

[文章编号] 1007-3949(2006)14-08-0653-04

• 实验研究 •

实验性高血压大鼠局灶性脑缺血再灌注后 肾上腺髓质素及其 mRNA 的表达

毕国荣¹, 张贺敏¹, 周慧杰¹, 海虹¹, 白丽娟¹, 张辉¹, 方秀斌²

(中国医科大学 1. 第二临床学院神经内科, 2. 基础医学院神经生物学教研室, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 神经病学; 肾上腺髓质素; 实验性高血压大鼠; 脑缺血再灌注; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应

[摘要] 目的 探讨肾上腺髓质素与脑缺血再灌注损伤及高血压的关系。方法 应用改良 Kellen 的方法制备实验性高血压大鼠, 采用栓线法制成大鼠大脑中动脉闭塞模型, 阻断血流 2 h 后进行再灌注。免疫组织化学法检测高血压大鼠与非高血压大鼠局灶性脑缺血再灌注后肾上腺髓质素阳性细胞百分率并进行比较, 逆转录聚合酶链反应检测大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织肾上腺髓质素 mRNA 表达的情况。结果 正常大鼠脑内有肾上腺髓质素 mRNA 表达, 假手术后肾上腺髓质素 mRNA 表达略有增加, 但与正常对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$); 大鼠脑缺血再灌注后肾上腺髓质素 mRNA 过表达, 与正常对照组及假手术组相比差异有显著性 (均 $P < 0.05$); 大鼠脑缺血再灌注后, 缺血侧及缺血对侧肾上腺髓质素 mRNA 均有高表达, 但以缺血侧最显著 ($P < 0.05$)。正常对照组和假手术组大鼠大脑组织中均有肾上腺髓质素阳性细胞表达, 肾上腺髓质素阳性细胞百分率分别为 $2.87\% \pm 0.78\%$ 和 $2.47\% \pm 0.59\%$ ($P > 0.05$)。缺血再灌注非高血压组肾上腺髓质素阳性细胞高表达, 以缺血侧为明显, 阳性细胞百分率为 $59.42\% \pm 3.71\%$, 缺血对侧亦明显, 阳性细胞百分率为 $36.87\% \pm 5.28\%$, 两者相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。与假手术组及正常对照组相比差异也有显著性 ($P < 0.05$)。比较高血压组与非高血压组肾上腺髓质素阳性细胞百分率发现, 高血压组肾上腺髓质素阳性细胞百分率 (缺血侧为 $78.60\% \pm 4.82\%$, 缺血对侧为 $57.52\% \pm 5.22\%$) 明显高于非高血压组 ($P < 0.05$)。结论 脑缺血再灌注后肾上腺髓质素及其 mRNA 高表达。高血压组肾上腺髓质素的高表达更显著。肾上腺髓质素与脑缺血再灌注损伤相关, 与高血压血管内皮损伤有关。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

Expression of Adrenomedullin and Its mRNA in the Experimental Hypertension Rats After Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion

BI Guo Rong¹, ZHANG He Min¹, ZHOU Hui Jie¹, HAI Hong¹, BAI Li Juan¹, ZHANG Hui¹, and FANG Xiur Bin²

(1. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital; 2. Laboratory of Neurobiology, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Adrenomedullin; Focal Cerebral Ischemia; Experimental Hypertension Rats; Cerebral Ischemia/Reperfusion; Immunohistochemical Staining

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship of adrenomedullin and its mRNA with the focal cerebral ischemia/reperfusion injury and hypertension in rats. **Methods** The experimental hypertension rats were prepared by the advanced Kellen's methods. The models of middle cerebral artery occlusion in rats were constructed by the line-block method, and after ischemia for 2 h they were reperfused. By using the immunohistochemical method, the percentage of adrenomedullin positive cells both in hypertension group and nonhypertension group after focal cerebral ischemia/reperfusion was determined and compared, and the expression of adrenomedullin mRNA in the brain tissue after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats was monitored by the RT-PCR analysis. **Results** Adrenomedullin mRNA expressed in the normal rats' brains, and it increased slightly in the sham operated group, but it had no significant difference from the normal group ($P > 0.05$). The over-expression of ADM mRNA existed after cerebral ischemia/reperfusion in rats, which had significant difference with the normal group and the sham operated group ($P < 0.05$ both). After focal cerebral ischemia/reperfusion in rats, adrenomedullin mRNA in not only the ipsilateral but also the contralateral side of the ischemic area expressed high, especially in the ischemic area ($P < 0.05$). The adrenomedullin positive cells expressed in the brain tissue of the rats in the normal group and the sham operated group, and their percentages were $2.87\% \pm 0.78\%$ versus $2.47\% \pm 0.59\%$, both of which had no significant difference ($P > 0.05$). The adrenomedullin positive cells expressed high in the nonhypertension group after ischemia/reperfusion, especially in the ischemic side, whose percentage of the positive cells was $59.42\% \pm 3.71\%$, and the contralateral side was also significant, whose percentage of the positive cells was

