

大鼠局灶性脑缺血再灌注后缺血核心区 NCCa-ATP 通道的表达变化

李 华¹⁾, 马明义²⁾

(1) 泸州医学院附属医院内分泌科; 2) 泸州医学院医学细胞生物学与遗传学教研室,
四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 了解局灶性脑缺血再灌注后磺酰脲类受体 1 (SUR1) 调控的非选择性阳离子通道 (nonselective cation channel, NCCa-ATP 通道) 表达的变化与脑缺血损伤的关系, 探索脑缺血的治疗时间窗。 **方法** 以颈内动脉线栓法建立大鼠大脑左侧中动脉梗塞模型, 缺血 2 h 后恢复再灌注。取实验性脑缺血再灌注损伤后 3 h、6 h、8 h、12 h、24 h 等不同时间缺血核心区的脑组织, 采用 RT-PCR 及 Western-blot 技术, 测定 SUR1 的 mRNA 及蛋白表达水平。采用免疫荧光双标法技术, 观察 SUR1 在缺血后脑微血管内皮细胞的表达情况。 **结果** 缺血再灌注核心区组织在缺血再灌注后 3 h、6 h、8 h、12 h 及 24 h 各时间点 SUR1 mRNA 和 SUR1 蛋白的表达量均上调, 再灌注后 8 h 达高峰 ($P < 0.05$), 缺血再灌注后 12 h, SUR1 在脑微血管内皮细胞的表达非常明显。 **结论** 局灶性脑缺血再灌注过程中 SUR1 调节的 NCCa-ATP 通道参与了脑缺血损伤, 在脑缺血再灌注后其 mRNA 和蛋白的表达量均上调。推测应用 SUR1 受体的特异性抑制剂最佳时机在缺血再灌注后 8 ~ 12 h。

[关键词] 局灶性脑缺血再灌注; 缺血核心区; NCCa-ATP 通道; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 09 - 0046 - 05

Changes of NCCa-ATP Channels in Core Area During Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats

LI Hua¹⁾, MA Ming-yi²⁾

(1) Dept. of Endocrinology and Metabolism, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College; 2) Dept. of Medical Cell Biology & Medical Genetics of Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the changes of SUR1-regulated NCCa-ATP channels in core area during focal cerebral ischemia and reperfusion in rats, and to explore the therapeutic window of focal cerebral ischemia. **Methods** Adult male Wistar rats were rendered to undergo 120 minutes of the left middle cerebral artery occlusion (MCAO) by the intraluminal thread technique before reperfusion. The core area of the left hemisphere cortex ischemia/reperfusion at different times (reperfusion: R3 h, 6 h, 8 h, 12 h and 24 h) was taken to be tested the level of mRNA and protein expression of sulfonylurea receptor 1 (SUR1) using RT-PCR and Western-blot techniques. SUR1 of the ischemic brain microvascular endothelial cells were observed by immunofluorescence double staining at the peak expressing time point of SUR1. **Results** We found the up-regulation of SUR1 mRNA and SUR1 protein in ischemic infarcts tissues for R3 h, 6 h, 8 h and 12 h, peaked at R8 h, compared with the sham-operation group ($P < 0.05$). However, SUR1 expression increased was observed at R12 h by double immunofluorescence in microvascular endothelium. **Conclusion** SUR1-regulated NCCa-ATP channel may take part in cerebral ischemic damage during focal cerebral ischemia and reperfusion. The expressions of SUR1 mRNA and SUR1 protein were up-regulated in ischemic infarcts tissues. The data suggested that the best time to apply SUR1 inhibitor is within 8-12 hours after ischemia and reperfusion.

