

米诺环素对局灶性脑缺血大鼠脑可塑性的影响^{*}

陶涛¹, 秦文熠², 李作孝¹, 李小刚^{1△}

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)

【摘要】目的 观察米诺环素对大鼠脑缺血再灌注(I/R)损伤后皮质神经元结构及突触素(synaptophysin, SYN)蛋白表达的影响。**方法** 将36只大鼠随机分为假手术组(Sham组)、I/R模型组(I/R组)及米诺环素组(Min组),每组12只。Sham组不进行I/R处理,不给药。I/R组及Min组均采用线栓法阻塞大脑中动脉制作大鼠MCAO模型,再尾静脉注射PBS或米诺环素(3 mg/kg, 2次/d)14 d后,采用Montoya楼梯实验评估3组大鼠前肢运动功能,HE染色观察皮质神经元的形态结构,免疫荧光法观察缺血灶周围神经突的生长,Western blot法检测缺血脑组织内SYN蛋白的表达。**结果** 假手术组大鼠无明显神经功能缺损,皮层神经元细胞形态正常,微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)阳性神经元排列整齐,神经突较长;同模型组相比,米诺环素组大鼠的前肢运动功能改善,MAP-2及SYN蛋白表达增加,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 米诺环素能促进大鼠缺血皮层神经元神经突的生长、突触素的表达及神经功能的恢复,发挥对脑组织可塑性的调节作用。

【关键词】 米诺环素 突触素 脑缺血再灌注 微管相关蛋白-2

Effects of Minocycline on the Neuronal Plasticity in Rats after Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury TAO Tao¹, QIN Wen-yi², LI Zuo-xiao¹, LI Xiao-gang^{1△}. 1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Department of Integrative Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

△ Corresponding author, E-mail: lixg5948@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of minocycline on morphology and the expression of synaptophysin in cortical tissues of rats after cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** 36 male SD rats were randomly divided into 3 groups: sham group, model group [ischemia reperfusion (I/R)] and minocycline (Min) group (treated with minocycline for 14 d, 3 mg/kg, 2 times/d). Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to established as focal cerebral I/R model. At 14 d after I/R. Neurological functional recovery was evaluated using the staircase test, the cell morphology in cortex was evaluated by HE staining, the neurite growth was observed by immunostaining with anti-microtubule-associated protein-2 (MAP-2) antibody, the expression of synaptophysin in peri-infarct region was tested by Western blot. **Results** In the sham group, the rats did not show any neurological deficits. The neurons in the cortex were arranged in neat rows and the morphology were normal, the MAP-2 positive neurons showed longer neuronal processes than the model group. Compared to the model group, minocycline significantly improved forelimb motor function, increased the expression of synaptophysin and the number of MAP-2-positive cells in peri-infarct region ($P<0.05$). **Conclusion** Minocycline could improve the neurite regrowth and the expression of synaptophysin of neuron in ischemic cortex, promote neurological functional recovery of rats after MCAO, which is related to regulate the neuronal plasticity.

【Key words】 Minocycline Synaptophysin Cerebral ischemia reperfusion MAP-2

脑卒中是威胁人类生存的常见病、多发病,其中缺血性脑血管疾病具有极高的致残率,严重影响人们的生活质量,给社会和家庭带来巨大的精神和经济负担。缺血性卒中后的神经康复是神经科学家孜孜以求的研究方向,研究表明神经可塑性是神经康复的关键所在^[1]。神经可塑性是指在外界环境的作用下,从神经元到神经环路在结构和功能上进行适应性变化^[2]。急性缺血性卒中后促进受损神经可塑性的变化及功能重组,与患者运动功能的康复密切相关^[3]。近期研究表明米诺环素是目前最有潜力的神经保护剂之一,在多种神经疾病的动物模型中具有抗炎症、抗凋亡、抗氧化应激及血管保护活性^[4]。本课题组前期研究表明,静脉给予低剂量米诺环素

