

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0029-05

重组人可溶性血栓调节蛋白对小鼠脑缺血 / 再灌注损伤的神经保护作用及机制研究

黄山鉴¹, 韦贵宁², 姚人银¹, 邓小玲¹, 黄祖贵¹

[1. 广西医科大学第十附属医院 (钦州市第一人民医院) 药剂科, 广西 钦州 535000 ;
2. 广西中药与天然药物工程技术研究中心, 广西 南宁 530022]

摘要: 目的 研究重组人可溶性血栓调节蛋白 (ART-123) 对小鼠脑缺血 / 再灌注损伤的影响。**方法** BALB/c 小鼠行 4 h 大脑中动脉闭塞 (MCAO), 再灌注时静脉注射 Vehicle 或 ART-123 (1 或 5 mg/kg)。再灌注 24 h 后评估小鼠脑梗死体积、运动协调、血浆高迁移率族蛋白 (HMGB1) 水平及出血量。**结果** ART-123 可减少 MCAO 小鼠脑梗死体积, 并呈剂量依赖性 ($F=4.843, P=0.038$)。与 Vehicle 组比较, ART-123 (5 mg/kg) 可改善旋转试验中 MCAO 小鼠运动协调 ($P=0.028$); 降低血浆 HMGB1 水平 ($P=0.000$)。此外, Vehicle 组和 ART-123 组小鼠出血量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** ART-123 可能通过抑制 HMGB1 改善小鼠脑缺血 / 再灌注损伤。

关键词: 重组人可溶性血栓调节蛋白; 缺血 / 再灌注损伤; 小鼠

中图分类号: R743.31

文献标识码: A

Neuroprotective effect of ART-123 on ischemia / reperfusion injury in mice and its mechanism

Shan-jian Huang¹, Gui-ning Wei², Ren-ying Yao¹, Xiao-ling Deng¹, Zu-gui Huang¹

(1. Department of Pharmacy, Qinzhou First People's Hospital, the Tenth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Qinzhou, Guangxi 535000, China; 2. Guangxi Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Engineering Technology Research Center, Nanning, Guangxi 530022, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of recombinant human soluble thrombomodulin alpha (ART-123) on cerebral ischemic/reperfusion injury in mouse model. **Methods** BALB/c mice were subjected to 4 h-middle cerebral artery suture occlusion (MCAO) and treated at reperfusion with Vehicle or ART-123 (1 or 5 mg/kg, i.v) after 4 h MCAO. Infarct volume, motor coordination, plasma high-mobility group box (HMGB1) level and hemorrhage volume were evaluated 24 h after 4 h MCAO. **Results** The infarct volume was reduced by ART-123 in mice subjected to 4 h MCAO in a dose-dependent manner ($F=4.843, P=0.038$). Moreover, ART-123 (5 mg/kg) improved motor coordination determined by the rotarod test ($P=0.028$), and decreased plasma HMGB1 level compared with Vehicle-treated controls ($P=0.000$). In addition, there was no difference in hemorrhage volume between Vehicle-treated control group and the ART-123 treatment group. **Conclusions** ART-123 may improve cerebral ischemia / reperfusion injury in mice by inhibiting HMGB1.

Keywords: ART-123; ischemic/reperfusion injury; mice

收稿日期: 2017-09-11

脑卒中是致死和致残主要病因之一。大约 80% 急性脑卒中是缺血性脑卒中, 其中 25% ~ 35% 是由于大血管阻塞引起的^[1]。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box protein1, HMGB1) 在机体各组织中广泛表达, 包括大脑。脑卒中患者血浆 HMGB1 水平增高; 而在小鼠脑缺血模型中, 缺血性脑组织可释放 HMGB1^[2]。此外, 有研究报道, 脑缺血后 HMGB1 进入细胞外液, 诱导缺血脑组织神经炎症及小胶质细胞激活, 从而使缺血损伤加重^[3]。血栓调节蛋白是一种细胞表面糖蛋白, 在多种细胞表面表达。血栓调节蛋白可与 HMGB1 D1 结构域结合具有抗炎作用^[4]。在一些动物模型中, 重组人可溶性血栓调节蛋白 (recombinant human soluble thrombomodulin alpha, ART-123) 与 HMGB1 表达有关联, 如急性肺窘迫综合征、败血症和痛觉过敏等^[5-6]。然而, 目前没有研究评估 ART-123 是否通过调节 HMGB1 在小鼠脑缺血/再灌注损伤中发挥神经保护作用。因而, 本研究目的是评估 ART-123 是否能改善小鼠大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 后脑缺血性损伤, 并评估 HMGB1 在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

