

川芎素对脑缺血再灌注损伤细胞外 信号调节激酶活化的影响* *R28 A*

王 强¹ 熊利泽¹ 陈绍洋¹ 王 颖² 金卫林² 路志红¹

摘要 **目的:**观察大鼠局灶性脑缺血/再灌注后信号转导介质细胞外信号调节激酶(ERKs)的活化情况以及川芎素对其影响。**方法:**雄性成年 SD 大鼠 45 只,随机分成 3 组:假手术组、对照组和川芎素组(每组 15 只),分别于缺血时腹腔注射生理盐水 4ml,生理盐水 4ml 和川芎素 100mg/kg(川芎素用 4ml 生理盐水溶解)。采用线栓法致大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,在脑缺血再灌注后的 2h、6h、12h、24h 和 72h 分别处死大鼠(各组每个时间点 3 只),将脑组织进行免疫组织化学和病理组织学染色观察。**结果:**病理组织学显示,缺血再灌注 2h,川芎素组缺血侧皮层神经细胞缺血性损伤较对照组减轻。脑缺血诱导 ERKs 活化,第 6h 达高峰,并持续到 72h。川芎素组 ERKs 活化明显较对照组增强,而且各时间点 ERKs 免疫反应阳性细胞数川芎素组显著较对照组增多($P < 0.01$)。**结论:**局灶性脑缺血再灌注可诱导缺血脑细胞部分 ERKs 活化,川芎素干预可使缺血大鼠皮层 ERKs 活化增强,减轻皮层细胞的缺血性损伤。

关键词 注射用川芎素 脑缺血 细胞外信号调节激酶

Effect of Sodium Ferulate on Activation of Extracellular Signal Regulated Kinase after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats WANG Qiang, XIONG Li-ze, CHEN Shao-yang, et al *Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an (710032)*

Objective: To study the activation of extracellular signal regulated kinase (ERK) after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and the effect of sodium ferulate (SF) on it. **Methods:** Forty-five male adult SD rats were randomly divided into 3 groups, the sham-operated group, the control group and the SF group. The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by thread ligation method, and in the ischemic phase, to rats in the sham-operated and the control group 4 ml of normal saline was intraperitoneally injected, and to rats in the SF group, 100 mg/kg of SF dissolved in 4 ml of normal saline was injected. The rats were decapitated at 2 hrs, 6 hrs, 12 hrs, 24 hrs and 72 hrs after reperfusion, 3 rats of every group at each time point, and rats brains were taken for immunohistochemistry and histopathological examination. **Results:** Histopathological examination showed that the cerebral ischemic damage in the SF group was significantly milder than that in the control group at 2 hrs after reperfusion. The cerebral ischemia induced ERK activation reached the peak at 6 hrs and maintained to 72 hrs after reperfusion. As compared with the control group, the ERK activation in the SF group was significantly enhanced with increased positive immune reacted cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** Cerebral ischemia/reperfusion could induce the activation of ERK in the ischemic brain cells, intervention of SF could enhance the activation and alleviate the ischemic injury in cerebral cortex.

Key words sodium ferulate injection, cerebral ischemia, extracellular signal regulated kinase

近年来,人们对脑缺血再灌注损伤机制进行了广泛研究,认为细胞信号转导级联参与调节中枢神经系

统神经细胞的损伤^[1]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一组分布于胞浆中具有丝氨酸/酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERKs), c-jun 氨基末端蛋白激酶(c-jun N-terminal protein kinases, JPKs)和 P₃₈ MAPK 激酶,可对多种细胞外刺激起反应而调节细胞信号,被认为是从细胞表面到细胞核信号转导的重要介质^[2]。ERKs

* 全军“十五”医药卫生科研基金资助项目(No. 01M118);第四军医大学金桥工程基金资助项目(No. 01015)

