

Apelin 对急性局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑神经细胞的保护作用

蔡世昌¹, 张秋玲², 李金国², 白波^{3*}

1. 怀化医学高等专科学校解剖学教研室, 怀化 418000

2. 泰山医学院基础医学院生理学教研室, 泰安 271000

3. 济宁医学院基础学院神经生物学研究所, 济宁 272000

[摘要] **目的** 利用 apelin 在大鼠急性局灶性脑缺血再灌注早期进行干预处理, 观察大脑神经细胞凋亡情况及脑组织抗氧化应激能力的变化。**方法** 取成年雄性 Wistar 大鼠随机分成假手术对照(sham)组 12 只、缺血再灌注(I/R)组 72 只、缺血再灌注+apelin 干预(I/R+AP)组 72 只。I/R 组和 I/R+AP 组又根据灌注时间分为再灌注 3、6、12、24、72、120 h 亚组, 每亚组 12 只。I/R+AP 组在再灌注早期(30 min)用 10^{-7} mol/L apelin($10 \mu\text{l}$)进行侧脑室注射给药干预处理。利用 RT-PCR 测定各组大鼠损伤侧大脑皮质 *caspase-3*、*caspase-12* mRNA 表达的变化; 用流式细胞术检测各组大鼠大脑神经细胞凋亡率; 用试剂盒测定脑组织丙二醛(MDA)含量、总谷胱甘肽过氧化物酶活性以及总抗氧化能力。**结果** RT-PCR 检测结果显示, 与假手术组比较, I/R 组和 I/R+AP 组 *caspase-3*、*caspase-12* mRNA 在损伤侧大脑皮质的表达升高; apelin 干预可下调 *caspase-12* mRNA 的表达, 而 *caspase-3* mRNA 的表达变化不明显。流式细胞术检测结果显示, apelin+AP 组缺血区神经细胞凋亡率较 I/R 组降低($P < 0.05$), 且随时间增加变明显。脑组织氧化应激功能检测结果显示, 与假手术组比较, I/R 组脑组织 MDA 含量升高($P < 0.05$), 总谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力降低($P < 0.05$); apelin 干预后, MDA 含量下降, 总谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力升高, 与 I/R 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 大鼠急性局灶性脑缺血再灌注后 apelin 的早期干预对脑神经细胞有一定的保护作用。

[关键词] 卒中; 脑缺血; 再灌注损伤; apelin**[中图分类号]** R 743.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1324-05

Neuroprotective effects of apelin after acute cerebral ischemia and reperfusion in rats

CAI Shi-chang¹, ZHANG Qiu-ling², LI Jin-guo², BAI Bo^{3*}

1. Department of Anatomy, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, Hunan, China

2. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Taishan Medical University, Taian 271000, Shandong, China

3. Institute of Neurobiology, School of Basic Sciences, Jining Medical University, Jining 272000, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To observe the neuron apoptosis and anti-oxidative stress function of cerebral tissues after acute cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in rats treated with apelin in the early period of acute cerebral I/R. **Methods** Totally 156 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: sham group ($n=12$), ischemia reperfusion group (I/R group, $n=72$) and ischemia reperfusion plus apelin group (I/R+AP group, $n=72$). The latter two groups were further divided into 6 subgroups according to reperfusion time (3, 6, 12, 24, 72, and 120 h groups, each group containing 12 rats). Apelin (10^{-7} mol/L [$10 \mu\text{l}$]) was injected into the lateral ventricle in the early time of reperfusion (30 min) in the I/R+AP group. RT-PCR was used to observe the change of *caspase-3* and *caspase-12* mRNA expression in the injured side of cerebral cortex in each group, and flow cytometer was employed to detect the apoptosis rate of neurons. The content of malondialdehyde (MDA), activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), and the total antioxidant capacity were also examined in the brain homogenate after I/R. **Results** The expression of *caspase-3* mRNA and *caspase-12* mRNA was increased in I/R and I/R+AP groups compared with the sham group. Treatment with apelin down-regulated *caspase-12* mRNA expression but had little influence on *caspase-3* mRNA expression. The neuron apoptosis rate was significantly lower in I/R+AP group compared with the I/R group ($P < 0.05$), and the changes increased with time. Compared with the sham group, I/R group had significantly increased MDA content ($P < 0.05$) and significantly decreased GSH-Px activity and total antioxidant capacity ($P < 0.05$). Compared with the I/R group, I/R+AP group had significantly increased GSH-Px activity and total antioxidant capacity and significantly decreased MDA content ($P < 0.05$).

