

锰苯甲酸卟啉在蛛网膜下腔出血早期脑损伤中的保护作用

季 丹¹, 方 琼¹, 黄大可², 李 华¹, 吴 芳¹

摘要 目的 探讨锰苯甲酸卟啉(MnTBAP)在蛛网膜下腔出血(SAH)早期脑损伤中的保护作用。方法 将100只SD大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组(SAH)和实验组(SAH+MnTBAP),每组25只。比较各组大鼠的神经功能缺陷评分、脑组织含水含量、血脑屏障通透性(Evans 蓝外渗实验)、线粒体三磷酸腺苷合成酶6亚基(ATPase-6)和细胞色素C蛋白(Cytc)表达及丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的差异。结果 与模型组相比,实验组的神经功能缺陷评分明显增高,脑含水量明显减少,血脑屏障通透性降低,ATPase-6蛋白表达上调,Cytc表达下降,MDA含量减少,SOD和GSH-Px活性增加。结论 MnTBAP能够改善神经功能并对线粒体具有保护作用,MnTBAP在SAH早期脑损伤中可能具有神经保护作用。

关键词 锰苯甲酸卟啉;蛛网膜下腔出血;脑损伤

中图分类号 R 743.35

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0938-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.021

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是常见的神经外科急症之一,早期脑损伤在SAH发病后72 h^[1-2]。前期动物实验研究^[3-4]显示低氧诱导因子-1 α 、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶可致大脑水肿、神经元死亡。而N-(6-氧代-5,6-二氢菲啶-2-基)-2-(N,N-二甲基氨基)乙酰胺、氟西汀可以降低SAH后促炎细胞因子的水平,具有保护神经细胞作用^[4-5]。生物活性氧(reactive oxygen species, ROS)主要来源于线粒体,过量的ROS容易导致机体的氧化应激状态,从而产生自由基等细胞毒性物质。锰苯甲酸卟啉[Mn(III) tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride], MnTBAP]为含有金属锰的锰卟啉药物,它不仅是超氧化物歧化酶(superox-

ide dismutase, SOD)类似物,而且具有清除超氧自由基的作用,且其本身较易透过细胞膜^[6]。该研究拟探讨MnTBAP对SAH早期脑损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 SAH大鼠模型的建立 本实验采用颈内动脉穿刺法建立大鼠SAH模型,取健康体质量300~350 g的SPF级SD大鼠100只,钝性分离暴露其右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),结扎切断ECA和ICA之间的吻合支,将ECA结扎、切断拉直,使其与ICA成一直线。采用直径0.26 mm锐化尼龙线从颈外动脉插入颈内动脉的颅内段,感觉有阻力时继续插入3 mm,造成蛛网膜下腔出血。迅速拔尼龙线,颈外动脉残端结扎,妥善处理颈部切口。采集脑组织标本时如见基底池、枕大池、脑干、小脑或者大脑表面有血凝块存在则认为模型成功。见图1。

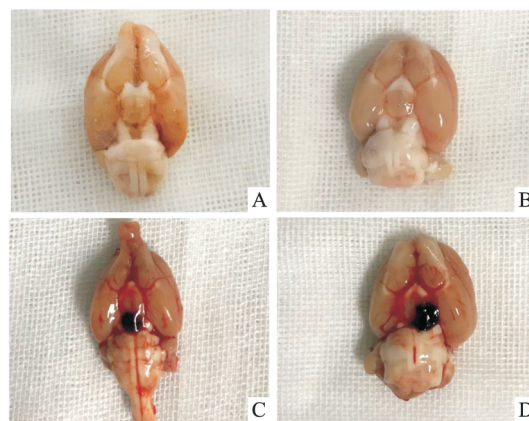


图1 各组大体标本

A: 空白对照组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 实验组

2019-05-08 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目(编号: 12925KJ2018B04)

作者单位: ¹安徽医学高等专科学校, 合肥 230061

²安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

作者简介: 季 丹, 女, 讲师, 硕士研究生, 责任作者, E-mail: 920930720@qq.com

1.2 实验动物分组 SD大鼠被随机分为空白对照组、假手术组、模型组和实验组,每组25只。假手术组大鼠经相同的手术过程,但不穿破血管壁,其余操作均与SAH组一致。参考既往文献^[7],实验组大鼠行腹腔注射MnTBAP 10 mg/kg。

1.3 检测指标

1.3.1 神经功能缺陷评分 参照 Garcia 制定后经 Kusaka et al^[8] 修订的标准,于术后 24 h 评估各组动物的自发性活动、四肢运动对称、前脚伸展、攀登、双侧躯干的触碰反应和触须反应。

