

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 06-0028-05

血管紧张素 II 2 型受体活化在缺血再灌损伤中的神经保护作用及机制研究 *

刘远新¹, 张玉蓉², 苗常青³

(1. 西安体育学院健康科学系, 陕西 西安 710068; 西安交通大学第一附属医院
2. 神经内科, 3. 急诊科, 陕西 西安 710061)

摘要: **目的** 评估血管紧张素 II 2 型 (AT2) 受体激动剂 CGP42112 在体内、外脑缺血 / 再灌损伤中的保护作用及机制探讨。 **方法** Wistar 大鼠行 3 h 大脑中动脉阻塞 (MCAO), 再灌 21 h。再灌期间大鼠腹腔注射 CGP42112 (1 mg/kg) 和 (或) IL-10 中和抗体 (0.1 mg/kg)。大鼠手术 24 h 后进行梗死体积、行为结果和 ELISA 分析。并采用大鼠原代神经元氧糖剥夺 / 复氧 (OGD/R) 模型用来观察 CGP42112 在体外的神经保护作用。 **结果** 与对照大鼠比较, CGP42112 处理可减少缺血大脑半球梗死体积、改善神经功能预后, 并减少肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达。而 IL-10 中和抗体可逆转 CGP42112 处理引起的梗死体积、炎症缓解及神经功能改善。在体外, CGP42112 可使 OGD/R 神经元活力增加, 并减少细胞凋亡。 **结论** 在体内 CGP42112 可能通过 IL-10 发挥神经保护作用; 在体外则具有直接神经保护作用。

关键词: 缺血 / 再灌损伤; 氧糖剥夺 / 复氧; 血管紧张素 II 2 型受体

中图分类号: R363.1

文献标识码: A

Neuro-protective effect of angiotensin II type 2 receptor activation in rat model of ischemia/ reperfusion injury*

Yuan-xin Liu¹, Yu-rong Zhang², Chang-qing Miao³

(1. Department of Health Science, Xi'an Physical Education University, Xi'an, Shaanxi 710068, China;

2. Department of Neurology, 3. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of

Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: Objective To investigate neuro-protective effect of angiotensin type 2 (AT2) receptor agonist in rat model of brain ischemia / reperfusion injury. **Methods** Wistar rats in IR group were subjected to 3 hours of ischemia (middle cerebral artery suture occlusion) followed by reperfusion for 21 hours. Rats from control received sham operative procedures without ischemia nor reperfusion. Rats received CGP42112 (AT2 agonist, 1 mg/kg) and / or IL-10 antibody (0.1 mg/kg) through intraperitoneal injection. Infarction size and behavioral outcomes were recorded at 24 hours post-injury. TNF- α were measured by ELISA. Primary rat neurons were utilized to test neuroprotective effect of CGP42112 *ex vivo*. Cell model of oxygen / glucose deprivation and reperfusion (OGD/R) was established based on standard protocol. **Results** Treatment of CGP42112 reduced infarct size, enhanced functional recovery, and decreased the expression of pro-inflammatory cytokine (TNF- α) in IR group compared with control group. Anti-IL-10 antibody reversed the CGP42112-induced neuro-protective effect including infarction size, improvement in behavioral outcome, and inflammatory response. In *ex vivo*, CGP42112 preserved OGD/R induced neuron loss, while reduced cell apoptosis. **Conclusion** CGP42112 provides direct neuroprotection in ischemia and reperfusion model,

收稿日期: 2017-07-10

* 基金项目: 陕西省自然科学基金 (No: 2014JM4107)

[通信作者] 苗常青, E-mail: mcqfree@163.com

potentially through modulating IL-10 pathway.