[收稿日期] 2012-08-19**[接受日期]** 2012-10-15**[作者简介]** 蔡世昌, 硕士, 讲师. E-mail: caishichang2008@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0537-2206996, E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn

Conclusion Early intervention with apelin can protect the neurons in rats after acute cerebral I/R.

[Key words] stroke; brain ischemia; reperfusioninjury; apelin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12): 1324-1328]

脑卒中是临床常见病和多发病, 具有高发病率、高病死率、高致残率和高复发率的特点, 分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中, 其中缺血性脑卒中的发病率占 70%~80%, 猝死率更是高达 80% 以上, 是目前临床致残的“头号杀手”, 并且有上升趋势和年轻化趋势^[1]。缺血性脑卒中患者预后不佳, 生活质量偏低, 脑缺血再灌注后损伤的脑组织修复不佳是其预后差的主要原因, 但至今尚无有效的治疗手段来完全修复受损组织。因此, 寻找能有效减缓细胞坏死过程或减少梗死面积的新药就成了目前临床亟待解决的问题。

Apelin 是孤儿 G 蛋白偶联受体——血管紧张素 1 型受体相关蛋白 (putative receptor protein related to AT1, APJ) 的天然配体, 是一种重要的生理调节肽, 由 Tatemoto 等^[2] 于 1998 年首次从牛胃分泌物中发现。研究表明, apelin 广泛存在于中枢神经系统内, 具有神经保护作用, 可保护海马区神经细胞, 防止神经细胞遭受 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 介导的兴奋性损伤, 阻止细胞凋亡和兴奋性毒性死亡^[3-4]。本研究利用 apelin 在大鼠急性脑缺血再灌注后的超早期进行干预, 观察神经细胞凋亡情况以及脑组织抗氧化应激能力变化, 探讨 apelin 对脑缺血再灌注后神经系统功能的保护作用, 为开发与研制修复受损脑组织的新药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物造模及分组 清洁级 Wistar 成年雄性大鼠, 体质量为 (220±10) g, 由山东鲁抗医药股份有限公司提供 (合格证号: scxk 鲁 2008002)。手术前将 Wistar 大鼠在标准动物实验室饲养 1 周, 使之适应周围环境, 以维持基础生理状态, 1 周后严格选择体质量符合标准的大鼠进行实验。将大鼠随机分成假手术对照 (sham) 组 12 只、缺血再灌注 (I/R) 组 72 只、缺血再灌注+apelin 干预 (I/R+AP) 组 72 只, IR 组和 IR+AP 组又根据灌注时间分为再灌注 3、6、12、24、72、120 h 亚组, 每亚组 12 只。采用改良型线栓法制备大鼠大脑中动脉阻断 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 局灶性脑缺血再灌注模型^[5], 缺血 30 min 后, 缓慢拔出尼龙栓进行再灌注。I/R+AP 组造模成功的大鼠在再灌注早期 (30 min)

向侧脑室内注射 10 μl 10⁻⁷ mol/L 的 apelin-13 (Phoenix Pharmaceuticals 公司, apelin-13 浓度根据文献报道^[6] 和预实验结果确定)。再灌注结束后处死动物取材。

