

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130310

丙泊酚衍生物 cqmu-039 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其对胶质细胞的影响

张 越¹, 董 志¹, 肖晓秋²

(重庆医科大学 1. 药学院生化与分子药理研究室; 2. 生命科学研究院, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察丙泊酚衍生物 cqmu-039 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用,探讨 cqmu-039 对脑缺血再灌注的保护机制。**方法:**雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为假手术组、模型组、药物低、中、高(6、12、24 mg/kg)剂量组。模型组采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)线栓法制备脑缺血模型,缺血 2 h 后再灌注 24 h 取脑;假手术组与模型组采用相同手术方法,不植入栓子,药物处理组系在脑缺血模型建立后立即腹腔注射给药。**结果:**与模型组相比,药物处理组能显著改善大鼠神经缺损症状,其行为学评分降低,脑梗死面积明显缩小,皮层、CA1 区与 CA3 区治疗组大鼠胶质细胞源性神经营养因子(lial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)阳性细胞数量明显增加($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$);CA1 区、CA3 区及齿状回胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达明显减少。**结论:**丙泊酚衍生物 cqmu-039 能通过提高 GDNF 表达同时降低 GFAP 的表达从而明显改善大鼠脑缺血再灌注时的损伤。

【关键词】丙泊酚衍生物;脑缺血再灌注;胶质原纤维酸性蛋白;胶质细胞源性神经营养因子

【中国图书分类法分类号】R961; R962; R965

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-10-29

Protective role of propofol derivative compound cqmu-039 against cerebral ischemia-reperfusion injury of rats and its effects on gliocyte

ZHANG Yue¹, DONG Zhi¹, XIAO Xiaochu²

(1. Teaching and Research Section of Biochemical and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy;

2. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effects of propofol derivative cqmu-039 on cerebral ischemia-reperfusion injury in SD rats and its mechanisms. **Methods:** A total of 40 SD rats were randomly divided into 5 groups: sham surgery group, cerebral ischemia-reperfusion (IR) model group, low (6 mg/kg), medium (12 mg/kg) and high (24 mg/kg) doses of cqmu-039 groups. IR model was generated via the surgery of middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 h and then reperfusion of blood for 24 h. Sham surgery was performed in the same way as IR model without implanting the embolus. Three different doses of cqmu-039 were injected immediately after the IR surgery was performed. Protective effects of cqmu-039 were evaluated through the neurological behavioral score, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and expressions of glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus. **Results:** Neuronal injury was significantly improved in cqmu-039 groups than in model group. In addition, lower neurological behavioral scores, smaller cerebral infarct size and higher expressions of GDNF in CA1, CA3 and cortex regions were observed in cqmu-039 groups than in model group ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). Expressions of GFAP in CA1, CA3 and dentate gyrus regions in cqmu-039 groups were decreased in a dose-dependent manner. **Conclusions:** Propofol derivative cqmu-039 can effectively improve cerebral ischemia-reperfusion injury of rats through increasing expressions of GDNF and decreasing expressions of GFAP.

【Key words】propofol derivative; ischemia-reperfusion; glial fibrillary acidic protein; glial cell derived neurotrophic factor

脑血管病是临床常见病、多发病,是目前三大致死疾病之一,是首位致残因素,其发病率、病死率

作者介绍:张 越, Email: 672370619@qq.com,

研究方向:神经药理。

通信作者:董 志, Email: zhidong073@hotmail.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金重点资助项目(编号:CSTC2009 BA5086)。

及致残率有逐年上升的趋势,其中缺血性脑血管病占绝大部分,对人类健康的影响越来越大。目前,针对脑缺血再灌注的治疗方法较多,但效果均不理想。丙泊酚为麻醉药物,有研究显示其有一定的脑保护作用,由重庆医科大学药物化学实验室研究合成的丙泊酚衍生物 cqmu-039,目前少见其相关报道。

本研究通过大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)诱导脑缺血再灌注损伤模型,探讨 cqmu-039 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

成年雄性清洁级 SD 大鼠 40 只,体质量 280~320 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,丙泊酚衍生物 cqmu-039 由重庆医科大学药物化学实验室提供,以生理盐水配制成浓度为 2、4、8 mg/ml 备用;TTC 购于美国 Amresco 公司;兔源性胶质细胞源性神经营养因子(lial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF),胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)一抗购自英国 abcam 公司;羊抗兔 SP 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;PBS 缓冲液,多聚甲醛等购于鼎国生物技术有限公司。

