

# Exendin-4 对 MCAO 再灌注导致的脑缺血/ 再灌注损伤具有神经保护作用

王晗 雷占翔 郭虹敏

**【摘要】 目的** 探讨 GLP-1 受体激动剂 Exendin-4 腹腔给药对大脑中动脉闭塞(MCAO)再灌注所致大鼠脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用。**方法** SD 大鼠术前 1 h 腹腔注射 Exendin-4, MCAO 再灌注 24 h 后进行神经功能缺损评分, TTC 染色计算脑梗死体积, 免疫荧光观察神经元和小胶质细胞生存数量及检测凋亡通路相关蛋白的相对表达水平。**结果** Exendin-4 能够保护由于 MCAO 再灌注后所致的脑缺血再灌注损伤, 减少了脑梗死体积, 降低皮层凋亡蛋白的相对表达水平, 抑制神经元凋亡。**结论** Exendin-4 可以对 MCAO 再灌注所致脑缺血/再灌注损伤具有神经保护作用, 该作用是通过抑制凋亡蛋白的产生, 从而抑制细胞凋亡。

**【关键词】** Exendin-4 大脑中动脉闭塞再灌注 神经元 小胶质细胞 凋亡

**【中图分类号】** R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)05-0576-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.05.004

## Neuroprotective effect of Exendin-4 on cerebral ischemia / reperfusion injury induced by MCAO reperfusion

Wang Han\*, Lei Zhanxiang\*, Guo Hongmin. \* Department of Clinical Microbiology and Immunology, The 990<sup>th</sup> Hospital of PLA, Zhumadian Henan 463000

**【Abstract】 Objective** To investigate the neuroprotective effect of exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, on cerebral ischemia / reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) reperfusion in rats. **Methods** SD rats were given exendin-4 intraperitoneally 1h before operation, and MCAO reperfusion injury was operated. Neuroprotective effect was valued after 24h of reperfusion through neurologic deficit score, infarct size, survival count of neuron and microglial. Infarct size was counted by TCC staining. Survival count of neuron and microglial cells were analyzed by immunofluorescence and the expression levels of correlative protein about apoptosis pathway were tested by western blot. **Results** Exendin-4 could protect the cerebral ischemia / reperfusion injury caused by MCAO reperfusion, reduce the infarct volume and the expression levels of apoptosis protein in cortex, and inhibit neuron apoptosis. **Conclusion** Exendin-4 had neuroprotective effect on cerebral ischemia / reperfusion injury induced by MCAO reperfusion, which could inhibit neuron apoptosis by inhibiting the production of apoptotic protein.

**【Key words】** Exendin-4 MCAO reperfusion Neuron Microglial cell Apoptosis

缺血性脑卒中是由于脑血管堵塞引起的, 可导致死亡或残疾。缺血性脑卒中伴随着一系列分子变化如谷氨酸兴奋毒性、氧化应激、一氧化氮的产生等炎症反应<sup>[1]</sup>。在动物实验和细胞实验中很多神经保护剂都可以降低脑缺血带来的危害, 但是在临床上这些药物的效果很低<sup>[2]</sup>。胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一类胃肠道激素, 可以控制血糖, 促进胰岛  $\beta$  细胞增殖<sup>[3]</sup>。GLP-1 可以被神经细胞分泌, 同时 GLP-1 受体可以在大脑中表

达。GLP-1 受体激活可以发挥脑保护作用, 调节神经元的活性, 保护神经元不受损伤<sup>[4-5]</sup>, 因此 GLP-1 受体可以作为治疗脑损伤的有效治疗靶点。Exendin-4 就是其中 GLP-1R 的激动剂之一, 同时具有高于 GLP-1 的半衰期<sup>[6-7]</sup>, 所以本实验通过给予小鼠术前腹腔注射 Exendin-4 处理, 以观察其对于脑缺血再灌注损伤的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物及分组

250~280 g SD 大鼠购买于陆军军医大学动物中心, 合格证号: scxk(军)2012-0007。大鼠随机分为

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0888)

作者单位: 463000 解放军第九九〇医院检验病理科(王晗 雷占翔); 聊城市人民医院生殖医学科[郭虹敏(通信作者)]