1.2 RT-PCR 检测大鼠损伤侧大脑皮质 *caspase-3*、*caspase-12* mRNA 的表达 取各组大鼠损伤侧大脑皮质, 用 TRIzol 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 抽提神经细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 方法检测 *caspase-3*、*caspase-12* mRNA 的表达。引物序列: *caspase-3* 上游引物 5'-GAG ACA GAC AGT GGA ACT GAC GTG-3', 下游引物 5'-GGC GCA AAC TGA CTG GAT GA-3'; *caspase-12* 上游引物 5'-TGC CAA TTC CGA CAA ACA GC-3', 下游引物 5'-GGA CGG CCA GCA AAC TTC AT-3'; *GAPDH* 上游引物 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG G-3', 下游引物 5'-TGG AAG ATG GTG ATG GGA T-3'。*Caspase-3* 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s (30 个循环); 72℃ 延伸 8 min。*Caspase-12* 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s (30 个循环); 72℃ 延伸 8 min。*GAPDH* 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s (26 个循环); 72℃ 延伸 8 min。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。所得电泳条带用自动凝胶成像分析系统测定各阳性条带的密度, 以内参 *GAPDH* 与各扩增产物密度的比值作为目的基因的相对表达量, 用 Quantity One 软件对结果进行分析。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取各组大鼠大脑缺血半暗带区组织制成神经细胞悬液, 利用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), 用 FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BIO-RAD 公司) 对细胞凋亡情况进行检测。采用 488 nm 的激发波长计数 10⁴ 个细胞, 所得计量资料用 Cell Quest 软件进行分析。

1.4 大鼠脑组织氧化应激功能检测 缺血再灌注 24 h 后取各组大鼠半暗带周围 3 mm 脑组织匀浆, 对脑组织进行丙二醛 (MDA) 含量、总谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力检测。脂质氧化 MDA 检测试剂盒、总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 快速法) 均购自江苏

碧云天生物技术研究所。

1.5 统计学处理 所得数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用双因素方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Apelin 对大鼠损伤侧大脑皮质 *caspase-3* mRNA 和 *caspase-12* mRNA 表达的影响 由图 1 可见,I/R 组和 I/R+AP 组 *caspase-3* mRNA 表达较假手术组升高,说明脑缺血能激发细胞凋亡;apelin 干预后,I/R+AP 组 *caspase-3* mRNA 表达变化不明显。由图 2 可见,I/R 组和 I/R+AP 组 *caspase-12* mRNA 表达较假手术组升高,提示脑缺血能激发细胞凋亡途径;apelin 干预后,I/R+AP 组 *caspase-12* mRNA 表达减弱,说明 apelin 可能通过影响 *caspase-12* mRNA 表达而降低细胞凋亡。

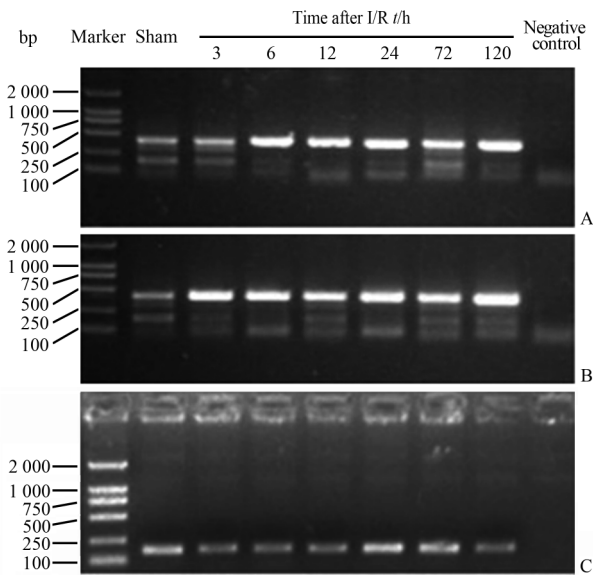


图 1 *Caspase-3* mRNA 在大鼠损伤侧大脑皮质的表达
Fig 1 Expression of *caspase-3* mRNA in injured side of rat cerebral cortex

