

# 依达拉奉对脑缺血再灌注后 A $\beta$ 及其前体表达干预

任海燕<sup>1</sup>, 赵晖<sup>2</sup>, 王蕾<sup>2</sup>, 许晨波<sup>1</sup>, 马梅蕾<sup>3</sup>, 文娟<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830054
2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100054
3. 日本新潟药科大学临床药理学实验室, 东京 956-8603

**摘要** 为探讨缺血再灌注对大鼠海马区神经元细胞的损伤机制及依达拉奉的干预作用, 利用大脑中动脉线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 缺血 2 h 后再灌注 22 h (术后 24 h), 按照 Zea Longa 5 级评分法, 对大鼠进行神经行为学评分; 通过苏木精-伊红染色法 (HE) 染色大鼠脑组织, 观察其病理形态学的改变; 通过免疫组织化学, 图像分析及 Western Blot 的方法检测大鼠海马区  $\beta$  淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) 及其前体 (APP) 的表达。结果显示, 模型组大鼠表现出明显的神经功能缺损症状, 与之相比, 6 和 10 mg/kg 的依达拉奉可不同程度改善损伤模型大鼠的神经缺损症状, 尤其是 10 mg/kg 依达拉奉组的大鼠症状改善更为明显 ( $P < 0.01$ ); HE 染色结果显示, 模型组大鼠海马区神经元细胞脱失明显, 而治疗组可减轻这种形态学改变; 免疫组织化学及 Western Blot 分析结果提示, 在模型组中 A $\beta$ 、APP 表达明显高于假手术组 ( $P < 0.01$ ), 而在不同质量分数依达拉奉组中, A $\beta$ 、APP 含量均减弱 ( $P < 0.05$ )。由此得出, 缺血再灌注可能通过上调淀粉样蛋白 A $\beta$  及其前体 APP 而引起神经元细胞损伤, 而依达拉奉可能通过对它们的抑制起到保护神经元细胞的作用。

**关键词** 脑缺血再灌注;  $\beta$  淀粉样蛋白; 淀粉样蛋白前体; 依达拉奉

**中图分类号** R741.02

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.12.013

## Intervention of Edaravone on expression of $\beta$ amyloid and amyloid precursor protein after cerebral ischemia reperfusion

REN Haiyan<sup>1</sup>, ZHAO Hui<sup>2</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, XU Chenbo<sup>1</sup>, MA Meilei<sup>3</sup>, WEN Juan<sup>1</sup>

1. School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China
2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100054, China
3. Laboratory of Clinical Pharmacology, Nigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, Tokyo 956-8603, Japan

**Abstract** This paper investigates the damage mechanism of rat hippocampal neurons induced by the ischemia reperfusion and the intervention of the Edaravone. An ischemia reperfusion model is built by the middle cerebral artery occlusion (MACO)-reperfusion method. The reperfusion is performed 2 hours after the ischemia and persists for 22 hours (24 h since surgery). According to the Zea Longa's 5 level evaluation method, the neurobehavioral score of rats is graded; The rats' tissue pathological morphological changes are observed by the HE staining; the expressions of amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) and its precursor (APP) in the hippocampus of rats are detected with the immunohistochemistry, the image analysis and the Western Blot. It is shown that the model group rats show obvious symptoms of the nerve function defect; By contrast, the Edaravone of 6 and 10 mg/kg could improve model rats' symptoms of the nerve defect in varying degrees; And the difference is more significant in 10 mg/kg group ( $P < 0.01$ ). The HE staining shows that the depigmentation of

收稿日期: 2015-01-14; 修回日期: 2015-04-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2011211A046)

作者简介: 任海燕, 主治医师, 研究方向为神经病理生理学, 电子信箱: 424732833@qq.com; 文娟 (通信作者), 副教授, 研究方向为神经病理生理学, 电子信箱: juanjwen@sina.com

引用格式: 任海燕, 赵晖, 王蕾, 等. 依达拉奉对脑缺血再灌注后 A $\beta$  及其前体表达干预[J]. 科技导报, 2015, 33(12): 77-82.

the model group rat hippocampal neurons is obvious, and the two treatment groups could reduce this kind of morphology change; The immunohistochemistry and Western Blot analysis results suggest that both levels of A $\beta$  and APP in the model group are significantly higher than those in the sham group ( $P < 0.01$ ), however, in different concentrations of Edaravone groups, their expression is significantly reduced ( $P < 0.05$ ). It is concluded that the ischemia reperfusion could cause neuron cells' damage by increasing A $\beta$  and APP, and the Edaravone might suppress their toxic effects and protect the neuron cells by decreasing their expression.

