

米诺环素对大鼠脑出血后 VEGF、GLUT-1 表达的影响

陈建新

(山东省济南市第一人民医院神经内科, 山东 济南 250011)

摘要:目的 研究米诺环素对脑出血大鼠 VEGF、GLUT-1 表达的影响,探讨其的脑保护作用机制。方法 选用雄性 Wistar 大鼠 60 只,随机分为假手术组、模型组及米诺环素组,每组 20 只。采用 VII 型胶原酶法制备 Wistar 大鼠右侧纹状体出血模型。模型制备成功后米诺环素组给予腹腔注射米诺环素,剂量为 22.5 mg/kg,2 次/d,假手术组和模型组给予腹腔注射等量的生理盐水。观察脑缺血后改良神经功能缺损评分(mNSS)、脑组织含水量、Western blots 及免疫组化法分别检测 VEGF 及 GLUT-1 的表达。结果 与模型组相比,米诺环素组大鼠脑组织的 mNSS 评分、脑组织含水量、VEGF 及 GLUT-1 的表达量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 米诺环素可显著减轻脑出血后大鼠的神经功能损害及组织学损伤,并提高大鼠脑组织 VEGF 及 GLUT-1 的表达水平,对脑出血具有一定的神经保护作用,其机制可能与增强 VEGF 及 GLUT-1 的表达有关。

关键词:脑出血;米诺环素;VEGF;GLUT-1

中图分类号:R743.3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.21.026

文章编号:1006-1959(2019)21-0085-03

Effect of Minocycline on the Expression of VEGF and GLUT-1 after Intracerebral Hemorrhage in Rats

CHEN Jian-xin

(Department of Neurology, the First People's Hospital of Jinan, Jinan 250011, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of minocycline (MC) on the expression of VEGF and GLUT-1 in rats with intracerebral hemorrhage, and to explore the mechanism of brain protection of minocycline. Methods 60 male Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group and minocycline group, with 20 rats in each group. The right striatum hemorrhage model of Wistar rats was prepared by type VII collagenase method. After successful model preparation, the minocycline group was given intraperitoneal injection of minocycline at a dose of 22.5 mg/kg twice daily. The sham operation group and the model group were given an equal amount of normal saline. The cerebral ischemic modified neurological deficit score (mNSS), brain tissue water content, Western blots and immunohistochemistry were used to detect the expression of VEGF and GLUT-1. Results Compared with the model group, the mNSS score, brain water content, VEGF and GLUT-1 expression in the brain tissue of the minocycline group were significantly lower ($P<0.05$). Conclusion Minocycline can significantly reduce the neurological damage and histological damage in rats after intracerebral hemorrhage, and increase the expression of VEGF and GLUT-1 in rat brain tissue. It has a certain neuroprotective effect on intracerebral hemorrhage, and its mechanism may be associated with enhanced expression of VEGF and GLUT-1.

Key words: Intracerebral hemorrhage; Minocycline; VEGF; GLUT-1

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是常见的卒中类型,具有较高的致残率及致死率,严重威胁患者生命健康及生活质量,给社会及家庭带来了沉重的经济负担。目前仍缺乏有效的药物改善预后,因此探讨脑出血的病因并寻找针对性的有效药物是亟待解决的问题^[1]。近年来亦有研究表明米诺环素(MC)对神经系统具有一定的保护作用^[2]。血管内皮生长因子(VEGF)是体内一种具有神经营养及神经再生作用的因子,可促进内皮细胞增生,加速组织修复。葡萄糖转运体(GLUT)可维持机体的能量代谢,并参与机体的多种神经生理过程,从而对脑组织发挥保护作用,而发挥主要作用的是 GLUT-1^[3]。本研究利用大鼠脑出血模型,检测 MC 对脑出血大鼠脑组织 VEGF 及 GLUT-1 表达的影响,探讨 MC 对脑出血的潜在神经保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物的分组和处理 健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 60 只,8 周龄,体重约 250~300 g,由山东大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将其分为假手术组、模型组及米诺环素组,每组 20 只。

