

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01073

低剂量米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用

陶涛¹, 秦新月², 秦文熠³, 李小刚^{1*}

1. 泸州医学院附属医院神经内科, 泸州 646000
2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016
3. 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨静脉用低剂量米诺环素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及其机制。**方法** 成年雄性SD大鼠72只,随机分为假手术组(S组)、缺血再灌注组(I/R组)和米诺环素干预组(I/R+MC组)。I/R组行大脑中动脉阻塞再灌注术;S组行假手术操作;I/R+MC组在再灌注术后,尾静脉注射3 mg/kg米诺环素,每日2次,持续14 d。缺血再灌注后2 d,采用TTC染色法测定脑梗死体积,伊文思蓝(EB)法评估血脑屏障的通透性,蛋白质印迹法检测缺血侧脑组织内高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)及离子钙接头蛋白(ionized calcium-binding adaptor molecule 1, Iba1)的表达。分别于再灌注后2、7、14 d,采用改良的神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)评估大鼠神经功能。**结果** 缺血再灌注后2 d,I/R组大鼠脑梗死体积较S组增大,缺血侧脑组织内EB的渗出量、HMGB1和Iba1蛋白表达均较S组明显增加($P<0.05$)。与I/R组比较,I/R+MC组大鼠脑梗死体积减小($P<0.05$),EB的渗出量、HMGB1和Iba1蛋白表达量降低($P<0.05$)。I/R+MC组大鼠的神经功能缺损评分较I/R组下降($P<0.05$)。**结论** 米诺环素可能通过降低大鼠脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积、血脑屏障的通透性及小胶质细胞激活等发挥神经保护作用。

[关键词] 米诺环素;脑缺血;再灌注损伤;高迁移率族蛋白质类

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1073-05

Neuroprotective effects of low dose minocycline against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats

TAO Tao¹, QIN Xin-yue², QIN Wen-yi³, LI Xiao-gang^{1*}

1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China
2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
3. Department of Integrative Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the neuroprotective effects of low dose intravenous minocycline against ischemia reperfusion injury in rats after focal cerebral ischemia reperfusion and to explore the possible mechanism. **Methods** Seventy-two rats were randomly divided into sham-operated group (S group), cerebral ischemia/reperfusion group (I/R group), and minocycline intervention group (I/R + MC group). Focal cerebral ischemia was induced by filament medial cerebral artery occlusion method. Minocycline (3 mg/kg) in saline was administered intravenously via the caudal vein twice a day for 14 days in the I/R + MC group. At 2 days after ischemia reperfusion, the infarct volume was evaluated using TTC staining, the permeability of blood-brain barrier was assessed by Evan's blue (EB) dye extravasation, and the expressions of high mobility group box-1 protein (HMGB1) and Iba1, a marker of activated microglia, were analyzed by using Western blotting analysis. The neurological function recovery was evaluated using the modified neurological severity score (mNSS) at 2 d, 7 d, and 14 d after ischemia/reperfusion. **Results** Two days after cerebral ischemia reperfusion, the brain infarction volume and the extravasations of EB were significantly increased and the expressions of HMGB1 and Iba1 were significantly up-regulated in I/R group compared with sham group ($P<0.05$). Compared with I/R group, minocycline at 3 mg/kg via the caudal vein

[收稿日期] 2014-03-28 **[接受日期]** 2014-07-17

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会资助项目(140032), 泸州市科技计划项目(2014S4506), 泸州医学院附属医院青年基金(博士)资助项目(14046). Supported by Project of Health Department of Sichuan Province (140032), Project of Science and Technology Plan of Luzhou (2014S4506) and the Youth Fund of Affiliated Hospital of Luzhou Medical College (2014046).

[作者简介] 陶涛, 博士, 讲师. E-mail: congsheng1984@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0830-3165794, E-mail: lixg5948@163.com

significantly reduced the infarct volume in ischemic brain ($P < 0.05$), extravasation of EB and expressions of HMGB1 and Iba1 ($P < 0.05$). Additionally, the rats in I/R+MC group exhibited a significantly decreased neurological severity score compared with I/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** Minocycline exerts a neuroprotective effect in rats with cerebral ischemia reperfusion injury, which may be related to decrease of infarct size, inhibition of EB extravasation and microglia activation.

