

PNU-282987 对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经元凋亡和学习记忆能力的影响

李晓敏, 樊文香*

(东南大学附属中大医院药学部, 南京 210009)

摘要 研究 PNU-282987 对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用和可能机制。建立体内大脑中动脉闭塞再灌注 (MCAO/R) 损伤模型, SD 大鼠 44 只随机分为 4 组: 假手术组、模型对照组、PNU-282987 低剂量 (1.2 mg/kg) 和 PNU-282987 高剂量 (2.4 mg/kg) 治疗组。Y-型电迷宫检测大鼠空间学习记忆能力, 并检测大鼠脑梗死面积、脑含水量和神经功能评分, 苏木精-伊红 (H&E) 染色观察脑组织病理学改变, TUNEL 法检测神经元凋亡情况。结果显示, 治疗组较模型对照组学习记忆能力明显改善, 且治疗组可显著降低缺血再灌注后大鼠脑梗死面积、脑含水量和神经行为学评分, 同时发现 PNU-282987 高剂量 (2.4 mg/kg) 能够改善缺血脑组织病理学损伤, 抑制神经元凋亡。本研究提示 PNU-282987 可提高脑缺血再灌注损伤后大鼠学习记忆能力, 其机制可能与抑制神经元凋亡有关。

关键词 PNU-282987; 脑缺血再灌注损伤; 学习记忆能力; 凋亡

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)02-0193-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200210

引用本文 李晓敏, 樊文香. PNU-282987 对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经元凋亡和学习记忆能力的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(2): 193-197.

Cite this article as: LI Xiaomin, FAN Wenxiang. Effects of PNU-282987 on neuronal apoptosis and learning and memory ability after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(2): 193-197.

Effects of PNU-282987 on neuronal apoptosis and learning and memory ability after cerebral ischemia-reperfusion in rats

LI Xiaomin, FAN Wenxiang*

Department of Pharmacy, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract To investigate the neuroprotective effect and possible molecular mechanism of PNU-282987 on rats subjected to ischemia and reperfusion. In this study, middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) in rats was used as the animal model. The 44 Sprague-Dawley (SD) rats were divided into 4 groups, sham group, model group, low-dose of PNU-282987 (1.2 mg/kg) and high-dose of PNU-282987 (2.4 mg/kg) treatment group. Y-maze test was tested for the learning and memory abilities of rats, and we also examined the brain infarct size, brain edema and neurological dysfunction in rats. Furthermore, HE staining was used to evaluate the neuronal injury and TUNEL assay was used to evaluate the neuronal apoptosis in the rat brain. The results revealed that the learning and memory abilities of rats in treatment group improved significantly, and treatment with PNU-282987 reduced brain infarct size, lessened brain edema, lessened neurological dysfunction, ameliorated pathological injury and prevented neuronal apoptosis. The above results suggest that the underlying mechanism of PNU-282987 on improving learning and memory abilities of rats after cerebral ischemia and reperfusion may include the inhibition of neuronal apoptosis.

Key words PNU-282987; cerebral ischemia-reperfusion; learning and memory ability; apoptosis

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central University (No. 2242020K40175)

收稿日期 2020-01-07 通信作者 * Tel: 025-83262638 E-mail: wenxiangfancpu@163.com

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No. 2242020K40175)

缺血性脑血管病是危害人类生命与健康的常见病和多发病,具有发病率高、病死率高、复发率高和致残率高的“四高”特点。在急性脑血管病中,缺血性脑卒中约占脑卒中总数的 85%^[1]。近年来,α7 nAChR 在心肌缺血/再灌注损伤、脑卒中、动脉粥样硬化和高血压等心血管系统疾病中均有研究,且激活 α7 nAChR 可抑制神经元细胞凋亡,促进神经细胞的存活^[2–5]。但对于脑缺血再灌注损伤中 α7 nAChR 的作用却鲜有报道。PNU-282987 已被证明是 α7nAChR 的一种有效激动剂,与其他 nAChR 亚型的相互作用可以忽略不计,是目前合成的最特异的 α7nAChR 激动剂。因此,本研究选择 PNU-282987 作为研究对象,通过研究其在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用和可能机制,进一步阐述 α7 nAChR 在脑缺血再灌注损伤中的影响。

1 材 料

1.1 药品与试剂

PNU-282987(美国 MedChemexpress 公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);多聚甲醛(上海凌峰化学试剂有限公司);红四氮唑(TTC, 中国 Biosharp 公司);甲醛溶液(西陇化工股份有限公司)。

1.2 仪 器

MG-3 迷宫刺激器(张家港市教学实验器械厂);BS 224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.3 动 物

