

## 脑缺血再灌注大鼠脑内 Mrp1 的表达变化

杨力<sup>1)</sup>, 李洁<sup>1)</sup>, 李志雄<sup>2)</sup>, 容伟<sup>3)</sup>, 于建云<sup>2)</sup>, 郭泽云<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系; 2) 法医学院, 云南昆明 650500; 3) 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** 观察脑缺血再灌注后多药耐药蛋白 (Mrp1) 在脑内的表达变化, 探讨其与缺血再灌注的关系. **方法** 24 只大鼠随机分为假手术组 ( $n=6$ ) 和缺血再灌注后 1、3、7 d 组 ( $n=6$ ). 应用颈内动脉线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 以抗 Mrp1 抗体进行免疫组化染色, 检测缺血再灌注后脑组织中 Mrp1 的表达变化. **结果** Mrp1 在正常脑内的神经元及胶质细胞中均有表达. 缺血再灌注后 1 d、3 d、7 d 组中, 缺血再灌注区的皮质、海马及纹状体内可见 Mrp1 表达升高, 阳性细胞数量增多, 在 3 d 组达高峰 ( $P<0.05$ ). **结论** 大鼠脑缺血再灌注后细胞中 Mrp1 的表达增高, 可能是细胞受损时的自我保护反应, 但同时也可能与临床耐药性的发生有关.

**[关键词]** 脑缺血再灌注; Mrp1; 大鼠

**[中图分类号]** R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0004-04

## The Changes of Multidrug Resistance Protein-1 Expression in Brain after Ischemia-reperfusion in Rats

YANG Li<sup>1)</sup>, LI Jie<sup>1)</sup>, LI Zhi-xiong<sup>2)</sup>, RONG Wei<sup>3)</sup>, YU Jian-yun<sup>2)</sup>, GUO Ze-yun<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Anatomy and Histology; 2) Institute of Forensic Medicine Kunming Yunnan 650500; 3) The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression changes of multidrug resistance protein-1 in brain ischemia/reperfusion in rats. **Methods** The models of ischemia-reperfusion were established by focal middle cerebral artery occlusion (MCAO) method. 24 adult male SD rats were randomly divided into sham and ischemia/reperfusion group (I/R) including 1day, 3days, 7days after I/R ( $n=6$ ); the expression of Mrp1 was observed by immunohistochemistry. **Results** Mrp1 was expressed in cells in cerebral cortex, hippocampus and corpus striatum of normal brain and ischemia/reperfusion brain. The over expression of Mrp1 was found in infarct region after I/R, especially in 3 d group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The over expression of mrp1 can be found in brain after I/R. It suggests that over expression of mrp1 induced by ischemia/reperfusion injuring brain tissue may be related with neural self-protection or multidrug resistance.

**[Key words]** Brain ischemia/reperfusion; Multidrug resistance protein-1; Rat

脑缺血再灌注损伤 (ischemia/reperfusion injury, I/R) 是指脑缺血致脑细胞损伤, 恢复血液再灌注后, 其缺血性损伤反而进一步加重的现象. 随着溶栓术, 血管内介入治疗等手段的广泛应用, 脑缺血再灌注损伤的机制及预防治疗也受

到越来越多的重视. 在血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 上存在转运系统 — 腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白), 如多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance protein, Mrp) 和 P 糖蛋白 (P-glycoprot-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81060101); 云南省科技厅基金资助项目 (2013FZ056); 云南省教育厅基金资助项目 (2011Y168)

**[作者简介]** 杨力 (1976~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 副教授, 主要从事组织胚胎学教学及脑缺血研究工作.

**[通讯作者]** 郭泽云. E-mail: guozeyun1@163.com

ein, P-gp) 等, 该类蛋白在各种生物包括细菌、植物和哺乳类中广泛表达, 并具有多样的功能, 在维持细胞正常的生理活动中有着不可忽视的作用, 如有害物质排出、营养吸收、离子和肽类的转运、细胞信号转导等, 同时也可将细胞中的药物、致癌物等转运到毛细血管腔而保护脑组织<sup>[1]</sup>. 一方面防止脑组织受有害因素的影响, 但另一方面也妨碍治疗脑内疾病药物的进入. Mrp1 (Multidrug resistance protein-1) 是转运蛋白家族中的重要成员, 在损伤因子进入细胞内的同时, 也能引起多药耐药进而降低临床疗效.