[Key words] Focal cerebral ischemia reperfusion; Core area; NCCa-ATP channel; Rat

[基金项目] 泸州医学院附属医院人才基金资助项目 (11179)

[作者简介] 李华 (1973~), 女, 四川自贡市人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事糖尿病胰岛素抵抗及大血管病变研究工作。

众所周知, 缺血性脑卒中是一严重危害健康的中枢神经系统疾病. 局部脑动脉闭塞和缺血后再灌注所致相应脑组织水肿是缺血性卒中患者死亡及神经功能障碍的主要原因. 美国马里兰大学医学院 Simard 教授的实验室在星形胶质细胞上发现了一种受磺脲类药物受体 1 (SUR1) 调节的非选择性阳离子通道^[1,2] (The SUR1-regulated Ca^{2+} -activated, ATP-sensitive nonspecific cation channel, NCCa-ATP channels), 该通道表达后处于关闭状态, 但当细胞内 ATP 耗竭时该通道开放, 从而导致细胞去极化、细胞毒性水肿以及肿胀细胞死亡. SUR1 蛋白与 mRNA 在缺血后的神经元、星形胶质细胞和毛细血管中都有新的表达. SUR1 上调与转录因子 Sp1 的活化及功能性 NCCa-ATP 通道有关, 但与 KATP 无关. SUR1 调节的 NCCa-ATP 通道在脑水肿的发展过程中至关重要, 而以 SUR1 为靶点的治疗手段有可能成为缺血性脑卒中的一种新的治疗方法. 因此, 本研究采用检测 NCCa-ATP 通道的亚单位 SUR1 在脑缺血再灌注后的动态表达及在脑微血管内皮细胞的表达变化与脑缺血损伤的关系, 探索脑缺血的治疗时间窗.

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 275 ~ 350 g, 由四川大学实验动物中心提供. 大鼠饲养于室温恒定 18 ~ 22℃、12 h 昼夜节律光照的环境, 自由摄取水分和食物 (普通饲料). 术前一夜禁食.

1.2 主要试剂

标准蛋白分子量 Marker SM0671 (Fermenta), 化学发光试剂盒 (A 液、B 液), 羊抗鼠 SUR1 多克隆抗体 SC-5789, HRP 标记驴抗羊 IgG SC-2020, TRIT 标记驴抗羊 IgG SC-2783 均购自 Santa Cruz 公司, 兔抗鼠 β -actin, HRP 标记兔抗羊 IgG ZF-0317, FRITC 标记羊抗兔 IgG ZF-0311 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 兔抗人 VIII 因子相关抗原, 戊巴比妥钠购自 Sigma 公司. 离心柱型 RNApure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司).

1.3 实验方法

1.3.1 分组 MCAO 模型大鼠 30 只, 随机分为缺血再灌注后 3 h、6 h、8 h、12 h、24 h 5 组, 每组 6 只; 正常对照组 (假手术组) 6 只.

1.3.2 颈内动脉线栓法制备 Wistar 大鼠 MCAO 模型及神经功能评分.

用 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉 Wistar 大鼠. 参照 Zea Longa^[3] 报道的线栓方法并加以改进建立左侧大脑中动脉梗塞模型. 大脑中动脉阻塞 2 h 后恢复血液灌注. 每只动物均于麻醉苏醒后根据 Longa^[3] 及 Bederson^[4] 的 5 分制法在动物麻醉清醒后 12 h 内进行评分以评估各组动物的神经功能受损情况. 评分高于 1 分者建模成功, 入组. 评分标准: 0 分: 无神经损伤体征, 肢体活动正常; 1 分: 轻度局灶性损伤, 不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 中度局灶性损伤, 向对侧转圈; 3 分: 重度局灶性损伤, 向对侧倾倒; 4 分: 极重度损伤, 不能自发行走, 意识丧失.

1.3.3 标本取材 各组动物分别于相应时间点处死, 30 s 内快速取脑. 参考 Ashwal 等^[5] 的方法, 并加以改进. 在距额叶前端 3 mm 和 9 mm 处进行冠状切片, 取中间 6 mm 厚的脑组织块, 然后沿此脑块矢状缝两侧约 2 mm 处, 从上至下切去两侧半球的正中结构 (此结构由大脑前动脉供血, 弃去). 余下的左右两侧脑块, 各沿矢状切面旁开 2 mm 处, 并和矢状切面呈 30° 斜切, 其中外侧皮层为缺血核心区, 内侧皮层为缺血半暗区. 取缺血核心区脑组织, -80℃ 保存.