Sham 组、MCAO(MCAO 再灌注)组和 MCAO + Exendin-4( $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组(术前 1 h 腹腔注射给药), Exendin-4 的给药水平根据以往文献报道使用<sup>[8]</sup>。

### 1.1.2 试剂

H-DMEM(HyClone, 美国), FBS(杭州四季青生物工程材料有限公司), 兔抗鼠单克隆抗体 caspase, Bax, Bcl-2, Iba1, NeuN(abcam, 英国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的构建

根据以往文献报道的 MCAO 再灌注大鼠模型构建方法构建动物模型<sup>[9]</sup>。腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 将大鼠固定在操作台上, 将颈总动脉、颈外和颈内动脉分离, 在颈外和颈内动脉分叉处插入尼龙包被的硅胶线以实现脑缺血, 2 h 后将线拔出, 血液回流以实现再灌注。

#### 1.2.2 神经功能缺损评分

根据贝德森评分标准进行神经功能缺损评分, MCAO 再灌注 24 h 后进行贝德森评分。0 分: 没有神经功能缺损症状; 1 分: 向对侧旋转; 2 分: 没有旋转并且降低向另一侧的推力; 3 分: 向受影响的一侧倒去; 4 分: 没有自发运动。

#### 1.2.3 TTC 染色

贝德森评分完成后取大鼠大脑,  $-20^{\circ}\text{C}$  速冻 30 min; 大脑组织随后以 2 mm 的宽度切片; 脑片在体积分数为 0.02 的 TTC 溶液中染色 30 min, 避光, 随后用 4%多聚甲醛室温固定 24 h。

#### 1.2.4 免疫荧光染色

贝德森评分完成后将大鼠大脑完整取出, 冰冻切片机制片, 贴片; 4%多聚甲醛固定, 通透, 加入血清封闭, 然后根据抗体的稀释倍数配制工作液,  $4^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, 清洗, 荧光二抗封闭, 清洗, 封片。

#### 1.2.5 Western blot

贝德森评分完成后取大鼠缺血半脑皮层, 剪碎, 加入含有 PMSF 和磷酸酶抑制剂的 RIPA, 裂解, 提取上清, BCA 蛋白定量, 制备样品。电泳电压 80 V, 转膜电压 100 V, 100 min; 剪膜; 封闭 2 h; 洗膜: 用清水将牛奶洗净; 孵育一抗: PBST 稀释一抗,  $4^{\circ}\text{C}$  一抗封闭 PVDF 膜过夜; 洗膜: 将 PVDF 膜从一抗中取出, PBST 洗 3 次/10 min; 孵育二抗: 将 PVDF 膜放入二抗中, 室温孵育 2 h; 洗膜: PBST 洗 3 次/10 min; 发光: 发光液的配置为 A、B 液等体积混匀, 化学发光仪检测 caspase3, Bax, Bcl-2 蛋白的相对表达水平。

### 1.2.6 统计学处理

采用 SPSS 软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 SNK- $q$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Exendin-4 预处理可以降低脑梗死体积和减轻神经功能损伤

Exendin-4 预处理的大鼠神经功能缺损评分较 MCAO 组低 ( $P < 0.05$ ); 同时 TTC 染色显示, 与 MCAO 组比较, Exendin-4 可以显著降低脑梗死体积(图 1)。

### 2.2 Exendin-4 提高小胶质细胞和神经元的存活数量

免疫荧光分别检测细胞凋亡和小胶质细胞、神经元的数量。MCAO 组的细胞凋亡数量显著高于 MCAO + Exendin-4 组和 Sham 组, 小胶质细胞和神经元的生存数量明显低于 MCAO + Exendin-4 组、Sham 组 ( $P < 0.05$ )(图 2)。

### 2.3 Exendin-4 通过抑制皮层凋亡蛋白的产生来减轻脑缺血再灌注损伤

Western blot 显示, 与 MCAO 组比较, MCAO + Exendin-4 组凋亡蛋白 caspase3 和 Bax 的相对表达水平显著降低 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 相对表达水平没有显著变化 ( $P > 0.05$ ), 且与 sham 组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )(图 3)。