Keywords: ischemia/reperfusion injury; oxygen glucose deprivation/reoxygenation angiotensin type 2 receptor

血管紧张素II 2型(angiotensin type 2, AT2)受体活化后对缺血脑卒中动物具有神经保护作用^[1]。刺激AT2受体可减少小鼠永久性或暂时性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后梗死面积;还可减少神经细胞凋亡并降低小鼠死亡率^[2]。最近有研究指出,AT2受体激动剂C21可使MCAO大鼠缺血半球神经保护细胞因子白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)表达增加^[3]。但是IL-10增加与大鼠神经功能改善的关系仍不明确。IL-10是一种抗炎细胞因子,通过激活JAK1-STAT3信号通路发挥作用^[4]。研究已证实,IL-10在体内外具有神经保护作用^[5-6]。AT2受体激动剂,CGP-42112,不是C21,对葡萄糖剥夺大脑皮质神经元具有保护作用^[7]。因而,本研究主要评估AT2受体激动剂CGP-42112在MCAO大鼠以及氧糖剥夺(oxygen deprivation, OGD)原代神经元模型中的神经保护作用,及其与抗炎细胞因子IL-10的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 雄性Wistar大鼠,体重280~340g,购于西安体育学院。实验大鼠随机分为Sham组和MCAO组, MCAO组大鼠进一步分为:MCAO组、CGP42112+MCAO组、CGP42112+IL-10中和抗体+MCAO组及IL-10中和抗体+MCAO组,每组各5只大鼠。

1.1.2 实验仪器和试剂 CGP42112、PD123319、TTC染料、MTT和DMSO(美国Sigma公司), TNF- α ELISA试剂盒(广州锐博生物科技公司), DMEM培养基(美国Gibco公司), IL-10中和抗体(上海安研商贸有限公司), 剪切Caspase-3抗体(美国Santa公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑缺血再灌模型的复制 10%水合氯醛麻醉(150~200 mg/kg), 然后进行颈部手术。显微镜下分离出颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。然后用缝合线结扎颈总动脉近心端和颈外动脉远心端, 用针头在颈外动脉远端动脉壁上扎1个小口, 将线栓从颈外动脉孔插入颈总动脉, 通过颈内动脉最后到达大脑中动脉, 用缝合线固定线栓, MCAO后3h拔出线栓, 再灌

注21h。模型复制成功的标志是大鼠麻醉清醒后出现手术侧肢体瘫痪, 站立不稳。手术成功率约为80%。Sham组大鼠仅分离颈部血管, 大脑中动脉不插入栓线, 其他手术操作步骤同MCAO组。CGP42112(1 mg/kg)和IL-10中和抗体(0.1 mg/kg)均在大鼠再灌时腹腔注射。

1.2.2 脑梗死体积评估 MCAO手术后24h, 将大鼠麻醉后取脑, 置入-20℃冰箱冷冻15min后, 行冠状切片, 厚度为1.5mm。将切好的脑片迅速放入准备好的1% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)磷酸盐缓冲液中, 在37℃水浴中避光孵育10min。脑梗死区域不染色(灰白色), 而正常脑组织染为深红色。依据相关文献报道^[8]方法计算MCAO后脑梗死体积。

1.2.3 行为学评估 Bederson评分: MCAO手术后24h, 放在空旷的地方进行评分。评分范围在1~3分之间。1分为大鼠提尾悬空时前肢弯曲; 2分为侧推时阻力降低; 3分为向瘫痪侧转圈。

Beam walk评分测试 MCAO手术后24h大鼠在横梁上的平衡。大鼠放在横梁上1min, 评分范围在0~6分之间。0分: 以稳定的姿势在平衡木上; 1分: 抓住平衡木侧面; 2分: 抱住平衡木, 1肢跌下; 3分: 抱住平衡木, 2肢跌下; 4分: 40~60s从平衡木跌下; 5分: 20~40s从平衡木跌下; 6分: 20s内从平衡木跌下。

1.2.4 ELISA分析 尾静脉抽取MCAO大鼠血液, 通过ELISA试剂盒规定的步骤检测血液中TNF- α 浓度。

1.2.5 原代神经元分离和培养 从妊娠Wistar大鼠17d胚胎中分离大脑皮层。用冷Hank液冲洗, 用剪刀剪碎, 并用吸管吹打, 然后加入胰蛋白酶消化15min, 加入DEME培养液, 将细胞悬液加入新试管中, 吸管吹打, 静放10min, 重复2、3次。用筛网过滤细胞悬液, 加入DEEM培养基, 在培养箱中培养10~12d后进行相关检测。

1.2.6 氧糖剥夺/复氧(oxygen deprivation/reoxygenation, OGD/R) 为模拟体内缺血/再灌注, 原代神经元进行OGD 3、6或9h后复氧6h。对细胞OGD, 把常规细胞培养基换成无糖培养基, 后孵育在缺氧培养箱中培养(94%氮气N₂, 5%二氧化碳CO₂, 小

