

# 美金胺对缺血性脑损伤保护作用的研究

王维维, 张光毅

(徐州医学院生物化学与分子生物学研究中心, 江苏 徐州 221002)

**摘要:**目的 观察美金胺对 SD 雄性大鼠全脑缺血 再灌注后海马 CA1 区锥体细胞的保护作用, 并研究其可能的机制。方法 采用四动脉结扎法建立大鼠全脑缺血模型, 缺血 15 min 后分别灌注 6 h 或 5 天。大鼠随机分为假手术组、缺血 再灌注组、缺血 再灌注给药组和缺血 再灌注溶剂对照组。缺血 再灌注给药组腹腔注射 20 mg/kg 美金胺。使用免疫印迹、免疫沉淀和焦油紫染色法等技术检测相关信号蛋白的表达、活化水平及神经元的死亡。结果 大鼠缺血 再灌注 5 天后, 缺血 再灌注给药组海马 CA1 区细胞的存活数量较缺血 再灌注组和缺血 再灌注溶剂对照组明显增加; 缺血 再灌注 6 h 缺血 再灌注给药组 N-甲基-D-天门冬氨酸 (NMDA) 受体亚基 2A (NR2A)、突触后密集区蛋白 95 (PSD-95)、非受体型蛋白酪氨酸激酶 (Src) 三者间免疫沉淀的蛋白量及 NR2A 的酪氨酸磷酸化水平较缺血 再灌注组和缺血 再灌注溶剂对照组明显降低, 而三者的表达量没有明显变化。结论 美金胺通过抑制 NR2A、PSD-95、Src 三者结合及 Src 介导的 NR2A 的酪氨酸磷酸化抑制了缺血后 NMDA 受体功能的增强, 从而对大鼠缺血性脑损伤有保护作用。

**关键词:** 脑缺血 再灌注; 美金胺; NMDA 受体; NR2A; Src

**中图分类号:** R364.1<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)07-0437-04

## Pathological study on the neuroprotection of memantine against cerebral ischemia in SD rats

WANG Weiwei ZHANG Guangyi

(Research Center for Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the neuroprotection of memantine against cerebral ischemia in SD rat models and investigate the underlying mechanism. Methods Rats were randomly assigned to 4 groups: sham-operation group, ischemia/reperfusion group, vehicle control group and drug test group. Transient brain ischemia (15 min) and reperfusion was induced by the four-vessel occlusion method (4-VO). The experiment was performed by using IB, IP and morphologic methods to examine the expression of relevant message proteins and the survival of hippocampal neurons. Results Transient cerebral ischemia/reperfusion induced obvious neuronal death, which could be improved by the use of memantine. It was also found that memantine inhibited the interactions between NR2A, Src and PSD-95, and decreased the tyrosine phosphorylation of NR2A. Conclusions The neuroprotective effects of memantine against cerebral ischemic/reperfusion damage are pathologically confirmed in SD rats models. And the mechanism may involve the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src.

**Key words:** cerebral ischemia/reperfusion; memantine; NMDA receptors; NR2A; Src

近年来脑缺血损伤的发病机制被认为主要是 N-甲基-D-天门冬氨酸 (NMDA) 受体的兴奋毒作用。研究报道 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂美金胺 (memantine) 可以抑制 NMDA 受体在病理条件下的过度增强, 其作用与阻滞通道过度开放有关<sup>[1]</sup>, 但其作用的具体机制仍没有充分阐明。本实验采用大鼠全脑缺血 再灌注模型研究美金胺对脑缺血的神经保护作用, 并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级雄性 Sprague-Dawley

(SD) 大鼠, 250~300 g 由徐州医学院实验动物中心提供。随机分为 4 组: 假手术组 (Sham)、缺血 再灌注组 (ischemia/reperfusion, I/R)、缺血 再灌注溶剂对照组 (Saline)、缺血 再灌注给药组 (Memantine)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 按本实验室已建立的大鼠四动脉结扎模型, 动物以 20% 水合氯醛 (300~350 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 分离双侧颈总动脉, 电凝椎动脉。手术第 2 天动物于清醒状态下结扎双侧颈

