

## 经颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2 对脑局灶性缺血再灌注大鼠脑组织的影响

吴晓黎<sup>1</sup>,何志义<sup>2Δ</sup>,赵彬<sup>3</sup>,刘晓梅<sup>4</sup>

(1. 中国医科大学附属盛京医院神经内科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 附属第一医院神经内科; 3. 沈阳市第五医院神经内科; 4. 沈阳市第四医院神经内科)

**[摘要]** 目的:研究经颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2 对大鼠脑缺血再灌注损伤后的影响。方法:51只健康成年 Wistar 大鼠随机分对照组、空质粒组、bcl-2 组,每组分缺血再灌注 9,24 h 两小组。采用线栓法制作大鼠中动脉梗死模型,2 h 后实现再灌注。3 h 后经颈内动脉注射质粒 pLXSN,pLXSN-bcl-2。检测缺血再灌注 24 h 后大鼠脑梗死体积,及各组大鼠脑内 bcl-2、caspase-3 的表达情况和神经细胞凋亡情况。结果:bcl-2 组缺血再灌注 24 h 的脑梗死体积最小;bcl-2 组在缺血再灌注 9,24 h 后 bcl-2 阳性表达明显升高;缺血再灌注 24 h caspase-3 蛋白表达及凋亡细胞数明显降低,缺血再灌注 9 h 后与其他组之间无差异。结论:脑缺血再灌注 3 h 后经颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2 可以增加 bcl-2 在脑内的表达,并在缺血再灌注 24 h 后通过抑制 caspase-3 的表达,抑制神经细胞凋亡,减少脑梗死体积。而在缺血再灌注 9 h 尚未表现出明显的神经保护作用。

**[关键词]** 缺血再灌注;质粒;bcl-2;caspase-3;凋亡

**[中图分类号]** R743.32

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-4646(2007)02-0135-03

### Effect of pLXSN-bcl-2 injected into internal carotid artery on brain tissue of rats after focal cerebral ischemia-reperfusion

WU Xiao-li<sup>1</sup>, HE Zhi-yi<sup>2Δ</sup>, ZHAO Bin<sup>3</sup>, LIU Xiao-mei<sup>4</sup>

(1. Department of Neurology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, China Medical University; 3. Department of Neurology, The Fifth Hospital of Shenyang; 4. Department of Neurology, The Forth Hospital of Shenyang)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of pLXSN-bcl-2 injected into carotid artery on brain tissue of rats after focal cerebral ischemia-reperfusion. **Methods:** Fifty-one healthy adult Wistar rats were randomly and equally divided into control group, plasmid control group, and bcl-2 group, and in each group the rats were subdivided into 9-hour and 24-hour ischemia-reperfusion subgroups ( $n=6$  and  $n=11$ , respectively). The left middle cerebral artery was occluded for 2 hours, and pLXSN or pLXSN-bcl-2 was injected into internal carotid artery 3 hours later. The cerebral infarct volume 24 hours after ischemia-reperfusion, the expressions of bcl-2 and caspase-3, and the apoptosis of neural cells were determined. **Results:** In bcl-2 group, the cerebral infarct volume 24 hours after ischemia-reperfusion significantly decreased, and the expression of bcl-2 significantly increased 9 and 24 hours after ischemia-reperfusion. No significant difference in the expression of caspase-3 and the apoptosis of neural cells was found between 3 groups 9 hours after ischemia-reperfusion, but the expression of caspase-3 and the apoptosis of neural cells in bcl-2 group significantly decreased 24 hours after ischemia-reperfusion. **Conclusion:** Injection of pLXSN-bcl-2 into internal carotid artery 3 hours after ischemia-reperfusion may reduce cerebral infarct volume by inhibiting the expression of caspase-3 and the apoptosis of neural cells 24 hours after ischemia-reperfusion, but no such effect exists 9 hours after ischemia-reperfusion.