于 1% 氧气 O₂)。复氧即把无糖培养基换成常规培养基, 常规培养箱中培养 (94% 空气, 5% CO₂)。在 OGD 实验中, 神经元 OGD 开始前采用不同浓度 CGP42112 处理。在 OGD/R 实验中, 细胞复氧时采用 CGP42112 (10、100 和 1 000 nmol/L)、AT2 受体拮抗剂 PD123319 (1 μmol/L) 或 IL-10 中和抗体 (1 μg/ml) 处理。

1.2.7 MTT 分析 实验结束时, 96 孔培养板加入 MTT 溶液 (0.5 mg/ml), 反应 4 h。去除溶液, 加入 DMSO 融解结晶物, 孵育 5 min, 使用酶标仪在 540 nm 处测量吸光值。

1.2.8 Western blot 分析 提取原代神经元总蛋白, 取 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜上。用兔抗剪切 Caspase-3 多克隆抗体 (1 : 1 000) 和鼠抗 β-actin 多克隆抗体 (1 : 2 000) 4℃ 孵育 3 h。用 PBS-T 稀释山羊抗兔和山羊抗鼠的 II 抗 (1 : 25 000), 室温孵育 1 h。洗膜后用化学发光扫描系统检测并摄片, 以 β-actin 为内参, 应用图像分析软件 Quantity one 进行吸光度积分值分析。

1.3 统计学方法

数据处理采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 两两比较用 Tukey HSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-10 对大鼠体内 CGP42112 介导的神经保护作用的影响

经方差分析显示, 各组间梗死体积比较, 差异有统计学意义 ($F = 6.081, P = 0.025$), 与 MCAO 组大鼠比较, CGP42112 腹腔注射可减少 MCAO 大鼠梗死体积 ($P = 0.032$); 而 IL-10 中和抗体可消除 CGP42112 诱导的神经保护作用 (见图 1)。IL-10 可能参与 CGP42112 介导的神经保护作用。经方差分析也显示, 各组间 Bederson ($F = 12.142, P = 0.013$) 和 Beam walk 评分 ($F = 9.749, P = 0.019$) 差异有统计学意义, 其中 CGP42112 处理可改善 MCAO 手术 24 h 后大鼠 Bederson ($P = 0.017$) 和 Beam walk 评分 ($P = 0.026$), 而 IL-10 中和抗体可阻止神经功能恢复 (见图 2)。各组间血液 TNF-α 浓度差异也有统计学意义 ($F = 20.537, P = 0.006$), 与 Sham 组大鼠比较, MCAO 组大鼠血液中炎症细胞因子 TNF-α 水平增加。而 CGP42112 腹腔注射可降低 MCAO 大鼠血液中 TNF-α 浓度 ($P = 0.012$), IL-10 中和抗体也可消除

CGP42112 的抗炎作用 (见图 3)。

2.2 CGP42112 在体外实验中发挥直接神经保护作用

实验证实, 原代神经元 OGD 6 h, 然后复氧 6 h 提供最合适的细胞死亡数量。MTT 分析显示各组间比较, 差异有统计学意义 ($F = 14.537, P = 0.018$); 与 Sham 组比较, 不同浓度 CGP42112 (10、100 和 1 000 nmol/L) 处理均可使 OGD/R 神经元活力增加 ($P = 0.013、0.009$ 及 0.008) (见图 4)。Western blot 显

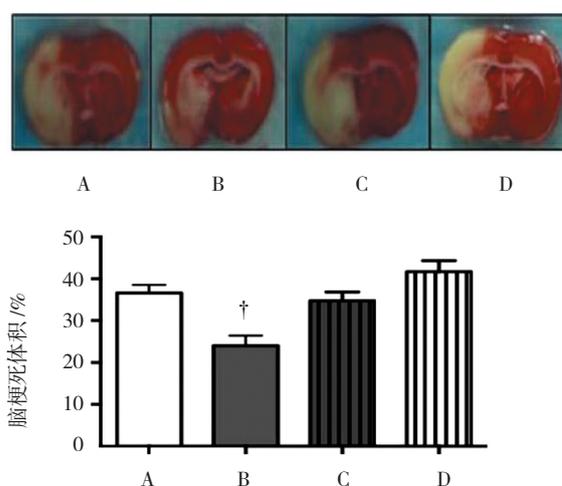


图 1 典型 TTC 染色脑片及定量不同组间梗死体积
A: MCAO 组; B: CGP42112+MCAO 组; C: CGP42112+IL-10 中和抗体 +MCAO 组; D: IL-10 中和抗体 +MCAO 组。† 与 CGP42112+MCAO 组比较, $P < 0.05$

