DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.001
文章编号： 1005-8982（2019）09-0001-05

基础研究·论著

曲古抑菌素 A 预处理对小鼠脑缺血再灌注损伤皮质炎症反应和凋亡的影响 *

侯家保，袁泉，万杏，刘恋，赵博，吴洋
（武汉大学人民医院 麻醉科，湖北 武汉 430060）

摘要：目的 探讨曲古抑菌素 A 预处理在小鼠脑缺血再灌注损伤中对大脑皮质炎症反应和凋亡的影响。**方法** Balb/c 小鼠随机分为 3 组：假手术组（S 组）、缺血再灌注组（IR 组）、曲古抑菌素 A 预处理组（预处理组），每组 10 只。采用颈部切口大脑中动脉线栓（MCAO）法缺血 1 h，再灌注 24 h 复制脑缺血再灌注模型，预处理组在复制脑缺血再灌注模型前连续 3 d 腹腔注射曲古抑菌素 A 5 mg/kg。取脑皮质组织，光学显微镜下观察病理学结果，ELISA 检测 TNF-α、IL-1β，免疫组织化学法检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3，TUNEL 检测细胞凋亡。**结果** 3 组 TNF-α、IL-1β、Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 比较，差异有统计学意义（P <0.05）。与 S 组比较，IR 组病理学损伤严重，TNF-α、IL-1β、Bax、Caspase-3 阳性表达水平升高，Bcl-2 降低（P <0.05）；与 IR 组比较，预处理组病理学损伤减轻，TNF-α、IL-1β、Bax、Caspase-3 阳性表达水平降低，Bcl-2 升高（P <0.05）。**结论** 曲古抑菌素 A 预处理能抑制炎症因子、凋亡因子的表达及减少细胞凋亡，从而减轻脑缺血再灌注损伤。

关键词： 再灌注损伤；模型，动物；曲古抑菌素 A；因子，炎症；凋亡诱导因子
中图分类号： R743 **文献标识码：** A

Effect of Trichostatin A on cerebral cortex inflammation and apoptosis in mouse model of cerebral ischemia reperfusion injury*

Jia-bao Hou, Quan Yuan, Xing Wan, Lian Liu, Bo Zhao, Yang Wu
(Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To evaluate effect of Trichostatin A (TSA) on inflammatory factors and apoptosis in mouse model of cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** Mice were randomly divided into three groups (n = 10): sham (S) group in which mouse received all surgical procedure except ligation of arteries, ischemia/reperfusion (IR) group in which mouse received ligation of middle cerebral artery for one hour following by blood reperfusion for 24 hours, TSA group in which mouse were pretreated with TSA (5 mg/kg) for 3 days before ischemia/reperfusion insult. Histopathology was detected by HE-staining; circulating concentration of TNF-α, IL-1β were measured by ELISA; expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 were detected by immunohistochemistry; and apoptosis rate was identified by TUNEL. **Results** Brain tissue in IR group exerted obvious histological deterioration and expression of TNF-α, IL-1β; Bax and Caspase-3 were increased significantly when compared with those in S group (P < 0.05), all of which were attenuated by pretreating of TSA (P < 0.05). TUNEL analysis indicated apoptosis rate were increased in TSA group compared with S group, which was down-regulated by treatment of TSA (P < 0.05). **Conclusions** TSA has a protective effect in cerebral ischemia reperfusion by decreasing inflammation and apoptosis.

收稿日期：2018-12-12
* 基金项目：湖北省自然科学基金（No：2016CF167，2017CFB267）；武汉大学人民医院引导基金（No：RMYD2018M03）
[通信作者] 吴洋，E-mail：wywytwin@163.com

Keywords: reperfusion injury; model; animal; Trichostatin A; factor; inflammation; apoptosis inducing factor

脑缺血再灌注损伤是指缺血的脑组织经治疗后重新恢复血液供应，但损伤进一步加重的反常现象[1-2]。由于其发病率、致残率和病死率高，已经严重威胁到人类健康[3]。脑缺血再灌注损伤后如何实现神经组织的自我修复是目前研究的热点问题之一[2, 4]。在中枢神经系统中，胶质细胞参与维持神经元正常功能，分泌神经营养因子，实现免疫应答[5-6]。因此在脑缺血再灌注损伤时，胶质细胞可以发生活化及参与调控炎症因子和凋亡因子的表达，避免神经炎症反应加重诱发神经细胞凋亡，从而使受损神经元修复成为可能。新近研究表明，组蛋白去乙酰化酶抑制剂（histone deacetylase inhibitor, HDACi）曲古抑菌素 A 在脑缺血再灌注损伤中可以产生内源性再生和恢复的保护效应[7-9]。那么曲古抑菌素 A 是否通过神经炎症和细胞凋亡途径参与其中的保护效应呢？目前并没有详细研究。本研究旨在探讨曲古抑菌素 A 预处理在脑缺血再灌注损伤中对炎症因子和凋亡因子表达的影响及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康成年雄性 Balb/c 小鼠 30 只，体重 18 ~ 22 g，购自武汉生物制品研究所。

