

· 实验研究 ·

他克莫司对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马 GAP-43 表达的影响

周艳,熊英,袁三英

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)是新生儿期常见病,具有较高的致死率和神经系统致残率,目前尚无有效干预措施。新型的免疫抑制剂他克莫司(FK506)已在成年动物缺血性脑损伤模型中显示神经保护作用,目前尚无新生动物模型研究。该研究旨在探讨 FK506 对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马生长相关蛋白(GAP-43)表达的影响。方法 7日龄 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组、HIBD组和FK506干预组,HIBD组和干预组制备HIBD模型,干预组缺氧后即刻腹腔内注射FK506 1 mg/kg,连续注射3 d。大鼠分别于缺氧后24 h,72 h,7 d,14 d断头取脑,切片行苏木精-伊红染色及免疫组化Envision法检测海马GAP-43的表达。结果 同HIBD组相比,干预组神经细胞灶性坏死减少。HIBD组海马GAP-43的表达较假手术组增加,在缺氧后72 h至14 d差异有显著性意义($P<0.05$)。干预组海马GAP-43的表达在缺氧后7 d达到高峰,与HIBD组相比,在缺氧后72 h、7 d表达增加,差异有显著性($P<0.05$)。结论 FK506可能对HIBD新生大鼠具有神经保护作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(1):65-68]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;FK506;GAP-43;新生大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)01-0065-04

Effect of tacrolimus on growth-associated protein-43 expression in the hippocampus of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

ZHOU Yan, XIONG Ying, YUAN San-Ying. Department of Pediatrics, Second West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: xiongying246@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Immunosuppressant tacrolimus (FK506) has shown neuroprotective effects on hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in the adult animal model. This study investigated whether FK506 has a protection against HIBD in neonatal rats by examining growth-associated protein-43 (GAP-43) expression in the hippocampus. **Methods** Ninety-six seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: sham-operation, HIBD and FK506 intervention group. HIBD was induced in the later two groups. The FK506 intervention group was intraperitoneally injected with FK506 immediately after HIBD, at a dosage of 1 mg/kg daily, for three days. The HIBD group was injected with normal saline. Immunohistochemical technical was applied to examine GAP-43 expression in the hippocampus 24 and 72 hrs and 7 and 14 days after HIBD. **Results** Compared with the HIBD group, hematoxylin-eosin staining showed attenuated neuronal necrosis in the FK506 intervention group. In the HIBD group, the expression of GAP-43 increased significantly 72 hrs, and 7 and 14 days after HIBD compared with that in the sham-operation group. The GAP-43 expression in the FK506 intervention group was significantly higher than that in the HIBD group 72 hrs and 7 days after HIBD. **Conclusions** FK506 might have neuroprotective effects against HIBD in neonatal rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (1):65-68]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; FK506; Growth-associated protein-43; Neonatal rats

他克莫司(tacrolimus, FK506)是一种新型强效免疫抑制剂,适用于肝、肾、心等器官移植术后的移植排斥反应。后来的研究发现,FK506还具有神经保护作用,在脑缺血、中风模型中能减少梗死灶范围,改善认知及行为能力^[1,2]。在外周神经损伤中,能促进轴突的萌出、轴索的延长并加快其生长速度^[3]。同时,由于其能很好地透过血脑屏障,作为一种神经保护药物,FK506引起了人们的关注。但是,FK506对缺血性脑损伤作用的研究仅限于成年动物,而有关FK506在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤

[收稿日期]2008-04-07;[修回日期]2008-05-15
[作者简介]周艳,女,硕士研究生,医师。主攻方向:新生儿疾病。
[通讯作者]熊英,女,教授,四川大学华西第二医院,邮编:610041。

(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 中的作用尚未见报道。

生长相关蛋白 (growth associated protein-43, GAP-43) 又称 B-50, F1, pp46, P57, 神经调节素, 是一种胞膜磷酸蛋白质, 与神经系统的发育、神经突触连接重建和可塑性以及再生密切相关。转基因小鼠脑内 GAP-43 过度持续表达, 能引起正常范围之外的中枢神经系统轴突末端自发性的出芽反应^[4], 而同源重组后不表达 GAP-43 的小鼠则会出现轴突生长和路径寻找的畸形^[5]。目前认为 GAP-43 是神经再塑、再生的分子标志物。

