

支链氨基酸对大鼠局灶性缺血后神经元凋亡的影响

闫凤¹ 孙鹏² 赵会寿³ 黄冲³ 郭雄³ 张晓萌³ 陶凌³

【摘要】 目的 研究支链氨基酸对大鼠脑缺血再灌注损伤后凋亡相关蛋白表达的调节, 探讨支链氨基酸对缺血性脑损伤的保护作用。**方法** 雄性大鼠 40 只采用随机数字表法分为正常饮食组 ($n=20$) 和支链氨基酸 (BCAA) 组 ($n=20$), 每组再分为对照组 ($n=6$), 假手术组 ($n=6$) 及模型组 ($n=8$), 模型组大鼠采用线栓法制作缺血再灌注模型。造模后用改良神经功能缺损程度评分表 mNSS 评分法评估各组大鼠在造模后 2、6、24、48、72 h 的神经功能损伤状态。用免疫蛋白印迹法检测并比较造模 72 h 后正常饮食组大鼠和 BCAA 组大鼠凋亡相关蛋白 (cleaved caspase3、Bax/Bcl-2) 的表达量。**结果** 与正常饮食组大鼠比较, BCAA 组大鼠造模后 2、6、24、48、72 h mNSS 评分分别为 (11.35 ± 2.78 比 7.15 ± 2.41 , $P=0.019$)、(9.35 ± 1.75 比 5.82 ± 1.17 , $P=0.002$)、(6.11 ± 1.16 比 4.39 ± 1.46 , $P=0.048$)、(5.87 ± 1.32 比 3.55 ± 1.94 , $P=0.036$)、(4.98 ± 2.24 比 2.09 ± 1.33 , $P=0.022$), BCAA 组大鼠 cleaved caspase3 蛋白表达以及 Bax/Bcl-2 的比值均有所减低。**结论** BCAA 可以缓解大鼠缺血再灌注后神经凋亡的发生, 减轻神经功能损伤, 对缺血性脑损伤有积极的保护作用。

【关键词】 支链氨基酸; 脑缺血再灌注; 凋亡

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目资助 (81225001); 国家重点基础研究发展计划项目资助 (2013CB531204)

Effect of branched chain amino acid on apoptosis of neurons after focal cerebral ischemia in rats Yan

Feng, Sun Peng, Zhao Huishou, Huang Chong, Guo Xiong, Zhang Xiaomeng, Tao Ling. * Department of Nutrition, the Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author; E-mail:

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of branched chain amino acids (BCAA) on the expression of apoptosis related proteins after cerebral ischemia reperfusion injury and the protective effects of BCAA on ischemic brain injury in rats. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into normal diet group ($n=20$) and branched chain amino acid (BCAA) group ($n=20$) according to the random number table, and each group was randomly divided into control group ($n=6$), sham operation group ($n=6$) and model group ($n=8$) which used suture method to make ischemia reperfusion model. After modeling, modified Neurological Severity Scores (mNSS) was used to access the neurological impairment degree of 2, 6, 24, 48 and 72 h in each group. The expression of apoptosis related proteins (Cleaved, Bax/Bcl-2) after 72 h was detected by the method of immune protein imprinting (Caspase3) and compared between normal diet group and BCAA group. **Results** Compared with the normal diet rats, the mNSS of BCAA diet rats after modeling at 2, 6, 24, 48, 72 h decreased (11.35 ± 2.78 vs. 7.15 ± 2.41 , $P=0.019$; 9.35 ± 1.75 vs. 5.82 ± 1.17 , $P=0.002$; 6.11 ± 1.16 vs. 4.39 ± 1.46 , $P=0.048$; 5.87 ± 1.32 vs. 3.55 ± 1.94 , $P=0.036$; 4.98 ± 2.24 vs. 2.09 ± 1.33 , $P=0.022$). The expression of cleaved caspase3 protein and the ratio of Bax/Bcl-2 decreased in BCAA group.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-635X.2019.02.010

作者单位: 1. 西安 710032, 空军军医大学第一附属医院营养科; 2. 西安 710000, 空军军医大学第二附属医院神经外科; 3. 西安 710032, 空军军医大学第一附属医院心内科

通信作者, 闫凤, E-mail:

Conclusion BCAA can alleviate the apoptosis of rats after ischemia and reperfusion, reduce the damage of nerve function, and has a positive protective effect on ischemic brain injury.