**[Key words]** ischemia-reperfusion; plasmid; bcl-2; caspase-3; apoptosis

脑缺血再灌注损伤后,神经细胞以坏死和凋亡两种方式死亡。经适当治疗可阻止凋亡过程,改善预后。因此抗凋亡治疗日益受到重视。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)在缺血性脑损伤中发挥重要作用,其中 caspase-3 是最关键的凋亡蛋白酶<sup>[1]</sup>。通过抑制 caspase-3 表达可减轻脑缺血的损伤程度。bcl-2 过度表达可以促进神经元的存活。有实验通过经皮质、经侧脑室注射质粒 pLXSN-bcl-2 达到抗凋亡目的,但由于以上两种方法损伤大,不利于临床推广<sup>[2,3]</sup>。在本实验中,我们采用经颈内动脉

注射 pLXSN-bcl-2 的方法,来探讨其在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

质粒 pLXSN 及 pLXSN-bcl-2 由第二军医大学东方肝胆外科医院钱其军博士惠赠。

#### 1.2 实验动物及其分组

51 只健康 Wistar 大鼠,体质量 260~300 g,由中国医科大学实验动物中心提供。随机分为大脑中动脉梗死组(对照组),颈内动脉注射空质粒 pLXSN 组(空质粒组),颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2 组(bcl-2 组),各组分缺血再灌注 9,24 h 两小组。

**[作者简介]** 吴晓黎(1973-),女,医师,硕士。

Δ Corresponding Author's E-mail:hezhiyi1588@sina.com

### 1.3 质粒鉴定及提取

根据何志义等报道的方法提取质粒<sup>[2]</sup>,分光光度法测定浓度,pLXSN、pLXSN-bcl-2 分别为 370 ng/ $\mu$ l、375 ng/ $\mu$ l,-20 °C 冰箱保存备用。

### 1.4 动物模型的制作

根据文献[4]报道的方法制作局灶性短暂脑缺血模型。空质粒组和 bcl-2 组在 3 h 后,经颈外动脉残端向颈内动脉注入质粒 0.26 ml,结扎颈外动脉残端。各组大鼠分别在缺血再灌注 9,24 h 处死。

### 1.5 脑梗死体积测定

脑缺血再灌注 24 h 后每组动物各 5 只处死,取大脑。制成 2 mm 切片,进行 TTC (红四氮唑)染色。用显微图像分析系统以梯形法计算脑梗死体积。

### 1.6 免疫组化分析

脑缺血再灌注 9,24 h 后每组动物各 6 只,常规灌流取大脑,制成石蜡切片。bcl-2 (Ab-1)及 caspase-3 (Ab-1)、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购于武汉博士德公司。按试剂说明进行 bcl-2 和 caspase-3 免疫组化染色。用显微图像分析系统采集图像,每张切片取海马处 5 个区域,分析阳性细胞面积百分比,取均值。

### 1.7 原位细胞凋亡检测

细胞凋亡检测试剂盒购于武汉博士德公司。严格按说明进行 TUNEL 染色。每张切片经显微镜检测海马 5 个高倍视野计数凋亡细胞数,取均值。

### 1.8 统计分析

数据以数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSSV11.5 软件进行处理,采用 *t* 检验, $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TTC 染色法脑梗死体积测定

缺血再灌注 24 h 的梗死体积,对照组为 (214.73  $\pm$  32.15)mm<sup>3</sup>,空质粒组 (221.56  $\pm$  33.86)mm<sup>3</sup>,bcl-2 组 (162.43  $\pm$  25.46)mm<sup>3</sup>,其中 bcl-2 组与对照组、空质粒组之间有显著差异, $P < 0.05$ 。

### 2.2 免疫组化

2.2.1 bcl-2 蛋白表达:对照组、空质粒组和 bcl-2 组缺血再灌注 9 h bcl-2 阳性细胞面积百分比分别为 (0.507 4  $\pm$  0.188 5)%、(0.486 1  $\pm$  0.201 1)%、(1.223 7  $\pm$  0.135 5)%。缺血再灌注 24 h bcl-2 阳性细胞面积百分比分别为 (0.925 4  $\pm$  0.213 3)%、(0.908 1  $\pm$  0.198 5)%、(2.273 6  $\pm$  0.633 1)%。其中 bcl-2 组比对照组和空质粒组明显升高, ( $P < 0.05$ )。

