

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002790

上调 A1 腺苷受体减轻继发性脑损伤

陈东栋¹, 黄擎擎², 陆 华¹, 蒋云召¹, 葛 风¹, 王 泳¹

(1. 江南大学附属医院神经外科, 无锡 214000; 2. 江苏省原子能研究所普外科, 无锡 214000)

【摘要】目的:探讨 A1 腺苷受体(A1 adenosine receptor, A1AR)在脑出血(intracranial hemorrhage, ICH)诱导的继发性脑损伤(secondary brain injury, SBI)中的作用。**方法:**将 30 只成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、脑出血组、激动剂组[A1 腺苷受体激动剂 N(6)-环己基黄素, R-PIA]和拮抗剂组(A1 腺苷受体拮抗剂 8-苯基-1,3-二丙基黄嘌呤, 8-PT), 最终每组 6 只。以胶原酶注射法建立 ICH 模型。造模前 30 min 给予激动剂和拮抗剂, 48 h 后进行检查。分别予免疫蛋白印迹检测 A1AR、活性 Caspase-3、白蛋白、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bax 的表达; 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)观察神经元凋亡; 湿/干比法评估脑水肿程度。**结果:**激动剂组 A1AR 的表达明显上调($P=0.000$), 拮抗剂组 A1AR 的表达下调。激动剂组细胞凋亡减少($P=0.003$), 活性 Caspase-3、白蛋白的水平下调($t=4.649, P=0.043; t=24.89, P=0.001$)。拮抗剂组细胞凋亡增多, 活性 Caspase-3、白蛋白水平上调($t=12.49, P=0.006; t=8.501, P=0.013$)。激动剂组 Bcl-2 表达增加($t=14.13, P=0.005$)、Bax 表达下调, 脑水肿程度减轻($P=0.007$)。**结论:**激活 A1AR 可增加 Bcl-2 表达, 减轻脑水肿, 减少神经细胞凋亡, 抑制继发性脑损伤。

【关键词】脑出血; 继发性脑损伤; A1 腺苷受体; B 淋巴细胞瘤-2 基因**【中图分类号】**R89**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-05-06

Up-regulation of A1 adenosine receptor in alleviating secondary brain injury

Chen Dongdong¹, Huang Qingqing², Lu Hua¹, Jiang Yunzhao¹, Ge Feng¹, Wang Yong¹

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Jiangnan University;

2. Department of General Surgery, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the role of A1 adenosine receptor (A1AR) in secondary brain injury (SBI) induced by intracranial hemorrhage (ICH). **Methods:** Thirty adult male SD rats were randomized into sham operation group, ICH group, agonist group [A1 adenosine receptor agonist N(6)-cyclohexylflavin, R-PIA] and antagonist group (A1 adenosine receptor antagonist 8-phenyl-1,3-dipropylxanthine, 8-PT), with 6 rats in each group. A collagenase-induced ICH model was established. The agonists and antagonists were administered 30 minutes before modeling and examinations were performed 48 hours later. The expressions of A1AR, active Caspase-3, albumin, B cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bax were detected by Western blot. The apoptosis of neurons was observed by TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL). The degree of brain edema was evaluated by wet/dry ratio. **Results:** The expression of A1AR in agonist group was significantly up-regulated ($P=0.000$), while that in antagonist group was down-regulated. In agonist group, apoptosis decreased ($P=0.003$), and the levels of active Caspase-3 and albumin decreased ($t=4.649, P=0.043; t=24.89, P=0.001$). In the antagonist group, apoptosis increased, and the levels of active Caspase-3 and albumin were up-regulated ($t=12.49, P=0.006; t=8.501, P=0.013$). In agonist group, Bcl-2 expression increased ($t=14.13, P=0.005$), Bax expression decreased, and the degree of brain edema decreased ($P=0.007$). **Conclusion:** Activation of A1AR can increase the expression of Bcl-2, relieve brain edema, reduce nerve cell apoptosis and inhibit secondary brain injury.