目前, 有研究发现 Mrp1 可在脑肿瘤及癫痫的神经细胞中大量表达, 从而影响药物的治疗效果. 但对于脑缺血损伤时 Mrp1 在脑内的表达情况, 目前尚不完全清楚, 本研究将探讨正常脑组织以及缺血再灌注损伤时脑组织中 Mrp1 的表达变化, 以期进一步揭示缺血再灌注与多药耐药的相关关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

成年健康雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 260~280 g, 购于昆明医科大学实验动物中心. 动物均于实验前置于实验室适应环境 1 周, 自由进食、饮水; 室温控制在  $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , 自然光照, 术前禁食 12 h. 随机分为假手术和缺血再灌注 (I/R) 后 1 d、3 d、7 d 组共 6 组 ( $n=6$ ). 整个实验过程均遵循昆明医科大学动物保护伦理委员会的相关规定进行研究.

### 1.2 模型建立和切片制备

用 10% 水合氯醛按 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉, 动物仰卧位固定于手术台上, 采用 Zea-Longa 线栓法<sup>[2]</sup>制备大鼠右侧大脑中动脉栓塞模型. 线栓直径 0.26 mm, 从颈外动脉将线栓插至大脑中动脉起始处, 插入深度约 18~20 mm, 90 min 后拔出线栓, 结扎颈外动脉断端, 缝合皮肤, 缺血再灌注/损伤模型制备完成, 在温床复苏后回笼饲养. 将各组动物依不同时间点腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后仰卧固定, 依次用生理盐水、4% 多聚甲醛溶液经心脏灌注固定后断头取脑, 置于 4% 多聚甲醛溶液后固定 24 h, 梯度酒精脱水后进行石蜡包埋. 之后连续石蜡切片, 切片厚 10  $\mu\text{m}$ , 每个脑组织间隔 3 片取 1 片, 贴于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 室温晾干后保存备用.

### 1.3 TTC 染色

复制大鼠 MCAO 模型, 缺血后 1 d 断头取脑,

去除嗅球、小脑和低位脑干, 生理盐水漂洗后, 置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中冷冻 30 min, 由前向后沿冠状面切成 5 片, 浸入含 1% 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 10 mL 和 0.2 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的溶液中  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min, 其间每隔 10 min 翻动一次脑组织片, 使其染色均匀. 染色后, 将脑组织片置于 4% 的多聚甲醛液中固定, 数码相机摄片.

### 1.4 免疫组织化学染色

取上述切片脱蜡水化后, 以 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液微波修复, 滴加兔抗 Mrp1 抗体 (1:200, Santa Cruz 公司), 置湿盒中孵育, 阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替上述抗体,  $4^\circ\text{C}$  过夜. 用 S-P 羊抗兔二抗试剂盒 (福州迈新公司) 按说明书完成, DAB 显色后以中性树胶封片. 光学显微摄像系统 (BX31, Olympus, Japan) 观察并摄片.

### 1.5 统计学处理

对皮质及纹状体中的 Mrp1 阳性细胞进行计数. 应用 SPSS 软件包对分析测定的结果进行 *t* 检验, 数据采用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 脑缺血后 TTC 染色结果

TTC 染色显示, 大鼠脑右侧有大面积黄白色区域, 即缺血梗死区, 包括大部分皮质、海马和纹状体, 与大脑中动脉供应区域相吻合, 其余红染部位为正常非缺血区 (见图 1).

