

米诺环素抑制脑缺血再灌注后小胶质细胞激活的机制研究^{*}

陶涛, 付洁, 刘永刚, 李作孝, 李小刚

西南医科大学附属医院 神经内科 (泸州 646000)

【摘要】 目的 观察米诺环素对大鼠脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤后小胶质细胞的激活及神经炎症的影响,探讨腺苷 A_{2A}受体(adenosine A_{2A} receptor, A_{2A}R)在米诺环素调节小胶质细胞活化中的作用机制。
方法 采用线栓法阻塞大脑中动脉制作大鼠 I/R 损伤模型,将 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组、I/R 模型组及米诺环素组[I/R 造模时,米诺环素按体质量 3 mg/kg(质量浓度为 100 g /1 mL)尾静脉注射,每日 2 次]。再灌注 24 h 后,处死大鼠,取大鼠缺血侧脑组织,采用小胶质细胞特异性标记抗体 CD11b/c 染色、抗 A_{2A}R 抗体免疫荧光以及双标染色检测缺血灶周围活化的小胶质细胞和 A_{2A}R 蛋白的表达。Western blot 法检测缺血脑组织内白介素-1 β -6(IL-1 β 、IL-6)及 A_{2A}R 蛋白的表达。
结果 I/R 模型组 CD11b 阳性的小胶质细胞数明显多于假手术组;与 I/R 模型组相比,米诺环素组 IL-1 β 、IL-6 及 A_{2A}R 蛋白表达下降($P < 0.05$),活化的小胶质细胞数目明显减少。
结论 米诺环素可抑制局灶性脑 I/R 损伤所致的小胶质细胞激活及神经炎症反应,其机制可能与下调 A_{2A}R 蛋白的表达有关。

【关键词】 米诺环素 腺苷 A_{2A}受体 脑缺血再灌注 小胶质细胞

Minocycline Prevent Microglial Activation via Suppression of Adenosine A_{2A} Receptor in a Rat Stroke Ischemia/Reperfusion Model TAO Tao, FU Jie, LIU Yong-gang, LI Zuo-xiao, LI Xiao-gang. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate whether minocycline could inhibit neuroinflammation induced by microglia activation through suppression of adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) expression in rats after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham group, I/R group and minocycline group. The rats were subjected to occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO) for 2 h to establish stroke I/R model, and 3 mg/kg minocycline was injected intravenously immediately after reperfusion twice a day in minocycline group. At 24 h after I/R, the inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 in peri-infarct region were measured by Western blot, microglia activation was detected by double-immunofluorescence labeling. A_{2A}R density was detected by immunohistofluorescence and Western blot. **Results** The number of CD11b-positive cells in I/R group was increased when compared with that in sham group. The expressions of IL-1 β , IL-6 and A_{2A}R were markedly up-regulated after I/R. Minocycline significantly decreased the expressions of IL-1 β , IL-6 and A_{2A}R and the number of CD11b-positive cells in peri-infarct region. **Conclusion** Minocycline could prevent cerebral ischemia induced neuroinflammation by the suppression of microglial activation, which may be related to down-regulation of A_{2A}R expression.

【Key words】 Minocycline Adenosine A_{2A} receptor Cerebral ischemia reperfusion Microglia

2008 年我国居民死亡原因调查报告显示,脑血管病已成为我国第一位死亡原因。脑卒中高发、高致残、高死亡和高复发率的特点,为患者及家庭带来了沉重的经济负担。其中缺血性脑卒中(即脑梗塞)是因局部脑血流供应中断所致的神经功能缺损。脑缺血后启动一系列瀑布式级联反应,最终导致神经元的死亡,其中神经炎症反应是启动缺血性脑损

伤的关键环节。腺苷 A_{2A}受体(A_{2A}R)的活化可促进小胶质细胞的增殖/活化,进而释放大量炎症介质,产生促炎作用^[1]。

米诺环素是一种已在临床上广泛使用的抗生素,近期大量研究表明,米诺环素在多种神经疾病的动物模型中通过抑制小胶质细胞的激活、缓解神经细胞的凋亡及减少活性氧的产生而发挥神经保护作用^[2]。在中枢神经系统,米诺环素通过调节小胶质细胞的增殖/激活,抑制白介素-6、1 β (IL-6, IL-1 β)及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的释放而发挥抗炎活性^[3-4]。本课题组前期研究也

