

缺血后适应对大鼠缺血再灌注损伤时 Bcl-2 及 GAP-43 表达变化的影响

钱芳, 朱榆红, 李燕, 严勇, 李春艳, 容伟
(昆明医科大学第二附属医院神经内科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 观察缺血后适应对大鼠缺血再灌注损伤时 Bcl-2 和 GAP-43 表达变化的影响. **方法** 50 只成年健康雄性 SD 大鼠随机分为缺血 2 h 再灌注组 ($n=25$)、缺血 4.5 h 后适应组 ($n=25$). 线栓法制备大鼠中动脉闭塞模型 (MCAO), Lumila Belayev 12 分、Zea Longa 5 分和悬吊实验术后 24 h 进行神经功能评分, TTC 法染色后测量脑梗死体积, 免疫组织化学方法和 Western Blot 检测 Bcl-2 及 GAP-43 蛋白. **结果** 与缺血 2 h 再灌注组相比, 缺血 4.5 h 后适应组神经功能评分和脑梗死体积差异没有统计学意义 ($P>0.05$). 缺血 4.5 h 后适应组 Nogo-A 表达降低, GAP-43 表达增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$). **结论** 缺血后适应能够改善神经功能损伤, 减小脑梗死体积, 增加 GAP-43 的表达以及减少 Nogo-A 的表达, 对缺血的脑组织起保护作用.

[关键词] 缺血后适应; 再灌注损伤; 神经功能; Bcl-2; Nogo-A

[中图分类号] R743.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 12-0012-06

Effects of Ischemic Postconditioning on the Expression of Bcl-2 and GAP-43 in Rats with Ischemia-reperfusion Injury

QIAN Fang, ZHU Yu-hong, LI Yan, YAN Yong, LI Chun-yan, RONG Wei

(Dept. of Neurology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of ischemic postconditioning on the expression of Bcl-2 and GAP-43 in ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** 20 healthy adult male SD rats were randomly divided into ischemia reperfusion for 2h group ($n=25$) and IP for 4.5h group ($n=25$). Intraluminal filament was used to establish the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO). Postoperative 24h, all rats were given the Ludmila 12 points test, Zea Longa 5 points test and over hanging experiments. TTC staining was used to determine the infarct volume. Immunohistochemical method and Western blot were used to detect the expression levels of Bcl-2 and GAP-43. **Results** Compared with ischemia reperfusion 2h group, The neurological function score and infarct volume of ischemic postconditioning for 4.5h group had no statistically significant difference ($P>0.05$). The expression of Bcl-2 and GAP-43 of ischemic postconditioning for 4.5h group had statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Ischemic postconditioning can improve neurologic damage, reduce infarction volume, increase GAP-43 and Bcl-2 expression and has cerebral protective effect.

[Key words] Ischemic postconditioning; Ischemia-reperfusion injury; Nerve function; Bcl-2; Nogo-A

脑缺血再灌注损伤是造成脑神经功能损伤加重的重要原因之一. 缺血后适应对缺血再灌注损伤具有保护作用, 而 Bcl-2 和 GAP-43 是与神经元

凋亡和神经功能修复密切相关的蛋白. 在本实验中, 通过观察缺血再灌注损伤后, 后适应对缺血再灌注损伤后 Bcl-2 和 GAP-43 蛋白的表达情况.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81060102);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目(2008CD018)

[作者简介] 钱芳 (1986~), 女, 云南宣威市人, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事神经内科临床工作.