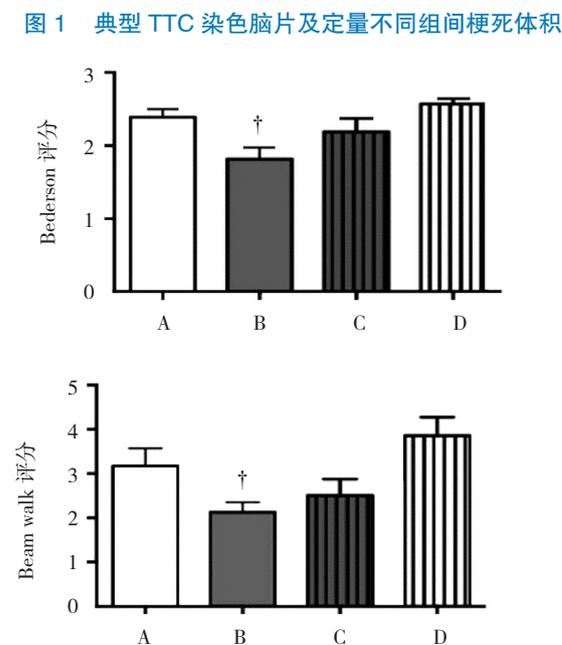
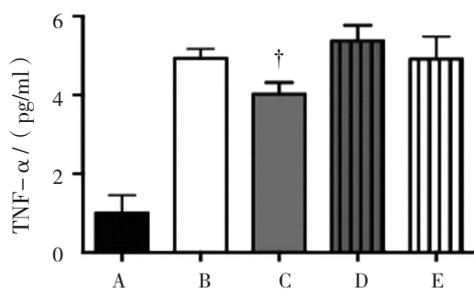


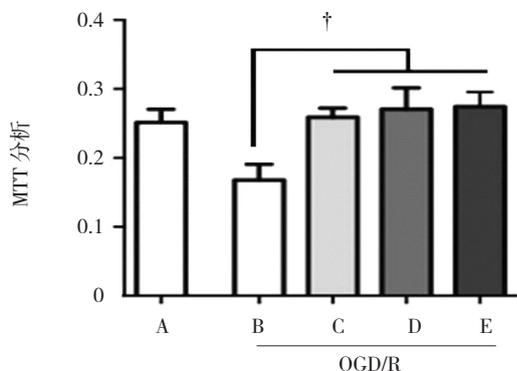
图 2 各组 MCAO 手术 24 h 行为学评分
A: MCAO 组; B: CGP42112+MCAO 组; C: CGP42112+IL-10 中和抗体 +MCAO 组; D: IL-10 中和抗体 +MCAO 组。† 与 MCAO 组或 IL-10 中和抗体 +MCAO 组比较, $P < 0.05$

图 2 各组 MCAO 手术 24 h 行为学评分



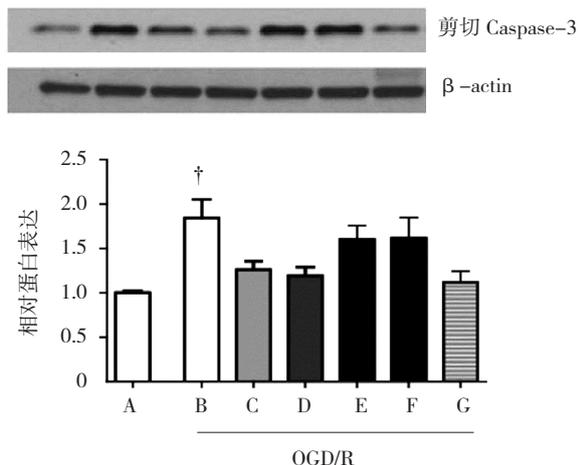
A: Sham 组; B: MCAO 组; C: CGP42112+MCAO 组; D: CGP42112+IL-10 中和抗体+MCAO 组; E: IL-10 中和抗体+MCAO 组。† 与 MCAO 组或 CGP42112+IL-10 中和抗体+MCAO 组比较, $P < 0.05$

