基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0202-04

金属硫蛋白对全脑缺血再灌注后损伤神经的修复作用

李 峥,董 志

(重庆医科大学药学院药理教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察金属硫蛋白(Metallothionein,MT)外源性补充对大鼠全脑缺血再灌注(Cerebral ischemia and reperfusion,I/R)损伤的保护作用,并初步探讨其可能机制。方法:建立 I/R 模型,采用低血压并双侧颈总动脉夹闭的全脑缺血再灌注模型。缺血 20 min 再灌注 1 d 后,测行为学指标,石蜡切片 HE 染色观察海马神经元形态变化,并用免疫组化方法检测海马神经生长因子-β(Nerve growth factor-β,NGF-β)的表达。结果:MT 脑室注射给药(1.4、4.2 mg/kg)能剂量依赖性的减轻大鼠行为学症状,增加大鼠海马神经元 NGF-β 的表达(0.46、1.4、4.2 mg/kg)。同时病理组织学观察还发现,MT(0.46、1.4、4.2 mg/kg)能显著减少 I/R 大鼠海马区神经元的固缩,增加存活细胞的数量,减轻脑损伤。结论:MT 对脑缺血再灌注损伤有神经保护作用,可能机制为促损伤神经元修复。

【关键词】金属硫蛋白;神经生长因子;脑缺血再灌注

【中国图书分类法分类号】R743.3; R962 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-25

The reparation of metallothionein to the injuried neuron after cerebral ischemia and reperfusion in rats

LI Zheng, et al

(*Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the protect action of exogenous metallothionein on rats' cerebral ischemia and reperfusion and explore its possible mechanism. *Methods*: I/R modle was established. After 20 min ischemia and 1 d reperfusion, determined the ethology index and the HE staining was determined to see the morphologic changes of neurons in hippocampus. The expression of NGF-β in hippocampus was determined by immunohistochemistry.

作者介绍:李 峥(1983-),男,硕士,研究方向:新药开发与研究。

通讯作者:董 志,男,教授,E-mail:zhidong073@hotmail.com。

了实验依据。

参 考 文 献

[1] 齐惠丽,赵广荣,王典瑞,等.丹红注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J].现代中医药,2007,27(4):65-67.

[2] 辛 勤,李秀芳,司端运,等.丹参红花注射液对实验性大鼠脑缺血的保护作用[J].中成药,2004,26(3):222-224.

[3] Paller M S, Hoidl J R, Ferris T F, et al. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Clin Invest, 1984, 74(1): 1156-1164.

[4] 王书梅. 高效液相色谱法测定丹红注射液中丹参水溶性成分的含量[J].时珍国医国药,2006,17(6):989-990.

[5] 张梅兰,金静维,杜秀芳,等.丹红注射液对实验性脑缺血大鼠脑毛细血管通透性及脑含水量的影响 [J]. 河北医药,2007,29(3):204-205.

[6] Stefanutti G, Pierro A, Smoth vv, et al. Peroxynitrite decomposition catalyst FeTMPyP provides partial protection against intestinal ischemia and reperfusion injury in infant rats[J]. Basic Science Investigation, 2007, 62(1):43-48.

[7] Patel NS, Chatterie PK, Mazzon E, et al. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion[J]. J Pharmaeol ExpTher, 2005, 312(3): 1170-1178.

[8] Fukatsu K, Kudsk K A, Zarzaur B L, et al. Increased ICAM-1 and [beta]2 integrin expression in parenterally fed mice after a gut ischemic insult [J]. Shock, 2002, 18(2), 119-124.

[9] Olanders K, Borjesson A, Dib M, et al. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats[J]. Shock, 2002, 18(1): 86-92.

[10] Langer R M, Janczewska S, Furian L, et al. Methoxyethyl-modified intercellular adhesion molecule-1 antisense phosphorothiateol-igonucleotides inhibit allograft rejection, ischemic-reperfusion injury, and cyclosporine-induced nephrotoxicity[J]. Transplantation, 2005, 79(4): 401-408.

[11] Burne-Taney, MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury[J]. Current Opinion in Nephrology & Hypertension, 2003, 12(1): 85-90.