40 只雄性 BALB/c 小鼠, 体重 22 ~ 28 g, 购自广西医科大学动物中心。室温下自由饮食和饮水。将 BALB/c 小鼠随机分成: Sham 组 ($n=10$)、Vehicle 组 ($n=10$) 和 ART-123 组 (1 和 5 mg/kg 各 10 小鼠)。Vehicle 组和 ART-123 组小鼠均在 MCAO 后 4 h 静脉注射蒸馏水或 ART-123 (溶于蒸馏水配成 1 和 5 mg/kg 溶液)。

1.2 实验试剂

ART-123 (日本朝日化学公司), TTC (美国 Sigma 公司), HMGB1 ELISA 试剂盒 (上海内含子生物科技有限公司)。

1.3 MCAO 诱导脑缺血/再灌模型

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (0.06 g/kg) 麻醉 BALB/c 小鼠, 然后颈部进行手术操作。最终在显微镜下可以观察到左侧颈动脉鞘, 然后分离出颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。然后用缝合线结扎颈总动脉近心端和颈外动脉远心端, 用针头在颈外动脉远端动脉壁上扎 1 个小口, 将准备好的线栓从颈外动脉小孔插入颈总

动脉, 通过颈内动脉最后到达大脑中动脉, 用缝合线固定线栓, MCAO 后 4 h 拔出线栓, 缝合小鼠皮肤, 再灌注 24 h。Sham 组小鼠进行相关手术操作, 但不插入线栓。

1.4 评估脑梗死体积与出血量

神经行为学评分后, 将小鼠迅速断头取脑, 放入 -20°C 冰箱冷冻约 15 min 后, 行冠状切片, 厚度为 2 mm。采用图像分析系统 (NIH 图像, 版本 1.63) 测定每个脑片出血面积, 并计算出出血量。然后将脑片放入 1% TTC 磷酸盐缓冲液中, 在 37°C 水浴中避光孵育 10 min。脑梗死区域不染色 (灰白色), 而正常脑组织染为深红色。依据相关研究^[7] 方法计算 MCAO 后脑梗死体积。

1.5 神经行为学评分

小鼠 MCAO 4 h 后, 再灌注 24 h, 按照文献报道的方法^[8] 进行神经行为学评分, 评分范围是 0 ~ 5 分。0 分为正常运动功能; 1 分为动物尾巴抬起时躯干和对侧前肢屈曲; 2 分为同侧旋转, 但静止时姿势正常; 3 分为对侧旋转; 4 分为向同侧滚动; 5 分为静止时向同侧倾斜 (无自发性运动活动)。

1.6 旋转杆试验

通过旋转杆试验测定小鼠的运动协调能力^[8], 把小鼠被放置在直径 3 cm 防滑的杆上, 杆以 10 r/min 速度旋转, 记录小鼠从杆上跌下的时间。

1.7 ELISA 分析

采集小鼠 MCAO 后再灌注 24 h 的血液样本, 离心后获得血浆 ($1\ 200\ \text{r/min} \times 10\ \text{min}$), 按照 ELISA 规定的步骤检测血浆 HMGB1 浓度。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析; 并行 Turkey's post hoc 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ART-123 对脑梗死体积的影响

平均脑梗死体积 Vehicle 组为 $(93.2 \pm 7.0)\ \text{mm}^3$, ART-123 (1 mg/kg) 为 $(76.7 \pm 7.4)\ \text{mm}^3$, ART-123 (5 mg/kg) 为 $(64.8 \pm 6.5)\ \text{mm}^3$ 。方差分析显示, 3 组脑梗死体积差异有统计学意义 ($F=4.843$, $P=0.038$)。与 Vehicle 组比较, ART-123 (5 mg/kg) 组小鼠梗死

