

## 脑缺血大鼠脑内 AT1 和 AT2 受体表达的免疫组化观察

田锦涛<sup>1)</sup>, 吴长会<sup>1)</sup>, 崔丽娟<sup>1)</sup>, 王光杰<sup>1)</sup>, 赵贵丽<sup>1)</sup>, 吴春云<sup>2)</sup>, 李娟娟<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学 2008 级临床医疗系; 2) 昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 观察成体大鼠脑缺血后脑内是否重新表达血管紧张素 II 受体 (AT1 和 AT2 受体), 探讨 AT1 和 AT2 受体表达变化与脑缺血的关系. **方法** 采用微创开颅法复制大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型, 将 25 只成年雄性 SD 大鼠分为正常对照组 (n=5), 假手术组 (n=5) 和缺血组 (随机分为缺血后 1 d、3 d 和 1 周 3 组, 每组 n=5). 用抗 AT1 和抗 AT2 抗体分别进行免疫组织化学染色. **结果** MCAO 后在缺血半暗区内可见大量 AT1 和 AT2 受体免疫阳性表达的细胞, 分别以缺血后 3 d 和 1 周数目最多, 且免疫阳性反应最强, 与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ). **结论** 脑缺血后大鼠脑内能重新表达 AT1 和 AT2 受体, 通过血管紧张素 II (Ang II) 的介导, 参与脑缺血的病理过程.

**[关键词]** 脑缺血; 血管紧张素 II 受体; 大鼠

**[中图分类号]** R651.1+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 05 - 0012 - 05

## Immunohistochemical Study of AT1 and AT2 Receptors Expression in Cerebral Ischemia at Rats

TIAN Jin - tao<sup>1)</sup>, WU Chang - hui<sup>1)</sup>, CUI Li - juan<sup>1)</sup>, WANG Guang - jie<sup>1)</sup>, ZHAO Gui - li<sup>1)</sup>,  
WU Chun - yun<sup>2)</sup>, LI Juan - juan<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Clinical Medicine; 2) Dept. of Human Anatomy, Histology and Embryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression of AT1 and AT2 receptors following the focal cerebral ischemia in the rats. **Methods** The rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by minimal invasive craniotomy. The twenty-five SD adult male rats were randomly divided into normal control groups (n=5), sham operation groups (n=5), cerebral ischemia groups (including 1 d, 3 d, 1 w groups after MCAO, n=5). Immunohistochemistry was used to observe the expression of AT1 and AT2 receptors by anti-AT1 and anti-AT2 antibodies. **Results** There were a large number of AT1 and AT2 receptors-positive cells in the ischemia border (penumbra) zone. These cells respectively reached the peak in 3 d and 1 w post-injury with the largest number, and the optical density of the AT1 and AT2-positive cells increased strikingly, which showed significantly differences compared with the control groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The adult brain can express AT1 and AT2 receptors after cerebral ischemia as in the developing brain, which may be an important cell source of angiotensin-receptor system involving the pathological processes of ischemia.

**[Key words]** Ischemia; Angiotensin II receptors; Rats

血管紧张素 II (Ang II) 主要有 2 种 G 蛋白偶联受体亚型, 即 AT1 受体和 AT2 受体. AT1 受体主要分布于星型胶质细胞, 除调节血管张力并维持内环境的稳定以外, AT1 受体还参与体内细胞生

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30900778)

**[作者简介]** 田锦涛 (1989~), 男, 云南德宏州人, 2008 级临床医疗系在读本科生.

**[通讯作者]** 李娟娟. E-mail: lijjuanjuan527@163.com

长、凋亡、氧化应激和神经炎症反应<sup>[1-3]</sup>. AT2 受体主要分布于神经元<sup>[4]</sup>, 该受体激活后可引起血管舒张, 调节细胞生长、促进分化和增生, 参与组织结构的重塑和修复<sup>[5]</sup>. 笔者先前的研究发现<sup>[6]</sup>, AT1 和 AT2 受体也表达于生后早期大鼠脑内的阿米巴样小胶质细胞 (amoeboid microglial cell, AMC) 中, 即新生大鼠脑内的巨噬细胞中, 但随着发育, 当 AMC 逐渐转变为静息分支状的小胶质细胞后, AT1 和 AT2 受体表达减弱. 而且, 大量研究表明<sup>[7-10]</sup>, 缺血缺氧是诱发小胶质细胞活化和增殖的重要因素之一. 活化后的小胶质细胞形态和功能与 AMC 相似. 故本实验拟采用大鼠中动脉闭塞大鼠中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 应用免疫组织化学技术, 观察大鼠脑缺血后激活的小胶质细胞是否也像 AMC 一样重新表达 AT1 和 AT2 受体, 成为脑内血管紧张素受体系统的一个重要细胞来源, 参与脑缺血的病理过程.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