(责任编辑:关蕴良)

Resluts: Metallothionein cerebral ventricle injection (1.4、4.2 mg/kg)could significantly reduce the ethology symptom by dose dependent, the expression of NGF-β in hippocampus also was increased(0.46、1.4、4.2 mg/kg).Meanwhile, the pathological examination showed that the karyopycnosis of neurons in hippocampus with I/R in rats could be decreased by MT uncommonly, which mitigated the injury of brain. *Conclusion*: MT can protect the brain from I/R injury, its active mechanism may be related to repair impaired neurones.

【Key words】Metallothionein; Nerve growth factor; Cerebral ischemia and reperfusion

大量研究证明自由基损伤和神经元凋亡[1]是缺血再灌注损伤的关键因素。金属硫蛋白(Metallothionein,MT)是小分子可诱导蛋白,多种生理及病理情况下均有 MT 的变化,特别是内源性 MT 具有清除自由基和抗脂质过氧化的功能[2],但目前对 MT 的研究主要集中于 $ZnSO_4$ 诱导内源性 MT 的抗氧自由基和解救重金属中毒作用[3,4],而对在全脑缺血再灌注过程中,外源性补充 MT 是否对损伤神经元有修复和促生长作用未见报道,本研究旨在探索外源性补充 MT 在脑缺血再灌注损伤中修复受损神经元作用,为 MT 在脑缺血再灌注损伤的治疗研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MT 购自湖南麓谷生物技术有限公司(批号:20060302),NGF 一抗试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司,二抗试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,其余均为市售分析纯。722 可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)由重庆医科大学药理教研室提供。切片机为 LEICA, 型号为 RM2135。

1.2 动物与分组

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 60 只 (重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(渝)20020001),雌雄各半,实验动物在正常饮食条件下饲养 3 d 以适应实验环境。随机分为 5 组,每组 10 只:假手术组(A),模型组(B),金属硫蛋白 0.46、1.4、4.2 mg/kg 治疗组(C ~ E)。

1.3 模型及给药

全脑缺血再灌注损伤大鼠模型参照李梨[5]的方法并略作修改,大鼠 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g,ip)麻醉后,仰卧固定于鼠板,颈正中 2 cm 切口并向右延伸 1 cm,钝性分离右侧颈总静脉和两侧颈总动脉,结扎右侧颈总静脉远心端,插管后输入 2 ml 肝素化生理盐水(100 ml 生理盐水含 250 U 肝素),抽取占大鼠总血容量体积 30%的血液后,夹闭双侧颈总动脉,缺血 20 min,回输抽取血液,结扎右侧颈总静脉,缝合切口。假手术组大鼠除了右侧颈总静脉插管抽血、双侧颈总动脉夹闭操作外,其余同模型组。

MT 用药组在手术后 30 min 后脑室内给药,MT 用生理盐水配成 200 mg/ml,MT 给药组分为低、中、高剂量组(0.46、1.4、4.2 mg/kg)。

1.4 检测项目

1.4.1 动物模型行为学评价方法 采用卒中指数(Apoplexy index)评分和神经病学症状(Neurology symptom)评分标准[6]。卒中指数评分:总分 25 分,0 ~ 3 分为症状组,3 ~ 9 分为中间组,可能有损伤,>10 分明显有损伤。毛发脏乱颤抖:1 分,运动减少或迟钝:1 分,耳触觉迟钝:3 分,头翘起:3 分,后肢外展呈"八"字:3 分,上睑下垂:1 分,转圈:3 分,惊厥或爆发运动:3 分,极度衰弱:6 分。神经病学症状评分:总分 10 分,0 分正常,1 ~ 3 分轻度损伤 ,4 ~ 6 分中度损伤,7 ~ 10 分严重损伤。有自发探究:0 分, 刺激时能走动:1 分, 正常步态:0 分,共济失调:1 分,爬行:2 分,无步态:3 分。能进食:0 分,不能进食:1 分,能饮水:0 分,不能饮水:1 分,疼痛刺激可移动:0 分,仅头或躯干运动:1 分,肢体回缩或无反应 :2 分。