2.2.2 caspase-3 蛋白表达:bcl-2 组比对照组和空质粒组明显降低,有统计学意义(表 1)。

2.3 原位细胞凋亡检测:bcl-2 组缺血再灌注 9 h 凋亡细胞数略低,各组间没有明显差异。bcl-2 组缺血再灌注 24 h 与对照组、空质粒组之间有显著差异(表 1)。

表 1 缺血再灌注 9,24h caspase-3 阳性细胞数及凋亡细胞数(个/高倍视野)

Tab.1 Number of caspase-3-positive cells and apoptotic cells 9 and 24 hours after ischemia reperfusion (per highpower field)

项目	对照组	pLXSN 组	pLXSN-bcl-2 组
caspase-3			
9 h	25.49 $\pm$ 7.45	27.38 $\pm$ 8.37	21.25 $\pm$ 6.61
24 h	56.74 $\pm$ 9.21	57.21 $\pm$ 7.34	36.55 $\pm$ 11.24 <sup>1)</sup>
凋亡细胞数			
9 h	32.57 $\pm$ 7.37	35.26 $\pm$ 6.33	27.45 $\pm$ 9.59
24 h	79.75 $\pm$ 10.21	81.46 $\pm$ 9.73	54.91 $\pm$ 5.41 <sup>1)</sup>

注:与 9 h 组比较 1)  $P < 0.05$

## 3 讨论

脑缺血再灌注损伤可引起神经细胞凋亡,通过对细胞凋亡机制的研究,发现了 caspase 依赖途径的凋亡过程。caspase 目前认为是凋亡机制中重要的效应子之一。其中 caspase-3 被认为是各种凋亡刺激因子激活的 caspase 家族中的关键蛋白酶。药理学证据显示,抑制 caspase-3 可减少神经细胞凋亡并减少梗死面积<sup>[5]</sup>。近期研究表明,细胞内尚存在 caspase 非依赖的凋亡途径。PLESNILA N 等研究指出线粒体内存在 caspase 非依赖信号途径并在脑缺血后的细胞凋亡中起重要作用<sup>[6]</sup>。

我们的实验结果显示,经颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2 后,bcl-2 蛋白表达比对照组和空质粒组明显增加。并且在缺血再灌注 24h,bcl-2 组的 caspase-3 和凋亡细胞数明显减少,脑梗死体积下降明显。表明经颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2 可增加大鼠脑内 bcl-2 蛋白的表达,并通过抑制 caspase-3 减轻细胞凋亡,减少梗死体积。再一次证实 bcl-2 基因对脑梗死大鼠的缺血损伤具有保护作用。

另 1 组数据显示,缺血再灌注 9 h 后,bcl-2 组的 bcl-2 表达明显增加,但 caspase-3 的表达仅有轻度降低,并且凋亡细胞数变化不明显,各组间没有显著差异。我们认为这一结果可能是由于时间太早,caspase-3 还没有受到 bcl-2 的明显抑制。或者是由于在脑缺血再灌注后的早期,神经细胞凋亡主要由 caspase 非依赖途径引发,而 bcl-2 不能有效的抑制该途径引起的凋亡。因此我们推测 bcl-2 对神经细胞的保护作用是有一定时间的限制。

在本实验中我们采用经颈内动脉注射的方法进行基因治疗,将载体直接经缺血侧颈内动脉注入。

可使移植的载体广泛分布于缺血半暗带区,并允许较多数量、较大体积的药物输入,迅速提高局部药物浓度。ROSENBERG 等<sup>[7]</sup>证实在缺血再灌注 3,48 h 时血脑屏障的通透性明显增高。本实验在脑缺血再灌注后 3 h 经颈内动脉注药,既可使更多药物通过已开放的血脑屏障,又能尽早干预细胞凋亡过程。实验结果证实在脑缺血再灌注后 3 h 经颈内动脉注射 pLXSN-bcl-2,可使 bcl-2 在脑内的表达明显增加,并起很好的神经保护作用。

脑缺血的基因治疗是目前神经科学领域新的焦点,还处于实验阶段,需要克服许多技术上的问题。从本实验结果看应用 pLXSN-bcl-2 治疗脑梗死是一值得探索的治疗方法。

#### 参考文献:

[1] EARNSHAW WC, MARTINS LM, KAUFMANN SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 383-424.