孜孜以求的研究方向,研究表明神经可塑性是神经康复的关键所在^[1]。神经可塑性是指在外界环境的作用下,从神经元到神经环路在结构和功能上进行适应性变化^[2]。急性缺血性卒中后促进受损神经可塑性的变化及功能重组,与患者运动功能的康复密切相关^[3]。近期研究表明米诺环素是目前最有潜力的神经保护剂之一,在多种神经疾病的动物模型中具有抗炎症、抗凋亡、抗氧化应激及血管保护活性^[4]。本课题组前期研究表明,静脉给予低剂量米诺环素

^{*} 四川省卫生计生委项目(No. 140032)、四川省教育厅资助项目(No. 15ZA0168)、泸州市科技计划项目(No. 2014S4506)和泸州医学院院级基金资助项目(No. 2014QN-092)资助

△ 通讯作者, E-mail: lixg5948@163.com

可促进大鼠局灶性脑缺血再灌注(I/R)损伤后神经功能的恢复^[5]。因此,本研究采用大鼠大脑中动脉阻塞模型,探讨米诺环素对脑可塑性的影响及其作用机制,以期缺血性脑血管病的神经康复提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 大鼠脑 I/R 模型的制备

线栓法制作大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型^[5]:麻醉大鼠后,将其仰卧位固定,颈正中切口,分离出颈总、颈内及颈外动脉,灼断颈内、外动脉之间的交通支,结扎颈总动脉和颈内动脉,从颈外动脉残端缓慢插入线栓,插入到微感阻力即停止,用丝线固定线栓并缝合伤口,缺血 2 h 后拔出线栓实现再灌注。假手术组大鼠除不插入线栓外,其余步骤同上。大鼠清醒后采用 Longa 评分法对大鼠进行神经功能评分:0 分和 4 分以及后续取材发现蛛网膜下腔出血者均剔除,并从同批大鼠中随机补足各组动物数。

1.2 实验分组及给药

健康雄性成年 SD 大鼠 36 只(3 月龄,体质量 240~280 g),购于泸州医学院实验动物中心。随机分为假手术组(Sham 组)、I/R 模型组(I/R 组)及米诺环素组(Min 组),每组 12 只。米诺环素组于 I/R 造模同时按 1 mL/100 g 的比例尾静脉注射 3 mg/kg 米诺环素,每日 2 次,持续 14 d,所选剂量基于前期研究结果^[5]。模型组用等体积 PBS 代替。Sham 组不进行注射。神经功能评分后 6 只大鼠用于免疫荧光检测,另外 6 只用于免疫印迹检测。

1.3 前肢运动功能评分

参照并改进 Montoya 设计^[6]的“楼梯测试”,对术后第 7 和 14 d 的大鼠进行前肢运动功能评价。将大鼠放入两侧各有 7 层楼梯的透明玻璃树脂盒子里,每个楼梯的食槽内放置 3 个 45 mg 食物小球,将大鼠前肢在 15 min 内抓取食物粒的个数作为其前肢运动功能的评分。

1.4 实验取材及 HE 染色

缺血 14 d 后,从各组中取出 6 只大鼠,深度麻醉后直接断头取脑,取缺血侧大脑中动脉供血脑组织(前凶前 1 mm 至前凶后 2 mm,前凶右侧 2 mm),分别放入无菌的冻存管中,置于一 80 ℃ 冰箱中保存用于 Western blot 检测;各组另取 6 只大鼠,经 4% (体积分数)多聚甲醛灌流固定后常规行 HE 染色观察皮质神经元形态结构,并选取缺血区脑组织制作冰冻切片(片厚 10 μm),用于免疫荧光检测。

1.5 免疫荧光标记神经元

取大鼠缺血侧脑组织冰冻切片,以丙酮固定,枸橼酸盐中微波修复,0.3% Triton X-100 破膜及山羊血清封闭后,加入神经元标志物抗微管相关蛋白-2(MAP-2)抗体(Santa Cruz,美国),PBS 代替一抗做阴性对照,4 ℃ 过夜后,在避光情况下加入 FITC 标记的二抗,室温孵育 2 h,50%甘油封片,在激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.6 Western blot 检测突触素(SYN)的表达

