[文章编号] 1007-3949(2010)18-11-0865-03

·实验研究·

艾芬地尔对大鼠脑缺血再灌注后 Survivin表达的影响

刘学娟[1]，杨金升[2]，郑佳丽[1]，马亚杰[1]
(1.兰州大学第二临床医学院，2.兰州军区兰州总医院神经内科，甘肃省兰州市 730050)

[关键词] 缺血再灌注； Survivin； 艾芬地尔

[摘 要] **目的** 探讨大脑中动脉缺血再灌注后缺血侧海马区 Survivin的表达规律及艾芬地尔对大鼠脑缺血再灌注后不同时相 Survivin表达的影响。**方法** 72只 Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组和艾芬地尔干预组，采用线拴法制作局灶性大鼠脑缺血再灌注模型，假手术组于术后，模型组和艾芬地尔干预组于脑缺血 2 h分别再灌注 3 h、24 h、72 h及 7天后处死取材，免疫荧光法测量不同时相缺血侧海马神经元 Survivin的表达。**结果** 假手术组 Survivin呈现少基础量表达，模型组和艾芬地尔干预组 Survivin表达规律基本一致，即在再灌注 3 h时表达即有升高，至 72 h达到高峰，7天表达有所下降，与假手术组比较差异显著($P<0.05$)；艾芬地尔干预组荧光强度值明显高于对应模型组($P<0.05$)。**结论** 大脑中动脉缺血再灌注后 Survivin的表达升高，72 h达高峰；艾芬地尔对大脑中动脉缺血再灌注损伤具有保护作用。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effect of Ifenprodil on Survivin Expression After Cerebral Ischemia-Reperfusion

LIU Xue-Juan, YANG Jin-Sheng, ZHENG Jia-Li, and MA Ya-Jie
(1. *the Second Clinical Medical College of Lanzhou University*, 2. *Department of Neurology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou, Gansu* 730050, *China*)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia-Reperfusion; Survivin; Ifenprodil

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression discipline of Survivin after perifocal areas of cerebra after ischemia-reperfusion (I/R) in rats, and to identify the effect of ifenprodil on Survivin after I/R. **Methods** Seventy-two Wistar rats were randomly divided into sham group, model group and ifenprodil group. The right middle cerebral artery occlusion reperfusion (MCAO/R) model was established by thread ligation. After operation in sham group, 2 hours ischemia of middle cerebral artery was followed with 3 hours, 24 hours, 72 hours and 7days reperfusion in model group and ifenprodil group. Rats were sacrificed and Survivin in hippocampus of ischemia side was detected by immunofluorescence. **Results** Fluorescence intensity of the sham group was very weak, showing the basal expression; while fluorescence intensity of model group and ifenprodil group had almost the same trend, which expression rose 3 hours after I/R, increased continuously and reached the peak at 72 hours, and then decreased afterward, and there were significant differences compared with the sham group ($P<0.05$). Fluorescence intensity of ifenprodil group were stronger than the model group at the same time point ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of Survivin increased after MCAO/R, reaching the maximum at 72 hours. Ifenprodil had a protective effect on the damage of I/R.

Survivin是一种新近发现的凋亡抑制因子，对细胞凋亡和细胞周期的调节起着关键的作用[1]。它既能抑制细胞凋亡，又能诱导调控神经细胞的有丝分裂，促进神经元轴突沿细胞生长周期时相有规律进行再生繁殖。这种双重作用主要与 Survivin蛋白在线粒体、细胞质以及细胞核等不同部位的存在有关[2]。Survivin在胚胎发育时期表达较多；在疾病方面，相关的研究主要集中在肿瘤的发生上[3]，目前，在炎症、退行性疾病、免疫性疾病等多种病变中亦发现了其表达[4]。在神经系统疾病，如多发性硬化、阿尔茨海默病中也有一定研究[5,6]。但在缺血性脑血管病中的研究尚不多，具体机制亦尚未完全明确，本研究观察大鼠脑缺血再灌注后 Survivin的表达规律及特点，进一步探讨艾芬地尔对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

健康 Wistar大鼠 72只，雌雄各半，体重在 250～320 g之间，购于甘肃省中医学院。将其随机分为三组：假手术组、模型组和艾芬地尔干预组，每组 24

[收稿日期] 2010-10-22 [修回日期] 2010-11-08
[作者简介] 刘学娟，硕士研究生，主要研究方向为脑血管病，E-mail为 lxj0228@163.com。通讯作者杨金升，主任医师，硕士研究生导师，主要研究方向为脑血管病，E-mail为 yangjins@163.com。郑佳丽，硕士研究生。

只,右侧大脑中动脉缺血模型采用线拴栓塞法建立,缺血 2 h后分别在再灌注 3 h、24 h、72 h及 7天处死 6只大鼠取材。剔除死亡和蛛网膜下腔出血大鼠后,随机补充以满足每组实验只数。