本研究旨在探讨 FK506 对 HIBD 新生大鼠海马 GAP-43 表达的影响, 了解其是否具有神经保护作用及其可能的作用机制, 为临床使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 缺氧缺血模型的制备及 FK506 干预方案

7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠 (购自四川省医学科学院动物实验中心) 96 只随机分为假手术组 (分离右侧颈总动脉, 不结扎和低氧处理), HIBD 组和 FK506 (普乐可复, 1 mL: 5 mg, 爱尔兰藤泽制药) 干预组。后两组吸入乙醚麻醉, 分离并结扎右侧颈总动脉, 缝合皮肤后空气中恢复 0.5 ~ 2 h, 然后置于自制低氧舱, 以 2 L/min 的速度通入氮氧混合气体 (氧浓度为 8%) 2 h, 制备 HIBD 模型。缺氧完成后, 干预组腹腔内注射用生理盐水稀释的 FK506 1 mg/kg, HIBD 组腹腔内注射等量生理盐水, 之后每天注射 1 次, 共 3 d。

1.2 标本的制备

各组动物于缺氧后 24 h, 72 h, 7 d, 14 d 行心脏灌注, 断头取脑。所取脑组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h 以上, 石蜡包埋, 经视交叉后 2 ~ 6 mm 冠状切面切取组织 (含海马), 切片行苏木精-伊红染色及免疫组化染色。

1.3 免疫组化检测

组织切片经过固定及脱石蜡处理, GAP-43 (购自北京博奥森生物技术有限公司) 经枸橼酸缓冲液

微波修复, 一抗浓度为 1: 400。4℃ 过夜, 37℃ 复温 30 min, PBS 振洗后滴加抗兔 Envision 液 (购自北京中山生物技术有限公司)。37℃ 孵育 60 min, DAB 显色。

1.4 图像分析

Olympus U-TX1X-2 图像采集系统采图, 每张切片于放大 400 倍镜下海马随机选取 2 个不同的视野采图, 棕黄色为阳性表达。Image-Pro Plus 4.5 图像分析软件对图像进行分析。

1.5 统计学分析

各组各时点的免疫组织化学染色的阳性结果选择积分光密度 (integrated optical density, IOD) 作为参数进行统计分析。统计分析方法为单因素方差分析, 统计分析工具为 SPSS 11.0 软件包, 计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 FK506 对缺氧缺血性大鼠脑组织病理改变的影响

苏木精-伊红染色光学显微镜观察: 与 HIBD 组相比, 干预组神经元水肿、坏死减轻, 无明显的成片细胞死亡现象 (图 1)。

2.2 3 组大鼠海马 GAP-43 的表达

GAP-43 染色阳性表达于神经元胞浆、胞膜及其周围神经纤维, 呈棕黄色。假手术组海马从 24 h (生后 8 d) 起即有 GAP-43 表达, 随日龄增加表达逐渐增加, 至 7 d (生后 14 d) 达到高峰。HIBD 组海马的 GAP-43 在缺氧缺血后 72 h 表达增加, 于 7 d 达到高峰, 至 14 d 仍维持在较高水平, 同假手术组相比, HIBD 组海马 GAP-43 的表达在 72 h, 7 d 和 14 d 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。干预组海马的 GAP-43 的表达变化趋势与 HIBD 组一致, 于缺氧缺血后 72 h 表达增加, 7 d 达到高峰, 与假手术组相比, 在 72 h, 7 d 和 14 d 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 与 HIBD 组相比, 在 72 h 和 7 d 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), (表 1, 图 2)。

表 1 3 组大鼠不同时间 GAP-43 表达 OD 值 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

	24 h	72 h	7 d	14 d
假手术组	4 264.41 ± 228.33	4 384.28 ± 410.52	6 740.81 ± 260.85	2 065.57 ± 287.77
HIBD 组	4 154.23 ± 181.78	11 397.60 ± 658.79 ^a	17 579.48 ± 621.39 ^a	16 513.51 ± 588.90 ^a
治疗组	4 088.22 ± 167.58	21 400.65 ± 1 056.01 ^b	27 170.04 ± 3 548.05 ^b	16 681.24 ± 1 348.71