1.2 方法

1.2.1 脑出血动物模型的建立 采用 VII 型胶原酶法制备 Wistar 大鼠脑出血模型。具体操作如下:以 8 周龄雄性 Wistar 大鼠前囟为原点,在大鼠前囟右侧 3.2 mm、前方 0.5 mm 处,以微型电钻(Roboz, RS-6300, 美国)钻孔,将微量注射器固定于相应位置缓缓插入,深度 5.6 mm,米诺环素组和模型组大鼠以微量注射器(Hamilton, 80565, 美国)向其右侧纹状体缓慢注射经无菌生理盐水(广西裕源药业有限公司,批号:H45020977,规格:500 ml/瓶)稀释的 VII 型胶原酶(江莱生物<上海>, 93703879)2 μ l,假手术组大鼠注射等体积生理盐水,停针 3 min 使溶液充分扩散后拔针、仔细缝合手术伤口。术后米诺环素组予腹腔米诺环素注射液(湖北潜龙药业股份公司,批号:20050602,规格:50mg)22.5 mg/kg,2 次/d,假手术组和模型组给予腹腔注射等量生理盐水,共 28 d。

1.2.2 神经功能评价 分别于治疗后第 1、3、7、14、28 天使用改良 mNSS 评分评价大鼠神经功能。包括运动实验(6 分)、感觉实验(2 分)、平衡木实验(6 分)、反射实验和不正常运动(4 分),总评分共 18 分,其中评分 7 分以下为轻度损害、评分 7~12 分中度损害、评分 12 分以上重度损害。

作者简介:陈建新(1978.7-),男,山东济南人,硕士,主治医师,主要从事脑血管病的基础和临床研究

1.2.3 脑组织含水量测定 采用干湿重法测定脑组织含水量。治疗结束后每组每个时间点(第 1、3、7、14、28 天)分别随机选取 3 只大鼠,以 10% 水合氯醛(300 mg/kg)(Macklin, MFCD00044479, 美国)麻醉大鼠,端头取脑,称重缺血侧的脑组织,后将其放入 100 ℃的烤箱(中杰, ZJ885-6 型, 苏州)中烤至恒重,当 2 次称重脑组织质量差小于 0.2 mg 时,记录最后 1 次质量为脑组织的干重。计算脑组织的含水量,脑组织含水量(%)=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%。

1.2.4 大鼠脑组织灌注取材 治疗结束后,各组剩余 5 只大鼠予腹腔注射 10%水合氯醛麻醉,剪刀剪开剑突下皮肤,充分暴露心脏,以大号注射针头刺入尖部,经左心室入主动脉,剪开右心耳。以生理盐水约 100 ml 快速灌注,继之 300 ml 生理盐水缓慢灌注,于冰上断头取脑,额极后 2.5 mm 处切取 3.0 mm 厚的脑组织,每只大鼠的一半脑组织放入 4%多聚甲醛液中浸泡 30 min 后进行聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物(OCT)包埋,另一半脑组织经液氮速冻后于-80 ℃保存,提取蛋白后行 Western blots 检测。

1.2.5 Western blots 检测 VEGF 表达水平 取冻存脑组织,加入组织蛋白质抽提液,匀浆器高速匀浆,4℃冰冻离心机以 12000 r/min 离心 15 min,收集上清液,采用 BCA 试剂盒(百奥莱博,HR-0359-BKL,北京)检测总蛋白浓度,根据蛋白浓度配胶上样,每孔 20 μg 蛋白,经电泳、转膜后,以 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,4℃下 VEGF(BioXcell, BE0060-100MG)—抗孵育过夜,洗膜后二抗孵育,化学发光法扫膜分析,以 β-actin (TIANDZ, 130590-20, 中国)作为内参。

1.2.6 免疫荧光染色检测 GLUT-1 的表达 OCT 包埋脑组织后,行冰冻切片切片以磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次,10 ml/dl 山羊血清封闭,PBS 冲洗,室温孵育

GLUT-1(Santacruz, sc-377228, 美国)—抗 2 h,后二抗孵育 1 h,孵育完成后,切片滴加抗淬灭溶液后加盖玻片保存,于共聚焦显微镜(Nikon, 尼康 A1 型, 日本)下观察,采集图片分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析,计数资料用($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 mNSS 评分比较 与假手术组的大鼠比较,模型组及米诺环素组大鼠在造模后的第 1、3、7、14、28 天时 mNSS 评分均较假手术组升高($P < 0.05$);与模型组的大鼠比较,米诺环素组的大鼠的 mNSS 评分明显降低($P < 0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠脑含水量的比较 与假手术组的大鼠比较,模型组及米诺环素组的大鼠在造模后第 1、3、7、14、28 天时大鼠脑含水量升高($P < 0.05$)。与模型组的大鼠比较,米诺环素组的大鼠的脑含水量降低,($P < 0.05$),见表 2。