[通讯作者] 朱榆红. E-mail:yu-hong-lilm@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

3.5%水合氯醛 (北京 Solarbio)、直径 0.26 mm 线栓 (北京沙东生物技术有限公司)、2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑红 (TTC, 北京 Solarbio)、4%多聚甲醛 (PFA, 北京 Solarbio)、一抗, 即 Rabbit anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, SC-25660)、Rabbit anti-GAP-43 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, SC-17790); 二抗, 超敏二步法免疫组化检测试剂盒; 通用型二氨基联苯胺 DAB 底物试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司, DAB-0031/1031);

1.2 实验动物和分组

成年雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 250 ~ 320 g, SPF 级, 由昆明医学院实验动物中心提供 (许可证编号: SCXK (滇) 2011-0004)。应用线栓法经右侧颈内动脉插线栓建立右侧大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 再灌注模型, 即缺血 2 h 再灌注组 ($n = 25$); 缺血 4.5 h 后适应组 ($n = 25$), 在拔出线栓的即刻给予双侧颈总动脉 (Common carotid artery, CCA) 5 次 10s 夹闭 /10 s 再通的处理, 其余步骤同缺血 2 h 再灌注组。

1.3 神经功能评分

1.3.1 参照 Ludmila Belayev 12 分评分法^[1] 姿势反射实验: 无明显神经功能缺失为 0 分, 梗死对侧肢体屈曲为 1 分, 侧推试验阳性为 2 分。肢体放置实验^[2]: (1) 视觉亚实验和; (2) 触觉亚实验, 分为前方和侧方刺激。动物肢体放置反应正常为 0 分; 反应延迟但不超过 2 s 为 1 分; 反应延迟且超过 2 s 为 2 分; (3) 本体觉亚实验, 只有前方刺激。评分标准同前, 总分范围为 0 ~ 10 分, 功能损伤越重, 分数越高。

1.3.2 Zea Longa 评分法 评分标准: 无神经功能损伤为 0 分; 不能完全伸展对侧前肢为 1 分; 行走时向对侧转圈为 2 分; 行走时向对侧倾倒为 3 分; 不能自发行走且意识丧失为 4 分; 死亡为 5 分。

1.3.3 悬吊实验 (Over hanging test, OHT)^[3] 使大鼠双前肢抓住一距离地面高度 50 cm, 直径 0.5 cm 的水平铜棒, 记录大鼠由放置至掉下所需的时间, 记录时间单位为 s。

1.4 TTC 染色及脑梗死体积的测定

大鼠脑术后 24 h 处死 (缺血 2 h 再灌注组 $n =$

10, 缺血 4.5 h 后适应组 $n = 10$), 取脑, 迅速置于冰箱内保存 20 min 左右后取出, 将鼠脑连续冠状等距切片, 共切 5 片。将脑片置于 2% 的 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑 (2, 3, 5- Triphenyl tetrazolium chloride staining, TTC) 中, 室温下避光染色 20 min, 正常脑组织染成深红色, 缺血梗死脑组织呈苍白色。之后用数码相机拍摄, 使用 Image-Pro Plus 6.0 计算机图像分析系统描绘梗死区与非梗死区轮廓, 计算脑梗死体积^[2]。

1.5 HE 染色

将每只大鼠的 5 个蜡块分别切取 1 片脑片, 置于二甲苯 I 中脱蜡 10 min → 二甲苯 II 中脱蜡 5 min → 无水乙醇洗去二甲苯 2 min → 95% 乙醇水化 1 min → 90% 乙醇水化 1 min → 85% 乙醇水化 1 min → 自来水冲洗 2 min → 苏木精染色 5 min → 自来水冲洗 2 min → 1% 盐酸乙醇分化 20 s → 自来水冲洗 1 min → 蒸馏水冲洗 1 min → 伊红染色 3 min → 自来水冲洗 30 s → 85% 乙醇脱水 30 s → 90% 乙醇脱水 30 s → 95% 乙醇 I 脱水 1 min → 95% 乙醇 II 脱水 1 min → 无水乙醇 I 2 min → 无水乙醇 II 2 min → 二甲苯 I 2 min → 二甲苯 II 2 min → 中性树胶封片。染色后, 显微镜下观察细胞核呈蓝色, 细胞质、嗜伊红颗粒呈不同程度的红色。