1.2 模型的建立与分组

采用随机数字表法将 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D、E 组,每组 8 只,A 组为假手术组,B 组为模型组,C 组为 cqmu-039 低剂量组,D 组为 cqmu-039 中剂量组,E 组为 cqmu-039 高剂量组。将雄性 SD 大鼠禁食不禁水 12 h 后,用水合氯醛轻度麻醉,进行 MCAO,分离出右侧颈总动脉,颈内动脉及颈外动脉后,结扎颈总动脉和颈外动脉,于颈总动脉上开口,插入栓子至颈内动脉约 2 mm 即造成大脑中动脉阻塞,阻塞 2 h 后再灌注 24 h,从而建立大鼠脑缺血再灌注模型,其中,B、C、D、E 组均插入栓子,A 组不插入线栓为假手术组。MCAO 术后,立即腹腔注射给药,C、D、E 组分别按体质量给予药物 6、12、24 mg/kg,A、B 组分别给予等体积生理盐水。

1.3 标本采集与处理

再灌注完成后首先进行神经行为学评分。0 分:无神经缺损症状;1 分:左前肢不能完全伸直;2 分:向左转圈;3 分:行走时向左侧瘫倒;4 分:不能自行行走,意识丧失。评分完毕后每组取 3 只取新鲜全脑组织进行 TTC 染色,另外 5 只用 4%多聚甲醛心脏灌注后取全脑组织进行 4%多聚甲醛体外固定 24 h,随即进行脱水、透明、石蜡包埋,切 4 μm 厚的切片,常温保存备用。

1.4 TTC 染色

将新鲜脑组织冰冻 10 min 后切 2 mm 厚的片,放入用 PBS 配制的浓度为 0.5% TTC 的溶液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15~20 min。

1.5 免疫组化染色

切片进行常规脱蜡水化后,按照一抗要求进行抗原修复,修复完成后用 PBS 冲洗(3 min $\times$ 3);每张切片加 50 μl 过氧化氢阻断液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗(3 min $\times$ 3);每张切片加 50 μl 山羊血清,室温孵育 10 min,PBS 冲洗(3 min $\times$ 3);每张切片加 50 μl 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 冲洗(3 min $\times$ 3);

每张切片加 50 μl 二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,PBS 冲洗(3 min $\times$ 3);每张切片加 50 μl 链霉菌抗生物素-过氧化氢溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,PBS 冲洗(3 min $\times$ 3);每张切片加 100 μl 新鲜配制的 DAB 溶液,显色 1 min;自来水冲洗,苏木精复染,常规脱水、透明,中性树脂风干,显微镜下观察(Olympus BX51,日本)。结果评判采用阳性细胞的计数数量进行统计分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差以($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 cqmu-039 对大鼠神经行为学评分的影响

假手术组均无神经缺损症状,模型组与之相比神经缺损症状明显,给予药物处理以后,神经缺损症状与模型组比较明显减轻,表现出一定的剂量依赖性。见表 1。

表 1 药物对神经行为学评分的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of cqmu-039 on neurological behavior scores

($\bar{x} \pm s$)			
组别	评分	F 值	P 值
假手术组	0.0 $\pm$ 0.0		
模型组	3.0 $\pm$ 0.7		
cqmu-039 低剂量组	2.2 $\pm$ 0.4	34.583	0.018
cqmu-039 中剂量组	1.6 $\pm$ 0.5		0.000
cqmu-039 高剂量组	0.2 $\pm$ 0.4		0.000

2.2 cqmu-039 对大鼠脑梗死面积的影响

模型组 TTC 染色的结果显示,大鼠大脑右侧出现明显的白色梗死区域,左侧为正常对照,与模型组相比,cqmu-039 药物处理组大鼠右脑梗死面积明显减小,且表现出一定的剂量依赖性,见图 1。