成年健康雄性 SD 大鼠 26 只, 体重 250 ~ 280 g, 由昆明医科大学实验动物供应中心提供. 1 只用于 TTC 染色, 其余 25 只随机分为正常对照组 (n = 5)、假手术组 (n = 5) 和脑缺血组, 其中脑缺血组按大鼠中动脉阻断后 1 d、3 d 和 1 周又分为 3 个亚组 (n = 5). 实验大鼠于术前禁食 12 h.

### 1.2 大鼠 MCAO 模型复制

大鼠 MCAO 模型采用微创开颅法复制, 按照 Tamura 等<sup>[11]</sup>方法, 行右侧大鼠中动脉电凝术, 造成大鼠局灶性永久性脑缺血. 假手术组以同样方法暴露大鼠中动脉, 但不阻断血流.

### 1.3 TTC (2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑) 染色

MCAO 后 1 d, 大鼠麻醉后断头取脑, -4℃ 冰冻 30 min, 沿冠状面四等分连续切片, 浸入含 1% TTC 溶液中. TTC 染色可将缺血区染成苍白色, 正常区域染成红色, 且界限清楚.

### 1.4 组织样品制备及免疫组化染色 (S-P 法)

按照预设缺血时间, 定时将实验大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 经左心腔 2% 多聚甲醛灌注内固定、取脑, 石蜡包埋、连续切片 (厚度 8 μm)、贴片、脱蜡附水. 用柠檬酸盐抗原修复液对切片行热修复 (15 min), 0.1% PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次; 用内源性过氧化物酶阻断剂封闭 15 min, 0.1% PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次; 滴加 5% 羊血清封闭 15 min 后倾去血清, 分别用小鼠抗

兔 AT1 和 AT2 抗体 (1:200) 室温孵育过夜; 阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗. 生物素标记的二抗 (羊抗兔 IgG, 1:200), 室温 30 min; 链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化物酶溶液室温孵育 12 min; DAB 显色, 阳性产物呈棕色, 中性树胶封片, 显微镜下观察.

### 1.5 图像分析

用显微照相系统分别对脑缺血半暗区与对侧脑区 AT1 和 AT2 受体阳性细胞进行采图, 应用 Image Pro Plus 6.0 图文分析系统分别测量其平均光密度值 [注: 光密度 (optical density, OD) 又称吸光度, OD 值越大, 所测物质浓度越高, 反之则低].

### 1.6 统计学处理

实验数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 统计软件处理数据. 对 AT1 和 AT2 阳性细胞光密度的半定量结果进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 TTC 染色及 MCAO 后 AT1 和 AT2 受体

TTC 染色结果显示 (图 1A): 红色区代表正常脑组织, 白色区代表缺血区, 在缺血区与正常脑组织交界处为缺血半暗区. MCAO 后, AT1 和 AT2 受体阳性细胞主要集中在缺血半暗区, 形成一条细胞集中的区带 (图 1B、C).

### 2.2 大鼠 MCAO 后不同时间点脑内 AT1 受体的免疫组织化学表达变化

免疫组化结果显示, 正常对照组和假手术组中, AT1 受体表达为阴性 (图 2A). MCAO 后不同时间点在缺血半暗区内可见大量 AT1 受体免疫反应阳性细胞, 细胞呈圆形或胞体为灌木样、突起消失, 形似激活的小胶质细胞. 阳性细胞光密度值检测结果显示: MCAO 后不同时间点缺血半暗区 AT1 受体阳性表达强度明显升高, 并随缺血时间的延长逐渐上升, 至缺血后 3 d 达到高峰. 缺血各组与对照组比较均有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 1、图 2.

### 2.3 大鼠 MCAO 后不同时间点脑内 AT2 受体的免疫组织化学表达变化

免疫组化结果显示, 正常对照组和假手术组中, AT2 受体表达为阴性 (图 3A). MCAO 后不同时间点在缺血半暗区中, AT2 受体免疫反应阳性细胞数量增多, 可见一些体积较神经元小、圆形、突起消失的阳性反应细胞, 形似激活的小胶质细胞. 阳性细胞光密度值检测结果显示: MCAO 后不同时间点缺血半暗区 AT2 受体阳性细胞表达强度明显升高, 随缺血时间的延长逐渐上升, 并在缺血

后 1 周达到高峰.缺血各组与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2, 图 3.

