文章编号:1000-5404(2007)01-0081-03

论著

右-苯丙胺对脑缺血大鼠细胞凋亡和生长相关蛋白43的作用

李红梅,肖 农,张晓萍 (重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

提 要:目的 采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,观察右-苯丙胺对脑缺血损伤的保护作用。**方法** 应用Koizumi线栓法建立单侧局灶性脑缺血再灌注模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。术后1、3、6周应用原位末端标记法观察细胞凋亡并计数阳性细胞,免疫组织化学方法及RT-PCR检测缺血周围区生长相关蛋白(GAP-43)表达的变化。**结果** 右-苯丙胺治疗组较自然恢复组细胞凋亡明显减少;免疫组化光密度定量测定及RT-PCR显示GAP-43的表达水平在第1周末明显增高,且治疗组高于自然恢复组。**结论** 右-苯丙胺能减少脑梗死边缘区细胞凋亡的发生,促进GAP-43的表达。

关键词:脑缺血;生长相关蛋白43;右-苯丙胺;凋亡
中图法分类号:R741.02; R743.31; R971 **文献标识码**:A

Effect of D-amphetamine on apoptosis and GAP-43 expression of rat brain cells after focal cerebral ischemia

LI Hong-mei, XIAO Nong, ZHANG Xiao-ping (Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To observe the protection of D-amphetamine on rat brain after focal cerebral ischemia. Methods The unilateral middle cerebral artery occlusion (MCAO) models were established by using Koizumi's method. TUNEL was applied to detect quantitatively brain cell apoptosis at 1st, 3rd and 6th week after operation. Immunohistochemical staining and RT-PCR were respectively used to detect the expression of growth-associated protein 43 (GAP-43) and GAP-43 mRNA around ischemic area. Results Apoptosis of brain cells reduced evidently in the group treated with D-amphetamine. GAP-43 protein detection demonstrated statistically significant increase in immunoreaction product as determined by optical density measurements in D-amphetamine treated group compared with the group without any agent treatment. The same results appeared in RT-PCR product. Conclusion D-amphetamine can reduce brain cell apoptosis and promote GAP-43 expression.

Key words: brain ischemia; growth-associated protein 43; D-amphetamine; apoptosis

脑缺血后神经功能的恢复与脑的可塑性有关。脑的可塑性即脑神经在结构和功能上的自身修复能力。是脑梗死临床治疗的重要基础[1]。自20世纪80年代以来,一些动物实验表明,右-苯丙胺可能在脑卒中后运动功能的康复方面有一定的作用[2]。本研究通过对细胞凋亡以及生长相关蛋白43(growth-associated protein 43, GAP-43)在蛋白及基因水平表达的检测,探讨右-苯丙胺对脑缺血损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

60只清洁级雄性SD大鼠,8~10周龄,体质量220~250 g,重庆医科大学实验动物中心提供。分为3组:①假手术组(6只);②自然恢复组(27只);③右-苯丙胺治疗组(27只)。各组均分为3个时间点,即:术后1周,术后3周,术后6周。各时间点取假手术组2只,手术组(自然恢复组和右-苯丙胺治疗组)各9只,其中用于免疫组化检测5只,RT-PCR检测4只。

1.2 方法

1.2.1 MCAO模型的制备 参考Koizumi等[3]的方法进行。手术组缺血2 h后取出栓线实现再灌注。假手术组不插入栓线,其余步骤和手术组相同。术后右-苯丙胺治疗组每3天给予1次2 mg/kg右-苯丙胺腹腔注射[4],其余2组注射同体积的生理盐水。

1.2.2 取材与切片 各时间点麻醉动物,40%多聚甲醛灌注固定后取脑,收集前囟前1 mm至前囟后1 mm脑标本,经脱水、透明、浸蜡、包埋后,连续冠状切片(片厚约5 μm)。

1.2.3 TUNEL法染色 按电镜取材方法取材,常规固定、脱水、石蜡包埋,用涂有多聚赖氨酸的载玻片捞片,使用TUNEL试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche公司)进行

作者简介:李红梅(1975-),女,重庆市长寿区人,硕士研究生,医师,主要从事神经康复方面的研究。电话:(023)63607531
通讯作者:肖 农,电话:(023)63622984
收稿日期:2006-01-20;修回日期:2006-06-30