体积减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 ART-123 对神经行为学评分和运动协调的影响

平均神经学评分 Vehicle 组为 (3.6 ± 0.3), ART-123 (1 mg/kg) 组为 (3.5 ± 0.3), ART-123 (5 mg/kg) 组为 (2.9 ± 0.3)。3 组间比较差异无统计学意义 ($F = 2.564$, $P = 0.084$)。

在旋转杆试验中, 平均跌落时间 Sham 组为 (120.0 ± 7.5) s, Vehicle 组为 (22.3 ± 12.5) s, ART-123 (5 mg/kg) 组为 (66.2 ± 9.9) s。方差分析显示, 各组间比较差异有统计学意义 ($F = 7.042$, $P = 0.013$)。与 Sham 组比较, Vehicle 组小鼠运动协调能力降低 ($P < 0.05$)。而 ART-123 (1、5 mg/kg) 可改善 MCAO 后小鼠的运动协调能力 ($P < 0.05$)。见图 2。

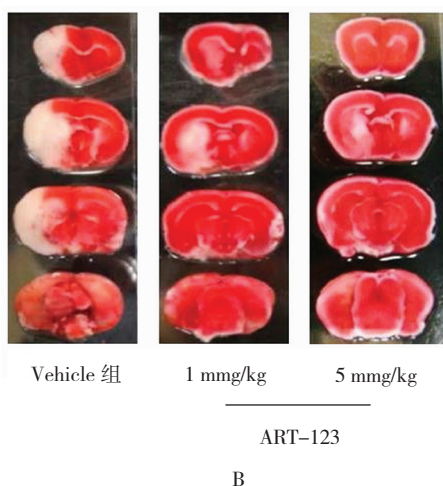
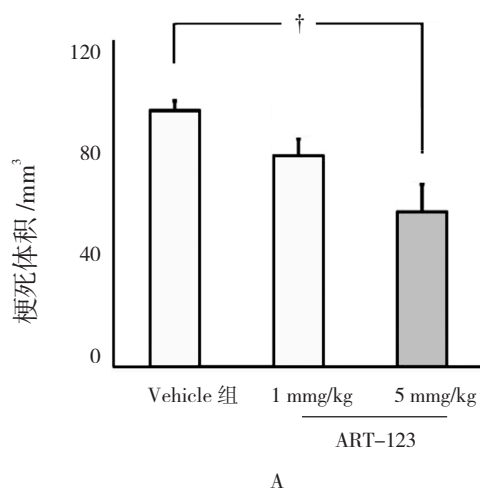
2.3 ART-123 对血浆 HMGB1 浓度影响

平均血浆 HMGB1 浓度 Sham 组为 (18.3 ± 3.82)

ng/ml, Vehicle 组为 (37.2 ± 3.15) ng/ml, ART-123 (1 mg/kg) 组为 (20.7 ± 3.82) ng/ml, ART-123 (5 mg/kg) 组为 (14.8 ± 3.16) ng/ml。方差分析显示, 各组间比较差异有统计学意义 ($F = 9.673$, $P = 0.012$)。与 Sham 组比较, Vehicle 组平均血浆 HMGB1 浓度增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ART-123 (1 mg/kg) 和 ART-123 (5 mg/kg) 均可降低 Vehicle 组血浆 HMGB1 浓度 (均 $P < 0.05$)。结果表明 ART-123 能降低血浆 HMGB1 浓度。见图 3。

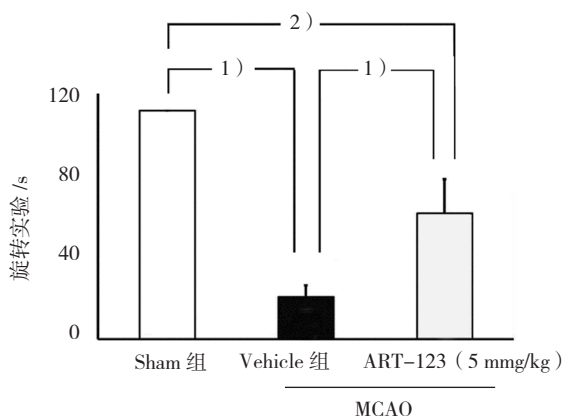
2.4 ART-123 对出血体积的影响

平均出血体积 Vehicle 组为 (3.48 ± 2.43) mm^3 ; ART-123 (1 mg/kg) 为 (6.92 ± 3.27) mm^3 ; ART-123 (5 mg/kg) 为 (5.18 ± 2.58) mm^3 。3 组出血体积差异无统计学意义 ($F = 1.071$, $P = 0.164$)。见图 4。