^{*} 四川省教育厅科研项目(No. 15ZA0168)、泸州市科技计划项目(No. 2014S4506)和西南医科大学附属医院课题(No. 2015-PT-010)资助

发现米诺环素可抑制大鼠缺血脑组织内小胶质细胞的激活,从而减少脑梗死体积,促进大鼠神经功能的恢复^[5]。因此,我们推测米诺环素抑制小胶质细胞的激活,与其阻断 $A_{2A}R$ 的活化有关。为验证此推测,本研究采用大鼠大脑中动脉阻塞模型,观察米诺环素对脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)后小胶质细胞的活化及 $A_{2A}R$ 表达的影响,探讨米诺环素抑制小胶质细胞活化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

3~4 月龄清洁级健康成年 SD 大鼠 30 只(体重 240~280 g),购于西南医科大学实验动物中心。盐酸米诺环素(Sigma 公司),小鼠抗 CD11b 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),兔抗 IL-1 β 及兔抗 $A_{2A}R$ 多克隆抗体(北京博奥森公司),兔抗 IL-6 多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔及 Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(武汉博士德公司),全蛋白提取试剂盒(南京凯基公司),Western blot 相关试剂均购于碧云天公司。

1.2 动物分组及大鼠脑 I/R 模型的制备

按随机数字表将大鼠分为假手术组(S 组)、I/R 模型组(I/R 组)及米诺环素组(Min 组),每组 10 只。参照本课题组前期的实验方法制作大鼠大脑中动脉阻塞(I/R)模型^[5]。大鼠麻醉后将其仰卧位固定,颈正中切口,分离暴露颈总、颈内及颈外动脉,灼断颈内、外动脉间交通支,从颈外动脉残端插入线栓,缺血 2 h 后拔出线栓,即再灌注。S 组大鼠除不插入线栓外,其余操作同另两组大鼠。大鼠清醒后进行 Longa 神经功能缺失评分,评分为 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。

1.3 实验动物给药及取材

Min 组给药方案参照本课题组前期的实验方法^[6]。即 Min 组大鼠在 I/R 造模时,米诺环素按体质量 3 mg/kg(质量浓度为 100 g/1 mL)尾静脉注射,每日 2 次;I/R 组大鼠尾静脉注射等量磷酸盐缓冲液(PBS);S 组大鼠不进行尾静脉注射。再灌注 24 h 时,断头处死各组大鼠,取各组 5 只大鼠脑组织用于免疫荧光检测,另外 5 只大鼠脑组织用于免疫印迹检测。

1.4 免疫荧光检测缺血脑组织中活化的小胶质细胞及 $A_{2A}R$ 蛋白的表达

采用小胶质细胞特异性标记抗体 CD11b/c 染色(红色荧光)、抗 $A_{2A}R$ 抗体免疫荧光(绿色荧光)以及

双标染色检测缺血侧脑组织活化的小胶质细胞和 $A_{2A}R$ 蛋白的表达。再灌注 24 h 后,将大鼠缺血侧脑组织冰冻切片(片厚 10 μ m)分别放入丙酮中固定,枸橼酸盐中进行微波修复,0.3% TritonX-100 破膜及山羊血清封闭后,加入抗 CD11b(1:50)和抗 $A_{2A}R$ (1:50)抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜后,加入 FITC 标记(1:50)及 Cy3 标记(1:100)的二抗,在避光情况下室温孵育,封片后在激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.5 Western blot 检测缺血脑组织中 IL-1 β 、IL-6 及 $A_{2A}R$ 的表达

再灌注 24 h 后,取大鼠缺血侧脑组织,全蛋白提取试剂盒提取脑组织蛋白,利用 BCA 蛋白定量法测定各组大鼠脑组织蛋白浓度,配制 SDS-PAGE 凝胶,电泳后将蛋白电转至 PDVF 膜,脱脂奶粉封闭非特异性抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育抗 IL-1 β (1:150)、抗 IL-6 (1:100)、抗 $A_{2A}R$ (1:200)、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:1 000),复温 1 h 孵育二抗 2 h,使用凝胶成像系统扫描拍照,并测定各显色条带的灰度值。用 Quantity One 图像进行条带分析,以目的条带灰度值与 GAPDH 比值为目的蛋白的相对含量。

