

[文章编号] 1000-4718(2009)04-0810-03

异丙酚对大鼠脑缺血再灌注海马细胞周期因子变化及神经元凋亡的影响

宋铁山, 王欣, 李旭光

(温州医学院基础医学院解剖教研室, 浙江温州 325035)

[摘要] 目的: 探讨大鼠局灶性脑缺血再灌注后海马神经元细胞周期蛋白 1(cyclin D1)和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)的表达与神经元凋亡的关系及异丙酚的脑保护作用。方法: 采用大脑中动脉内栓线阻断法(middle cerebral artery obstruction, MCAO)造成局灶性脑缺血再灌注模型。用免疫印迹法(Western blotting)观察 cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达; 采用流式细胞仪检测海马神经元凋亡。再灌注 48 h 时进行大鼠神经功能缺陷比较。结果: (1) 异丙酚可以改善大鼠脑缺血再灌注后的神经功能缺陷($P < 0.01$); (2) 与假手术组比较, 脑缺血再灌注 48 h 后缺血侧海马神经元 cyclin D1、CDK4 表达明显升高、凋亡细胞数明显增多($P < 0.01$)。与缺血再灌注组比较, 异丙酚组海马神经元 cyclin D1、CDK4 的表达和凋亡率明显降低($P < 0.05$)。结论: 脑缺血再灌注后缺血侧海马 cyclin D1、CDK4 表达增强, 这可能是介导脑缺血再灌注后神经元凋亡的机制之一; 异丙酚可下调神经元 cyclin D1、CDK4 的表达, 抑制神经元凋亡, 减轻缺血再灌注对大鼠海马神经元的损伤。

[关键词] 脑缺血; 再灌注; 细胞周期蛋白 D1; 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4; 细胞凋亡; 异丙酚

[KEY WORDS] Brain ischemia; Reperfusion; Cyclin D1; Cyclin-dependent kinase 4; Apoptosis; Propofol

[中图分类号] R338.2 **[文献标识码]** A

异丙酚是临床上脑损伤外科手术麻醉的常用药物。研究证实, 麻醉剂量异丙酚对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用^[1], 还有实验发现, 异丙酚具有抑制神经细胞凋亡的作用^[2]。但其细胞凋亡发生的机制还不清楚。细胞周期素(cyclins)和细胞周期素依赖激酶(CDKs)是细胞周期调控的关键成分。目前认为 cyclins 及 CDKs 的功能不仅限于细胞周期的调控, 而且参与了细胞的凋亡过程。Cyclins 及 CDKs 与神经元凋亡之间关系的研究已引起人们的关注。为此, 本研究旨在观察大鼠脑缺血再灌注后海马区 cyclin D1 及 CDK4 的表达及其对神经元凋亡的影响, 探讨异丙酚的脑保护作用机制。

材 料 和 方 法

1 动物与分组

健康成年雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体重 250-300 g(温州医学院动物实验中心提供), 随机分为 3 组: 假手术组(10 只, sham 组)、缺血再灌注组(20 只, IR 组)、异丙酚组(20 只, propofol 组)。

2 动物模型的制备

大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型参考 Longa 等^[3]方法并加以改良, 阻断血流 2 h 后, 拔线实现再灌注。脑缺血再灌注成功的标志为动物苏醒后出现同侧的 Horner 征和对侧以前肢为重的偏瘫。手术过程中观察呼吸节律, 保持大鼠肛温为(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。异丙酚组于缺血前 10 min 腹腔注射异丙酚

100 mg/kg(购于英国阿斯利康公司)。缺血再灌注组于缺血前腹腔注射等量生理盐水。假手术组除不插线外, 其余步骤同缺血再灌注组。

3 神经功能缺陷评分

参照 Longa 等^[3]的评分方法进行行为学评分。标准为 0 分: 无神经功能障碍; 1 分: 不能完全伸展右前肢; 2 分: 行走时向右侧转圈; 3 分: 行走向右侧跌倒; 4 分: 完全不能行走。累计 1 分以上即为模型成功。