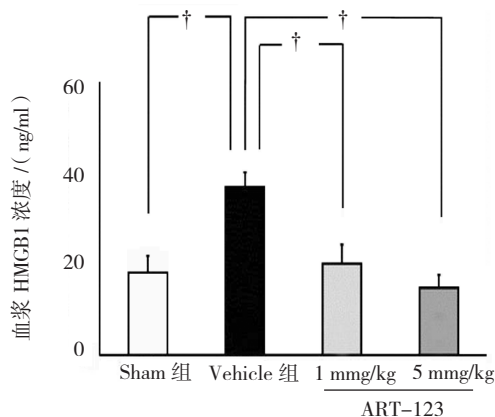
A: 定量分析脑梗死体积; B: 典型 TTC 染色。† 与 Vehicle 组比较, $P = 0.027$

图 1 ART-123 对 MCAO 后脑梗死体积的影响



1) 与 Vehicle 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$

图 2 ART-123 对 MCAO 后运动协调的影响



† 与 Vehicle 组比较, $P < 0.05$

图 3 ART-123 对血浆 HMGB1 浓度的影响

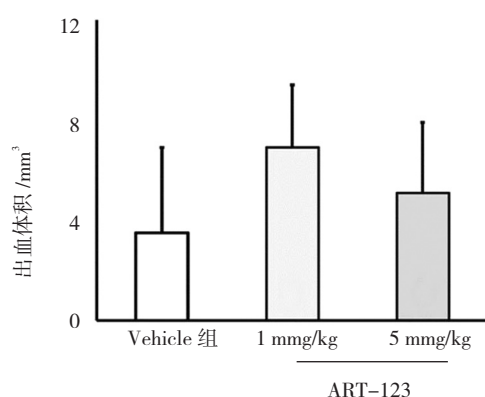


图 4 ART-123 对 MCAO 后出血体积的影响

3 讨论

本结果表明,再灌时注射 ART-123 可减少脑梗死体积,改善神经功能缺损,并降低血浆 HMGB1 水平,且出血并发症无变化。ART-123 在 4 h MCAO 模型中可抑制血浆 HMGB1 表达。此外,脑缺血损伤后,白细胞可释放 HMGB1,引起小胶质细胞活化^[8]。血液和中枢神经系统细胞外 HMGB1 迅速增加,可诱导炎症反应^[9]。LIU 等^[10]报道, HMGB1 单克隆抗体可减少大鼠脑缺血后梗死体积,且与神经功能缺损改善相关。同时, HMGB1 单克隆抗体可抑制血脑屏障通透性增加、小胶质细胞活化及促炎因子产生。重组血栓调节蛋白 Solulin 可减少缺血性脑卒中动物模型梗死体积,主要是通过其抗凝和抗炎性质^[11]。RYANG 等^[12]报道, Solulin 下调 2 h MCAO 大鼠缺血半影区炎症因子表达,并降低 CD11B 表达, CD11B 是小胶质细胞/巨噬细胞活化标志物。本结果提示, ART-123 可能下调脑缺血时 HMGB1 表达。以往动物模型研究 HMGB1, ART-123 注射剂量为 1 ~ 10 mg/kg^[13]。有研究报道, 10 mg/kg 重组组织型纤溶酶原激活物 (recombinant tissue plasminogen activator, rtPA) 对 4 h MCAO 小鼠梗死体积无影响,而且脑内大量出血^[14]。因此,在本研究中选择 ART-123 剂量 1 和 5 mg/kg。本研究表明, ART-123 减少脑梗死体积且无出血改变。由于 ART-123 可结合凝血酶,所以具有抗凝作用,但是 5 mg/kg ART-123 未增加出血量。日本 ART-123 第 3 阶段临床试验表明, ART-123 注射 7 d 后出血相关不良事件发生率低于肝素组^[15]。本结果表明, ART-123 是一种较安全治疗缺血性脑卒中药物。此外, Solulin 通过其抗凝和抗炎作用可减少缺血性脑卒中动物模型梗死体积,模型中 MCAO 时间为 30、60 或 120 min^[11-12]。而本研究表