1.6 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较行单因素方差分析(one-way ANOVA),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 免疫荧光检测 I/R 后脑组织中活化的小胶质细胞

激光共聚焦结果显示,S 组脑组织中仅有少量活化的小胶质细胞,缺血再灌注 24 h 后,Min 组缺血侧皮质 CD11b 阳性的细胞数即活化的小胶质细胞明显低于 I/R 组,见图 1。

2.2 米诺环素对大鼠 I/R 后脑组织 $A_{2A}R$ 蛋白表达的影响

免疫荧光双标结果显示(图 2),在缺血灶周围大量 $A_{2A}R$ 阳性细胞(绿色荧光),同时表达小胶质细胞标记物 CD11b(红色荧光)。Western blot 检测结果(图 3)显示,I/R 组缺血灶周围 $A_{2A}R$ 蛋白表达(1.13 ± 0.09)与 S 组(0.13 ± 0.03)间差异有统计学意义($P < 0.05$)。Min 组 $A_{2A}R$ 蛋白表达(0.42 ± 0.06)低于 I/R 组($P < 0.05$),见图 2。

2.3 米诺环素对大鼠脑 I/R 损伤导致的炎症反应的影响

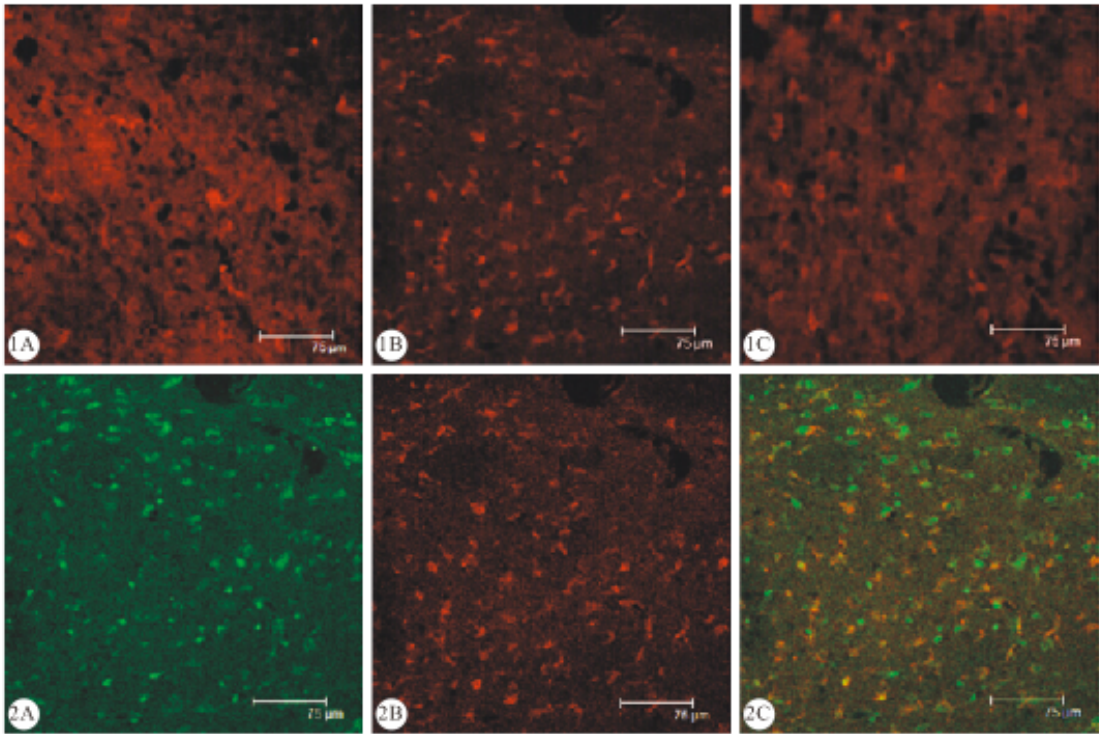


图 1 免疫荧光检测 I/R 后脑组织内活化的小胶质细胞

图 2 免疫荧光 I/R 后检测缺血脑组织内 A_{2A}R (绿色) 及 CD11b (红色) 蛋白的表达

Fig 1 Activated microglia in brain tissues of rats 24 h after I/R under immunofluorescence scope