**Keywords** cerebral ischemia reperfusion;  $\beta$  amyloid; amyloid precursor protein; Edaravone

脑卒中严重危害人类健康,目前高居人类死因排名第二,且发病率有逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。脑卒中分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中发病率高达80%。

研究证实, $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$  amyloid, A $\beta$ )是阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)患者老年斑的主要成分,具有神经毒性,启动了AD的病理过程<sup>[2]</sup>,是引起神经元细胞死亡和认知功能障碍的主要原因。1997年,Jendroska研究发现, $\beta$ 淀粉样蛋白及其前体(amyloid precursor protein, APP)的表达水平在缺血性脑血管病患者脑内有显著的升高<sup>[3]</sup>。通过对AD患者的死后尸检发现,其中存在脑缺血相关病理改变的人数占总数的60%~90%;而既往有过脑卒中病史的老年人罹患AD的风险是普通人的3倍<sup>[4]</sup>。通过闫福玲等<sup>[5]</sup>的研究推测:因为在AD患者及脑缺血患者中具有部分共同的临床表现及病理学改变,所以脑缺血可能是导致AD发病的启动环节之一。

在AD的许多发病环节中,自由基应激可能发挥着一定的作用,并且促进更多的A $\beta$ 聚合,进而潜在地引起AD发病过程中的级联反应<sup>[6,7]</sup>。另外,A $\beta$ 还能与线粒体相互作用,从而使活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生增加,并且显著降低活性氧解毒过程中涉及的关键线粒体酶的水平:比如 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDHC),细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COX)等<sup>[8-11]</sup>。已有实验证明,某些线粒体靶向抗氧化剂,例如MitoQ,能够对AD的发病进程产生有利影响<sup>[12,13]</sup>。在沈月娥等<sup>[14]</sup>的APP695-人神经母细胞瘤细胞系体外实验中发现,自由基清除剂依达拉奉以剂量依赖型的方式下调A $\beta$ 的产生,可能的机制有:1)减少APP的表达;2)增加不产生A $\beta$ 的非淀粉源途径,降低产生A $\beta$ 的淀粉源途径;3)增加A $\beta$ 降解酶的活性或表达水平,而此次实验结果也支持在涉及自由基形成的AD和其他神经退行性病变的进程中,依达拉奉具有自由基靶向的治疗潜能。因此,在防治AD的发病进程中,活性氧的调节可能是一个非常重要的治疗靶点<sup>[15]</sup>。

依达拉奉,作为一种高效的自由基清除剂,在20世纪80年代末首次被报道,在卒中动物模型中具有神经保护作用,目前在日本、中国及印度已经被广泛使用于临床<sup>[16-18]</sup>。本实验通过建立大鼠脑缺血再灌注模型,观察了神经元细胞的损伤情况及A $\beta$ 和APP蛋白的表达水平,探讨二者之间的关联,并使用不同质量分数的依达拉奉进行干预,以寻求药物治疗缺血性脑血管疾病的新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

依达拉奉:南京先声药业有限公司产品,注射剂,批号:20130309; APP: #1565-1, 美国 Epitomics 公司产品; A $\beta$ 42: ab10148, Abcam, 美国 Epitomics 公司产品。

### 1.2 动物模型的制备及处理

#### 1.2.1 动物与分组

选用清洁级 Sprague-Dawley 大鼠, 雄性, 体重(290 $\pm$ 10) g (北京维通利华有限公司产品)。动物随机分为假手术组、模型组、依达拉奉 6 mg/kg 组、依达拉奉 10 mg/kg 组。除假手术组动物 8 只, 其余各组动物 20 只。

#### 1.2.2 制备大鼠脑缺血再灌注模型(MCAO)

以剂量为 0.4 g/kg 的 8% 水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉后仰卧固定, 按照 Zea Longa 线栓法, 首先将大鼠右侧颈总动脉近心端和颈外动脉结扎, 然后将圆头直径 0.265 mm 的尼龙线插入颈内动脉 18 mm, 进而将大脑中动脉的所有血供彻底阻断<sup>[19]</sup>。阻断血液供应 2 h 后向外提拉预留线头, 直到感觉阻力, 如此进行再灌注大脑中动脉直至手术后 24 h。手术动物清醒后, 具有以下 3 项方可入选: 不能完全伸展左侧前爪; 向左侧旋转; 行走时向左侧倾倒, 余者舍弃。假手术组只施行颈动脉分离手术后缝合, 不给予其他干预措施。