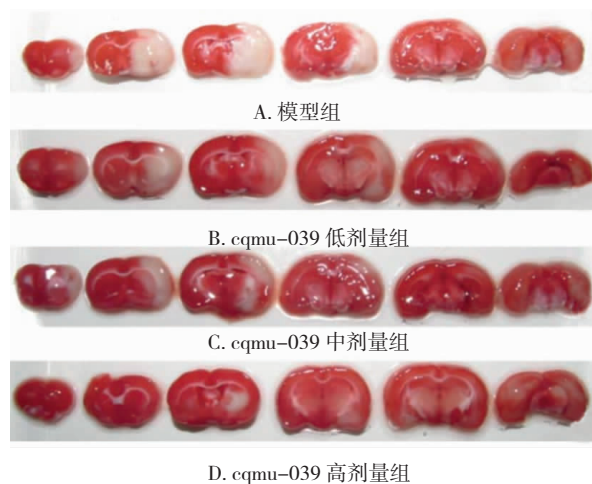


图 1 药物对梗死区域面积的影响

Fig.1 Effects of cqmu-039 on the infarction size

2.3 cqmu-039 对 GDNF 的影响

2.3.1 cqmu-039 对皮层 GDNF 的影响 假手术组与模型组皮层 GDNF 均有一定表达,cqmu-039 药物处理以后,随着药物剂量的增加,GDNF 的表达量与模型组比较明显增高,具有一定的剂量依赖性,见表 2。

表 2 皮层 GDNF 阳性细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Positive cell counts of GDNF in cortex ($\bar{x} \pm s$)

组别	皮层计数	F 值	P 值
假手术组	9.8 ± 2.4		
模型组	12.2 ± 2.4		
cqmu-039 低剂量组	19.0 ± 2.1	82.512	0.000
cqmu-039 中剂量组	25.0 ± 2.0		0.000
cqmu-039 高剂量组	31.4 ± 2.1		0.000

2.3.2 cqmu-039 对海马 CA1 区 GDNF 的影响 假手术组与模型组大鼠 CA1 区 GDNF 表达均较少,模型组略有增多但并不明显,cqmu-039 药物处理以后,随着药物剂量的增加,GDNF 表达有所增高,中剂量组达到最高,见表 3。

表 3 CA1 区 GDNF 阳性细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.3 Positive cell counts of GDNF in CA1 region ($\bar{x} \pm s$)

组别	CA1 区计数	F 值	P 值
假手术组	9.6 ± 1.9		
模型组	11.8 ± 1.6		
cqmu-039 低剂量组	14.6 ± 1.8	20.785	0.071
cqmu-039 中剂量组	21.8 ± 3.3		0.000
cqmu-039 高剂量组	17.0 ± 2.5		0.002

2.3.3 cqmu-039 对海马 CA3 区 GDNF 的影响 假手术组与模型组大鼠 CA3 区 GDNF 均有一定表达,cqmu-039 药物处理以后,随着药物剂量的增加,各组表达量与模型组比较明显增高,并表现出一定的剂量依赖性,其结果与 CA1 区的表现并不完全一致,见表 4。

表 4 CA3 区 GDNF 阳性细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4 Positive cell counts of GDNF in CA3 region ($\bar{x} \pm s$)

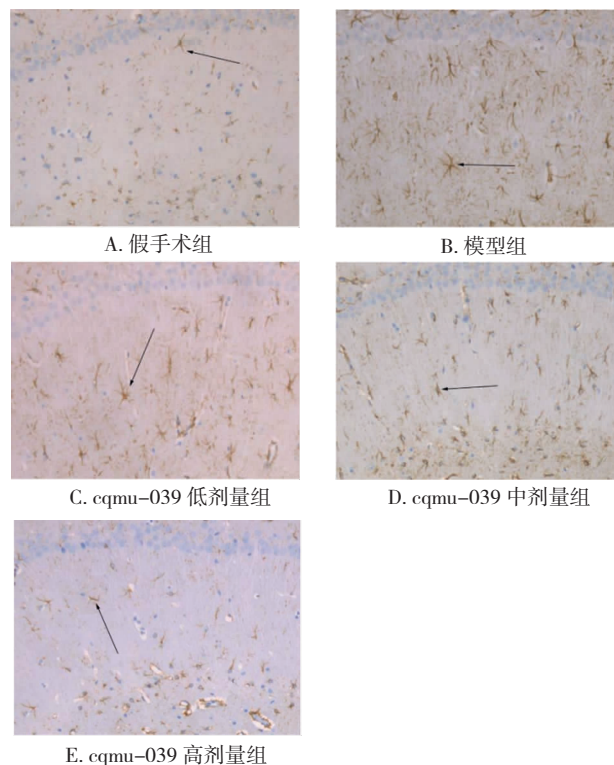
组别	CA3 区计数	F 值	P 值
假手术组	17.0 ± 2.0		
模型组	21.2 ± 1.6		
cqmu-039 低剂量组	24.2 ± 2.4	28.141	0.087
cqmu-039 中剂量组	27.0 ± 2.7		0.002
cqmu-039 高剂量组	33.6 ± 3.8		0.002