1.3.4 荧光定量 PCR 检测脑缺血核心区 SUR1 mRNA 的表达 大鼠脑缺血核心区组织总 RNA 提取采用离心柱型 RNApure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒提取. 荧光定量 PCR 方法测定 SUR1 mRNA 的表达, Premier5.0 软件设计引物. 引物由 Invitrogen 公司合成. 引物序列: Abcc8 mRNA (编码 SUR1).

Abcc8 基因, 上游引物: 5'-GAGTCGGACTTC-TCGCCCT-3', 下游引物: 5'-CCTTGACAGTGGAC-CGAACC-3', 探针: 5'-TTCCACATCCTGGTCCACAC-ACCGCTGT-3', 预计扩增产物 106 bp.

内参: 组蛋白 1 基因, 上游引物: 5'-CGGAC-CACCCCAAGTATTCA-3', 下游引物: 5'-GCCGGC-GCGGTTCTTCT-3', 探针: 5'-CATGATCGTGGCTGCCATCCAGGCA-3', 预计扩增产物 65 bp.

用假定初始拷贝数 (x) 的 cDNA 模板按 5 倍梯度进行稀释, 自每个稀释模板中取样 2 μ L, 分别加入 25 μ L 的反应体系中, 行实时荧光定量 PCR. 结果通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析相对基因表达差异^[6].

1.3.5 Western blot 检测脑缺血核心区 SUR1 蛋白的表达 各时间点结束后取缺血核心区脑组织提取总蛋白, BCA (Bicinchoninic acid) 法测蛋白浓度. 定量后进行 SDS-PAGE 胶电泳, 按常规方法

转膜,用10%脱脂牛奶、0.1%Tween20封闭液室温封闭1h;加入一抗,用PBST配制的10%的牛奶稀释羊抗鼠SUR1和兔抗鼠 β -actin(1:200),4℃孵育过夜;用PBST洗膜3次,每次5min;加入二抗,用PBST配制的10%的牛奶稀释HRP标记驴抗羊IgG和羊抗兔(1:5000),37℃摇床孵育1h;将膜放入干净的平皿中,加辣根过氧化物酶底物(A液500:B液500)反应5min,暗室中X线曝光,将膜依次放入显影液和定影液中,待显色后拿出膜放入清水中定影,拍照.利用ImageJ生物医学图像分析软件,以SUR1受体与内参 β -actin的灰度(OD值)比值表示SUR1受体的表达水平.

1.3.6 冰冻切片免疫荧光双标法检测SUR1在脑缺血再灌注微血管内皮细胞的表达 选取的时间点处死动物,取脑缺血核心区,浸入液氮速冻过夜;切片机内温度-22℃,冻20min,以5 μ m的厚度作冰冻连续切片,按照先后顺序存放备用;切片切好后迅速用冷丙酮4℃冰箱固定5min,然后用0.01M PBS缓冲液漂洗3次,每次3min;直接加混合的2种一抗[兔抗人VIII因子相关抗原和羊抗鼠SUR1多克隆抗体(1:50稀释)],置湿盒内4℃过夜.次日用0.01M PBS缓冲液漂洗3次,每次3min;滴加2种混合的荧光二抗[1:50稀释的荧光素(TRIT标记驴抗羊IgG,FRITC标记羊抗兔IgG)],置湿盒内37℃避光孵育60min;直接滴加DAPI复染(1 μ g/mL)3min,用0.01M PBS缓冲液漂洗3次,每次3min;缓冲甘油封片,荧光显微镜观察.以PBS代替一抗作阴性对照.

1.4 统计学方法

实验结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS for windows 进行统计分析,组间均数差异

采用单因素方差分析和t检验, $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 缺血再灌注后大脑皮层缺血核心区脑组织SUR1受体mRNA和蛋白的表达

与假手术组比较,缺血再灌注后各时间点SUR1 mRNA的表达量均上调,缺血再灌注后8h达到高峰,见表1.

与假手术组比较,3h、6h、8h、12h、24h各组SUR1蛋白的表达均有明显增加,再灌注后8h达高峰,见表2,图1.

