

NAD⁺ 对 tMCAO 小鼠的脑保护作用

陈昕 魏珍玉 岳丹丹 潘杰 钟萍 吴丹红

【摘要】 目的 探讨烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)对大脑中动脉短暂阻塞再灌注(tMCAO)小鼠的脑保护作用。**方法** 实验分为正常组、假手术组、缺血2 h再灌注模型组和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸组;采用线栓法制作 tMCAO 小鼠模型;2 h后再灌注时立即腹腔注射 NAD⁺ 建立 tMCAO + NAD⁺ 组;48 h后观察以上4组小鼠行为学的差异,采用苏木素-伊红(HE)染色法对小鼠脑组织进行染色,观察其病理变化及计算梗死体积,利用尼氏染色法检测尼氏小体的变化。**结果** 与正常组及假手术组相比较,tMCAO 组出现明显神经损伤性异常行为;tMCAO 组脑组织出现严重病理变化,脑梗死体积增大,单位体积脑组织内神经细胞数量减少,尼氏小体减少。tMCAO + NAD⁺ 组与 tMCAO 组比较,神经功能缺损程度明显减轻($P < 0.05$),梗死体积减小($P < 0.01$),单位体积脑组织内神经细胞数量多,尼氏小体多。**结论** NAD⁺ 对 tMCAO 小鼠的脑损伤有一定的保护作用。

【关键词】 缺血再灌注损伤 NAD⁺ 保护

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)05-0318-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.05.003

Treatment of NAD⁺ protects transient middle cerebral artery occlusion in the mouse model of tMCAO Chen Xin, Wei Zhenyu, Yue Dandan, et al. Department of Neurology, the Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201999

【Abstract】 Objective To explore the effect of NAD⁺ treatment for AIS in the mouse model of transient focal brain ischemia(tMCAO). **Methods** Animals was divided into control group, sham group, tMCAO group and tMCAO + NAD⁺ group. tMCAO model was generated by nylon suture method. We built the tMCAO + NAD⁺ group by the intra-peritoneal injection NAD⁺ 50 mg/kg immediately after reperfusion. The behaviour was quantified 48hours later. HE-staining was performed to compared pathological changes and infarct volumes by, meanwhile, nissl staining was used to detect the Nissl changes. **Results** Compare to the sham group, 48hours after ischemia, severe damages were determined in tMCAO group, including pathological changes, increasing infarct volumes, decreaseing of neurones and Nissl signals. compared to the the tMCAO group, the tMCAO + NAD⁺ group had significant decreases of infarct volumes($P < 0.01$), less neurological deficits($P < 0.05$) and more neurones and the Nissl signals. **Conclusion** Our study indicated the protective effort of NAD⁺ for brain after transient middle cerebral artery occlusion.

【Key words】 Reperfusion injury NAD⁺ Protection

当急性缺血性脑卒中发生后脑组织出现氧化应激、炎症反应、内皮功能受损、血脑屏障破坏、纤溶系统失衡、细胞死亡等多种病理生理变化^[1-2],在细胞的代谢反应中发挥重要作用的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)

是脱氢酶的辅酶,其分子式为 C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂,是一种质子传递辅酶,在糖酵解、糖异生、三羧酸循环及呼吸链中发挥着不可替代的作用,同时 NAD⁺ 作为经典的能量代谢调控分子在维持线粒体功能、能量代谢、钙盐平衡、基因表达等生物学功能中发挥重要作用^[3-6]。

由于缺血性脑卒中有效治疗方法的匮乏,探索缺血性脑损伤新的治疗方法及药物一直是脑卒中研究的焦点。近年研究发现 NAD⁺ 可能是拥有多个靶点的神经保护剂^[7]。国外学者发现在暂时性局部

基金项目:宝山区科委基金(11-E-3);上海交通大学医学院基金(13×J10030)

作者单位:201999 上海交通大学医学院附属第九人民医院神经内科[陈昕 魏珍玉 岳丹丹 潘杰 吴丹红(通信作者)];上海市中西医结合医院脑病科(钟萍)

