

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.008

雷帕霉素对脑缺血再灌注损伤保护效应的研究

王丽君, 吴登艳, 胡安春, 杨 晨, 景玉宏

(兰州大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学研究所, 兰州 730000)

【摘 要】目的: 采用双侧颈总动脉阻断的方法制作全脑缺血再灌注动物模型, 研究雷帕霉素(Rapamycin, Rapa)对大鼠脑缺血再灌注损伤是否有保护效应。方法: 用双侧颈总动脉阻断法制作脑缺血模型, 缺血前侧脑室给予 Rapa, 缺血 20 min, 再灌 24 h 后固定, 取脑, 做连续冠状冰冻切片, 焦油紫染色, 光镜下观察拍照, 无偏差计数, 比较假手术组(SO 组)、治疗对照组(TC 组)、Rapa 治疗组(RI 组)的细胞密度。结果: ①与 SO 组比较, TC 组前额皮层及颞叶皮层的分子层细胞均明显减少($P<0.05$)。②与 TC 组比较, 缺血前 12 h 给予 Rapa 组的颞叶分子层细胞明显增多($P<0.05$)。③与 TC 组比较, 缺血前 30 min 给予 Rapa 组和缺血前 12 h 给予 Rapa 组的前额分子层细胞均增多, 但缺血前 12 h 给予 Rapa 组的增加更明显($P<0.05$)。结论: Rapa 对大鼠脑缺血再灌注损伤有保护效应, 且这一保护效应和给药时间密切相关。

【关键词】雷帕霉素; 脑缺血; 再灌注损伤; 保护

【中国图书分类法分类号】R322

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-09-15

Study on the protective effects of rapamycin on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Lijun, WU Dengyan, HU Anchun, YANG Chen, JING Yuhong

(Institute of Human Anatomy and Embryology, School of Basic Medicine, Lanzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effects of rapamycin on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, with the model of global cerebral ischemia-reperfusion established by means of ligating bilateral carotid arteries. Methods: Cerebral ischemia was produced by transient occlusion of bilateral carotid arteries for 20 minutes. The rapamycin treated group received an intracerebroventricular injection of rapamycin (10 mmol/L) 30 minutes and 12 hours before cerebral ischemia. Serial coronal sections of the brains were collected every 250 μ m 24 hours after ischemia-reperfusion, then each frozen brain slice was selected to stain using cresyl violet and observed under light microscope unbiased counting method was used to calculate the cell density of the sham-operation (SO) group, treatment control (TC) group and rapamycin injection (RI) group. Results: ①The cells of prefrontal cortex and temporal lobe in the molecular layer in TC group reduced obviously compared with SO group ($P<0.05$). ②The cell density of the temporal lobe molecular layer in RI group 12 hours before ischemia increased significantly compared with TC group ($P<0.05$). ③The cell density of the prefrontal cortex in RI group both 30 minutes and 12 hours before cerebral ischemia was higher than that in TC group and the increase in RI group 12 hours before cerebral ischemia was much more significant ($P<0.05$). Conclusion: Rapamycin has protective effects against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, and the protective effects are closely related to the administration time.

【Key words】rapamycin; cerebral ischemia; reperfusion injury; protection

脑血管病是严重危害人类健康的常见病和多发病, 在全球已成为第一致残和第三致死的原因^[1]。尤其近年来随着人们生活水平的提高及生活方式的改变, 脑血管疾病的发病率呈上升趋势, 而其中缺血性脑血管疾病占主要地位, 作为神

经系统的一种常见疾病, 它发生后可导致神经元变性、坏死或凋亡。雷帕霉素(Rapamycin, Rapa)是一种免疫抑制剂, 通过不同的细胞因子受体阻断信号传导, 阻断 T 淋巴细胞及其他细胞由 G₁ 期至 S 期的进程, 从而发挥免疫抑制效应, 同时它也是经典的自噬诱导剂, 通过抑制自噬途径中的哺乳动物 Rapa 靶蛋白促进自噬的发生^[2-4]。但 Rapa 对神经细胞的保护效应究竟如何, 目前报道较少, 因此, 本实验主要探讨 Rapa 对脑缺血再灌注损伤是否有保护效应, 为临床脑缺血损伤的治疗提供一些参考。