【Key words】intracranial hemorrhage; secondary brain injury; A1 adenosine receptor; B cell lymphoma 2

颅内出血(intracranial hemorrhage, ICH)是目前

作者介绍: 陈东栋, Email: chendongdong1357@163.com,

研究方向: 脑血管病及脑肿瘤治疗。

通信作者: 黄擎擎, Email: huangqingqing@jinnm.org。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210412.2041.034.html>

(2021-04-13)

人类健康的主要威胁^[1-2]。脑出血早期主要是组织破坏产生占位效应并引起相应的临床症状, 及时手术清除血肿为此期主要治疗方法。血肿不能及时清除, 会继发周围脑组织缺血、水肿^[3]、细胞凋亡^[4]等损害。此期手术可延缓病情进展, 但已受损脑组织功

能不易完全恢复。临床多数患者不能早期及时手术,现有营养神经药物起效缓慢,因此,探索能快速有效减轻继发性脑损伤的药物成为临床神经外科医生的需求。

腺苷是一种具有多种生物学功能的介质,通过与其受体结合发挥作用。在 ICH 期间,其浓度急剧增加,激活 4 种腺苷受体(adenosine receptors, ARs)。近年来,越来越多的证据表明 A1 腺苷受体(A1 adenosine receptor, A1AR)可促进脑源性神经营养因子的产生^[5],抑制凋亡和细胞坏死^[6],并刺激热休克蛋白产生,维持细胞骨架稳定^[7],抑制兴奋性氨基酸释放等神经保护作用。

研究表明 A1AR 在缺氧/缺血中上调 Bcl-2 发挥保护作用^[8]。然而,人们对它在 ICH 条件下的作用知之甚少。本实验欲探索腺苷 A1AR 在 ICH 条件下是否可以发挥神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与分组

抗 A1 腺苷受体抗体(ab82477)、活性 Caspase-3(ab2302)、鸡抗白蛋白抗体(ab106582)、兔抗 NeuN 抗体(ab177487)、鼠抗 NeuN 抗体(ab104224)购自 Abcam 公司。 β -肌动蛋白(sc-47778)购自 Santa Cruz 公司。

分为假手术组、脑出血(ICH)组、激动剂(ICH+R-PIA)组、拮抗剂(ICH+8-PT)组。

1.2 脑出血模型的建立

将体质量为 270~350 g 的成年雄性 SD 大鼠完全麻醉并置于立体定位装置框架(上海阮龙科技发展有限公司,中国上海),其中放置加热垫以保持温度为 27~30 ℃。根据尾部收缩反应,如果需要,可以腹腔内注射额外的水合氯醛(按老鼠体质量每 100 g 注射 1 mL 水合氯醛)。实验性 ICH 模型是通过立体定位插入具有圆形尖端和侧孔进入基底神经节。用微量注射器将胶原酶 IV 注入该位置。使用骨蜡来封闭骨孔,以避免脑脊液和血液流出。然后将大鼠放入笼中,自由获取食物和水。

1.3 免疫蛋白印迹实验

收集脑组织后,将每个样品分别匀浆并在冰冻的 RIPA 裂解缓冲液(P0013; Beyotime, Shanghai, China)上裂解。在 4 ℃以 12 500g 离心 15 min 后,收集上清液并使用标准 BCA(Beyotime, P0012)测量蛋白质浓度。然后,将等量的蛋白质样品(100 μ g/泳道)上样到 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶上,分离,并电泳转移到 PVDF 膜(IPVH00010; Millipore, Billerica, MA, USA)。在 37 ℃下在 5%脱脂乳中封闭 2 h,在 4 ℃下一抗检测膜过夜。然后将其与辣根过氧化物酶连接的二抗在 37 ℃温育 1.5 h,洗涤后显影。利用 Image J 程序分析蛋白质的相对量。

分别检测 A1AR、活性 Caspase-3(与细胞凋亡正相关)、白蛋白(与血脑屏障通透性相关)、Bcl-2、Bax 表达情况。

1.4 TUNEL

对样本进行脱蜡和脱水;样本加热后将其在二甲苯和各种浓度的乙醇中冲洗。在 PBST 中洗涤后,用含有 4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)的抗褪色封固剂保护切片。仔细计数阳性 TUNEL 每毫米的细胞数并取平均值。