2.4 cqmu-039 对 GFAP 的影响

2.4.1 cqmu-039 对 CA1 区 GFAP 的影响 与假手术组相比,模型组 CA1 区 GFAP 表达明显增加,成为反应性星形胶质细胞,与模型组相比较,cqmu-039 药物处理后星形胶质细胞的体积有所减小,中剂量组逐渐趋于正常,中高剂量组无明显的变化,见图 2。

2.4.2 cqmu-039 对 CA3 区 GFAP 的影响 CA3 区星形胶质细胞的变化与 CA1 区一致,cqmu-039 药物处理后星形胶质细胞的体积逐渐减小,表明药物对星形胶质细胞有一定的

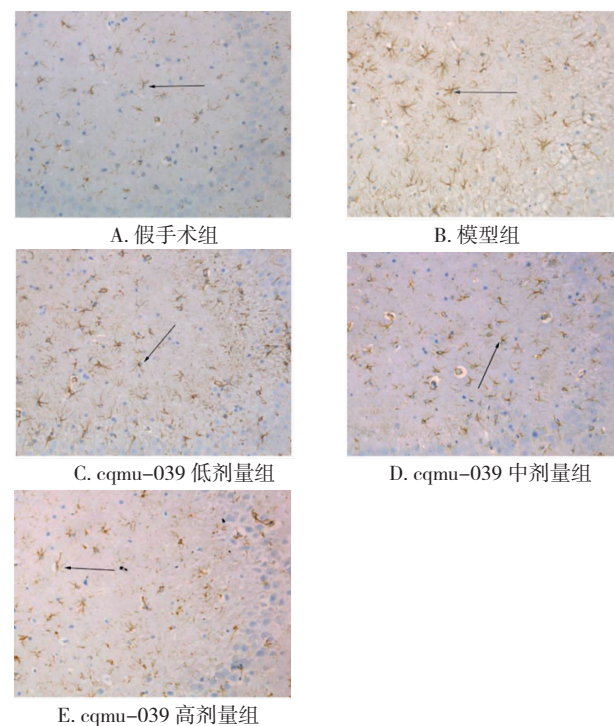
保护作用,且中剂量与高剂量无明显变化,证明中剂量已经体现较好的保护作用,见图 3。



注:“→”表示星形胶质细胞

图 2 cqmu-039 对 CA1 区 GFAP 表达的影响 (100 ×)

Fig.2 Effects of cqmu-039 on expressions of GFAP in CA1 region (100 ×)

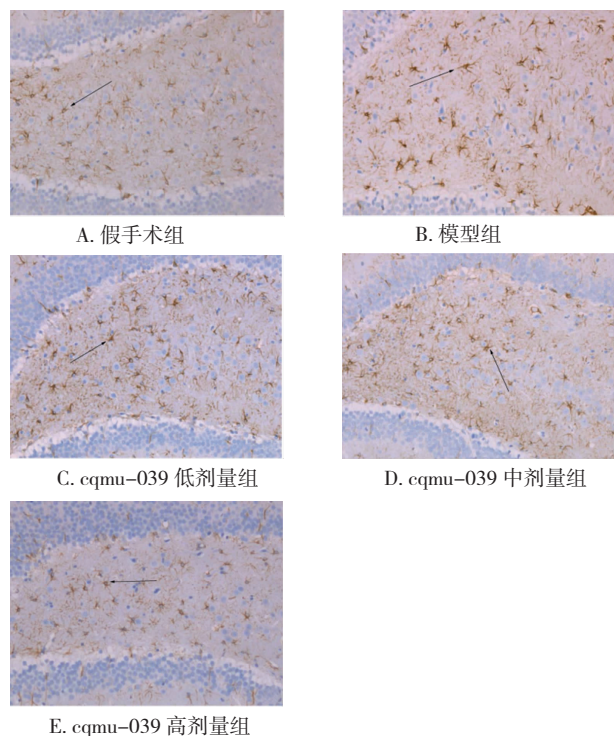


注:“→”表示星形胶质细胞

图 3 cqmu-039 对 CA3 区 GFAP 表达的影响 (100 ×)