#### 1.2.3 给药途径

经尾静脉注射依达拉奉, 给药时间为实现再灌注前 15 min; 假手术组、模型组给予生理盐水代替, 各组注射容量均为 2.5 mL/kg<sup>[20]</sup>。

### 1.3 神经症状评分

实现大鼠缺血再灌注 24 h 后, 以 Zea Longa 5 级评分法<sup>[21]</sup>为准绳进行神经行为学评分, 首先去除 0 分及昏迷不醒者, 具体的评分标准为: 1) 神经症状不明显者给予 0 分; 2) 缺血对侧前肢伸展不全者给予 1 分; 3) 向缺血对侧旋转者给予 2 分; 4) 行走时肢体向缺血对侧倾斜者给予 3 分; 5) 完全无法独立行走者给予 4 分。

### 1.4 灌注固定、取材、组织处理

每组于缺血再灌注 24 h 随机取 3 只大鼠, 麻醉后以 4% 多聚甲醛、0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4) 进行心内灌注固定, 然后断头取出完整脑组织, 置于上述固定液固定 1 周。然后常规脱水、包埋。最后将蜡块进行冠状连续切片, 片厚 2  $\mu$ m, 贴附于载玻片上, 以备进行 HE 染色及免疫组化染色。

### 1.5 苏木素-伊红染色

将厚度为4  $\mu\text{m}$ 的冠状石蜡切片进行脱蜡后进行苏木素-伊红染色(Haematoxylin-eosin staining, HE),在显微镜400 $\times$ 高倍视野下观察大脑海马区神经元细胞形态变化。

### 1.6 免疫组化检测APP和A $\beta$ 42表达

具体步骤为:微波修复抗原 $\rightarrow$ 分别滴入1:100 APP及1:50 A $\beta$ 42一抗50  $\mu\text{L}$  $\rightarrow$ 经历40 h 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,1 h 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 $\rightarrow$ 分别滴加二抗I 50  $\mu\text{L}$  $\rightarrow$ 孵育后进行磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,再滴加二抗II 50  $\mu\text{L}$  $\rightarrow$ DAB显色25 min,苏木素染色,完成后封片。利用Olympus光学显微镜联合Leica数字显微照相机,采集每组动物缺血侧(右侧)海马区5个视野的图像,然后通过NIS-Elements Basic Research图像采集分析系统计算各视野下APP及A $\beta$ 42阳性表达的积分光密度(integrated optical density, IOD),用以反映其免疫染色强度<sup>[10]</sup>。

### 1.7 Western Blot检测APP、A $\beta$ 42蛋白

具体步骤为:1) 每组于缺血再灌注24 h随机取3只大鼠,断头处死后取其右侧(缺血侧)大脑海马组织,以1:9的比例加入含有浓度为100 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)储存液的蛋白抽提试剂(北京赛诺博生物技术中心,SN0027),将组织在冰上进行裂解匀浆,以10000 r/min进行20 min离心,然后将其上清液置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,以备检测蛋白;2) 以BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司, CW0014)测定所有样本蛋白的质量浓度;3) 使用还原5 $\times$ 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 5 $\times$ SDS-PAGE)上样缓冲液和组织裂解液,将蛋白质量浓度调整到3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 并于沸水浴中加热变性后,在10%分离胶和5%浓缩胶中进行电泳;4) 电泳结束后,将凝胶上的蛋白样品常规转印到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上并在室温下以5%脱脂奶粉封闭液封闭60 min,然后把膜放入APP(1:20000)、A $\beta$ 42(1:1000)、 $\beta$ -actin(1:2000)抗兔抗体中,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。经过3次TBST缓冲液漂洗后,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗山羊抗兔IgG(1:20000),在室温下继续孵育2 h,最后以TBST漂洗3次;5) 在PVDF膜上滴加ECL发光液,于暗室进行30~120 s曝光。扫描胶片后以Image J软件对特异性条带分析,获得积分光密度值后,以目的蛋白值与内参蛋白值相比进行误差校正,最终结果即可代表各样本中目的蛋白的相对含量。

### 1.8 统计学分析

用 $\bar{x} \pm s$ (均数 $\pm$ 标准差)表示所有数值,利用SPSS 11.5软件进行所得数据分析,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 依达拉奉对MCAO大鼠神经症状评分的影响

假手术组大鼠未出现神经功能缺损症状,而其他组大鼠均出现了轻重程度不一的神经功能障碍表现,诸如缺血对侧

(左侧)前肢伸展不全,行走不稳,向缺血对侧倾斜,严重者无法独立行走。而给予了不同质量分数依达拉奉组别的大鼠上述症状却得到了一定的改善(表1)。

表1 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠神经症状评分的影响

Table 1 Influence of Edaravone on rats' nerve symptom scores after cerebral ischemia reperfusion for 24 h