先提取脑组织全蛋白,经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,然后电转至 PDVF 膜,脱脂牛奶中封闭后先后加入抗 SYN(1:200,武汉博士德公司)、β-actin(1:1 000)及辣根过氧化物酶标记的 IgG(1:2 500),扫描拍照后用 Quantity One 软件进行条带分析,以目标蛋白/β-actin 条带光密度值的比值表示蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后前肢运动功能的影响

术前各组大鼠左前肢运动功能无明显差异,术后模型组大鼠左前肢运动功能降低,但 I/R 第 2 周较第 1 周好转。I/R 术后第 1 周,米诺环素组大鼠前肢运动功能评分与模型组之间的差异无统计学意义($P=0.61$),I/R 术后第 2 周米诺环素组大鼠左前肢抓取食物粒多于模型组($P=0.23$)。见表 1。

表 1 各组间大鼠的前肢运动功能比较($n=6, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of the staircase test between three group ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Pre-operation	7 d	14 d
Sham	16.68±1.75	15.83±1.47	16.50±1.87
I/R	16.50±1.87	2.68±0.82★	6.33±1.75★
Min	17.17±1.72	3.00±0.89★	8.33±1.47★、▲

★ $P < 0.05$, vs. sham group; ▲ $P < 0.05$, vs. I/R group

2.2 脑缺血再灌注侧皮质神经元的病理改变

HE 染色结果显示假手术组大鼠皮质神经元排列整齐,细胞核及核仁完整清晰,细胞周围未见明显水肿。模型组神经元细胞水肿,部分神经元细胞核固缩深染,细胞周围间隙增宽。米诺环素组神经元排列较模型组整齐,神经细胞肿胀程度减轻,仅少量

细胞变性(图 1)。

2.3 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经突生长的影响

免疫荧光染色显示,假手术组皮质可见大量胞体及神经突 MAP-2 阳性细胞,神经元排列规则,突起明

显且排列成束状,而 I/R 模型组缺血侧皮质神经元 MAP-2 阳性细胞数减少,神经突破坏明显,树突排列紊乱,突起长度明显缩短。米诺环素组与模型组比较,MAP-2 阳性细胞数增加,突起数目及长度明显增加(图 2)。