1.5 脑水肿

脑含水量用作反映 SBI 的指标。将大鼠随机分为假手术组(仅注射生理盐水)、脑出血组、激动剂组(RPIA,溶解于 20%DMSO 的生理盐水中,配成浓度为 5 μ g/mL,腹腔注射)、拮抗剂组(8-PT,溶解于 20%DMSO 的生理盐水中,配成浓度为 0.2 mg/mL,腹腔注射)。通过湿/干比法评估脑水肿。收集后立即称量样品(湿重),然后在 100 ℃下干燥 72 h(干重)。脑含水量计算=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.6 统计学处理

使用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述。组间比较通过单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 A1AR 激活抑制 Caspase-3 的活化和白蛋白的外渗,诱导 Bcl-2 的表达,并抑制 Bax 的产生

成功建模后(图 1),激动剂组与脑出血组相比,A1AR 的表达明显增多(3.526 ± 0.217 vs. 1.727 ± 0.186 , $t=61.26$, $P=0.000$);拮抗剂组与脑出血组相比,A1AR 表达下调(1.153 ± 0.268 vs. 1.727 ± 0.186)。脑出血组与假手术组相比,活性 Caspase-3 蛋白水平(1.293 ± 0.110 vs. 0.798 ± 0.126)增加,白蛋白外渗(1.441 ± 0.089 vs. 0.241 ± 0.056 , $t=17.23$, $P=0.003$)明显增多。激动剂组与脑出血组相比,活性 Caspase-3(0.728 ± 0.092 vs. 1.293 ± 0.110 , $t=4.649$, $P=0.043$)、白蛋白(0.342 ± 0.040 vs. 1.441 ± 0.089 , $t=24.89$, $P=0.001$)明显下调(图 2)。拮抗剂组与脑出血组相比,活性 Caspase-3(2.518 ± 0.127 vs. 1.293 ± 0.110 , $t=12.49$, $P=0.006$)、白蛋白(1.862 ± 0.186 vs. 1.441 ± 0.089 , $t=8.501$, $P=0.013$)表达明显上调(表 1)。

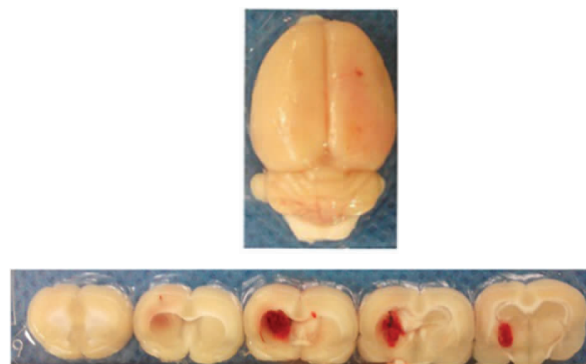


图 1 ICH 大鼠的 48 h 脑切片

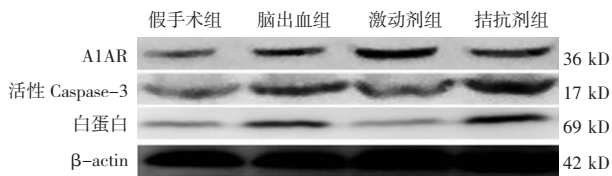


图2 使用蛋白印迹检测 A1AR、活性 Caspase-3 和白蛋白水平

表1 各组 A1AR、活性 Caspase-3、白蛋白的表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A1AR	活性 Caspase-3	Albumin
假手术组	0.553 ± 0.104	0.798 ± 0.126	0.241 ± 0.056
脑出血组	1.727 ± 0.186	1.293 ± 0.110	1.441 ± 0.089
激动剂组	3.526 ± 0.217 ^a	0.728 ± 0.092 ^b	0.342 ± 0.040 ^d
拮抗剂组	1.153 ± 0.268	2.518 ± 0.127 ^c	1.862 ± 0.186 ^e
F 值	124.800	98.660	538.400
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 ICH 组相比,A1AR 表达明显增加;b:与 ICH 组相比,活性 Caspase-3 表达下降;c:与 ICH 组相比,活性 Caspase-3 表达增多;d:与 ICH 组相比,白蛋白表达下降;e:与 ICH 组相比,白蛋白表达增加