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	个数	体重/g	评分
模型组	0	6	307.67 $\pm$ 10.61	2.67 $\pm$ 0.52
依达拉奉	6	7	308.71 $\pm$ 7.52	2.29 $\pm$ 0.49
依达拉奉	10	7	311.14 $\pm$ 11.71	1.86 $\pm$ 0.38 <sup>##</sup>

注:与模型组比较,<sup>##</sup>为 $P < 0.01$ 。

### 2.2 依达拉奉对脑缺血大鼠组织病理形态学改变的影响

HE染色显示,假手术组大鼠脑组织大体观正常,神经元排列紧凑整齐,其内的胞核染色清晰;血管内皮细胞之间紧密相连,形态完整,管周组织未见异常改变;海马CA1区可见规整密集的锥体细胞,而神经元细胞的胞核大而圆,位居胞体中央,可见1~2个清晰的核仁。相比之下,模型组大鼠缺血侧海马、尾壳核的中外侧部位组织结构破坏明显,大量神经元细胞发生变性坏死,原有的整齐排列被破坏,其内的细胞核形态模糊,胞体皱缩,细胞间质疏松,胶质细胞增生明显;海马CA1区锥体细胞体积变小,部分出现了一系列凋亡的特征:细胞整体皱缩变小;核染色质固缩甚至发生碎裂;胞浆也出现皱缩,其嗜酸性明显增加,锥体细胞数较假手术组明显降低( $P < 0.01$ )。各治疗组与模型组相比,变性坏死组织范围缩小、程度减轻,海马CA1区锥体细胞排列规则,神经元脱失不明显,依达拉奉10 mg/kg组锥体细胞数较模型组明显增加( $P < 0.05$ )(表2,图1)。

表2 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠海马CA1区锥体细胞数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Influence of Edaravone on the number of pyramidal cells in CA1 area of rat Hippocampus after cerebral ischemia reperfusion for 24 h ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	缺血再灌注24 h 细胞数/ $\text{mm}^2$
假手术组	0	46.50 $\pm$ 8.69 <sup>##</sup>
模型组	0	32.13 $\pm$ 5.79
依达拉奉	6	39.19 $\pm$ 5.15
依达拉奉	10	41.79 $\pm$ 6.03 <sup>#</sup>

注:与模型组比较,<sup>##</sup>为 $P < 0.01$ ,<sup>#</sup>为 $P < 0.05$ 。

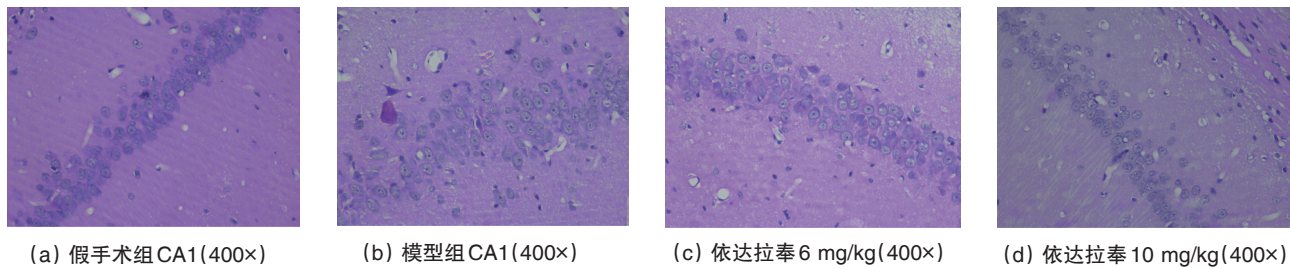


图1 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠海马CA1区病理损伤的影响(HE染色)

Fig. 1 Influence of Edaravone on the degree of pathological damage in CA1 area of rat Hippocampus after cerebral ischemia reperfusion for 24 h (HE staining)

### 2.3 依达拉奉对脑缺血大鼠APP及Aβ42表达的影响

#### 2.3.1 免疫组化检测结果

免疫组化检测结果显示,在神经元核周体及周围的轴突部位,APP表达比较集中。脑缺血再灌注24 h后,可见染色加深的棕黄色颗粒在缺血侧脑组织内明显增多,还有大量呈丛状聚集的免疫阳性细胞,这种现象说明APP免疫反应是增强的。最终的图像分析结果显示,模型组脑缺血再灌注24 h大鼠海马CA1区APP表达明显高于假手术组( $P < 0.01$ );而与模型组相比,依达拉奉6 mg/kg可明显下调APP的表达( $P < 0.05$ )(表3,图2)。