1.2 材料与试剂

Survivin多克隆抗体由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,TRITC标记的山羊抗兔二抗、山羊血清封闭液、胰蛋白酶由北京博奥森生物技术有限公司提供。

1.3 脑缺血再灌注模型的建立

大鼠右侧大脑中动脉缺血再灌注模型依据 Nagasawa等的改良线栓法制成[7,8]。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,将其仰卧固定,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎 ECA与 CCA近心端,用微型动脉夹夹闭 CCA分叉处,在其下方约 3~4 mm处剪一小口,将一预先用酒精灯烧成圆头的尼龙鱼线(直径 0.205 mm)插入颈内动脉,插入深度为 20.0±0.5 mm,至有轻微阻力感为止,实现大脑中动脉阻塞缺血;结扎插线入口处,尼龙鱼线外留约 1 cm,缝合皮肤;维持肛温在 37℃左右,保持呼吸道通畅。2 h后轻轻提拉外露线头至略有阻力,实现大脑中动脉缺血再灌注;动物清醒后,依据改良的 Bederson's评分方法进行神经功能缺失评分,选择评分在 2~3分的动物进行下一步实验。假手术组分离右侧 CCA、ICA及 ECA后缝合皮肤。

1.4 给药方法

艾芬地尔注射液由重庆人本植恩药业有限公司提供,规格为 5 mg/支。干预组于造模前 30 min腹腔注射艾芬地尔注射液 10 mg/kg,造模成功后每日于相同时间点给予药物注射(10 mg/kg)直至处死当日。同时,假手术组和模型组动物按照体重计算,给予同等剂量生理盐水腹腔注射,余同干预组。

1.5 标本采集及组织切片制作

在大鼠脑缺血 2 h分别再灌注 3 h、24 h、72 h及 7天时取材。用 10% 水合氯醛腹腔注射深度麻醉大鼠后,经左心室插管,剪开右心耳,快速灌注生理盐水直至流出无色、清亮灌流液为止,继以 4% 多聚甲醛先快后慢继续灌注至全身僵硬后,断头取脑(去除蛛网膜下腔出血者),置入 4% 多聚甲醛固定 6~8 h,于视交叉后 2 mm附近取材,厚约 4 mm,常规石蜡包埋,冠状面连续取材,取齿状回与海马互包平面的切片,片厚 4 μm。

1.6 Survivin免疫荧光染色

载玻片去除自发荧光处理后,切片常规脱蜡、水化,枸橼酸盐缓冲液高温高压抗原修复。0.01 mmol/L PBS冲洗切片 5 min×3次,0.25% 胰蛋白酶 37℃孵育 30 min,10% 正常山羊血清封闭 30 min,倾去,滴加 Survivin兔多克隆抗体,4℃过夜,37℃复温 30 min。0.01 mmol/L PBS冲洗切片 5 min×3次后,滴加 TRITC标记的山羊抗兔二抗,37℃孵育 20 min。此后步骤在避光条件下进行。0.01 mmol/L PBS冲洗 5 min×3次,阴干,缓冲甘油封片,荧光显微镜观察。

1.7 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,用 LSD-t法进行两两比较。

2 结 果

假手术组海马 CA1区 Survivin仅呈少量基础表达,且荧光强度低。模型组和艾芬地尔干预组再灌注 3 h时 Survivin表达量即增多,荧光强度值增高,至 72 h达到高峰,7天表达有所下降,与假手术组比较有显著差异性($P<0.05$);艾芬地尔干预组与模型组表达规律基本一致,但荧光强度值较对应模型组表达增高($P<0.05$,图 1和表 1)。

表 1 大鼠缺血侧 Survivin荧光强度值的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分 组	3 h	24 h	72 h	7天
假手术组	130.7680±0.7845	131.6260±1.1048	137.5500±1.4079	136.4680±1.1276
模型组	203.4120±2.3523[a]	234.2980±1.9528[a]	273.7360±2.7705[a]	243.3280±1.0482[a]
艾芬地尔干预组	214.1160±3.0966[ab]	251.5140±2.6001[ab]	290.8000±2.0052[ab]	252.8520±2.0375[ab]

a为 $P<0.05$,与假手术组比较;b为 $P<0.05$,与模型组比较。

3 讨 论

脑缺血再灌注时,梗死灶周围脑组织由于缺血、缺氧导致血脑屏障破坏,使兴奋性氨基酸自神经组织中大量释放至细胞外,引起细胞外大量谷氨酸积累。谷氨酸过度激活谷氨酸受体尤其是 NMDA受