1.6 Bcl-2 和 GAP-43 免疫组化染色

将缺血 2 h 再灌注组 ($n = 10$) 和缺血 4.5 h 后适应组 ($n = 10$) 分别于术后 24 h 时用 4% 多聚甲醛灌注后处死, 断头取脑去除嗅球和小脑, 浸泡于固定液内固定 24 h, 石蜡包埋。切片后, 3% 过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性, 3% 正常小牛血清 (福州迈新生物技术开发有限公司) 封闭液室温封闭, 加 1:100 稀释的 Bcl-2 和 1:200 稀释的 GAP-43 抗体, 4 °C 过夜; 加二抗室温 2 h; DAB 染色。经脱水、透明、干燥封片后计数阳性细胞。阳性细胞为棕黄色或棕褐色, 细胞浆或细胞膜着色。采用 Image-Pro Plus 6.0 分析系统, 在 400 倍视野下选取相同区域的 2 个视野, 计数 Bcl-2 和 GAP-43 阳性细胞数。

1.7 Bcl-2 和 GAP-43 的 Western Blot

将缺血 2 h 再灌注组 ($n = 10$) 和缺血 4.5 h 后适应组 ($n = 10$) 分别于术后 24 h 时处死, 切取梗死部分至于 -80 °C 的冰箱内保存。进行组织中总蛋白的提取, 置于 -20 °C 保存。经蛋白定量、转膜、免疫反应、化学发光, 显影, 定影和图像分析后得出。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件, 各组间数据用均数 ± 标

准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行正态性检验, 组间比较若满足正态性, 采用 t 检验; 否则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注损伤神经功能评分的影响

缺血 4.5 h 后适应组 24 h 神经功能评分较缺血 2 h 再灌注组对无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 1、图 1。

2.2 缺血后适应对脑梗死体积的影响

大鼠缺血 4.5 h 后适应组 24 h 梗塞体积较缺血 2h 再灌注组无明显差异, 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2、图 2。

2.3 缺血后适应对 MCAO 大鼠脑缺血再灌注后脑组织病理形态的影响

大鼠脑片经 HE 染色后显微镜下观察细胞核呈

蓝色, 细胞质、嗜伊红颗粒呈现不同程度的红色。高倍镜下缺血 2 h 再灌注组可见大脑梗死侧神经元细胞数量减少, 轴突缺失, 细胞层次紊乱, 部分细胞坏死, 有炎性细胞浸润细胞核模糊, 神经元细胞周围可见有空泡的神经纤维; 缺血 4.5 h 后适应组所见较缺血 2 h 再灌注组所见无明显加重, 见图 3。

2.4 缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注后脑组织 Bcl-2 和 GAP-43 表达的影响

缺血 4.5h 后适应组梗塞侧基底节 GAP-43 阳性细胞计数比缺血 2h 再灌注组相应部位 GAP-43 阳性细胞数增加 ($P < 0.05$); 而缺血 4.5 h 后适应组梗塞侧基底节) Nogo-A 阳性细胞计数比缺血 2 h 再灌注组相应部位) Nogo-A 阳性细胞计数减少 ($P < 0.05$), 见表 3、图 4。

大鼠脑组织 GAP-43 和 Bcl-2 蛋白的 Western Blot 结果, 见表 4、图 5 和表 5。

表 1 再灌注组与后适应组各种神经功能评分的比较 [$(\bar{x} \pm s)$, 分]

Tab. 1 Comparison of the nerve function scores between two groups [$(\bar{x} \pm s)$, score]

| 神经功能评分 | 2 h 再灌注组 ($n = 10$) | 4.5 h 后适应组 ($n = 10$) |
|---------------|-----------------------|-------------------------|
| Ludmila12 分法 | 7.80 ± 1.13 | 7.50 ± 0.71 |
| Zea Longa5 分法 | 2.60 ± 0.70 | 2.30 ± 0.48 |
| 悬吊实验 | 16.00 ± 2.50 | 17.00 ± 1.94 |

