

慢性应激大鼠海马的比较蛋白质组学研究

王 亮 杨志华* 弓景波 赵晓玲 钱令嘉

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

摘要 慢性应激可造成海马神经细胞丢失、树突萎缩等损伤, 但有关其损伤机制仍有很多问题不甚明了。为了寻找应激致海马损伤相关的重要蛋白质、从蛋白质水平揭示应激致海马损伤的分子机制, 应用双向凝胶电泳(2-DE)技术分离对照组和束缚应激组大鼠海马组织总蛋白质, 图像分析检测差异表达的蛋白质点, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和数据库检索对差异表达的蛋白质点进行鉴定, 并采用半定量的 RT-PCR 在 mRNA 水平验证 2-DE 结果。得到了分辨率较高、重复性较好的对照和束缚应激大鼠海马 2-DE 图谱, 质谱分析和数据库检索鉴定了 14 个差异表达蛋白质点中的 11 个蛋白质, 大多数差异蛋白的功能涉及能量代谢、信号传递等过程。研究结果为揭示应激致海马损伤的机制、提高机体的应激适应能力提供了理论依据。

关键词 应激, 海马, 蛋白质组, RT-PCR

学科分类号 Q42

慢性应激可引起一系列的脑功能障碍, 如认知功能低下、情绪和行为异常等。海马是大脑边缘系统的一个重要组成部分, 目前认为, 海马是脑内与学习和记忆功能关系最密切的部位之一; 同时海马也是参与下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴负反馈调节的高位中枢, 同其他脑区相比, 海马神经元脆性大, 易受损伤。已有研究发现, 慢性应激或长期外源性糖皮质激素(GCs)刺激可选择性损伤海马, 使其神经细胞丢失、树突萎缩、突触点减少, 进而影响海马的学习记忆功能^[1~4]。应激致海马结构与功能的损伤是一个极其复杂的生物学过程, 必然涉及到多种蛋白质表达的变化及由此引起的生物化学反应和信号传导的改变。以往的研究只局限于探讨应激时一个或几个蛋白质的变化, 并且这些研究结果来源于各个独立的实验, 不能在一次实验中发现应激海马神经细胞中蛋白质表达的整体变化。蛋白质组学方法的出现, 使得在整体上、高通量筛选不同生理和病理过程中差异表达的蛋白质成为可能。本研究利用束缚应激建立应激性海马损伤动物模型, 在此基础上应用比较蛋白质组学方法发现并鉴定与慢性应激海马损伤相关的蛋白质, 以揭示慢性应激致海马损伤的机制, 为最终制定防护措施、提高机体适应能力提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠(180~200 g) (军事医学科学院试验动物中心提供), 随机分为对照组和束缚应激组(每组 6 只)。

1.2 试剂

18 cm IPG 胶条(pH 3~10)、IPG 缓冲液、尿素、硫脲、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、SDS、甘氨酸、溴酚蓝等购自 Amersham Biosciences 公司, Pharmalyte、DTT、TEMED、CHAPS、碘乙酰胺、过硫酸铵碘乙酰胺、考马斯亮蓝 R-250 等购自 Sigma 公司; Trizol 和 Superscript III 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, 2×Taq PCR Master Mix 购自北京天根公司。

1.3 方法

1.3.1 慢性束缚应激动物模型的建立。将应激组大鼠在自制的小铁笼里每天束缚 6 h(9:00 am~15:00 pm), 连续束缚 3 周。对照组大鼠正常条件下饲养。

** 通讯联系人。

Tel: 022-84655062, E-mail: yazhu@hotmail.com

收稿日期: 2007-07-10, 接受日期: 2007-09-27

1.3.2 皮质酮和儿茶酚胺浓度测定. 对照组大鼠及束缚应激 3 周大鼠, 空腹眼眶取血 2~3 ml, 0.5% EDTA-Na₂ 抗凝(10 ml/L), 立刻冰浴冷却, 1 100 g 4℃离心 15 min, 收集血浆, 采用 ¹²⁵I- 皮质醇放射性免疫检测试剂盒测定血浆皮质醇的含量. 由于皮质酮是啮齿类动物主要的糖皮质激素, 大鼠血浆中皮质酮与皮质醇含量比恒定, 约为 50:1, 所以, 检测结果中皮质酮含量由皮质醇测定值换算得来, 换算公式: 皮质酮浓度 = 皮质醇浓度 × 50. 血清中儿茶酚胺的检测参照 Grouzmann 等^[9]的高效液相色谱法进行检测.