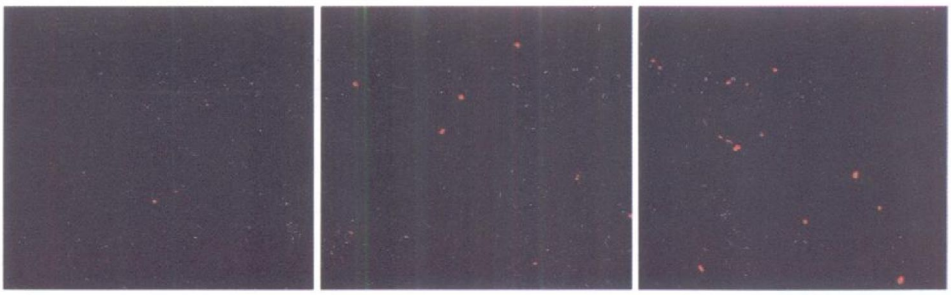

图 1. 再灌注 72 h缺血侧海马 CA1区 Survivin的表达 (×400) 从左至右分别为假手术组、模型组和艾芬地尔干预组。

体,引起大量 Ca^{2+} 进入细胞,激活 Ca^{2+} 敏感酶如 nNOS,促成大量自由基生成、线粒体损伤,随后发生细胞凋亡。艾芬地尔是一种新型的 NMDA 2B亚型受体特异性拮抗剂,通过选择性与 NMDA受体相结合直接松弛血管平滑肌,扩张血管,增加脑血流量,改善神经元的新陈代谢,增加线粒体的呼吸作用,维持脑内线粒体的磷酸化作用。另外发现它还可以抗血小板凝集,从而改变血液粘性。通过上述作用,它能够改善脑缺血造成的损伤。

本研究中,我们通过免疫荧光法检测大鼠脑缺血再灌注模型组、艾芬地尔干预组不同时相 Survivin的表达,发现在再灌注后 3 h即在缺血侧海马 CA1区出现 Survivin表达的增高,72 h达到高峰。提示脑缺血再灌注能刺激 Survivin持续表达,这种作用在 72 h表现最明显。在脑缺血再灌注后,Survivin表达的增高可能为脑内缺血侧海马区发生的自动保护反应机制。已有研究发现,Caspase家族蛋白参与了脑缺血后神经元损伤的病理过程,在脑缺血再灌注损伤中起重要的作用。Survivin通过直接或间接方式来干涉 Caspase功能而抑制细胞凋亡,具体机制可能是通过作用于 Caspase-3蛋白发挥作用的[9,10]。首先,Survivin直接抑制凋亡终末效应器 Caspase-3活性,阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程;其次,Survivin依赖细胞增殖信号进入核内与 CDK4结合,导致 CDK2/Cyclin E激活和 Rb磷酸化,Rb磷酸化后启动细胞进入周期,加快 G1→S期的转换,导致 p21从 CDK4中释放出来,p21易位到线粒体与 Preocaspase-3结合,阻断线粒体细胞色素 C释放,抑制 Caspase-3活性从而阻断细胞凋亡[11]。另外,可能还存在非 Caspase依赖途径,如参与调节 p53依赖的缺血后细胞凋亡[12]。

使用艾芬地尔干预后各个时相检测结果发现,再灌注 3 h、24 h、72 h及 7天 Survivin均较模型组表达量增多、光密度值增高。以上结果提示艾芬地尔可能具有促进 Survivin合成和分泌的作用,有进一步增强 Survivin抑制细胞凋亡的作用。因此,在缺血性脑血管病的早期开始使用艾芬地尔治疗,并且持续至 2周左右,可以有效地阻断缺血半暗带细胞的凋亡过程,挽救更多的脑组织,对疾病的恢复具有更积极的作用。

[参考文献]

[1] Grossman D, McNiff JM. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, **113** (6): 1076-081.

[2] Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, **8** (1): 61-70.

[3] Minakshi Guha, Dario DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks [J]. *Cell Cycle*, 2009, **8** (17): 2 708-710.

[4] Prasad S. Crotepoxide chemosensitizes tumor cells through inhibition of expression of proliferation, invasion, and angiogenic proteins linked to proinflammatory pathway [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285** (35): 26 987-997.

[5] Conway EM. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation [J]. *Am J Pathol*, 2003, **163** (3): 935-946.

[6] 陈伟光, 欧阳小明. 大鼠脑损伤后 survivin表达与神经细胞凋亡的研究[J]. 华北煤炭医学院学报, 2010, **12** (1): 16-18.

[7] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1989, **20** (8): 1 037-043.

[8] 陈荣华. 局灶性脑缺血大鼠白细胞介素 10的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, **11** (7): 622-624.

[9] 廖秋菊, 王 晶. survivin对脑缺血后神经细胞凋亡的保护作用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, **24** (7): 627-629.

[10] Kren L, Brazdil J. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2004, **12** (1): 44-49.

[11] Suzuki A. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, **19** (10): 1 346-353.

[12] Xu ZX, Zhao RX. Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (3): 1 838-844.

(此文编辑 文玉珊)