表 2 再灌注组与后适应组脑梗死体积百分比的比较 [$(\bar{x} \pm s)$, %]

Tab. 2 Comparison of the cerebral infarct volume between two groups [$(\bar{x} \pm s)$, %]

| 组别 | n | 脑梗死体积百分比 |
|------------|-----|--------------|
| 2 h 再灌注组 | 10 | 22.09 ± 4.14 |
| 4.5 h 后适应组 | 10 | 19.65 ± 4.04 |

表 3 两组大鼠术后 24h 脑组织 GAP-43 和 Bcl-2 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of the expression levels of GAP-43 and Bcl-2 24 hour after operation between two groups ($\bar{x} \pm s$)

| 蛋白 | n | 2 h 再灌注组 | 4.5 h 后适应组 |
|--------|-----|--------------|----------------|
| Bcl-2 | 10 | 21.37 ± 7.14 | 77.87 ± 12.92* |
| GAP-43 | 10 | 20.55 ± 6.39 | 37.23 ± 8.73* |

与 2 h 再灌注组比较, * $P < 0.05$ 。

表 4 蛋白提取结果

Tab. 4 The results of protein extraction

| 样本 | 4.5 h | 2 h | 4.5 h | 4.5 h | 2 h |
|----|-------|-----|-------|-------|-----|
| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | 50 | 43 | 64 | 52 | 42 |

表 5 2 组大鼠术后 24 h 脑组织蛋白 Bcl-2 和 GAP-43 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of the protein expression levels of GAP-43 and Bcl-2 24 hour after operation between two groups ($\bar{x} \pm s$)

| 蛋白 | 2 h 再灌注组 | n1 | 4.5 h 后适应组 | n2 |
|--------|---------------|----|----------------|----|
| Bcl-2 | 21.05 ± 15.76 | 5 | 104.05 ± 8.95* | 4 |
| GAP-43 | 26.77 ± 11.55 | 5 | 108.74 ± 4.96* | 4 |

与 2 h 再灌注组比较, *P<0.05.

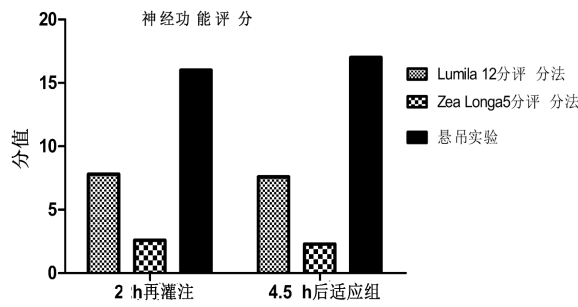


图 1 再灌注组与后适应组神经功能评分的比较

Fig. 1 Comparison of the nevre function scores between two gro ups

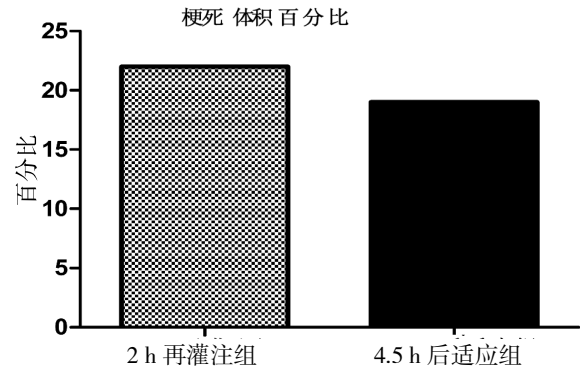
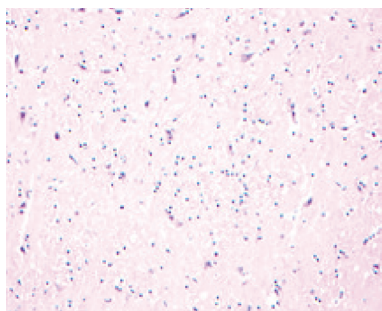
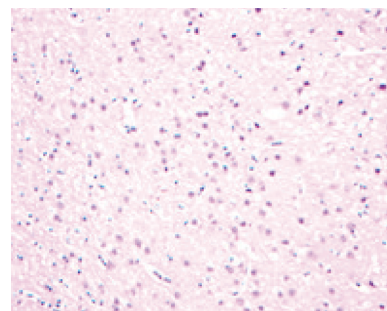