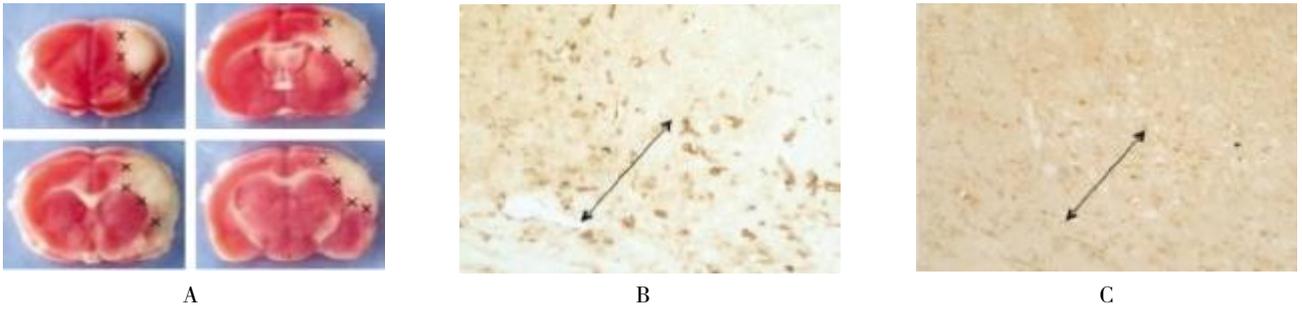


图 1 大鼠脑缺血后脑组织 TTC 染色和 AT1、AT2 受体的免疫组化染色

Fig. 1 Brain tissue with TTC staining following cerebral ischemia in adult rats and the immunohistochemical staining of AT and AT2 receptors

A:TTC 染色, 红色为正常灌注区, 白色为缺血区, “x” 示缺血半暗区;  
B、C:分别示脑缺血后, AT1、AT2 受体免疫反应呈阳性表达 ( $\times 40$ ), 双箭头示缺血半暗区.

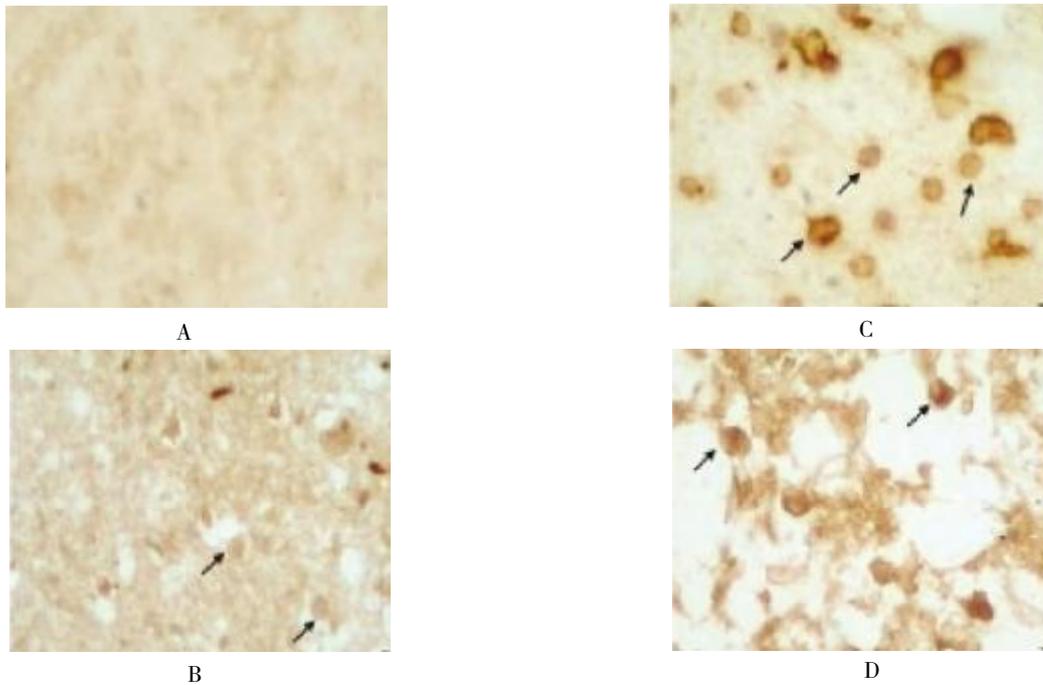
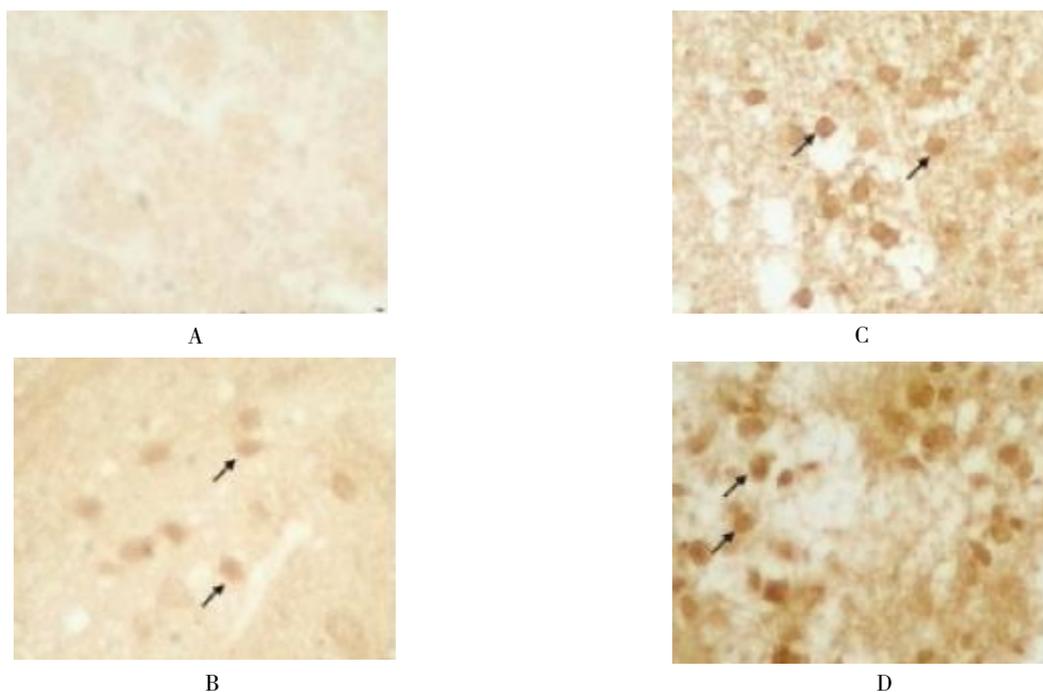