脑出血组中,Bcl-2 呈低水平表达(图3)。激动剂组较脑出血组 Bcl-2 表达明显增加(3.173 ± 0.232 vs. 0.184 ± 0.075 , $t=14.13$, $P=0.005$)。拮抗剂组 Bcl-2 表达下调,与脑出血组相比无统计学差异(0.079 ± 0.032 vs. 0.184 ± 0.075 , $t=1.413$, $P=0.293$)。而 Bax 在脑出血组中较高,激动剂组与脑出血组相比下降(0.204 ± 0.100 vs. 0.572 ± 0.135 , $t=4.201$, $P=0.050$);拮抗剂组与脑出血组相比再次升高(1.450 ± 0.188 vs. 0.572 ± 0.135 , $t=4.525$, $P=0.045$)(表2)。

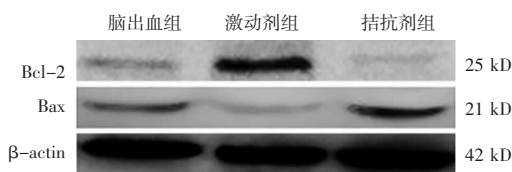


图3 Bcl-2、Bax 在脑出血组、激动剂组、拮抗剂组中的表达

表2 各组 Bcl-2、Bax 的表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax
脑出血组	0.184 ± 0.075	0.572 ± 0.135
激动剂组	3.173 ± 0.232 ^a	0.204 ± 0.100 ^b
拮抗剂组	0.079 ± 0.032	1.450 ± 0.188 ^c
F 值	250.300	28.330
P 值	0.001	0.004

注:a,与 ICH 组相比,Bcl-2 表达增加;b:与 ICH 组相比,Bax 表达减少;c:与 ICH 组相比,Bax 表达增加

2.2 A1AR 激活减少神经元凋亡

脑出血组与假手术组相比,凋亡细胞数量明显增加(44.724 ± 1.772 vs. 12.619 ± 1.672 , $t=20.07$, $P=0.002$)(图4)。激动剂组与脑出血组相比,凋亡细胞数量明显减少(14.979 ± 1.386 vs. 44.724 ± 1.772 , $t=17.14$, $P=0.003$)。拮抗剂组与脑出

血组比较,凋亡细胞数量增多(53.788 ± 8.698 vs. 44.724 ± 1.772 , $t=1.522$, $P=0.267$),但差异无统计学意义。

