

## 神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000244

米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后学习记忆能力及  
海马神经元 PSD-95 蛋白表达的影响陶 涛<sup>1</sup>, 秦文熠<sup>2</sup>, 秦新月<sup>3</sup>, 马勋泰<sup>1</sup>, 李小刚<sup>1</sup>(1. 泸州医学院附属医院神经内科, 泸州 646000; 2. 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科, 重庆 400016;  
3. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨静脉用低剂量米诺环素对局灶性脑缺血再灌注大鼠认知功能障碍及缺血侧海马生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)和突触后致密物质-95(postsynaptic density 95, PSD-95)表达的影响。**方法:**采用线栓法建立 Sprague-Dawley 大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型, 将 45 只雄性大鼠随机分为假手术组、模型组及米诺环素组( $n=15$ )。分别采用免疫组织化学及免疫印迹法检测术后 2 周大鼠缺血侧海马 GAP-43 和 PSD-95 蛋白的表达, Morris 水迷宫实验评价大鼠的行为学改变。**结果:**同假手术组相比, 模型组大鼠缺血侧海马 GAP-43( $0.49 \pm 0.03$ )和 PSD-95( $0.92 \pm 0.04$ )表达明显增高( $P=0.000$ ); 大鼠逃避潜伏期明显延长[( $44.2 \pm 10.0$ ) s], 穿过原平台次数( $2.6 \pm 0.9$ )和在目标象限探索时间百分率明显降低[( $19.2 \pm 2.1$ )%,  $P=0.000$ ]。同模型组相比, 尾静脉给予 3 mg/kg 米诺环素治疗后, 大鼠缺血侧海马 GAP-43( $0.72 \pm 0.05$ )表达明显增加, PSD-95 表达降低( $0.67 \pm 0.05$ ,  $P=0.000$ ), 大鼠逃避潜伏期明显缩短[( $30.8 \pm 7.6$ ) s,  $P=0.020$ ]、穿过原平台次数( $4.4 \pm 1.1$ ,  $P=0.012$ )和在目标象限探索时间百分率明显增加[( $30.4 \pm 2.7$ )%,  $P=0.000$ ]。**结论:**低剂量米诺环素能显著改善脑缺血再灌注后大鼠学习记忆能力, 其机制可能与上调 GAP-43 和下调 PSD-95 表达有关。

**【关键词】**米诺环素; 学习记忆; 突触后致密蛋白 95; 生长相关蛋白-43**【中图分类号】**R743.31**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-12-09Protective effects of low dose minocycline on spatial learning  
and memorizing ability and the expression of PSD-95 in rats  
after focal cerebral ischemia reperfusionTao Tao<sup>1</sup>, Qin Wenyi<sup>2</sup>, Qin Xinyue<sup>3</sup>, Ma Xuntai<sup>1</sup>, Li Xiaogang<sup>1</sup>(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College; 2. Department of Integrated  
Traditional and Western Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;  
3. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects of low dose minocycline through vein on the spatial learning and memorizing ability and the expressions of growth associated protein-43 (GAP-43) and postsynaptic density 95 (PSD-95) in ischemic hippocampus of rats after focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R). **Methods:** The middle cerebral artery occlusion procedure was used to induce focal cerebral ischemia. Forty-five adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated, I/R and minocycline groups. The GAP-43 and PSD-95 protein expression in ischemic hippocampus was measured by Western blot and immunohistochemistry, respectively. Morris water maze test was performed to detect the praxiology of rats after 2 weeks. **Results:** Compared with those in sham group, expression of GAP-43 ( $0.49 \pm 0.03$ ) and PSD-95 ( $0.92 \pm 0.04$ ) was significantly increased ( $P=0.000$ ), escape latency was extended ( $44.2 \pm 10.0$ ) s, times of crossing the platform ( $2.6 \pm 0.9$ ) and time percentage of swimming in target quadrant [( $19.2 \pm 2.1$ )%,  $P=0.000$ ] were significantly decreased in I/R group. Moreover, the rats in minocycline group demonstrated better spatial memory performance than I/R group. The protein levels of GAP-43 ( $0.72 \pm 0.05$ ) was increased, PSD-95 was decreased ( $0.67 \pm 0.05$ ,  $P=0.000$ ), escape latency was shortened [( $30.8 \pm 7.6$ ) s,  $P=0.020$ ], times of crossing the platform ( $4.4 \pm 1.1$ ,  $P=0.012$ ) and time percentage of swimming in target quadrant [( $30.4 \pm 2.7$ )%,  $P=0.000$ ] were significantly decreased in minocycline group compared with those in I/R

group ( $P=0.000$ ). **Conclusion:** Low dose intravenous minocycline improves the ability of learning and memorizing of rats after cerebral ischemia reperfusion, which may be partly associated with up-regulating GAP-43 and down-regulating PSD-95 protein expression.