总动脉, 全脑缺血 15 min 再灌注 6 h 或 5 天。缺血

后立即给予腹腔注射药物或溶剂,以体征表现判断缺血模型的可靠性<sup>[2]</sup>。假手术组不结扎双侧颈总动脉。

1.2.2 给药 美金胺溶于生理盐水中,缺血再灌注给药组在缺血后立即腹腔注射给药 20 mg/kg 溶剂对照组给予等体积生理盐水。

1.2.3 样品制备 大鼠再灌注 6 h后,断头快速取脑,分离双侧海马,沿海马裂将其 CA1 部分分离出来,置液氮中冻存备用。以下操作均在冰水浴中进行:从液氮中取出海马加匀浆缓冲液,用 Teflon 匀浆器高速匀浆 (10 s×6 次), 1 000 g 于 4℃ 离心 15 min,小心移取上清液 (主要为海马的胞质部分),置 -80℃ 冰箱待用。

1.2.4 蛋白浓度测定 采用改良 Lowry's 法,以牛血清白蛋白 (BSA, fraction V) 为标准蛋白。

1.2.5 免疫沉淀 (immunoprecipitation IP) 以下操作均在 4℃ 条件下进行:含相同蛋白量 (400 μg) 的样品中,加入 0.35 ml IP 缓冲液,1~2 μg 抗体 anti-NR2A,旋转混匀器上反应 4 h 或过夜,再加入 25 μl 蛋白 A,旋转混匀器上反应 2 h,12 000 g 离心 2 min 沉淀用 IP 缓冲液洗 3 遍。加入 1/3 体积 4× 蛋白上样缓冲液,混匀后置沸水浴中 5 min 以洗脱蛋白 A 上结合的蛋白,12 000 g 离心 2 min 吸取上清液用于免疫印迹。

1.2.6 免疫印迹 (immunoblot IB) 含相同蛋白量的样品中加入 1/3 体积 4× 蛋白上样缓冲液,置沸水浴中 5 min 变性处理。取等量的变性蛋白质样品 (100 μg) 或 IP 处理后样品,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis PAGE) 分

离后,电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上。将 NC 膜置封闭液中室温孵育 3 h 后,分别加入一抗 anti-pY、anti-NR2A、anti-PSD-95 或 anti-Src 工作液,4℃ 孵育 4 h 或过夜, TBST 洗膜 (5 min×3) 后,加入 AP 标记的二抗工作液,室温孵育 2 h, TBST 洗膜 (3 min×5), 水洗。使用 NBT/BCIP 试剂盒,在新鲜配制的 AP 显色液中显色,流水洗涤终止反应。扫描膜上显色条带并以 Quantity One 软件分析处理。

1.2.7 组织学检查 再灌注 5 天时,以水合氯醛麻醉大鼠,接着以生理盐水和 4% 多聚甲醛进行心室灌注,然后取脑块放于 4℃ 下 4% 多聚甲醛中固定 1 天。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。取海马齿状回互包段连续冠状切片,片厚 5 μm,切片经脱蜡、晾干,0.1% 焦油紫 (cresyl violet) 染色 10~20 min 梯度乙醇分色,光镜下观察神经元呈紫色而背景基本无色为止,脱水、透明、封片。显微镜下计数 CA1 区 1 mm 宽度内的存活锥体细胞。

1.3 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SigmaStat 统计软件,采用单因素方差分析 (ANOVA),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 缺血再灌注 5 天海马 CA1 区锥体细胞的存活量 光镜下可见:Sham 组、Memantine 组海马 CA1 区细胞分布均匀整齐;I/R 组和 Saline 组出现大量死亡细胞,存活细胞较少,表现为细胞破碎、核固缩、溶解 (图 1)。各组大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区细胞存活量统计结果见表 1。与 I/R 组相比,Memantine 组存活细胞明显增加 ( $P < 0.05$ )。

