

雷帕霉素对大鼠脑缺血再灌注后神经元损害的保护作用

李丽茹 黄杰

201400 上海交通大学附属第六人民医院南院 上海市奉贤区中心医院急诊医学科(李丽茹), 中西医结合科(黄杰)

通信作者: 黄杰, Email: hjie1970@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.03.007

【摘要】 目的 观察雷帕霉素对大鼠脑缺血再灌注后神经元损害的保护作用。方法 52只雄性SD大鼠随机分为对照组和实验组(雷帕霉素干预)各24只,另4只为假手术组。采用Longa线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,缺血3h后,于再灌注4h、6h、12h、24h、72h、7d进行各指标观察;其中实验组在构建脑梗模型之前进行腹腔注射雷帕霉素(1mg/kg),假手术组不插线,其余过程同对照组。采用TTC染色法观察脑组织变化;免疫组织化学(免疫荧光法)检测Bcl-2、Caspase-3及自噬相关蛋白LC-3的变化。结果 TTC染色假手术组未见缺血表现,缺血3h后可见病灶侧脑组织苍白,实验组病灶小于对照组。实验组大鼠灌注6、12、24h时神经功能缺损评分均明显低于对照组($P < 0.05$)。Caspase-3的表达:再灌注4h表达显著增高,至24h左右达高峰,实验组再灌注6h、24h、7d表达明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); Bcl-2的表达:再灌注4h增多,24h达高峰,实验组再灌注4、6、12、24h表达明显高于对照组($P < 0.05$);实验组LC-3表达明显高于对照组。结论 雷帕霉素能促进LC-3表达,抑制细胞凋亡;抑制Caspase-3的表达,增加Bcl-2的表达从而减轻缺血所致的损伤,对大鼠缺血后神经功能的恢复有确切的疗效。

【关键词】 雷帕霉素; 脑缺血; 再灌注; Bcl-2; Caspase-3

基金项目: 上海市奉贤区科学技术委员会科学技术发展基金项目(奉科20131407);上海市卫生局面上项目(20124286)

Protective effects of rapamycin on neuronal damage after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats

Li Liru, Huang Jie

Emergency Medical Department, the Sixth People's Hospital South Campus Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201400, China (Li LR); Department of Integrated Tradition and Western Medicine, the Sixth People's Hospital South Campus Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201400, China (Huang J)

Corresponding author: Huang Jie, Email: hjie1970@163.com

【Abstract】 Objective To observe and evaluate the protective effects of rapamycin on neuronal damage after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Methods** A total of 52 male SD rats were randomly divided into control group and experimental group (rapamycin intervention group), with 24 rats in each group, and the other 4 rats were assigned into sham-operated group. The model of focal ischemia-reperfusion was prepared by Longa's method. Each index was observed at the 4th, 6th, 12th, 24th, 72nd hour and the 7th day after reperfusion for 3 hours. The experimental group was injected with rapamycin (1 mg/kg) intraperitoneally before establishing the cerebral infarction model. The sham-operated group did not plug the thread, and the rest of the process was same with the control group. The changes of brain tissue were observed by TTC staining. Changes of Bcl-2, Caspase-3 and autophagy related protein LC-3 were detected by immunohistochemistry (immunofluorescence). **Results** There was no ischemia detection in TTC staining sham operation. After 3 hours of ischemia, the lesion side brain tissue was pale, and the lesions in the experimental group were smaller than those in the control group. The score of neurological deficit of the experimental group at the 6th, 12th and 24th hour after reperfusion was lower than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of caspase-3 increased significantly at the 4th hour after reperfusion and peaked at 24h, and the expression of caspase-3 of experimental group at the 6th, 24th hour and the 7th day was significantly lower than that of control group, and the difference

was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of Bcl-2 increased at the 4th hour after reperfusion, and peaked at the 24th hour after reperfusion. The reperfusion at the 4th, 6th, 12th and 24th hour of the experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of LC-3 of the experimental group was significantly higher than that of the control group. **Conclusions** Rapamycin can promote LC-3 expression to inhibit apoptosis, reduce the expression of Caspase-3 and increase the expression of Bcl-2, so as to reduce the injury caused by ischemia, which has a definite effect on the recovery of neurological function after ischemia in rats.