1.3.3 海马组织 2-DE 蛋白样品的制备. 束缚应激 3 周后, 将大鼠断头取脑, 迅速分离海马组织放入匀浆器中, 加入裂解液 (8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 5% CHAPS, 12.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF 和 0.5% pharmalyte 3-10), 冰上匀浆后室温裂解 1 h, 12 000 g 4℃离心 1 h, 小心避开上层脂肪, 吸取上清蛋白. Bradford 法对提取的蛋白质进行定量, 分装后-80℃冻存备用.

1.3.4 双向凝胶电泳. 将 1 mg 海马组织蛋白与水化液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 5% CHAPS, 12.5 mmol/L DTT, 0.5% Triton X-100, 0.4% pharmalyte 3-10, 痕量溴酚蓝)混合至总体积为 350 μl. 蛋白质样品于 IPGphor 等电聚焦仪 (Amersham Biosciences) 进行第一向等电聚焦至 80 000 Vh. 等电聚焦结束后, 胶条分别在含 2% DTT 的平衡液 I 和含 2.5% 碘乙酰胺的平衡液 II 中平衡 15 min, 然后进行第二向 SDS-PAGE, 分离胶

浓度为 12.5%. 电泳结束后, 对凝胶进行考马斯亮蓝染色.

1.3.5 2-DE 图像分析. 应用 Image Scanner 扫描仪 (Amersham Biosciences) 扫描脱色后的 2-D 胶. ImageMaster 2D Elite 5.0 (Amersham Biosciences) 分析软件分析应激组和对照组海马蛋白质样品 2-DE 图谱. 利用 SPSS 软件进行统计学处理, 从而找到差异表达的蛋白点.

1.3.6 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析. 从凝胶中切取差异表达的蛋白点于 EP 管中, Milli-Q 水洗 2 次, 每次 5 min, 50% 乙腈脱色, 真空浓缩离心机中干燥, 加入适量胰酶 37℃孵育过夜, 样品与 2 μl CAA 基质混合, 点样于不锈钢板, 置空气中自然风干. 在 MALDI-TOF-MS 质谱仪上进行分析, 获得肽质量指纹图谱(PMF). Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质.

1.3.7 半定量 RT-PCR 检测差异蛋白 mRNA 水平的变化. 采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取海马组织总 RNA, 分光光度法检测 RNA 的纯度和浓度. 1 μg 总 RNA 用 Superscript III 逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司)合成 cDNA. 20 μl PCR 反应体系如下: 4 μl cDNA, 10 μl 2×Taq PCR Master Mix, 10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μl, 4 μl 水. 反应条件如下: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s, 59℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环. 以看家基因 GAPDH 为内参基因, 5 μl 产物通过 2 % 琼脂糖凝胶电泳检测. 引物序列见表 1(Invitrogen 公司合成).

Table 1 Primer sequence, length of PCR products and optimal annealing temperature for each gene				
Spot	Name	Primer sequence (5'~3')	Products size / bp	Annealing temperature / °C
2	α-Synuclein	Sense ggcgtcctctatgttaggttc	148	59
		Antisense gctccctccactgtctcttg		
14	Dynamin1	Sense cctetcccaccatectac	163	59
		Antisense ctggtccacctcttctca		
-	GAPDH	Sense gtgttctaccccaatg	93	59
		Antisense gcctgttcaccaccttc		

2 结 果

2.1 慢性束缚应激实验动物模型的建立

应激时交感神经兴奋性增高, 儿茶酚胺分泌增多; 下丘脑 - 垂体 - 肾上腺 (HPA) 轴过度激活, 使

肾上腺皮质释放皮质醇类激素增多^[9]. 我们通过检测血中皮质醇和儿茶酚胺含量的变化验证应激动物模型是否建立. 从检测结果可以发现, 束缚应激 3 周后大鼠血中皮质醇和儿茶酚胺水平明显高于正常对照组(表 2). 这表明束缚应激模型已成功建立.