1. 第四军医大学西京医院麻醉科(西安 710032);2. 第四军医大学神经生物研究所

通讯作者:陈绍洋, Tel: 029-3375343, Fax: 029-2510219, E-mail: chensy@fmmu.edu.cn

活化与细胞存活或再生有关。我们的研究^[3]表明川芎素(又称阿魏酸钠 sodium ferulate, SF)对短暂性局灶性脑缺血损伤有明显保护作用。本研究选择血管内栓线法致大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察大鼠大脑缺血再灌注后 ERKs 活化及 SF 对其影响,探讨 SF 防治缺血性脑血管病的作用可能机制。

材料与方法

1 动物与分组 雄性成年 SD 大鼠 45 只,体重 300~350g,由第四军医大学动物实验中心提供。随机分成 3 组:假手术组、对照组和 SF 组,每组 15 只。

2 药物和试剂 注射用 SF:每支含生药 100mg,四川远望药业成都制药厂,批号:990202;异氟醚:每瓶 100ml, AstraZeneca, 英国;兔抗 ERK₁/ERK₂ (P44/P42 MAPKs) 多克隆抗体: New England Biolab Inc, 美国;鼠抗兔 IgG、ABC 复合物和多聚甲醛为美国 Sigma 公司产品。

3 仪器 多功能监测仪: Spacelab, 美国;麻醉呼吸机: Acoma, 日本;麻醉气体分析仪: Ohmeda, 丹麦;尼龙线(3-0): Ethicon, 日本;冷冻切片机: Cryocut 1800, 美国;图像分析仪: Leica Q500MC, 瑞士;全自动显微镜照相装置: Olympus PM-CBAD, 日本。

4 实验方法

4.1 脑缺血模型制作 大鼠术前禁食 12h, 不禁水。大鼠用 4% 异氟醚诱导麻醉, 2% 异氟醚吸入维持麻醉深度, 保留自主呼吸。术中体温由肛温探头连接多功能监测仪监测, 并用烤灯维持在 37~37.5℃。

大脑 MCAO 模型采用右侧颈内动脉尼龙线栓法, 根据 Zea Longa 等^[4]的改良方法, 并参照我们以前的报道^[5]即动物麻醉后取颈正中切口, 暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉, 结扎颈总动脉、颈外动脉, 于颈总动脉分叉下方剪一切口, 将一预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线置入颈内动脉 17.5mm, 直到有轻微阻力感为止。阻闭 120min 后抽出尼龙线, 恢复再灌注。假手术组一切同对照组, 仅不行血管内栓线。术后苏醒回笼, 自由食水。

4.2 给药方法 假手术组、对照组和 SF 组分别于缺血时腹腔注射生理盐水 4ml、生理盐水 4ml 和 SF 100mg/kg (SF 用 4ml 生理盐水溶解)。

4.3 组织切片制备 大鼠脑缺血再灌注后 2h、6h、12h、24h 和 72h, 在深麻醉下开胸暴露心脏, 经升主动脉插管剪开左心耳, 用生理盐水 100ml 左右快速冲洗, 随后用 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(4℃, pH7.4)

灌注约 400ml 固定, 取脑浸入 20% 蔗糖溶液, 4℃ 冰箱中过夜。应用 Cryocut 1800 冷冻切片机自视交叉处开始向后切成 40μm 冠状位切片(各组再灌注 2h 的间隔切成 6μm 和 40μm 冠状位切片)。

4.3.1 HE 染色 6μm 切片用 HE 染色, 简要步骤如下: 贴片, 空气中干燥, 入二甲苯脱脂, 乙醇梯度脱水, 苏木素-伊红(HE)染色, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察。

4.3.2 免疫组织化学 40μm 切片采用常规 ABC 法(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex technique)进行染色, 即将切片在 30% Triton X-100 液中孵育 30min, 用 0.01mol/L 磷酸缓冲液(PBS)漂洗 10min 3 次, 把切片浸入兔抗 ERK₁/ERK₂ (P44/P42 MAPKs) 多克隆抗体(1:500), 置 4℃ 冰箱孵育 48h, 再次用 0.01mol/L PBS 漂洗 10min 3 次, 切片浸入生物素结合鼠抗兔 IgG(1:200)室温孵育 2h, 再经 0.01mol/L PBS 冲洗 10min 3 次后, 切片浸入 ABC 复合物(1:200)温孵育 2h。用 PBS 充分洗后, 采用硫酸镍胺加强的 DBA 蓝色反应法显色。贴片, 空气中干燥, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 在显微镜下观察 ERKs 活化。