【Key words】 Rapamycin; Cerebral ischemia; Reperfusion; Bcl-2; Caspase-3

Fund programs: Scientific Technology Development Foundation Program of Shanghai Fengxian District Scientific Technology Committee (Fengxian 20131407); Project of Shanghai Health Bureau (20124286)

脑血管病作为常见病、多发病严重威胁着人身体健康,已经成为全球第一致残和第三致死性疾病,而缺血性脑血管病占整个脑血管病的85%以上^[1]。研究发现mTOR激酶抑制剂—雷帕霉素可以诱导自噬的发生、抑制半胱天冬酶,从而抑制细胞凋亡^[1],雷帕霉素对于脑缺血是否具有保护作用,是否通过自噬途径对脑缺血具有保护作用还不是很清楚。本实验Longa线栓法制备大鼠脑缺血-再灌注模型,观察雷帕霉素对于脑缺血后凋亡相关蛋白Bcl-2、Caspase-3及自噬相关蛋白LC-3的表达影响,现报道如下。

一、材料与方法

1. 动物及实验材料:选择清洁级雄性SD大鼠(10~12周龄,常州卡文斯)52只,随机分为假手术组4只、对照组及实验组(雷帕霉素干预)各24只。对照组和实验组大鼠缺血2h后,进一步分为再灌注4h、6h、12h、24h、72h、7d组。实验材料—抗:Bcl-2(博士德公司);Caspase-3(Abcam,货号ab49822);LC-3(Abcam,货号ab192890);二抗羊抗兔(联科生物,货号GAM4882)。

2. 造模及干预方法:Longa线栓法^[2]制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,用1%的戊巴比妥钠(40mg/kg体重)腹腔麻醉,颈部正中切口,逐步分离左侧颈总动脉(CCA)、左侧颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA)。近心端结扎颈总动脉,并在其上剪一小口,切口远端打一松扣,将一头端烧成球形的直径0.165mm的鱼线插入切口,扎紧切口远端丝线,松开动脉夹,将鱼线缓慢向ICA入颅的方向推进,至有阻力不能再进为止。其中实验组在构建脑梗模型之前进行腹腔注射雷帕霉素(1mg/kg);假手术组除不进线外,其余过程同对照组。大鼠术后笼中喂养,自由进食、饮水,根据不同时间点处死动物,留取标本。

3. 评价方法:(1)神经功能缺损评分:根据Longa^[2]评分法进行神经功能缺损评分,具体评分标准如下:0分,无神经缺损症状;1分,右前肢屈曲;2分,转圈

实验阳性;3分,向右侧倾倒;4分,不能行走或意识障碍。其中1~4分为有效模型。(2)TTC染色法观察脑组织病理变化。(3)免疫组织化学(免疫荧光检测法)检测各组凋亡相关蛋白Bcl-2、Caspase-3及自噬蛋白LC-3表达水平。

4. 统计学方法:采用统计软件SPSS 16.0对收集的数据进行整理与统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间不同时间点比较行 t 检验,计数资料采用%表示,进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

二、结果

1. 病理组织学结果:见图1(见本期封三)。TTC染色假手术组未见缺血病灶,对照组左侧大脑皮质顶叶呈典型的缺血性坏死,实验组较对照组梗死灶明显减小,梗死部位以基底节区为主,半暗带面积较对照组小,脑水肿明显减轻。

2. 神经功能缺损评分比较:见表1。实验组再灌注6h、12h、24h评分明显低于对照组($P < 0.05$),其余时间点差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3. 免疫荧光结果:见表2、3,图2~4(见本期封三)。Caspase-3的表达:再灌注4h表达显著增高,至24h左右达高峰,实验组再灌注6h、24h、7d表达明显低于对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);Bcl-2的表达:再灌注4h增多,24h达高峰,实验组再灌注4、6、12、24h表达明显高于对照组($P < 0.05$);实验组LC-3表达明显高于对照组。

讨论 脑血管病作为人类第一致残性疾病严重困扰着医务工作者,如何做到有效的治疗是一项艰巨的任务,而缺血性脑血管病在所有脑血管病中占85%以上。凋亡作为细胞死亡的另外一种方式,已经备受关注,神经元脑缺血所诱发的凋亡过程极为复杂,有众多凋亡信号通路参与神经元凋亡的发生发展^[3-4];近年来研究显示,PI3K/AKT/mTOR信号通路是细胞内重要的信号转导分子,mTOR为一种苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶,在体内广泛表达,参与调

表1 对照组和实验组神经功能缺损评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注4 h	再灌注6 h	再灌注12 h	再灌注24 h	再灌注72 h	再灌注7 d
对照组	1.83 ± 0.24	1.66 ± 0.19	2.23 ± 0.18	2.55 ± 0.23	1.75 ± 0.15	1.85 ± 0.25
实验组	1.41 ± 0.13	0.93 ± 0.13	1.55 ± 0.16	1.56 ± 0.18	1.13 ± 0.07	1.52 ± 0.16
t值	0.850	2.571 ^a	2.648 ^a	2.591 ^a	0.681	0.981