[收稿日期] 2005-11-28 [修回日期] 2006-06-16

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(编号 20032058)资助

[作者简介] 毕国荣, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为神经肽与神经系统疾病, 联系电话为 024-83956963, E-mail 为 biguorongcmu@sina.com。张贺敏, 硕士研究生。周慧杰, 硕士研究生。

36.87% ± 5.28%, and the differences between them was significant ($P < 0.05$), which was also significantly different from the sham operated group and the normal group ($P < 0.05$). By comparing the percentage of the adrenomedullin positive cells in the hypertension group with that in the norm hypertension group, the percentages of the adrenomedullin positive cells in the hypertension group (78.60% ± 4.82% in the ipsilateral side of the ischemic area and 57.52% ± 5.22% in the contralateral side) were much higher than the norm hypertension group ($P < 0.05$). **Conclusions** Adrenomedullin and its mRNA express high after the cerebral ischemia/reperfusion, and the over-expression is much more significant. Adrenomedullin has relation to the cerebral ischemia/reperfusion injury, and also to the vascular endotheliocyte injury after hypertension.

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是从人嗜铬细胞瘤组织中发现的一种新型血管活性多肽^[1],能增加大鼠血小板中cAMP水平,与降钙素基因相关肽具有一定的同源性,ADM具有强烈的舒张血管和降低血压的作用。前期实验表明,ADM在正常大鼠脑内分布广泛,其中脉络丛、室旁组织和下丘脑为高表达区。有关高血压大鼠脑缺血再灌注后ADM表达的报道甚少,我们对ADM与高血压动脉硬化和脑缺血再灌注损伤的关系进行了研究与探讨。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

健康雄性SD大鼠48只,200~250g,由中国医科大学实验动物中心提供。随机分为正常对照组($n=12$)、假手术组($n=12$)、再灌注高血压组($n=12$)和再灌注非高血压组($n=12$)。正常对照组不行手术。假手术组不结扎腹主动脉,颈动脉不拴线,其余步骤同模型组。正常对照组、假手术组和再灌注非高血压组常规饲料,饮自来水,饲养3周。

1.2 高血压大鼠模型的制备

参考Kellen等^[2]方法并加以改良。用氨基甲酸乙酯麻醉(1mg/kg),在无菌条件下作左腰椎旁切口,经后腹膜与左肾动脉上方用4号丝线将腹主动脉与8号针头一起结扎,然后抽出针头,造成腹主动脉狭窄,缝合皮肤。术后饮用1%食盐水,常规饲料喂养,饲养3周。选择呈现稳定高血压状态的大鼠。高血压大鼠为收缩压140~180mmHg,舒张压90~100mmHg。

1.3 局灶性脑缺血再灌注模型的制备

3周后取高血压大鼠和非高血压大鼠采用栓线法^[3]制成大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,阻断血流2h后进行再灌注。术中使用烤灯,维持大鼠的肛温于37℃,应用心电监护仪,维持大鼠的血压和心率恒定。模型成功的标志是脑缺血再灌注2h,动物苏醒后出现右侧以前肢为重的偏瘫和/或同侧的Horner征。参考Zealanga等^[4]和Bederson等^[5]的5分制评分标准进行评分。0分:无神经功能缺损症状;1分:不能伸展右侧前爪;2分:向右侧划圈(追尾

现象);3分:向右侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。其中,0分和4分者被剔除,取评分为1分、2分和3分者为实验对象,不具备上述体征及术后未能生存至预定时间的大鼠被淘汰。

1.4 石蜡切片的制备

缺血再灌注4h取各组大鼠开胸,经左心室插管至升主动脉,肝素生理盐水冲洗血液后,用4%多聚甲醛灌注,断头取脑,置于4%多聚甲醛固定液中固定12h,常规石蜡包埋,取两耳级连线前6mm左右冠状切面,切片厚7μm,4℃冰箱保存备用。