1.4.2 组织病理学检查 全脑缺血再灌注 1 d, 经行为学评分后,每组取 3 只大鼠用 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g,ip)麻醉,仰卧固定,经左心室滴入肝素化生理盐 100 ml(100 ml 生理盐水含 250 U 肝素), 同时剪开右心耳作为血液和灌注液的出口, 然后滴入 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液 (pH7.0 ~ 7.4,0.2 mol/L)200 ml 进行在体脑组织固定。完整分离脑组织,再用 4%多聚甲醛固定 3 ~ 5 d,海马平面冠状切面切片,切片厚约 5 μm,HE 染色观察海马神经元形态变化。

1.4.3 免疫组化法测海马 NGF-β 的表达 大鼠分离固定脑组织同病理学检测,固定完成后石蜡包埋,切片厚度 3 μm。免疫组化法染色采用 SP 方法。具体步骤为:先将切片脱蜡至水,98℃微波抗原修复,3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶,0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次,加入兔抗 NGF-β ,兔抗 NGF-β 稀释度为 1:100,4 ℃过夜后 37 ℃孵育 1 h。然后依次加入二抗生物素化羊抗兔和辣根过氧化氢标记的链酶亲和素,DAB 显色, 于光镜下观察阳性表达细胞呈棕黄色免疫染色。在高倍镜下,每组取随即 5 个视野,对阳性细胞计数,测平均值。

1.5 统计方法

测定结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS12.0 软件对结果进行 t 检验统计学处理

2 结 果

2.1 全脑缺血再灌注对动物行为的影响

大鼠全脑缺血再灌注 1 d 后的行为学评分见表 1。模型组与假手术组相比有明显差异($P<0.01$);各治疗组卒中指数与神经病学指数均较模型组有降低,中、高剂量组有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 大鼠组织病理形态学变化

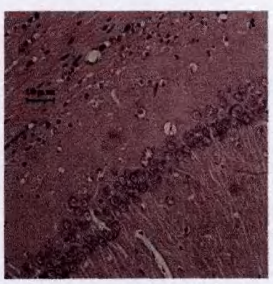
假手术组大鼠海马神经元结构清楚、完整，细胞排列及层次分明，细胞无固缩现象。模型组海马神经元出现明显的核固缩，固缩神经元多呈长梭形，几乎无正常细胞。低剂量组损伤情况有所改善，出现了很少的正常细胞，固缩神经元有些由长梭形变为不规则的多边方形。而中、高剂量组这种改善明显加强（图 1）。

2.3 大鼠海马神经元 NGF-β 表达

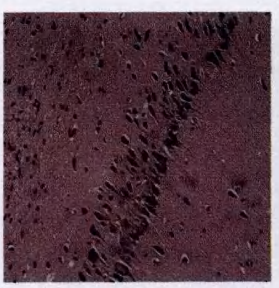
从下图可以看出，A 组表达较低，且全为正常细胞。B 组核固缩细胞增多，NGF-β 仅在未固缩的细胞上出现较强表达。C 组 NGF-β 的阳性表达明显比 B 组增多，固缩细胞减少。D 组较 C 组 NGF-β 的阳性表达增多，且逐渐呈区域状。E 组 NGF-β 阳性表达最强，几乎呈区域状（图 2）。每组随机取 5 个视野计算 NGF-β 阳性表达细胞的个数（表 3）。