脑缺血的大鼠模型中给予 NAD^+ 能有效减少水肿形成,提示 NAD^+ 对缺血性脑损伤有保护作用^[8]。目前国内尚无 NAD^+ 与缺血性脑损伤的相关研究,本研究将应用小鼠大脑中动脉短暂阻塞再灌注(temporary middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型进一步证实急性缺血性脑卒中发生早期给予 NAD^+ 是否具有脑保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康雄性 ICR 小鼠 32 只,体重约(25~30 g),由斯莱克(SLAC)实验动物中心提供。分笼以标准鼠饲料喂养,自由饮水。

1.2 主要试剂及试剂盒:

1.2.1 NAD^+ 试剂由西格玛公司(Sigma Chemical Co)提供。

1.2.2 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色试剂盒由碧云天生物技术研究提供。

1.2.3 其他试剂均为市售分析纯产品。

1.3 ICR 小鼠中动脉阻塞是再灌注模型制作

1.3.1 分组:将小鼠随机分为 4 组:正常组(control 组),假手术组(sham 组),缺血 2 h 再灌注模型组(tMCAO 组)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸组(tMCAO + NAD^+ 组)。

1.3.2 建模:采用线栓法制作小鼠大脑中动脉短暂阻塞(temporary middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型。每组各 8 只;首先将老鼠仰卧位固定在手术台上,然后腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)和甲苯噻嗪(10 mg/kg)来实现麻醉;然后在手术显微镜下游离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA);用 6-0 线栓穿入颈外动脉残端,结扎分叉处缝线后剪断血管,进入颈内动脉(ICA)颅内段,阻断大脑中动脉(MCA)起始段,线头位于大脑前动脉;用激光多普勒血流仪测量并记录双侧大脑中动脉血流(位置大约在前凶旁 3 mm 左右处),以降低至基础血供 10%以下为建模成功。120 min 后将线栓抽回至颈外动脉,以恢复颈内-大脑中动脉的血供,实现再灌注。

1.3.3 给药:将 NAD^+ 溶解于 0.9% 的生理盐水中,其中 tMCAO + NAD^+ 组在再灌注后立即腹腔注射 NAD^+ 生理盐水溶液,给药剂量为 50 mg/kg。tMCAO 组同时注射同容积生理盐水。

1.3.4 行为学评分:tMCAO 模型建立后饲养 48

h,采用神经损伤行为学评分(LONGA 分级法)对 4 组小鼠术后行为进行评分^[9]。具体评分准则如下:0 分为无缺陷;1 级为不能伸展对侧前肢;2 分为对侧前肢屈曲;3 分为轻度向对侧转圈;4 分为严重向对侧转圈;5 分为向对侧跌倒。

1.3.5 组织取材及脑梗死体积计算:四组小鼠在 tMCAO 模型建立后饲养 48 h 进行行为学评分后,通过注射水合氯醛处死,取出大脑,冰冻切片,HE 染色观察脑组织损伤。具体步骤如下:先用多聚甲醛固定,然后用苏木素染色液染色,之后用自来水冲洗染液,95%乙醇洗涤,伊红染色液染色,再经过梯度酒精脱水和二甲苯透化,行封片处理,晾干之后,再放于显微镜下进行观察。利用扫描仪拍下切片的 H-E 全局图片,无着色或者着色浅为梗死区。利用 Image Pro Plus 计算每个切片梗死对侧半脑面积和梗死区未梗死区面积,差值即为梗死面积,得出每片脑组织的梗死面积、梗死侧脑片的总面积、梗例对侧脑片的总面积,计算梗死体积:总梗死体积 = 总梗死面积 × 脑片厚度,并计算单位体积脑组织内神经细胞数量。

1.3.6 尼氏染色:用多聚甲醛固定冰冻切片,采用尼氏染色液染色,再用蒸馏水洗涤,再经过梯度酒精脱水、二甲苯透化、封片、晾干之后,放于显微镜下观察分析。

1.3.7 统计学处理:应用 Graphpad Prism 6 软件进行统计分析。采用 *t* 检验对 4 组数据进行比较。

2 结果

1. 神经损伤评分:正常组与假手术组之间(神经损伤评分、脑梗死体积、尼氏染色)无统计学差异($P > 0.05$)。与正常组比较,tMCAO 组小鼠出现严重程度的神经缺损性症状,表现在小鼠行走严重障碍,向对侧倾倒,缺血对侧前后肢屈曲,按照 LONGA 法评分,tMCAO 模型组得分(3.40 ± 0.24)分($n = 8$)。与 tMCAO 组比较,tMCAO + NAD^+ 组小鼠神经缺损性症状明显减轻,小鼠可曲线行走,仅向对侧转圈,行为学评分显著下降至(2.10 ± 0.33)分($n = 8$)。