图 2 AT1 受体的免疫组化染色 ( $\times 400$ )

Fig. 2 The immunohistochemical staining of AT1 receptor ( $\times 400$ )

A:对照组, AT1 受体免疫反应呈阴性表达; B:缺血 1 d 组; C:缺血 3 d 组; D:缺血 1 周组.

图 3 AT2 受体的免疫组化染色 ( $\times 400$ )Fig. 3 The immunohistochemical staining of AT2 receptor ( $\times 400$ )

A:对照组, AT2 受体免疫反应呈阴性表达; B:缺血 1 d 组; C:缺血 3 d 组; D:缺血 1 周组.

表 1 大鼠脑缺血组、对照组 AT1、AT2 受体表达平均光密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 1 The average optical density of AT1 and AT2 receptor expression in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	AT1 受体 (平均光密度值)	AT2 受体 (平均光密度值)
假手术组	11.40 $\pm$ 3.37	15.41 $\pm$ 2.77
对照组	18.32 $\pm$ 2.11	21.48 $\pm$ 2.43
1 d 组	43.01 $\pm$ 2.21*	37.11 $\pm$ 2.36*
3 d 组	60.34 $\pm$ 2.78*	45.09 $\pm$ 3.01*
1 周组	44.81 $\pm$ 3.89*	48.66 $\pm$ 3.83*

与对照组比较, \* $P < 0.05$ .

### 3 讨论

本研究发现, 在局灶性脑缺血后不同时间点 AT1 和 AT2 受体的表达均增多, 且阳性表达细胞形态呈圆形或胞体为灌木样、突起消失, 形似激活的小胶质细胞. 说明脑缺血后激活的小胶质细胞能重新表达 AT1 和 AT2 受体.

肾素 - 血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 是体内重要的体液调节系统, 脑内亦存在独立的 RAS 系统. 有研究表明, 在脑内独立的 RAS 系统中, Ang II 通过 AT1 受体介导脑动脉、微动脉血管的收缩效应, 促进儿茶酚胺、前列腺素释放, 引起血管平滑肌细胞过度肥厚或增生, 增加细胞内钙含量, 造成血管损伤后新生内膜过度增

生, 从而导致血管堵塞, 发生卒中<sup>[12]</sup>. 而 AT2 受体作用似乎是对 AT1 受体作用的拮抗和平衡<sup>[4]</sup>, 它在脑血流自动调节中起重要作用. 激活的 AT2 受体能促进侧支循环开放, 从健侧脑半球盗血至缺血侧半球, 改善脑血液循环<sup>[13]</sup>. 另外, 大量的临床实践证明, 应用 Ang II 受体阻滞剂 (ARB) 阻断 Ang II 与 AT1 受体的结合, 对预防脑卒中的发生起到显著的成效<sup>[14]</sup>.

