpha\text{II}$  等;而目前对血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的认识及关注较少。血影蛋白家族是一类肌动蛋白结合蛋白,是细胞骨架超结构的重要组成部分,由非同源的  $\alpha$  及  $\beta$  链构成二聚、四聚及多聚体;血影蛋白  $\alpha\text{I}$  及  $\beta\text{I}$  主要存在于红细胞内,血影蛋白  $\alpha\text{II}$ 、 $\beta\text{II}$  及  $\beta\text{III}$  则存在于其它体细胞中;存在于神经系统内的为血影蛋白  $\alpha\text{II}$ ,该蛋白主要表达于神经元的胞体、轴突及树突中,在维持神经元的形态及胞膜完整性方面具有重要作用。当机体发生脑缺血后,血影蛋白  $\alpha\text{II}$  可被卡配因 I 及胱冬酶-3 等蛋白酶水解,产生相应的特异性降解产物<sup>[8]</sup>。Morimoto 等<sup>[9]</sup>对大脑中动脉梗死 1 h 后再灌注大鼠分别给予常温( $37^{\circ}\text{C}$ )及高温( $39^{\circ}\text{C}$ )处理,结果发现高温作用可加重血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的降解。目前,关于亚低温对局灶性脑缺血再灌注后血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的影响鲜见报道。

本研究结果表明,血影蛋白  $\alpha\text{II}$  阳性细胞数量于脑缺血/再灌注后 2 h 即开始减少,随着再灌注时间的延长,其阳性细胞数量进一步减少,于再灌注 24 h 时血影蛋白  $\alpha\text{II}$  阳性细胞数量达到最低点。本研究结果还同时发现,脑缺血/再灌注后卡配因 I 及胱冬酶-3 的表达于再灌注 2 h 后开始增加,于再灌注 24 h 时达到峰值,随后逐渐下降;提示脑缺血/再灌注后血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的动态表达过程与卡配因 I 及胱冬酶-3 这两种对其具有降解作用的蛋白酶的含量变化有关,其中卡配因 I 阳性细胞数量虽然于再灌注 6 h 后短暂下降,而再灌注 24 h 内血影蛋白  $\alpha\text{II}$  阳性细胞数量却持续减少,推测是多种蛋白水解酶综合作用的结果。

本研究还发现,亚低温组大鼠脑梗死灶周围缺血区血影蛋白  $\alpha\text{II}$  阳性细胞数量在各再灌注时间点均明显高于相应常温组,提示亚低温可以减缓脑缺血再灌注后细胞骨架蛋白血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的降解;同时亚低温组脑梗死灶周围脑缺血区卡配因 I 及胱冬酶-3 阳性细胞数量均明显低于相应常温组,提示亚低温可以通过抑制脑缺血再灌注后卡配因 I 及胱冬酶-3 等蛋白酶的激活,减缓细胞骨架蛋白血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的降解。亚低温对

上述两种蛋白酶活性的抑制,到底是低温直接作用的结果或是通过减少兴奋性氨基酸的聚集、抑制钙内流从而降低其活性还有待进一步研究。

近年来 Pike 等<sup>[10]</sup>研究发现,脑脊液中与 calpain 相关的特异血影蛋白  $\alpha\text{II}$  降解产物在脑缺血损伤后明显增加,可作为诊断脑梗死的重要生化标志物之一。本研究仅观察了大鼠脑组织中全长、未被降解的血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的表达,而亚低温对与 calpain 及胱冬酶-3 相关的特异性血影蛋白  $\alpha\text{II}$  降解产物的影响尚不清楚,还有待进一步研究。

综上所述,亚低温可以抑制局灶性脑缺血再灌注后蛋白酶卡配因 I、胱冬酶-3 的表达,减缓细胞骨架蛋白血影蛋白  $\alpha\text{II}$  的降解,具有一定的脑保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] Hanley DF. Review of critical care and emergency approaches to stroke. *Stroke*, 2003, 34: 362-364.
- [2] Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke*, 2004, 35: 1482-1489.
- [3] Bennett V, Lambert S. The spectrin skeleton: from red cells to brain. *J Clin Invest*, 1991, 87: 1483-1489.
- [4] Czogalla A, Sikorski AF. Spectrin and calpain: a target and a sniper in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 1913-1924.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [6] 王德生, 丰宏林, 盛莉. 病变侧亚低温对局部脑缺血再灌注流损伤有关因素的影响. *中华神经外科杂志*, 1999, 15: 240-242.
- [7] Liebetrau M, Burggraf D, Martens HK, et al. Delayed moderate hypothermia reduces calpain activity and breakdown of its substrate in experimental focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 2004, 357: 17-20.
- [8] Yokota M, Saito TC, Kamitani H, et al. Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Res*, 2003, 984: 122-132.
- [9] Morimoto T, Ginsberg MD, Dietrich WD, et al. Hyperthermia enhances spectrin breakdown in transient focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1997, 746: 43-51.
- [10] Pike BR, Flint J, Dave JR, et al. Accumulation of calpain and caspase-3 proteolytic fragments of brain-derived  $\alpha\text{II}$ -spectrin in cerebral spinal fluid after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24: 98-106.

(修回日期: 2006-03-19)

(本文编辑: 易 浩)