2.2 缺血再灌注后SUR1在脑微血管内皮细胞的表达情况

冰冻切片免疫荧光双标结果显示,缺血再灌注后12h,SUR1在脑微血管内皮细胞的表达非常明显,而在缺血再灌注后8h,即SUR1受体mRNA和蛋白水平高峰阶段则不明显,见图2.

表1 缺血再灌注后SUR1受体mRNA的表达变化($\bar{x}\pm s$)
Tab.1 Change of the mRNA expression level of SUR1 ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	相对基因表达倍数(倍)
假手术组	6	1.00 \pm 0.00
缺血再灌注后3h	6	1.31 \pm 0.31*
缺血再灌注后6h	6	1.63 \pm 0.06*
缺血再灌注后8h	6	1.75 \pm 0.15*
缺血再灌注后12h	6	1.42 \pm 0.13*
缺血再灌注后24h	6	1.16 \pm 0.18

与假手术组比较,* $P<0.05$.

表2 缺血再灌注后SUR1蛋白的表达变化($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Change of the protein expression level of SUR1 ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	与 β -actin的相对灰度值(OD值相比)	SUR1蛋白表达相对倍数(倍)
假手术组	6	0.48 \pm 0.17	1.00 \pm 0.00
缺血再灌注后3h	6	1.30 \pm 0.51	2.68 \pm 0.30*
缺血再灌注后6h	6	1.59 \pm 0.85	3.12 \pm 0.62*
缺血再灌注后8h	6	1.88 \pm 0.63	3.85 \pm 0.14*
缺血再灌注后12h	6	1.02 \pm 0.26	2.14 \pm 0.19*
缺血再灌注后24h	6	1.03 \pm 0.47	1.66 \pm 0.12*

与假手术组比较,* $P<0.05$.

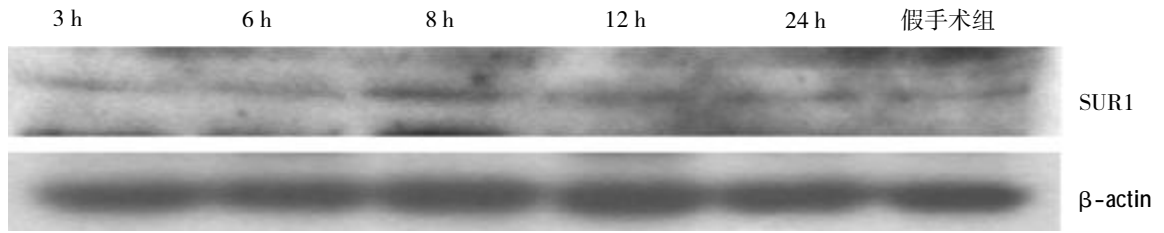


图 1 脑缺血再灌注后不同时间点 SUR1 蛋白的表达

Fig. 1 The protein expression of SUR1 after cerebral ischemia reperfusion at different times

