文章编号:1000-5404(2010)24-2591-04

论著

强力霉素抑制MMP-9对大鼠局灶性缺血再灌注脑损伤的保护作用

焦海霞[1,2],王 萍[1],马 腾[1],薛一雪[1] (110001 沈阳,中国医科大学基础医学院神经生物学教研室[1];350004 福州,福建医科大学基础医学院生理学与病理生理学系[2])

[摘要] **目的** 观察强力霉素对脑缺血再灌注MMP-9活性的影响,探讨其对神经元的保护作用。**方法** 利用大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion,MCAO)制备局灶性脑缺血再灌注模型,SD大鼠分为假手术组、生理盐水组、强力霉素组,每组18只。激光多普勒血流仪分别检测大鼠手术前、MCAO时、再灌注24 h大脑中动脉脑血流;再灌注24 h时应用TTC染色法观察大鼠脑梗死体积;明胶酶谱法检测缺血区脑组织MMP-9活性变化;透射电镜观察缺血区脑组织神经元超微结构。**结果** 生理盐水组与强力霉素组大鼠在再灌注24 h时脑血流[分别为基础值的(57.98±4.20)%、(59.23±3.30)%]与MCAO时[分别为基础值的(22.94±3.16)%、(21.63±3.46)%]差异显著($P<0.01$),但在同一时间点两组间无显著差异($P>0.05$);强力霉素组大鼠脑梗死体积[(9.77±2.68)%]与生理盐水组[(33.44±4.50)%]相比显著减少($P<0.01$);生理盐水组大鼠MMP-9活性(5.95±0.73)与假手术组(1.21±0.15)相比显著升高($P<0.01$),应用强力霉素后MMP-9活性(2.47±0.42)与生理盐水组相比显著降低($P<0.01$);生理盐水组大鼠神经元超微结构发生异常改变,强力霉素组大鼠神经元形态结构基本正常。**结论** 强力霉素抑制MMP-9活性对大鼠局灶性缺血再灌注损伤脑组织具有保护作用。

[关键词] 强力霉素;脑缺血;再灌注;基质金属蛋白酶;脑梗死
[中图法分类号] R345.5;R743.31;R978.14 **[文献标志码]** A

Doxycycline-mediated inhibition of MMP-9 protects focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Jiao Haixia[1,2], Wang Ping[1], Ma Teng[1], Xue Yixue[1] ([1]Department of Neurobiology, College of Basic Medicine, China Medical University, Shenyang, Liaoning Province, 110001; [2]Department of Physiology and Pathophysiology, College of Basic Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province, 350004, China)

[Abstract] **Objective** To observe the activity alteration of MMP-9, and investigate the protective effect of doxycycline on brain tissue after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Cerebral ischemia-reperfusion model was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). SD rats were divided into sham-operated group, saline group and doxycycline group, 18 rats in each group. The laser-doppler probe was fixed before and after operation (MCAO), and at reperfusion 24 h, to measure local cerebral blood flow (CBF) in an area supplied by the middle cerebral artery. The infarct volume was defined by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining at reperfusion 24 h. Gelatin zymography was used to determine the activity of MMP-9 in the cerebral ischemic tissue. Neuron ultrastructure was investigated by transmission electron microscopy (TEM) in the rat ischemic cerebral cortex. **Results** There was significant change between the cerebral blood flow (CBF) [(57.98±4.20)%, (59.23±3.30)% respectively of the base line] at reperfusion 24 h and MCAO [(22.94±3.16)%, (21.63±3.46)% of the base line] ($P<0.01$), but no significant difference was seen between the saline and doxycycline groups at same time point ($P>0.05$). The cerebral infarction volume in doxycycline group [(9.77±2.68)%] was significantly decreased than that in saline group [(33.44±4.50)%] ($P<0.01$). The activity of MMP-9 in saline group (5.95±0.73) were significantly increased compared with the sham-operation group (1.21±0.15) at reperfusion 24 h ($P<0.01$). Doxycycline (2.47±0.42) significantly inhibited the enhanced activity of MMP-9 at reperfusion 24 h ($P<0.01$). Neuron ultrastructure was abnormal change in saline group, but there was obvious recovery for the abnormal neuron ul-

[基金项目] 国家自然科学基金(30872656;30973079);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20092104110015);沈阳市科学技术计划项目(1091175-1-01,1081266-9-00)

[通信作者] 薛一雪,电话:(024)23256666,E-mail:xueyixue888@yahoo.com.cn

trastructure in doxycycline group. **Conclusion** Doxycycline exerts a protective effect on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting MMP-9 activity.