Table 2 Plasma concentration of corticosterone, norepinephrine, epinephrine in rats after chronic restraint stress

Group	Corticosterone / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Norepinephrine / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Epinephrine / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Control	0.39 ± 0.04	25.57 ± 7.94	5.36 ± 1.11
Stress	$1.30 \pm 0.02^{(1)}$	$52.20 \pm 12.35^{(1)}$	$11.95 \pm 1.70^{(1)}$

($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $^{(1)}P < 0.05$ vs control group)

2.2 对照组和束缚应激组大鼠海马蛋白质的 2-DE 差异分析

建立了分辨率高, 重复性较好的海马蛋白双向电泳图谱, 利用 ImageMaster 2D Elite 5.0 软件分析对照组和束缚应激组大鼠海马蛋白 2-DE 图谱, 检测到 14 个差异表达的蛋白质点. 对照组和应激组大鼠海马蛋白典型的 2-DE 图谱见图 1. 图 2 为差异表达蛋白质点的局部放大图.

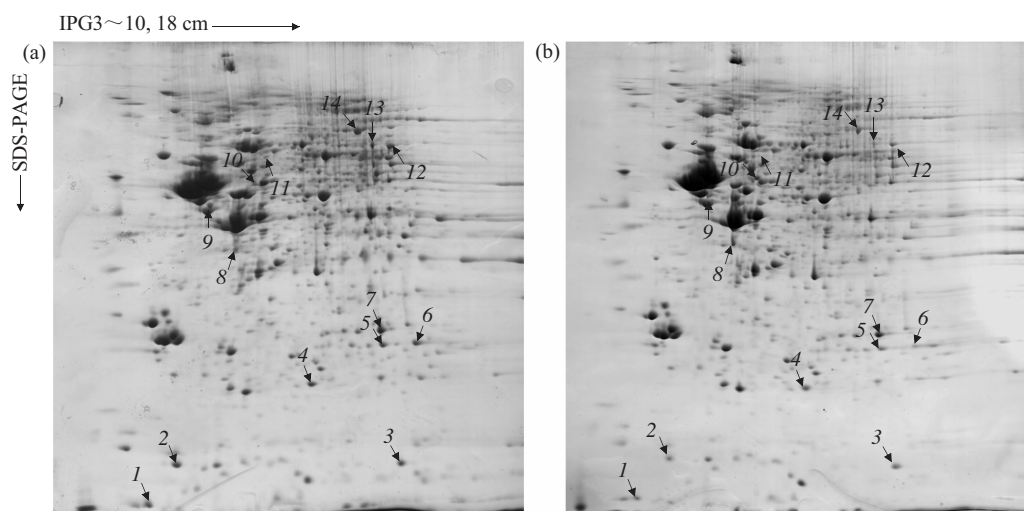


Fig. 1 2-DE maps of proteins from rat hippocampus

(a) Control group (C). (b) Stress group (S). Proteins are loaded on pH 3~10 IPG strips (18 cm), followed by 12.5% SDS-PAGE as the second dimension. The gel is visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining.