2. 脑梗死体积及细胞数量:我们利用脑切片 HE 染色法评价大脑组织坏死情况。正常组小鼠大脑无损伤,HE 着色均匀(图 2);tMCAO 组脑组织出现严重坏死,缺血区细胞核急剧减少,HE 着色淡(图 2); NAD^+ 组脑组织坏死体积显著减少(图 2)。

利用数学模型估算出小鼠脑梗死的体积(图 2),tMCAO 组小鼠脑梗死体积约为 43.26 mm³,NAD⁺ 组小梗死体积下降至 25.69 mm³。正常组小鼠大脑神经细胞丰富,尼氏染色显示较多神经细胞(图 3 组);tMCAO 组脑组织出现严重坏死,尼氏染色显示神经细胞明显减少(图 3 组);tMCAO + NAD⁺ 组脑组织神经细胞明显增加(图 3 组)。利用数学模型估算出小鼠脑组织神经细胞存活数量(图 3),正常组小鼠脑组织单位体积神经细胞存活数量约为 1.48 × 10⁵/mm³;tMCAO 组小鼠脑组织单位体积神经细胞存活数量约为 0.65 × 10⁵/mm³;NAD⁺ 组小鼠脑组织单位体积神经细胞存活数量约为 1.25 × 10⁵/mm³。

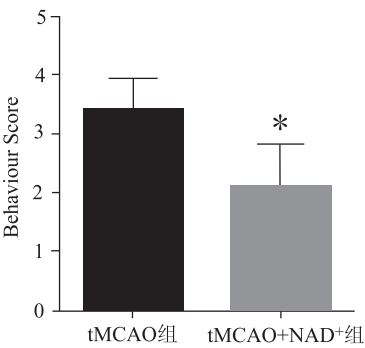


图 1 tMCAO 组和 tMCAO + NAD⁺ 神经损伤评分 按照 LONGA 法评分对小鼠神经损伤评分,tMCAO 组行为学得分 3.40 ± 0.24 (n = 8);tMCAO + NAD⁺ 组行为学得分 2.10 ± 0.33 (n = 8)

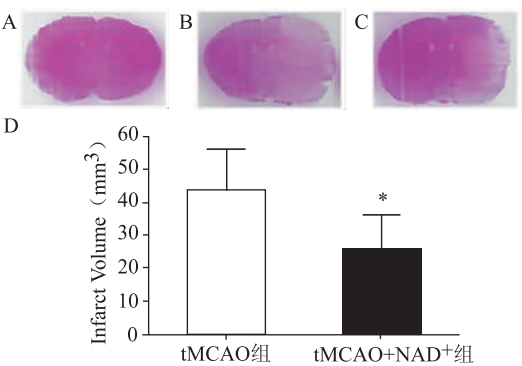


图 2 tMCAO 组和 tMCAO + NAD⁺ 组梗死体积 A: 正常组小鼠脑切片;B: tMCAO 组,着色淡;C: tMCAO + NAD⁺ 组,梗死组织明显减少;D: 数学模型计算出的 2 组的梗死体积;与 tMCAO + NAD⁺ 组比较,* P < 0.01

3. 尼氏小体:结果发现,tMCAO 小鼠梗死核心区尼氏小体急剧减少(图 2B,2b),在其半暗带区,尼氏小体数量较正常组显著减少(如图 2D,2d),表明蛋白合成能力下降,意味着神经细胞受到严重损伤。