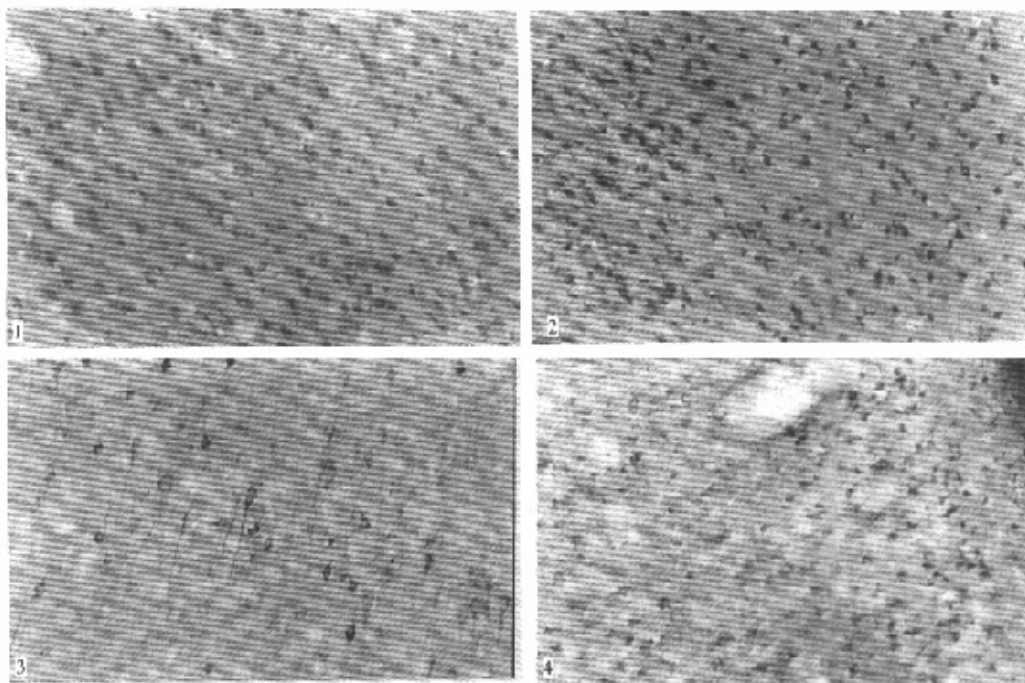
4.4 计算机辅助图像分析 应用图像分析仪(Q500MC), 经过免疫细胞化学染色的切片在光学显微镜下放大 200 倍, 图像经过摄像机转变为电信号, 再转换成可被计算机直接处理和储存的数字信号, 并可同时在监视器上显示。每组大鼠取同部位切片, 每张切片在缺血侧皮层 ERKs 活化区选 5 个视野, 进行着色细胞图像分析, 然后计算 ERKs 阳性细胞的个数, 进行半定量测量。

5 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间同一时间点的比较采用 *t* 检验。

结果

1 HE 染色 病理组织学研究显示, 假手术组皮层神经元形态结构正常; 对照组大鼠缺血侧大脑皮层神经元呈缺血性改变, 大量神经元出现变性坏死, 表现为胞体缩小呈三角形, 胞浆为伊红性, 核固缩深染, 核仁消失, 细胞周围间隙等(见图 1)。SF 干预组缺血侧皮层神经细胞亦呈缺血改变, 但只有部分细胞固缩, 深染程度较轻, 细胞无缩小, 细胞周围间隙改变不明显(见图 2)。