[Key words] doxycycline; brain ischemia; reperfusion injury; matrix metalloproteinases; brain infarction

Supported by the Natural Science Foundation of China (30872656, 30973079), the Special Fund for Scientific Research of Doctorial Subjects in Colleges and Universities of Ministry of Education (20092104110015), and the Projects of Department of Science and Technology of Shenyang (1091175-1-01, 1081266-9-00). Corresponding author: Xue Yixue, Tel: 86-24-23256666, E-mail: xueyixue888@yahoo.com.cn

脑梗死发生后尽快进行溶栓被证明是治疗该病的最有效方法，但是溶栓治疗有严格的时间窗限制，容易造成脑缺血再灌注损伤，严重影响患者愈后[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs)是一组降解细胞外基质的重要酶类，研究表明脑缺血再灌注诱发 MMP-9(明胶酶 B，相对分子量 92×10^3)活性增加，参与神经炎症反应、神经元凋亡、脑水肿、脑出血等病理过程，是引起再灌注损伤的重要因素[2]。强力霉素(Doxycycline)是广谱基质金属蛋白酶抑制剂，本研究观察强力霉素对脑缺血再灌注 MMP-9 活性的影响，探讨其对神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 成年大鼠 58 只，雄性，清洁级，体质量 280～320 g。中国医科大学实验动物中心提供，实验动物置于室温和光照可控的饲养室内(22 ℃；每 12 小时为光照、黑暗一循环；光照从 07:00 开始)，自由进食水。

1.2 制备局灶性脑缺血再灌注动物模型

参照 Longa 等[3]大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion，MCAO)制备局灶性脑缺血再灌注动物模型。40 只 SD 大鼠用于模型制备，腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3 ml/kg)，麻醉后，仰卧位固定在手术台上行颈部脱毛，常规消毒后在颈部正中切口，分离皮下组织，充分暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)。在 ECA 与 CCA 分叉处结扎 ECA，线栓采用直径为 0.26 mm 涂有肝素的尼龙线，尼龙线经 CCA 进入 ICA 18～20 mm，感觉有阻力时则为阻断 MCA 入口，栓塞成功后固定尼龙线，2 h 后拔出尼龙线进行再灌注。

1.3 激光多普勒血流仪检测脑血流

麻醉大鼠俯卧位固定于脑立体定位仪，正中矢状切开皮肤，在冠状缝后 1 mm 与矢状缝右 5 mm 交点处钻一小孔至硬脑膜，直径 2 mm，该区域为缺血核心区域。将激光多普勒血流仪探头插入孔内，测量大鼠大脑中动脉血流变化。分别记录正常状态下脑血流基础值、缺血 2 h 内以及再灌注 24 h 时血流变化。要求 MCAO 后脑流量迅速降到基础值的 30% 以下，4 只不符合此标准的动物被剔除。

1.4 实验分组

将 36 只模型制备成功大鼠分为生理盐水组和强力霉素组，其余大鼠为假手术组、每组大鼠 18 只。假手术组手术操作与模型制备相同，但不插尼龙线；强力霉素组大鼠腹腔注射强力霉素(45 mg/kg)，于再灌注前 12 h 开始，每 12 小时注射 1 次直至处死；生理盐水组腹腔注射同剂量生理盐水。

1.5 TTC 染色测定脑梗死体积

大鼠过量麻醉致死后迅速断头取脑，置于 -20 ℃冰箱快速冷冻 10 min，从额极开始由前向后每隔 2 mm 冠状切取脑组织 6 片，置于 2% TTC 溶液中，37 ℃水浴避光孵育 30 min，数码相机拍照。用图像分析软件(Motif Images Advanced 3.2)处理计算脑梗死体积百分比。