3 讨 论

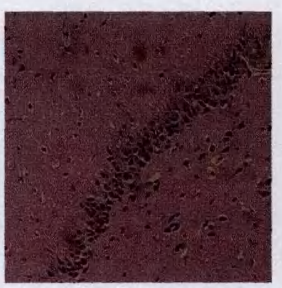
缺血性脑血管病因其高发病率、高致残率、高死亡率而



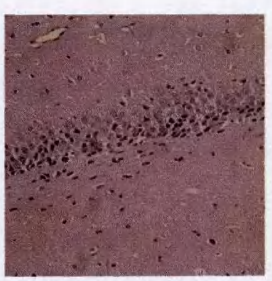
A. 正常组：细胞形态正常，无核固缩



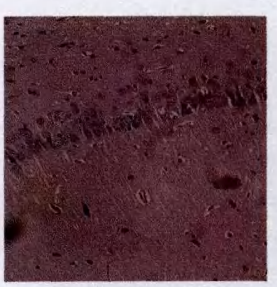
B. 模型组：几乎所有细胞出现核固缩



C. MT 0.46 mg/kg：核固缩细胞减少，有少量正常细胞

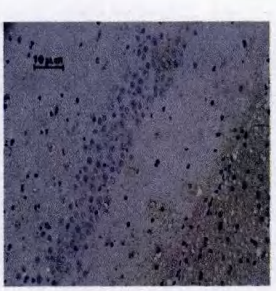


D. MT 1.4 mg/kg：正常细胞比 C 图增多，核固缩细胞减少

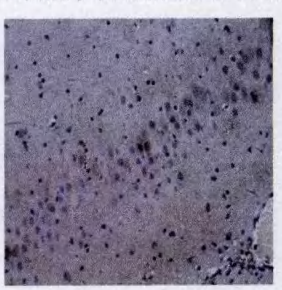


E. MT 4.2 mg/kg：大部分表现为正常细胞，核固缩细胞几乎没有

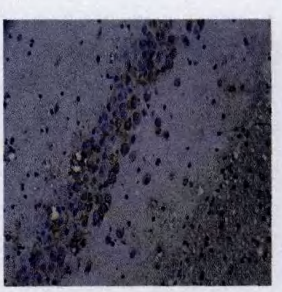
图 1 I/R 大鼠海马组织病理形态学变化（HE，400×）



A. 正常组：NGF-β 低表达以维持满足正常生理需要



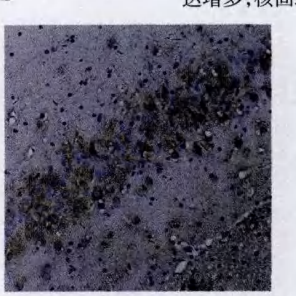
B. 模型组：NGF-β 在未固缩死亡的细胞上出现强表达



C. MT 0.46 mg/kg：与 B 组相比 NGF-β 表达增多，核固缩细胞减少



D. MT 1.4 mg/kg：更多的 NGF-β 表达表明存活细胞的增多和固缩细胞的减少



E. MT 4.2 mg/kg：NGF-β 的表达几乎布满了整个海马，核固缩细胞几乎没有

图 2 MT 对 I/R 大鼠海马 NGF-β 表达的影响（400 ×）

表 1 MT 对 I/R 大鼠行为学的影响（$\bar{x} \pm s$，n=10）

分组	剂量(mg/kg)	卒中指数	神经病学指数
正常组		0	0
模型组		5.4 ± 1.6**	5.5 ± 1.1**
MT 治疗组	0.42	5.3 ± 1.3	4.9 ± 0.7
	1.4	3.7 ± 0.9△△	3.4 ± 0.7△△
	4.2	2.7 ± 0.6△△	2.3 ± 0.8△△

与正常组比较 *P<0.05，**P<0.01；与模型组相比△P<0.05，△△P<0.01

表 3 MT 诱导 I/R 大鼠海马 NGF-β 阳性表达细胞计数（$\bar{x} \pm s$，n=5）

组别	A	B	C	D	E
NGF-β 阳性表达细胞	10.4 ± 2.9	28.2 ± 3.7**	60.1 ± 5.4△△	82.2 ± 5.6△△	174.1 ± 8.6△△

和正常组比较 *P<0.05，**P<0.01 和模型组比较△P<0.05，△△P<0.01 A.正常组；B.模型组；C. MT 0.46 mg/kg；D. MT 1.4 mg/kg；E. MT 4.2 mg/kg

严重危害人类健康，不但影响患者生活质量，而且给患者家庭和社会带来沉重的负担。缺血性脑血管病的发病机制至今尚未阐明，至今仍是广大学者关注的焦点。

实验结果显示，大鼠全脑缺血再灌注后，卒中指数和神经病学指数与正常大鼠相比有明显改变，大鼠两侧海马出现明显的核固缩，细胞层次明显减少，这说明建立的全脑缺血再灌注模型是成功的。

