文章编号:1000-5404(2010)17-1847-04

论著

米诺环素对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用

陈佳琳[1*],姚声涛[2*],陈良勇[3],何朝晖[3],孙晓川[3],唐文渊[3],郭宗铎[3] (563002 贵州 遵义,贵州省遵义医院:儿科[1],神经外科[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[3])

【摘要】 目的 探讨米诺环素对大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑损伤(early brain injury, EBI)的保护作用及其机制。方法 健康 4 月龄雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 250~300 g,按随机数字表法分为假手术组(sham 组)、SAH 组、安慰剂组(vehicle 组)和米诺环素组(minocycline 组),每组各 12 只。采用经视交叉前池注血法建立蛛网膜下腔出血模型。各组于处理后 24 h 经 HE 染色观察海马 CA1 区神经元形态;运用 Western blot 和明胶酶谱方法检测大鼠海马基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)的表达;采用原位末端标记法(TUNEL)检测海马神经元凋亡。结果 HE 染色显示:SAH 组大鼠海马 CA1 正常神经元数量(67.42±20.35)个较 sham 组(145.5±21.23)个明显下降($P<0.01$),米诺环素组正常神经元数量(125.73±24.67)个较 SAH 组明显增加($P<0.01$)。Western blot 检测结果显示:sham 组大鼠海马 MMP-9 蛋白表达水平较低(1.94±0.39)%,SAH 后 24 h MMP-9 表达明显增高[(103.60±7.72)%,与 sham 组相比明显升高,$P<0.01$];米诺环素组 MMP-9 蛋白表达明显降低[(74.52±6.47)%,较 SAH 组明显降低($P<0.01$)]。明胶酶谱检测显示:sham 组大鼠海马未检测到活性[(0.39±0.23)%]、SAH 组 MMP-9 活性(201.81±6.31)%较 Sham 组明显增高($P<0.01$);米诺环素组 MMP-9 活性(148.96±6.02)%较 SAH 组明显降低($P<0.01$)。TUNEL 检测显示:sham 组海马神经元未检测到 TUNEL 阳性细胞,SAH 后 24 h 海马 TUNEL 阳性细胞数明显增加[(192.17±6.31)个],与 sham 组相比差异有统计学意义($P<0.01$);米诺环素组凋亡阳性细胞数(91.17±7.78)个较 SAH 组明显下降($P<0.01$)。结论 大鼠蛛网膜下腔出血后,米诺环素能够改善大鼠海马神经元形态,对早期脑损伤发挥保护作用;其机制可能与米诺环素抑制 MMP-9 活性及其蛋白表达,减轻海马神经元凋亡有关。

【关键词】 米诺环素;基质金属蛋白酶-9;蛛网膜下腔出血;早期脑损伤
【中图法分类号】 R743.35;R742.06;R978.14 **【文献标志码】** A

Effect of minocycline on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats

Chen Jialin[1], Yao Shengtao[2], Chen Liangyong[3], He Zhaohui[3], Sun Xiaochuan[3], Tang Wenyuan[3], Guo Zongduo[3] ([1] Department of Neurosurgery, [2]Department of Pediatrics, Zunyi Hospital, Zunyi, Guizhou Province, 563002; [3]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of minocycline on early brain injury (EBI) after subarachnoid hemorrhage (SAH) and its mechanism. Methods Forty-eight adult male SD rats were randomly divided into sham operation group, SAH group, vehicle group and minocycline group. A SAH model was induced by injecting autologous arterial blood into the prechiasmatic cistern. Morphology of CA1 region in hippocampus of rats was observed with hematoxylin and eosin (HE) staining in each group. Expression of MMP-9 in hippocampus was detected at 24 h by Western blotting and zymography. Neuronal apoptosis in hippocampus was determined by TUNEL. Results HE staining showed that the number of normal neurons in CA1 region of hippocampus was significantly lower in SAH group than in sham operation group (67.42±20.35 *vs* 145.5±21.23, $P<0.01$). The number of normal neurons was significantly greater in minocycline group (125.73±24.67) than in SAH group ($P<0.01$). Western blotting showed that the expression level of total MMP-9 was lower in minocycline group (1.94±0.39) and significantly higher in SAH group (103.60±7.72) at 24 h than in sham operation group ($P<0.01$). The expression level of total MMP-9 was lower in minocycline group (148.96±6.02)