作者介绍: 王丽君(1990-), 女,

研究方向: 神经退行性疾病。

通信作者: 景玉宏, 男, 副教授, Email: jingyh@lzu.edu.cn。

基金项目: 兰州大学本科生创新创业行动计划项目资助(编号: LZU2010449)。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康雄性 SD 大鼠 32 只, 鼠龄 2 个月, 体重 280~300 g, 由兰州大学动物实验中心提供。实验前将动物在饲养环境中适应 3 d, 术前 12 h 禁食, 自由饮水。随机分为以下各组: 假手术组(SO 组)、治疗对照组(TC 组)、雷帕霉素(RI)30 min 治疗组(RI 30 min)、RI 12 h 治疗组(RI 12 h), 8 只/组。

1.2 侧脑室给药

大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 0.36 ml/100 g 麻醉, 固定在立体定位仪上, 前囟高于后囟, 按前囟后 0.8 mm, 旁开 1.5 mm, 深 3.6 mm 的坐标, 用 5 μ l 微量进样器注射, 给药时间为 5 min。RI(30 min)组侧脑室注射 Rapa 5 μ l(10 mmol/L)30 min 后施全脑缺血手术, RI(12 h)组侧脑室注射 Rapa 5 μ l(10 mmol/L)12 h 后施全脑缺血手术, 再灌注 24 h 后处死动物, SO 组、TC 组分别经侧脑室注射等量的生理盐水和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)。麻醉前腹腔注射阿托品, 以减少分泌物, 防止窒息。

1.3 脑缺血制作

将大鼠仰卧位固定于操作台, 备皮, 消毒, 取颈部正中切口长度约 3 cm, 分离双侧颈总动脉, 尽量避免过度牵拉血管和神经, 用 0 号丝线分别结扎双侧颈总动脉彻底阻断其血流, 20 min 后恢复血流, 实现再灌注, 假手术组只分离双侧颈总动脉。皮肤间断缝合, 碘伏消毒皮肤。术中采用自动控温加热垫将大鼠肛温控制在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。术后将动物置于温度适宜、清洁通风的环境中饲养。

1.4 心脏灌注固定

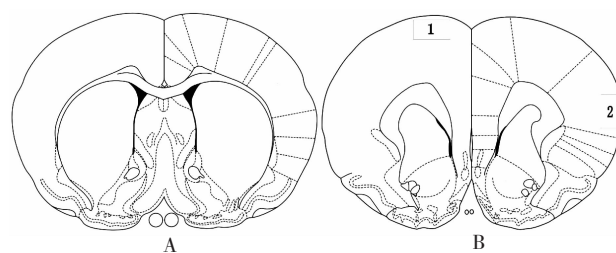
各组于再灌 24 h 后腹腔注射 10% 水合氯醛 0.36 ml/100 g 麻醉, 开胸, 利用灌注泵心脏灌注固定, 先快速滴入 0.9% 生理盐水 250 ml, 再注入 4% 多聚甲醛溶液 200 ml, 先快后慢共约 1 h, 开颅取全脑, 放置于 4°C 冰箱中, 保存至 4% PA 4~6 h, 然后转入 20% 蔗糖-4% PA 中固定, 直至沉底, 再转入 30% 蔗糖中直至沉底。

1.5 取全脑做连续冠状冰冻切片

切片厚度为 25 μ m, 每 10 张选取 1 张切片, 进行焦油紫染色, 然后以明胶封片, 晾干。均选取 Bregma 0.0 mm, Bregma 2.0 mm 水平的脑片于 10 倍, 40 倍光镜下观察拍照, 如图 1 所示。用无偏差计数法计算细胞密度。在放大 400 倍的图像上设置 4 个计数框, 计数框距离图像上缘 3 cm, 下缘 4 cm, 左缘 3.5 cm, 右缘 4.1 cm, 4 个计数框等大等距。按照数上无数下, 数左无数右的原则于 40 倍镜下数出每个方框中的细胞数, 再计算出每平方毫米的细胞数, 进行数据统计与分析。

