

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.01.010

米诺环素对大鼠脑缺血半暗带脑血流量及内皮素-1 蛋白表达的影响^{*}

陶 涛¹,甘林望²,付 洁¹,李作孝¹,李小刚^{1△}
(泸州医学院附属医院:1. 神经内科;2. 肾病内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血半暗带脑血流量及内皮素-1(endothelin-1,ET-1)蛋白表达的影响。**方法** 采用线栓法制作大鼠脑缺血再灌注损伤模型,将 35 只 SD 大鼠随机分为假手术组($n=10$)、模型组($n=15$)及米诺环素组($n=15$)。再灌注 24 h 后,采用 Longa 法评估大鼠神经功能,激光多普勒血流仪监测大鼠脑缺血半暗带局部脑血流量,免疫组织化学法观察缺血侧皮质 ET-1 蛋白的分布情况,再灌注 6、24 h 时放射免疫法测定 ET-1 蛋白的水平。**结果** 同假手术组相比,模型组大鼠神经功能评分增加($P<0.05$);缺血半暗带脑血流量明显减少($P<0.05$),ET-1 蛋白表达显著增加($P<0.05$),米诺环素组较模型组大鼠神经功能评分明显降低($P<0.05$),脑缺血半暗带局部脑血流量增加($P<0.05$),ET-1 蛋白的表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 米诺环素可增加大鼠脑缺血后局部脑血流量,抑制 ET-1 蛋白的表达,减轻大鼠神经功能损害,从而发挥神经保护作用。

[关键词] 米诺环素;再灌注损伤;脑血流量;内皮素-1
[中图分类号] R743.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)01-0027-03

Effects of minocycline on cerebral blood flow and endothelin-1 protein expression in ischemic penumbra of rats with focal cerebral ischemia reperfusion^{*}

Tao Tao¹,Gan Linwang²,Fu Jie¹,Li Zuoxiao¹,Li Xiaogang^{1△}
(1. Department of Neurology;2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Xinan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of minocycline on regional cerebral blood flow and the expression of endothelin-1(ET-1) in ischemic penumbra of rats after focal cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) with nylon suture was used to be established as focal cerebral ischemia reperfusion mode (I/R), a total of 35 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham-operated group($n=10$), model group($n=15$) and minocycline group($n=15$). After 24 hours of I/R, The neurobehavioral function of rats was evaluated by Longa's test, the regional cerebral blood flow in ischemic penumbra was assessed with laser-Doppler flowmetry. After 6 and 24 hours of I/R, the expression of ET-1 in peri-infarct region was measured by both immunohistochemistry and radioimmunoassay. **Results** Compared with sham-group, the Longa's test scales, ET-1 protein expression increased and the rCBF decreased in ischemic penumbra in model group($P<0.05$). the Longa's test scales, ET-1 protein expression decreased and the rCBF decreased in ischemic penumbra in minocycline group when compared to the model group($P<0.05$). **Conclusion** Minocycline could promote neurological functional recovery of rats after MCAO, which might be attributed to increase the cerebral blood flow and regulate the endothelin-1 expression in ischemic penumbra.

[Key words] minocycline; reperfusion injury; cerebral blood flow; endothelin-1

脑卒中是一种因急性脑循环障碍导致神经功能缺损的临床综合征。具有高发病率、高致残率、高病死率及高复发率的特点,给社会和家庭带来了沉重的经济负担和精神负担。尽管对缺血性卒中的病理生理过程进行了大量的基础研究,但除在时间窗内给予静脉溶栓治疗外,目前仍缺乏其他有效的治疗。因此探索新的治疗方法显得尤为重要^[1]。米诺环素具有抗炎、抗凋亡、抗氧化应激及血管保护活性^[2]。前期研究表明,米诺环素可抑制小胶质细胞的激活及缺血灶周围神经元的凋亡,降低血脑屏障的通透性,减少脑梗死体积从而促进大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经功能的恢复^[3-5]。内皮素-1(endothelin-1,ET-1)主要由血管内皮细胞产生,是一种具有缩血管效应的多肽之一^[6]。脑血流量的改变会引起 ET-1 的合成及释

放^[7]。基于以上理论基础,本研究采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,观察米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血半暗带脑血流量及 ET-1 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 盐酸米诺环素(Sigma 公司),激光多普勒血流仪((Moor VMS-LDF,森西科技公司),大鼠脑立体定位仪(日本东茂公司),GC-1200 型 γ 计数器(中科中佳科学仪器公司),ET-1 放射免疫试剂盒(北京普尔伟业生物技术研究),SP 法免疫组织化学试剂盒(北京中山金桥公司),成年雄性 SD 大鼠,体质量 240~280 g(重庆医科大学实验动物中心),其他相关试剂均购自碧云天公司。