1.6 MMP-9 活性检测

应用明胶酶谱法检测 MMP-9 活性变化[4]：大鼠过量麻醉致死后，迅速断头，冰浴中取脑。PBS 裂解缺血侧脑额顶叶组织蛋白，匀浆离心、测定蛋白浓度；10% SDS-PAGE 电泳(1.0 mg/ml 明胶)分离蛋白，凝胶经洗脱、漂洗、孵育、染色、脱色，采用 Chemi Imager 5 500V 2.03 软件扫描胶片，Fluor Chem 2.0 图像分析，读取条光密度。

1.7 透射电镜观察神经元超微结构

麻醉大鼠 4% 多聚甲醛灌流固定，取缺血区脑组织额顶叶皮质 1 mm^3 用 2.5% 戊二醛浸泡固定，2% 四氧化锇后固定，梯度酒精脱水，环氧树脂 618 包埋，超薄切片经醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后，在 80 kV 条件下用 JEM-1200EX 型透射电镜观察。

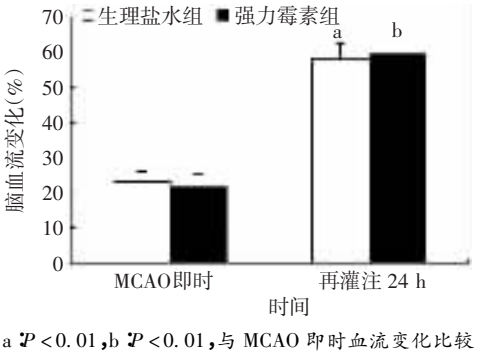
1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间采用 t 检验，多组间采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验。

2 结果

2.1 大鼠大脑中动脉供血区血流变化

大鼠脑血流以基础值百分比表示，MCAO 时大鼠脑血流降于基础值 30% 以下，被认为脑缺血模型成功，血流值没有降于基础值 30% 以下的大鼠剔除。生理盐水组和强力霉素组大鼠在再灌注 24 h 时与 MCAO 时存在显著差异($P<0.01$)，但同一时间点两组间无显著差异($P>0.05$)。见图 1。



a $P<0.01$，b $P<0.01$，与 MCAO 即时血流变化比较

图 1 生理盐水组与强力霉素组大鼠脑缺血及再灌注 24 h 大脑中动脉血流变化

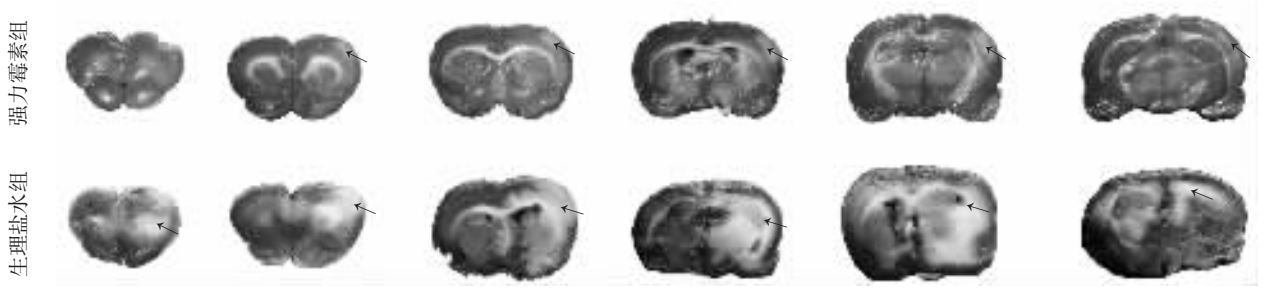


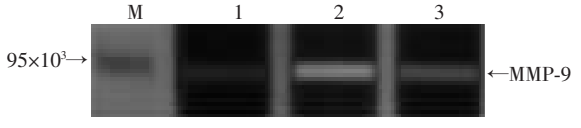
图2 TTC染色典型的脑组织大体观察 （箭头所示白色梗死灶）

2.2 强力霉素对脑缺血再灌注脑梗死体积的影响

脑缺血再灌注24 h脑组织梗死灶位于右侧额、顶、颞叶皮层及新纹状体外侧部，各组脑切片染色结果见图2，正常组织为深色，梗死灶白色。应用Shrimakura法计算梗死体积[5]，数据分析显示强力霉素组大鼠脑梗死体积与生理盐水组相比显著减少（$P<0.01$）。