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与 HIBD 组比较, $P < 0.05$

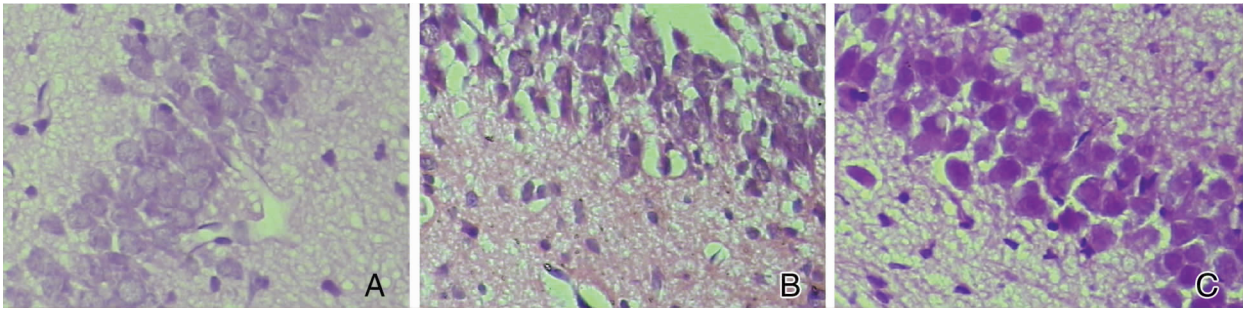


图1 大鼠脑组织病理改变(苏木精-伊红染色×400)。A:正常组6 h,海马细胞排列整齐;B:HIBD后24 h,海马神经元水肿,缺失;C:FK506 干预组24 h,海马细胞间隙宽,细胞水肿不明显。