A: I/R group; B: I/R+AP group; C: *GAPDH*. I/R: Ischemia/reperfusion; AP: Apelin

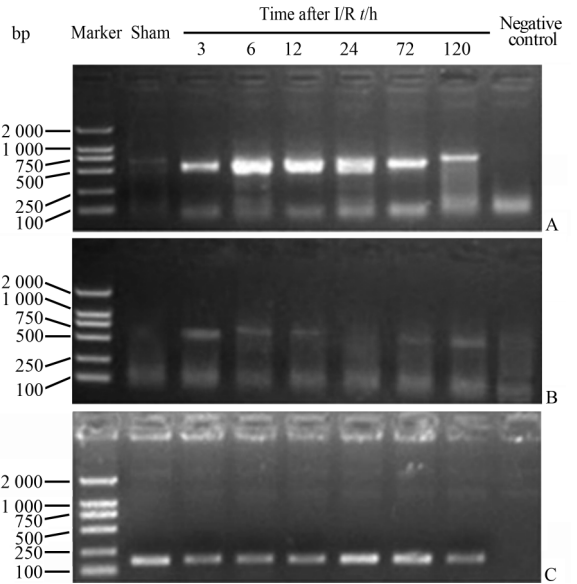


图 2 *Caspase-12* mRNA 在大鼠损伤侧大脑皮质的表达
Fig 2 Expression of *caspase-12* mRNA in injured side of rat cerebral cortex

A: I/R group; B: I/R+AP group; C: *GAPDH*. I/R: Ischemia/reperfusion; AP: Apelin

2.2 Apelin 对大鼠脑神经细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示:假手术组脑早期神经细胞凋亡率为(3.86±1.75)%。单纯脑缺血 30 min 再灌注 3 h 后早期神经细胞凋亡率增高[(73.90±7.50)%],并持续居高不下,单纯脑缺血 30 min 再灌注 12 h 神经细胞凋亡率达到峰值[(90.88±2.75)%],至再灌注 24 h 开始降低。Apelin 干预脑缺血再灌注 3 h 后神经细胞凋亡率为(73.22±9.40)%,与 I/R 组比较差异无统计意义($P>0.05$);apelin 干预脑缺血再灌注 6 h,12 h 后各组神经细胞凋亡率与 I/R 组相比均降低($P<0.05$),表明 apelin 超早期干预能降低脑缺血再灌注后大鼠神经细胞的凋亡率。Apelin 干预脑缺血再灌注 24 h 后神经细胞凋亡率与 I/R 组相比差异无统计意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 I/R 后各组大鼠脑神经细胞的凋亡率
Tab 1 Apoptosis rates of neurons in rats of each group after I/R

Group	n=12, $\bar{x} \pm s$, %			
	I/R 3 h	I/R 6 h	I/R 12 h	I/R 24 h
Sham	3.86±1.75	3.86±1.75	3.86±1.75	3.86±1.75
I/R	73.90±7.50**	84.28±3.80**	90.88±2.75**	79.88±8.21**
I/R+AP	73.22±9.40**	81.22±5.40**△	88.30±8.90**△	80.13±6.85**

I/R: Ischemia/reperfusion; AP: Apelin. ** $P<0.01$ vs sham group; △ $P<0.05$ vs I/R group

2.3 Apelin 对大鼠脑组织氧化应激功能的影响 由表 2 可见,大鼠急性脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后,I/R 组的 MDA 含量明显高于假手术组,总谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力低于假手术组(P 均 <0.05);经 apelin 干预后,MDA 含量降低,

总谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力升高,与 I/R 组比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。表明 apelin 的干预能有效降低氧化应激中脂质氧化反应,提高抗氧化能力。

表 2 I/R 24 h 后各组大鼠脑组织 MDA 含量、总谷胱甘肽过氧化物酶活性及总抗氧化能力

Tab 2 MDA content, glutathione peroxidase activity and total antioxidant capacity in brain homogenate of rats in each group 24 h after I/R