2.3 脑水肿测定

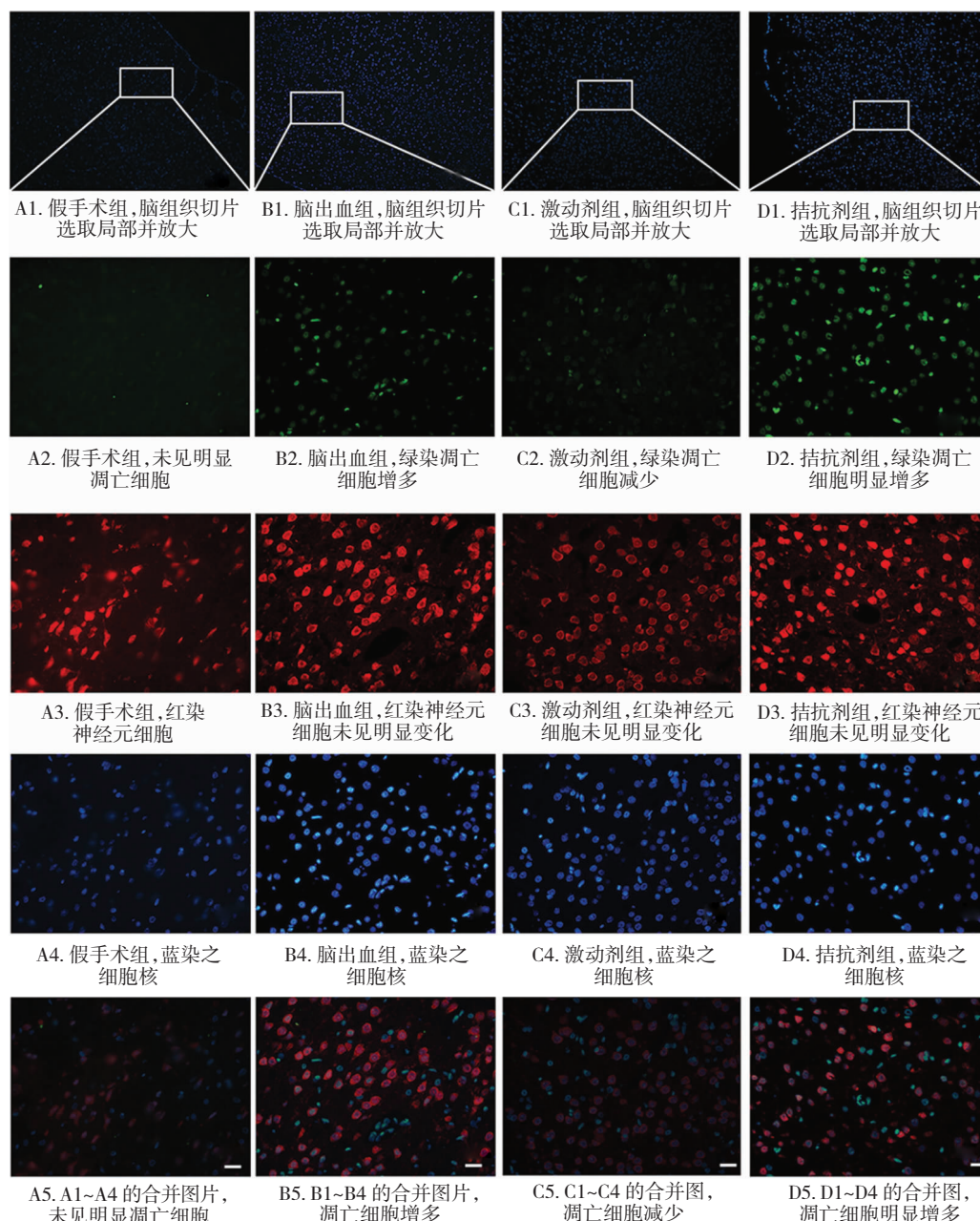
与假手术组相比,脑出血组脑水肿程度相对于假手术组明显增加(83.206 ± 0.898 vs. 77.812 ± 0.244 , $P=0.021$)(图5)。激动剂组与脑出血组相比,脑水肿程度明显下降(79.914 ± 0.216 vs. 83.206 ± 0.898 , $P=0.007$);而拮抗剂组比脑出血组脑水肿程度增加(84.609 ± 1.309 vs. 83.206 ± 0.898),差异无统计学意义。

3 讨论

脑出血发病率呈年轻化趋势,目前主要以开颅血肿清除、脑室镜下血肿清除等手术治疗为主,辅以脱水、营养神经等药物治疗。虽经上述有效治疗,仍有部分患者出现偏瘫、偏身感觉障碍等后遗症。研究发现神经细胞凋亡和坏死是出现上述后遗症的机制之一^[9],因此理论上讲,减少或阻滞神经细胞凋亡可减轻脑损伤、促进脑功能恢复。本研究发现激活 A1AR 可有效减少神经细胞凋亡,减轻脑水肿。