Fig 2 Expressions of A_{2A}R (green) and CD11b (red) in I/R brain tissues detected by double immunofluorescence

1A: Sham group; 1B: Model group; 1C: Minocycline group; 2A: A_{2A}R; 2B: CD11b; 2C: Merged

Western blot 结果显示,S 组大鼠缺血灶周围皮质仅有少量炎症因子 IL-1 β (0.16 $\pm$ 0.03)、IL-6(0.19 $\pm$ 0.02)蛋白表达。同 S 组相比,I/R 组 IL-1 β (0.77 $\pm$ 0.06)、IL-6(0.67 $\pm$ 0.06)蛋白表达增高(P 均 $<$ 0.05),给予米诺环素干预后,Min 组 IL-1 β (0.36 $\pm$ 0.05)、IL-6(0.42 $\pm$ 0.04)蛋白表达下降(P 均 $<$ 0.05),见图 3。

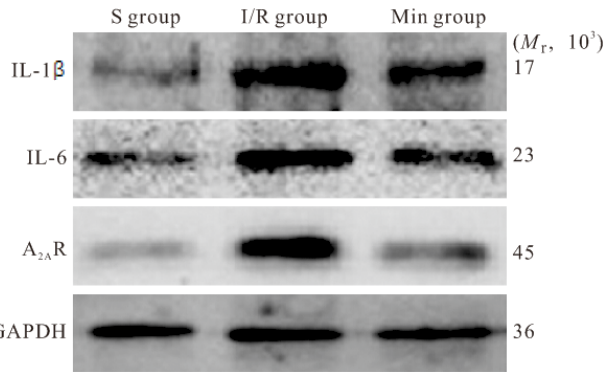


图 3 Western blot 检测 I/R 后脑组织炎症因子及 A_{2A}R 蛋白的表达

Fig 3 Expressions of A_{2A}R and inflammatory factors in I/R brain tissues detected by Western blot

3 讨论

缺血性卒中导致局部脑组织发生不可逆性死

亡,同时启动以局部固有免疫细胞的激活和外源性白细胞的浸润为特征的组织非特异性炎症,其中小胶质细胞是中枢神经系统最主要的免疫细胞。缺血性脑损伤后,活化的小胶质细胞在调节炎症反应中起到关键作用^[7]。在脑 I/R 初期,氧化应激、兴奋性毒性等多种因素激活小胶质细胞,分泌大量神经炎症因子,活性氧,一氧化氮及谷氨酸,进一步促进炎症级联反应,从而导致神经元的凋亡^[8]。米诺环素是一种在临床上广泛应用的抗菌药物,近期研究表明米诺环素具有神经保护作用而得到广泛关注。体外研究表明,米诺环素可抑制脂多糖介导的小胶质细胞激活,降低炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等的表达。脑缺血后,大鼠梗死灶内小胶质细胞的激活/增殖在数分钟后出现,并持续数周^[9]。腹腔注射米诺环素可抑制缺血灶周围小胶质细胞的激活,从而减轻脑组织的损伤^[10]。本研究发现,局灶性脑 I/R 后,缺血侧脑组织内 CD11b 阳性的小胶质细胞数目增加,米诺环素可抑制小胶质细胞的激活,降低缺血灶周围 IL-1 β 及 IL-6 的分泌,同前期研究一致^[11]。

