33(24): 2587-2591.
[12] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
[13] 方华, 王泉云, 李昌熙, 等. 脊髓分级缺血再灌注损伤模型的建立与病理学评价[J]. 四川动物, 2007, 26(3): 689-692.
[14] Kiyoshima T, Fukuda S, Matsumoto M, *et al*. Lack of evidence for apoptosis as a cause of delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 96(3): 839-846.
[15] Sakurai M, Hayashi T, Abe K, *et al*. Delayed and selective motor neuron death after transient spinal cord ischemia: a role of apoptosis? [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 115(6): 1310-1315.
[16] Schoeler M, Loetscher P D, Rossaint R, *et al*. Dexmedetomidine is neuroprotective in an *in vitro* model for traumatic brain injury[J]. BMC Neurol, 2012, 12: 20.
[17] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, *et al*. Effects of dexmedetomidine on hippocampal focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in physiologic and ischemic conditions[J]. Anesthesiology, 2005, 103(5): 969-977.

(**收稿**:2014-09-11;**修回**:2014-11-16)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409153

异丙酚对大鼠脑缺血再灌注脑组织紧密连接蛋白 MMP-2、MMP-9 表达的影响

王进全,曹 剑,王恩琴 (400038 重庆,第三军医大学西南医院麻醉科)

[**关键词**] 异丙酚; MMP-2; MMP-9; 紧密连接蛋白
[**中图法分类号**] R971.2 [**文献标志码**] B

溶栓是缺血性脑血管病发生后能够治疗成功的关键,溶栓后易造成脑水肿及脑缺血再灌注性损伤。如何降低脑缺血再灌注对脑组织的损伤成为国内外学者的研究焦点[1]。脑微血管紧密连接为血脑屏障的主要结构基础,可有效阻止细菌入侵脑组织,从而保护脑组织[2]。但血脑屏障的保护作用大大降低了药物对脑组织损伤的治疗。临床研究显示,全麻药异丙酚可以降低缺血性脑损伤后血脑屏障通透性、脑血管事件的发生率,但对其脑保护的作用机制尚不清楚。研究发现组织紧密连接蛋白 MMP-2、MMP-9 在脑缺血性损伤后表达显著升高,参与血脑屏障的破坏,加剧缺血后的脑损伤[2]。本实验观察异丙酚对 SD 大鼠脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白 MMP-2、MMP-9 表达的影响,探讨异丙酚对脑组织的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及设备、试剂来源

8 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 80 只,体质量 240~280 g(购于中国医科大学实验动物中心)。大鼠按随机编号分为 5 组:A 组为假手术组($n=10$);B 组为正常组($n=10$);C 组:缺血 6、12 h 50 mg/kg 异丙酚预处理组(每个时间点 10 只);D 组:缺血 6、12 h 100 mg/kg 异丙酚治疗组(每个时间点 10 只);E 组:缺血 6、12 h 再灌注组(每个时间点 10 只)。酶联免疫吸附法的仪器由郑州安图绿科有限公司提供;药品异丙酚由阿斯利康公司提供;MMP-2、MMP-9 检测试剂盒由晶美生物工程有限公司提供。Mias 图像分析系统由上海交通大学图像分析研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 缺血再灌注动物模型制作方法 参照文献[3]对大鼠进行大脑中动脉线栓后缺血再灌注造模:将大鼠腹腔麻醉后,暴露分离左侧颈内总动脉,插入线栓、结扎,建立大脑中动脉缺血模型,假手术组插入线栓不结扎,正常组不予任何处理;预处理组于结扎前给予异丙酚;治疗组于结扎后给予异丙酚;缺血再灌注组进行正常手术。

1.2.2 干预方法 实验大鼠于再灌注后 6、12 h,分别采用 3.5% 水合氯醛、异丙酚进行干预,而后断头取脑,经速冻 20 min 后。从视交叉向后连续冠状切片,片厚 2 mm。将脑片放入 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液,37 ℃温箱中染色 30 min,15 min 翻面,甲醛固定 24 h 后,见正常脑组织呈红色,梗死灶则为白色。梗死体积 = 各层梗死面积之和 × 层面厚度。

1.2.3 制作脑组织匀浆 断头取全脑,加入生理盐水中制成 10% 的脑组织匀浆备用,所有的脑组织匀浆采用 ELISA 法测定蛋白量 MMP-2 和 MMP-9 的含量。同组大鼠经麻醉后打开胸腔,经升主动脉段快速灌注生理盐水,直至右心房流出液清亮为止,采用 4% 的多聚甲醛 150 mL 灌注固定,断头取脑,将大脑组织置于 4% 的甲醛溶液中固定,采用免疫组织化学法检测各组

(下转 442 页)