Group	MDA $m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	Total GSH-Px $\bar{x}_B/(\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1})$	Total antioxidant capacity $m_B/(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1})$
Sham	3.58±0.88	890.03±98.96	6.68±0.42
I/R	7.12±0.67*	316.00±37.05*	3.79±0.20*
I/R+AP	5.82±0.53* Δ	655.95±30.33* Δ	5.36±0.16* Δ

$n=12, \bar{x} \pm s$

I/R: Ischemia/reperfusion; AP: Apelin; MDA: Malondialdehyde; GSH-Px: Glutathione peroxidase. * $P<0.05$ vs sham group; $\Delta P<0.05$ vs I/R group

3 讨论

急性脑缺血造成的脑损伤是一个复杂的病理生理过程,脑血流的中断和再灌注造成的损伤是一个快速的级联反应,包括能量障碍、细胞酸中毒、兴奋性氨基酸释放增加、细胞内钙稳态失衡、自由基生成、凋亡基因的激活等许多环节。这些环节互为因果,彼此重叠,相互联系,相互影响,最终导致细胞的凋亡或坏死^[7]。细胞坏死和细胞凋亡是两种完全不同的细胞死亡机制;细胞凋亡是主动性的细胞程序化死亡,是机体主动清除衰老、受损和死亡细胞,维护机体自身稳定性的一种主要机制。在急性脑损伤的边缘区,神经细胞并不立即死亡,而是可存活数小时后才发生细胞凋亡或坏死,这就为抢救细胞死亡的治疗争取了时间。如此时突然恢复供血(即再灌注)则会加重细胞的损伤,随着再灌注的持续,坏死边缘区的组织有一定的修复。本实验强调在缺血再灌注损伤的超早期实施干预,从而在有效的时间内尽可能地延长抢救时间窗和阻止可存活的细胞发生凋亡,甚至逆转细胞凋亡。卒中中对中枢神经系统损伤的抢救关键有两点,一是减少损伤区脑细胞的凋亡,再就是促进中枢神经系统的再生及分化,从而诱导神经功能的重建和神经功能的恢复。

Caspase 被认为与凋亡密切相关。常态下以无活性的结构存在,激活后能够特异性地切割靶蛋白天冬氨酸残基后的肽键,导致 DNA 修复蛋白细胞骨架蛋白及其他 caspase 相关蛋白水解。Caspase-12 被认为是与炎症相关的凋亡因子,而 caspase-3

是与凋亡相关的效应因子,目前研究证实 caspase-3 在细胞凋亡级联反应中处于核心地位,是 caspase 级联反应下游最关键的凋亡执行蛋白水解酶^[8]。本实验利用 RT-PCR 技术检测两种因子 mRNA 的表达,结果发现在单纯急性脑缺血再灌注后 caspase-3 mRNA 在大脑皮质表达升高,caspase-12 mRNA 的表达也升高;apelin 干预后可下调 caspase-12 mRNA 的表达,而对 caspase-3 mRNA 的表达影响不大。说明脑缺血再灌注后能触发 caspase-3 因子的活化,启动凋亡程序;apelin 超早期干预后主要是通过抑制 caspase-12 表达而抑制细胞凋亡。

大鼠急性脑缺血后会产生大量的活性氧成分,从而激发神经细胞的氧化应激,具体表现为氧自由基的大量生成,引发链式脂质过氧化反应,细胞内的过氧化物和细胞膜及细胞器膜发生脂质氧化,膜的通透性和流动性发生改变,并攻击蛋白质,使酶的活性丧失或降低^[9],进而破坏神经细胞的细胞膜和细胞器膜以及微血管系统,这些脂质结构和过氧化物发生脂质氧化,产生一系列复杂的化合物,MDA 是组织中发生脂质氧化后脂肪酸分解产物之一。本实验通过检测 MDA 的含量从而间接检测脂质氧化水平,实验结果表明,在大鼠脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后,apelin 的超早期干预能降低大鼠脑组织 MDA 含量。哺乳动物体内具有一个防御体系,机体可自动产生超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶等来清除氧自由基^[10],谷胱甘肽过氧化物酶可以清除组织细胞内的过氧化物从而起到保护细胞膜免受氧自由基损伤的作用。本实验通过检测总谷胱甘