[Key words] minocycline; brain ischemia; reperfusion injuries; high mobility group proteins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1073-1077]

脑血管病因其高发病率、高致残率及高死亡率,给社会和家庭带来了沉重的经济负担。缺血性脑卒中患者除在超早期进行静脉溶栓治疗外,尚缺乏有效的治疗手段。因此,积极寻求新的神经保护剂是目前研究的重点。米诺环素是一种第二代四环素类抗生素,具有抗炎、抗凋亡、抗氧化应激及血管保护活性,通过多途径、多靶点发挥保护作用^[1]。有研究表明,腹腔注射大剂量米诺环素对大鼠缺血性脑损伤具有神经保护作用^[2]。近期一项临床研究显示,静脉给予低剂量米诺环素对缺血性脑卒中患者是安全可行的^[3]。大量基础和临床研究表明小胶质细胞激活介导的炎症反应及缺血灶周围高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)的聚集在缺血性脑损伤中起着重要作用^[4-5]。本研究旨在观察静脉给予低剂量米诺环素对大鼠缺血性脑损伤后脑梗死体积、血脑屏障通透性、小胶质细胞的活化、HMGB1的表达及神经功能的影响,从而阐明其可能的神经保护机制。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂 72只成年雄性SD大鼠,体质量250~280g,购于重庆医科大学实验动物中心[SCXK(渝)20120001]。红四氯氮唑(TTC)及盐酸米诺环素(Sigma公司),山羊抗离子钙接头蛋白(Iba1)多克隆抗体(英国Abcam公司),兔抗HMGB1多克隆抗体(北京博奥森公司),全蛋白提取试剂盒(南京凯基公司),伊文思蓝(EB,碧云天生物公司)。

1.2 动物处理与分组 72只SD大鼠按随机数字表分为假手术组(S组)、缺血再灌注组(I/R组)和米诺环素干预组(I/R+MC组),每组24只。从各组中各选6只分别进行蛋白质印迹、脑梗死体积、血脑屏障通透性及大鼠神经功能评分。I/R组大鼠参照本课题组前期的实验方法^[6]制作大脑中动脉阻塞再

灌注模型:大鼠麻醉后,将其仰卧位固定,颈正中切口,分离出颈总、颈内及颈外动脉,隔断颈外动脉及颈内外动脉之间的交通支,结扎颈总动脉和颈内动脉,从颈外动脉残端缓慢插入线栓,插入到微感阻力即停止,用丝线固定线栓并缝合伤口,缺血2h后轻轻拔出线栓到动脉分叉处,实现再灌注。S组大鼠除不插入线栓外,其余步骤同I/R组。I/R+MC组在再灌注后,尾静脉注射3mg/kg米诺环素,每日2次,持续14d。

1.3 TTC染色法测定大鼠脑梗死体积 大鼠脑缺血再灌注2d后进行TTC染色。具体步骤如下:用3.5%水合氯醛麻醉大鼠后断头处死,将脑组织放入-20℃冰箱中冷冻30min,取出后切成5片(每片厚2mm);放入2%TTC溶液中,37℃避光孵育30min;最后用数码相机采图,使用ImageJ软件测量不同层面的梗死面积,根据梯形法则计算梗死体积。

1.4 EB法测定血脑屏障通透性 参照Belayev等^[7]的方法,再灌注2d后股静脉注射2%EB(5mL/kg),6h后处死大鼠,经左心室灌注生理盐水后取出大脑,称量双侧大脑半球,每克脑组织加入2mL甲基酰胺,60℃水浴24h取出,7500×g离心20min,取上清液,15000×g离心10min。取上清液200μL加入酶标板中,酶标仪630nm测定光密度值,计算脑组织EB含量,结果以μg/g脑组织表示。