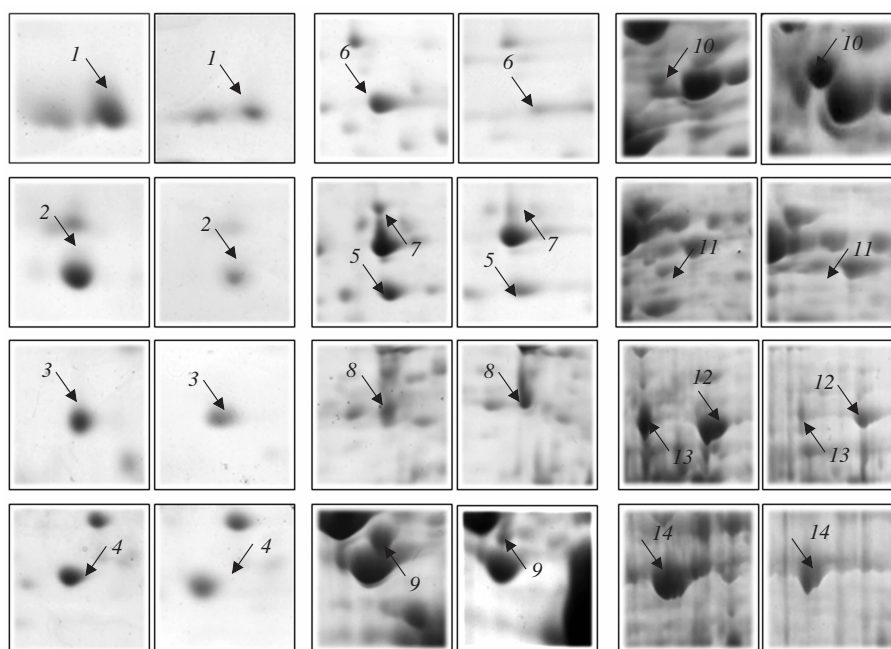


Fig. 2 Fourteen differentially expressed proteins from rat hippocampus

Each pair of gel maps is from control (C) and stress groups (S) respectively. Differentially expressed proteins are marked by an arrow and number.

2.3 差异表达蛋白质点 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图鉴定及数据库检索

将 14 个差异表达的蛋白质点从二维凝胶中切下, 进行蛋白质斑点的脱色和胶上原位消化、酶

解。酶解后的肽混合物经 MALDI-TOF-MS 分析获得肽质量指纹图。Mascot 数据库检索, 成功鉴定出了其中的 11 个蛋白质(表 3)。图 3 是 Spot 2 的肽质量指纹图。

Table 3 Identification of fourteen proteins which show a significantly different level after restraint stress

Spot	Protein identified	NCBI index code	TOP score	Change after stress
1	Not identified			Down
2	α-Synuclein	gi 9507125	82	Down
3	Subunit d of mitochondrial H ⁺ -ATP synthase	gi 9506411	92	Down
4	Adenylate kinase 1	gi 61889092	68	Down
5	Triosephosphate isomerase 1	gi 38512111	103	Down
6	Phosphoglycerate mutase 1	gi 116242707	120	Down
7	G(o) subunit alpha 2	gi 232135	73	Down
8	Not identified			Up
9	Not identified			Down
10	Creatine kinase-B	gi 203476	70	Up
11	Vacuolar -ATPase B2	gi 17105370	98	Down
12	Pyruvate kinase, muscle	gi 16757994	168	Down
13	Syntaxin binding protein 1	gi 6981602	92	Down
14	Dynamin 1	gi 18093102	140	Down

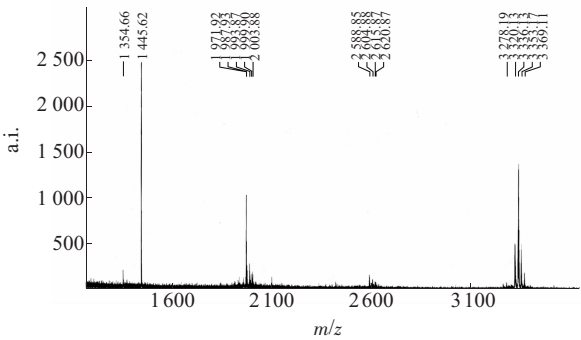


Fig. 3 MALDI-TOF-MS analysis of spot 2

2.4 RT-PCR 检测差异蛋白质点mRNA 表达水平

选择已鉴定的差异蛋白质点 spot 2 (α-synuclein)和 spot 14(dynamin1)进行半定量 RT-PCR 分析其 mRNA 变化规律, GAPDH 基因作为内参照, 半定量结果显示, 编码 dynamin1 和 α-synuclein 的 mRNA 在束缚应激组大鼠海马中表达水平明显降低(图 4), 与蛋白质组分析结果基本一致。