1.5 免疫组织化学染色

参照Hsu等^[6]建立ABC法,石蜡切片常规脱蜡至水化;滴加3%双氧水,10min 37℃灭活内源性酶;蒸馏水洗3次;在0.01mol/L枸橼酸缓冲液(pH=6.0)100mL中8min进行热抗原修复;0.01mol/L枸橼酸缓冲液PBS(pH=7.6),洗涤2次,滴加正常山羊封闭液,20min 37℃;滴加1:160ADM抗体,37℃2h,PBS(pH=7.6)冲洗,2min,3次;滴加生物素化山羊抗兔,20min 37℃,PBS(pH=7.6)冲洗,2min,3次;滴加试剂SABC,20min 37℃,PBS(pH=7.6)冲洗,5min,4次;DAB室温显色,光镜下观察,显色时间约15min,自来水冲洗;苏木素轻度复染30s,浸泡返蓝15min;脱水,透明,中性树脂胶封片。显微镜观察,每张切片取5个高倍视野,计数ADM阳性细胞数和总细胞数,计算ADM mRNA阳性细胞数百分率(阳性细胞数百分率=阳性细胞数/总细胞数×100%)。用PBS替代一抗作为阴性对照。

1.6 半定量逆转录聚合酶链反应

大鼠脑组织RNA提取:取各组大鼠6只断头处死,冰盘上快速取脑,用高温处理过的锡箔纸包裹,在液氮中速冻后,-80℃冰箱保存待测。按Chomczynski等^[7]建立的“异硫氰酸胍-酚-氯仿”方法,从大鼠左侧额、顶叶及右侧相应部位各提取脑组织0.1g,提取总RNA,采用紫外线吸收法进行RNA定量,各组RNA样品的OD_{260nm}/OD_{280nm}吸收度比值均在1.8~2.0之间,将2g的总RNA反转录为相应的cDNA。

肾上腺髓质素cDNA探针的制备:大鼠ADM前体正义引物为5'-CCGACA GAC AAC AAC AGA CGC-

3'; 反义引物为 5'-CAC CCT GAG GCA GAT GAA -3', 扩增产物 286 bp。以 β -actin 为内参照, 其正义引物为 5'-GAT TGC CTC AGG ACA TTT CTG-3'; 反义引物为 5'-GAT TGC TCA CAT TTC TGT T-3', 扩增产物 690 bp。

肾上腺髓质素 mRNA 的测定: ADM mRNA 扩增条件为 94 °C 变性 30 s \rightarrow 55 °C 退火 1 min \rightarrow 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环。取扩增产物 7 μ L 电泳, 经溴酚蓝染色后用 Bio2RAD Gel Doc 2000 型影像分析系统对密度进行扫描分析, 所测扩增条带积分光密度值用内参照修正, 比较各组表达水平的差异。所有试剂均由武汉博士德生物技术有限公司提供。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的比较先采用方差分析, 再用 *t* 检验。

2 结果

2.1 HE 染色结果

正常对照组、假手术组和缺血再灌注组缺血侧大脑皮质细胞层次分明, 形态结构正常。缺血再灌注组缺血侧大脑皮质、皮质下白质及基底节区神经元减少、排列紊乱, 细胞周围间隙增宽, 有大量坏死神经元, 胞体肿胀、胞浆淡染、胞核溶解、结构不清, 梗死边界区可见大量固缩神经元(图 1)。

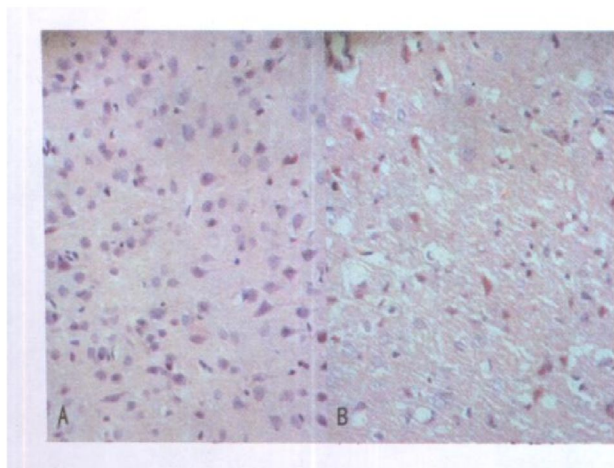


图 1. 正常及缺血后大鼠大脑皮质的比较 (HE 染色 $\times 400$)
A 为正常组, B 为缺血再灌注组。

2.2 各组大鼠肾上腺髓质素 mRNA 表达的比较

正常大鼠脑组织有 ADM mRNA 的表达。缺血再灌注后脑组织 ADM mRNA 的表达明显增高, 与正常对照组和假手术组相比差异有显著性 ($P < 0.05$); 大鼠脑缺血再灌注后缺血侧及缺血对侧脑组