**【Key words】**minocycline; learning and memorizing; postsynaptic density 95; growth associated protein-43

作者介绍: 陶 涛, Email: butterfly2013dr@gmail.com,

研究方向: 脑血管病的神经保护

通信作者: 李小刚, Email: lixg5948@163.com。

**基金项目:**国家自然科学基金面上资助项目(编号:30770762); 四川省  
省卫生厅资助项目(编号:140032); 泸州医学院附属医院  
青年(博士)基金资助项目(201471)。优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1504.002.html>

(2014-04-28)

脑卒中是目前世界范围内严重危害人类健康的疾病之一,其发病率逐年上升。脑梗死所致认知功能障碍的神经生物学机制一直是神经科学研究的热点。米诺环素作为一种安全有效的抗菌药和抗炎药在临床上被广泛应用,近期研究表明米诺环素可以通过抑制小胶质细胞的激活,直接或间接地清除病灶周围的氧自由基,调节半胱氨酸蛋白酶依赖或非依赖的凋亡途径发挥神经保护作用<sup>[1]</sup>。目前已有学者观察到口服或腹腔注射大剂量米诺环素可以促进脑缺血再灌注大鼠认知功能的恢复<sup>[2]</sup>。本研究通过线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion, I/R)模型,观察静脉用低剂量米诺环素对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力,缺血侧海马生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)和突触后致密物质-95(postsynaptic density 95, PSD-95)表达的影响从而探讨米诺环素治疗大鼠脑缺血后认知功能障碍的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和器材

盐酸米诺环素(美国 Sigma 公司),兔抗 PSD-95(Santa Cruz 公司),兔抗 GAP-43(武汉博士德),其他免疫组化及 Western blot 相关试剂均购于碧云天生物公司。

### 1.2 实验分组

45 只 12 周龄清洁级雄性 SD 大鼠(220~250 g)购于重庆医科大学实验动物中心。按照随机数字表法分为假手术组( $n=15$ )、缺血再灌注组( $n=15$ )和米诺环素组( $n=15$ )。缺血再灌注第 2 周,每组随机选取 5 只大鼠分别进行免疫组化染色、免疫印迹检测蛋白含量及行为学观察。

### 1.3 模型建立及动物给药

参照本课题组前期报道的右侧大脑中动脉阻塞再灌注模型的制作方法<sup>[3]</sup>。腹腔注射 3.5%的水合氯醛麻醉大鼠,颈正中切口,分别暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。凝断交通动脉及颈外动脉分支后暂时夹闭颈外动脉和颈内动脉。将头端圆钝的尼龙丝(0.235 mm)由颈外动脉远端剪口处插入阻塞大脑中动脉起始处,深度约 18~20 mm 时停止插入并将线栓固定于颈外动脉,2 h 后将线栓拔至颈外动脉中实现再灌注。假手术组仅将线栓插入 10~15 mm 深度即可,其余操作同上。大鼠清醒后采用 Longa 评分法<sup>[4]</sup>对其进行神经功能评分:1~3 分入组,后续取材时发现蛛网膜下腔出血及 HE 染色无明显缺血病理改变者剔除,并从同批大鼠中随机补足大鼠数。米诺环素组大鼠在再灌注的同时尾静脉给予 3 mg/kg 的米诺环素,每日 2 次。

### 1.4 免疫组化检测 GAP-43 蛋白的表达

选取 4  $\mu\text{m}$  厚大鼠缺血侧海马的石蜡切片,参照 S-P 试

剂盒说明书,在光学显微镜下观察并摄片,每只动物随机选取 10 张非连续切片,每张切片在 200 倍放大倍数下随机选择 5 个视野,光镜下细胞膜及细胞浆中棕黄色颗粒是阳性着色。