笔者先前的研究发现<sup>[5]</sup>, 脑缺血后, 缺血半暗区 Ang II 表达增强, 并有大量神经元变性坏死. 而本实验研究显示, MCAO 后不同时间点在缺血半暗区 AT1 受体表达逐渐升高, 缺血后 3 d 达到高峰, 之后开始下降; AT2 受体的表达升高较 AT1 受体缓慢, 表达高峰时间在 MCAO 后 1 周组. 提示 AT1 受体在脑缺血损伤的急性期, 可能通过介导急

性缩血管反应,参与缺血后氧化应激和神经炎症反应,导致缺血后损伤加重.而 MCAO 后 AT2 受体表达的缓慢上调,其功能可能就是抑制 AT1 受体的作用,通过舒张血管,抑制细胞氧化和凋亡,减轻脑损伤;通过调节细胞生长和分化,参与组织结构的重塑和修复<sup>[3-5,16]</sup>.

大鼠脑缺血后激活的小胶质细胞能重新表达 AT1 和 AT2 受体,并在缺血后不同时间点表达增强,Ang II 可能通过介导 2 种受体发挥损伤和保护的双重作用,参与脑缺血的病理过程.

### [参考文献]

- [1] BENICKY J, SANCHEZ-LEMUS E, HONDA M, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 36(4): 857 - 870.
- [2] SUZUKI Y, RUIZ-ORTEGA M, LORENZO O, et al. Inflammation and angiotensin II [J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2003, 35(6): 881 - 900.
- [3] LI J, CULMAN J, HORTNAGL H, et al. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury [J]. *FASEB J*, 2005, 19(6): 617 - 619.
- [4] CAREY R M, WANG Z Q, SIRAGY H M. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function [J]. *Hypertension*, 2000, 35(1): 155 - 163.
- [5] ZAPPAROLI A, FIGUEIREDO J F, BOER P A, et al. Impaired dipsogenic and renal response to repetitive intracerebroventricular angiotensin II (AngII) injections in rats [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2011, 12(3): 161 - 168.
- [6] LI J J, LU J, KAUR C, et al. Expression of angiotensin II and its receptors in the normal and hypoxic amoeboid microglial cells and murine BV-2 cells [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(4): 1488 - 1499.
- [7] SOLTYS Z, ORZYLOWSKA - SLIWINSKA O, ZAREMBA M, et al. Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis [J]. *Journal of neuroscience methods*, 2005, 146(1): 50 - 60.
- [8] KATO H, TAKAHASHI A, ITOYAMA Y. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat [J]. *Brain research bulletin*, 2003, 60(3): 215 - 221.
- [9] SCHILLING T, QUANDT F N, CHERNY V V, et al. Up-regulation of Kv1.3 K (+) channels in microglia deactivated by TGF-beta [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2000, 279(4): 1123 - 1134.
- [10] SUK K, PARK J H, LEE W H. Neuropeptide PACAP inhibits its hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia [J]. *Brain research*, 2004, 1026(1): 151 - 156.
- [11] TAMURAA, GRAHAMDI, MCCULLOCH J, et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1(1): 53 - 60.
- [12] 杨卉, 王赤波, 梁辉. 肾素-血管紧张素系统与卒中 [J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 2001, 9(4): 227 - 229.
- [13] FERNANDEZ L A, CARIDE V J, S TROMBERG C, et al. Angiotensin AT2 receptor stimulation increases survival in gerbils with abrupt unilateral carotid ligation [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 24(6): 937 - 940.
- [14] 严晓伟. 血管紧张素 II 受体阻滞剂临床应用进展 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2007, 5(6): 11 - 14.
- [15] 夏青青, 查皓, 王晓娟, 等. AngII 在脑缺血大鼠大脑皮质中的表达及依达拉奉对其干预的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(2): 154 - 160.
- [16] KAGIYAMA T, KAGIYAMA S, PHILLIPS M I. Expression of angiotensin type 1 and 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Regulatory peptides*, 2003, 110(3): 241 - 247.

(2014 - 02 - 16 收稿)