1.3.2 脑组织含水量测定 术后 24 h,分离大脑并保持蛛网膜的完整性。对大脑的湿重进行测量并记录,后将大脑放入烤箱内进行 120 ℃ 烘烤 24 h 后测量干重。用干湿重法计算脑组织含水量(脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%)。

1.3.3 血脑屏障通透性测定 使用 Evans 蓝外渗实验评定。SAH 建模成功后 24 h,股静脉注射 2% Evans 蓝(2 mg/kg),1 h 后开胸灌注后迅速断头取脑。后行荧光光度测定法测定外渗 Evans 蓝量,以 ng/mg 表示。

1.3.4 Western blot 法检测 术后 24 h 采集大鼠大脑组织,蛋白质液裂解并提取总蛋白,提取的蛋白标本采用 BCA 试剂盒测定其浓度。每孔取 20 μg 蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,其后转膜,加一抗 4 ℃ 过夜线粒体三磷酸腺苷合成酶 6 亚基(adenosine triphosphatase-6,ATPase-6)抗体(购自美国 Abcam 公司)、细胞色素 C(Cytochrome C,Cytc)抗体(购自美国 Santa Cruz 公司)和 β-actin 抗体(购自美国 Invitrogen 公司),加 HRP 标记的二抗,ECL 法显影,X 线胶片记录。

1.3.5 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性测定 术后 24 h,取大鼠大脑组织裂解、匀浆、离心、蛋白定量后,按照各试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公司)操作说明书,分别检测大脑组织中丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量、SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)活性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经功能缺陷评分比较 空白对照组和假手术组大鼠神经功能均无明显损伤,而模型组和实验组神经功能均有一定程度的损伤。见表 1。模

型组的神经功能缺陷评分明显低于空白组、假手术组和实验组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。实验组与空白组、假手术组之间的神经功能缺陷评分差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 1。

2.2 各组脑组织含水量比较 模型组的脑组织含水量明显高于空白组、假手术组和实验组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。实验组与空白组及假手术组之间的神经功能缺陷评分差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 1。

2.3 各组血脑屏障通透性比较 空白组和假手术组大脑表面和周围血管颜色正常,而模型组颞底皮层呈现显著的蓝色,而实验组亦在颞底皮层有蓝色呈现,但显示的蓝色程度较模型组弱。见图 2。Evans 蓝渗出量测定验证了大体观测,模型组和实验组的 Evans 蓝渗出量明显高于空白组和假手术组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。实验组的 Evans 蓝渗出量明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而空白组和假手术组之间的 Evans 蓝渗出量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

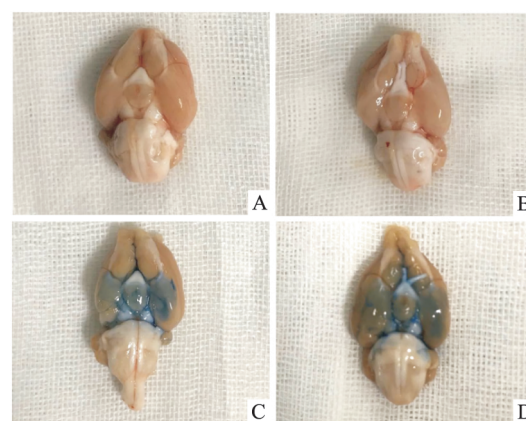


图 2 各组血脑屏障通透性实验

A: 空白对照组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 实验组

2.4 各组 ATPase-6、细胞色素 C 表达 MnTBAP 抑制 Cytc 的表达和增加了 ATPase-6 的表达水平,实验组与空白组、假手术组两组蛋白表达量差异无统计学意义。见图 3。

表 1 各组神经功能缺陷评分、脑组织含水量和 Evans 蓝渗出量

指标	空白组	假手术组	模型组	实验组	F 值
神经功能评分	18.4 ± 0.6*	17.5 ± 1.1*	10.5 ± 1.7	15.5 ± 2.2*	3.55
脑组织含水量(%)	79.2 ± 0.6*	79.5 ± 0.5*	82.5 ± 0.7	80.2 ± 0.7*	2.87
Evans 蓝渗出量(ng/mg)	5.8 ± 0.6*#	6.1 ± 0.7*#	22.6 ± 1.3	12.9 ± 1.1*	24.55