染色，石蜡切片脱蜡至水，PBS 充分漂洗，蛋白酶 K 37 ℃消化 30 min，PBS 充分漂洗，在冰上用含 TritonX-100 的枸橼酸钠溶液透化处理2 min，PBS 充分漂洗，3% H_2O_2 室温下孵育 20 min，PBS 充分漂洗，加 20 μl TUNEL 混合液 37 ℃ 60 min，PBS 充分漂洗后在荧光显微镜下观察凋亡细胞的染色情况，并计算阳性细胞的数目。

1.2.4 免疫组化检测 GAP-43（S-P 法） GAP-43 为 Sigma 公司产品，S-P 试剂盒和 DAB 试剂盒均购于北京中山试剂公司。按照产品说明书操作。切片脱蜡至水，3% H_2O_2 室温下孵育 10 min，PBS 充分漂洗，枸橼酸缓冲液微波修复，保持 95 ℃～98 ℃ 15 min，自然冷却至室温后 PBS 充分漂洗，加入正常山羊封闭血清，室内温孵育 10 min，甩干后加入 GAP-43（1∶150），37 ℃孵育 2 h，PBS 充分漂洗后加入生物素标记的二抗工作液，37 ℃孵育 30 min，PBS 充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液，37 ℃孵育 30 min，PBS 漂洗后 DAB 室温下显色约 8 min，自来水冲洗以中止反应。脱水、透明，封片。

1.2.5 RT-PCR 引物由上海生工生物工程公司设计与合成，基因：GAP-43，基因长度：406 bp。引物序列：上游：5′-AGGGAGATGGCTCTGCTACT-3′，下游：5′-TCTTTACCCTCATC-CTGTCG-3′。

取缺血周围脑组织 100 mg，放入匀浆器，加入 1 ml Trizol，按照 Trizol 试剂说明书进行操作，提取总 RNA，并对 RNA 进行定量，要求 $D(260)/D(280)$ 达 1.95 以上。将各标本提取的总 RNA 分别加入 DEPC 水稀释为 0.6 μg/μl，将 RNA 5 μl、DEPC 水 4 μl 及 Oligot 1 μl 混匀 70 ℃孵育 10 min 后加入以下逆转录体系中：DEPC 水 2.5 μl、5 × Buffer 4 μl、4 × dNTP 2 μl Rnasin 0.5 μl、M-MLV 1 μl 总体积 10 μl，37 ℃孵育 1 h。将逆转录产物 4 μl 加入以下反应体系：DEPC 水 15 μl、10 × Buffer 2.5 μl、4 × dNTP 0.5 μl、上游引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl、*Taq* 酶 1.5 μl 放入 PCR 仪进行扩增。然后取 PCR 产物 10 μl 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭染色，最后在紫外透射反射仪上观察结果及拍照。

1.3 图像分析和统计学处理

根据凋亡细胞的分布情况，选取 5 个视野计数 TUNEL 阳性细胞数。应用积分光密度值反映 GAP-43 免疫反应产物的面积及强度。每张切片在梗死周围区选取 6 个 400 倍视野拍照，应用 GD-8 型病理影像分析系统测定每视野各阳性区光密度值，并求出各阳性区光密度的积分和（$\sum\int OD$），得到积分光密度值。每例标本的被检各区测 3 张切片，取其均值。所得结果用 SPSS 12.0 软件进行方差分析，*t* 检验及秩和检验。

2 结果

2.1 TUNEL 法染色结果

假手术组偶见少数阳性细胞，MCAO1 周末梗死边缘区阳性细胞数目增多，随时间的推移逐渐下降。治疗组 TUNEL 阳性细胞表达水平在各时间点均低于自然恢复组，两者之间差异有显著性（$P<0.05$，表 1）。