Fig.3 Effects of cqmu-039 on expressions of GFAP in CA3 region (100 ×)

2.4.3 cqmu-039 对齿状回 GFAP 的影响 与假手术组相比,模型组海马齿状回 GFAP 的表达增加,与模型组相比较,cqmu-039 药物处理低剂量组细胞体积变化不明显,中高剂量组均表现出 GFAP 表达减小,见图 4。



注:“→”表示星形胶质细胞

图 4 cqmu-039 对齿状回 GFAP 的表达影响 (100 ×)

Fig.4 Effects of cqmu-039 on expressions of GFAP in dentate gyrus (100 ×)

3 讨论

脑缺血是指某些脑血管受阻,使脑局部血流下降或终止,从而引起一系列神经机能的改变。再灌注则是指被阻血管再通或周围侧支循环开放,使缺血组织部分或全部恢复血液供应,缺血组织恢复血液供应后,反而引起了原有病变的加重,该种损伤即为脑缺血再灌注损伤^[1]。相关研究较多,但致力于神经胶质细胞变化的研究并不多,所以关于神经胶质细胞的研究也正成为热点。

星形胶质细胞的主要功能包括维持突触周围微环境自稳态,参与神经信息的传递,参与对刺激的反应,在神经细胞发生、发育和再生中的作用以及在脑机能活动中的调控作用,当机体受到损伤刺激以后,未被脑缺血破坏的星形细胞将转变为反应性星形细胞,GFAP 这一特异性针对反应性胶质细胞的染色增加,表现为细胞肥大及细胞增殖,反应

性星形细胞可加剧脑缺血性损伤^[2-4]。GDNF 是另一类源自于胶质细胞的重要物质,它是从大鼠 B49 胶质细胞系中分离出来的、对中枢腹侧多巴胺神经元具有特异性营养作用的神经因子^[5],在神经系统广泛分布,当机体受到脑缺血损伤后,GDNF 应激性表达增多,而产生神经保护作用,它不仅能促进多巴胺神经元的成熟与存活,而且对去甲肾上腺能神经、运动神经元、感觉神经元和交感神经元等多种神经细胞的成熟和存活亦有促进作用^[6]。

丙泊酚是临床常用的短效静脉麻醉药。已有的研究显示,丙泊酚具有一定的脑保护作用,本实验采用的是重庆医科大学自主合成的丙泊酚衍生物 cqmu-039 对脑缺血再灌注模型大鼠进行干预治疗,由神经行为学评分结果和 TTC 染色的结果显示,cqmu-039 高剂量组可明显降低神经行为学评分,同时明显缩小模型大鼠的脑梗塞面积,提示其可能具有一定的脑保护作用。本文进而对其可能的机制进行了进一步的探讨,结果显示,cqmu-039 中高剂量组可明显降低模型鼠海马 CA1 区与 CA3 区以及齿状回 GFAP 染色,可减少反应性星形细胞的生成,抑制星形胶质细胞的肥大,同时,cqmu-039 也可明显增加皮层与海马 CA1 区与 CA3 区 GDNF 的染色,促进 GDNF 的表达,从而促进脑内神经元的存活与再生。

综上所述,cqmu-039 在脑缺血再灌注时可明显降低反应性星形细胞的生成,同时可提高 GDNF 的表达,提示其可能具有一定的脑保护作用,增加机体对脑缺血再灌注的耐受性,为脑缺血性疾病提供了可能的治疗药物,其中对星形细胞和胶质细胞源性神经营养因子的研究也为脑缺血性疾病提供了新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] 蒲传强.脑缺血再灌注的利与弊[J].中华神经科杂志,2003,8(4):244-245.
- [2] Pu C Q.Advantages and disadvantages of cerebral ischemia and reperfusion[J].Chinese Journal of Neurology,2003,8(4):244-245.
- [3] Bragin D E,Zhou B,Ramamoorthy P,et al.Differential changes of glutathione levels in astrocytes and neurons in ischemic brains by two-photon imaging[J].J Cereb Blood Flow Metab,2010,30(4):734-738.
- [4] 温得中,曲极冰,石卓,等.三七皂甙 Rg1 对 D-半乳糖衰老鼠脑星形胶质细胞保护作用的研究[J].神经解剖学杂志,2005,21(6):667-670.