[Key words] Branched chain amino acid; Cerebral ischemia reperfusion; Apoptosis

Fund program: National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (81225001); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2013CB531204)

缺血性脑血管疾病被认为是威胁人类健康的主要疾病之一, 缺血后神经功能缺损是致残的主要原因, 其中脑缺血后的神经元缺氧发生凋亡, 是缺血性脑血管病的主要病理机制之一^[1]。减少或者抑制脑缺血后的神经元凋亡对减缓脑缺血后发病进程及改善预后有重要的意义。

支链氨基酸 (BCAA) 包括亮氨酸, 缬氨酸, 异亮氨酸三种。研究发现, BCAA 对于肝性脑病以及苯丙酮尿症患者有积极的治疗作用, 但是 BCAA 的代谢异常而导致的 BCAA 在中枢神经系统的聚集是枫糖尿症的关键发病机制之一^[2]。另外, 有研究发现, 脑外伤后外周血以及中枢神经系统中的 BCAA 明显减少, 补充 BCAA 可以有效改善预后, 促进认知功能及意识状态的恢复^[3]。本研究旨在通过线栓法建立大鼠脑缺血模型, 通过比较 BCAA 干预大鼠和普通饮食大鼠在造模后的神经功能缺损以及脑组织凋亡水平的差别, 探讨 BCAA 对缺血性脑血管疾病的积极保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

相同遗传背景的健康成年雄性 SD 大鼠 40 只 (空军军医大学实验动物中心提供), 体重 300~350 g。采用随机数字法分为正常饮食组 (20 只), BCAA 组 (20 只), 每组再分为对照组 (6 只), 假手术组 (6 只) 及模型组 (8 只)。兔抗 cleaved caspase3、兔抗 Bax、兔抗 Bcl-2 (美国 CST 公司), GAPKH 兔源单克隆抗体 (美国 Proteintech 公司)。

1.2 BCAA 干预

40 只健康成年雄性 SD 大鼠, 随机分为正常饮食组 (20 只), BCAA 组 (20 只), 2 组大鼠均喂食普通饲料, 正常饮食组给予普通饮用水, BCAA 组给予含有 5% 浓度的 BCAA 饮用水 (亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸粉末以 2:1:1 的比例溶于普通饮用水中, 充分搅拌, 得到终浓度 5% 的 BCAA 饮用水)。正常饮食组和 BCAA 组大鼠每日饮水量分别为: 11.52 ml/100 g 体重、11.41 ml/100 g 体重,

差异无统计学意义。BCAA 组大鼠每日 BCAA 摄入量约为 0.57 g/100 g 体重。

1.3 线栓法制作大鼠脑缺血模型

按照孙念霞等^[4]的方法制作大鼠脑缺血模型, 具体方法如下: ①大鼠术前禁饮食 6 h, 100 g/L 水合氯醛 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉。②固定门齿, 术区去毛备皮, 用碘伏消毒颈部皮肤 3 次, 颈部正中部位纵行切开皮肤约 2 cm 长, 钝性分离皮下组织, 找到颈总动脉分叉处, 沿血管方向纵行钝性分离颈总动脉, 颈内动脉和颈外动脉。③颈总动脉处置一根手术线不结扎。颈外动脉处置两根手术线, 距分叉 4 mm 处结扎第 1 根手术线, 在线结的远心端 2 mm 处结扎第 2 根手术线, 于两线结之间高频电刀电凝夹闭血管, 眼科剪剪断血管。线剪剪断两线结处的余线。④分离颈外动脉第一分支枕动脉并电凝灼断血管。分离颈内动脉, 微动脉夹夹闭颈内动脉、颈总动脉。⑤颈外动脉起始处置一手术线, 打单结不收紧, 紧靠残端线结处眼科剪垂直血管剪口。⑥取出泡在 0.9% NaCl 溶液中的鱼线, 小心提起颈外动脉残端线结与颈内动脉成一直线, 从剪口处插进鱼线达颈内动脉夹闭处, 适量收紧颈外动脉起始处的手术线, 松开颈内动脉的动脉夹, 缓慢推进鱼线。⑦插入鱼线 16~18 mm 遇阻力时停止, 结扎颈外动脉起始处的手术线, 松开夹闭颈总动脉的动脉夹。⑧记录缺血开始的时间, 缺血 90 min 后缓慢拔出鱼线, 记录再灌注开始的时间。⑨清理伤口, 观察无内出血后逐层缝合伤口, 乙醇消毒, 对皮。假手术组: 只分离颈总、颈外和颈内动脉, 不结扎不栓线。对照组不做任何处理。对各组大鼠在术后 48 h 进行麻醉, 麻醉成功后, 用 0.9% NaCl 溶液左心室灌注处死, 取脑后, 分离出大脑皮质和海马组织, 置于液氮中保存。