1.2 动物分组与实验方法

采用随机数字表法将实验小鼠分为 3 组，每组 10 只。假手术组（S 组），仅做颈部打开手术；缺血再灌注组（IR 组），行颈部切口大脑中动脉线栓（middle cerebral artery occlusion, MCAO）法手术；曲古抑菌素 A 预处理组（预处理组），复制脑缺血再灌注模型前连续 3 d 腹腔注射曲古抑菌素 A 5 mg/kg 后行 MCAO 手术。通过缺血 1 h、再灌注 24 h 复制脑缺血再灌注模型。异氟烷深度麻醉小鼠，暴露左侧颈外动脉，向颈外动脉内插入一根 6-0 单丝线栓直达大脑中动脉分支处，线栓于大脑中动脉中留置 45 min 后小心取出，手术总时间约 1 h。模型复制成功的标志是小鼠在麻醉苏醒后出现右前肢严重偏瘫。

1.3 指标检测

MCAO 后再灌注 24 h 处死小鼠，并取大脑皮质组织。①制备石蜡切片，置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h，行 HE 染色，光学显微镜下观察病理学结果。② ELISA 检测肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -1β（IL-1β）：脑皮层组织匀浆，离心后提取上清液。严格按试剂盒（武汉博士德生物科技公司）说明书操作。所得样本用酶标仪测定吸光度值并计算对应样品浓度。③免疫组织化学法检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3（北京中杉金桥生物科技公司）：切片入水，3% H_2O_2 孵育 10 min，滴加多克隆抗体，4℃孵育过夜；滴加二抗，37℃孵育 20 min，滴加 SP，37℃孵育 20 min，DAB 显色。④ TUNEL 检测细胞凋亡（美国 Roche 公司）：脑切片入水，3% H_2O_2 孵育 10 min，滴加蛋白酶 K，37℃消化 10 min，加入反应混合液，37℃孵育 60 min，加入转化剂，37℃孵育 30 min，DAB 显色。用光学显微镜观察并计数阳性细胞数。

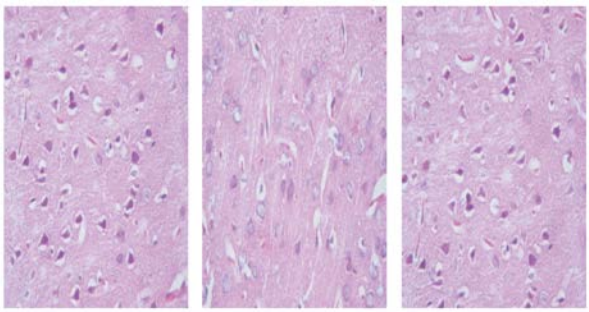
1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，符合方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析，在方差分析有意义的基础上，两两比较用 LSD-t 检验，P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠大脑皮质组织病理学结果

S 组与预处理组小鼠大脑皮质神经元排列相对整齐，胞膜完整，胞质丰富，核圆形，结构较为清晰；IR 组大脑皮质神经元形态不规则，胞质分布不均，有空泡，核固缩溶解或消失。见图 1。



S 组　　IR 组　　预处理组

图 1　3 组小鼠大脑皮质组织病理学结果　（HE ×400）

2.2　3 组小鼠大脑皮质 TNF-α、IL-1β 含量比较

3 组小鼠大脑皮质 TNF-α、IL-1β 含量比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P <0.05）。IR 组大脑皮质 TNF-α 含量与 S 组比较，差异有统计学意义（t =10.213，P =0.000），IR 组升高；预处理组大脑皮质 TNF-α 含量与 IR 组比较，差异有统计学意义（t =4.183，P =0.002），预处理组降低。IR 组大脑皮质 IL-1β 含量与 S 组比较，差异有统计学意义（t =9.574，P =0.000），IR 组升高；预处理组大脑皮质 IL-1β 含量与 IR 组比较，差异有统计学意义（t =3.296，P =0.008），预处理组降低。见表 1。