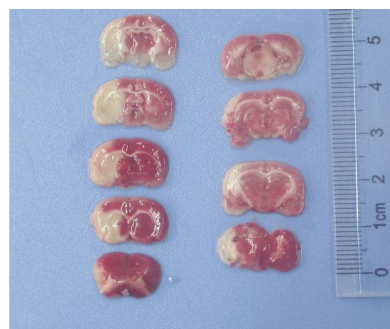


图 1 脑缺血后大鼠脑组织 TTC 染色

Fig. 1 TTC staining after MCAO

### 2.2 免疫组织化学染色结果

免疫组化染色显示, 正常脑组织的神经元及神经胶质细胞中呈现 Mrp1 免疫反应阳性产物, 以散在的点状颗粒形式分布于细胞中, 并具有一定的表达水平. 在皮质、海马及纹状体中均可见体

积大,多突起,核区空染且大而圆的神经细胞,另有许多体积较小的细胞散在分布,可能为胶质细胞(见图2,A1-C1).

缺血再灌注后,缺血区可见神经元及胶质细胞中 Mrp1 免疫反应阳性细胞数增多,阳性产物的表达明显增高,神经元胞质中的颗粒物增多,细胞深

染(见图2,A2-C2). 经过对皮质及纹状体的阳性神经元进行计数后,显示缺血再灌注后 Mrp1 阳性神经元数量增加,并持续到手术后 7 d,其中以手术后 3 d 组达高峰,与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图3.

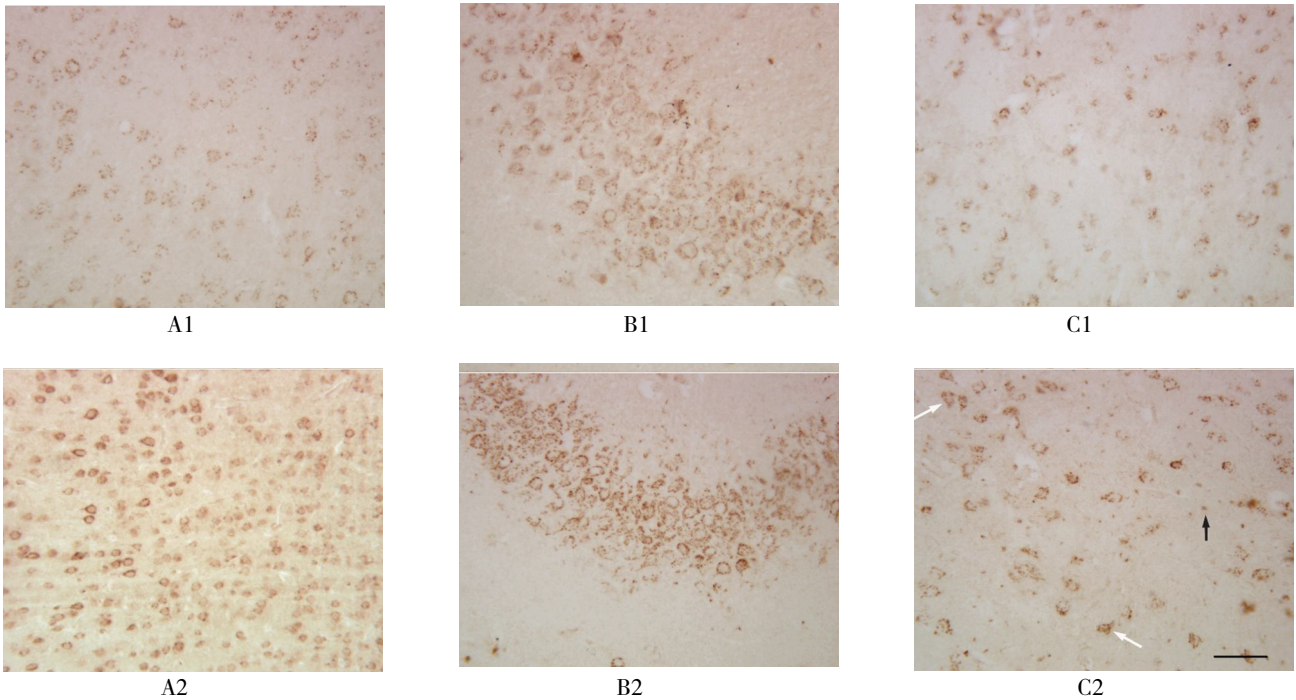


图 2 Mrp1 免疫组化染色

Fig. 2 Mrp1 immunohistochemistry staining

A:Mrp1 在大脑皮质的表达; B:Mrp1 在海马的表达; C:Mrp1 在丘脑的表达; 白色箭头: 神经元; 黑色箭头: 神经胶质细胞; A1-C1:假手术组, A2-C2: 3 d 组, Bar = 50  $\mu$ m.