而在神经元细胞质中,也可见大量呈棕褐色颗粒的Aβ42阳性表达物,其细胞核失去正常形态,呈皱缩状。这说明Aβ42在缺血侧脑组织中阳性表达率增强。最终的图像分析结果显示,模型组脑缺血再灌注24 h时大鼠海马CA1区Aβ42表达较假手术组增强( $P < 0.01$ );而依达拉奉10 mg/kg组大鼠

海马CA1区Aβ42表达下调,较模型组差异显著( $P < 0.01$ )(表3,图3)。

表3 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠海马CA1区APP及Aβ42表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Influence of Edaravone on the expression of APP and Aβ42 in CA1 area of rat Hippocampus after cerebral ischemia reperfusion for 24 h ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	APP积分 光密度(IOD)	Aβ42积分 光密度(IOD)
假手术组	0	8962.43±1619.52 <sup>##</sup>	3530.67±1056.36 <sup>##</sup>
模型组	0	25097.16±3042.97	15178.08±1420.15
依达拉奉	6	16542.14±1444.07 <sup>#</sup>	11538.50±1975.75
依达拉奉	10	22943.58±2389.93	8671.87±1890.52 <sup>##</sup>

注:与模型组比较,<sup>##</sup>为 $P < 0.01$ ,<sup>#</sup>为 $P < 0.05$ 。

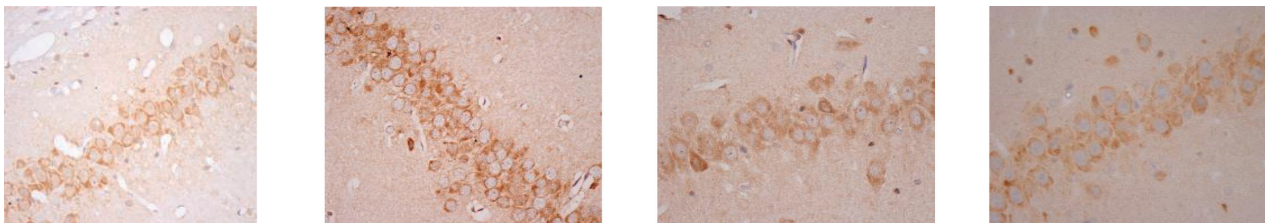
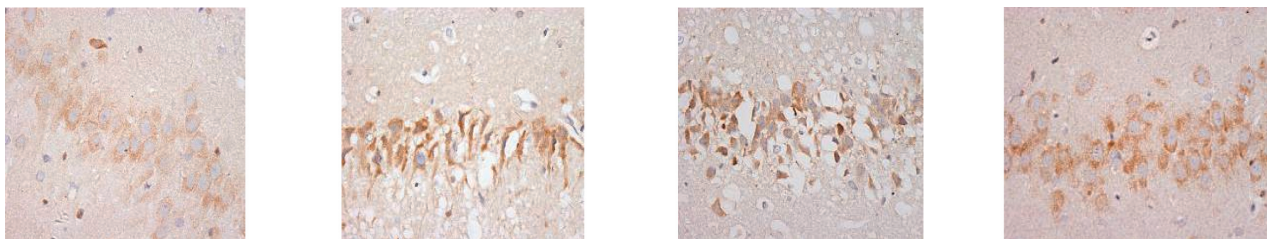


图2 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠海马CA1区APP表达的影响(免疫组化染色)

Fig. 2 Influence of Edaravone on the expression of APP in CA1 area of rat Hippocampus after cerebral ischemia reperfusion for 24 h (immunohistochemical staining)



(a) 假手术组 (b) 模型组 (c) 依达拉奉6 mg/kg (d) 依达拉奉10 mg/kg

图3 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠海马CA1区Aβ42表达的影响(免疫组化染色)

Fig. 3 Influence of Edaravone on the expression of Aβ42 in CA1 area of rat Hippocampus after cerebral ischemia reperfusion for 24 h (immunohistochemical staining)

### 2.3.2 Western Blot检测结果

Western Blot检测结果显示,模型组大鼠海马区APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的表达含量均明显高于假手术组( $P < 0.01$ );而在依达拉奉6 mg/kg组及依达拉奉10 mg/kg组中,大鼠海马区APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的表达含量均有一定程度的下调