【基金项目】 贵州省科技厅项目(2009GZ37205);重庆医科大学优秀博士学位论文资助基金(0200101174)
* 同等贡献者
【通信作者】 郭宗铎,电话:(023)63263410,E-mail:stonegzd@gmail.com

than in SAH group ($P<0.01$). The zymography showed that the expression level of active MMP-9 could not be measured in sham group, which was significantly higher in SAH group than in sham operation group ($P<0.01$) and lower in minocycline group than in SAH group ($P<0.01$). TUNEL showed no positive neurons in sham operation group, and the number of positive neurons was greater at 24 h in SAH group (192.17±6.31) than in sham operation group ($P<0.01$), which was then gradually decreased to 91.17±7.78 after treatment with minocycline ($P<0.01$). **Conclusion** Minocycline can improve the morphology of neurons in hippocampus and EBI after SAH by inhibiting the expression of total and active MMP-9 and decreasing the neuronal apoptosis in hippocampus.

[Key words] minocycline; matrix metalloproteinase 9; subarachnoid hemorrhage; early brain injury

Supported by the Program of Department of Science and Technology of Guizhou Province (2009GZ37205) and the Foundation of Excellent Doctorial Dissertation of Chongqing Medical University (0200101174). Chen Jialin and Yao Shengtao are the first author who contributed equally to the anticle. Corresponding author: Guo Zongduo, Tel: 86-23-63263410, E-mail: stonegzd@gmail.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑损伤(early brain injury, EBI)是导致SAH患者高死亡率和高病残率的主要原因,细胞凋亡是EBI过程中的重要病理改变[1]。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)也称明胶酶B,能够介导细胞外基质降解和出血转化,我们在前期研究中已经发现MMP-9在SAH后大鼠海马组织中表达升高,并通过介导细胞失巢凋亡途径参与EBI病理过程[2-4]。米诺环素是第2代半合成四环素类药物,具有抗炎症和抗凋亡的作用,且通过血脑屏障的能力较强。最近研究发现米诺环素对中枢神经损伤具有良好的保护作用[5]。本实验拟在前期研究的基础上观察米诺环素对SAH后海马MMP-9表达和海马神经元凋亡的影响,探讨米诺环素在SAH后EBI过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与材料

健康4月龄雄性SD大鼠48只,体质量250~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。大鼠以随机数字表法分为假手术组(sham组)、SAH组、安慰剂组(vehicle组)和米诺环素组(minocycline组)。每组各12只大鼠,分别用于检测MMP-9蛋白表达及TUNEL染色。实验所需MMP-9单克隆抗体购自Lab Vision公司;米诺环素及明胶购于美国Sigma公司;TUNEL检测试剂盒购自Roche公司。

1.2 SAH模型的制作

根据文献[2]采用改良的经视交叉前池注血法建立大鼠SAH模型。sham组动物蛛网膜下腔置管后不注入血液。minocycline组于注血后30 min及12 h后按文献[6]提供方法经腹腔给予米诺环素45 mg/kg,vehicle组于相应时间点腹腔注射等量生理盐水。

1.3 实验方法

1.3.1 海马CA1区形态学观察 各组大鼠于建模后24 h灌注固定后,取脑组织制作石蜡切片,行HE染色观察。

1.3.2 海马组织蛋白的提取和定量 各组大鼠于建模后24 h迅速断头取脑,分离出双侧海马,并按文献[3]方法提取海马组织蛋白,于-80 ℃冰箱保存备用。

1.3.3 MMP-9蛋白表达的检测 根据文献[7]采用Western blot方法检测海马MMP-9总蛋白含量。采用10%聚丙烯酰胺凝胶分离待测样品蛋白,转移缓冲液在200 mA、100 V条件下电泳2 h后转膜,洗膜,封闭液封闭。加入MMP-9单克隆一抗,4 ℃过夜,经磷酸盐缓冲液漂洗后,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h,再次漂洗,加入生色底物二氨基联苯胺。密度扫描分析光密度值。

1.3.4 MMP-9活性检测 根据文献[3]所采用明胶酶谱方法检测MMP-9活性。将提取的海马组织蛋白与上样缓冲液混匀,于含1%明胶蛋白的10%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳槽中电泳。电泳结束后,凝胶以洗脱液振荡洗涤后过夜。再以0.25%考马斯亮蓝G-250染色,脱色液脱色。以凝胶图像处理系统扫描后使用图像分析软件计算每一条带的光密度值[条带面积×(灰度-背景灰度)],表示酶活性相对大小。