1.2 方法

^{*} **基金项目:**四川省卫生计生计划生育委员会资助项目(140032);四川省教育厅资助项目(15ZA0168);泸州市科技计划项目(2014S4506);泸州医学院院级基金资助项目(2014QN-092)。
作者简介:陶涛(1984—),博士,讲师,主要从事脑血管病的神经保护研究。 \triangle **通讯作者,**E-mail:lixg5948@163.com。

1.2.1 实验分组及给药 将 SD 大鼠根据随机数字表分为假手术组($n=10$)、模型组($n=15$)及米诺环素组($n=15$)。从各组中分别选取 5 只大鼠用于免疫组织化学及放射免疫检测。

1.2.2 大鼠脑缺血再灌注模型的制备 参照本课题组前期的实验方法^[8]。用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,固定于脑立体定位仪上,颈正中切口,分离暴露颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在 ECA 主干远端作一切口,将线栓插入至大脑中动脉(MCA)起始部,固定线栓并缝合伤口。缺血 2 h 后,将线栓拔出实施再灌注。假手术组不插入线栓,其余步骤同模型组。米诺环素组于缺血再灌注同时按 1 mL/100 g 的比例尾静脉注射 3 mg/kg 米诺环素,每日 2 次。各时间点大鼠死亡或取材时造模不成功大鼠被剔除,随机补充。

1.2.3 实验取材 再灌注 6、24 h 时,深度麻醉大鼠后直接断头取脑,冰上操作取缺血侧大脑中动脉供血脑组织(前囟前 1 mm 至前囟后 2 mm,前囟右侧 2 mm),置于一 80 ℃ 冰箱中保存用于放射免疫检测;再灌注 24 h 时,经 4% 多聚甲醛灌流固定后,选取缺血区脑组织制作石蜡切片(片厚 4 μm),用于免疫组织化学检测。

1.2.4 局部脑血流量的测定(rCBF) 大鼠麻醉后选取俯卧位,沿正中线剪开额顶部皮肤,过氧化氢暴露颅骨前囟及右侧半颅骨。在前囟右侧 2 mm,前囟后 1 mm 处用牙科钻打孔至硬脑膜外,将激光多普勒血流监测仪探针垂直固定于骨膜上,监测插线前、MCAO 时及再灌注 24 h 后各时间点的脑血流,每次记录 5 min,取其平均值。术后用骨蜡封上钻孔,缝合皮肤,继续饲养。

1.2.5 免疫组织化学检测 ET-1 的表达 选取大鼠缺血侧脑

组织石蜡切片,参照 S-P 法试剂盒说明书,DAB 显色后光镜下观察细胞质或细胞核棕黄色颗粒为阳性着色,计算 ET-1 阳性细胞数。加入 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.6 脑组织内 ET-1 水平的表达 取各组大鼠脑组织称质量后研磨匀浆,加冰浴的生理盐水制成 10% 脑匀浆液,在冷冻离心机中以 10 000 g 离心 10 min,取上清液,参照放射免疫试剂盒说明书测定 ET-1 量,结果以(pg/g 脑组织)表示。

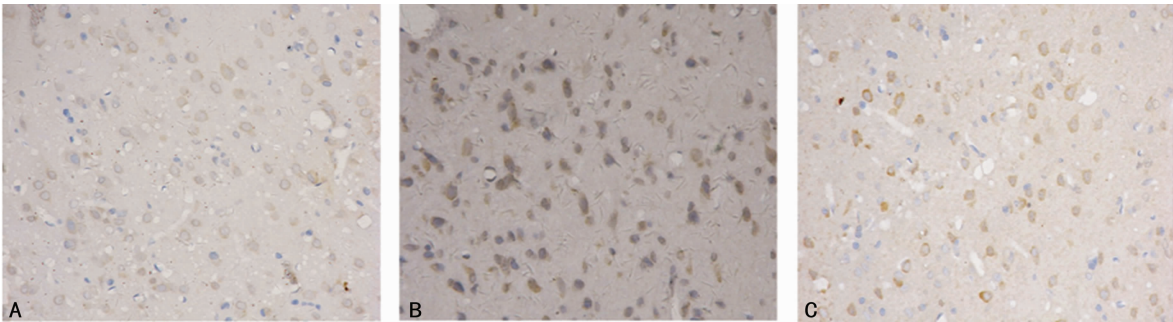
1.2.7 神经功能评分 再灌注 24 h 后,采用 Longa 评分法^[9]对大鼠进行神经功能评分:0 分,无神经缺损症状;1 分,左前肢不能完全伸展;2 分,向左侧转圈;3 分,向左侧跌倒;4 分,不能自发行走,意识水平降低。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析(one-way ANOVA),两组之间的比较采用 LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