## 3 讨论

临床上脑缺血再灌注损伤缺乏有效的干预手段, 本研究利用大鼠脑缺血再灌注模型发现 Exendin-4 可以有效地降低大鼠脑缺血再灌注损伤, 为有效和安全防治脑缺血再灌注损伤提供了实验依据。GPL-1 和 GPL-1 受体激动剂因其分子量小可以通过血脑屏障而发挥神经保护作用<sup>[10-11]</sup>, 脑缺血再灌注损伤有着复杂的分子级联反应发生, 这一过程中产生的氮和氧自由基可能与脑损伤有重要关系<sup>[12]</sup>。MCAO 再灌注后神经元、侵袭性中心粒细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞中 NADPH 氧化酶、一氧化氮合成酶的激活表达上升, 同时细胞间黏附分子 1 水平上调和产生活性氧。抑制活性氧的作用被认为是神经保护的重要方式<sup>[13]</sup>, 而 Exendin-4 可能在抑制活性氧的产生中发挥了重要作用。

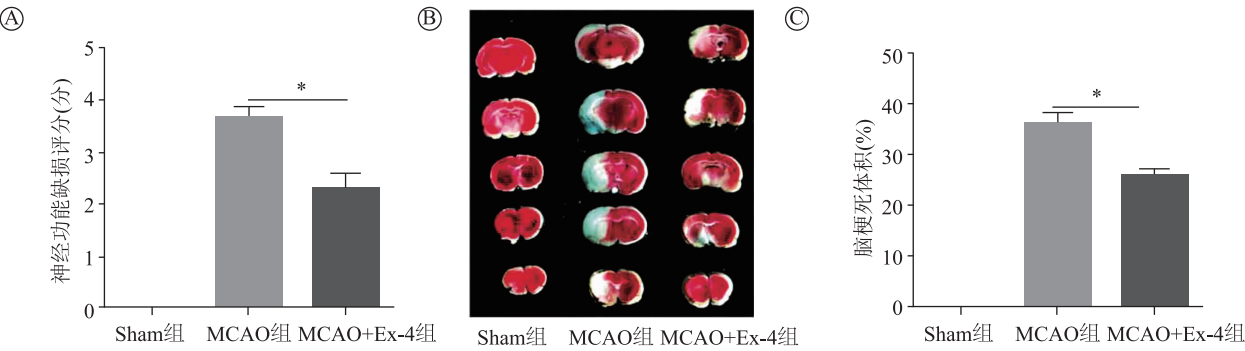


图 1 Exendin-1 预处理明显降低了 MCAO 再灌注后造成的神经功能损伤 A 为贝德森评分;B 为 TTC 染色;C 为脑梗死体积;两两比较, \*  $P<0.05$