2.3 强力霉素对脑缺血再灌注MMP-9活性上调的影响

再灌注24 h时缺血侧脑额顶叶组织MMP-9活性生理盐水组（5.95±0.73）与假手术组（1.21±0.15）相比显著升高（$P<0.01$），强力霉素组（2.47±0.42）与生理盐水组比较显著下降（$P<0.01$）。见图3。



M：标准；1：假手术组；2：生理盐水组；3：强力霉素组

图3 明胶酶谱法检测强力霉素对脑缺血再灌注24 h MMP-9活性的影响

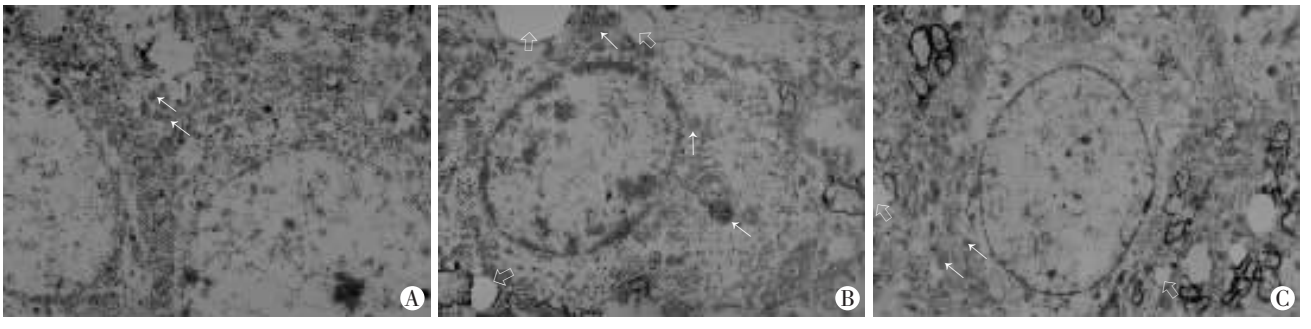
2.4 强力霉素改变脑缺血再灌注神经元超微结构

透射电镜结果显示假手术组脑组织神经元细胞质充盈，无空泡，线粒体数量、大小正常，核形规则（图4A），生理盐水组缺血区脑组织神经元细胞质溶解，空泡形成；线粒体代偿性增多，体积变大；细胞核变小，染色质边集（图4B），应用强力霉素后神经元形态基本恢复，空泡数量减少、体积变小；线粒体数量减少、体积恢复；核形基本正常（图4C）。

3 讨论

MMP-9在正常脑组织内表达极少，脑缺血及随后的再灌注能够诱发缺血区脑组织表达MMP-9。MMP-9合成后以酶原形式存在，被特殊的蛋白酶切割后产生活性，降解细胞外基质，导致白细胞浸润，加重脑组织损伤[6]。强力霉素是半合成的第2代四环素族抗生素，这类药物除具有抗菌功能外，还能够抑制基质金属蛋白酶表达、加之其良好的脂溶性，能顺利通过血-脑脊液屏障，所以强力霉素是有效的神经细胞保护剂[7]。但脑缺血再灌注损伤后，关于强力霉素对缺血部位神经元超微结构的影响鲜有报道，本实验结果显示强力霉素显著抑制再灌注引起MMP-9活性上调、降低脑梗死体积的同时，能够减少神经元超微结构的破坏，基本恢复细胞质、线粒体、细胞核形态，该结果证明强力霉素能够通过抑制MMP-9活性上调，保护缺血再灌注脑组织，维持神经元基本形态。