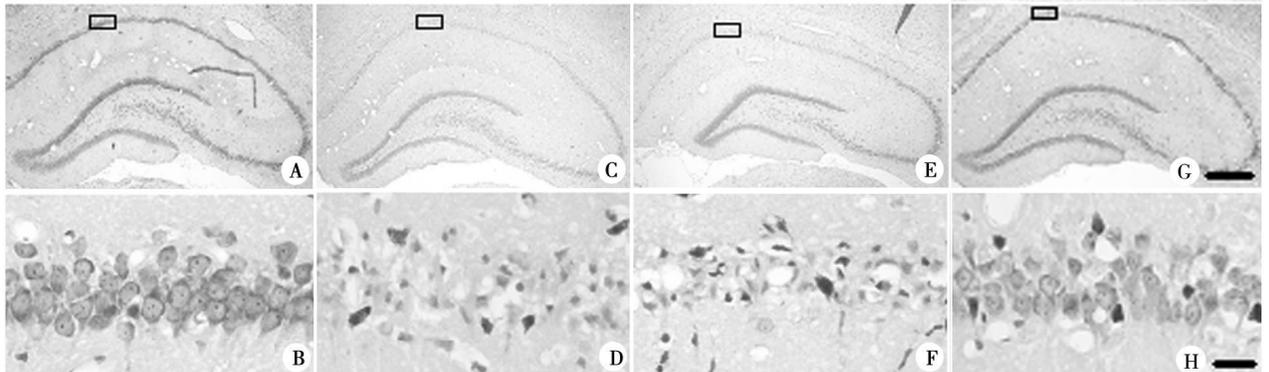


图 1 缺血再灌注 5 天后各组大鼠海马 CA1 区锥体细胞焦油紫染色结果

A, B; Sham 组; C, D; I/R 组; E, F; Saline 组; G, H; Memantine 组。上排图内矩形面积分别在下排以较高放大倍数显示。A, C, E, G; ×40; B, D, F, H; ×400。靶标: G; 200 μm; H; 10 μm

表 1 缺血 再灌注 5天后各组大鼠海马 CA1区 锥体细胞存活数 (n=5,  $\bar{x} \pm s$  个)

组别	存活细胞数
Sham组	209±8
I/R组	47±10
Saline组	51±11
Memantine组	165±7*

与 I/R组比较: \* P<0.05

2.2 缺血 再灌注 6 h 海马 CA1 区 NR2A、PSD-95、Src 三者的结合及 NR2A 的酪氨酸磷酸化水平的变化 由图 2、3 可知,以 anti-NR2A 免疫沉淀, anti-pY、anti-PSD-95、anti-Src 免疫印迹,在缺血 再灌注 6 h Memantine 组海马 CA1 区 NR2A、PSD-95、Src 三者相互免疫沉淀蛋白量及 NR2A 的酪氨酸磷酸化水平较 I/R 组明显降低;以 NR2A、PSD-95、Src 三者抗体直接免疫印迹的结果各组均没有明显变化。