4 Western blotting 检测

各组大鼠于术后 48 h 活体断头取脑, 在冰面上快速分离出缺血侧海马(CA1 区), 约 30 mg, 然后进行蛋白提取和浓度测定。其过程大致如下: 0.2% TTBS 洗 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 1:200 兔多克隆 cyclin D1、CDK4 I 抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 0.2% TTBS 洗膜, DAB 显色。应用凝胶成像系统(美国, UVP DigiDOC-It)成像并进行分析。设立阴性对照组。结果以 cyclin D1、CDK4 蛋白的吸光度值与同一样本 β -actin 蛋白的 A 值的比值表示。

5 流式细胞仪计数细胞凋亡

将取出的海马 CA1 区组织剪碎, 用 0.25% 胰蛋白酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中消化, 以等量生理盐水终止消化, 经 200 目筛网过滤、离心。将被染色分析的细胞用冷 PBS 洗染 2 次并在恰当的染色缓冲液中以 1×10^9 cells/L 的浓度重悬。在室温下吸取 100 μL 的细胞至试管中, 加入适量荧光标记的 Annexin V 试剂和 PI 混匀后避光室温下孵育 15 min, 然后加入 400 μL

[收稿日期] 2008-02-25

[修回日期] 2008-08-11

Tel: 0577-86689965; E-mail: songtieshan@sina.com.cn

染色缓冲液,立即上流式细胞仪分析(Coulter,型号为 FAC-SAria)。

6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS11.0 统计软件处理。各组间差异比较采用单因素方差分析。

结 果

1 异丙酚对缺血 2 h 再灌注 48 h 后神经功能的影响

异丙酚组及缺血再灌注组动物均有不同程度的神经功能缺损,且异丙酚组动物的神经功能较缺血再灌注组有明显改善($P < 0.01$);假手术组未见神经功能缺损,见表 1。

表 1 各组神经功能缺陷评分比较

Tab 1 The comparison of neurological deficit scores in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Neurological deficit scores
Sham	0.14 ± 0.02
IR	2.53 ± 0.41**
Propofol treatment	1.42 ± 0.32 [△]

** $P < 0.01$ vs sham group; [△] $P < 0.05$ vs IR group.

2 Western blotting 检测结果

各实验组均可见 cyclin D1、CDK4 的表达,缺血再灌注组较假手术组蛋白表达明显增加($P < 0.01$),而异丙酚组较缺血再灌注组蛋白表达明显减少,见图 1、2。

3 流式细胞仪检测结果

与假手术组比较,缺血再灌注组细胞凋亡率明显升高($P <$

0.01),异丙酚组细胞凋亡率较缺血再灌注组明显降低,见图 3、4。

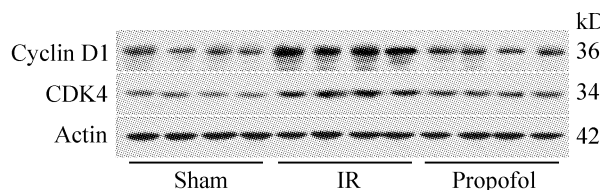


Fig 1 The expressions of cyclin D1 and CDK4 were analyzed by Western blotting 48 h after MCAO.

图 1 Western blotting 检测大鼠 MCAO 后 48 h 海马 cyclin D1、CDK4 蛋白表达

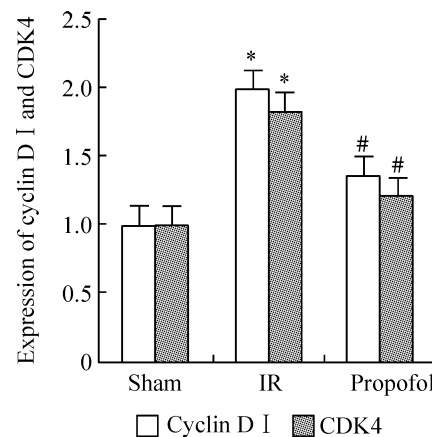


Fig 2 The comparison of A value of cyclin D1, CDK4 in hippocampus of each group. $\bar{x} \pm s, n = 10 - 20$. * $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs IR group.