1.3.5 TUNEL法检测海马细胞凋亡 各组大鼠于建模后24 h开胸暴露心脏,经左心室置管至升主动脉,剪破右心耳,以等渗盐水快速冲洗,而后以40 g/L多聚甲醛0.1 mol/L PBS(4 ℃, pH 7.4)灌注400 ml。灌毕后断头,开颅取脑,切取视交叉后1~5 mm处脑组织,放入40 g/L多聚甲醛0.1 mol/L PBS溶液,4 ℃冰箱固定24 h。标本常规脱水、浸蜡。所有组织蜡块切取视交叉后2~3 mm处的脑冠状切面,片厚5 μm。切片常规脱蜡至水,按文献[3]方法检测海马凋亡细胞数。

1.4 统计学分析

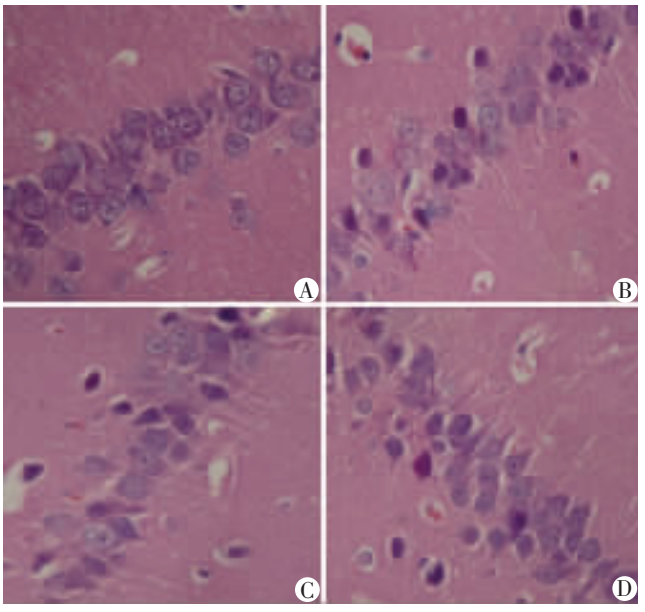
计量资料运用SPSS 13.0统计软件处理,以$\bar{x}\pm s$表示,采用单向方差分析检验分析组间差异。

2 结果

2.1 大鼠海马CA1区形态学观察

sham组大鼠海马CA1区神经元形态正常,正常神经元数量为(145.5±21.23)个。SAH组大鼠CA1区部分神经元出现胞质固缩、深染,核固缩,正常神经元数量为(67.42±20.35)

个，与 sham 组相比明显下降（$P<0.01$）。安慰剂组海马神经元胞质及核固缩明显，正常神经元数量为（75.96 ± 22.43）个，与 SAH 组相比无明显变化（$P>0.05$）。minocycline 组大鼠海马 CA1 区神经元异常形态减轻，固缩、深染的神经元数量显著减少，正常神经元密度为（125.73 ± 24.67）个，与 SAH 组相比明显增加（$P<0.01$）（图 1）。

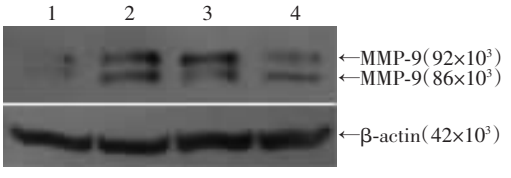


A：sham 组；B：SAH 组；C：vehicle 组；D：minocycline 组

图 1　各组大鼠海马 CA1 区形态学变化　（HE ×400）

2.2　大鼠海马组织 MMP-9 蛋白表达

sham 组大鼠海马组织 MMP-9 蛋白表达水平较低，其平均光密度值为（1.94 ± 0.39）%；SAH 后 24 h，SAH 组大鼠海马组织 MMP-9 表达增高，平均光密度值为（103.60 ± 7.72）%，与 sham 组相比明显升高（$P<0.01$）；安慰剂组海马 MMP-9 蛋白平均光密度值为（102.07 ± 6.08）%，与 SAH 组相比无明显变化（$P>0.05$）。minocycline 组 MMP-9 蛋白表达下降，平均光密度值为（74.52 ± 6.47）%，较 SAH 组明显降低（$P<0.01$）。Western blot 检测结果显示，SAH 后 24 h 大鼠海马组织 MMP-9 表达明显增高；给予 minocycline 治疗后，MMP-9 蛋白表达较 SAH 组明显降低（图 2）。