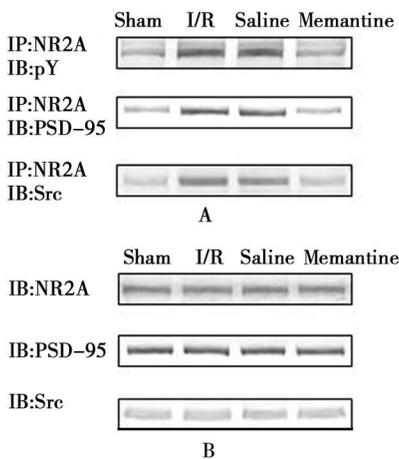


图 2 缺血 再灌注 6 h 各组大鼠海马 CA1 区 NR2A、PSD-95、Src 三者的结合,及 NR2A 的酪氨酸磷酸化电泳图

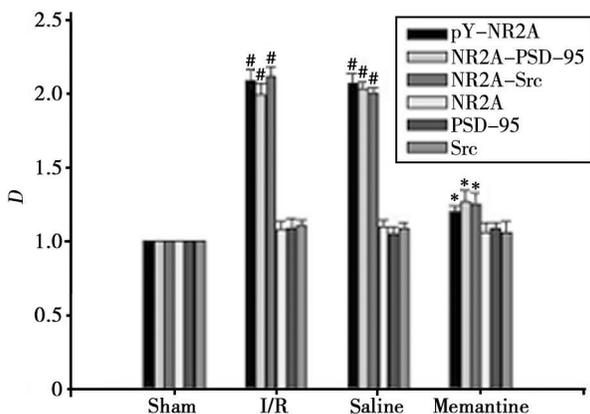


图 3 缺血 再灌注 6 h 各组大鼠海马 CA1 区 NR2A、PSD-95、Src 三者的结合,及 NR2A 的酪氨酸磷酸化水平与 Sham 组比较: # P<0.05; 与 I/R 组比较: \* P<0.05

### 3 讨论

缺血性神经细胞损伤相当一部分是由谷氨酸受体中的 NMDA 受体的过度活化介导的,它的活化引起通过膜受体离子通道内流的  $Ca^{2+}$  大量增加,导致神经元死亡。而 NMDA 受体功能受到 Src 激酶介导的受体亚基 NR2A 的酪氨酸磷酸化水平的调节<sup>[3]</sup>。然而,NMDA 受体的生理性活化状态对于正常神经元的功能也非常重要。这就意味着那些完全抑制 NMDA 受体活性的具潜在神经保护作用的药物极有可能在临床上产生不可耐受的副作用<sup>[4]</sup>。

而金刚胺的衍生物美金胺,作为一种非竞争性、低亲和力和开放性的通道阻滞剂,优先抑制 NMDA 受体的过度活化,而不影响正常的受体活性。当受体离子通道过度开放时,它优先进入通道;更重要的是,它的解离速率快,不会持续积聚在通道上干扰随后正常的突触传递,理论上应用相对安全<sup>[5]</sup>。有报道美金胺对脑缺血缺氧损伤和其他多种神经损伤都具有脑保护作用<sup>[1]</sup>,比如阿尔茨海默病和血管性痴呆<sup>[4]</sup>。它作为抗帕金森病的新药近年来在欧洲广泛应用,罕见副作用的报道<sup>[6-7]</sup>。

同时,脑缺血方面的研究证实美金胺对新生鼠缺血缺氧性脑损伤<sup>[8]</sup>具有神经保护作用,并且对实验动物的认知能力没有产生明显副作用<sup>[9]</sup>。已知在脑缺血 再灌注 6 h NMDA 受体亚基 NR2A、PSD-95、Src 三者结合增加, NR2A 的酪氨酸磷酸化水平增加<sup>[10]</sup>,从而上调 NMDA 受体的功能,导致  $Ca^{2+}$  内流增加,最终引起神经元的死亡。本实验中,我们在诱导全脑缺血后立即给予美金胺,通过免疫沉淀和免疫印迹结果显示美金胺能够抑制缺血 再灌注 6 h NR2A、PSD-95、Src 三者的结合及 NR2A 酪氨酸磷酸化的增加,提示其抑制了缺血后 NMDA 受体的功能。而焦油紫染色结果也显示美金胺明显减少了再灌注 5 天后海马 CA1 区锥体细胞的死亡,证明在全脑缺血发生后立即给予美金胺使 NR2A 的酪氨酸磷酸化减少,抑制了 NMDA 受体的功能,拮抗了 NMDA 受体的过度激活,从而对神经细胞具有保护作用。在全脑缺血损伤发生后给予美金胺对神经细胞仍然具有保护作用,与缺血前给药的方式<sup>[11]</sup>相比,增加临床治疗措施的可行性。本研究结果为我们进一步阐述美金胺脑缺血保护作用及其临床应用提供了一定的依据。

#### 参考文献:

[1] Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists.

molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults [J]. *NeuroRx* 2004, 1(1): 101-110.

[2] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke* 1979, 10(3): 267-272.

[3] Yu XM, Askalan R, Keil GJ 2nd, et al. NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src [J]. *Science* 1997, 275 (5300): 674-678.