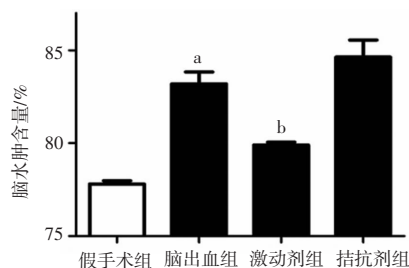
腺苷作为人体内的一种基本物质,已被证明在许多器官中起调节作用^[10]。例如,文献发现 A1AR 激活可减轻肝缺血缺氧损伤、减少局灶性脑缺血大鼠脑梗死并改善其行为缺陷^[11]。目前 A1AR 研究主要集中在缺血性事件,脑出血后研究相对较少。Aziz NAWA 等^[12]研究发现单独运用反式白藜芦醇可改善脑出血后脑组织神经行为,但同时运用反式白藜芦醇和 A1AR 拮抗剂后神经行为的改善不再出现,证明反式白藜芦醇对神经组织的保护作用是通过 A1AR 发挥作用的,与本研究结果相同,即 ICH 后使用 A1AR 激动剂组细胞凋亡较少,具有神经保护功能,而用拮抗剂组细胞凋亡相对较多。

脑出血后血肿对周围组织压迫造成原发性损伤,原发性损伤引起的炎症、凝血酶活化和红细胞溶解可以促进脑水肿的形成。血管生成因子增多、凝血酶形成、红细胞溶解和血红蛋白毒性都被认为与脑水肿相关^[13]。研究发现中风后脑水肿程度加重,和炎症反应、氧化应激等一起促进凋亡的产生;而虹膜素能减轻中风后小鼠的脑水肿含量,减轻细胞凋亡^[14];证明水肿和凋亡有一定相关性,与本研究结果一致,即激动剂组脑水肿程度减轻,凋亡细胞数目减少;拮抗剂组脑水肿程度加重,凋亡细胞数目增多。



注: 比例尺=50 μm ; A1~D1 在 100 倍镜下观察, 其余切片在 400 倍镜下观察

图 4 各组 TUNEL 染色情况



注: a, 脑出血组与假手术组相比, 脑水含量增多, 差异有统计学意义; b: 激动剂组与脑出血组相比, 脑水含量减少, 差异有统计学意义

图 5 每组的脑含水量结果 (n=6)

Pytel E 等^[15]发现凋亡为机体严格控制的程序性细胞死亡, 而 Bcl-2、Bax 与细胞凋亡密切相关。接受凋亡相关信号, 细胞会发生明显的变化, 启动细胞凋亡过程^[16]; 通过 Bcl-2 家族蛋白之间相互作用导致线粒体外膜通透性增加, 促进凋亡过程^[17]。Bax 是 Bcl-2 家族中促神经元死亡的促凋亡蛋白之一, 而 Bcl-2 是家族中抗凋亡蛋白之一。Bax 激活后, 线粒体外膜的通透性增加促进细胞色素 c 的释放, 释放的细胞色素 c 组装了一种多蛋白 Caspase 激活复

合物(凋亡小体),其组成部分是 Apaf1(一种激活 Caspase 的蛋白),在结合细胞色素 c 时会寡聚,然后通过与其 Caspase 募集域的相互作用而结合 pro-Caspase-9。最终导致半胱天冬酶浓度明显增加,破坏正常细胞功能,包括细胞骨架中的结构蛋白和核蛋白。半胱天冬酶还可以活化其他降解酶(如脱氧核糖核酸酶),切割细胞核中的 DNA,破坏细胞功能触发凋亡。Ma YM 等^[9]报道脑出血后 Bcl-2 水平下降,Bax 水平升高。本研究中,在脑出血条件下 Bax 水平升高,其升高同时可见活性 Caspase-3 水平升高,凋亡细胞数量增多。而在激动剂组中 Bax 水平下降,拮抗剂组中表达水平又升高。Bcl-2 的变化却与 Bax 相反:在脑出血条件下表达水平下降,而激动剂组水平升高,拮抗剂组水平下降。这些结果表明,A1AR 激活可以上调 Bcl-2、保护神经元、减少凋亡,减轻继发性脑损伤。