1.5 蛋白质印迹法检测HMGB1、Iba1蛋白表达 缺血再灌注2d后,分别提取缺血侧脑组织蛋白。以30μg蛋白/电泳道上样,10%SDS-PAGE电泳后将目的蛋白转移至0.45μm的PDVF膜上,5%脱脂牛奶封闭后,4℃孵育特异性一抗过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1h后,用凝胶扫描成像仪拍照。采用Quantity One图像软件进行灰度定量分析,将目的蛋白与内参β-actin的光密度的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.6 大鼠神经功能缺损评分 参照 Chen 等^[8]提出的改良神经功能缺损评分(mNSS),对各组大鼠术后 2、7、14 d 的神经功能进行评价计分。0 分是最低分,18 分为最高分,得分越高神经功能损害越严重。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较运用 AVONA 分析,两两比较行 LSD 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 米诺环素对脑缺血再灌注后脑梗死体积的影响 脑缺血再灌注后 2 d, TTC 染色结果显示, I/R 组大鼠脑梗死体积约占 S 组正常脑组织体积的 35.4%,米诺环素干预后大鼠的脑梗死体积约占 S 组的 23.7%,低于 I/R 组梗死体积(图 1)。

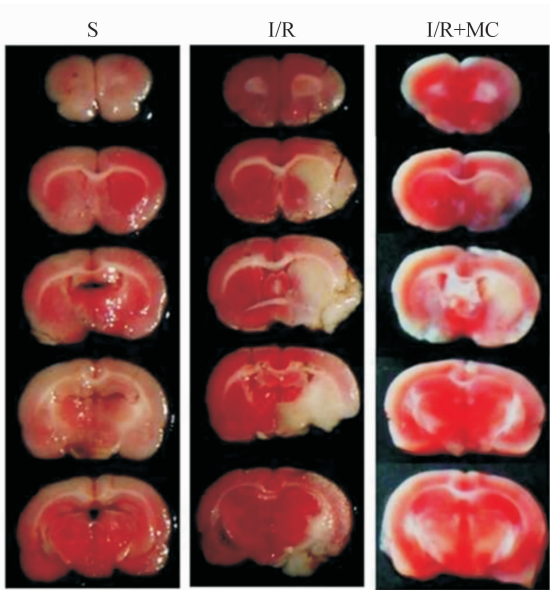


图 1 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积的影响

Fig 1 Effects of minocycline on infarct volume of rats after cerebral ischemia/reperfusion

S; Sham-operated group; I/R; Ischemia/reperfusion group; I/R+MC; Minocycline intervention group

2.2 米诺环素对脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的影响 脑缺血再灌注后 2 d, I/R 组大鼠右侧大脑半球皮质及皮质下有明显的 EB 渗出。定量分析结果表明, I/R 组大鼠缺血侧脑组织 EB 含量多于 S 组 ($P < 0.05$), I/R+MC 组大鼠缺血脑组织的 EB 含量低于 I/R 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

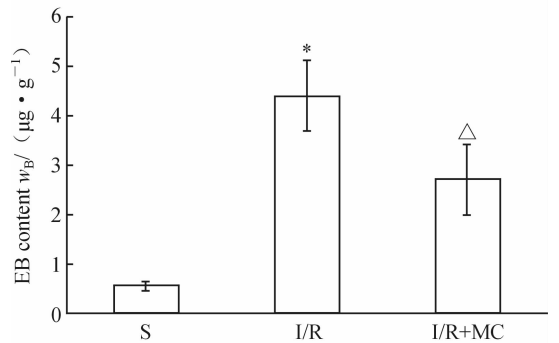


图 2 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性的影响

Fig 2 Effects of minocycline on permeability of blood brain barrier of rats after cerebral ischemia/reperfusion

S; Sham-operated group; I/R; Ischemia/reperfusion group; I/R + MC; Minocycline intervention group; EB; Evan's blue. * $P < 0.05$ vs S group; $\Delta P < 0.05$ vs I/R group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 米诺环素对脑缺血再灌注后 Iba1、HMGB1 蛋白表达的影响 S 组缺血侧脑组织仅有少量 Iba1 和 HMGB1 蛋白表达。缺血再灌注后 2 d, I/R 组 Iba1 和 HMGB1 蛋白表达量高于 S 组 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, I/R+MC 组 Iba1 和 HMGB1 蛋白表达量减少 ($P < 0.05$, 图 3)。