### 1.5 免疫印迹检测 PSD-95 和 GAP-43 蛋白的表达

将预先置于-80  $^{\circ}\text{C}$  保存的脑组织切成细小的碎片,参照凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。各条带用 Quantity One 图像软件分析蛋白的平均光密度值,待测蛋白表达水平以目的蛋白/ $\beta$ -actin 光密度的比值表示。

### 1.6 行为学评价

1.6.1 定位航行实验 造模后第 11 天,连续 4 d,每天共 2 个时间段,每一时间段训练 4 次,将大鼠面向池壁由 4 个入水点放入池中,记录第 4 天大鼠成功进驻平台所需时间(逃避潜伏期)。如在 60 s 内大鼠不能成功进驻平台,则实验者将其引上平台并令其停留 10 s,逃避潜伏期记为 60 s,每次训练间隔时间 60 s。

1.6.2 空间探索实验 实验最后 1 d,撤除平台,从原平台象限对侧池壁中点将大鼠放入水中,记录 60 s 内大鼠穿越目标象限的次数及各象限游泳时间占总时间百分比。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,所有结果用平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较采用单因素方差分析的方法,两两比较采用 LSD- $t$  检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Morris 水迷宫实验结果

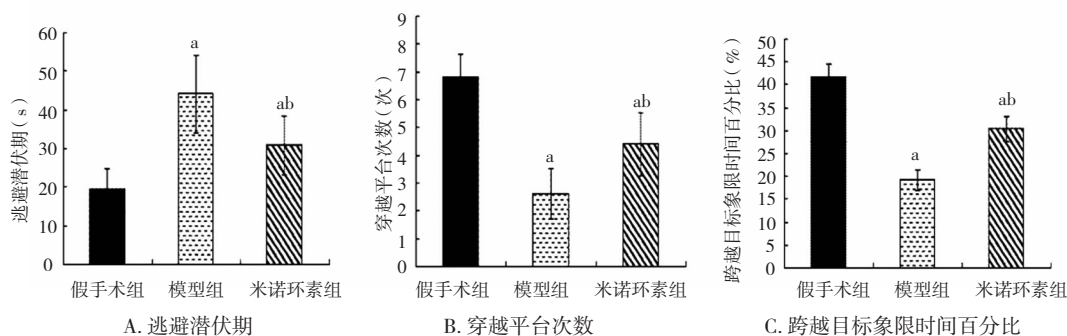
定位导航实验中,假手术组、模型组及米诺环素组大鼠逃避潜伏期分别是( $19.4 \pm 5.5$ ) s、( $44.2 \pm 10.0$ ) s 和( $30.8 \pm 7.6$ ) s。模型组和米诺环素组较假手术组大鼠明显延长( $F=12.314, P=0.001$ ),而米诺环素组较模型组明显缩短( $P=0.020$ ,图 1A)。空间探索实验中,假手术组、模型组及米诺环素组大鼠穿越平台次数分别是( $6.8 \pm 0.8$ )、( $2.6 \pm 0.9$ )和( $4.4 \pm 1.1$ )次,米诺环素组较模型组明显减少( $F=23.786, P=0.000$ ,图 1B),假手术组、模型组及米诺环素组大鼠在目标象限探索时间百分比分别为( $41.6 \pm 2.9$ )%、( $19.2 \pm 2.2$ )%及( $30.4 \pm 2.7$ )%,米诺环素组较模型组明显增加( $F=62.690, P=0.000$ ,图 1C)。

### 2.2 免疫组化检测海马神经元 GAP-43 蛋白的表达

假手术组及模型组海马内可见少量、散在分布,染色浅的 GAP-43 阳性细胞,米诺环素组缺血侧海马内 GAP-43 阳性细胞染色成棕褐色,主要位于细胞膜(图 2)。

### 2.3 免疫印迹检测海马神经元 GAP-43 蛋白的表达

Western blot 结果示假手术组、模型组及米诺环素组 GAP-43 蛋白表达的相对值分别为( $0.29 \pm 0.03$ )、( $0.49 \pm 0.03$ )及( $0.71 \pm 0.05$ ),3 组间差异有统计学意义( $F=146.46, P=0.000$ )。模型组和米诺环素组均高于假手术组( $P=0.000$ ),其中以米诺环素组表达量最多( $P=0.000$ ,图 3)。



a,  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b,  $P < 0.05$ , 与模型组比较

图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig.1 Experiment results of Morris Water maze ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