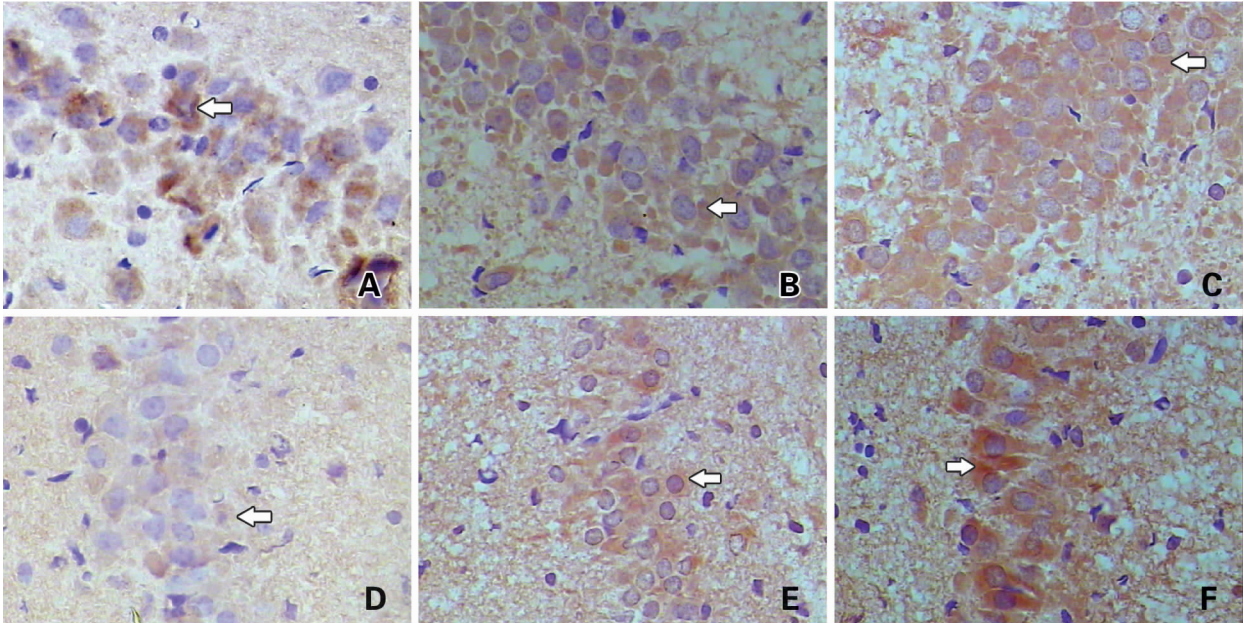


图2 3组大鼠海马 GAP-43 表达(免疫组化×400)。A:假手术组7 d, 海马 CA1 区可见 GAP-43 阳性表达于胞浆及神经纤维网,棕黄色为阳性表达; B:HIBD 组7 d,海马 CA1 区可见 GAP-43 表达较假手术组增加,棕黄色为阳性表达; C:FK506 组7 d,海马 CA1 区可见 GAP-43 表达较 HIBD 组增加,棕黄色为阳性表达; D:假手术组7 d,海马 CA2 区 GAP-43 阳性表达于胞浆及神经纤维网,棕黄色为阳性表达; E:HIBD 组7 d,海马 CA2 区 GAP-43 表达较假手术组增加,棕黄色为阳性表达; F:FK506 组7 d,海马 CA2 区 GAP-43 表达较 HIBD 组增加,棕黄色为阳性表达。

3 讨论

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是足月新生儿致死和神经系统致残的主要原因之一。7 日龄大鼠 HIBD 模型是被广泛采用的新生儿窒息的动物模型。海马是神经元高度集中的部位,从低等动物到人,是脑部结构中最有规则的部位,也是研究得最深入的一个部位,具有中枢神经系统的典型特性,一直被认为是研究脑损伤的生理功能和病理变化机制的代表部位。

FK506 是一种新型强效免疫抑制剂,广泛用于肝、肾、心等器官移植。1994 年,Sharkey^[6]首次报道了 FK506 可改善大鼠由中风引起的局灶性大脑缺

血损伤。此后大量实验对 FK506 在脑缺血中作用进行了研究。2005 年 Macleod 等^[2]对 FK506 在中风动物模型中神经保护作用的有效性进行了系统回顾和 Meta 分析,共有 29 个实验包括 1 759 个动物纳入研究。结果发现 FK506 有效性点估计值为 31.3%(95%的可信区间为 27.2%~35.4%),有明确的神经保护作用。目前尚无 FK506 在新生动物脑损伤模型作用的报道。

GAP-43 是一种胞膜磷酸蛋白质,在神经元的发育和再生过程中,GAP-43 伴随着轴突的生长在神经组织内大量合成。本研究显示,假手术组 GAP-43 在缺氧缺血后 24 h(生后 8 d)表达逐渐增加,至缺氧缺血后 7 d(生后 14 d)达到高峰,缺氧缺血后 14 d(生后 21 d)仍有表达,而这一时期正是轴突生

长、延伸及终末分支形成的关键时期,支持 GAP-43 是参与神经发育、突触形成的重要物质这一观点。

本研究还显示,HIBD 新生大鼠海马 GAP-43 在缺氧缺血后 72 h 表达增加,于 7 d 达到高峰,至 14 d 仍维持在较高水平;与假手术组相比,HIBD 组海马 GAP-43 的表达在 72 h、7 d 和 14 d 差异有显著性意义,这与鲁利群等^[7],黄玉春等^[8]的研究相似。GAP-43 主要存在于已分化定型并开始轴突生长的神经元中,位于突触前膜,在膜上与钙调蛋白(CaM)结合,参与 G 蛋白的相互作用以及神经递质的释放,并作用于胞吞/胞吐过程。GAP-43 能通过加速生长锥基部胞浆膜的扩展而促进轴突生长,诱导生长锥的生长和促进膜扩展,其表达水平调节着生长锥的形态和轴突的长出,是损伤后中枢神经系统可塑性损伤修复的重要物质^[9]。HIBD 新生大鼠 GAP-43 表达增加可能与中枢神经系统损伤后自身修复与再生有关。