2 免疫组织化学 在假手术组中, 非缺血大鼠的皮层、海马区, 纹状体均未见 ERKs 免疫阳性细胞。在缺血对照组中, 2h 即可发现缺血侧大脑皮层出现明



注:图1 再灌注 6h 对照组大鼠缺血侧大脑皮层神经元形态(200×); 图2 再灌注 6h SF 组大鼠缺血侧大脑皮层神经元形态(200×); 图3 再灌注 6h 对照组大鼠缺血侧皮层 ERKs 免疫阳性细胞(200×); 图4 再灌注 6h SF 组大鼠缺血侧皮层 ERKs 免疫阳性细胞(200×)

显的 ERKs 免疫阳性反应,6h 达高峰,一直持续到缺血再灌注 72h。从解剖学上看,ERKs 活化主要分布在大脑皮层的外侧呈散在的斑点状分布(见图 3)。其次 ERKs 在纹状体和海马区亦有少量分布,但重复性差。ERKs 阳性细胞位于脑皮层神经核、胞浆、胞膜和轴突、树突中呈淡蓝色。与对照组比较,SF 干预大鼠其缺血侧大脑皮层 ERKs 活化明显增强,广泛分布于大脑皮层外侧 1/2 的区域,形成宽的带状分布区,且区域重复性好。ERKs 阳性颗粒分布于神经元细胞核、胞浆、胞膜和突轴树中,分布密,染色偏深(见图 4),而且纹状体 ERKs 阳性活化也较多。

3 计算机辅助图像分析 单纯缺血组与 SF 干预组缺血脑组织中均有 ERKs 活化,但 ERKs 免疫反应阳性细胞的个数是不相同的。大鼠脑缺血再灌注后 2h、6h、12h、24h 和 72h,两组间 ERKs 免疫反应阳性细胞数差异有显著性($P < 0.01$),见表 1。

表 1 缺血再灌注后不同时间点两组大鼠缺血侧皮层 ERKs 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERKs 阳性细胞数(个)				
		2h	6h	12h	24h	72h
对照	15	19 ± 11	106 ± 38	87 ± 29	62 ± 31	49 ± 17
川芎素	15	41 ± 14*	187 ± 45*	142 ± 37*	112 ± 26*	78 ± 25*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

讨 论

采用组织病理学和免疫组织化学方法,证明局灶性脑缺血再灌注期间,大鼠缺血侧皮层及纹状体,ERKs 活化增多;SF 可减轻脑缺血损伤且能增加 ERKs 活性。

随着对脑缺血再灌注损伤机制研究的不断深入,越来越多的证据表明细胞信号转导系统对缺血后中枢神经系统神经细胞的存活与死亡起着重要的调节作用^[1]。MAPKs 是一组分布于胞浆中具有丝氨酸/酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,激活的 MAPKs 通过磷酸化多种转录因子、细胞骨架相关蛋白和其它酶类等多种蛋白底物来调节多种细胞生理过程,从而对刺激细胞的信号作出必要的反应,参与了细胞生长、发育、分裂、死亡及细胞间的功能同步化等多种生理过程,是细胞外信号引起的细胞核反应的共同通路^[2]。通过对脑缺血后 MAPKs 途径的研究,了解在脑缺血后其动态、复杂和时间依赖性的变化环节和规律,以寻找可行的方法来调控,阻断信号传导途径来减少神经细胞的死亡,从而为脑缺血/再灌注损伤的基础研究和临床救治提供新的视角和手段。

目前对 ERKs 研究较清楚,认为 ERKs 激活与细

胞增殖有关^[6],促进细胞存活^[7,8]。虽然脑缺血后 ERKs 激活已有报道^[6-11],但对脑缺血后 ERKs 激活的时序性变化规律及对缺血性损伤的作用尚未达成共识。Wu DC 等^[9]应用大鼠永久性 MCAO 局灶缺血模型研究,显示 ERKs 在缺血后 30min 开始被激活,高峰活化时增加了 2.7 倍。另有研究^[8,11]发现心跳骤停再灌注后 ERKs 活性增加,再灌注 6h 达高峰,我们的研究与此结果是一致的。