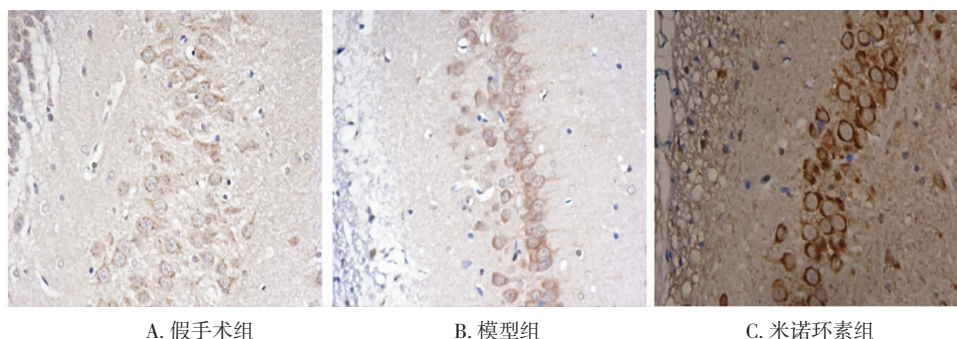
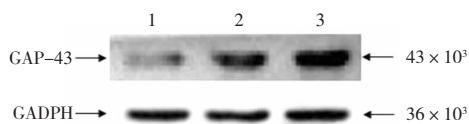


图 2 免疫组织化学示 GAP-43 的表达 ( $200 \times, n=5$ )

Fig.2 Expression of GAP-43 in hippocampus demonstrated by immunohistochemistry staining ( $200 \times, n=5$ )



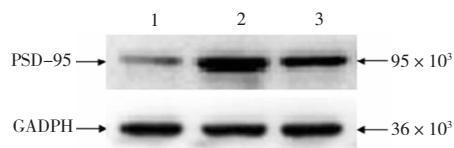
1. 假手术组; 2. 模型组; 3. 米诺环素组

图 3 Western blot 检测各组 GAP-43 蛋白的表达 ( $n=5$ )

Fig.3 Protein expression of GAP-43 in ischemic hippocampus demonstrated by Western blot ( $n=5$ )

#### 2.4 海马神经元 PSD-95 蛋白的表达

假手术组、模型组及米诺环素组 PSD-95 蛋白表达的相对值分别为  $(0.34 \pm 0.03)$ 、 $(0.91 \pm 0.04)$  和  $(0.66 \pm 0.05)$ , 各组间差异有统计学意义 ( $F=245.200, P=0.000$ ), 米诺环素组明显低于模型组 ( $P=0.000$ , 图 4)。



1. 假手术组; 2. 模型组; 3. 米诺环素组

图 4 Western blot 检测各组 PSD-95 蛋白的表达 ( $n=5$ )

Fig.4 Protein expression of PSD-95 in ischemic hippocampus demonstrated by Western blot ( $n=5$ )

### 3 讨论

随着经济的快速增长和生活方式的改变,脑卒中已经成为我国死亡和成人致残的首位原因。缺血性脑卒中常导致认知功能障碍,其机制可能为脑缺血后神经元的损伤和突触可塑性的改变。海马是大脑边缘系统的重要组成部分,与空间学习记忆功能密切相关。脑缺血后海马神经元树突棘脱落及丢失,引起海马神经元结构可塑性变化,导致学习记忆障碍<sup>[5]</sup>。海马神经元兴奋性突触后膜含有大量 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR),生理条件下神经信号激活 NMDAR,诱导长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 明显增强,产生学习记忆能力<sup>[6]</sup>。缺血再灌注脑损伤后海马神经元谷氨酸释放增加,过度激活 NMDAR 受体,进而导致大鼠学习记忆功能障碍<sup>[7]</sup>。