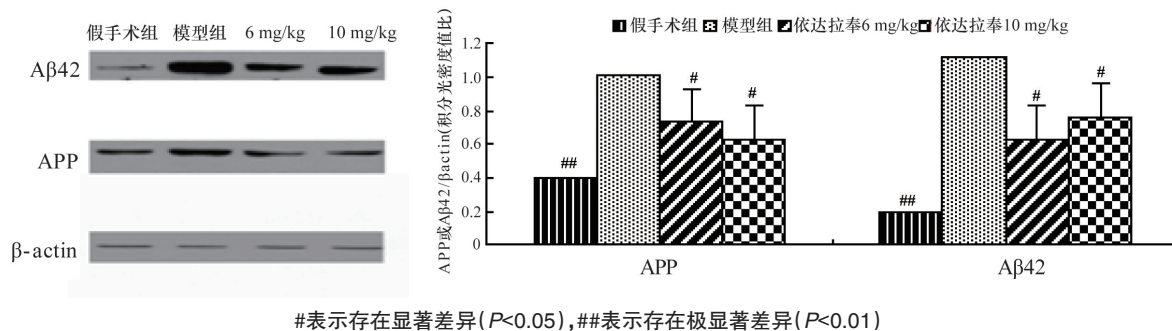


图4 依达拉奉对脑缺血再灌注24 h大鼠海马区APP及A $\beta$ 42表达的影响

Fig. 4 Influence of Edaravone on the expression of APP and A $\beta$ 42 in rat Hippocampus after cerebral ischemia reperfusion for 24 h

## 3 讨论

APP是一种跨膜糖蛋白,由695个氨基酸组成,相对分子质量为110~130 kD,在人体大部分组织细胞均有表达,但是在脑组织神经元及星形胶质细胞中的表达含量最高;而APP先后经过 $\beta$ 及 $\gamma$ 分泌酶的作用后产生一种相对分子质量约为4.2 kD的代谢产物,就是A $\beta$ ,其含有39~43个氨基酸<sup>[22]</sup>。A $\beta$ 通常以A $\beta$ 42和A $\beta$ 40两种形式存在。其中,A $\beta$ 42是聚合的多肽,具有神经毒性,是AD患者老年斑的主要成分<sup>[23,24]</sup>。

有国内学者进行体外试验观察A $\beta$ 的毒性作用,研究发现,A $\beta$ 的沉积会使神经干细胞发生毒性损伤、退行性变甚至凋亡<sup>[25]</sup>。当神经元细胞浆中自由基大量产生,醛基等脂质过氧化物形成,必然会造成神经元细胞的损伤,而A $\beta$ 正是通过自身产生的活性氧(ROS, reactive oxygen species),以及多种途径诱导产生的ROS发挥毒性作用;同时,A $\beta$ 还可以诱导大量Ca<sup>2+</sup>内流使神经元细胞发生钙超载,进而导致细胞内线粒体肿胀破坏,功能障碍,影响能量代谢<sup>[26]</sup>。Hashimoto等<sup>[27]</sup>进行的体外实验也进一步证实了A $\beta$ 对线粒体的毒性。

研究发现,脑缺血再灌注损伤可诱导神经细胞凋亡<sup>[28]</sup>。Caspase3是哺乳动物细胞凋亡的关键因子,它可以直接剪切APP,使APP的正常代谢受到干扰,增加了其代谢产物A $\beta$ 的生成,生成的A $\beta$ 将启动细胞凋亡,而这种不利的剪切可以被Caspase3的特异性抑制剂Z-DEVD-CHO抑制<sup>[29]</sup>。还有研究表明,当神经元细胞发生缺血性损伤时, $\gamma$ 分泌酶活性增强,作用于APP使其代谢产物A $\beta$ 增多,更进一步加重了神经元细胞的损伤<sup>[30]</sup>。

有学者使用自由基清除剂D609对AD大鼠进行干预,结果发现D609可以降低脑组织中3-NT含量,抑制A $\beta$ 诱导的神经元细胞凋亡,所以自由基清除剂的使用将可能成为治疗AD的新手段,但作用机制尚不清晰<sup>[31]</sup>。而依达拉奉(3-甲基-

( $P < 0.05$ )(图4)。故分析可知,在大鼠脑缺血再灌注过程中,APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的表达升高,可能对大脑海马区神经元细胞产生损害作用,而使用了不同质量分数依达拉奉进行干预的大鼠则表现为二者水平降低,说明依达拉奉可以通过对APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的抑制作用减少神经元细胞损伤。