SD 大鼠 44 只,雄性,体质量 250~280 g,由上海杰思捷实验动物有限公司提供,生产许可证号: SCXK(沪)2013-0006,所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤(MCAO/R)模型的建立

SD 大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 11 只,分别为假手术组、模型对照组, PNU-282987 低剂量(1.2 mg/kg)和 PNU-282987 高剂量(2.4 mg/kg)治疗组。各组大鼠在造模手术前 24 h 禁食不禁水。手术过程参照 Longa^[6] 方法:大鼠用 3% 水合氯醛

300 mg/kg(1 mL/100 g)麻醉,分离右侧颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)、颈总动脉(CCA)、枕动脉(OA)、甲状腺上动脉((STA))。结扎并剪断 OA 及 STA。结扎 ECA 远心端。于 ECA 主干切口向 ICA 入颅方向插入尼龙线(长 40 mm, 直径 0.26 mm)。插入深度以距 CCA 分叉处(18 ± 0.5) mm 为宜,可感到明显的阻力及尼龙线的弯曲和牵张,此时达到大脑前动脉内,阻断了大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)供血来源。记录缺血时间,扎紧 ECA 根部,缺血 90 min 后拔出尼龙线,为再灌注开始。假手术组仅做钝性分离,不闭塞 MCA。术后治疗组分别腹腔注射 PNU-282987(1.2 mg/kg 或 2.4 mg/kg),假手术组和模型对照组大鼠腹腔注射相应量的生理盐水,每天给药 1 次,连续给药 3 d。

2.2 Y-迷宫实验

给药第 2 天 30 min 后对大鼠进行 Y-迷宫实验。将受试大鼠放入 Y 型电迷宫内适应环境 3 min,然后给大鼠以电刺激,设定电击电压 50 V,延迟时间 2 s。改变电击区和安全区,大鼠遭遇电击时直接逃避至安全区为正确反应,否则为错误反应。每 10 次电击后休息 5 min。学习评分以达到连续 10 次电击中有 9 次正确反应(9/10 正确反应)前所受的累计电击次数来表示。24 h 后测定连续 10 次电击中正确反应次数,作为记忆评分^[7]。

2.3 神经功能学评分、脑梗死面积和脑含水量的测定

给药第 3 天 30 min 后对动物的神经功能缺陷进行分级评分并记录,标准如下^[6]。0 分:未观察到神经症状;1 分:提尾悬空时,动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲,肩内旋,肘外展,紧贴胸壁;2 分:将动物置于光滑平面上,推手术侧肩向对侧移动时,阻力降低;3 分:动物自由行走时向手术对侧环转或转圈;4 分:软瘫,肢体无自发活动。

神经功能评分结束后,前 8 只大鼠脱颈椎处死,迅速取出全脑,用镊子去除小脑、嗅球和低位脑干。将大脑迅速置于 -20 °C 冰箱中冷冻 15~0 min,至大鼠脑变硬时,用锋利的刀片在视交叉及其前后各 2 mm 处,做冠状切 5 刀,将脑组织切成 5 片,迅速将切好的脑片置于含有 1% TTC 的 PBS 缓冲溶液约 4 mL 中(过程中要避光),避光温孵 15 min。15 min 后轻轻取出脑片,按顺序排列好,擦干脑片周围的水分,用数码相机对染好的脑片进

行拍照。数码照片使用 Image-Pro Plus 图像分析软件进行分析,计算梗死百分比^[8]的公式:梗死百分比(%) = 梗死部分面积/全脑面积 × 100。

用数码相机对脑片进行拍照后,称取大脑湿重并记录。将称重后的脑组织放入 110 ℃烘箱里进行烘干(12 h),达到恒重后称取脑组织干重并记录,计算脑含水量百分比^[9]。

2.4 HE 和 TUNEL 染色

神经功能评分结束后,每组后 3 只大鼠脱颈椎处死,迅速取出全脑,将脑组织浸入 10% 福尔马林溶液中固定并制备石蜡切片。对蜡块进行常规切片 5 μm,再进行脱蜡处理。脱蜡结束后用苏木精染料染色 5~6 min,染色结束后用流水冲洗返蓝。接着进行脱水、透明,之后进行中性树脂封片。最后显微镜下进行阅片,拍照。染色后细胞核呈蓝色,胞浆呈红色,其他成分呈深浅不同红色。观察大脑皮质区细胞形态学改变,根据病变程度分别记为 0 分,1 分,2 分,3 分,4 分^[10]。