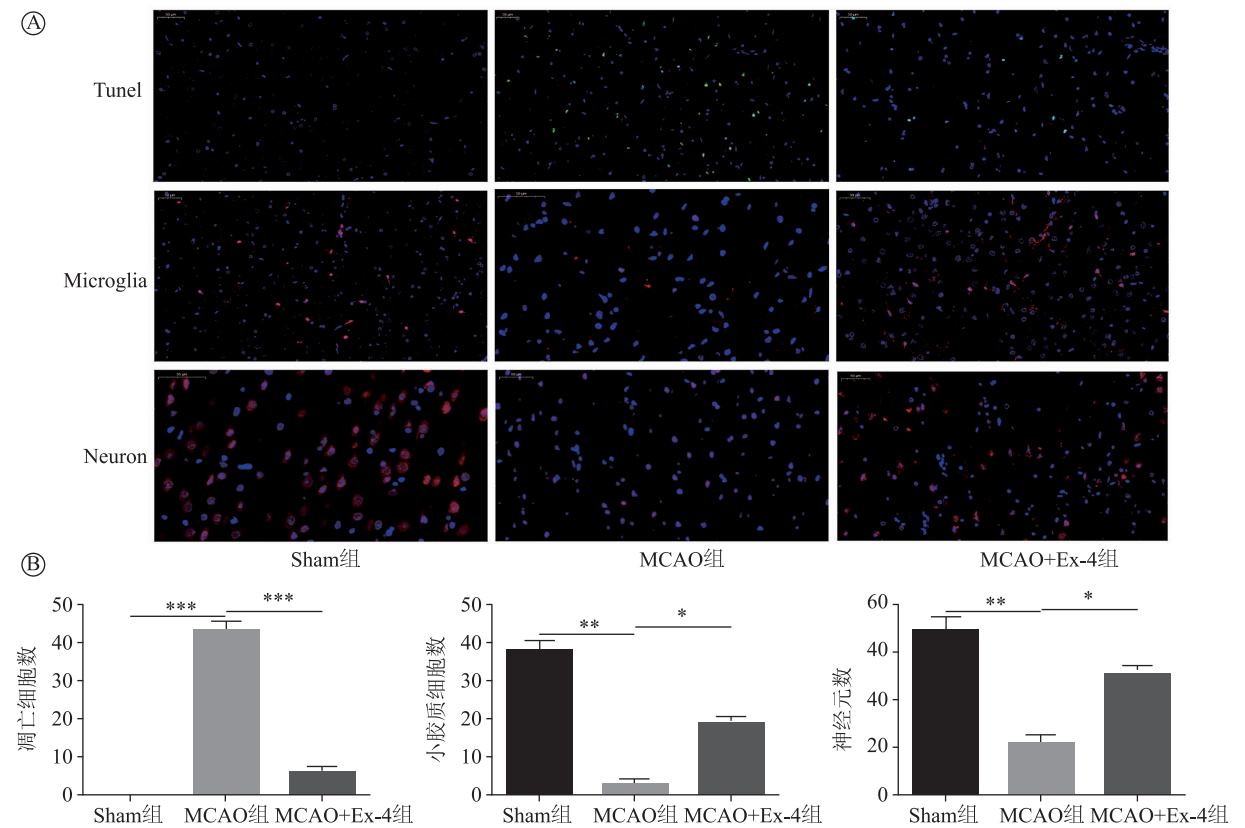


图 2 Exendin-4 对大鼠 MCAO 再灌注后细胞凋亡、小胶质细胞和神经元存活的影响 A 为凋亡细胞、小胶质细胞和神经元免疫荧光染色,小胶质细胞和神经元标记物为 Iba1 和 NeuN;B 为免疫荧光染色存活细胞数;两两比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

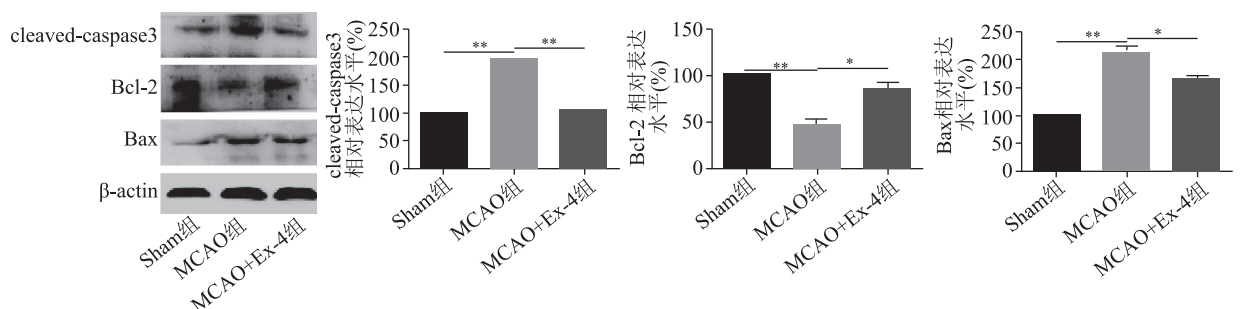


图 3 Exendin-4 对 MCAO 再灌注损伤组织中 caspase3, Bax, Bcl-2 相对表达水平的影响 两两比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

有研究发现 GLP-1 受体在大脑中表达,推测 GLP-1 可能具有脑保护作用。有报道称 GLP-1 可以降低由于兴奋性中毒导致的细胞损伤<sup>[14-15]</sup>,但是过短的半衰期限制了 GLP-1 在临床中的应用。有文献报道 GLP-1 模拟物 Lir 能够在 MCAO 再灌注后促进神经元的存活和减轻丙二醛的氧化压力,抑制凋亡<sup>[16]</sup>。Exendin-4 是临床中使用的用于代替 GLP-1 发挥降低血糖作用的药物<sup>[17]</sup>。本研究通过给予大鼠 Exendin-4 预处理,观察 MCAO 再灌注后是否可以保护由于缺血再灌注引起的大脑损伤,结果显示 Exendin-4 能够显著地降低神经功能缺损评分,并且降低脑缺血体积,提示 Exendin-4 具有保护脑缺血再灌注损伤的作用。同时,Exendin-4 可以有效地降低凋亡的细胞数量,增加神经元和小胶质细胞的数量,提示 Exendin-4 可能通过提高小胶质细胞和神经元的活性来保护脑缺血再灌注损伤。本研究结果显示,Exendin-4 抑制细胞凋亡通路的激活,降低凋亡相关蛋白的相对表达水平,其原因可能是 Exendin-4 能够上调 cAMP 和其反应元件结合蛋白磷酸化<sup>[13]</sup>,进一步引起 Bcl-2 表达上调而抑制细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>,从而发挥脑保护的作用;另一方面,Exendin-4 可能影响了血脑屏障,上调水通道蛋白 4 水平<sup>[20]</sup>以及小胶质细胞的极化特性而发挥神经保护作用,这仍需进一步研究证实。