1-苯基-2-吡唑啉-5-酮, MCI-186)区别于其他自由基清除剂,因为它是一种小分子质量的药剂,兼具水溶性及脂溶性,很容易通过血脑屏障<sup>[32,33]</sup>。它可以清除脑内的羟基基团,从而减轻其高度的细胞毒性<sup>[34]</sup>。依达拉奉可能通过以下3种途径起到神经保护作用:1)抑制羟自由基依赖的以及非羟自由基依赖的脂质过氧化反应;2)抑制兼具水溶性及脂溶性的氧化自由基诱导的过氧化反应体系;3)抑制非酶的脂质过氧化反应和脂质氧化酶反应途径<sup>[35]</sup>。依达拉奉还可以通过抑制Caspase活性,降低死亡域蛋白FADD(Fas-associated protein with a novel death domain)表达水平和上调Bcl-2基因表达抑制细胞凋亡<sup>[36]</sup>。既往的研究通常关注阿尔茨海默病中A $\beta$ 的沉积和毒性作用,而本次实验发现在脑缺血再灌注损伤过程中A $\beta$ 及APP也有异常表达,这可能说明他们参与了脑缺血再灌注后神经元细胞的损伤过程,而依达拉奉的神经保护作用也在此得到了体现,它可以降低A $\beta$ 及APP的表达水平,但是这种作用的具体机制还需要进行体外实验进一步探讨。