1.4 神经行为学评分

各组大鼠再造模前及造模后 2、6、24、48、72 h 根据改良神经功能缺损程度评分表 (modified neurological severity score, mNSS)^[5] 进行神经行为评分, 评估神经功能损伤程度。

1.5 免疫蛋白印迹法

0.9% NaCl 溶液灌注后取脑, 取皮质和海马, 用 RIPA 裂解液提取组织蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量后, 调整每孔上样量为 50 μg 。分子量低于 20 kD 的目标蛋白用 150 g/L 的分离胶, 分子量在 30~90 kD 的目标蛋白用 100 g/L 分离胶进行 SPS-PAGE 电泳, 后用电泳转膜仪在冰上转膜将凝胶上的蛋白转至 NC 膜上, 转膜结束后用 50 g/L 脱脂牛奶封闭 2 h。一抗 (cleaved caspase3 1 : 750; Bax 1 : 1 000; Bcl-2 1 : 1 000; GAPDH 1 : 4 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。之后, 0.5% TBST 洗膜 5 次, 每次 8 min。然后 HRP-标记的羊抗兔抗体 (1 : 5 000) 室温下孵育 1 h。TBST 洗膜后, 发光, 照相。条带采用 image J 分析软件测定灰度值, 并用其相应的 GAPDH 条带进行校正, 计算其相对含量, 进行定量分析。

1.6 统计学分析

应用 SPSS16.0 统计软件对资料进行分析, 检测结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 符合正态性分布及方差齐性, 多个样本均数间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

模型组大鼠在造模后呼吸节律不规整, 部分出现胸式呼吸, 苏醒后出现走路不稳, 活动减少, 摄食及饮水明显减少。mNSS 评分结果显示, 与对照组和假手术组相比, 模型组大鼠线栓后 2、6、24、48、72 h mNSS 评分均有所升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示神经功能损伤。BCAA 饮食的

模型组大鼠较正常饮食的线栓法组大鼠同时时间点的 mNSS 评分较低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。模型组大鼠有 3 只死亡, 死亡率为 7.5% (3/40), 死亡全部发生在术后 24 h 以内。死亡原因可能是颅脑损伤后颅内压增高或者严重的脑干原发性损伤导致的呼吸心跳骤停。每组剩余大鼠仍然大于 6 只, 有足够的样本量完成实验。

2.2 各组大鼠海马凋亡相关蛋白表达水平

用免疫蛋白印迹法检测各组大鼠脑干凋亡相关蛋白的表达, 正常饮食组和 BCAA 组中的模型组大鼠, cleaved caspase3、Bax 的表达较相对应的对照组增高, 同时 Bcl-2 的表达减少, 灰度分析结果显示, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.3 各组大鼠皮质凋亡相关蛋白表达水平

用免疫蛋白印迹法检测各组大鼠皮质内凋亡相关蛋白的表达, 正常饮食组和 BCAA 组中的模型组大鼠, cleaved caspase3、Bax 的表达较相对应的对照组增高, 同时 Bcl-2 的表达减少, 灰度分析结果显示, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

3 讨论

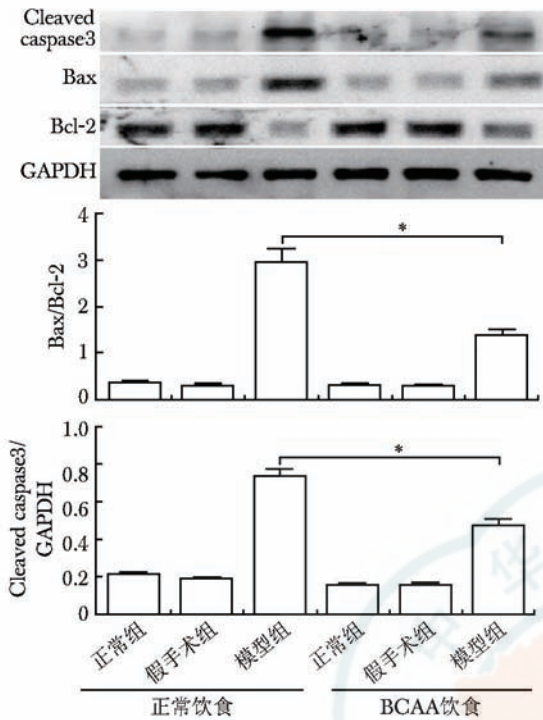
脑缺血再灌注发生后, 由于糖和能量的供应减少, 能量衰竭等变化, 引发神经元的钙离子内稳态失衡, 细胞间隙兴奋性谷氨酸的聚集以及氧自由基的大量生成造成线粒体损伤等多种病理变化, 最终导致神经元凋亡^[1], 从而造成颅内压增高以及神经功能缺损等临床表现。造模后用 mNSS 进行神经功能评分, 发现模型组大鼠较对照组和假手术组大鼠有明确的神经功能损伤表现, 说明用线栓法制作大鼠脑缺血再灌注模型确实可靠, 能够较好地模拟缺血性脑血管疾病的病理生理变化。