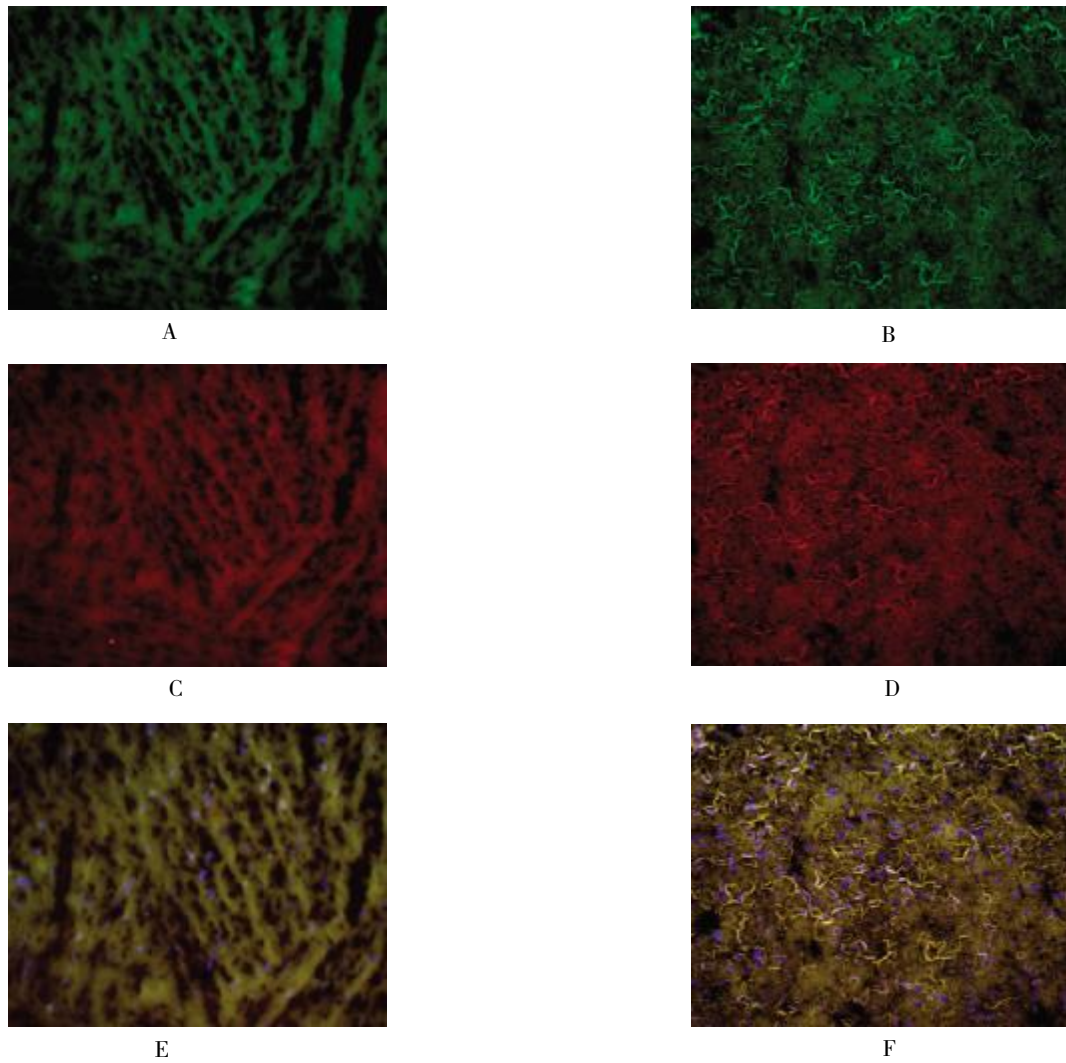


图 2 缺血再灌注后皮层缺血核心区脑组织Ⅷ因子相关抗原和 SUR1 的免疫荧光双标显色 ($\times 20 \times 1.6$ 倍, $n = 3$)

Fig. 2 The von Willebrand factor antibody of ischemic infarcts tissues and SUR1 observed by immunofluorescence double staining after ischemia reperfusion

注: A、B: 兔抗人Ⅷ因子相关抗原标记显色 (绿色); C、D: SUR1 标记显色 (红色); E、F: 兔抗人Ⅷ因子相关抗原、SUR1 和 DAPI 的免疫荧光三标显色. 缺血再灌注后 8 h (A, C, E) 和 12 h (B, D, F) .

3 讨论

各种动物和人体实验已经阐明缺血性脑卒中的病理生理过程是脑供血中断导致局部脑组织缺血缺氧, 激活一系列复杂的时间和空间级联病理

反应, 最终导致神经元死亡^[7]. 而影响缺血性脑卒中预后的主要因素是缺血再灌注所致的细胞水肿. 脑水肿是一个复杂的病理生理过程, 它引起脑肿胀, 使缺血性脑卒中复杂化, 导致神经功能障碍, 出现脑疝甚至死亡. 研究表明, 兴奋性毒性、炎症