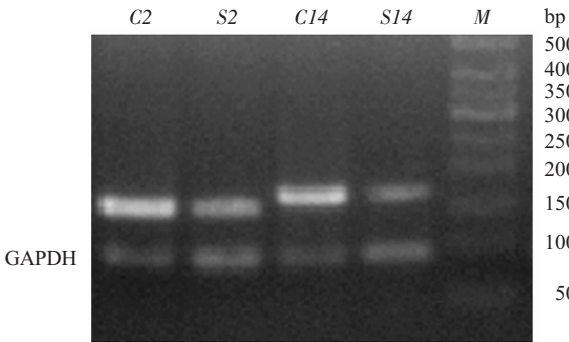


Fig. 4 RT-PCR analysis of two differential expressed protein

M: DNA molecular mass marker; C: Control group; S: Stress group; “2,14”: Denote the same gene reported in Table1, Table 3 and Figure 2. Products length are showed in Table 1.

3 讨 论

现代社会中伴随着社会竞争日益激烈, 生态环境不断恶化, 人类承受着越来越强烈、越来越复杂的生理和心理应激负荷, 大量流行病学和实验室研究均已证实, 高强度的应激负荷已成为现代人类多种重大致死性疾病的重要诱因和病因。中枢神经系

统是应激损伤作用的主要靶点之一, 应激可以引起一系列的脑功能障碍如认知功能低下, 情绪和行为异常. 海马是脑内与学习记忆功能关系最密切的部位, 同时海马也是参与下丘脑 - 垂体 - 肾上腺 (HPA) 轴负反馈调节的高位中枢. 由于海马神经元自身的结构特点, 海马是脑内对应激反应最敏感的部位, 许多应激性神经系统疾病都与海马有关. 随着蛋白质组学的出现, 人、大鼠、小鼠等的海马蛋白质组数据库纷纷建立^[7-9]. 蛋白质组学为研究人类重大疾病提供了新的技术方法.

本研究以对照组和束缚应激组大鼠海马组织为研究对象, 首次采用比较蛋白质组学的方法检测了二者之间的差异蛋白, 共发现 14 个表达发生明显变化的蛋白质, 并成功鉴定出了其中的 11 个: α -突触核蛋白、线粒体 ATP 合成酶 d 亚基、腺苷酸激酶 1、磷酸丙糖异构酶 1、磷酸甘油酸变位酶 1、Go 蛋白 $\alpha 2$ 亚基、B 型肌酸激酶、V-ATPase B2 亚基、丙酮酸激酶、突触融合蛋白结合蛋白 1、动力蛋白 1. 这些蛋白质的功能涉及物质代谢、能量产生、离子跨膜转运、神经递质释放等过程.

磷酸丙糖异构酶 1、磷酸甘油酸变位酶 1、丙酮酸激酶、B 型肌酸激酶、线粒体 ATP 合成酶 d 亚基都参与到机体 ATP 合成的各个过程中, 而这些蛋白质在束缚应激后的大鼠海马中表达量均降低, 表明束缚应激可能使 ATP 的合成减少, 海马神经细胞处于一种缺乏能量的状态, 而机体的各种生命活动都需要 ATP 来直接提供能量. 此外, ATP 在中枢神经系统突触中还参与嘌呤类神经递质或神经调节物质调节神经系统的信号传导过程^[10]. ATP 合成减少, 神经细胞的各项生命活动受阻, 从而影响海马神经元的功能.

细胞内几乎所有的生物学功能都需要一定的 pH 环境, 而特定 pH 环境需要 V-ATPase 分解 ATP 产生的能量泵出或泵入 H^+ 来维持, B2 亚基是 V-ATPase V1 部分的重要组成元件, 参与 ATP 的水解及 H^+ 的跨膜转运过程^[11, 12]. 蛋白质组学研究发现, B2 亚基在束缚应激后表达量降低, 这可能影响质子的跨膜转运, 使细胞内 pH 环境失衡, 影响各项生物学功能的发挥. 而 ATP 的供应不足, 导致 H^+ 跨膜转运缺乏能量支持, 进一步加剧了这一过程. Go 蛋白 $\alpha 2$ 亚基在脑和其他的神经组织中表达丰富, 目前对其生物学功能研究比较少, 可能参与调节离子通道的开关及信号转导过程^[13].