图 2 再灌注组与后适应组脑梗死体积百分比的比较

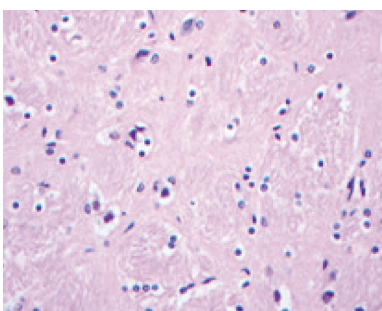
Fig. 2 Comparison of the cerebral infarct volume between two groups



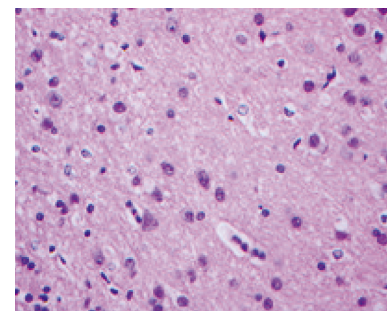
A HE × 200



B HE × 200



C HE × 400



D HE × 400

图 3 2 组大鼠再灌注 24 h 脑组织 HE 染色后病理学观察

Fig. 3 The pathological changes of the brain tissues of rats in two groups after reperfusion for 24 hours

A:缺血 2 h 再灌注组 (2 h group); B:缺血 4.5 h 后适应组(4.5 h group).