- [2] 何志义、陈晏、孟祥亚,等. 质粒 pLXSN 介导人 bcl-2 cDNA 抑制局灶性脑缺血大鼠神经细胞凋亡 [J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36(5): 374-378.
- [3] 何志义、赵晶、邹巧治,等. 脑室注射 pLXSN-bcl-2 对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积、Bcl-2/Bax 蛋白表达及神经元凋亡的影响 [J]. *中华神经科杂志*, 2005, 38(4): 269-270.
- [4] CHUN FANG XIA, HANG YIN, CESAR V, et al. Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and in hibiting apoptosis [J]. *Hypertension*, 2004, 43(2): 452-463.
- [5] HAN BH, HAN BH, XU D, et al. Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(33): 30128-30136.
- [6] PLESNILA N, ZHU C, CULMSEE C, et al. Nuclear translocation of apoptosis inducing factor after focal cerebral ischemia [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(4): 458-466.
- [7] ROSENBERG GA, ESTRADA EY, ENCOFF JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain [J]. *Stroke*, 1998, 29(10): 2189-2195.

[收稿日期] 2006-09-20

(上接第 132 页)

### 3 讨论

p38 是有丝分裂蛋白激酶(MAPK)信号转导途径家族中的重要成员,它在运动信号转导中发挥重要作用。资料显示,运动可以提高骨骼肌对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖的利用,改善糖尿病患者胰岛素抵抗现象<sup>[1]</sup>。本研究也证实,不同强度和取材时间运动大鼠血浆胰岛素明显低于对照组,说明运动增加了骨骼肌对胰岛素的敏感性。然而,其分子机制的研究结果不一。资料报道,阻力运动后即刻 p38 磷酸化升高,1 h 后恢复到运动前水平;急性运动 30 min p38 磷酸化升高,可以维持 15 min<sup>[2,3]</sup>。本实验发现,1 h/d 运动 48 h 取材组 p38 磷酸化无变化,其余 3 组均高于对照组,可见运动方式的选择可能决定 p38 磷酸化的改变。骨骼肌离体实验发现,电刺激肌肉 10 min, p38 蛋白表达无改变;而人体马拉松耐力运动实验证实,股内侧肌 p38 蛋白表达降低<sup>[4,5]</sup>。本实验证实,1.5 h/d 运动 24 h 取材 p38 蛋白含量下降,48 h 后恢复正常。推测运动强度过大促进 p38 蛋白分解,影响 p38 蛋白表达的主要因素是运动强度。运动是否可以改变 p38 mRNA 的表达目前尚未见报道,本研究发现,1 h/d 和 1.5 h/d 运动 24 h 取材, p38 mRNA 表达增加,48 h 后恢复正常。

说明运动可以改变 p38 mRNA 表达,但需要合理的运动强度与准确的取材时间。

总之,运动可以增加骨骼肌对胰岛素的敏感性,提高 p38 磷酸化水平、影响蛋白和基因表达,但受运动方式选择的影响,其分子机制目前尚未十分清楚,还需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] ERIK J, HENRIKSEN. Exercise effects of muscle insulin signaling and action. Invited review: Effects of acute exercise training on insulin resistance [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93(2): 788-796.
- [2] KEI SAKAMOTO AND LAURIE J. Exercise effects on muscle insulin signaling and action. Invited Review: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93(1): 369-383.
- [3] HAKAN KR, ANDERS N, TOHNNY N, et al. Branched-chain amino acids increase P70S6k Phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise [J]. *Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 28(2): E1-E7.
- [4] ULRIKA W, XIN JIAN J, ANNA K. Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle [J]. *FASEB J*, 1998, 12(5): 1379-1389.
- [5] JEFFREY WR, ROGER F, HARRIET WH, et al. Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(2): 1457-1462.

[收稿日期] 2006-11-28