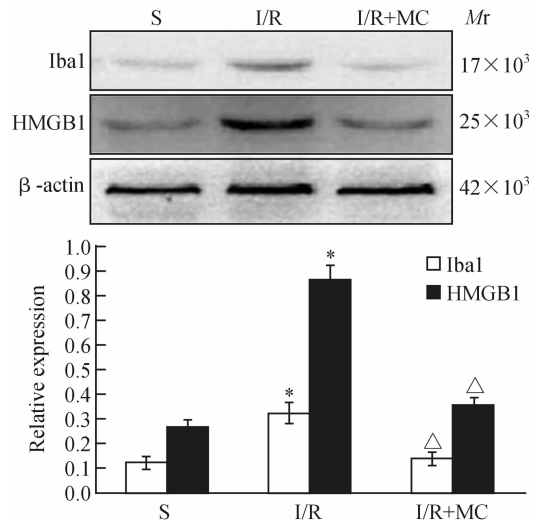


图 3 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Iba1 和 HMGB1 蛋白表达的影响

Fig 3 Effects of minocycline on Iba1 and HMGB1 expressions of rats after cerebral ischemia/reperfusion

S; Sham-operated group; I/R; Ischemia/reperfusion group; I/R+MC; Minocycline intervention group. Iba1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; HMGB1: High mobility group box-1 protein. * $P < 0.05$ vs S group; $\Delta P < 0.05$ vs I/R group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.4 米诺环素对大鼠缺血再灌注后神经功能的影响 S 组在各时间点无神经功能缺损症状。缺血再灌注后, I/R 组和 I/R+MC 组大鼠均出现神经功能缺损症状。缺血再灌注 2 d 后, I/R+MC 组大鼠神

经功能缺损评分与 I/R 组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 缺血再灌注 7、14 d 后, I/R+MC 组大鼠神经功能缺损评分均低于 I/R 组 ($P<0.05$, 表 1)。

表 1 各组间大鼠改良神经功能缺损评分比较

Tab 1 Comparison of modified neurological severity scores between rats of different groups

$n=6, \bar{x} \pm s$

Group	After ischemia/reperfusion		
	2 d	7 d	14 d
Sham-operated	0	0	0
Ischemia/reperfusion	10.50±1.05*	7.50±1.22*	6.83±0.75*
Minocycline intervention	10.67±1.17*	5.83±0.75*△	4.00±1.26*△

* $P<0.05$ vs sham-operated group; △ $P<0.05$ vs ischemia/reperfusion group

3 讨论

米诺环素是一种高脂溶性且能通过血脑屏障的四环素类抗生素, 在临床上被广泛用于治疗严重的关节炎及感染性疾病。最近的研究表明, 米诺环素在中枢神经系统疾病中具有神经保护作用, 是目前最具潜力的神经保护剂^[2]。多项研究表明, 长期给予米诺环素治疗可以通过抑制小胶质细胞/巨噬细胞的激活、清除氧自由基、调节半胱氨酸蛋白酶 (caspases) 依赖或非依赖性途径发挥抗炎、抗氧化应激、抗凋亡等作用, 从而改善大鼠的神经功能^[2,9]。在脑缺血的动物模型中, 常选择腹腔注射高剂量 (10~90 mg/kg) 米诺环素的方式给药^[10], 但腹腔注射会导致米诺环素的延迟吸收和腹膜激惹^[11], 而且不适合于临床的广泛应用。因此, 寻找米诺环素最佳的给药途径及最佳剂量是将基础研究应用到临床的关键。静脉注射 3 mg/kg 的米诺环素可以达到口服 200 mg 米诺环素的血药浓度。Xu 等^[12]发现, 脑缺血 5 h 内静脉注射 3 mg/kg 米诺环素能降低大鼠脑梗死体积, 缓解神经功能的损害, 与本研究的結果一致。血脑屏障在维持大脑功能中起到重要的作用, 本实验表明低剂量米诺环素能降低伊文思蓝的渗出, 减轻血脑屏障的损坏。