虽然脑缺血后 ERKs 的活性增强,在缺血区活化增多是一致的,但 ERKs 在脑缺血后对神经元的作用存在争议。Alessandrini A 等^[12]报道在局灶性脑缺血前 30min 应用 ERKs 抑制剂可分别减少再灌注 2h 和 72h 55% 和 36% 的梗塞容积,同时 ERKs 的活化减少,认为 ERKs 在脑缺血中被活化起神经毒性作用,诱导缺血性损伤。Sugino T 等^[10]研究发现沙土鼠短暂 5min 全脑缺血后,ERKs 在海马 CA3 区和齿状会活化增加,而在 CA1 区未见 ERKs 活化。在缺血前 30min 腹腔注射不同剂量的 ERKs 抑制剂(PD98059),发现呈剂量依赖性地减少 ERKs 的活化,但并不影响 CA1 和 CA3 区神经元的存活,认为脑缺血后 ERKs 的激活与决定神经元存活和死亡没有明显的关系。另一方面,更多的文献^[7,8]报道 ERKs 在脑缺血后活性增加,与改善神经元存活有关,而且最近有学者^[6,13]研究认为 ERKs 激活是预处理产生神经元缺血耐受性的关键机制。脑缺血后 ERKs 激活的时序性变化不一致及其对缺血性损伤的不同作用,可能与实验动物模型如缺血和再灌注持续时间和动物种类不同有关。

我们的研究^[3]证明 SF 可显著减少 MCAO 致大梗塞容积和改善神经功能缺陷,本实验进一步从组织病理学证实 SF 可减轻脑缺血性损伤,并且增强 ERKs 的活化。因此,我们认为局灶性脑缺血后 ERKs 激活与神经元的存活有关,SF 可能通过增强脑缺血 ERKs 活性而发挥其神经保护作用,这也许是 SF 治疗缺血性脑血管病的分子机理之一。虽然 SF 对缺血后神经元中 ERKs 的活化,发挥调节作用的机制尚不清楚,但可能与 SF 药理作用,包括直接清除氧自由基、抗氧化、减轻脂质过氧化,抑制血小板聚集,减少细胞内游离钙浓度,抗炎,以及可能是内皮素(ET)-1 拮抗剂、谷胱甘肽 S-转移酶抑制剂、引起 H₂O₂ 处理的淋巴细胞中 bcl-2 增加和 bax 致癌基因降低,从而改善细胞凋亡等有关。确切机制尚待进一步探讨。

参 考 文 献

1 Wieloch T, Hu BR, Boris-Moller A, et al. Intracellular signal

transduction in the postischemic brain. *Adv Neurol* 1996;71:371-387.

2 Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2001;23(1):1-19.

3 王 强,熊利泽,陈绍洋.川芎素对大鼠大脑中动脉栓塞所致脑缺血损伤的保护作用. *第四军医大学学报* 2002;23(24):2309-2311.

4 Zea-longa E, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat. *Stroke* 1989;20(1):84-91.

5 Xiong LZ, Zhu ZH, Dong HL, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces neuroprotection against ischemia in transient not permanent middle cerebral artery occlusion rat model. *Chin Med J* 2000;113(9):836-839.

6 Gu ZL, Jiang Z, Zhang GY, et al. Diphosphorylation of extracellular signal-regulated kinases and c-Jun N-terminal protein kinase in brain ischemic tolerance in rat. *Brain Res* 2000;860(1-2):157-160.

7 Irving EA, Barone FC, Reith AD, et al. Differential activation of MAPK/ERK and P38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;77(1):65-75.

8 Hicks SD, Parmele KT, DeFranco DB, et al. Hypothermia differentially increase extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase/C-Jun terminal kinase activation in the hippocampus during reperfusion after asphyrial cardiac arrest. *Neuroscience* 2000;98(4):677-685.

9 Wu DC, Ye W, Che XM, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20(9):1320-1330.

10 Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J Neurosci* 2000;20(12):4506-4514.

11 Ozawa H, Shioda S, Dohi K, et al. Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Neurosci Lett* 1999;262(1):57-60.

12 Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, et al. MEK₁ protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(22):12866-12869.

13 Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, et al. Requirement for nitric oxide activation of p21 (ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(1):436-441.

(收稿:2002-11-27 修回:2003-05-01)