脑组织的石蜡切片进行脱蜡处理后,根据试剂盒说明书,用末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法进行染色。经过常规的脱水、透明、封片后,用显微镜进行观察、拍照。染色后阳性细胞呈现棕黄色,细胞浆呈现紫蓝色。拍好的照片使用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析数据。

2.5 统计学方法

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用单因素方差分析方法(One-Way Anova)进行检验分析,组间两两比较。若方差齐,采用 Bonferroni 检验;若方差不齐,则用 Dunnett's T3 检验。神经功能评分采用 Mann-Whitney 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 PNU-282987 降低缺血再灌注后大鼠脑梗死面积

由表 1 可见,脑缺血再灌注后,缺血大鼠连续给药 3 d,末次给药后脱颈椎处死并经 TTC 染色,结果显示假手术组未见明显的梗死区,模型对照组则出现显著的梗死区。与模型对照组比较,PNU-282987 高剂量组可以显著降低大鼠脑梗死面积($P < 0.01$),PNU-282987 低剂量组也可以显著降低大鼠脑梗死面积($P < 0.05$)。

Table 1 Effects of PNU-282987 on infarct size after MCAO/R in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Dose/(mg/kg)	Infarct size/%
Sham	-	-
Model	-	34.43 ± 4.31 ^{##}
PNU-282987	2.4	20.35 ± 5.17 ^{* *}
PNU-282987	1.2	29.09 ± 4.56 [*]

^{##} $P < 0.01$ vs sham group; ^{* *} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.2 PNU-282987 降低缺血再灌注后大鼠神经功能评分及脑含水量

由表 2 可见,脑缺血再灌注后,与假手术组比较,模型对照组大鼠的神经功能评分和脑含水量均显著上升($P < 0.01$),提示造模成功。与模型对照组比较,PNU-282987 治疗组可显著降低大鼠神经功能评分($P < 0.01$, $P < 0.05$),PNU-282987 高剂量组可显著降低缺血大鼠脑含水量($P < 0.01$)。

Table 2 Effects of PNU-282987 on neurological deficit scores and brain edema after MCAO/R in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Dose/(mg/kg)	Neurological deficit scores	Brain edema/%
Sham	-	-	77.19 ± 2.01
Model	-	2.75 ± 0.46 ^{##}	81.61 ± 1.84 ^{##}
PNU-282987	2.4	1.75 ± 0.46 ^{* *}	78.69 ± 1.65 ^{* *}
PNU-282987	1.2	2.13 ± 0.64 [*]	79.90 ± 2.20

^{##} $P < 0.01$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$, ^{* *} $P < 0.01$ vs model group

3.3 PNU-282987 改善缺血再灌注后大鼠脑组织病理学损伤

脑缺血再灌注后,假手术组大脑组织结构正常,细胞排列整齐,轮廓清楚,神经元未见坏死;模型对照组组织结构不清,排列紊乱,见严重坏死;PNU-282987 治疗后,神经元的形态得到改善(图 1-A)。对病理图片进行评分,结果显示,与假手术组比较,模型组脑缺血病变评分显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,PNU-282987 治疗组脑缺血病变评分降低,且 PNU-282987 高剂量组具有显著性($P < 0.01$)(图 1-B)。

3.4 PNU-282987 抑制缺血再灌注后神经元凋亡

由图 2 可见,脑缺血再灌注后,与假手术组比较,模型组大鼠凋亡神经元的数量显著增加($P < 0.01$)。与模型对照组比较,PNU-282987 治疗组大鼠脑组织中凋亡神经元的数量均显著性降低($P < 0.01$)。