介质、氧化应激、细胞凋亡、坏死等许多不同的机制都参与了中枢神经系统缺血性损伤。虽然每一种机制的信号转导通路各不相同^[8]，但在一定程度上，每一种机制都涉及到单价或二价阳离子进入细胞内。进入胞内的阳离子除了使膜电位去极化而提高兴奋性神经递质的毒性外，还可以通过其他途径加重细胞损伤。大量的研究结果表明，非选择性阳离子通道在缺血性脑卒中病变过程中发挥着重要作用。国外研究发现，在缺血的星形胶质细胞中存在 SUR1 调控的 NCCa-ATP 通道表达上调。这种通道由 SUR1 控制，在 ATP 耗竭时开放，并且这种开放会造成细胞毒性水肿。继而，在缺血的神经元中也发现了此通道的大量表达^[9]。此外，在中枢神经系统创伤如脊髓损伤中也发现，SUR1 调控的 NCCa-ATP 通道与其预后具有密切的联系^[9]。本研究发现，缺血再灌注后 3 h、6 h、8 h、12 h 及 24 h 各时间点大脑皮层缺血核心区脑组织 SUR1 受体 mRNA 和蛋白的表达量均上调，再灌注后 8 h 达高峰，之后其表达量逐渐下降，再灌注后 24 h 基本恢复到正常表达量。本研究中所观察到的 SUR1 在缺血再灌注后脑组织中表达量增加，再次证实 SUR1 调控的 NCCa-ATP 通道在脑组织缺血再灌注后表达上调。鉴于阳离子通道开放后必然伴随的细胞离子性水肿及肿胀细胞死亡。笔者认为缺血缺氧所诱导的 NCCa-ATP 通道表达上调与缺血性脑卒中的脑水肿形成有密切关系。

国外 Simard 等在动物卒中模型中，发现毛细血管内皮细胞上 SUR1 的表达也明显上调，在缺血性脑卒中的病理生理演变过程中，除直接的神经元死亡外，其他关键的病变过程如离子性水肿、血管源性水肿及继发性出血等无一例外都与毛细血管内皮细胞的功能相关^[2]。在脊髓损伤的动物模型^[9]中发现在损伤部位伴有出血中心区域内部出血的形成和周围大量的淤点性出血。而用格列本脲干预的动物，其损伤的脊髓仅见少量出血，且大部分局限于受伤部位，在组织周围仅有少量的淤点性出血。这一发现证实了 SUR1 调节的 NC-Ca-ATP 通道在脊髓挫伤、继发性神经损伤过程中血管机制即微血管内皮细胞功能衰竭参与其中并起着重要的作用。本研究发现，缺血再灌注后 12

h，SUR1 在脑微血管内皮细胞的表达非常明显，而在缺血再灌注后 8 h，即 SUR1 受体 mRNA 和蛋白水平高峰期则不明显。提示 SUR1 调控的 NC-Ca-ATP 通道和缺血性脑卒中的病理生理演变过程中与血管机制是相联系的。推测应用 SUR1 受体的特异性抑制剂最佳时机在缺血再灌注后 8 ~ 12 h，以 SUR1 为靶点的治疗手段有可能成为缺血性脑卒中的一种新的治疗方法。

[参考文献]

- [1] SIMARD J, CHEN M, TARASOV K, et al. Newly expressed SUR1-regulated NC (Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke [J]. *Nat Med*, 2006, 12(4): 433 - 440.
- [2] SIMARD J, KENT T, CHEN M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(3): 258 - 268.
- [3] LONGA E, WEINSTEIN P, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91.
- [4] BEDERSON J, PITTS L, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472 - 476.
- [5] ASHWAL S, TONE B, TIAN H, et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Stroke*, 1998, 29(5): 1 037 - 1 046.
- [6] LIVAK K, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [7] WALZ W E. Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology [M]. Toowa: Humana Press, 1999: 5 - 8.
- [8] WON S, KIM D, GWAG B. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2002, 35(1): 67 - 86.
- [9] SIMARD J, TSYMBALYUK O, IVANOV A, et al. Endothelial sulfonylurea receptor 1-regulated NC Ca-ATP channels mediate progressive hemorrhagic necrosis following spinal cord injury [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2 105 - 2 113.

(2013 - 04 - 17 收稿)