明, ART-123 改善 4 h MCAO 引起的缺血损伤。rtPA 是临床唯一批准用于缺血性脑卒中溶栓治疗的药物,但是在脑卒中发作 4.5 h 内使用才有效果^[16]。然而,不到 10% 急性脑卒中患者符合 rtPA 治疗^[17]。但本研究结果提示, ART-123 有可能用于治疗延迟性缺血性脑卒中。

总之, ART-123 可能通过抑制血浆 HMGB1 表达,降低小鼠脑缺血所致神经功能缺损,而且出血并发症无明显变化。

参 考 文 献:

- [1] SMADJA D. Pharmacological revascularization of acute ischaemic stroke: focus on challenges and novel strategies[J]. *Cns Drugs*, 2012, 26(4): 309-318.
- [2] MUHAMMAD S, BARAKAT W, STOYANOV S, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage[J]. *Journal of Neuroscience*, 2008, 28(46): 12023-12031.
- [3] 金聰麗,周海紅. 高迁移率族蛋白 B1 在缺血性脑卒中的作用及研究进展 [J]. *中华诊断学电子杂志*, 2016, 4(4): 284-287.
- [4] ABEYAMA K, STERN D M, ITO Y, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(5): 1267.
- [5] KUDO D, TOYAMA M, AOYAGI T, et al. Involvement of high mobility group box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2013, 173(2): 276-287.
- [6] TANAKA J, SEKI Y, ISHIKURA H, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB1 - dependent hyperalgesia in rats[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 170(6): 1233-1241.
- [7] 刘旭,封素娟,张彩艳,等. 低氧预适应对小鼠缺血脑的保护及其 p38 MAPK 机制的实验研究 [J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(5): 643-647.
- [8] HAYAKAWA K, MISHIMA K, NOZAKO M, et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism[J]. *Stroke*, 2008, 39(3): 951.
- [9] QIU J, NISHIMURA M, WANG Y, et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(5): 927-938.
- [10] LIU K, MORI S, TAKAHASHI H K, et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats[J]. *Faseb Journal*, 2007, 21(14): 3904-3916.
- [11] SU E J, GEYER M, WAHL M, et al. The thrombomodulin analog Solulin promotes reperfusion and reduces infarct volume in a thrombotic stroke model[J]. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*, 2011, 9(6): 1174-1182.

- [12] RYANG Y M, DANG J, KIPP M, et al. Solulin reduces infarct volume and regulates gene-expression in transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Bmc Neuroscience*, 2011, 12(1): 1-8.
- [13] KAWASAKI T, OKAMOTO K, KAWASAKI C, et al. Thrombomodulin improved liver injury, coagulopathy, and mortality in an experimental heatstroke model in mice[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2014, 118(5): 956-963.
- [14] VERGOUWEN M D, KNAUP V L, ROELOFS J J, et al. Effect of recombinant ADAMTS-13 on microthrombosis and brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*, 2014, 12(6): 943.
- [15] SAITO H, MARUYAMA I, SHIMAZAKI S, et al. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double - blind clinical trial[J]. *Journal of Thrombosis & Haemostasis Jth*, 2007, 5(1): 31.
- [16] HACKE W, KASTE M, BLUHMKI E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke[J]. *Journal of Vascular Surgery*, 2008, 48(6): 1634-1635.
- [17] KIKUCHI K, MIURA N, KAWAHARA K, et al. Edaravone (Radicut), a free radical scavenger, is a potentially useful addition to thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke[J]. *Biomedical Reports*, 2013, 1(1): 7.

(王荣兵 编辑)