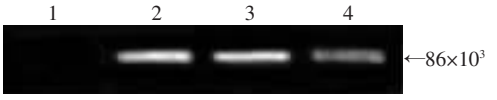


1：sham 组；2：SAH 组；3：vehicle 组；4：minocycline 组

图 2　Western blot 检测各组大鼠海马组织 MMP-9 蛋白的表达

2.3　大鼠海马组织 MMP-9 的活性

sham 组大鼠海马组织活性 MMP-9 的表达极低，其平均光密度值为（0.39 ± 0.23）%；SAH 后 24 h MMP-9 活性增高，平均光密度值为（201.81 ± 6.31）%，与 sham 组相比明显升高（$P<0.01$）；安慰剂组 MMP-9 平均光密度值为（201.36 ± 6.15）%，与 SAH 组相比无明显差异（$P>0.05$）。minocycline 组 MMP-9 活性明显下降，平均光密度值为（148.96 ± 6.02）%，较 SAH 组明显降低（$P<0.01$）。明胶酶谱检测显示，sham 组大鼠海马几乎检测不到活性 MMP-9 的表达；SAH 组 MMP-9 活性明显增高；Minocycline 组 MMP-9 活性较 SAH 组明显降低（图 3）。

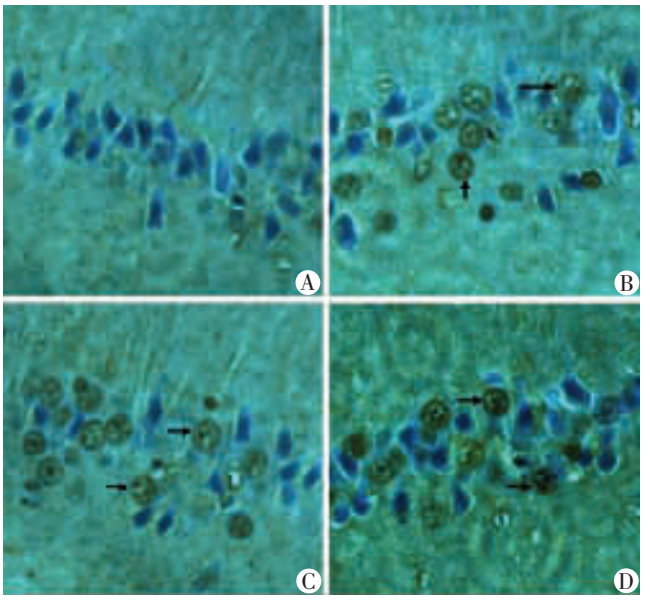


1：sham 组；2：SAH 组；3：vehicle 组；4：minocycline 组

图 3　明胶酶谱显示各组大鼠海马组织 MMP-9 的活性分析

2.4　大鼠海马神经元 TUNEL 染色

TUNEL 染色发现，sham 组大鼠海马神经元未观察到 TUNEL 阳性细胞。SAH 组海马 TUNEL 阳性细胞数为（192.17 ± 8.84）个，与 sham 组相比明显增加（$P<0.01$）；安慰剂组 TUNEL 阳性细胞数为（193.33 ± 6.31）个，与 SAH 组相比无显著差异（$P>0.05$）。minocycline 组 TUNEL 阳性细胞数为（91.17 ± 7.78）个，较 SAH 组明显下降（$P<0.01$，图 4）。



A：sham 组；B：SAH 组；C：vehicle 组；D：minocycline 组；↑：阳性细胞

图 4　TUNEL 法检测各组大鼠海马神经元凋亡　（×400）

3　讨论

EBI 涉及到 SAH 后，脑血管痉挛发生之前整个脑组织内包括神经元凋亡在内的多种病理生理事件[8]。越来越多的国内外学者认为 EBI 可能是 SAH 患者死亡率较高的首要原因。但目前国内外关于 EBI 的研究较少，且 EBI 的病理机制尚未阐明。

细胞凋亡在 SAH 病理过程中发挥重要作用[9]。有学者研究发现应用凋亡抑制剂，能够减少神经元凋亡，改善 SAH 后 EBI[10]。本课题组前期研究了 MMP-9

在SAH后EBI病理过程中的表达规律及其与细胞凋亡的关系，发现MMP-9参与介导EBI过程中的细胞失巢凋亡通路；抑制MMP-9的表达，SAH大鼠海马神经元凋亡明显减少，神经功能障碍得到明显改善[2-4]。因此寻找能够抑制海马神经元凋亡的临床药物，对治疗SAH后EBI可能具有重要的现实意义。