1.6 数据与分析

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对方差不齐的数据采用秩和检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。



注: A 代表 bregma 0.0 mm 层面; B 代表 bregma 2.0 mm 层面; 框 1 代表前额皮层; 框 2 代表颞叶皮层

图 1 大鼠图谱

Fig.1 Atlas of rat brain

2 结果

Rapa 对前额及颞叶分子层细胞密度的影响。利用焦油紫染色, 通过无偏差计数, 对各组细胞密度进行比较, 可见治疗对照组前额皮层及颞叶皮层的分子层细胞密度减少, 与假手术组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。缺血前 30 min 给予 Rapa 组和缺血前 12 h 给予 Rapa 组的前额分子层细胞较治疗对照组均增多, 但缺血前 12 h 给予 Rapa 组的增加更明显, 与治疗对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。缺血前 12 h 给予 Rapa 组的颞叶分子层细胞较治疗对照组明显增多, 2 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见表 1、图 2。

表 1 Rapa 对皮层神经细胞的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

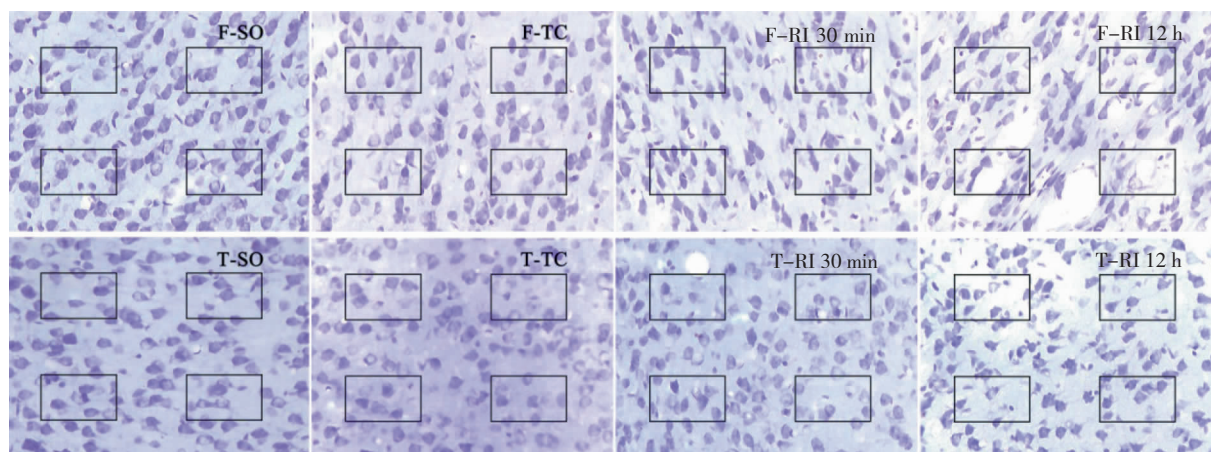
Tab.1 Effects of rapamycin on cell survival following cerebral ischemia in cortex ($n=8, \bar{x} \pm s$)

分组	分子层细胞密度	
	前额皮层	颞叶皮层
SO 组	2 671.24 $\pm$ 330.00	3 124.62 $\pm$ 418.00
TC 组	2 058.57 $\pm$ 170.00 [▲]	2 242.37 $\pm$ 211.00 [▲]
RI 30 min 组	2 079.25 $\pm$ 324.00	2 360.34 $\pm$ 296.00
RI 12 h 组	2 290.62 $\pm$ 367.00 [*]	2 628.35 $\pm$ 358.00 [*]