织中 ADM mRNA 的表达均增高, 但以缺血侧增高明显 ($P < 0.05$)。缺血再灌注 4 h 后, 高血压组 ADM mRNA 表达明显高于非高血压组 ($P < 0.05$, 图 2)。

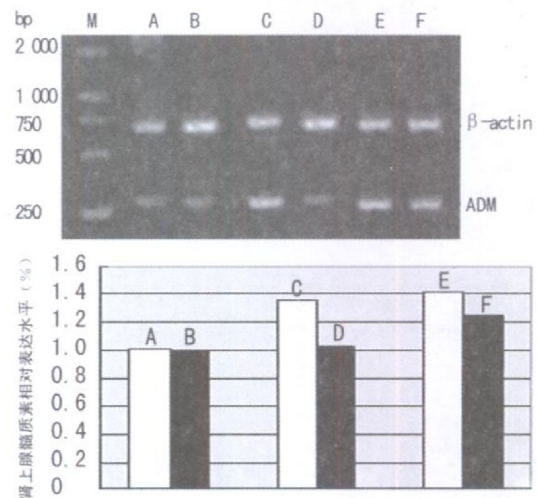


图 2. 实验性高血压大鼠局灶性脑缺血再灌注后肾上腺髓质素 mRNA 的表达 (RT-PCR) A 为正常组, B 为假手术组, C 为非高血压组缺血同侧, D 为非高血压组缺血对侧, E 为高血压组缺血同侧, F 为高血压组缺血对侧。

2.3 各组大鼠肾上腺髓质素表达的免疫组织化学染色结果

正常对照组和假手术组大鼠大脑组织中均有 ADM 阳性细胞表达, ADM 阳性细胞百分率分别为 2.87% \pm 0.78% 和 2.47% \pm 0.59% ($P > 0.05$)。再灌注非高血压组 ADM 阳性细胞高表达, 以缺血侧为明显, 阳性细胞百分率为 59.42% \pm 3.71%, 缺血对侧亦明显, 阳性细胞百分率为 36.87% \pm 5.28%, 两者相比差异有显著性 ($P < 0.05$), 与假手术组及正常对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。比较高血压组与非高血压组 ADM 阳性细胞百分率发现, 高血压组 ADM 阳性细胞百分率 (缺血侧为 78.60% \pm 4.82%, 缺血对侧为 57.52% \pm 5.22%) 明显高于非高血压组 ($P < 0.05$) (表 1, 图 3)。

表 1. 各组大鼠肾上腺髓质素阳性细胞百分率的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	缺血侧	缺血对侧
正常对照组	2.47% \pm 0.59%	-
假手术组	2.87% \pm 0.78%	-
再灌注非高血压组	59.42% \pm 3.71% ^{ab}	36.87% \pm 5.28%
再灌注高血压组	78.60% \pm 4.82% ^{bc}	57.52% \pm 5.22%

a 为 $P < 0.001$, 与假手术组比较, b 为 $P < 0.05$, 与缺血对侧比较, c 为 $P < 0.05$, 与非高血压组比较。

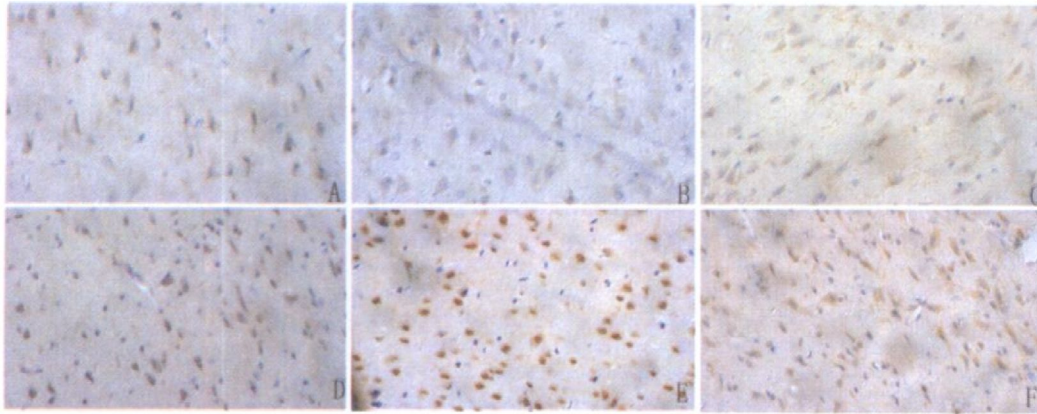


图3. 各组大鼠肾上腺髓质素的表达(免疫组织化学染色 ×400) A为正常组, B为假手术组, C为非高血压组缺血同侧, D为非高血压组缺血对侧, E为高血压组缺血同侧, F为高血压组缺血对侧。