HMGB1 是一种高度保守的非组蛋白 DNA 结合蛋白, 在大脑皮质及海马等部位广泛表达。近年研究发现 HMGB1 是一种新的促炎性细胞因子, 脑缺血再灌注后, HMGB1 可通过活性小胶质细胞主

动分泌和受损的神经细胞被动释放的方式从细胞核转移到细胞质, 再释放到细胞外, 激活体内多条信号通路, 启动炎症反应, 引起各种炎性介质的释放, 从而导致缺血再灌注损伤^[5]。Shin 等^[13]研究表明脑缺血后 HMGB1 的释放存在两个高峰, 早期以受损细胞的释放增多为主, 晚期以激活的炎性细胞合成增加为主。经鼻给予 HMGB1 七聚物肽治疗后, 可以抑制 HMGB1 介导的神经元死亡, 起到神经保护作用^[14]。本研究发现, 静脉给予低剂量米诺环素 2 d 后, 缺血脑组织内 HMGB1 的表达明显低于 I/R 组, 表明米诺环素抑制了脑缺血早期 HMGB1 的释放。小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞, Iba1 是活性小胶质细胞的标记物, 脑缺血后小胶质细胞过度激活, 参与缺血再灌注损伤的病理过程。本研究发现, 低剂量米诺环素可以抑制小胶质细胞的活化, 减轻缺血再灌注损伤, 与 Hayakawa 等^[15]报道结果类似。

综上所述, 尾静脉给予低剂量米诺环素可以改善局灶性脑缺血再灌注大鼠的神经功能, 其机制可能包括减少脑梗死体积, 降低血脑屏障的通透性, 抑制小胶质细胞的活化及促炎因子 HMGB1 的释放。本研究结果提示, 低剂量米诺环素对大鼠缺血性脑损伤具有神经保护作用, 这为临床应用米诺环素治疗缺血性脑血管疾病提供了理论及实验基础。

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] Karachitos A, García Del Pozo J S, de Groot P W, Kmita H, Jordán J. Minocycline mediated mitochondrial cytoprotection: premises for therapy of cerebrovascular and neurodegenerative diseases[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14:47-55.
- [2] Plane J M, Shen Y, Pleasure D E, Deng W. Prospects for minocycline neuroprotection[J]. *Arch Neurol*, 2010, 67:1442-1448.
- [3] Fagan S C, Waller J L, Nichols F T, Edwards D J, Pettigrew L C, Clark W M, et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study[J]. *Stroke*, 2010, 41:2283-2287.
- [4] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87:779-789.
- [5] Wang Y C, Lin S, Yang Q W. Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8:134.
- [6] 陶涛,秦新月,徐广会. 养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后轴突再生及RGMa表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35:635-638.
- [7] Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg M D. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Brain Res*, 1996, 739(1-2):88-96.
- [8] Chen J, Sanberg P R, Li Y, Wang L, Lu M, Willing A E, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32:2682-2688.
- [9] Franco E C, Cardoso M M, Gouvêia A, Pereira A, Gomes-Leal W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia[J]. *Neurosci Res*, 2012, 73:122-132.
- [10] Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, et al. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke[J]. *BMC Neurosci*, 2009, 10:126.
- [11] Fagan S C, Edwards D J, Borlongan C V, Xu L, Arora A, Feuerstein G, et al. Optimal delivery of minocycline to the brain; implication for human studies of acute neuroprotection[J]. *Exp Neurol*, 2004, 186:248-251.
- [12] Xu L, Fagan S C, Waller J L, Edwards D, Borlongan C V, Zheng J, et al. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats[J]. *BMC Neurol*, 2004, 4:7.
- [13] Shin J H, Lee H K, Lee H B, Jin Y, Lee J K. Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and secretion in activated microglia and in the postischemic brain[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 558:159-163.
- [14] Kim I D, Shin J H, Lee H K, Jin Y C, Lee J K. Intranasal delivery of HMGB1-binding heptamer peptide confers a robust neuroprotection in the postischemic brain[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 525:179-183.
- [15] Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism[J]. *Stroke*, 2008, 39:951-958.

[本文编辑] 魏学丽