图 2 各组海马 cyclin D1、CDK4 表达 A 值的比较

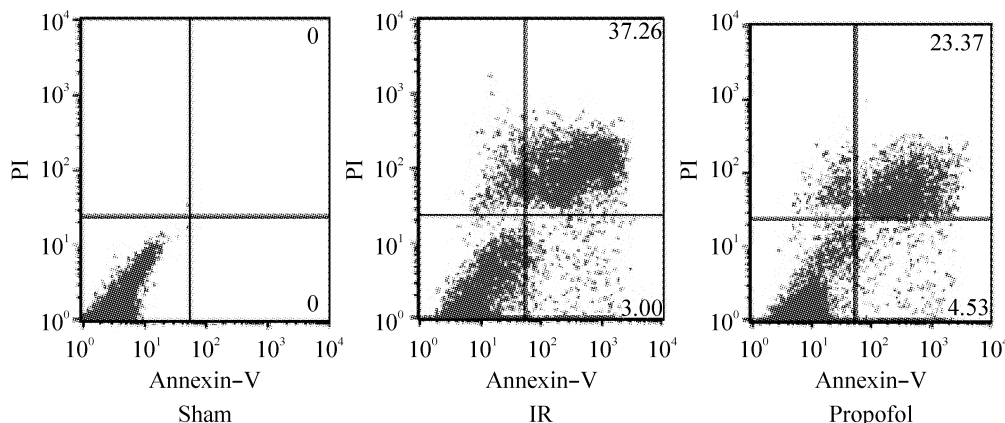


Fig 3 Apoptosis of CA1 in hippocampus was analyzed by flow cytometry 48 h after MCAO.

图 3 流式细胞仪检测大鼠 MCAO 后 48 h 海马 CA1 区神经元凋亡

讨 论

缺血性脑损伤所致神经细胞死亡不仅是坏死,也存在另一种形式即细胞凋亡^[4]。神经细胞坏死发生在缺血中心区,在缺血后立即发生;细胞凋亡则发生较迟,主要发生在缺血中心周围,随着缺血再灌注时间的延长,神经细胞凋亡数逐渐增加,至 24 - 48 h 达高峰,且持续数周之久^[5]。目前,脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的发生机制尚未完全清楚,人们认为它可能由两种不同的机制调控,一种是细胞周期蛋

白,另一种是经典的 caspase 通路^[6]。为此,本实验探讨异丙酚对细胞周期蛋白表达的影响及与细胞凋亡的关系,阐明异丙酚的脑保护作用机制。

Cyclin D1 是细胞周期调节因子,通过激活相应的 CDKs 而在细胞周期中起到至关重要的作用。Cyclin D1 通过激活 CDK4 和 CDK6 并与之结合成复合体,使细胞从 G 期进入 S 期,cyclin D1 是决定细胞周期能否开始的启动因子^[7]。大鼠脑缺血后 cyclin D1 的异常表达可能诱发了缺血神经细胞的凋亡^[8]。实验证实脑缺血后 cyclin D1、CDK4 表达升高,其高

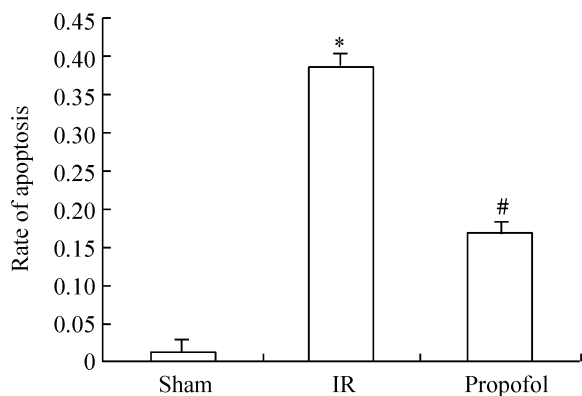


Fig 4 The comparison of the rate of apoptosis in hippocampus of each group. $\bar{x} \pm s$. $n = 10$. * $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs IR group.