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与实验组比较: # $P < 0.05$

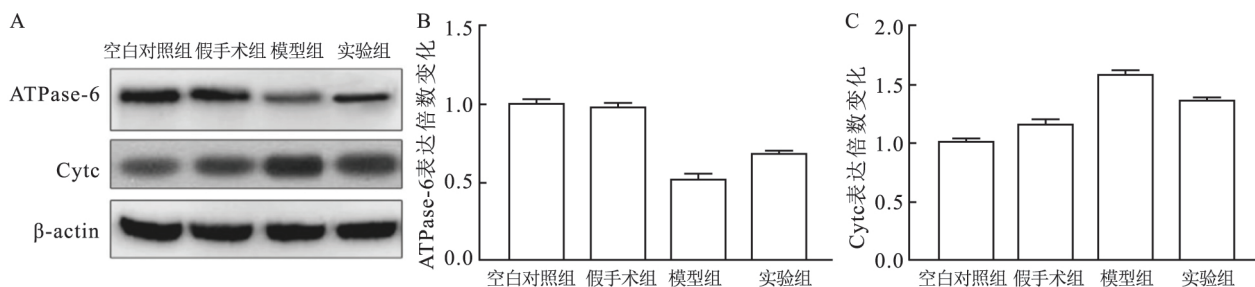


图3 各组 Western blot 结果

A: 各组 ATPase-6 和 Cytc 蛋白电泳示意图; B: 各组 ATPase-6 蛋白定量示意图; C: 各组 Cytc 蛋白定量示意图

表2 各组 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性

指标	空白组	假手术组	模型组	实验组	F 值
MDA(nmol/mg)	2.8 ± 0.2* #	3.1 ± 0.4* #	5.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5*	3.41
SOD(U/mg)	27.5 ± 2.9* #	26.8 ± 2.4* #	15.4 ± 3.2	22.6 ± 2.7*	5.16
GSH-Px(U/mg)	7.6 ± 1.8* #	7.4 ± 1.5* #	3.4 ± 1.1	5.6 ± 1.4*	6.27

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与实验组比较: # $P < 0.05$

2.5 各组 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性 模型组和实验组的 MDA 含量明显高于空白组和假手术组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。模型组和实验组的 SOD 活性和 GSH-Px 活性明显高于空白组和假手术组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。实验组的 MDA 含量明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组的 SOD 活性和 GSH-Px 活性明显高于模型组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。而空白组和假手术组之间的 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

SAH 是临床上具有较高发病率和死亡率的疾病之一,研究^[9]显示早期脑损伤是促使 SAH 患者不良结局的主要原因,而非血管痉挛。线粒体在细胞稳态、细胞代谢和能量产生中起重要作用。线粒体功能的损害,也称为线粒体功能障碍,其特征不在于 ATP 产生减少,ROS 产生增加,以及促凋亡产物如线粒体 DNA(mtDNA) 和 Cytc 的释放,线粒体 Cytc 介导了细胞凋亡,而 ATPase-6 是编码 ATP 合成中的 F1F0-ATP 合成酶复合物的部分,其通过影响 ATP 的合成在细胞凋亡中发挥重要作用^[10]。SAH 发生后细胞会产生过量的活性氧和氮物质(ROS 和活性氮),虽然内源性的细胞内抗氧化剂酶如 SOD 能够干扰 NO 和 $O_2^{\cdot -}$ 的反应环节,但 SAH 中仍会产生大量的 NO、 $O_2^{\cdot -}$ 和过氧亚硝酸盐。但一些研究^[11]提示 SOD 不能够穿透血脑屏障,因此内源性 SOD,或通过脑池内或鞘内投药均不能改善 SAH。

SOD 家族属于抗氧化系统成员,在氧化应激调节中具有重要意义。与不能穿过生物膜的重组 SOD 不同,MnTBAP 是一种非免疫原性的,并能够穿过细胞膜和细胞器膜的一种 SOD 类似超氧化物,可以清除过氧化物和过氧亚硝酸盐^[12]。研究^[13]已经证明 MnTBAP 可以阻止肿瘤坏死因子- α 诱导的内皮细胞细胞间粘附分子的上调,进而产生抗炎作用。有研究^[14]显示 MnTBAP 在预防糖尿病和肥胖方面具有积极作用。体外细胞实验表明,MnTBAP 处理过的细胞出现胞外 SOD 媒介活性的延缓,提示内源性的 SOD 和外源性的 MnTBAP 共同对内源性 $O_2^{\cdot -}$ 的歧化作用,表明 MnTBAP 小分子物质可以迅速渗透细胞及亚细胞的细胞膜^[15]。同时有研究^[16]提示 MnTBAP 可以改善实验性 SAH 后的血管痉挛,改善 SAH 后出现的血脑屏障的破坏、内皮功能障碍及脑水肿,以及继发的颅内压升高以及神经功能损害等。而本研究显示 MnTBAP 可以显著改善 SAH 早期脑损伤,显著改善 SAH 大鼠脑组织含水量,改善 SAH 大鼠的血脑屏障通透性,并改善由于 SAH 导致的大鼠神经功能缺陷评分的降低。Western blot 法检测结果显示 MnTBAP 能够抑制 SAH 的 Cytc 的表达和上调 ATPase-6 的表达,提示 MnTBAP 可能通过作用于 Cytc 和 ATPase-6,对线粒体起到保护作用,进而对 SAH 早期脑损伤具有一定的保护作用。本研究同时也表明 MnTBAP 可以抑制 MDA 的产生,促进 SOD 和 GSH-Px 的活性,提示 MnTBAP 在治疗 SAH 早期脑损伤中可能具有一定的神经保护作用。对于 MnTBAP 使用剂量大小对神经的保护作用程度是否