表 1 各实验组不同时点脑梗死周围区域 TUNEL 阳性细胞数（个／400 倍视野）（$n=5$）

组别	术后时间		
	1 周	3 周	6 周
假手术组	2.9 ± 2.1	2.7 ± 2.5	2.6 ± 2.5
自然恢复组	76.9 ± 9.1[a]	62.3 ± 7.9[a]	33.5 ± 6.6[a]
治疗组	64.5 ± 8.4[ab]	40.9 ± 6.2[ab]	17.6 ± 5.6[ab]

a：$P<0.05$，与假手术组比较；b：$P<0.05$，与自然恢复组比较

2.2 GAP-43 免疫组化染色结果

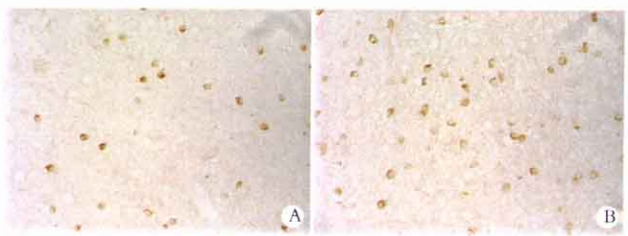
GAP-43 免疫反应产物主要存在于神经毡位置，表现为小点状或细颗粒状沉积环状保绕神经元。皮层、海马及第三脑室周围灰质着色较多。免疫反应越强，免疫产物表达越多，染色越深。

假手术组：大鼠大脑皮层神经毡位置有少量着色，免疫产物在两半球对称分布，$\sum\int OD$ 值在不同的时间点之间比较无显著性差异（$P>0.05$）。自然恢复组：在梗死中心区未见 GAP-43 表达，梗死周围区 GAP-43 的免疫活性 1 周时达高峰，与假手术组比较差异显著（$P<0.05$），3 周时已明显降低，6 周时表达和假手术组比较已无统计学意义（$P>0.05$）。治疗组：GAP-43 的表达变化趋势同自然恢复组，但表达水平在 1 周末高于自然恢复组，两者之间差异有显著性（$P<0.05$，表 2，图 1、2）。

表 2 各实验组脑梗塞周围区域 GAP-43 $\sum\int OD$ 值（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

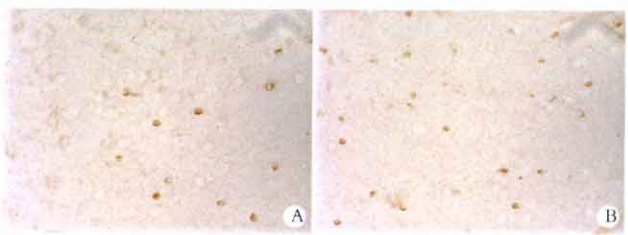
组别	术后时间		
	1 周	3 周	6 周
假手术组	3 249 ± 1 279	3 485 ± 1 062	3 267 ± 1 011
自然恢复组	8 827 ± 1 664[a]	4 875 ± 1 253[a]	3 329 ± 1 142
治疗组	12 514 ± 1 421[ab]	4 997 ± 1 223[a]	3 385 ± 1 205

a：$P<0.05$，与假手术组比较；b：$P<0.05$，与自然恢复组比较



A：自然恢复组；B：治疗组

图 1 缺血 1 周 GAP-43 的表达（S-P × 400）



A：自然恢复组；B：治疗组

图 2 缺血 6 周 GAP-43 的表达（S-P × 400）

2.3　GAP-43 mRNA 表达水平的变化

术后 1 周末自然恢复组及治疗组的 GAP-43 mRNA 表达均明显高于假手术组，差别显著（$P<0.05$），且第 1 周治疗组与自然恢复组比较有显著性差异（$P<0.05$）；3 周末 GAP-43 mRNA 表达有所下降；6 周末已接近假手术组，3 组组间比较差异不显著（$P>0.05$）（表 3）。

表 3　各实验组不同时间点脑梗死周围区域 GAP-43 mRNA 表达（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后时间		
	1 周	3 周	6 周
假手术组	0.280 ±0.107	0.267 ±0.084	0.278 ±0.104
自然恢复组	0.625 ±0.860[a]	0.405 ±0.284[a]	0.283 ±0.295
治疗组	0.798 ±0.109[ab]	0.438 ±0.165[a]	0.260 ±0.233

a：$P<0.05$，与假手术组比较；b：$P<0.05$，与自然恢复组比较

3　讨论

研究表明脑缺血再灌注后的病理形态改变是形成缺血核心区和缺血半暗带。核心区的细胞已发生死亡，是不可逆过程。半暗带能量代谢保存而血供受抑制，细胞未坏死，但功能受损，凋亡是半暗带内细胞死亡的一种主要方式，故呈可逆过程。半暗带的存在使我们应用脑保护药物减轻脑损伤和减少脑梗死面积成为可能。因此，使半暗带的细胞减少凋亡是减少脑梗死面积和应用脑保护药物的目标之一。右-苯丙胺是苯丙胺的同分异构体，它是一种单胺激动剂。本研究表明右-苯丙胺可阻止脑缺血再灌注后梗死范围的扩大，从而减轻神经系统损伤，在脑卒中后运动功能的康复方面发挥一定的作用。

脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生机制可能与以下因素有关：①缺血缺氧本身激活了凋亡发生基因。②脑缺血再灌注后产生大量氧自由基对神经元造成严重损伤的同时，也诱导了凋亡的发生。③钙超载激活一系列钙依赖性酶促反应，促进了凋亡的发生。④线粒体损伤导致细胞能量代谢障碍，在凋亡发生过程中起重要作用[5]。目前认为缺血后神经元的凋亡是一个发生早且动态持续的过程，缺血再灌注后神经元的迟发性死亡大多是凋亡形式。细胞凋亡是半暗带内细胞死亡的一种主要方式，与梗死灶的发展扩大有关[6]。本实验用 TUNEL 染色发现假手术组偶见少数阳性细胞，缺血再灌注 1 周后梗死边缘区阳性细胞数目增多，随时间推移逐渐下降。治疗组 TUNEL 阳性细胞表达水平在各时间点均低于自然恢复组，两者之间差异显著。右-苯丙胺能明显减少细胞凋亡，缩小半暗带，减轻脑缺血损伤，促进神经康复。

GAP-43 是一种特异性地与神经细胞生长、发育、再生相关的快速转运磷酸蛋白，其表达产物主要位于轴突生长锥质膜面。成年时，大脑皮层 GAP-43 表达水平较低。损伤时，GAP-43 的表达显著增强，因此 GAP-43 高表达被认为是神经再生的典型特征[7]。新近的研究表明 GAP-43 与神经系统的发育、突触形成和可塑性以及神经再生有密切关系，它在引导轴突生长和凋节轴突形成新的联系上起关键作用，被认为是神经元生长发育和可塑性的分子标记物[8]。国际上将 GAP-43 列为研究神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针。本研究表明局灶性脑缺血鼠缺血灶周围的神经组织出现 GAP-43 免疫反应阳性物增多，缺血灶内神经元的 GAP-43 mRNA 增多，在缺血再灌注 1 周时表达达到高峰，以后逐渐下降。用药组 GAP-43 表达时空变化与自然恢复组相同，但表达强度明显强于自然恢复组。

右-苯丙胺能减轻局灶性脑缺血损伤，促进神经康复可能与其减少神经细胞凋亡，缩小半暗带，促进 GAP-43 在 mRNA 和蛋白水平的高表达以重组半暗带的网络结构有关。

参考文献：

[1] Kwakkel G, Kollen B, Lindeman E. Understanding the pattern of functional recovery after stroke: facts and theories [J]. Restor Neurol Neurosci, 2004, 22(3-5): 281-299.

[2] 赵晓科，肖　农，周江堡. 右苯丙胺在神经可塑性研究中的进展[J]. 国外医学：神经病学神经外科学分册，2004，31(1)：102-104.

[3] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazava T, *et al*. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jan J Stroke, 1986, 8: 1-8.

[4] Stroemer R P, Kent T A, Hulsebosch C E, *et al*. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats [J]. Stroke, 1998, 29(11): 2381-2395.

[5] 兰希发，姚文秀，郭　阳. 脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的机制[J]. 中国临床康复，2003，7(3)：2726-2727.

[6] Xu X H, Zhang S M, Yan W M, *et al*. Development of cerebral infarction, apoptotic cell death and expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein following focal cerebral ischemia in rats [J]. Life Sci, 2006, 78(7): 704-712.

[7] Carulli D, Buffo A, Strata P. Reparative mechanisms in the cerebellar cortex [J]. Prog Neurobiol, 2004, 72(6): 373-398.

[8] Li Y, Chen J, Zhang C L, *et al*. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells[J]. Glia, 2005, 49(3): 407-417.

（编辑　王　红）