表 1　3 组小鼠大脑皮质 TNF-α、IL-1β 含量比较（n =10，pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别	TNF-α	IL-1β
S 组	5.7 ± 0.8	13.6 ± 1.3
IR 组	12.8 ± 1.5[1)]	28.3 ± 3.6[1)]
预处理组	9.3 ± 1.4[1)2)]	22.7 ± 2.2[1)2)]
F 值	49.233	40.985
P 值	0.000	0.000

注：1）与 S 组比较，P <0.05；2）与 IR 组比较，P <0.05

2.3　3 组小鼠大脑皮质 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 表达比较

3 组小鼠大脑皮质 Bax、Bcl-2、Caspase-3 表达比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P <0.05）。IR 组大脑皮质 Bax 表达与 S 组比较，差异有统计学意义（t =13.061，P =0.000），IR 组升高；预处理组大脑皮质 Bax 表达与 IR 组比较，差异有统计学意义（t =4.255，P =0.002），预处理组降低。IR 组大脑皮质 Bcl-2 表达与 S 组比较，差异有统计学意义（t =13.763，P =0.000），IR 组降低；预处理组大脑皮质 Bcl-2 表达与 IR 组比较，差异有统计学意义（t =4.032，P =0.002），预处理组升高。IR 组大脑皮质 Caspase-3 表达与 S 组比较，差异有统计学意义（t =11.477，P =0.000），IR 组升高；预处理组大脑皮质 Caspase-3 表达与 IR 组比较，差异有统计学意义（t =3.931，P =0.003），预处理组降低。见表 2 和图 2~4。

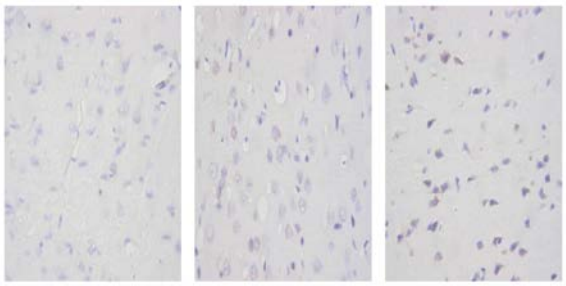
2.4　3 组小鼠大脑皮质 TUNEL 阳性表达数比较

S 组小鼠大脑皮质 TUNEL 阳性表达数为（5.60 ± 2.70），IR 组为（30.50 ± 5.93），预处理组为（13.30 ± 2.24），3 组比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（F =62.730，P =0.000）。IR 组大脑皮质 TUNEL 阳性表达与 S 组比较，IR 组升高（t =9.362，P =0.000）；

表 2　3 组小鼠大脑皮质 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达的比较　（n =10，$\bar{x} \pm s$）

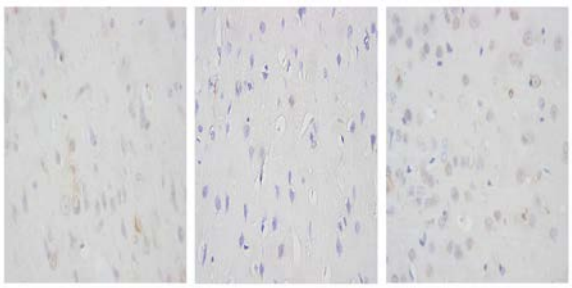
组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3
S 组	6.3 ± 1.1	23.7 ± 2.7	5.4 ± 0.7
IR 组	19.4 ± 2.2[1)]	7.3 ± 1.1[1)]	17.6 ± 2.5[1)]
预处理组	14.9 ± 1.4[1)2)]	11.5 ± 2.3[1)2)]	13.2 ± 1.1[1)2)]
F 值	100.556	104.396	84.711
P 值	0.000	0.000	0.000