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130311

诱导型一氧化氮合酶基因多态性与川崎病
并发冠状动脉病变易感性研究

卢亚亨, 张 静, 易岂建, 钟家蓉, 邓 兵

(重庆医科大学附属儿童医院心血管内科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因多态性与川崎病(Kawasaki disease, KD)并发冠状动脉病变(coronary artery lesion, CAL)的相关性。**方法:**将本院收治的 146 例 KD 患儿作为 KD 组, 同期健康体检儿童 119 例作为健康对照组。KD 组中合并 CAL(CAL 组)79 例, 未合并 CAL(none coronary artery lesion, NCAL 组)67 例。利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法检测 iNOS 基因-1026C/A 和+2087G/A 2 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点基因型。应用酶联免疫吸附实验(ELISA)双抗体夹心法检测血浆 iNOS 水平, 硝酸还原法检测血浆 NO 水平。比较各组间血浆 iNOS、NO 表达水平, 分析 2 个 SNP 位点多态性与 KD 并发 CAL 相关性。**结果:**健康对照组血浆 iNOS 水平(48.02 ± 31.46) U/L 明显低于 NCAL 组(81.46 ± 41.32) U/L 和 CAL 组(90.29 ± 47.68) U/L($P=0.000, 0.000$)。血浆 NO 水平组间比较差异无统计学意义($F=3.003, P=0.052$)。iNOS 基因+2087G/A 位点 A 等位基因及 GA+AA 基因型频率在 CAL 组明显低于 NCAL 组($P=0.010, 0.013$), 与 G 等位基因及 GG 基因型相比, A 等位基因及 GA+AA 基因型均能显著降低 KD 并发 CAL 发生风险[OR(95%CI)= 0.41(0.21–0.82), 0.42(0.19–0.92); $P=0.010, 0.029$]。-1026C/A 与+2087G/A 2 位点构建的-1026C/+2087A 单倍型频率分布在 CAL 组与 NCAL 组间差异有统计学意义($P=0.010$), -1026C/+2087A 单倍型携带者发生 KD 并发 CAL 的风险显著降低[OR(95%CI)=0.45(0.22–0.91), $P=0.030$]。**结论:**血浆 iNOS 水平在 KD 及其 CAL 的发生过程中可能起一定作用。iNOS 基因+2087G/A 多态性和-1026C/+2087A 单倍型与 KD 并发 CAL 密切相关, 其中+2087A 等位基因可能为减少 KD 并发 CAL 发生风险的保护基因, 其作用机制可能通过降低血浆 iNOS 水平, 减少 NO 产量实现。

【关键词】川崎病; 冠状动脉病变; 诱导型一氧化氮合酶; 一氧化氮; 基因多态性

【中国图书分类法分类号】R725.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-20

Correlation between inducible nitric oxide synthase gene polymorphism and
affectability of Kawasaki disease coincided coronary artery lesion

LU Yaheng, ZHANG Jing, YI Qijian, ZHONG Jiarong, DENG Bing

(Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation between inducible nitric oxide synthase(iNOS) gene polymorphism and the development of coronary artery lesion(CAL) in Kawasaki disease(KD). **Methods:** Totally 146 patients with KD in the Children's Hospital in Chongqing Medical University were included as KD group and 119 healthy children at the same period as control group. There were

作者介绍: 卢亚亨, Email: andyluyaheng@163.com,

研究方向: 川崎病基础与临床。

通信作者: 张 静, Email: xz8623@yahoo.cn。

Wen D Z, Qu J B, Shi Z, et al. Effect of Sanchi Saponin Rgl against aging of astrocyte in D-galactose induced aging mice model[J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2005, 21(6): 667–670.

[4] Mao X, Ji C, Sun C, et al. Topiramate attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via activating GABAergic signaling and inhibiting astrogliosis[J]. Neurochem Int, 2012, 60(1): 39–46.

[5] 高旭光, 王 军, 魏 昕. 毛果芸香碱致癫痫大鼠脑内胶质细胞源性神经营养因子及其受体 α 和 Ret 蛋白的表达[J]. 北京大学报(医学版), 2003, 35(3): 296–298.

学版), 2003, 35(3): 296–298.

Gao X G, Wang J, Wei X. Expression of GDNF, GDNFR alpha and Ret proteins in the brain of rats with seizures induced by pilocarpine[J]. Journal of Peking University(Medical Sciences), 2003, 35(3): 296–298.

[6] Lin L H, Doherty D H, Lile J D, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. Science, 1993, 260(5111): 1130–1132.

(责任编辑: 冉明会)