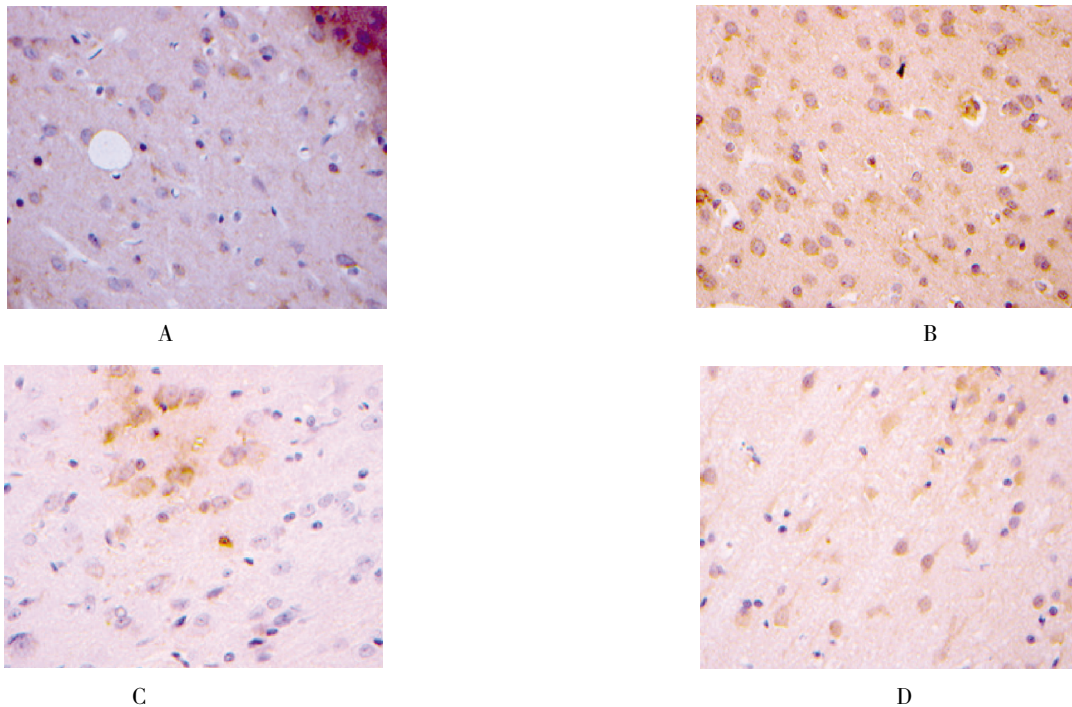


图 4 再灌注组与后适应组大鼠脑组织蛋白 Bcl-2 和 GAP-43 的比较

Fig. 4 Comparison of the expression of Bcl-2 and Gp-43 getwee

A、B 分别为大鼠脑组织基底节区缺血 2 h 再灌注和缺血 4.5 h 后适应组 Bcl-2 免疫组织化学染色；
C、D 分别为大鼠脑组织基底节区缺血 2 h 再灌注和缺血 4.5 h 后适应组 GAP-43 免疫组织化学染色。放大倍数：× 400 倍。

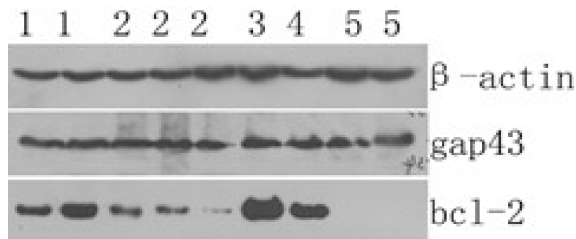


图 5 GAP-43 和 Bcl-2 蛋白的 Western Blot
Fig. 5 Western blot of GAP-43 and Bcl-2

3 讨论

缺血后适应对改善神经功能的机制研究不多。本实验结果显示脑缺血后适应组脑梗死体积和神经功能评分比再灌注组无明显差异，说明夹闭双侧颈总动脉的缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用，其保护作用可能与 Bcl-2 和 GAP-43 的表达变化有关。

在曹霞等^[3]的研究中提示永久性脑缺血大鼠缺血 2 ~ 24 h 梗死灶随时间的延长进行性增大，梗死体积与时间呈相关性，即时间越长，梗死体积越大，至 24 h 时梗死体积则逐渐趋于稳定。本实验再灌注 24 h 后脑梗死体积测定结果显示：大鼠缺血 4.5 h 后适应组梗死体积较缺血 2 h 再灌注组相

比，脑梗死体积无明显差异，提示缺血后适应能减轻大鼠脑缺血 / 再灌注损伤，减小梗死体积。实验结果显示：缺血 4.5 h 后适应组神经功能评分与缺血 2 h 再灌注组神经功能评分比较无统计学差异，表明缺血 4.5 h 后适应组的神经功能缺损较缺血 2 h 在灌注组无加重。提示缺血后适应能够改善大鼠缺血 / 再灌注引起的神经功能障碍，对神经功能的恢复有促进作用。

Bcl-2 是从滤泡性淋巴瘤中分离出来的一种原癌基因，即 B 细胞淋巴瘤 / 白血病基因 -2 (B-cell lymphoma/leukemia-2)。Bcl-2 蛋白是一种跨膜蛋白，有 239 个氨基酸组成，分子量为 25 ~ 26 KD，其羧基端附近有 19 个疏水氨基酸。Bcl-2 在调节神经元凋亡过程中发挥着关键作用。Bcl-2 在已经发育成熟的脑组织中很少有表达，但在处于发育过程的脑中高度表达^[4]，显然它对神经细胞的生长、发育、分化起重要的作用。Bcl-2 主要分布在线粒体外膜、内质网和核周膜，可以调节膜的通透性^[5]。在脑缺血再灌注损伤中 Bcl-2 表达与神经元存活密切相关，对神经元起保护作用。Cao 等^[6]以脂质体为载体，将人源性 Bcl-2 导入 MCAO 局灶脑缺血大鼠脑内，可明显减少脑梗死体积，明显减少梗死区及半影区的细胞凋亡性缺失。本实