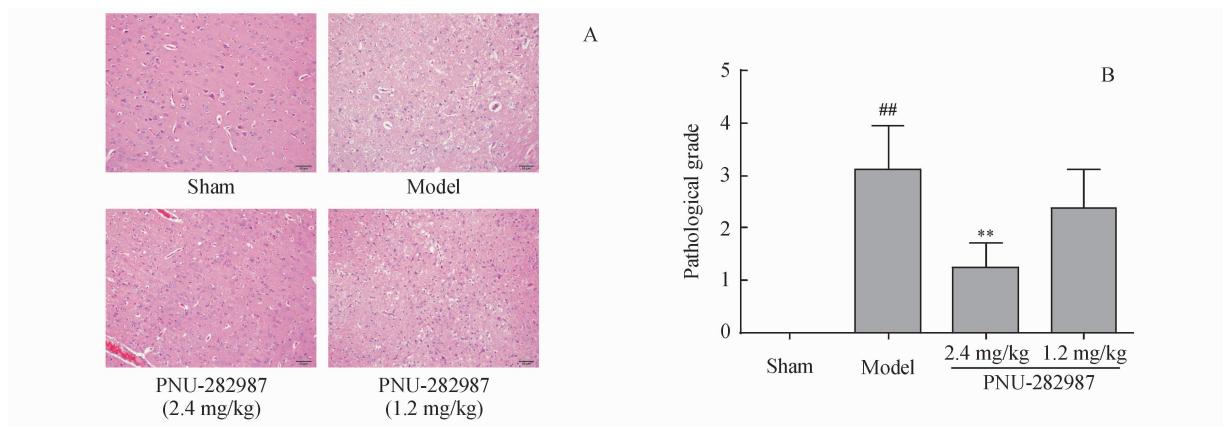


Figure 1 Effects of PNU-282987 on neuronal injury in the ischemic cerebral cortex of rats

A: Representative HE staining of brain tissues ($200\times$); B: Quantitative analysis of pathological grade ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

$P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

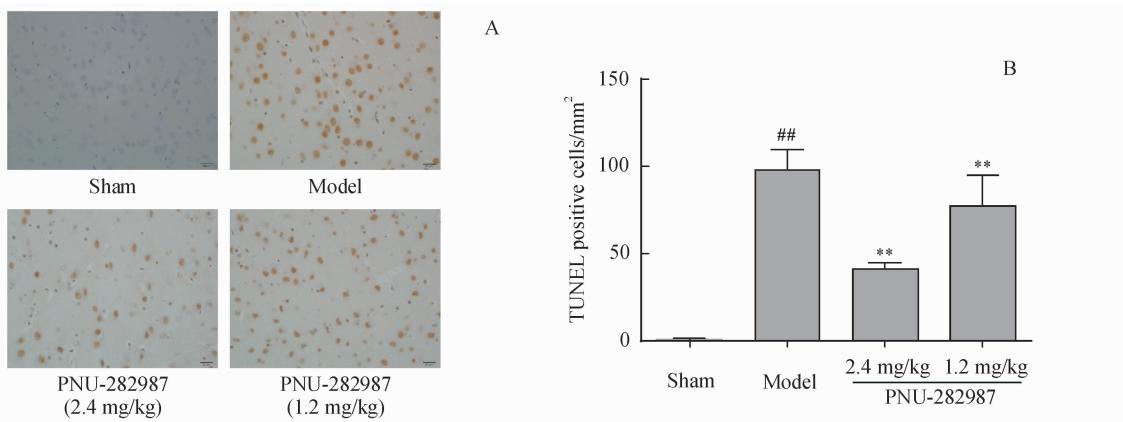


Figure 2 Effects of PNU-282987 on neuronal apoptosis in the ischemic cerebral cortex of rats

A: Representative TUNEL staining of brain tissues ($400\times$); B: Quantitative analysis of TUNEL positive cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

$P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

3.5 PNU-282987 提高缺血再灌注后大鼠空间学习记忆能力

脑缺血再灌注后,采用Y-电迷宫对大鼠进行空间学习记忆能力的检测。结果显示,与假手术组比较,模型对照组大鼠的学习能力和记忆能力均有所下降,且具有显著性($P < 0.01$)。与模型对照组比较,PNU-282987治疗组大鼠的学习和记忆能力均不同程度提高,且PNU-282987高剂量组具有显著性($P < 0.01$)。结果提示,PNU-282987可提高缺血大鼠的空间学习记忆能力。结果见表3。

Table 3 Effects of PNU-282987 on learning score and memory score in Y-maze test of rats after middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Dose/ (mg/kg)	Learning score	Memory score
Sham	-	31.40 \pm 11.61	8.40 \pm 0.97
Model	-	49.40 \pm 7.18 ##	6.50 \pm 0.97 ##
PNU-282987	2.4	35.50 \pm 11.41 * *	7.70 \pm 0.82 * *
PNU-282987	1.2	43.70 \pm 8.56	7.10 \pm 0.99

$P < 0.01$ vs sham group, * $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

本实验采用经典的线栓法制备大脑中动脉闭塞(MCAO)模型来研究PNU-282987在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用。MCAO模型是脑缺血再灌注损伤研究中的经典模型,能够高度模拟人脑的缺血过程^[11]。实验结果显示,模型组大鼠脑梗死面积、神经功能评分和脑含水量较假手术组均显著性增高,模型组大鼠表现出明显的神经功能损伤,表明造模成功。病理检查发现缺血大鼠大脑皮质区出现明显的病理损伤,主要表现为组织结构不清,排列紊乱,严重坏死;TUNEL法检测神经元凋亡情况,发现缺血大鼠大脑皮质区神经元凋亡数量增加。有文献报道,脑缺血再灌注后引起神经元凋亡,而神经元与学习记忆功能密切相关,神经元的损伤会引起患者认知功能障碍,从而影响患者生活质量^[12-14]。因此,接下来对缺血大鼠进行了Y-电