腺苷是中枢神经系统重要的神经调质之一,成年小鼠中枢神经系统的 A_{2A}R mRNA 及蛋白在海马、大脑皮质及中脑神经元中低表达,在纹状体苍白

球 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元内高表达。腺苷通过与 G 蛋白偶联腺苷 A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} 和 A_3 受体结合发挥广泛的病理生理功能。激活中枢神经系统的 $A_{2A}R$ 能促进乙酰胆碱、谷氨酸、天冬氨酸和多巴胺等多种神经递质的释放。成年小鼠 $A_{2A}R$ 的活化可以促进小胶质细胞的增殖活化,进而释放大炎症性递质,产生促炎作用。脑缺血后,抑制胶质细胞中 $A_{2A}R$ 表达的神经保护作用主要是通过抑制谷氨酸兴奋性毒性和神经炎症反应而实现^[12]。在成年 Wistar 大鼠局灶性脑缺血 24 h 后,免疫荧光结果显示 $A_{2A}R$ 仅仅在缺血侧大脑皮质及纹状体的神经元和活化的小胶质细胞中表达,星形胶质细胞中无表达^[13]。给予选择性 $A_{2A}R$ 拮抗剂(SCH58261)处理后能够阻止脂多糖诱导的小胶质细胞激活,降低炎症因子的释放而发挥脑保护作用^[1]。 $A_{2A}R$ 拮抗剂或 $A_{2A}R$ 基因敲除能减轻缺血性脑损伤,与调节兴奋性氨基酸的释放、小胶质细胞的活化等密切相关。本实验发现,大鼠脑 I/R 损伤后缺血侧皮质 CD11b 阳性的小胶质细胞中 $A_{2A}R$ 表达增加,同 REBOLA 等^[1]研究结果一致。缺血再灌注 24 h 后,米诺环素组 $A_{2A}R$ 的表达明显低于模型组。表明米诺环素对大鼠缺血性脑损伤的神经保护作用可能与下调小胶质细胞内 $A_{2A}R$ 的表达有关。

综上所述,米诺环素可抑制大鼠局灶性脑 I/R 损伤后缺血灶周围小胶质细胞的激活,从而减少炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放。其机制可能与下调小胶质细胞内 $A_{2A}R$ 蛋白的表达有关,为寻求米诺环素治疗缺血性脑血管病提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

- [1] REBOLA N, SIMÕES AP, CANAS PM, *et al.* Adenosine A_{2A} receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J Neurochem*, 2011, 117(1):100-111.
- [2] PLANE JM, SHEN Y, PLEASURE DE, *et al.* Prospects for minocycline neuroprotection. *Arch Neurol*, 2010, 67(12): 1442-1444.
- [3] SHIGEMOTO-MOGAMI Y, HOSHIKAWA K, GOLDMAN JE, *et al.* Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci*, 2014, 34(6): 2231-2243.
- [4] LARTEY FM, AHN GO, ALI R, *et al.* The relationship between serial [(18)F]PBR06 PET imaging of microglial activation and motor function following stroke in mice. *Mol Imaging Biol*, 2014, 16(6): 821-829.
- [5] 陶 涛, 秦新月, 徐广会. 养血清脑颗粒对缺血/再灌注大鼠脑炎症因子表达和轴突再生的影响. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(6): 592-594.
- [6] 陶 涛, 秦文熠, 李作孝. 米诺环素对局灶性脑缺血大鼠脑可塑性的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(4): 524-527.
- [7] ZHOU R, YANG Z, TANG X, *et al.* Propofol protects against focal cerebral ischemia via inhibition of microglia-mediated proinflammatory cytokines in a rat model of experimental stroke. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82729 [2016-04-21]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082729>.
- [8] LENZ KM, NUGENT BM, HALIYUR R, *et al.* Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci*, 2013, 33(7): 2761-2772.
- [9] JIN R, YANG G, LI G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(5): 779-787.
- [10] FRANCO EC, CARDOSO MM, GOUVÊIA A, *et al.* Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. *Neurosci Res*, 2012, 73(2): 122-132.
- [11] CAI ZY, YAN Y, CHEN R. Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroinflammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model. *Neurosci Bull*, 2010, 26(1): 28-36.
- [12] 范海玲, 陈 翔. 腺苷及 A_{2A} 腺苷受体与缺氧缺血性脑病. *医学研究杂志*, 2011, 40(2): 128-130.
- [13] TRINCAVELLI ML, MELANI A, GUIDI S, *et al.* Regulation of A_{2A} adenosine receptor expression and functioning following permanent focal ischemia in rat brain. *J Neurochem*, 2008, 104(2): 479-490.

(2016-09-15 收稿, 2016-12-04 修回)

编辑 沈 进