## 4 结论

通过大鼠体内实验探讨依达拉奉对神经元细胞可能的保护机制。实验结果说明,在脑缺血再灌注过程中,APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的增多可能引起了神经元细胞的损伤,从而导致大鼠部分神经功能的缺失。依达拉奉可以通过显著减弱海马区APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的表达,抑制其对神经元细胞的毒性作用,改善大鼠神经功能缺损症状。依达拉奉作为一种自由基清除剂,具有治疗诸如AD等神经退行性疾病的潜在可能。但是依达拉奉是通过怎样的途径作用于APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白,他们之间存在哪些具体的信号转导,这些机制尚未阐明。另外,依达拉奉对APP蛋白及A $\beta$ 42蛋白的抑制作用是否为剂量依赖型也需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Manley G T, Binder D K, Papadopoulos M C, et al. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice[J]. *Neuroscience*, 2004, 129: 983-991.
- [2] Hardy J A, Higgins G A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis[J]. *Science*, 1992, 25(6): 184-185.
- [3] Jendroska K, Hoffmann O M, Patt S. Amyloid beta peptide and precursor protein (APP) in mild and severe brain ischemia[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 826: 401-405.
- [4] Kalaria R N. The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(2): 321-330.
- [5] 闫福玲. 重视 Alzheimer 病与脑缺血的共病研究[J]. *国际脑血管病杂志*, 2006, 14(11): 801-802.  
Yan Fuling. Attaching importance to comorbidity study of Alzheimer's disease and cerebral ischemia[J]. *International Journal of Cerebrovascular Diseases*, 2006, 14(11): 801-802.
- [6] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics[J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [7] Woltjer R L, McMahan W, Milatovic D, et al. Effects of chemical chaperones on oxidative stress and detergent-insoluble species formation following conditional expression of amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment[J]. *Neurobiology of Disease*, 2007, 25(2): 427-437.
- [8] Tillement L, Lecanu L, Papadopoulos V. Alzheimer's disease: Effects of beta-amyloid on mitochondria[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(1): 13-21.
- [9] Cardoso S M, Proenca M T, Santos S, et al. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets[J]. *Neurobiology of Aging*, 2004, 25(1): 105-110.
- [10] Gibson G E, Blass J P, Beal M F, et al. The alphaketoglutarate-dehydrogenase complex: A mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration[J]. *Molecular Neurobiology*, 2005, 31(1-3): 43-63.
- [11] Pickrell A M, Fukui H, Moraes C T. The role of cytochrome c oxidase deficiency in ROS and amyloid plaque formation[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2009, 41(5): 453-456.
- [12] Tauskela J S. MitoQ—a mitochondria-targeted antioxidant[J]. *IDrugs*, 2007, 10(6): 399-412.
- [13] Spindler M, Beal M F, Henchcliffe C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease[J]. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2009, 5: 597-610.
- [14] Shen Y E, Wang Y, Yu G C, et al. Effects of edaravone on amyloid- $\beta$  precursor protein processing in SY5Y-APP695 cells[J]. *Neurotoxicity Research*, 2013, 24: 139-147.
- [15] Taupin P. A dual activity of ROS and oxidative stress on adult neurogenesis and Alzheimer's disease[J]. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 2010, 10(1): 16-21.
- [16] Green A R, Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke [J]. *Drug Discovery Today*, 2006, 11: 681-693.
- [17] van der Worp H B, Kappelle L J, Algra A, et al. The effect of tirilazad mesylate on infarct volume of patients with acute ischemic stroke[J]. *Neurology*, 2002, 58: 133-135.
- [18] Cuzzocrea S, Costantino G, Gitto E, et al. Protective effects of melatonin in ischemic brain injury[J]. *Journal of Pineal Research*, 2000, 29: 217-227.
- [19] 王海征, 张秋霞, 赵晖, 等. 风药、补虚药对脑缺血大鼠淀粉样 $\beta$ 蛋白及其蛋白前体表达的影响[J]. *世界中医药*, 2013, 8(8): 942-945.  
Wang Haizheng, Zhang Qiuxia, Zhao Hui, et al. Influence of wind-dispelling medicine assisted with deficiency-nourishing medicine on the expression of APP and A $\beta$ 42 for cerebral ischemic in rats model [J]. *World Chinese Medicine*, 2013, 8(8): 942-945.
- [20] 李泰东, 陆国辉, 崔云燕, 等. 缺血再灌注对大鼠海马神经元淀粉样蛋白及其蛋白前体表达的影响及人参皂甙 Rg2 的干预[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008(4): 417-420.  
Li Taidong, Lu Guohui, Cui Yunyan, et al. Effects of ischemia reperfusion on expression of amyloid and amyloid precursor protein in rat hippocampal neurons and the intervention of ginsenoside Rg2[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2008(4): 417-420.
- [21] 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.
- [22] 韩晶, 冯加纯. 脑缺血损伤后 $\beta$ 淀粉样蛋白及其前体蛋白在脑组织中的表达及治疗[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2006, 14(12): 935-937.  
Han Jing, Feng Jiachun. Expression and treatment of  $\beta$  amyloid and its precursor protein in the brain after cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease*, 2006, 14(12): 935-937.
- [23] Selkoe D J. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(2): 741-766.
- [24] Reiss A B. Cholesterol and apolipoprotein E in Alzheimer's disease[J]. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 2005, 20(2): 91-96.
- [25] 苏心, 张文治, 吴剑娟.  $\beta$ 淀粉样蛋白对培养胎鼠大脑神经干细胞作用的研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2005, 7(3): 192-194.  
Su Xin, Zhang Wenzhi, Wu Jianjuan. Effect of amyloid- $\beta$  protein on cultured neural stem cells of fetal rat[J]. *Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases*, 2005, 7(3): 192-194.
- [26] Nelson T J, Alkon D L. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid peptide[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(8): 7377-7387.
- [27] Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, et al. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's disease[J]. *Neuromolecular Medicine*, 2003, 4(1-2): 21-36.
- [28] Renolleau S, Aggoun Z D, Ben A Y, et al. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: Morphological changes indicative of apoptosis[J]. *Stroke*, 1998, 29(7): 1454-1461.
- [29] Gervais F G, Xu D, Robert son G S, et al. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- $\beta$  precursor protein and amyloidogenic A $\beta$  peptide formation[J]. *Cell*, 1999, 97(4): 395-406.
- [30] Lee P H, Hwang E M. Effect of ischemic neuronal insults on amyloid precursor protein processing[J]. *Neurochemistry Research*, 2006, 31: 821-827.
- [31] Perluigi M, Joshi G, Sultana R. *In vivo* protection by the xanthate tricyclodecan-9-yl-xanthogenate against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress[J]. *Neuroscience*, 2006, 138(4): 1161-1170.
- [32] Watanabe T, Tahara M, Todo S. The novel antioxidant edaravone: From bench to bedside[J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2008, 26: 101-114.
- [33] Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, et al. Neuroprotective effects of edaravone: A novel free radical scavenger in cerebrovascular injury[J]. *CNS Drug Reviews*, 2006, 12: 9-20.
- [34] Takamatsu Y, Yuki S, Watanabe T. Studies on the concentration of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one(MCI-186) in MCA occlusion and reperfusion model of rats[J]. *Japan Pharmacology Therapeutics*, 1997, 25(Suppl): S1785-S1791.
- [35] Yang J, Cui X, Li J, et al. Edaravone for acute stroke: Meta-analyses of data from randomized controlled trials[J]. *Developmental Neurorehabilitation*, 2013, doi: 10.3109/17518423.2013.830153.
- [36] Xiao B, Bi F F, Hu Y Q. Edaravone neuroprotection effected by suppressing the gene expression of the Fas signal pathway following transient focal ischemia in rats[J]. *Neurotoxicity Research*, 2007, 12(3): 155-162.

(责任编辑 吴晓丽)