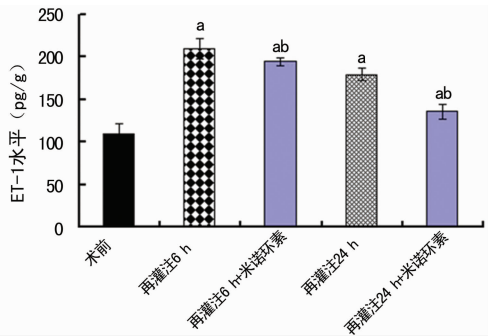
2.1 米诺环素对缺血半暗带脑血流量的影响 模型组大鼠插入线栓时缺血半暗带脑血流量下降到基线值的(55.2 ± 5.0)%,再灌注时脑血流量迅速恢复到基线值的(72.1 ± 2.9)%。再灌注 24 h 后,米诺环素组大鼠脑缺血半暗带脑血流量(86.6 ± 2.6)%明显高于模型组(76.3 ± 3.7)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 大鼠脑组织内 ET-1 蛋白的表达情况 免疫组织化学染色显示,假手术组脑组织可见少量 ET-1 阳性细胞,染色浅。缺血再灌注 24 h 后,模型组缺血灶周围 ET-1 阳性细胞数明显增加。米诺环素组与模型组比较,ET-1 阳性细胞数显著减少。见图 1。



A:假手术组;B:模型组;C:米诺环素组。

图 1 免疫组织化学检测脑组织内 ET-1 蛋白的表达(×200)



a, $P<0.05$,与假手术组比较;b, $P<0.05$,与缺血再灌注组比较。

图 2 放射免疫法检测米诺环素对缺血半暗带 ET-1 蛋白水平的影响($n=5$)

2.3 米诺环素对缺血半暗带 ET-1 蛋白水平的影响 同免疫

组织化学结果相似,放射免疫结果显示假手术组大鼠大脑中动脉供血区脑组织 ET-1 蛋白水平较低。缺血再灌注 6 h 后,大鼠缺血半暗带区 ET-1 蛋白水平开始增加,持续到再灌注 24 h,给予米诺环素干预后,各时间点 ET-1 蛋白的水平明显下降($P<0.05$),见图 2。

2.4 米诺环素对大鼠脑缺血后神经功能的影响 同假手术组相比,模型组及米诺环素组大鼠均出现明显的神经功能缺损($P>0.05$)。缺血再灌注 24 h 后,米诺环素组[(1.6 ± 0.5)分]神经功能评分显著低于模型组[(2.8 ± 0.4)分],差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

脑梗死是多种原因引起脑局部血流减少或供血中断,导致脑组织缺血性坏死。急性脑梗死灶包括中心坏死区及周围的缺血半暗带两种不同的组织区域。缺血半暗带含有大量存活

的神经细胞且存在侧支循环。脑梗死急性期迅速恢复脑血流量可以改善缺血半暗带区神经细胞的脑代谢,阻止其发生不可逆的坏死。因此,脑梗死后改善缺血半暗带区域血液灌注是目前脑梗死急性期治疗的重要靶点。

激光多普勒血流仪是一种既可以评价大鼠大脑中动脉阻塞模型,又可以用于检测各供血动脉支配区大脑皮质局部脑血流量的技术。具有实时定量、动态连续及客观敏感等特点。大鼠局灶性脑缺血模型成功的标志为插入线栓后大脑中动脉供血区皮质脑血流量迅速下降到基线值的 25.0%左右。本研究结果显示,脑缺血后缺血半暗带脑血流量下降了约 50.0%,同前期报道结果相一致^[10]。静脉给予米诺环素可以明显提高大鼠缺血半暗带局部脑血流量,提示米诺环素发挥神经保护作用可能与改善缺血半暗带局部脑血流量有关。