2.3 各组大鼠脑 VEGF 及 GLUT-1 表达水平的比较 假手术组、模型组及米诺环素组 GLUT-1 的荧光强度分别为(68.76 ± 5.47)、(35.85 ± 3.39)及(46.82 ± 4.25);与假手术组的大鼠比较,模型组及米诺环素组的大鼠在造模后 GLUT-1 表达水平降低($P < 0.05$)。与模型组的大鼠比较,米诺环素组的大鼠的 GLUT-1 表达水平升高($P < 0.05$),见图 1、图 2;假手术组、模型组及米诺环素组 VEGF 的表达量分别为(78.32 ± 6.21)、(39.52 ± 4.63)及(58.37 ± 5.03)。与假手术组的大鼠比较,模型组及米诺环素组的大鼠在造模后 VEGF 表达水平降低($P < 0.05$);与模型组的大鼠比较,米诺环素组的大鼠的 VEGF 表达水平升高($P < 0.05$),见图 3、图 4。

表 1 各组大鼠 mNSS 评分的比较($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
假手术组	0.55±0.21	0.68±0.18	0.59±0.20	0.45±0.16	0.42±0.14
模型组	17.20±1.20 [*]	19.52±1.80 [*]	18.84±1.40 [*]	16.18±1.50 [*]	14.52±1.31 [*]
米诺环素组	14.37±1.46 [#]	16.93±1.53 [#]	15.65±1.33 [#]	14.19±1.37 [#]	13.24±1.08 [#]

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

表 2 各组大鼠脑含水量的比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
假手术组	78.25±0.22	79.41±0.26	78.87±0.31	78.16±0.24	74.02±0.13
模型组	84.52±0.38 [*]	85.48±0.36 [*]	84.67±0.32 [*]	84.45±0.29 [*]	82.56±0.25 [*]
米诺环素组	79.81±0.33 [#]	81.69±0.34 [#]	81.02±0.28 [#]	79.79±0.30 [#]	77.32±0.23 [#]

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

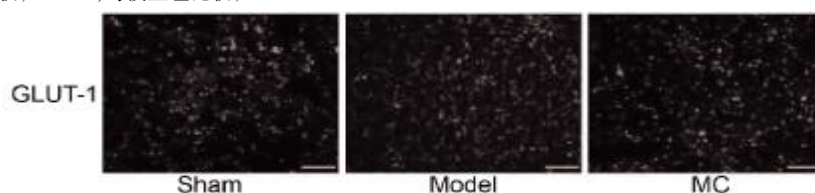


图 1 各组大鼠脑组织 GLUT-1 的免疫荧光染色结果

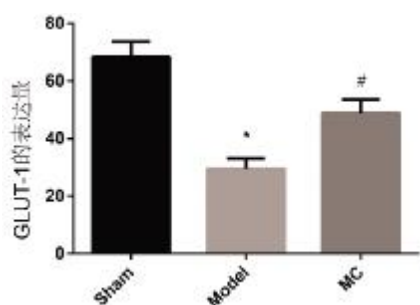


图2 各组大鼠脑组织 GLUT-1 免疫荧光染色的定量分析

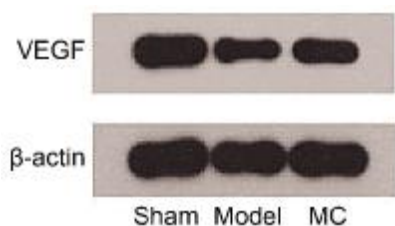


图3 各组大鼠脑组织 VEGF 的免疫印迹结果

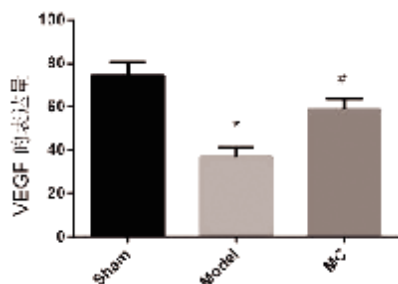


图4 各组大鼠脑组织 VEGF 免疫印迹结果的定量分析

3 讨论

脑出血是临床常见的脑血管病之一,常见于中老年人,其发病率高、致残率高且死亡率高,给社会及家庭带来较沉重的负担。目前脑出血缺乏有效的治疗药物,因此阐明脑出血的发病机制并探寻有效的药物是目前临床脑出血防治亟待解决的重大课题。