本研究将 FK506 按 1 mg/kg 腹腔内注射 3 d 对 HIBD 新生大鼠进行干预,结果显示 FK506 能减轻 HIBD 大鼠的神经细胞水肿及坏死,提示 FK506 对 HIBD 新生大鼠具有保护作用。同时,本研究还显示,FK506 能增加 HIBD 新生大鼠海马缺氧缺血后 GAP-43 的表达。Madsen 等^[10]在大鼠脊髓损伤模型中使用 FK506 干预,结果发现 FK506 可增加损伤后脊髓 GAP-43 的表达并促进神经再生,认为 FK506 能促进受损的中枢神经系统 GAP-43 的表达,与本研究结果相似,提示 FK506 可能在中枢神经系统损伤时具有促进神经再生和修复的作用。

但是,FK506 的神经保护作用机制尚不清楚。FK506 促进 GAP-43 活化的途径,Gold 等^[11]认为与 FKBP-52 有关。FKBP-52 是 FKBP(FK506 binding protein,FK506 结合蛋白)家族的一员,FK506 通过与其受体 FKBP 相结合发挥作用。FKBP-52,又被称为 FKBP-59、Hsp-56,是成熟的类固醇受体复合物的分子伴侣成分,与 Hsp-90 二聚体及 p23、受体分子共同构成类固醇受体复合物。Gold 等^[11]的研究显示,抑制类固醇受体复合物的解聚可中和 FK506 及其衍生物对体外培养的 SH-SY5Y 的促进轴突延长的作用。使用 FKBP-52 拮抗剂可验证其是否抑制 FK506 的神经保护作用,但目前尚无该拮抗剂。

FK506 现已用于人的器官移植、神经退行性疾病等,其脂溶性高,能很好地透过血脑屏障,动物实

验显示其神经保护的治疗时间窗长^[1],故被认为是治疗神经系统损伤非常有前景的药物。同时,目前的研究还显示,FK506 的神经保护作用与其免疫抑制作用无关,没有免疫抑制作用的 FK506 衍生物,如 GPI-1046^[12],已在动物模型中证实同样具有神经保护作用,故开发无免疫抑制作用的 FK506 衍生物是当前研究的重点。

[参 考 文 献]

- [1] Furuichi Y, Katsuta K, Maeda M, Ueyama N, Morikuchi A, Matsuka N, et al. Neuroprotective action of tacrolimus (FK506) in focal and global cerebral ischemia in rodents: dose dependency, therapeutic time window and long-term efficacy[J]. Brain Res, 2003, 965(1-2): 137-145.
- [2] Macleod MR, O'Collins T, Horky LL, Howells DW, Donnan GA. Systematic review and metaanalysis of the efficacy of FK506 in experimental stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(6): 713-721.
- [3] Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries[J]. J Peripheral Nerv Syst, 2003, 8(4): 236-250.
- [4] Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, et al. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice[J]. Cell, 1995, 83(2): 269-278.
- [5] Strittmatter SM, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC. Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43[J]. Cell, 1995, 80(3): 445-452.
- [6] Sharkey J, Butcher SP. Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia[J]. Nature, 1994, 371(6495): 336-339.
- [7] 鲁利群,赵聪敏,蒲昭霞.生长相关蛋白在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马中的表达变化[J].第三军医大学学报,2006,28(21):2160-2162.
- [8] 黄玉春,辛颖,韩玉昆,高红.生长相关蛋白 43 在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内表达的变化及意义[J].中国当代儿科杂志,2003,5(2):86-89.
- [9] Farina V, Gadau S, Lepore G, Manca P, Zedda M. Growth-associated protein expression in the frontal and occipital cortices of callosotomized rats[J]. Funct Neurol, 2004, 19(3):181-184.
- [10] Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Merir KF, et al. Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 1998, 154(2): 673-683.
- [11] Glod BG, Armishead DM, Wang MS. N-NK506-Binding protein-12 neuro immunophilin ligands increase neurite elongation and accelerate nerve regeneration[J]. J Neurosci Res, 2005, 80(1): 56-65.
- [12] Li F, Omori N, Hayashi T, Jin G, Sato K, Nagano I, et al. Protection against ischemic brain damage in rats by immunophilin ligand GPI-1046[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(3): 383-389.

(本文编辑:吉耕中)