ET-1 是一种广泛分布于心血管及脑等组织器官,具有强大缩血管效应的生物活性多肽。在中枢神经系统中,ET-1 在内皮细胞、神经元及星形胶质细胞上均有表达。大量研究表明 ET-1 蛋白在缺血性脑损伤过程中起到重要作用。脑缺血后 ET-1 异常表达或释放增加,参与调节血管收缩、脑血流量及神经毒性作用。大鼠短暂性脑缺血后,免疫活性的 ET-1 蛋白分布在缺血灶周围的星形胶质细胞上。进一步采用 ELISA 检测可发现缺血性脑损伤的大鼠血液中 ET-1 蛋白表达增加^[6]。在小鼠缺血缺氧损伤模型中,星形胶质细胞及脑微血管内皮细胞内 ET-1 mRNA 均呈高表达^[11]。脑缺血大鼠细胞质内 ET-1 蛋白水平明显升高,其表达水平在一定程度上与神经功能的损坏程度紧密相关。本研究发现,大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后,缺血半暗带内 ET-1 蛋白于缺血 6 h 后就开始表达增加,一直持续到再灌注后 24 h,同 Zhang 等^[6] 研究报道一致。以上研究表明 ET-1 蛋白水平增加引起血管舒张受限是导致缺血性脑损伤的重要机制。米诺环素是一种半合成的四环素类抗菌药物,最先被广泛应用于治疗严重感染及类风湿性关节炎。由于其脂溶性高,易于通过血脑屏障,目前受到神经病学家的广泛关注。近期大量研究表明,米诺环素在多种中枢神经系统疾病中具有神经保护作用。有研究者采用 1 型糖尿病大鼠局灶性脑缺血模型研究表明,静脉联合给予米诺环素和组织性纤溶酶原激活物可以缓解大鼠缺血灶周围的炎性反应,减轻脑水肿,降低脑梗死面积及减少出血转化^[5]。一项临床研究表明,口服 200 mg 米诺环素可以促进急性脑梗死患者 30 d 的神经功能改善^[12]。本研究发现,静脉给予 3 mg/kg 米诺环素可缓解大鼠缺血再灌注 24 h 神经功能的损坏,推测其作用可能与调节缺血半暗带内 ET-1 蛋白的表达有关。

综上所述,本研究发现大鼠大脑中动脉闭塞再灌注损伤后,缺血半暗带内 ET-1 蛋白表达升高,脑血管强烈收缩导致局部脑血流量减少,能量代谢中断,引起脑组织缺血性损伤。米诺环素能促进脑缺血大鼠神经功能的恢复,其作用机制可能与抑制缺血半暗带内 ET-1 蛋白的表达,增加局部脑血流量有关。这为进一步阐明米诺环素促进大鼠缺血性脑损伤后神经修复机制提供了实验依据。

参考文献

[1] Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, et al. Guidelines

for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association[J]. Stroke, 2011, 42(2): 517-584.

[2] Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, et al. Prospects for minocycline neuroprotection[J]. Arch Neurol, 2010, 67(12): 1442-1448.

[3] Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism[J]. Stroke, 2008, 39(3): 951-958.

[4] Tao T, Xu G, Si Chen C, et al. Minocycline promotes axonal regeneration through suppression of RGMa in rat MCAO/reperfusion model[J]. Synapse, 2013, 67(4): 189-198.

[5] Fan X, Lo EH, Wang X. Effects of minocycline plus tissue plasminogen activator combination therapy after focal embolic stroke in type 1 diabetic rats[J]. Stroke, 2013, 44(3): 745-752.

[6] Zhang Q, Zhang L, Yang X, et al. The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(6): 1696-1702.

[7] Henze D, Menzel M, Soukup J, et al. Endothelin-1 and cerebral blood flow in a porcine model[J]. J Clin Neurosc, 2007, 14(7): 650-657.

[8] 陶涛, 秦新月, 徐广会. 养血清脑颗粒对缺血/再灌注大鼠脑炎因子表达和轴突再生的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(6): 592-594.

[9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[10] Bratane BT, Cui H, Cook DJ, et al. Neuroprotection by freezing ischemic penumbra evolution without cerebral blood flow augmentation with a postsynaptic density-95 protein inhibitor[J]. Stroke, 2011, 42(11): U547-3265.

[11] Li JJ, Wu LH, Cao Q, et al. Endothelins-1/3 and endothelin-A/B receptors expressing glial cells with special reference to activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia in the adult rats[J]. Neuroscience, 2010, 167(3): 665-677.

[12] Lampl Y, Boaz M, Gilad R, et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study[J]. Neurology, 2007, 69(14): 1404-1410.

(收稿日期: 2015-08-10 修回日期: 2015-09-16)