注：1）与 S 组比较，P <0.05；2）与 IR 组比较，P <0.05



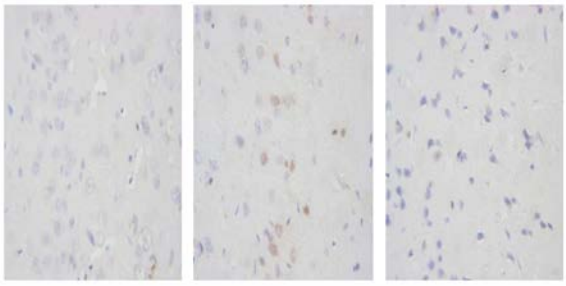
S 组　　IR 组　　预处理组

图 2　3 组小鼠大脑皮质 Bax 表达　（×400）



S 组　　IR 组　　预处理组

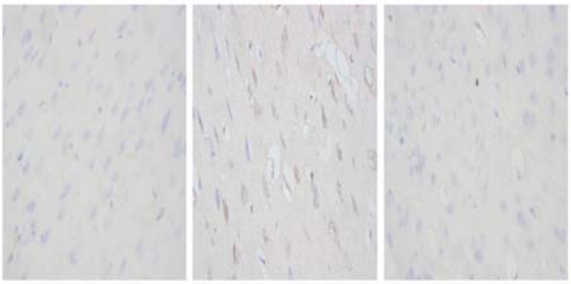
图 3　3 组小鼠大脑皮质 Bcl-2 表达　（×400）



S 组　　IR 组　　预处理组

图 4　3 组小鼠大脑皮质 Caspase-3 表达　（×400）

预处理组大脑皮质 TUNEL 阳性表达与 IR 组比较，预处理组降低（t =6.647，P =0.000）。见图 5。



S 组　　IR 组　　预处理组

图 5　曲古抑菌素 A 对 3 组小鼠大脑皮质组织细胞凋亡的影响（TUNEL × 400）

3　讨论

脑缺血再灌注损伤的发病机制尚未研究清楚，可能存在的机制包括炎症反应、氧化应激、细胞内钙超载、细胞凋亡、兴奋性氨基酸毒性、免疫调控、血脑屏障被破坏，以及神经血管单元的相互作用等[4]，但是相关保护性机制还有待进一步研究[4, 10]。脑缺血再灌注损伤早中期主要表现为自由基的产生、线粒体功能障碍、炎症反应增强、神经元细胞的凋亡等，后期则以胶质细胞增殖及小胶质细胞活化促进神经再生、血管新生等表现为主[4, 11]。而临床发现脑缺血再灌注损伤主要是急早性期损伤，本研究侧重于研究脑缺血再灌注损伤早期中炎症反应调控和神经元凋亡预防，对探讨早期脑缺血缺氧性损伤早期保护及恢复具有重要意义。

新近研究表明，脑缺血再灌注损伤可使损伤区神经细胞基因表达异常[7]，而 HDACi 可通过调节损伤的神经细胞内组蛋白和非组蛋白的修饰，进而参与脑缺血再灌注损伤机制中的多个环节，减轻脑组织损伤并促进缺血区血运重建，加快缺血后神经元结构和功能可塑性的恢复[7, 12-13]。因而本研究选用曲古抑菌素 A 预处理，再行大脑中动脉线栓 1 h，再灌注 24 h，行 HE 染色发现早期脑缺血再灌注损伤后大脑皮层神经元形态不规则，胞质分布不均，有空泡，核固缩溶解或消失清晰整齐，表明大脑皮层脑缺血再灌注损伤已经形成，而使用曲古抑菌素 A 预处理后再行 MACO，大脑皮质神经元形态与正常对照组基本一致，表明曲古抑菌素 A 预处理可以改善早期大脑皮质缺血再灌注损伤对神经细胞结构的影响。

HDACi 大脑皮质早期缺血再灌注损伤的保护机制是什么呢？本研究从炎症反应和凋亡机制研究发现，曲古抑菌素 A 预处理可以逆转大脑皮质早期缺血再灌注损伤后 TNF-α、IL-1β 和 Bax、Caspase-3 的高表达及 Bcl-2 的低表达，使之趋向正常表达水平，并使 IR 导致的 TUNEL 阳性细胞数目减少，表明曲古抑菌素 A 预处理可通过调控大脑皮质炎症反应和凋亡因子活化来产生保护效应。早期研究表明，脑缺血再灌注损伤可导致神经元的染色体启动封闭状态，而 HDACi 可以纠正神经元染色体转变成开放状态，起到神经保护的作用[12]。其机制包括：参与小胶质细胞 / 巨噬细胞的极化调控，减轻神经细胞炎症反应，抑制神经元凋亡因子活化，促进神经血管再生等[9-10, 12]，而本研究也从神经炎症反应和抑制神经元凋亡方面进行验证。