### 3 讨论

在 Mrp 蛋白家族中, Mrp1<sup>[9]</sup> 最为重要且被研究得最多,它是一种分子量为 190 kD 的跨膜糖蛋白,由 1 531 个氨基酸残基组成,是 Mrp 基因的编码产物,Mrp 基因含 6 500 bp,定位于染色体 16P13.1. Mrp1 广泛分布于多种正常组织的上皮细胞,是组成血脑屏障的重要部分,协同调节脑组织对生理代谢产物的分泌和重吸收,阻止药物、毒物的进入,但同时也使药物进入脑组织的量减少<sup>[4]</sup>. 在人体内 Mrp1 可分布于几乎全身的主要组织,尤其在肾、肺、睾丸和胎盘中高度表达<sup>[9]</sup>,2004 年有学者发现 Mrp1 可存在于人的血脑屏障上,之后有学者发现在脑内星形胶质细胞和小胶质细胞上也

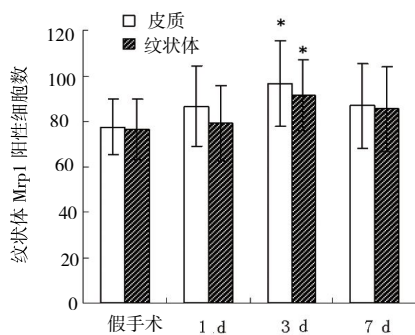


图 3 脑缺血后不同时间点皮质与纹状体 Mrp1 阳性细胞数  
Fig. 3 The number of Mrp1 immunoreactive cells in cerebral I/R area in different postoperative days

与假手术组比较, \* $P < 0.05$

有一定量的 Mrp1 表达<sup>[6]</sup>, 并且 Mrp1 在脑星形细胞瘤中有高度表达, 在正常组织中 Mrp1 主要分布于胞浆中而在肿瘤组织中主要表达于细胞膜上, 提示 Mrp1 的作用在两者中有所不同<sup>[7]</sup>.

Hirrlinger 通过体外实验发现, 培养的星形胶质细胞、神经元、小胶质细胞和少突胶质细胞均可表达 Mrp1, 且星形胶质细胞的表达更为明显<sup>[8]</sup>. 在小肠、肾、肺等器官中, Mrp1 主要表达在细胞膜上, 而在 HeLa 和 HEK293 细胞中, 80%~90%的 Mrp1 却定位在细胞质中, 说明 Mrp1 在不同细胞上的分布有所不同, 既可定位于胞膜也可定位细胞质膜<sup>[8,9]</sup>, 可能对细胞以及亚细胞结构均具有保护作用. 本实验通过免疫组化实验发现, 正常脑组织的皮质、海马及纹状体内有大量神经元和胶质细胞表达 Mrp1, 免疫反应阳性产物以小颗粒形式散在分布于神经元细胞核周围及突起的胞质中, 但对于 Mrp1 在星形胶质细胞及小胶质细胞中的表达量有何不同, 还需要进一步的实验观察. 正常脑组织中广泛表达 Mrp1, 说明生理状态下神经元及胶质细胞能合成一定量的多药耐药蛋白, 可能对维持细胞的多种生理功能有着重要意义.