注: 与 TC 组比较, ^{*}, $P<0.05$, 与 SO 组比较, [▲], $P<0.05$

3 讨论

脑缺血可产生许多神经毒性因子, 这些因子均可导致神经元死亡, 而脑缺血过程中的自噬激活导致了自噬性细胞死亡。但是侧脑室给予 Rapa 后, 损伤有所减轻。研究表明, 在成年大鼠侧脑室下区终生存在具有分裂增殖功能的神经前体细胞^[5,6]。近年也发现在新皮层同样存在神经前体细胞, 正常生理条件下该细胞群呈静息状态, 当发生脑缺血及其他脑损伤时, 该群细胞被诱导分裂增殖, 并定向迁移, 对受损脑组织进行修复和重塑^[7]。在脑缺血损伤过程中, 会代偿性出现新生血管, 而神经前体细胞也会出现在新生血管较丰富的区域, 新生血管的形成有利于受损脑组织的修复和重塑^[8]。Rapa 可显著改善脑缺血模型大鼠的行为障碍, 减小脑梗塞体积, 减少脑含水量, 帮助降低颅内压, 缩小脑梗塞坏死范围, 对脑中风



注: F 代表前额皮层; T 代表颞叶皮层

图 2 雷帕霉素对前额和颞叶分子层细胞密度的影响 (400×, 细胞密度/mm²)

Fig.2 Effects of rapamycin on cell density at prefrontal and temporal lobe cortex

具有一定的预防作用^[9]。

本研究发现双侧颈总动脉阻断再灌后,损伤主要在颞叶的分子层。全脑缺血损伤区域的细胞表面结构变化可能和脑血管分布模式有关。提前给予自噬诱导剂处理,可能钝化了由脑缺血导致的自噬激活,缺血也能够导致炎症反应,Rapa作为免疫抑制剂抑制炎症反应,也可能是发挥作用的有效途径。Rapa不同给药时间的作用不同,反映了在缺血过程中Rapa的作用方式可能是通过钝化自噬来发挥的。侧脑室给予Rapa可以减少损伤区的细胞丢失,伴随血管密度的增加(结果未显示),部分改善大鼠的神经行为学变化(结果未显示),但尚未明确是否为新生的血管,故Rapa对脑缺血损伤区的这种保护作用是否是通过促进缺血区新生血管的形成维持损伤区神经前体细胞的存活来发挥作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 也全民.大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后自噬的初步研究[D].苏州:苏州大学,2009.
- Nie Q M.Preliminary study on the autophagy after focal cerebral ischemia reperfusion in rat[D].Suzhou:Suzhou University,2009.
- [2] 程元荣.新型强效免疫抑制剂西罗莫司(Sirolimus)的作用机理、药物代谢和临床[J].四川生理科学杂志,2000,22(4):8-9.
- Cheng Y R.The mechanism,drug metabolism and clinical of new potent immunosuppressant Sirolimus[J].Sichuan Journal of Physiological Sci-

ences,2000,22(4):8-9.

- [3] 陈纯,林风,黄捷,等.西罗莫司高产菌株与野生菌株中FKBP 25的初步比较[J].中国药理学通报,2002,18(5):579-783.
- Chen C,Lin F,Huang J,et al.The preliminary comparison of FKBP25 in the higher sirolimus producer mutants and wild strain[J].Chinese Pharmacological Bulletin,2002,18(5):579-783.
- [4] Kaasinen S K,Harvey L,Reynolds A J,et al.Autophagy generates retrogradely transported organelles:a hypothesis[J].Int J Devl Neurosci,2008,26(6):625-634.
- [5] Temple S,Alvarez-Buylla A.Stem cells in the adult mammalian central nervous system[J].Curr Opin Neurobiol,1999,9(1):135-141.
- [6] Merkle F T,Alvarez-Buylla A.Neural stem cells in mammalian development[J].Curr Opin Cell Biol,2006,18(6):704-709.
- [7] Gage F H.Mammalian neural stem cells[J].Science,2000,287(5457):1433-1438.
- [8] Acarregui M J,England K M,Richman J,et al.Characterization of CD34 cells isolated from human fetal lung[J].Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2003,284(2):395-401.
- [9] 张立沙.自噬和内质网应激在大鼠脑缺血预适应中的作用和药物干预[D].苏州:苏州大学,2009.
- Zhang L S.The role of autophagy and endoplasmic reticulum stress in brain ischemic preconditioning and drug intervention[D].Suzhou:Suzhou University,2009.

(责任编辑:冉明会)