图4 各组海马神经元凋亡率的比较

峰出现在 48 h^[9]。因此,本实验选择了脑缺血再灌注后 48 h 观察各个指标的改变。Trimsit 等^[10]认为,脑缺血后缺血灶周围区神经元内 cyclin D1 和 CDK4 的表达是评估缺血神经元是否进入病理状态细胞周期的关键指标。本实验脑缺血时间较长(48 h),缺血灶神经元损伤严重。脑缺血再灌注损伤后,大鼠海马 CA1 区 cyclin D1、CDK4 的表达增强,以 cyclin D1 表达增高更为明显,神经元凋亡率明显增高,从而提示 cyclin D1、CDK4 异常表达可能是引起神经元凋亡的主要因素,其中 cyclin D1 的异常增高与神经元凋亡的关系更为密切。

异丙酚作为一种应用多年的兼具镇静和麻醉作用的药物被报道具有脑保护作用,其机制包括直接清除自由基、抑制脂质过氧化作用、调节钙离子平衡、抑制神经细胞凋亡等。但关于异丙酚抑制细胞凋亡的研究报道不一,机制不完全清楚,这也是本研究选择此药物研究的依据。本研究表明,异丙酚给药后显著改善脑缺血再灌注后神经功能缺陷,提示异丙酚对脑缺血损伤有保护作用。本研究还发现异丙酚能下调脑缺血再灌注后 cyclin D1、CDK4 的表达,并且使神经元凋亡率明显降低,此研究结果与郭建荣等^[11]报道的基本一致,提示异丙酚有抑制神经元凋亡的作用,并且其抑制作用可能与其下调 cyclin D1、CDK4 表达有关,其机制可能为通过抑制 cyclin D1 mRNA 转录,下调 cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达,降低神经元凋亡率。其确切的分子机制有待进一步研究。

临床上心肺复苏、严重脑外伤等都存在脑缺血再灌注损伤,及时采用有效措施(如适当给予异丙酚处理),对病人脑神经功能的恢复有着重要临床意义。

[参 考 文 献]

[1] 蔡英敏,王美钠,薛荣亮. 麻醉剂量异丙酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志,2001, 21(3):160-162.

[2] 刘鹏斌,蔡英敏,宋金鑫. 异丙酚对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007,28(8):682-684.

[3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke,1989,20(1):84-91.

[4] Eastman A. Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death[J]. Toxicol Appl Pharmacol,1993, 121(1):160-164.

[5] 王越晖,孟召祥,汪林,等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后 NF- κ B 蛋白、caspase-3 mRNA 表达及细胞凋亡的研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2004,21(3):208-210.

[6] Lossi L, Gambino G, Mioletti S, et al. *In vivo* analysis reveals different apoptosis pathways in pre- and postmigratory cerebellar granule cells of rabbit [J]. J Neurobiol, 2004,60(4):437-452.

[7] Kaya SS, Mahmood A, Li Y, et al. Expression of cell proteins (cyclin D1 and CDK4) after controlled cortical impact in rat brain[J]. J Neurotrauma,1999,16(12):1187-1196.

[8] 张家堂,郎森阳,匡培根,等. 丹参对大鼠局灶性脑缺血后神经元内细胞周期蛋白 D1 表达的影响[J]. 中华老年心血管病杂志,2001,8(4):272-274.

[9] Li Y, Chopp M, Powers C, et al. Immunoreactivity of cyclin D1, CDK4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997,17(23):846-856.

[10] Trimsit S, Rivera S, Ouaghi P, et al. Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischemia and epilepsy: a modulator of *in vivo* programmed cell death [J]. Eur J Neurosci,1999,11(3):263-269.

[11] 郭建荣,岳云,崔健君,等. 异丙酚对缺血再灌注损伤大鼠海马氨基酸递质水平变化及神经元凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(8):1547-1550.