注: ^a*P* < 0.05

表2 对照组和实验组 Caspase-3 表达的阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注4 h	再灌注6 h	再灌注12 h	再灌注24 h	再灌注72 h	再灌注7 d
对照组	21.75 ± 2.43	23.73 ± 1.55	27.47 ± 1.75	31.26 ± 2.92	13.12 ± 1.85	9.24 ± 1.45
实验组	21.12 ± 1.36	22.82 ± 1.65	27.76 ± 1.55	29.83 ± 1.66	13.39 ± 0.65	8.97 ± 1.23
t值	0.205	1.752 ^a	0.362	1.897 ^a	0.534	1.682 ^a

注: ^a*P* < 0.05

表3 对照组和实验组 Bcl-2 表达的阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注4 h	再灌注6 h	再灌注12 h	再灌注24 h	再灌注72 h	再灌注7 d
对照组	7.75 ± 0.91	16.66 ± 0.95	11.83 ± 0.46	8.15 ± 1.13	8.01 ± 0.85	3.75 ± 0.93
实验组	12.89 ± 1.16	22.88 ± 0.73	22.15 ± 0.87	21.15 ± 1.33	8.28 ± 0.52	4.25 ± 0.05
t值	3.560 ^a	5.369 ^a	6.358 ^a	8.652 ^a	0.472	0.781

注: ^a*P* < 0.05

节细胞代谢、存活^[5-6]; 研究发现在脑缺血半暗带内部的神经元凋亡主要由线粒体通路和死亡受体介导通路这两条 Caspase 介导的通路诱导神经元凋亡^[7-8]。

本实验采用 Longa 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 模拟临床上出现的脑梗死, 以脑缺血 3 h 作为缺血时间点, 这个时间点与目前临床静脉溶栓时间点相一致, 本研究把细胞损害的杀手半胱天冬酶 Caspase-3 和凋亡保护蛋白 Bcl-2 作为实验研究指标, 研究表明: Caspase-3 在缺血再灌注 4 h 即有明显表达, 24 h 表达显著升高; Bcl-2 在再灌注 6 h 表达显著增高, 到再灌注 7 d 时明显下降, 再灌注早期(24 h 内) Bcl-2 的表达随缺血时间的延长而增多, 再灌注后期(72 h 后) 其表达几乎与缺血时间长短无关, 本实验说明缺血后神经元损害即刻就会出现, 开始神经损害轻微, 但随着时间延长因为缺血导致的瀑布反应众多因子参与从而导致神经损害进一步加重。另外, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 早期有表达, 在缺血再灌注 72 h 达到高峰期, 且持续 7 d, 说明 72 h 后 Bcl-2 在这个时期一直处于高度活化状态, 起着抗击神经元损害角色作用。Bcl-2 开始增高是脑缺血再灌注所引发的级联反应, 72 h 后的升高可能是通过 PI3k/mTOR/Bcl-2 信号通路来调节促进 Bcl-2 的高表达^[9]。Bcl-2 表达的增高, 抑制了神经元的凋亡, 促进神经元的存活。而 Caspase-3 在脑缺血再灌注 24 h 达高峰并持续到 72 h, 其后下降, 至 7 d 时明

显降低, 降至再灌注 4 h 水平, 再灌注早期(24 h 内) Caspase-3 的表达随缺血时间的延长而增多, 再灌注后期(72 h 后) 其表达几乎与缺血时间长短无关, 与 Bcl-2 相似。

自噬是细胞对于生存环境的一种适应反应, 正常情况下自噬可以清除细胞内的代谢废物, 通过缺血缺氧动物模型, 证实了自噬不但对营养缺乏状态下的神经细胞起保护性作用^[10-12], 雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素, 雷帕霉素在哺乳动物细胞内特定作用靶点是 mTOR 蛋白, 已有的研究显示: 在缺血缺氧状态下, 细胞中 mTOR 是调节自噬的关键因子, 雷帕霉素作为 mTOR 激酶抑制剂, 对自噬发挥正向调节作用^[13]。本实验研究还发现, 脑缺血可以诱导自噬相关蛋白 LC-3 的表达, 脑缺血早期即有自噬表达, 早期表达可能是脑缺血后细胞启动自身保护作用; 后期 LC-3 增多可能与雷帕霉素通过 mTOR 蛋白的激活, 从而促进自噬相关蛋白 LC-3 表达有关, 另外雷帕霉素可以下调 Caspase-3 的活性; 推测雷帕霉素对脑缺血的保护作用可能是通过 PI3K/mTOR/Bcl-2 信号通路来调节, 促进自噬出现、抑制细胞凋亡。

综上所述, 本试验通过免疫组织化、细胞超微结构的研究, 提示雷帕霉素通过促进 Bcl-2 的表达、抑制 Caspase-3 及自噬相关蛋白 LC-3 产生对脑缺血再灌注早期的损伤起到保护作用。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计与实施为李丽茹、黄杰, 论文撰写为李丽茹, 论文修订为黄杰

参 考 文 献

[1] Chavez-Valdez R, Flock DL, Martin LJ, et al. Endoplasmic reticulum pathology and stress response in neurons precede programmed necrosis after neonatal hypoxia-ischemia [J]. Int J Dev Neurosci, 2016, 48: 58-70. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2015.11.007.