在实验中还发现，在用 MT 后，卒中指数和神经病学指数，都从 D 组开始表现有显著效果。组织形态学上，MT 组明显表现出固缩细胞减少，且 E 组效果最明显。在免疫组化实验中，C、D、E 组和 B 组相比，在海马的 NGF-β 表达上有明显提高。且刘学忠等[7]的实验也说明在 I/R 大鼠中补充外援性 MT 后有明显的抗氧化作用。以上说明，MT 对脑缺血再灌注损伤有保护作用。

细胞凋亡（Apoptosis）是急性脑缺血后缺血区细胞死亡的重要形式之一[8]，而神经元存活多少是决定缺血性损伤脑区神经功能恢复的主要因素。神经生长因子（Nerve growth factor）是神经营养因子家族的重要成员，其活性形式为 NGF-β。其对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持起重要作用。在神经元的损伤过程中，能促进神经元的有丝分裂、分化和修复，促进雪旺氏细胞和胶质细胞生长[9,10]，增加神经元对缺血再灌注损伤的耐受性，使神经元避免再次损伤，减少凋亡神经元。从本实验可以看出，在脑缺血再灌注损伤严重的海马区，MT 促进了 NGF-β 的阳性表达。从图 2 可以看出，正常组海马 NGF-β 虽然有表达，但并不强烈，因为其仅为维持正常细胞生长，并不要求大量的 NGF-β。模型组的 NGF-β 表达范围减少，因为大量细胞死亡，但在少数正常细胞上有强表达，说明脑损伤可刺激自身分泌的 NGF-β 增多，以应对大量损伤的神经元。但自身分泌的 NGF-β 并不能有效的阻止缺血再灌注时细胞的损伤，导致细胞大量凋亡。在加入外源性 MT 后，NGF-β 表达呈一个上升趋势，高剂量的 MT 使 NGF-β 呈高表达，且正常细胞也较模型组有明显增多，说明 MT 是一种可促进 NGF 表达的生物蛋白，缺血再灌注时，对保护神经元和修复损伤神经元有重大作用，减少了脑损伤时神经元的凋亡。

综上所述，MT 作为一种新兴的生物蛋白，在脑缺血/再灌注损伤中扮演了重要的角色。本文仅初步探讨了外源性 MT 对脑缺血/再灌注损伤的保护作用，其开发利用尚待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Geng MY, Xin XL, Li J. The prevention and cure drug and mechanism of cerebral ischemia[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.66-91.

[2] Yao C Y, Zhu W W, Niu J Y et al. The medical research progress of metallothionein[J]. Studies of trace elements and health, 2007, 124(3): 53-55.

[3] 孙忠东，高尚志. 金属硫蛋白对离体心脏细胞凋亡和 NO、NOS 表达的影响[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2005, 21(3): 170-172.

[4] 陈 魁，杨国杰. 金属硫蛋白对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中原医刊, 2005, 32(19): 1-3.

[5] Li L, Guo J Z, Zhou Q X. The estabilshment of mouse's dysmnesia model induced by cerebral ischemia and reperfusion[J]. Journal of Chong qing Medical University, 2005, 30(3): 412-415.

[6] Wang H Y, Li W, Sun B Q, et al. Pathlolgical reserrch in neuron damage after repetitive ischemia-reperfusion of rat's frontal cortex and hippocampus histology[J]. Chinese journal of gerontology, 2006, 8(26): 1088-1090.

[7] 刘学忠，崔 旭. 金属硫蛋白在大鼠全脑缺血再灌注中的神经保护作用[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 42-45.

[8] Li X G, Zhu K, Li N. Study on glutamate-induced Ca2+ influx and apoptosis-like death in cultured neurons and protective effect of glutamate receptor antagonist[J]. Chinese journal of geriatric cardiovascular and cerebrovascular diseases, 2001, 3(2): 122-125.

[9] Bothwell M E D. Neuronal growth factors[M]. Berlin: springerverlag, 1991, 122-125.

[10] Zhang J D, Hou T S, Zhao D L, et al. The effect of high dose methylprednisolone on tatal nerve growth factor with injured spinal cord in rat[J]. Chinese journal of surgery, 1995, 33(12): 727-729.

（责任编辑：关蕴良）