α -突触核蛋白(α -synuclein)属于天然不折叠蛋

白家族中的一员, 自身容易发生聚集, 基因突变、金属离子、各种内外毒素作用等可引起这种聚集作用增加. 它广泛分布于中枢和周围神经组织尤其是突触前末梢, 其正常功能还不清楚, 可能对突触神经递质的释放, 突触囊泡循环和突触完整性具有重要作用^[14]. α -突触核蛋白的聚集与帕金森病的发生密切相关^[15], 是帕金森病的特征性病变——路易小体的主要成分. 有研究者证实, α -突触核蛋白具有神经毒性和神经保护的双重作用, 并且此作用与其在细胞内的浓度密切相关^[16]. 另外, 体外实验证明, α -突触核蛋白对多巴胺能神经元具有毒性作用, 而对其他神经元如培养的海马神经元却无毒性作用, 甚至呈现保护作用^[17]. 而本研究中, α -突触核蛋白在束缚应激大鼠海马中表达量降低, 这是否表明其对应激性海马神经元的损伤具有一定的保护作用, 值得进一步的深入研究.

动力蛋白(dynamin)家族是一种大的 GTPase, 在哺乳动物脑中因其能依赖核苷酸结合微管而被第一次发现^[18], Dynamin1 是其中的一种, 后来研究发现它是一种对 Ca^{2+} 敏感的磷脂结合蛋白, 与蛋白激酶 C(PKC)具有很强的亲和力^[19]. Dynamin1 在细胞内吞、突触囊泡循环过程中起着非常重要的作用. 研究者通过一种小分子蛋白特异性阻断海马神经元动力蛋白 GTPase 的活性后发现, 代偿性细胞内吞作用完全被阻止, 而胞吐作用却不受任何影响, 这表明细胞内所有的代偿性内吞过程都依赖 dynamin 的 GTPase 活性^[20]. 另外发现, 六磷 (^{32}P) 酸钠肌醇(inositol hexakisphosphate, InsP₆) 能促进 dynamin1 介导的细胞内吞作用, 而 syntaphilin 可以与 dynamin1 结合, 使 dynamin1 依赖的细胞内吞作用被抑制^[21, 22], 同时, 肌营养不良蛋白聚糖(dystroglycan)也能通过与 dynamin1 相互作用而调节细胞的内吞过程^[23]. 老年痴呆病模型中研究发现, 在突触丢失之前 β -淀粉样蛋白使 dynamin1 明显减少, 进而影响记忆形成和信息处理^[24]. 本研究中, dynamin1 在束缚应激海马中表达量降低, 而应激可以影响海马的学习记忆功能, 这可能与 dynamin1 介导的细胞内吞和突触囊泡循环受阻有关, 需要我们进一步证实. 此外, 另一个与突触融合相关的蛋白质——突触融合蛋白结合蛋白 1 (syntaxin binding protein 1)表达量也降低, 也可能进一步影响神经递质的释放, 进一步影响海马的学习和记忆功能.

在本研究中, 建立了对照组和束缚应激组大鼠

海马的 2-DE 图谱, 成功鉴定了 11 个差异表达的蛋白质, 并用半定量 RT-PCR 验证了部分差异蛋白的表达水平, 这些资料为我们研究应激致海马损伤机制提供了线索, 并为最终制定应激防护措施, 提高机体的应激适应能力提供了科学依据。