[2] Fleiss B, Chhor V, Rajudin N, et al. The Anti-Inflammatory Effects of the Small Molecule Pifithrin- μ on BV2 Microglia [J]. Dev Neurosci, 2015, 37(4/5): 363-375. DOI: 10.1159/000370031.

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

[4] Thornton C, Leaw B, Mallard C, et al. Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia [J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 248. DOI: 10.3389/fncel.2017.00248.

[5] Chang YY, Juhász G, Goraksha-Hicks P, et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt1): 232-236. DOI: 10.1042/BST0370232.

[6] 孙振刚, 文益民, 毛庆花, 等. 三磷酸腺苷通过激活 mTOR/STAT3 信号通路促进大鼠脊髓损伤修复 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(2): 165-171.

[7] 王行健, 郑玮. 阿尔茨海默病与自噬 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(15): 3876-3881. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.15.106.

[8] Luo G, Li Q, Zhang X, et al. Ablation of C/EBP homologous protein increases the acute phase mortality and doesn't attenuate cardiac remodeling in mice with myocardial infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(1): 201-207. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.117.

[9] Carling D, Thornton C, Woods A, et al. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? [J]. Biochem J, 2012, 445(1): 11-27. DOI: 10.1042/BJ20120546.

[10] Sato A, Sunayama J, Matsuda K, et al. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR [J]. Neurosci Lett, 2010, 470(2): 115-120. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.12.067.

[11] Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases [J]. Nat Rev Neurosci, 2015, 16(6): 345-357. DOI: 10.1038/nrn3961.

[12] 赵雅宁, 孙竹梅, 刘俊杰, 等. 大鼠蛛网膜下腔出血后细胞外调节蛋白激酶 1/2 激活介导海马区神经细胞自噬 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 43(2): 110-115. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0152.2017.02.010.

Zhao YN, Sun ZM, Liu JJ, et al. The activation of extracellular regulated protein kinase 1/2 induces neuron autophagy in the hippocampus in a rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2017, 43(2): 110-115.

[13] 韦勇, 杨四军. 细胞自噬的调控与自噬程序性死亡的研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2016, 39(5): 493-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2016.05.017.

Wei Y, Yang SJ. The regulation of autophagy and autophagic programmed cell death [J]. International Journal of Immunology, 2016, 39(5): 493-497.

(收稿日期: 2017-12-09)

(本文编辑: 赵静姝)

· 消息 ·

《神经疾病与精神卫生》杂志 2018 年征稿通知

《神经疾病与精神卫生》杂志是神经、精神科学及精神卫生领域的学术性期刊(CN23-1479/R, ISSN1009-6574, 月刊)。为更好地服务神经科学、精神科学以及精神卫生领域的专家、作者和读者, 构建理想的学术交流平台, 配合本刊 2018 年的重点号刊发, 特发出征稿通知, 希望有关学科方向的医护工作者和学者能多给予支持。

解读本刊

中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

征稿内容

1. 精神疾病的流行病学调查; 2. 社区精神病学; 3. 女性心理健康; 4. 中西医结合治疗精神疾病; 5. 老年精神病学; 6. 睡眠障碍; 7. 帕金森及运动障碍疾病; 8. 神经康复; 9. 神经介入及内镜治疗; 10. 神经退行性疾病的基础研究; 11. 颅脑创伤研究; 12. 脑小血管病。此外, 以上所列方向相关的护理研究同为本刊重点征稿范围。

来稿要求

详见稿约。

相关事宜

(1) 来稿请注明为征稿稿件, 并备注相对应的征稿方向及编号(如: 1. 精神疾病的流行病学调查); (2) 所有符合征稿方向的稿件均享受优先审稿、优先发表的权利。

联系方式

地址: 北京市宣武门外大街香炉营东巷 2 号院 1-7-302 神经疾病与精神卫生杂志社 邮编: 100052
电话: 010-83191160 传真: 010-83191161 电子信箱: ndmh@ndmh.com