表 1 各组大鼠 mNSS 评分结果

Table 1 Comparison of mNSS scores between normal diet group and BCAA group

组别	<i>n</i> (只)	mNSS 评分					
		2 h	6 h	24 h	48 h	72 h	
正常饮食	对照组	6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	假手术	6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	模型组	6	11.35 \pm 2.78 [*]	9.35 \pm 1.75 [*]	6.11 \pm 1.16 [*]	5.87 \pm 1.32 [*]	4.98 \pm 2.24 [*]
BCAA 饮食	对照组	6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	假手术	6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	模型组	7	7.15 \pm 2.41 ^{**}	5.82 \pm 1.17 ^{**}	4.39 \pm 1.46 ^{**}	3.55 \pm 1.94 ^{**}	2.09 \pm 1.33 ^{**}

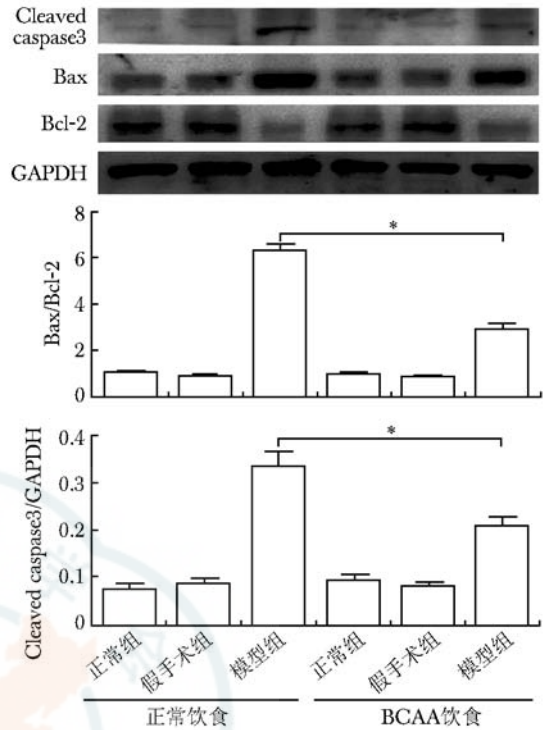
注: 同种饮食的大鼠模型组与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与正常饮食模型组的比较, ^{**} $P < 0.05$



注: * $P < 0.05$

图 1 BCAA 饮食对大鼠脑缺血后海马内凋亡相关蛋白表达的调节

Fig 1 Regulation of BCAA on the expression of apoptosis-related proteins in hippocampus after cerebral ischemia in rats



注: * $P < 0.05$

图 2 BCAA 饮食对大鼠脑缺血后脑皮层凋亡相关蛋白表达的调节

Fig 2 Regulation of BCAA on the expression of apoptosis-related proteins in cerebral cortex after cerebral ischemia in rats

BCAA 在蛋白质合成、糖原合成以及组织能量代谢方面发挥了重要的作用^[6]。BCAA 是通过位于血-脑-脊液屏障的特定转运体进入中枢神经系统的, 这个转运体除了帮助 BCAA 进入中枢神经系统外, 还可以转运大多数中性氨基酸, 例如: 络氨酸、苯丙氨酸 (儿茶酚胺的前体氨基酸) 和色氨酸 (5-羟色氨的前体氨基酸), 它们和 BCAA 存在竞争关系^[7-8], 即血浆浓度高的氨基酸更容易与转运体发生竞争性结合, 从而进入中枢系统中^[7-8]。