米诺环素是半合成广谱四环素类抗生素，在临床应用有近40年的历史，具有良好的脂溶性，能有效通过血脑屏障。近年来国内外在多种神经系统疾病，如脑缺血、脑外伤、阿尔茨海默病等动物模型中研究显示，米诺环素具有显著的神经保护作用，其机制可能与其抗凋亡作用相关[11,12]。但米诺环素在SAH动物模型中是否具有神经保护作用及其相关机制尚不清楚，需进一步研究以明确其在SAH后EBI过程中的作用。MMP-9是含有锌离子的内肽酶，其活性位点需要锌离子的存在以维持其功能，去除锌离子可以导致MMP-9化学构象改变并导致失活。目前大量证据认为MMP-9是BBB破坏的主要原因，并参与神经元死亡信号通路，抑制MMP-9的蛋白水解作用对中枢神经系统疾病导致的脑损伤改变可能具有保护作用[13]。米诺环素化学结构中存在活性结合位点，能与金属离子形成二价螯合物；而MMP-9是含Zn^{2+}的内肽酶，因此米诺环素可以与Zn^{2+}螯合，抑制MMP-9的催化区，阻碍其活化。

体外研究已经发现米诺环素能够抑制MMP-9的蛋白水解作用[14]。在脑缺血模型中应用米诺环素进行预处理，可以观察到MMP-9前体表达水平降低。由于米诺环素在多种脑损伤模型中具有神经保护作用，我们推测其中可能有多种机制参与；其中，抑制MMP-9的蛋白活性可能是其抗凋亡作用的核心环节。为明确之一假设，我们对SAH大鼠经腹腔给予米诺环素并检测MMP-9的表达，同时为明确其与SAH的临床相关性，我们还进一步观察了米诺环素能否减轻海马CA1区神经元形态改变及细胞凋亡。

本研究显示SAH后早期经腹腔注射米诺环素可以抑制SAH急性期MMP-9活化。研究还发现米诺环素能够有效减少大鼠海马神经元凋亡，同时减轻BBB破坏，海马CA1区形态学变化得以改善。因此，我们认为米诺环素可以通过抑制SAH后急性期MMP-9的活化，改善EBI，为临床治疗SAH提供了新的理论依据。

综上所述，本研究探讨了米诺环素对SAH后EBI的保护作用及其机制，该研究结果为SAH后EBI的治疗开辟了新的思路。然而米诺环素对SAH后血管损伤是否具有保护作用目前尚知之甚少。因此，进一步研究米诺环素在SAH后整个病理过程的作用将为EBI的治疗提供新的理论支持和实践依据。

志谢 感谢美国罗玛琳达大学医学中心张和教授在本研究实施过程中给予的支持和帮助

参考文献：

[1] Cahill J, Zhang J H. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? [J]. Stroke, 2009, 40(3 Suppl): S86 - S87.

[2] 郭宗铎，孙晓川，何朝晖，等. MMP-9在实验性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用[J]. 中国神经精神疾病杂志，2008，34(10)：623-625.

[3] 郭宗铎，孙晓川，何朝晖，等. 蛛网膜下腔出血后早期海马MMP-9的表达与海马神经元凋亡的相关性研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(1)：71-74.

[4] Guo Z, Sun X, He Z, *et al*. Role of matrix metalloproteinase-9 in apoptosis of hippocampal neurons in rats during early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Sci, 2010, 31(2): 143-149.

[5] Zemke D, Majid A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease[J]. Clin Neuropharmacol, 2004, 27(6): 293 - 298.

[6] Burgos-Ramos E, Puebla-Jimenez L, Arilla-Ferreiro E. Minocycline provides protection against beta-amyloid(25 - 35)-induced alterations of the somatostatin signaling pathway in the rat temporal cortex[J]. Neuroscience, 2008, 154(4): 1458-1466.

[7] Asahi M, Asahi K, Jung J C, *et al*. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(12): 1681-1689.

[8] Ostrowski R P, Colohan A R, Zhang J H. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Res, 2006, 28(4): 399-414.

[9] Park S, Yamaguchi M, Zhou C, *et al*. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2004, 35(10): 2412-2417.

[10] Gao C, Liu X, Liu W, *et al*. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Auton Neurosci, 2008, 141(1/2): 22-30.

[11] Nagel S, Su Y, Horstmann S, *et al*. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase[J]. Brain Res, 2008, 1188: 198-206.

[12] Kim H S, Suh Y H. Minocycline and neurodegenerative diseases[J]. Behav Brain Res, 2009, 196(2): 168-179.

[13] Muroski M E, Roycik M D, Newcomer R G, *et al*. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(1): 34-46.

[14] Leonardo C C, Hall A A, Collier L A, *et al*. Inhibition of gelatinase activity reduces neural injury in an *ex vivo* model of hypoxia-ischemia[J]. Neuroscience, 2009, 160(4): 755-766.

（收稿：2010-04-03 修回：2010-06-07）

（编辑 王 红）