有差异,有待于进一步研究。

综上,本实验表明 MnTBAP 在 SAH 早期脑损伤中可能具有神经保护作用,其具体的作用机制课题组将继续深入探讨。

参考文献

- [1] D'Souza S. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2015, 27(3): 222–40.
- [2] Suzuki H, Nishikawa H, Kawakita F. Matricellular proteins as possible biomarkers for early brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(7): 1175–8.
- [3] 胡强,吴聘,陈敬寅等. 蛛网膜下腔出血大鼠早期大脑皮层低氧诱导因子-1 α 表达与细胞凋亡相关性研究[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2014, 43(1): 58–65.
- [4] 王威. PARP 抑制剂经 NF- κ B/MMP-9 通路减轻蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤[D]. 浙江大学, 2016: 16–23.
- [5] Liu F Y, Cai J, Wang C, et al. Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 347.
- [6] Zhou Q, Einert M, Schmitt H, et al. MnTBAP increases BMPRII expression in endothelial cells and attenuates vascular inflammation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 84: 67–73.
- [7] Jivabhai Patel S, Bany-Mohammed F, McNally L, et al. Exogenous superoxide dismutase mimetic without scavenging H₂O₂ causes photoreceptor damage in a rat model for oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(3): 1665–77.
- [8] Kusaka G, Calvert J W, Smelley C, et al. New lumbar method for monitoring cerebrospinal fluid pressure in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 135(1–2): 121–7.
- [9] Tian Y, Guo S X, Li J R, et al. Topiramate attenuates early brain injury following subarachnoid haemorrhage in rats *via* duplex protection against inflammation and neuronal cell death [J]. *Brain Res*, 2015, 1622: 174–85.
- [10] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2001, 88(5): 529–35.
- [11] Aladag M A, Turkoz Y, Sahna E, et al. The attenuation of vasospasm by using a sod mimetic after experimental subarachnoidal haemorrhage in rats [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2003, 145(8): 673–7.
- [12] Bresciani G, da Cruz I B, Gonzalez-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 68: 87–130.
- [13] Zhou Q, Gensch C, Keller C, et al. MnTBAP stimulates angiogenic functions in endothelial cells through mitofusin-1 [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 72: 163–71.
- [14] Pires K M, Ilkun O, Valente M, et al. Treatment with a SOD mimetic reduces visceral adiposity, adipocyte death, and adipose tissue inflammation in high fat-fed mice [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2014, 22(1): 178–87.
- [15] Quan M, Cai C L, Valencia G B, et al. MnTBAP or catalase is more protective against oxidative stress in human retinal endothelial cells exposed to intermittent hypoxia than their co-administration (EUK-134) [J]. *React Oxygen Species*, 2017, 3(7): 47–65.
- [16] 周建,李争争,陈政纲,等. 线粒体靶向抗氧化剂 SS31 对大鼠蛛网膜下出血后早期脑损伤的保护作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(9): 1003–9.

Protective effect of MnTBAP on early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats

Ji Dan¹, Fang Qiong¹, Huang Dake², et al

(¹Anhui Medical College Hefei 230061; ²College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the protective effect of MnTBAP on early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rat model. **Methods** 100 SD rats were randomly divided into four groups: the blank control group, the sham operation group, the model group (SAH) and the experimental group (SAH + MnTBAP), 25 rats per group. The difference among these groups of the neurological deficit score, brain water content, blood-brain barrier permeability (Evans blue extravasation test), ATPase-6 and cytochrome C protein expression, MDA, SOD and GSH-Px active level was observed 24 h after SAH. **Results** Compared with the model group, the neurological deficit score was significantly increased, brain water content was significantly decreased, blood-brain barrier permeability was significantly decreased, ATPase-6 protein expression was significantly increased, cytochrome C protein expression was significantly decreased, MDA content was significantly decreased, SOD and GSH-Px activity were significantly increased in the experimental group. **Conclusion** MnTBAP can improve neurological function and protect mitochondria. MnTBAP may play a neuroprotective role in early brain injury following SAH.

Key words MnTBAP; subarachnoid hemorrhage; brain injury