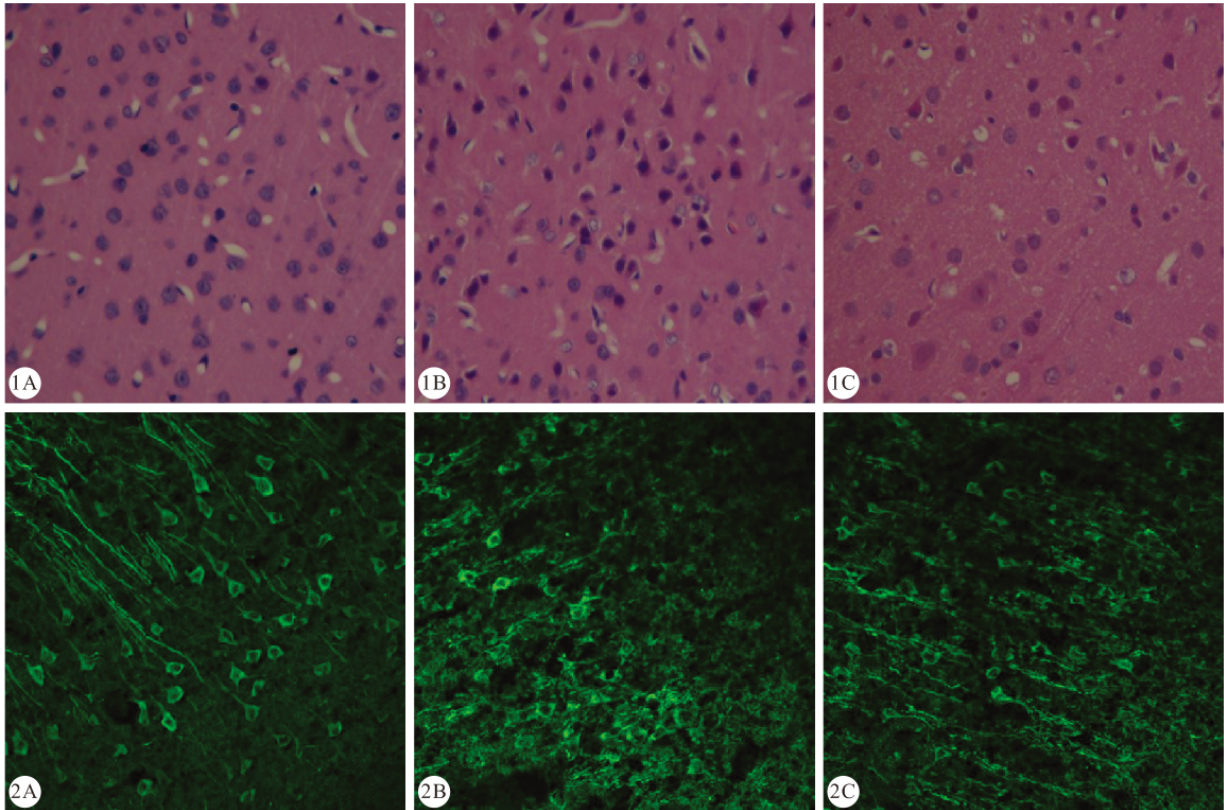


图 1 HE 染色显示大鼠脑组织的病理变化。×200 图 2 免疫荧光检测脑组织内神经突的生长情况。×200
Fig 1 Pathological changes of cerebral tissues in rats 14 days after cerebral ischemia reperfusion. ×200 Fig 2 Neurite growth in ischemic cortex were labelled by immunofluorescence. ×200

A: Sham group; B: I/R group; C: Min group

2.4 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后 SYN 蛋白表达的影响

见图 3。Western blot 结果显示,各组间 SYN 表达差异具有统计学意义($P<0.05$)。同假手术组(0.23 ± 0.09)相比,模型组 SYN 蛋白表达(0.61 ± 0.13)增高($P=0.00$),给予米诺环素干预后,SYN 蛋白的表达(0.82 ± 0.09)水平进一步增加($P=0.004$)。

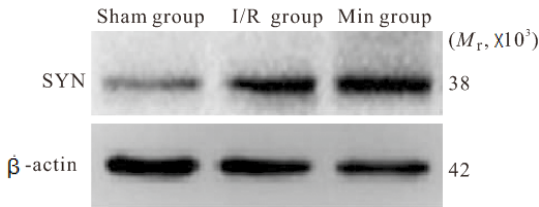


图 3 Western blot 检测米诺环素对缺血侧皮质 SYN 蛋白表达的影响
Fig 3 The effects of minocycline on the expression of SYN protein by Western blot

3 讨论

本研究发现,低剂量米诺环素可促进缺血侧皮质神经元 SYN 的表达。SYN 是突触囊泡膜上特有的钙结合糖蛋白,参与神经递质的释放、突触再生及突触可塑性的调节。SYN 也是突触重构的分子标志物之一。大鼠全脑 I/R 损伤 3 d 内,海马 CA1 区神经元 SYN 基因和蛋白表达下调,之后逐渐增加,第 14 d 时到达高峰^[7]。在局灶性脑缺血大鼠模型中,SYN 蛋白的表达自再灌注第 1 d 起开始下降,第 3 d 降至最低,从第 7 d 开始上升直到第 14 d 超过基线水平^[8]。研究表明 SYN 蛋白早期显著下降为缺血导致轴突终末的损伤及 SYP 合成减少所致,随后 SYP 逐渐增加可能是轴突出芽,使突触前囊泡数量增加的结果^[8,9]。本研究发现,在大鼠脑 I/R 第 14 d,缺血脑组织内 SYN 表达上调,与前述报道