脑出血后,血液急剧进入脑组织,导致脑水肿发生。一般认为,脑出血所致的水肿,可加重组织的缺血、缺氧状态,影响神经细胞的功能^[4]。VEGF 可在脑出血的脑组织中表达,发挥促进血管内皮增生及促进组织液回流的作用,改善微循环功能。因此,VEGF 水平对脑出血功能的恢复至关重要。此外,VEGF 还具有一定的神经营养及神经再生功能,促进神经细胞的存活,并可保持神经突触的完整性,指导血管腔的形成,促进神经血管网络的重建,根据机体需求,调控血管分布^[9]。因此,VEGF 发挥神经保护作用的机制复杂,调控 VEGF 水平是促进神经修复的重要手段。

在脑出血导致的神经损伤中,能量的合成及利用障碍是加重病情的重要病理机制,可能与出血所致的血管内皮细胞内三磷酸腺苷合成显著降低,离

子泵的功能不能维持,从而诱发糖酵解过程,无氧糖酵解可产生大量酸性物质,局部 PH 失衡,加重组织损伤^[6]。人脑中葡萄糖主要靠 GLUT 实现能量转移,而发挥主要作用的是 GLUT-1。在损伤早期 GLUT-1 表达上调,从而可加快葡萄糖的转运,有利于保证受损脑组织的能量供应,促进葡萄糖的脑内储备,维持神经元的存活,从而为后续治疗争取时间。葡萄糖产生的 ATP 同样对稳定神经膜电位有重要作用,可维持早期的神经传导及神经级联反应^[7]。因此 GLUT-1 对脑出血组织能量供应有重要作用,是治疗脑出血的潜在靶点。

MC 是一种广谱四环素衍生物,除具有抗菌作用外,还具有神经保护作用^[8]。本研究显示,MC 可有效改善脑出血的神经功能评分,降低脑水肿,表明 MC 对脑出血的神经保护作用。进一步检测 VEGF 及 GLUT-1 的表达,发现 MC 可显著增加二者的表达水平,提示增强 VEGF 及 GLUT-1 的表达可能是 MC 发挥脑出血保护作用的潜在机制。

综上所述,MC 治疗可增加脑出血脑组织内 VEGF、GLUT-1 的表达水平,减轻脑水肿,并改善 mNSS 神经功能评分,维持脑出血受压组织的能量供应,稳定线粒体膜电位,促进神经元及血管内皮的修复,从而发挥神经保护作用。因此,未来大样本多中心的临床研究具有重要意义,期待进一步在临床中证实 MC 对脑出血的神经保护作用机制,无疑将改善脑出血患者的治疗和预后。

参考文献:

- [1] Sprugel MI, Huttner HB. Intracerebral hemorrhage: hot topics [J]. *Nervenarzt*, 2019, 90(10): 987-994.
- [2] Miao H, Li R, Han C, et al. Minocycline promotes posthemorrhagic neurogenesis via M2 microglia polarization via upregulation of the TrkB/BDNF pathway in rats [J]. *J Neurophysiol*, 2018, 120(3): 1307-1317.
- [3] 陈建新. 阿加曲班注射液治疗急性脑梗死的疗效及对血清 VEGF、GLUT-1 水平的影响 [J]. *医学信息*, 2018, 31(19): 5-7.
- [4] 张玉龙. 内镜辅助小骨窗开颅血肿清除术治疗脑出血的疗效 [J]. *医学信息*, 2019, 32(18): 87-88.
- [5] 王爱丽. 补阳还五汤联合银杏达莫注射液对脑梗死患者 P-selection、VEGF 水平的影响 [J]. *临床研究*, 2019, 27(9): 142-143.
- [6] 章时杰, 许婷婷, 王奇. 蒙本内酯通过调节脑微血管内皮细胞 GLUT1 改善 APP/PS1 小鼠 Aβ 转运 [J]. *神经药理学报*, 2019, 9(4): 52.
- [7] 肖世庚, 董文彬, 叶小弟, 等. 自噬在米诺环素保护大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(7): 730-736.
- [8] Scott G, Zetterberg H, Jolly A, et al. Minocycline reduces chronic microglial activation after brain trauma but increases neurodegeneration [J]. *Brain*, 2017, 141(2): 459-471.

收稿日期: 2019-10-17; 修回日期: 2019-10-25

编辑/肖婷婷