肽过氧化物酶活性来证实各组大鼠急性脑缺血再灌注后脑组织的总抗氧化能力,结果表明 apelin 超早期干预能提升脑组织中总谷胱甘肽过氧化物酶活性,从而保护神经细胞免受氧化应激损害。利用 ABTS 快速法对各组脑组织中总抗氧化能力的检测结果表明大鼠脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后,apelin 超早期干预组与单纯缺血组相比,总抗氧化能力升高,但低于假手术组。这进一步说明 apelin 能提高大鼠缺血后脑组织的抗氧化能力,从而在一定程度上起到神经保护作用。

关于 apelin 对大鼠缺血后脑组织的神经保护机制尚不清楚。研究表明,apelin 在蛋白水解酶的作用下水解成不同长度的片段,其中 apelin-13 和 apelin-36 可以作为激动剂作用于 apelin 受体,apelin-13 可显著地阻止原代培养的小鼠皮质神经细胞的凋亡^[11]。Cook 等^[12]认为,apelin-13 可以起到较好的神经保护作用,其机制主要是诱导 Akt 和 Baf/ERK-1/2 的磷酸化进而对抗 NMDA 对神经细胞的兴奋性损伤;又有研究显示:apelin-13 诱导 ERK1/2 而不是 p38MAPK 磷酸化的产生^[6]。Apelin-13 也可以通过阻断 NMDA 诱导的 Ca²⁺ 堆积,通过直接减弱 NMDA 诱导的离子电流来降低 NMDA 的活性,防止神经细胞遭受 NMDA 介导的兴奋性损伤作用,阻止细胞凋亡和兴奋性毒性死亡^[3,12]。

本研究采用大鼠急性局灶性脑缺血再灌注模型,通过在脑损伤超早期给予 apelin 侧脑室微量注射干预治疗,证实通过抑制内质网应激通路中的一些凋亡早期指标,下调 caspase-12 mRNA 的表达和增强抗氧化能力等,进而阻断凋亡通路,为凋亡早期的细胞赢得时间窗,对抗脑缺血后诱发的细胞死亡级联反应,促进神经功能的恢复。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 高旭光. 2010 年世界卒中日之“六分之一”行动[J]. 中国医学前

沿杂志(电子版),2010,2:18-21.
 [2] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou M X, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251: 471-476.
 [3] O'Donnell L A, Agrawal A, Sabnekar P, Dichter M A, Lynch D R, Kolson D L. Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury[J]. J Neurochem, 2007, 102: 1905-1917.
 [4] Reaux A, Gallatz K, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain[J]. Neuroscience, 2002, 113: 653-662.
 [5] 张秋玲, 孙远标, 李金国, 陈小娣, 白波. 局灶性脑缺血及脑缺血再灌注动物模型的制作[J]. 中国临床康复, 2006, 10: 106-109.
 [6] Bai B, Tang J, Liu H, Chen J, Li Y, Song W. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the G_{i2} pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008, 40: 311-318.
 [7] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M A. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view[J]. Trends Neurosci, 1999, 22: 391-397.
 [8] Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68: 383-424.
 [9] Wattanapitayakul S K, Bauer J A. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications[J]. Pharmacol Ther, 2001, 89: 187-206.
 [10] Pardo-Andreu G L, Barrios M F, Curti C, Hernández I, Merino N, Lemus Y, et al. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver[J]. Pharmacol Res, 2008, 57: 79-86.
 [11] Zeng X J, Yu S P, Zhang L, Wei L. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons[J]. Exp Cell Res, 2010, 316: 1773-1783.
 [12] Cook D R, Gleichman A J, Cross S A, Doshi S, Ho W, Jordan-Sciutto K L, et al. NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury[J]. J Neurochem, 2011, 118: 1113-1123.

[本文编辑] 商素芳, 孙岩