胶质细胞中的小胶质细胞可敏感察觉大脑组织的微环境改变，参与免疫监视和防御的功能[5-6]。正常状态下，小胶质细胞处于静息状态，当在外源性或内源性刺激的作用下，其迅速活化，产生并释放促炎因子如：TNF-α 和 IL-1β，并通过交互作用诱导凋亡因子的释放。而本研究证实：小胶质细胞释放的 TNF-α、IL-1β 参与脑缺血再灌注损伤的进展，并诱导凋亡因子 Bax、Caspase-3 活化水平增加，当行曲古抑菌素 A 预处理后，炎症因子 TNF-α、IL-1β 表达降低，凋亡因子 Bax、Caspase-3 活化水平下降，Bcl-2 活化增加。这表明小胶质细胞对大脑正常功能的维持至关重要，在抗炎症反应和清除凋亡的神经元过程中起重要作用，是脑防御的重要机制[14-16]。

综上所述，曲古抑菌素 A 预处理通过抑制皮质炎症因子、凋亡因子的表达及减少细胞凋亡，减轻大脑皮质缺血再灌注损伤。

参 考 文 献：

[1] PARK H, HONG M, JHON G J, et al. Repeated oral administration of human serum albumin protects from the cerebral ischemia in rat brain following MCAO[J]. Exp Neurobiol, 2017, 26(3): 151-157.

[2] SHAMSAEI N, ERFANI S, FEREIDONI M, et al. Neuroprotective effects of exercise on brain edema and neurological movement disorders following the cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. Basic Clin Neurosci, 2017, 8(1): 77-84.

[3] SHIN D H, KIM G H, LEE J S, et al. Comparison of MSC-Neurogenin1 administration modality in MCAO rat model[J]. Transl Neurosci, 2016, 7(1): 164-172.

[4] WANG C P, SHI Y W, TANG M, et al. Isoquercetin ameliorates cerebral impairment in focal ischemia through anti-oxidative, anti-

inflammatory, and anti-apoptotic effects in primary culture of rat hippocampal neurons and hippocampal CA1 region of rats[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(3): 2126-2142.

[5] ANDERSON M A, BURDA J E, REN Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration[J]. Nature, 2016, 532(7598): 195-200.

[6] VERKHRATSKY A, MATTEOLI M, PARPURA V, et al. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion[J]. EMBO J, 2016, 35(3): 239-257.

[7] FESSLER E B, CHIBANE F L, WANG Z, et al. Potential roles of HDAC inhibitors in mitigating ischemia-induced brain damage and facilitating endogenous regeneration and recovery[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(28): 5105-5120.

[8] AUNE S E, HERR D J, KUTZ C J, et al. Histone deacetylases exert class-specific roles in conditioning the brain and heart against acute ischemic injury[J]. Front Neurol, 2015, 6: 145.

[9] 谢咏秋 , 郭曲练 . 不同剂量曲古抑素 A 后处理在脑缺血再灌注损伤中的脑保护作用 [J]. 中国现代医学杂志 , 2012(25): 28–31.

[10] 贺民 , 郭曲练 . 曲古抑素 A 预处理对大脑中动脉闭塞模型大鼠脑保护作用及其与 IL–1β 的关系 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2012, 37(4): 379–383.

[11] LOBO-SILVA D, CARRICHE G M, CASTRO A G, et al. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 297.

[12] GANAI S A, RAMADOSS M, MAHADEVAN V. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration[J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(1): 55-71.

[13] DREGAN A, CHARLTON J, WOLFE C D, et al. Is sodium valproate, an HDAC inhibitor, associated with reduced risk of stroke and myocardial infarction? A nested case-control study[J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2014, 23(7): 759-767.

[14] KIM H, BAE S, KWON K Y, et al. A combinational effect of acetaminophen and oriental herbs on the regulation of inflammatory mediators in microglia cell line, BV2[J]. Anat Cell Biol, 2015, 48(4): 244-250.

[15] ZHAO D, KWON S H, CHUN Y S, et al. Anti-neuroinflammatory effects of fucoxanthin via inhibition of Akt/NF-kappa B and MAPKs/AP-1 pathways and activation of PKA/CREB pathway in lipopolysaccharide-activated BV-2 microglial cells[J]. Neurochem Res, 2017, 42(2): 667-677.

[16] RUSSO I, BERTI G, PLOTEGHER N, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down-regulates NF-kappaB p50 signaling in cultured microglia cells[J]. J Neuroinflammation, 2015(12): 230.

（张西倩　编辑）