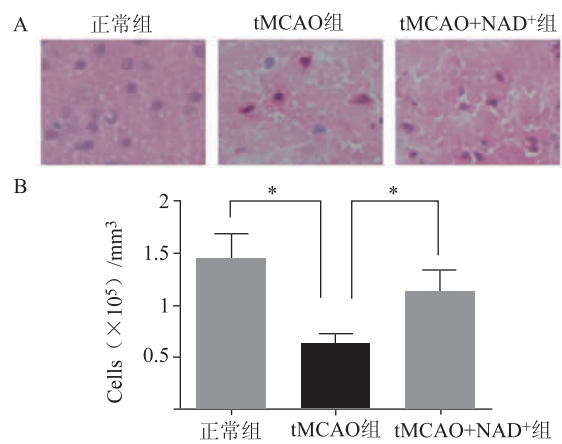


图 3 正常组、tMCAO 组和 tMCAO + NAD⁺ 组单位体积内神经细胞数量 A: 正常组小鼠脑切片神经细胞数量(HE 染色 × 40 倍);tMCAO 组单位体积内神经细胞数量明显减少(HE 染色 × 40 倍);tMCAO + NAD⁺ 组单位体积内神经细胞数量较 tMCAO 组明显增加(HE 染色 × 40 倍);B: 数学模型计算出的三组的神经细胞存活数量;与 tMCAO 组比较,* P < 0.01

我们进一步发现给药 NAD⁺, 梗死核心区细胞数高于 tMCAO 模型组,低于正常组(图 2C,2c),在半暗带区尼氏小体细胞数高于 tMCAO 组,低于正常组(图 2E,2e);结果提示,缺血再灌注损伤对神经细胞蛋白合成功能有严重影响,NAD⁺ 对蛋白功能损伤有保护效果。

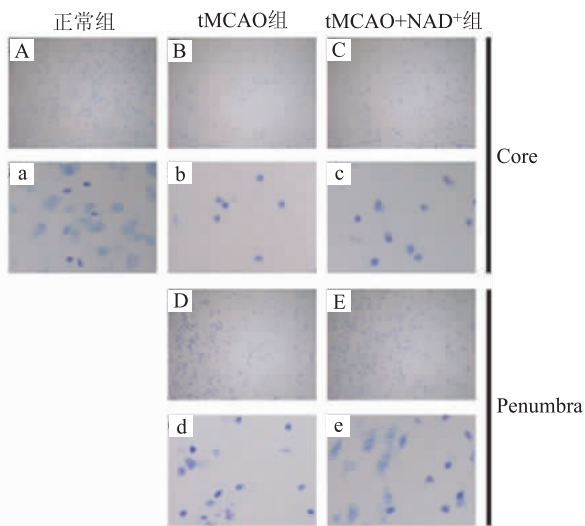


图 4 正常组、tMCAO 组和 tMCAO + NAD⁺ 组尼氏小体数目 A,B,C,D,E 为 5X 物镜,a,b,c,d,e 为 20X 物镜。A,a 为正常组,尼氏小体丰富;B,b 为 tMCAO 组缺血核心区,尼氏小体急剧减少;C,c 为 tMCAO + NAD⁺ 组缺血核心区,尼氏小体数目上调;D,d 为 tMCAO 组半暗带区域,靠近缺血侧尼氏小体数目减少;E,e 为 tMCAO + NAD⁺ 组半暗带区域,尼氏小体数目较 tMCAO 组回调

3 讨论

NAD⁺ 不仅是经典的能量代谢调控分子^[10-11],而且还参与介导细胞死亡和其他多种生物学过程,由于 NADH/NAD⁺ 是细胞还原势能的标识,因此它在细胞许多氧化还原反应中扮演重要的作用^[12]。有研究提示 NAD⁺ 对脑卒中后的脑损伤具有保护作用,也研究证明 NAD⁺ 能够减少氧化应激诱导的神经元和星形胶质细胞的死亡^[13-14]。有关脑缺血的动物模型研究发现在暂时性局部脑缺血的动物模型中通过鼻腔给予 NAD⁺ 能显著减少缺血性脑损伤;在缺血开始 2 h 后给予 NAD⁺ 能有效减小水肿形成,并且可以抑制脑缺血诱导的皮质和海马细胞自噬作用,从而可以减轻缺血性脑损伤^[15]。同时也有研究表明 NAD⁺ 能减少由于 DNA 烷化试剂、轴突损伤、OGD 和锌离子等刺激导致的神经细胞死亡^[14]。