一致。张昆南等^[10]进一步研究发现,大鼠缺血脑组织内 SYN 的含量与神经功能评分呈负相关,表明脑缺血后神经功能的恢复与 SYN 表达的增加密切相关^[11]。本研究发现大鼠脑缺血再灌注 14 d 后,病灶周围皮质神经元内 SYN 表达上调且大鼠左前肢运动功能较缺血第 7 d 明显好转。其次,低剂量米诺环素可促进缺血侧皮质神经元 SYN 表达进一步增加,利于大鼠前肢运动功能的恢复。以上结果表明脑缺血后大鼠神经功能的恢复与米诺环素调节 SYN 蛋白的表达有关。

本研究也发现,米诺环素可促进缺血侧皮质 MAP-2 阳性神经元数目及树突长度增加。MAP-2 是神经元特异的标志蛋白,与神经元的再生及结构可塑性密切相关。MAP-2 在核周质中合成后转运至树突,参与神经元的生长和损伤后的修复过程。脑缺血早期缺血核心区内 MAP-2 表达逐渐减少,而缺血半暗带内 MAP-2 表达选择性升高^[12,13]。本研究认为米诺环素可促进缺血侧皮质神经元结构可塑性变化,并与缺血后大鼠神经功能的恢复密切相关。

综上所述,本研究发现大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后,米诺环素可促进缺血皮质的组织形态发生适应性变化,神经元突触素蛋白表达增加,轴突再生能力增强,导致脑功能可塑性的变化和重组。为阐明米诺环素促进脑梗死后神经修复作用提供直观的形态学依据。但其具体机制及米诺环素是否引起缺血侧皮质神经元功能发生改变仍需进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 袁栋才,张凤春,魏 巍等.神经可塑性与脑卒中后运动功能恢复的研究进展.中国康复医学杂志,2014;29(4):391-394.
- 2 李红颖,单晶丽,王凤军.头穴透刺加康复对脑梗死大鼠脑可

塑性的影响.辽宁中医药大学学报,2013;15(1):73-75.

- 3 李飞平,陈增爱,沈加林等.缺血性脑卒中后神经可塑性与运动功能恢复研究进展.神经病学与神经康复学杂志,2009;6(2):127-130.
- 4 Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, *et al.* Prospects for minocycline neuroprotection. Arch Neurol, 2010; 67(12):1442-1448.
- 5 陶 涛,秦新月,冯金洲.低剂量米诺环素对脑缺血再灌注大鼠 RGMa 表达的影响.中国神经精神疾病杂志,2015;41(3):141-144.
- 6 Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, *et al.* The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. J Neurosci Methods, 1991; 36(2-3):219-228.
- 7 Zhao Y, Wang J, Liu C, *et al.* Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats. Synapse, 2011; 65(9):880-891.
- 8 刘晓梅,位学海,刘月霞等.银杏叶提取物对局灶性脑缺血/再灌注大鼠突触素表达的影响.黑龙江医药科学,2007;30(2):4-5.
- 9 李逸尘,姜信诚,景玉宏等.大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区血管内皮细胞生长因子与突触素的关系.兰州大学学报(医学版),2010;36(1):9-12.
- 10 张昆南,刘世民,胡国柱等.脑缺血再灌注恢复期大鼠梗死周围组织 GFAP、NSE、SYN、Nogo-A 表达与神经功能转归的相关性.国际脑血管病杂志,2011;19(3):220-225.
- 11 郑安洁,程 焱,陶华英.重复经颅磁刺激对大鼠缺血脑组织中突触素表达及运动功能康复的影响.中华老年心脑血管病杂志,2012;14(6):644-647.
- 12 关鸿志,刘士民,郭玉璞.大鼠的局灶性脑缺血再灌注损伤分区及再灌注时间窗.中华老年心脑血管病杂志,1999;1(1):46-49.
- 13 肖小华,李 玲,殷 梅等.实验性脑梗死及再灌注后的微管相关蛋白、热休克蛋白及胶质原纤维酸性蛋白的动态变化.中国临床康复,2005;9(9):73-75.

(2014-11-25 收稿,2015-03-20 修回)

编辑 吕 熙