[**基金项目**] 重庆市基础与前沿研究计划项目(CSTC2014jcyjA1694)
[**通信作者**] 王恩琴,E-mail: 448041475@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1638.015.html(2014-12-04)

cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(4): 411-413.
[8] Verhage M, Maia A S, Plomp J J, *et al*. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion[J]. Science, 2000, 287(5454): 864-869.
[9] Uriguen L, Gil-Pisa I, Munarriz-Cuezva E, *et al*. Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia[J]. Transl Psychiatry, 2013, 3: e221.
[10] Vatta M, Tennison M B, Aylsworth A S, *et al*. A novel STXBP1 mutation causes focal seizures with neonatal onset [J]. J Child Neurol, 2012, 27(6): 811-814.
[11] Han G A, Malintan N T, Collins B M, *et al*. Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion[J]. J Neurochem, 2010, 115(1): 1-10.
[12] Sheets L, Trapani J G, Mo W, *et al*. Ribeye is required for presynaptic Ca(V)1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells[J]. Development, 2011, 138(7): 1309-1319.
[13] Genc O, Kochubey O, Toonen R F, *et al*. Munc18-1 is a dynamically regulated PKC target during short-term enhancement of transmitter release[J]. Elife, 2014, 3: e01715.
[14] Cijsouw T, Weber J P, Broeke J H, *et al*. Munc18-1 redistributes in nerve terminals in an activity- and PKC-dependent manner[J]. J Cell Biol, 2014, 204(5): 759-775.

(收稿:2014-09-17;修回:2014-10-27)
(编辑 张 维)

(上接438页)

大鼠脑组织中的MMP-2、MMP-9含量。采用Mias图像处理系统,每组大鼠各取1张免疫组化切片,每张随机选取5个视野,分别测定MMP-2、MMP-9的光密度值,计算MMP-2、MMP-9阳性细胞的百分率,然后取平均值作为统计数据。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0统计软件行 t 检验。

2 结果

大鼠脑缺血6、12 h时,E组脑组织中MMP-2及MMP-9表达明显升高($P<0.05$)。在同一时间,与其他各组相比较,E组MMP-2及MMP-9的表达差异均有统计学意义($P<0.05$,表1、2)。

表1 各组大鼠不同缺血时间脑组织MMP-2的表达
($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	光密度		面密度	
	6 h	12 h	6 h	12 h
A组	214.5±4.4[a]	220.5±4.3[a]	10.5±1.3[a]	10.6±3.3[a]
B组	215.1±5.1[a]	219.5±5.1[a]	10.2±1.8[a]	10.5±4.3[a]
C组	165.5±5.5[a]	168.5±2.2[a]	39.7±4.8[a]	40.3±4.1[a]
D组	145.5±3.6[a]	148.5±5.4[a]	33.3±5.1[a]	33.7±4.1[a]
E组	105.5±5.5	105.8±6.2	50.7±4.6	50.3±4.7

a:$P<0.05$,与E组比较

表2 各组大鼠不同缺血时间脑组织MMP-9的表达
($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	光密度		面密度	
	6 h	12 h	6 h	12 h
A组	214.3±4.4[a]	219.5±3.3[a]	10.5±3.3[a]	10.6±3.3[a]
B组	214.2±4.9[a]	219.6±4.9[a]	10.2±3.8[a]	10.5±4.3[a]
C组	165.4±5.5[a]	168.4±2.7[a]	39.3±4.2[a]	39.2±4.1[a]
D组	145.6±3.6[a]	148.3±5.2[a]	33.3±5.2[a]	33.7±4.3[a]
E组	105.4±5.5	105.3±4.2	50.7±4.6	50.3±4.7

a:$P<0.05$,与E组比较

3 讨论

异丙酚是临床常用麻醉药物之一,具有起效快、代谢快及副反应少等特点。应用异丙酚后,细胞内钙离子水平及血脑屏障的通透性均受到较大影响。本实验观察异丙酚对SD大鼠脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白MMP-2、MMP-9表达的影响,探讨异丙酚对脑组织的保护机制。

本研究结果显示,与异丙酚预处理组、异丙酚治疗组及正常组、假手术组相比较,缺血再灌注组中MMP-2和MMP-9的表达显著升高,表明MMP-2、MMP-9在脑缺血性损伤后表达显著升高,参与脑缺血损伤的病理过程。而异丙酚各组中MMP-2和MMP-9的表达显著降低,说明异丙酚能够抑制大鼠在缺血脑组织中MMP-2和MMP-9的表达,能够保护血脑屏障通透性,证明异丙酚对缺血脑组织具有保护作用。MMP-2及MMP-9是基质金属蛋白酶家族的主要成员,也是脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白,可间接体现脑微血管通透性的程度[3]。其中MMP-2被称为明胶酶A,活化的MMP-2能够降解血管周围细胞外基质;MMP-9被称为明胶酶B,具有广泛的生理作用,可调节其他蛋白酶及细胞因子活性,还可与CD44相互结合,并释放TGF-β1的效用。此外,MMP-9还可释放血管内皮生长因子,参与血管生成。

综上所述,异丙酚可以抑制大鼠脑缺血再灌注脑组织紧密连接蛋白MMP-2、MMP-9表达,进而对缺血脑组织进行保护。但本实验时间点较少,观察时间较短,对异丙酚的脑保护作用机制需进一步研究。

参考文献:

[1] Deli M A, Abraham C S, Kataoka Y, *et al*. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology [J]. Cell Mol Neurobiol, 2005, 25(1): 59-127.
[2] Narayanasamy A K, Ghori A. Emergence agitation after sevoflurane anaesthesia in children[J]. Br J Anaesth, 2013, 111(1): 121.
[3] Bauer A T, Burgers H F, Rabie T, *et al*. Matrix metallo proteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain *via* tight junction rearrangement[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(4): 837-848.

(收稿:2014-09-10;修回:2014-11-10)
(编辑 栾 嘉)