综上所述,上调 A1AR 可以减轻水肿,抑制神经细胞凋亡,而其凋亡过程又与 Bcl-2、Bax 相关。具体机制可能为抑制凋亡相关通路,导致 Bax 的产生减少;促进抗凋亡相关通路,导致 Bcl-2 产生增多。最终减少或防止产生神经细胞凋亡,减轻脑损伤和促进脑功能恢复。

参 考 文 献

- [1] Fletcher-Sandersjö A, Bartek Jr J, Thelin E, et al. Predictors of intracranial hemorrhage in adult patients on extracorporeal membrane oxygenation; an observational cohort study[J]. J Intensive Care, 2017, 5(22): 27-37.
- [2] Zhao H, Zhang X, Dai Z, et al. P2X7 receptor suppression preserves blood-brain barrier through inhibiting RhoA activation after experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. Sci Rep, 2016, 6(16): 23286-23300.
- [3] Keep RF, Andjelkovic AV, Xiang J, et al. Brain endothelial cell junctions after cerebral hemorrhage: changes, mechanisms and therapeutic targets[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(8): 1255-1275.
- [4] Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(8): 720-731.
- [5] Savio LEB, de Andrade Mello P, Figliuolo VR, et al. CD39 limits P2X7 receptor inflammatory signaling and attenuates sepsis-induced liver injury[J]. J Hepatol, 2017, 67(4): 716-726.
- [6] Wits EC, Nascimento F, Miles GB. Adenosine-mediated modulation of ventral horn interneurons and spinal motoneurons in neonatal mice[J]. J Neurophysiol, 2015, 114(4): 2305-2315.
- [7] Zhai W, Chen D, Shen H, et al. A1 adenosine receptor attenuates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats by activating the P38-MAPKAP2-Hsp27 pathway[J]. Mol Brain, 2016, 9(1): 66-79.
- [8] Nayak GH, Prentice HM, Milton SL. Neuroprotective signaling pathways are modulated by adenosine in the anoxia tolerant turtle[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(2): 467-475.
- [9] Ma YM, Zheng JX, Xu X, et al. Effects of recombinant activated coagulation factor VII on apoptosis and expressions of Bcl-2 and Bax in rats with intracerebral hemorrhage[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(16): 5264-5269.
- [10] Tofovic SP, Salah EM, Smits GJ, et al. Dual A1/A2B receptor blockade improves cardiac and renal outcomes in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2015, 356(2): 333-340.
- [11] Dai QX, Geng WJ, Zhuang XX, et al. Electroacupuncture-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in the rat is mediated by adenosine A1 receptors[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(2): 228-234.
- [12] Aziz NAWA, Iezhitsa I, Agarwal R, et al. Neuroprotection by trans-resveratrol against collagenase-induced neurological and neurobehavioural deficits in rats involves adenosine A1 receptors[J]. Neurol Res, 2020, 42(3): 189-208.
- [13] Zheng H, Chen C, Zhang J, et al. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage[J]. Cerebrovasc Dis, 2016, 42(3-4): 155-169.
- [14] Yasin A, Fazel G, Sedigheh B, et al. Irisin peptide protects brain against ischemic injury through reducing apoptosis and enhancing bdnf in a rodent model of stroke[J]. Neurochem Res, 2018, 43(8): 1549-1560.
- [15] Pytel E, Bukowska B, Koter-Michalak M, et al. Effect of intensive lipid-lowering therapies on cholinesterase activity in patients with coronary artery disease[J]. Pharmacol Rep, 2017, 69(1): 150-155.
- [16] Daramola O, Stevenson J, Dean G, et al. A high-yielding CHO transient system: coexpression of genes encoding EBNA1 and GS enhances transient protein expression[J]. Biotechnol Prog, 2014, 30(1): 132-141.
- [17] Zhao B, Zheng Z. Insulin growth factor 1 protects neural stem cells against apoptosis induced by hypoxia through Akt/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (Akt/MAPK/ERK) pathway in hypoxia-ischemic encephalopathy[J]. Med Sci Monit, 2017, 23(19): 1872-1879.

(责任编辑:唐秋姗)