图 3 各组大鼠血液 TNF-α 浓度 (ELISA)



A: 非 OGD 对照组; B: OGD 对照组; C: CGP42112 (10 nmol/L) 组; D: CGP42112 (100 nmol/L) 组; E: CGP42112 (1000 nmol/L) 组。† 与 OGD 对照组比较, $P < 0.05$

图 4 各组细胞的活力 (MTT)



A: 非 OGD 对照组; B: OGD 对照组; C: CGP42112 (100 nmol/L) 组; D: CGP42112 (1000 nmol/L) 组; E: CGP42112 (100 nmol/L) + PD123319 (1 μmol/L) 组; F: CGP42112 (1000 nmol/L) + PD123319 (1 μmol/L) 组; G: CGP42112 (100 nmol/L) + IL-10 中和抗体 (1 μg/ml) 组。† 与 A、C、D 或 G 组比较, $P < 0.05$

图 5 各组细胞剪切 Caspase-3 表达 (Western blot)

示不同组细胞剪切 Caspase-3 表达差异有统计学意义 ($F = 10.058, P = 0.027$), 其中 CGP42112 具有抗凋亡作用, CGP42112 抗凋亡作用可被 AT2 受体拮抗剂 PD123319 抑制, 但是 IL-10 中和抗体对该效应无影响 (见图 5)。结果表明, CGP42112 在体外发挥神经保护作用, 且与 IL-10 无关。

3 讨论

近年研究已证实, 炎症反应在脑缺血 / 再灌注损伤中发挥关键作用。中枢神经系统中有许多组织和细胞可产生炎症细胞因子, 比如 IL-10 和 TNF-α 等^[9]。该细胞因子在脑缺血 / 再灌注引起的炎症损伤过程中广泛参与, 在神经元损伤及修复过程中也发挥重要作用。AT2 受体广泛分布于中枢神经系统中, 研究已经证实, AT2 受体可以促进神经细胞的分化和再生, 从而具有神经保护功能^[10], 但是其确切作用机制仍不明确。该研究证实, AT2 受体激动剂 CGP42112 可能通过 IL-10 在大鼠暂时性 MCAO 后发挥神经保护和抗炎作用。此外, 目前结果也显示, CGP42112 在原代神经元 OGD/R 损伤中直接发挥神经保护作用, 与 IL-10 调节无关。

最近有报道指出, AT2 受体激动剂在肾脏炎症和心肌缺血模型通过刺激活 AT2 受体发挥保护作用, 而且 IL-10 也在其中发挥作用^[11]。黄焱平等研究发现, CGP42112+ 缺血 / 再灌模型组脑组织中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达小于 Sham 组, 而 IL-4 和 IL-10 表达高于 Sham 组; PD123319+ 缺血 / 再灌模型组脑组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达高于 Sham 组, 同时 IL-4 和 IL-10 表达低于 Sham 组^[12]。在本研究主要明确是否 IL-10 上调与 CGP42112 的神经保护作用相关。研究结果显示, IL-10 中和抗体可消除 CGP42112 在脑缺血 / 再灌大鼠中介导的神经保护和抗炎作用。另外, 其他试剂也可通过介导 IL-10 上调从而发挥神经保护作用。例如, 内源性肽, 黑皮肤素已被证明通过诱导 IL-10 上调从而减轻脑缺血和创伤性脑损伤后的组织损伤^[13]。CGP42112 可以刺激不同细胞产生 IL-10。CGP42112 很难通过完整血脑屏障渗透到大脑中。然而, 短暂性 MCAO 可破坏血脑屏障的完整性^[14]。因此, CGP42112 可以渗透到缺血脑组织, 并刺激未损伤的神经元产生 IL-10。

CGP42112 也可能通过全身免疫细胞产生 IL-10。IL-10 可通过调节 T 淋巴细胞参与全身免疫细胞的神

经保护作用^[15]。在本研究中, 阻断 IL-10 不能完全逆转 MCAO 24 h 后大鼠的神经功能改善, 提示其他介质也可能参与 CGP421121 介导的神经保护。