PSD-95 是突触后致密物中重要的锚蛋白之一,直接参与 NMDAR 依赖的兴奋性突触信号传递和突触可塑性的调节。大鼠缺血性脑损伤后脑组织



内 PSD-95 表达增加<sup>[8]</sup>, PSD-95 与 NMDAR 的结合增强, 从而导致兴奋性毒性损伤。抑制 PSD-95 与 NMDAR 的结合可以缓解 NMDAR 受体介导的兴奋性毒性作用<sup>[9]</sup>。也有研究表明脑损伤后期 PSD-95 表达减少, PSD-95 与 NMDAR 的结合减弱, 从而导致血管性认知功能障碍。Shih 等<sup>[10]</sup>研究发现中等强度的运动训练可以上调脑缺血后海马神经元内 PSD-95 的表达, 从而增强大鼠的学习记忆能力。Xu 等<sup>[11]</sup>采用丰富环境干预能促进大鼠脑组织内 PSD-95 与 NMDAR 结合, 改善脑缺血大鼠的空间学习记忆能力。本课题组前期研究发现低剂量米诺环素可以通过抑制皮质 RGMa 蛋白的表达, 从而促进脑缺血再灌注大鼠神经功能的恢复<sup>[3]</sup>。本研究发现米诺环素可以抑制脑缺血后海马神经元 PSD-95 蛋白的表达, 并改善脑缺血后大鼠的空间学习记忆功能, 同前期<sup>[12]</sup>报道一致。GAP-43 是神经元发育和轴突再生的一个重要标记蛋白, 正常大鼠脑组织内有少量 GAP-43 表达, 缺血性脑损伤可诱发病灶周围 GAP-43 基因和蛋白的表达升高<sup>[13-14]</sup>。Juan 等<sup>[15]</sup>研究发现褪黑素可以上调 GAP-43 蛋白的表达, 改善神经可塑性, 促进脑缺血大鼠神经功能的恢复。本研究发现重复给予低剂量米诺环素 (3 mg/kg) 可以使大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧海马 GAP-43 的表达增加。这表明米诺环素可促进缺血侧海马神经元轴突的生长, 增强神经元突触的连接, 调节突触结构和功能可塑性的改变, 从而改善大鼠的学习记忆能力。

米诺环素被认为是目前最有前途的神经保护剂之一, 缺血性脑损伤后米诺环素可以通过抗炎、抗凋亡及抗氧化应激等作用, 减轻血脑屏障的破坏, 降低脑梗死体积, 促进大鼠神经功能的恢复。本研究表明低剂量米诺环素可以改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力, 其机制可能与促进缺血侧海马 GAP-43 并抑制 PSD-95 蛋白的表达, 从而调节突触的结构和功能可塑性有关。但米诺环素调节 PSD-95 表达的具体机制仍需深入探讨。

## 参 考 文 献

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

- [2] 李国艳, 余昌胤, 杨 华. 米诺环素对慢性脑低灌注大鼠空间学习记忆能力及海马 BACE-1 和 A $\beta$  表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(2): 115-119.
- [3] 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.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] 陈远寿, 陈 旻, 张 弛. 阻断 NR2A 可增强脑缺血小鼠海马神经元树突棘丢失和认知功能障碍[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2311-2313.
- [6] 陈 燕. 神经元的突触可塑性与学习和记忆[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(6): 610-619.
- [7] 李春丽, 杨吉平, 衡爱玲. 人参皂苷 Rg1 联合美满霉素对脑缺血大鼠海马内 NMDA 受体表达及学习记忆功能的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(5): 36-40.
- [8] Cheng CY, Su SY, Tang NY, et al. Ferulic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis by enhancing GABA(B1) receptor expression in transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(8): 889-899.
- [9] Fan J, Vasuta OC, Zhang LY, et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunit- and neuronal-type dependence of excitotoxic signaling through post-synaptic density 95[J]. J Neurochem, 2010, 115(4): 1045-1056.
- [10] Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e78163.
- [11] Xu X, Ye L, Ruan Q. Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(3): 296-305.
- [12] Kohman RA, Bhattacharya TK, Kilby C, et al. Effects of minocycline on spatial learning, hippocampal neurogenesis and microglia in aged and adult mice[J]. Behav Brain Res, 2013(242): 17-24.
- [13] Gregersen R, Christensen T, Lehrmann E, et al. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain[J]. Exp Brain Res, 2001, 138(3): 384-392.
- [14] Zhao Y, Wang J, Liu C, et al. Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats[J]. Synapse, 2011, 65(9): 880-891.
- [15] Juan WS, Huang SY, Chang CC, et al. Melatonin improves neuroplasticity by upregulating the growth-associated protein 43 (GAP-43) and NMDAR-post-synaptic density-95 (PSD95) proteins in cultured neurons exposed to glutamate excitotoxicity and in rats subjected to transient focal cerebral ischemia even during a long-term recovery period[J]. J Pineal Res, 2013, doi: 10.1111/jpi.12114[Epub ahead of time].

(责任编辑: 冉明会)