迷宫实验。在实验中,发现模型组大鼠第 1 天训练时达到(9/10 正确反应)结果前所受的累计电击次数明显增加,而第 2 天连续 10 次电击中正确反应次数明显减少,表明缺血大鼠的学习记忆能力受到影响。以上结果提示,脑缺血再灌注损伤后,大脑神经元凋亡增加,引起神经功能损伤,造成学习记忆能力下降。

以前的研究报道显示,α7 nAChR 的激活可防止神经元死亡或凋亡^[15-16]。因此,本实验选用 α7 nAChR 激动剂 PNU-282987 来研究其对脑缺血再灌注损伤大鼠的作用。实验结果显示,连续灌胃给药 3 天后,与模型组比较,PNU-282987 高、低剂量组均对脑缺血再灌注损伤具有良好的保护作用,尤其是 PNU-282987 高剂量组可显著性改善脑缺血再灌注损伤后的神经功能损伤、脑梗死面积和脑含水量以及脑组织病理组织学损伤,降低神经元凋亡数量,还可以显著性的提高缺血大鼠的空间学习记忆能力,改善缺血大鼠的认知功能障碍。各项结果显示,PNU-282987 能够治疗脑缺血再灌注损伤所致神经元凋亡,降低脑梗死率,减轻脑细胞病理损伤,改善神经功能,提高缺血大鼠的学习记忆能力,PNU-282987 对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用。PNU-282987 对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用可能与抑制缺血后神经元凋亡有关。

参 考 文 献

- [1] Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, **133**(2):245-261.
- [2] Li DJ, Zhao T, Xin RJ, et al. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protects against oxidant stress damage through reducing vascular peroxidase-1 in a JNK signaling-dependent manner in endothelial cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, **33**(2):468-478.
- [3] Yu W, Mechawar N, Krantic S, et al. α7 Nicotinic receptor activation reduces β-amyloid-induced apoptosis by inhibiting caspase-independent death through phosphatidylinositol 3-kinase signaling [J]. *J Neurochem*, 2011, **119**(4):848-858.
- [4] Sun Y, Song D, Wang M, et al. α7 nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates the cerebral injury in a rat model of cardiopulmonary bypass by activating the Akt/GSK3β pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, **16**(6):7979-7986.
- [5] Hua Y, Yang BB, Chen Q, et al. Activation of α7 nicotinic acetylcholine receptor protects against 1-methyl4-phenylpyridinium-induced astroglial apoptosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, **13**:507-518.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, **20**(10):84-91.
- [7] Zhou Y, Huang J, He W, et al. N2 ameliorates neural injury during experimental ischemic stroke via the regulation of thromboxane A2 production [J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2014, **124**:458-465.
- [8] Lv P, Fang W, Geng X, et al. Therapeutic neuroprotective effects of ginkgolide B on cortex and basal ganglia in a rat model of transient focal ischemia [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, **44**(3):235-240.
- [9] Fang W, Zhai X, Han D, et al. CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice [J]. *Theranostics*, 2018, **8**(13):3530-3543.
- [10] Ren Y, Sun M, Zheng J, et al. Protective effects of *Naomaili* granules on cerebral ischemia-reperfusion in rats and its mechanism [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2015, **46**(1):100-104.
- [11] Yu K, Wu Y, Hu Y, et al. Prior exposure to enriched environment reduces nitric oxide synthase after transient MCAO in rats [J]. *Neurotoxicology*, 2013, **39**:146-152.
- [12] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 1995, **15**(3):389-397.
- [13] Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat [J]. *Behav Neural Biol*, 1993, **60**(1):9-26.
- [14] Jakub H, Martin V, Kamil K, et al. Vascular cognitive impairment: information from animal models on the pathogenic mechanisms of cognitive deficits [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(10):2405-2422.
- [15] Liu AJ, Zang P, Guo JM, et al. Involvement of acetylcholine-α7nAChR in the protective effects of arterial baroreflex against ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, **18**(11):918-926.
- [16] Fan WX, Li X, Huang LL, et al. S-oxiracetam ameliorates ischemic stroke induced neuronal apoptosis through up-regulating α7 nAChR and PI3K/Akt/GSK3β signal pathway in rats [J]. *Neuroche Int*, 2018, **115**:50-60.