本研究重点探讨 NAD⁺ 对成年雄性小鼠发生脑缺血再灌注后的脑保护作用。

通过选取易于麻醉和控制、脑血管解剖和生理机能和人类相似、实验重复性好的小鼠作为实验对象,建立小鼠短暂性局灶性脑缺血再灌注模型来探讨脑血管疾病的发病早期 NAD⁺ 对脑组织的保护作用。tMCAO 模型有不开颅、准确控制缺血和再灌注时间等优点,目前普遍认为是短暂性局灶性脑缺血再灌注模型的标准模型。

为了探讨 NAD⁺ 对 tMCAO 小鼠模型的脑保护作用,本研究采用观察神经损伤行为学评分、脑组织梗死体积、单位体积脑组织内神经细胞数量、尼氏染色后尼氏小体数量等评估不同处理小鼠的脑损伤程度。

本实验建立小鼠 tMCAO 模型,观察到缺血性脑卒中发生早期(48 h),与正常组比较,tMCAO 组小鼠出现严重的神经缺损症状,同时脑组织出现严重病理变化,脑梗死体积增大,单位体积脑组织内神经细胞数量减少,尼氏小体减少;tMCAO + NAD⁺ 组与 tMCAO 组比较,小鼠神经功能缺损程度明显减轻,梗死体积减小,单位体积脑组织内神经细胞数量增多,尼氏小体较多。这与其他关于 NAD⁺ 脑保护作用的研究结果^[15] 基本一致,也再次证明了 NAD⁺ 对缺血性脑损伤有保护作用。

脑缺血过程是一个复杂的病理过程,它会导致脑内发生多种变化,如氧化应激的产生、能量的耗竭、离子流的平衡被打破等。通常活性氧(ROS)和

自由离子的不平衡导致的氧化应激被认为是导致缺血性脑损伤的主要因素之一。在脑缺血再灌注过程中 ROS 可通过多个途径产生。NAD⁺ 不仅是经典的能量代谢调控分子^[10-11],还参与介导细胞死亡和其他多种生物学过程。研究表明细胞内 NAD⁺ 的剥夺可以介导 RARP-1 诱导的细胞死亡,NAD⁺ 的水平也影响细胞抗氧化能力和氧化应激的产生。由于 NADH/NAD⁺ 是细胞还原势能的标识,因此它在细胞许多氧化还原反应中扮演重要的作用^[12]。此外,NAD⁺ 可以通过丙酮酸脱氢酶来抑制 ROS 的产生。有研究证明 NAD⁺ 能够减少氧化应激诱导的神经元和星形胶质细胞的死亡^[13-14]。

本研究结果证明了 NAD⁺ 对缺血性脑损伤有保护作用。NAD⁺ 有可能成为治疗缺血性脑卒中的一个新靶点。今后需在 NAD⁺ 对缺血性脑损伤保护作用的具体机制研究方面进一步深入。

参 考 文 献

- [1] Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, et al. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2012, 43(1):86-91.
- [2] Whiteley W, Jackson C, Lewis S, et al. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6[J]. *PLoS Med*, 2009, 6(9): e1000145.
- [3] Ziegler M. New functions of a long-known molecule[J]. *Emerging roles of NAD in cellular signaling*. *Eur J Biochem*, 2000, 267(6):1550-1564.
- [4] Rutter J, Reick M, Wu LC, et al. Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors[J]. *Science*, 2001, 293(5529):510-514.
- [5] Imai SI. The NAD world: a new systemic regulatory network for metabolism and Aging-Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2009, 53(2): 65-74.
- [6] Wang JY, Dennert G. Regulation of cytotoxic T cells by ectonicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase [J]. *J Immunol*, 1994, 153(9):4048-4058.
- [7] Alano CC, Garnier P, Ying W, et al. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(8):2967-2978.
- [8] Liu D, Pitta M, Mattson MP. Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147:275-282.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.