[4] Möbius HJ. Pharmacologic rationale for memantine in chronic cerebral hypoperfusion especially vascular dementia [J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999, 13 (Suppl 3): S172-S178.

[5] Seif el Nasr M, Penche B, Rossberg C, et al. Neuroprotective effect of memantine demonstrated in vivo and in vitro [J]. *Eur J Pharmacol* 1990, 185(1): 19-24.

[6] Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data [J]. *Neuropharmacology* 1999, 38(6): 735-767.

[7] Ditzler K. Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome. A double-blind placebo controlled trial

[J]. *Arzneimittelforschung* 1991, 41(8): 773-780.

[8] 张国庆, 陈惠金, 蒋明华, 等. 美金胺、黄芪对新生大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2003, 18(10): 793-795.

[9] Chen HS, Wang YF, Rayudu PV, et al. Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation [J]. *Neuroscience* 1998, 86(4): 1121-1132.

[10] Liu Y, Zhang G, Gao C, et al. NMDA receptor activation results in tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunit 2A (NR2A) and interaction of Pyk2 and Src with NR2A after transient cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Brain Res* 2001, 909(1-2): 51-58.

[11] Block F, Schwarz M. Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats [J]. *Neurosci Lett* 1996, 208(1): 41-44.

收稿日期: 2008-05-02 修回日期: 2008-07-04

本文编辑: 李昕

## 创伤性休克兔肺组织 IL-18、SOD、MDA水平的变化及亚甲蓝的干预作用\*

王厚清<sup>1</sup>, 许铁<sup>1</sup>, 高中<sup>1</sup>, 许鹏程<sup>2</sup>, 季永<sup>3</sup>, 郑翠芳<sup>4</sup>, 燕宪亮<sup>1</sup>, 梁高永<sup>1</sup>, 韩寒<sup>1</sup>, 纵雪梅<sup>1</sup>

(1. 徐州医学院附属医院急救中心, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221002; 3. 徐州医学院附属医院麻醉科; 4. 徐州市妇幼保健院麻醉科, 江苏 徐州 221005)

**摘要:**目的 观察创伤性休克兔肺组织白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)、超氧化物歧化酶 (superoxide-dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)水平的变化及鸟苷酸环化酶抑制剂亚甲蓝 (methylene blue, MB)的干预作用。方法 选用大白兔 18只, 随机分为对照组 (6只)、创伤性休克生理盐水复苏组 (生理盐水复苏组, 6只)、创伤性休克 MB处理组 (MB处理组, 6只)、生理盐水复苏组及 MB处理组测定复苏后 4 h肺组织 IL-18、SOD、MDA的水平, 对照组测定实验末肺组织 IL-18、SOD、MDA的水平。结果 兔创伤性休克复苏后肺组织 IL-18及 MDA明显升高, SOD明显降低, 但 MB处理组肺组织 IL-18及 MDA含量明显低于生理盐水复苏组, SOD水平明显高于生理盐水复苏组。结论 IL-18及氧自由基在创伤性休克的病理发展过程中起着重要作用, 应用 MB可降低肺组织 IL-18及 MDA的水平, 增加 SOD含量, 对创伤性休克缺血再灌注肺损伤有保护作用。

**关键词:** 休克; 创伤性; 白细胞介素 18; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 亚甲蓝

**中图分类号:** R641 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)07-0440-03

### The changes of lung tissue IL-18, SOD and MDA in rabbits with traumatic shock and the intervention with methylene blue

WANG Houqing<sup>1</sup>, XU Tie<sup>1</sup>, GAO Zhong<sup>1</sup>, XU Pengcheng<sup>2</sup>, JI Yong<sup>3</sup>, ZHENG Cuifang<sup>4</sup>,  
YAN Xianliang<sup>1</sup>, LIANG Gaoyong<sup>1</sup>, HAN Han<sup>1</sup>, ZONG Xuemei<sup>1</sup>

(1. Emergency Center Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China;

\* 基金项目: 徐州医学院附属医院科研课题。