目前有研究报道, BCAA 能够改善颅脑损伤患者的认知功能和意识水平, 其机制可能与 BCAA 能够影响膜电位的平衡从而稳定神经细胞的钠钾钙等离子的内稳态有关; 另外 BCAA 可以提高脑内糖的生成和利用率, 缓解 ATP 的缺乏状态; BCAA 还可以通过促进脑内相关蛋白质的合成减轻对神经功能的破坏情况^[3,6,9-10]。另有研究发现, 脑外伤后 BCAA 的含量迅速降低能够导致脑内谷氨酸的生成减少, 脑内长期缺乏谷氨酸也会出现意识和认知行为的异常, 因此研究者认为颅脑损伤患者补充 BCAA 可以缓解受伤后脑内谷氨酸的缺乏, 增加突

触间隙谷氨酸的清除率, 减轻谷氨酸的兴奋毒性作用^[3,6]。

本研究发现, 正常饮食组大鼠和 BCAA 组大鼠在造模后均出现脑皮质和海马内的 cleaved caspase3 表达增多以及 Bax/Bcl-2 的比值增高, 但 BCAA 组大鼠的变化程度没有正常饮食组大鼠幅度大。Bcl-2 家族是参与调控线粒体凋亡途径的一类蛋白, 包含多种促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白, 抗凋亡蛋白包括 Bcl-2、Bcl-X、Bcl-w 和 Mcl-1 等, 促凋亡蛋白则包括 Bax、Bak、Bad、Bik、Bim 和 Bid^[11]。在正常情况下, Bax 可与定位于线粒体膜上的抑凋亡蛋白分子 Bcl-2 相互结合, 在启动凋亡后 Bim 等促凋亡蛋白可 Bcl-2 发生结合, 从而导致 Bax 分离出来, 分离出来的 Bax 参与引起线粒体的膜电位的改变, 促使线粒体膜通透增加, 导致细胞色素 C 释放, 发挥促凋亡作用^[12]。Caspase-3 是介导细胞凋亡的重要蛋白酶, 在细胞凋亡早期活化, 其最主要的底物是 PARP, 该酶在细胞凋亡启动时, 被 caspase-3 剪切成 31 kD 和 85 kD 两个片段, 形成 cleaved caspase3, 结果使受 PARP 负调控影响

的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶的活性增高, 导致 DNA 裂解, 引起细胞凋亡^[13]。这也解释了本研究中所发现的 BCAA 饮食大鼠在造模后的 mNSS 评分较正常饮食大鼠低的原因。

总之, 脑缺血再灌注后发生神经凋亡是导致脑卒中高病死率和致残率的一个主要原因。BCAA 通过抑制细胞凋亡可以显著改善缺血性脑卒中后神经功能的损伤状态, 这也为将 BCAA 应用于缺血性脑卒中的治疗提供了新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Miller CM, Behrouz R. Impact of Infection on Stroke Morbidity and Outcomes [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16 (9): 83.
- [2] Scaini G, Comim CM, Oliveira GM, et al. Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model [J]. *J Inher Metab Dis*, 2013, 36 (5): 721-730.
- [3] Aquilani R, Iadarola P, Contardi A, et al. Branched-chain amino acids enhance the cognitive recovery of patients with severe traumatic brain injury [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2005, 86 (9): 1729-1735.
- [4] 孙念霞, 高维娟, 易忠良. 改良线栓法制作 SD 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 2 (18): 225-230.
- [5] Li Y, Song J, Liu X, et al. High expression of STIM1 in the early stages of diffuse axonal injury [J]. *Brain Res*, 2013, 1495: 95-102.
- [6] Jeter CB, Hergenroeder GW, Ward NR, et al. Human mild traumatic brain injury decreases circulating branched-chain amino acids and their metabolite levels [J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30 (8): 671-679.
- [7] Fernstrom JD. Branched-chain amino acids and brain function [J]. *J Nutr*, 2005, 135 (6 Suppl): 1539S-1546S.
- [8] Deshpande G, Adachi N, Liu K, et al. Recovery of brain dopamine metabolism by branched-chain amino acids in rats with acute hepatic failure [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2007, 19 (4): 243-248.
- [9] Scaini G, Jeremias GC, Furlanetto CB, et al. Behavioral responses in rats submitted to chronic administration of branched-chain amino acids [J]. *JIMD Rep*, 2014, 13: 159-167.
- [10] Scaini G, Mello-Santos LM, Furlanetto CB, et al. Acute and chronic administration of the branched-chain amino acids decreases nerve growth factor in rat hippocampus [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48 (3): 581-589.
- [11] Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria [J]. *Biosci Rep*, 2002, 22 (1): 47-58.
- [12] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15 (1): 49-63.
- [13] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, 281 (5381): 1309-1312.

(收稿日期: 2018-04-03)