既往研究显示, AT2 受体激动剂在体外无神经保护作用^[7]。但是本研究中, CGP42112 对 OGD/R 原代神经元具有神经保护作用, 表现为神经元存活率增加和细胞凋亡减少。差异可能是由于体外缺血/再灌模型不一样所致。LEE 在研究中仅仅采用葡萄糖剥夺, 而该研究使用氧糖剥夺并联合复氧。但是 CGP42112 直接神经保护作用的机制尚待阐明。最近报告指出, AT2 受体在神经元线粒体上表达。氧化应激可诱导神经元 AT2 受体表达增加, 从而降低线粒体呼吸^[16]。上述结果提示, AT2 受体可能通过调节线粒体呼吸发挥神经保护作用。

总之, 研究结果表明, IL-10 参与 AT2 受体激动剂 CGP42112 介导的体内神经保护作用。此外, CGP42112C21 对体外原代神经元具有直接的神经保护作用。

参 考 文 献:

- [1] MIN L J, MOGI M, TSUKUDA K, et al. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage[J]. *American Journal of Hypertension*, 2014, 27(8): 1036-1044.
- [2] SCHWENGEL K, NAMSOLLECK P, LUCHT K, et al. Angiotensin AT2-receptor stimulation improves survival and neurological outcome after experimental stroke in mice[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2016, 94(8): 957-966.
- [3] ALHUSBAN A, FOU DA A Y, PILLAI B, et al. Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke[J]. *Journal of Hypertension*, 2015, 33(1): 170-180.
- [4] SABAT R, GRÜTZ G, WARSZAWSKA K, et al. Biology of interleukin-10[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2010, 21(5): 331-344.
- [5] 王晓霞, 杨巧莲, 党连生. 血清 IL-10 与缺血性脑卒中早期进展的关系 [J]. *中国老年学*, 2011, 31(18): 3484-3486.
- [6] SHARMA S, YANG B, XI X, et al. IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways[J]. *Brain Research*, 2011, 1373(3): 189-194.
- [7] SEYOUNG L, BRAIT V H, ARUMUGAM T V, et al. Neuroprotective effect of an angiotensin receptor type 2 agonist following cerebral ischemia in vitro and in vivo[J]. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2012, 4(1): 16.
- [8] 江君, 杨巍巍, 张楠, 等. 低氧预适应减轻脑中动脉阻塞所致小鼠缺血性脑损伤 [J]. *基础医学与临床*, 2009, 29(2): 113-118.
- [9] 方晓艳, 孙建宁, 苗明三. 不同脑缺血预处理时相对再次缺血损伤大鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 含量的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(8): 537-540.
- [10] REINECKE K, LUCIUS R, REINECKE A, et al. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB[J]. *FASEB Journal*, 2003, 17(14): 2094.
- [11] DHANDE I, ALI Q, HUSSAIN T. Proximal tubule angiotensin AT2 receptors mediate an anti-inflammatory response via interleukin-10: role in renoprotection in obese rats[J]. *Hypertension*, 2013, 61(6): 1218-1226.
- [12] 黄焱平, 宋先兵. 血管紧张素 II 2 型受体对大鼠脑缺血-再灌注的保护作用研究 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2015(18): 2653-2656.
- [13] SPACCAPELO L, GALANTUCCI M, NERI L, et al. Up-regulation of the canonical Wnt-3A and Sonic hedgehog signaling underlies melanocortin-induced neurogenesis after cerebral ischemia[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 707(1-3): 78-86.
- [14] KOZAK W, KOZAK A, JOHNSON M H, et al. Vascular protection with candesartan after experimental acute stroke in hypertensive rats: a dose[J]. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 2008, 326(3): 773-782.
- [15] BODHANKAR S, CHEN Y, VANDENBARK A A, et al. Treatment of experimental stroke with IL-10-producing B-cells reduces infarct size and peripheral and CNS inflammation in wild-type B-cell-sufficient mice[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2014, 29(1): 59-73.
- [16] VALENZUELA R, COSTABESADA M A, IGLESIASGON ZALEZ J, et al. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration[J]. *Cell Death & Disease*, 2016, 7(10): e2427.

(王荣兵 编辑)