3 讨论

肾上腺髓质素是一种血管活性多肽, 主要来源于血管内皮细胞和血管平滑肌细胞^[8]。有研究表明外科手术本身可以刺激ADM分泌^[9], 但本实验发现, ADM阳性细胞百分率在假手术组与正常对照组之间未见明显差异, 表明外科手术对脑组织ADM的表达无明显影响, 可能是因为颅内ADM不仅来源于脑血管内皮细胞和血管平滑肌细胞, 也可能来自神经元和神经胶质细胞。本实验结果还发现, 大鼠脑缺血再灌注后ADM阳性细胞高表达, 以缺血侧最为明显, 提示ADM与脑缺血再灌注损伤可能相关。RT-PCR结果发现, 正常大鼠大脑有ADM mRNA的表达, 缺血再灌注后ADM mRNA表达增加, 以缺血侧最为明显。ADM mRNA的广泛表达与ADM阳性细胞的广泛分布相一致, 可能脑内不仅可以合成ADM, 也可分泌和释放ADM。此外, 比较高血压组与非高血压组ADM阳性细胞百分率发现, 高血压组ADM阳性细胞百分率明显高于非高血压组, ADM的高表达与血管内皮损伤可能有关^[10]。

脑缺血再灌注后ADM高表达的确切机制尚不十分清楚。可能由于ADM使大脑中动脉阻塞再灌注(MCAO)后局部脑血流量(rCBF)降低的程度减轻, 减少缺血性脑梗死的体积^[11]; 通过扩张血管、增加侧支循环、增加rCBF来减轻缺血性脑损伤; 血管平滑肌细胞上存在丰富的特异性ADM受体, ADM通过与组织细胞膜上的特异性受体结合, 使血管平滑肌细胞内cGMP增高, 血管舒张^[12, 13]; 脑缺血再灌注发生过程中有炎性细胞因子如白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 的表达, 两者均可刺激血管平滑肌细胞产生ADM; 脑缺血损伤的重要病理基础为动脉粥样硬化, 而高血压为致动脉粥样硬化的最危险因子, 动脉粥样硬化过程中增殖的平滑肌细胞分泌ADM增

加也是脑缺血后ADM高表达的原因之一。

我们的实验结果表明脑缺血再灌注后ADM及其mRNA表达增高可能是机体对缺血性脑损伤的一种保护性机制。

[参考文献]

- [1] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192** (2): 553-560
- [2] Kellen JA, Anderson KM. Hypertension in Sprague-Dawley rats after single or multiple challenge with DMBA[J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1972, **3** (1): 123-128
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, **20**: 84-91
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, **20** (1): 84-91
- [5] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, **17** (3): 472-476
- [6] Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry[J]. *J Histochem Cytochem*, 1981, **29** (11): 1 349-353
- [7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156-159
- [8] Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **207** (1): 25-32
- [9] Satoh F, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Ohmeda M, et al. Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma ganglioneuroblastoma and neuroblastoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, **80**: 1 750-752
- [10] Kuwasako K, Kida O, Kitamura K, Kato J, Eto T. Plasma adrenomedullin in cerebrovascular disease: a possible indicator of endothelial injury[J]. *Int Angiol*, 1997, **16** (4): 272-279
- [11] Nagaya N, Nishikimi T, Yoshihara F, Horio T, Morimoto A, Kangawa K. Cardiac adrenomedullin gene expression and peptide accumulation after acute myocardial infarction in rats[J]. *ADM J Physiol Regul Comp Physiol*, 2000, **278** (4): R1 019-026
- [12] Takahashi K, Nakayama M, Totsune K, Murakami O, Sone M, Kitamura T, et al. Increased secretion adrenomedullin from cultured human astrocytes by cytokines[J]. *J Neurochem*, 2000, **74** (1): 99-103
- [13] 李良, 李霞, 胡弼, 朱大年. 慢性应激性刺激致高血压大鼠下丘脑肾上腺髓质素和降钙素受体样受体基因表达改变[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 317-320 (此文编辑 朱雯霞)