老年 2 型糖尿病合并急性脑梗死患者血清 IGF-1 水平与神经功能及颈动脉斑块的关系

戢运建 况娥

【摘要】 目的 探讨老年 2 型糖尿病合并急性脑梗死患者血清胰岛素生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 水平与神经功能及颈动脉斑块的关系。**方法** 选择 2014 年 6 月~2015 年 10 月期间被我院神经内科收治的 60 例老年 2 型糖尿病并急性脑梗死患者为研究对象, 60 例老年 2 型糖尿病并急性脑梗死患者中, 按照动脉粥样硬化严重程度不同分为: 无斑块 10 例, 稳定斑块 22 例, 不稳定斑块 28 例。选择 40 例老年急性脑梗死患者作为疾病对照组; 选老年健康者 40 名为健康对照组。采用双抗夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA 法) 检测 IGF-1 水平。采用美国国立卫生院卒中量表 (NIHSS) 于发病 1 周、2 周时行神经功能评估; 采用改良 Rankin 量表 (MRS) 于 90 d 时行神经功能评估。**结果** 糖尿病合并脑梗死组 1 周、2 周时 IGF-1 水平均低于脑梗死组和对照组, 而脑梗死组 IGF-1 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。1 周、2 周时糖尿病合并脑梗死患者 NIHSS 评分均高于脑梗死组患者 ($P < 0.05$); 糖尿病合并脑梗死组患者 90 d MRS 评分高于脑梗死组患者 ($P < 0.05$)。1 周、2 周时糖尿病合并脑梗死患者血清 IGF-1 水平与 NIHSS 评分均呈负相关 ($r = -0.561, P = 0.006, r = -0.672, P = 0.000$); 1 周、2 周时糖尿病合并脑梗死患者血清 IGF-1 水平与 MRS 评分均呈负相关 ($r = -0.426, P = 0.016, r = -0.445, P = 0.009$)。随着糖尿病合并脑梗死患者颈动脉斑块严重程度的加重, 血清 IGF-1 水平呈下降趋势 ($P < 0.05$)。**结论** IGF-1 在老年 2 型糖尿病合并脑梗死患者外周血血清中呈现异常表达, IGF-1 水平与老年 2 型糖尿病合并脑梗死的神经功能缺损及颈动脉斑块严重程度密切相关。

【关键词】 2 型糖尿病 急性脑梗死 胰岛素生长因子-1 神经功能 颈动脉斑块

【中图分类号】 R743 R587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)05-0322-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.05.004

The relationship between the level of serum IGF-1 in elderly patients with type 2 diabetes mellitus combined with acute cerebral infarction and neurological function and carotid artery plaque Ji Yunjian, Kuang E. Department of Neurology, Fangxian People's Hospital of Shiyan City in Hubei Province, Shiyan 442100

【Abstract】 Objective To study relationship between the level of serum IGF-1 in elderly patients with type 2 diabetes mellitus combined with acute cerebral infarction, neurological function and carotid artery plaque. **Methods** 60 elderly patients with type 2 diabetes mellitus combined with acute cerebral infarction treated in our hospital were selected as the research object from June 2014 to October 2015. According to the severity of atherosclerosis, the patients were divided into three groups; 10 cases in no plaque group, 22 cases in

作者单位: 湖北省十堰市房县人民医院神经内科(戢运建), 重症监护室(况娥)

- [10] Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors[J]. Pharmacol Rev, 2002, 54(3): 375-429.
- [11] Ying W, Garnier P, Swanson RA. NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308: 809-813.
- [12] Starkov AA, Fiskum G, chinopoulos C, et al. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive Oxygen species[J]. J Neurosci, 2004, 24(36): 7779-7788.
- [13] Alano C, Ying W, Swanson RA. Polymerase-1-mediated cell

death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition[J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18895-18902.

- [14] Ying W, Wei G, Wang D, et al. Intranasal administration with NAD⁺ profoundly decreases brain injury in a rat model of transient focal ischemia[J]. Front Biosci, 2007, 12: 2728-2734.
- [15] Zheng C, Jin H, Xia WL, et al. Weihai Ying NAD⁺ administration decreases ischemic brain damage partially by blocking autophagy in a mouse model of brain ischemia[J]. Neurosci Lett, 2012, 512(2): 67-71.

(2016-03-01 收稿)