免疫组化结果和 Western Blot 结果显示: 缺血 4.5 h 后适应组中 Bcl-2 的表达较缺血 2 h 再灌注组明显增高, 提示缺血后适应能够增加 Bcl-2 蛋白的表达, 减少缺血所引起的细胞损伤和细胞凋亡, 从而使更多的神经细胞存活, 对神经功能的恢复有很大的作用. 对神经细胞有保护作用. 缺血后适应可能通过减少过氧化物的产生, 抑制脂质过氧化反应的水平、降低缺血再灌注后神经元细胞质中的细胞色素 C 的浓度, 阻止凋亡程序的激活, 达到脑保护的作用, 这与 Bcl-2 抑制细胞凋亡的途径类似.

GAP-43 是 80 年代初发现的一种分子量为 24KD 的钙调蛋白结合的胞膜磷酸蛋白. 新近的研究表明 GAP-43 与神经系统的发育、突触形成和可塑性以及神经再生有密切的关系, 在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用, 被认为是神经元生长发育和可塑性的分子标记物^[7]. GAP-43 广泛分布于神经系统的神经元内以及再生的施旺细胞和神经胶质细胞. Donovan^[8]等的研究发现, 在神经损伤后, 损伤局部吸收而逆行转运至胞体的某种正反馈信号或本身由胞体产生的某种正反馈信号刺激表达 GAP-43. 部分研究结果提示了 GAP-43 参与了神经元突触重组和神经环路的构建, 并为神经功能的恢复奠定了基础. 本实验免疫组化结果和 Western Blot 结果显示: 缺血 4.5h 后适应组与缺血 2h 再灌注组相比, GAP-43 蛋白表达明显增高, 提示缺血后适应能增加 GAP-43 蛋白的表达, 挽救缺血脑组织中的神经细胞, 促使其再生.

本实验结果显示: 在缺血 4.5 h 后适应组中 Bcl-2 和 GAP-43 蛋白表达水平明显增加, 而 Bcl-2 可抑制神经元细胞凋亡, GAP-43 在轴突的形成和生长过程中起重要的作用. 本研究的结果提示缺血后适应可通过增加 Bcl-2 和 GAP-43 的表达

减少神经细胞凋亡, 促进神经元可塑性的再生, 从而共同促进神经再生.

[参考文献]

- [1] 周璿平,王帆,李瑞林,等. 热性惊厥对大鼠运动行为及空间学习记忆的影响 [J]. 中华儿科杂志,2004,42(1):49-53.
- [2] WANG Y,KILIC E,KILIC U,et al. VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection,but facilitates haemodynamic steal phenomena[J].Brain,2005,128:52-63.
- [3] 曹霞,曹秉振,郭述苏. 大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型的明间梗死体积相关研究[J]. 解放军医学杂志,2000,25:123-124.
- [4] ZHANG R,XUE Y,LU S D,et al. Bcl-2 enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of newborn neurons in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion[J]. Neurobio Dis,2006,24(2):345-356.
- [5] LI Y Z,LU D Y,TAN W Q,et al.p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein A RC[J]. Mol Cell Biol,2008,28(2):564-574.
- [6] GAO Y J,SHIBATA T,RAINOV N G.Liposome-mediated transfer of the Bcl-2 gene results in neuroprotection after in vivo transient focal cerebral ischemia in an animal model [J]. Gene Therapy,2002,9(6):415-419.
- [7] LI Y,CHEN J,ZHANG C L,et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells[J]. Glia,2005,49(3):407-471.
- [8] DONOVAN S L,MCCASLAND J S. GAP-43 is critical for normal targeting of thalamocortical and corticothalamic,but not trigeminothalamic axons in the whisker barrel system [J]. Somatosens Mot Res,2008,25(1):33-47.

(2014-09-07 收稿)