参 考 文 献

- Magarinos A M, Verdugo J M, McEwen B S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(25): 14002~14008
- Stein-Behrens B, Mattson M P, Chang I, *et al.* Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J Neurosci*, 1994, **14** (9): 5373~5380
- McIntosh L J, Sapolsky R M. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 1996, **17** (3~4): 873~882
- Venero C, Borrell J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci*, 1999, **11**(7): 2465~2473
- Grouzmann E, Fathi M, Gillet M, *et al.* Disappearance rate of catecholamines, total metanephrines, and neuropeptide Y from the plasma of patients after resection of pheochromocytoma. *Clin Chem*, 2001, **47**(6): 1075~1082
- Balm P H M. *Stress Physiology in Animals*. Sheffield Academic Press, 1999
- Yang J W, Czech T, Lubec G. Proteomic profiling of human hippocampus. *Electrophoresis*, 2004, **25** (7~8): 1169~1174
- Fountoulakis M, Tsangaris G T, Maris A, *et al.* The rat brain hippocampus proteome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, **819**(1): 115~129
- Pollak D D, John J, Hoeger H, *et al.* An integrated map of the murine hippocampal proteome based upon five mouse strains. *Electrophoresis*, 2006, **27**(13): 2787~2798
- Matsuoka I, Ohkubo S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ecto-nucleotidases. *J Pharmacol Sci*, 2004, **94**(2): 95~99
- Xu J, Cheng T, Feng H T, *et al.* Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis. *Histol Histopathol*, 2007, **22**(4): 443~454
- Jouret F, Auzanneau C, Debaix H, *et al.* Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H⁺-ATPase are differentially expressed during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 2005, **16**(11): 3235~3246
- James J, Murtagh Jr, Joel Moss, *et al.* Alternative splicing of the guanine nucleotide-binding regulatory protein Go α generates four distinct mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 1994, **22** (5): 842~849
- Bonini N M, Giasson B I. Snaring the function of α -Synuclein. *Cell*, 2005, **123**(3): 359~373
- Ma Q L, Chan P, Yoshii M, *et al.* Alpha-synuclein aggregation and neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*, 2003, **5**(2): 139~148
- Albani D, Peverelli E, Rametta R, *et al.* Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *FASEB J*, 2004, **18**(14): 1713~1715
- Xu J, Kao S Y, Lee F J, *et al.* Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Med*, 2002, **8**(6): 600~606
- Cao H, Garcia F, McNiven M A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**(9): 2595~2609
- Liu J P, Powell K A, Sudhof T C, *et al.* Dynamin I is a Ca²⁺-sensitive phospholipid-binding protein with very high affinity for protein kinase C. *J Biol Chem*, 1994, **269**(33): 21043~21050
- Newton A J, Kirchhausen T, Murthy V N. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(47): 17955~17960
- Hoy M, Efanov A M, Bertorello A M, *et al.* Inositol hexakisphosphate promotes dynamin 1 mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (10): 6773~6777
- Das S, Gerwin C, Sheng Z H. Syntaphilin binds to dynamin-1 and inhibits dynamin-dependent endocytosis. *J Biol Chem*, 2003, **278** (42): 41221~41226
- Zhan Y, Tremblay M R, Melian N, *et al.* Evidence that dystroglycan is associated with dynamin and regulates endocytosis. *J Biol Chem*, 2005, **280**(18): 18015~18024
- Kelly B L, Vassar R. β -Amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 2005, **280**(36): 31746~31753

Comparative Proteomics Analysis of Hippocampal Proteins From Chronic Stressed Rats

WANG Liang, YANG Zhi-Hua*, GONG Jing-Bo, ZHAO Xiao-Ling, QIAN Ling-Jia

(*Institute of Health & Environmental Medicine, Tianjin 300050, China*)

Abstract Chronic stress can induce hippocampus injury such as neuron loss, dendrite atrophy, but its mechanism and molecular basis remain unclear up to now. To understand the molecular mechanism on protein level and find the crucial proteins which correlated with chronic stress-induced injury, two-dimensional electrophoresis was applied to separate the hippocampal total proteins of control group and restraint stressed rats, then the differential expressed proteins were detected by image analysis and identified by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) as well as database searching. Moreover, the 2-DE results were verified on the mRNA level by semi-quantitative RT-PCR. The hippocampal 2-DE map with high resolution and good reproducibility of control and stress group rats were obtained. Fourteen differentially expressed protein spots were detected and eleven proteins were successfully identified, most of these proteins were involved in the process of energy metabolism and signal transduction. These results provide a clue for elucidating the mechanism of chronic stress-induced hippocampal injury and are useful for elevating the adaptability to stress.

Key words stress, hippocampus, proteome, RT-PCR

*Corresponding author.

Tel: 86-22-84655062, E-mail: yazhhu@hotmail.com

Received: July 10, 2007 Accepted: September 27, 2007