脑缺血再灌注大鼠脑血流变化显示，再灌注24 h时缺血区脑血流增加，与MCAO时存在显著差异，但此时脑血流并没有恢复到基础水平，持续的低灌注引起缺血区域血液供给减少，脑组织代谢障碍，诱发氧化应激和神经炎症反应。大量活性氧和各种炎症介质，



A：假手术组；B：生理盐水组；C：强力霉素组

图4 透射电镜观察强力霉素对缺血区脑组织神经元形态的影响 ↑：线粒体，⇧：空泡；标尺：1 μm

如白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等促进MMP-9表达上调[8-9]。激活的MMP-9降解细胞外基质、血管基底膜Ⅳ胶原蛋白、层粘连蛋白等破坏脑微血管完整性、增加血-脑脊液屏障通透性,导致毒性物质及炎症介质进入脑实质,脑内环境紊乱,引起脑组织继发损伤。在永久性脑缺血大鼠模型中,脑缺血24 h血浆与脑组织MMP-9活性皆显著升高[10],MMP-9活性被抑制与神经元损伤减少正相关[11]。缺血缺氧小鼠敲除MMP-9基因后脑组织损伤明显轻于野生型小鼠[12]。本实验应用明胶酶谱法检测MMP-9活性,结果表明再灌注24 h MMP-9活性显著高于假手术组,同时缺血区神经元形态明显改变:细胞质溶解,空泡形成;线粒体代偿性增多,体积变大;细胞核变小,染色质边集,该结果证明再灌注损伤导致MMP-9活性升高,伴随神经元超微结构显现坏死或凋亡早期的表现,加大了缺血区脑组织的损伤。

研究证明强力霉素能够从转录水平和酶原活化几方面抑制MMP-9蛋白表达和活性上调,例如:①阻断转录因子活化蛋白-1(activator protein-1,AP-1)与启动子结合,限制MMP-9转录[13];②具有Zn^{2+}或Ca^{2+}螯合作用能够封锁MMP-9的结合位点,抑制MMP-9激活[14];③直接抑制MMP-9前体向活体形式转化[15]。本实验观察到强力霉素能够通过抑制MMP-9活性维持神经元的超微结构,神经元形态基本正常,从而对缺血再灌注脑组织产生明显的保护作用。本结果在临床上具有一定的应用前景,强力霉素的应用有望成为治疗缺血性脑血管疾病的新途径。

参考文献:

[1] Strbian D, Karjalainen-Lindsberg M L, Kovanen P T, *et al*. Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke[J]. Circulation, 2007, 116(4):411-418.

[2] Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, *et al*. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke[J]. Stroke, 2008, 39(4):1121-1126.

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

[4] 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.

[5] Shimakura A, Kamanaka Y, Ikeda Y, *et al*. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion[J]. Brain Res, 2000, 858(1):55-60.

[6] del-Zoppo G J, Milner R, Mabuchi T, *et al*. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2007, 38(2 Suppl):646-651.

[7] Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, *et al*. Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2007, 25(3):506-513.

[8] Gidday J M, Gasche Y G, Copin J, *et al*. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(2):H558-H568.

[9] Hosomi N, Ban C R, Naya T, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(8):959-967.

[10] Park K P, Rosell A, Foerch C, *et al*. Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2009, 40(8):2836-2842.

[11] Ostrowski R P, Jadhav V, Chen W, *et al*. Reduced matrix metalloproteinase-9 activity and cell death after global ischemia in the brain preconditioned with hyperbaric oxygen[J]. Acta Neurochir Suppl, 2010, 106:47-49.

[12] Svedin P, Hagberg H, Savman K, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia[J]. J Neurosci, 2007, 27(7):1511-1518.

[13] Lindeman J H, Abdul-Hussien H, van-Bockel J H, *et al*. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells[J]. Circulation, 2009, 119(16):2209-2216.

[14] Garcia R A, Pantazatos D P, Gessner C R, *et al*. Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(4):1128-1136.

[15] Lee H M, Golub L M, Cao J, *et al*. CMT-3, a non-antimicrobial tetracycline (TC), inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer[J]. Curr Med Chem, 2001, 8(3):257-260.

(收稿:2010-07-19 修回:2010-09-16)

(编辑 王 红)