### 参 考 文 献

- [1] Hao L,Zou Z,Tian H, et al. Stem cell-based therapies for ischemic stroke[OL]. Biomed Res Int, 2014. doi: 10.1155/2014/468748.
- [2] Wang J,Huang Q,Ding J, et al. Elevated serum levels of brain-derived neurotrophic factor and miR-124 in acute ischemic stroke patients and the molecular mechanism[J]. 3 Biotech, 2019,9(11):386.
- [3] Khatri R, McKinney AM, Swenson BA. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke[J]. Neurology, 2012,79(13, 1):S52-S57.
- [4] Zhang H,Meng J,Li X, et al. Pro-GLP-1, a pro-drug of GLP-1, is neuroprotective in cerebral ischemia[J]. Eur J Pharm Sci, 2015,5(70):82-91.
- [5] Teramoto S,Miyamoto N,Yatomi KA, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2011,31(8):1696-1705.
- [6] Deacon CF,Pridal L,Klarskov L, et al. Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig[J]. Am J Physiol, 1996,271(3):458-464.
- [7] Nielsen LL,Young AA,Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes[J]. Regul Pept, 2004,117(2):77-88.
- [8] Ma X,Meng J,Jia M, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats[J]. J Bone Miner Res, 2013,28(7):1641-1652.
- [9] McBride DW,Zhang JH. Precision stroke animal models: the permanent MCAO model should be the primary model, not transient MCAO[OL]. Transl Stroke Res[Z], 2017.
- [10] Bertilsson G,Patrone C,Zachrisson OA, et al. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease[J]. J Neurosci Res, 2008,86(2):326-338.
- [11] Harkavyi A,Abuirmeileh A,Lever R, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease[J]. J Neuroinflammation, 2008,doi:10.1186/1742-2094-5-19.
- [12] Love S. Oxidative stress in brain ischemia[J]. Brain Pathol, 1999,9(1):119-131.
- [13] Han L,Yu Y,Sun X, et al. Exendin-4 directly improves endothelial dysfunction in isolated aortas from obese rats through the cAMP or AMPK-eNOS pathways[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012,97(3):453-460.
- [14] Liebner S,Corada M,Bangsow T, et al. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier[J]. J Cell Biol, 2008,183(3):409-417.
- [15] Moghaddam HK, Baluchnejadmojarad T, Roghani M, et al. Berberine ameliorate oxidative stress and astrogliosis in the hippocampus of STZ-induced diabetic rats[J]. Mol Neurobiol, 2014,49(2):820-826.
- [16] Briyal S SS. Ischemia Effects of Liraglutide in the Rat Brain Following Focal Cerebral Anti-apoptotic. Neuroscience [Z], 2014.
- [17] Guyton J,Jeon M,Brooks A. Glucagon-like peptide 1 receptor agonists in type 1 diabetes mellitus[J]. Am J Health Syst Pharm, 2019,76(21):1739-1748.
- [18] Meller R,Minami M,Cameron JA, et al. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005,25(2):234-246.
- [19] Hockenbery DM,Oltvai ZN,Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis[J]. Cell, 1993,75(2):241-251.
- [20] Chien CT,Ming JJ,Ye T, et al. Exendin-4-loaded PLGA microspheres relieve cerebral ischemia/reperfusion injury and neurologic deficits through long-lasting bioactivity-mediated phosphorylated Akt/eNOS signaling in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015,35(11):1790-1803.

(2019-12-25 收稿)