实验还观察到, 手术后 Mrp1 在缺血再灌注区皮质、海马及纹状体中的免疫反应阳性表达明显增高, 细胞中核周胞质区出现大量的阳性深染颗粒, 同时免疫阳性细胞数在手术后 1 d 组即开始增多, 在 3 d 时达高峰, 并一直持续至 7 d 时仍未恢复至正常水平, 统计结果表明 3 d 组与对照组比较有统计学意义. 说明缺血再灌注损伤可引起脑内神经元和胶质细胞中的多药耐药蛋白表达升高. 在伴发癫痫的胶质瘤患者、接受化疗的脑肿瘤患者及药物诱导的动物癫痫模型中均发现 Mrp1 阳性细胞增多, 同时 Western blot 和 QPCR 表明脑内 Mrp1 的水平升高<sup>[10,11]</sup>. 这些研究证实, 在缺血性损伤、药物、肿瘤及癫痫中, 脑内均可出现 Mrp1 的过表达.

脑缺血再灌注时, 由于兴奋性氨基酸毒性作用及离子失衡, 缺血区组织周围的 pH 值下降, 酸中毒可加重神经细胞的损伤引起脑细胞死亡, 同时也能活化基质金属蛋白酶 (MMPs), 降解细胞外基质的所有成分, 如胶原成分和层粘蛋白、弹性蛋白及纤维蛋白, 促进了基底膜的降解, 使其完整性遭受破坏, 引起血脑屏障通透性增加<sup>[12]</sup>. 血脑屏障的改变使得定位于血脑屏障上的多药耐药蛋白也会受到相应的影响.

本实验进一步证实了脑缺血再灌注能够诱导 Mrp1 在神经组织中的过表达, 这可能是脑损伤后

的一种自我保护机制, 但与此同时也可能与缺血再灌注表现出的耐药性有一定的联系, 对于缺血再灌注后神经组织如何引发 Mrp1 增高的具体机制, 今后将进一步探讨.

### [参考文献]

- [1] BELLAROSAL C, BELLAROSAL G, BORTOLUSSI C. Tiribelli2, The role of ABC transporters in protecting cells from bilirubin toxicity[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15(25):2884-2892.
- [2] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] OLAGA ESAKOVA, ANDREY S. Krasilnikov of proteins and RNA: The RNase P/MRP family[J]. *RNA*, 2010, 16(9):1725-1747.
- [4] PARK H A, KUBICKI N, GNYAWALI S. Natural vitamin E  $\alpha$ -tocotrienol protects against ischemic stroke by induction of multidrug resistance-associated protein 1[J]. *Stroke*, 2011, 42(8): 2308-2314.
- [5] SLOT A J, MOLINSKI S V, COLE S P C. Mammalian multidrug resistance proteins (MRPs)[J]. *Essays Biochem*, 2011, 50(1):179-207.
- [6] YCMAYUR, GJPETERS, VVSRAJENDRA PRASAD, Design of new drug molecules to be used in reversing multidrug resistance in cancer cells [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2009, 9(3):298-306.
- [7] HIRRLINGER J, KONIG J, AND DRINGEN R. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(3):716-719.
- [8] XUE-QING Y U, CHARLIE CHANGLI XUE, GUANGJI-WANG, et al. Multidrug resistance associated proteins as determining factors of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs [J]. *Current Drug Metabolism*, 2007, 8(8):787-802.
- [9] SURTAJ H, IRAMI, SUSAN P C, COLE, Differential functional rescue of Lys513 and Lys516 processing mutants of MRP1 (ABCC1) by chemical chaperones reveals different domain domain interactions of the transporter [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1838(3):756-765.
- [10] CHEN Y H I, WANG C C, XIAO X, et al. Multidrug resistance-associated protein 1 decreases the concentrations of antiepileptic drugs in cortical extracellular fluid in amygdala kindling rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 473-479.
- [11] CALATOZZOLO C I, POLLO B, BOTTURI A, et al. Multidrug resistance proteins expression in glioma patients with epilepsy [J]. *J Neurooncol*, 2012, 10(1):129-135.
- [12] 刘志林, 王士雷, 王 鹏. 线粒体钙单向转运体在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用及其机制 [J]. *卒中与神经疾病*, 2011, 18(2):9-12.

(2014-06-21 收稿)