

半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过下调自噬减轻长爪沙鼠的全脑缺血再灌注损伤

石巧娟¹, 郭红刚¹, 楼琦¹, 卢领群¹, 潘若真¹, 应华忠¹, 周文伟¹, 褚晓峰^{2*}

(1. 浙江省医学科学院实验动物中心, 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 浙江 杭州 310013;

2. 浙江省医学科学院, 浙江省实验动物公共服务平台, 杭州 310013)

【摘要】 目的 探讨半胱氨酰白三烯受体拮抗剂(普鲁司特、HAMI 3379)对长爪沙鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 采用结扎双侧颈总动脉缺血10 min再灌注24 h,建立长爪沙鼠全脑缺血再灌注损伤模型,随机分为假手术组、模型组、普鲁司特、HAMI 3379组,每组20只,术前3 d开始腹腔注射给药,1次/日,术前30 min给药1次。观察再灌注24 h神经症状及功能;尼氏染色法观察皮层及海马区神经元;免疫印迹法检测皮层、海马中自噬相关蛋白 beclin-1 及 LC3 的表达情况;电镜观察海马区自噬小体。结果与模型组比较,普鲁司特、HAMI 3379组可提高神经症状评分,减少神经功能损伤,减轻皮层及海马区神经元损伤及丢失,减少自噬相关蛋白 beclin-1 及 LC3 的表达及海马区自噬小体的数量。**结论** 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过下调大脑皮层、海马区的自噬减轻长爪沙鼠全脑缺血再灌注损伤。

【关键词】 长爪沙鼠;全脑缺血;普鲁司特;HAMI 3379;自噬

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0057-09

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.009

Cysteinyl leukotriene receptor antagonist alleviates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils through down-regulating autophagy

SHI Qiaojuan¹, GUO Honggang¹, LOU Qi¹, LU Lingqun¹, PAN Ruozhen¹,
YING Huazhong¹, ZHOU Wenwei¹, CHU Xiaofeng^{2*}

(1. Zhejiang Academy of Medical Sciences Center of Laboratory Animals, Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Research of Zhejiang Province, Zhejiang Hangzhou 310013, China. 2. Zhejiang Academy Medical Sciences, Zhejiang Public Service Platform for Laboratory Animals, Zhejiang Hangzhou 310013)

Corresponding author: CHU Xiaofeng. E-mail: sydw@zjinfo.gov.cn

【Abstract】 Objective Cysteinyl leukotrienes are potent inflammatory mediators. Their actions are mediated by specific receptors, the CysLT receptors (CysLT₁R and CysLT₂R), which have been cloned and characterized. In this study, we investigated the protective effects of the CysLTR antagonist Pranlukast and HAMI 3379 on global cerebral ischemia/reperfusion (CI/R) injury in gerbils and its underlying mechanisms. **Methods** The gerbil model of CI/R was established by bilateral common carotid artery occlusion for 10 min followed by 24 h reperfusion. Then the animals were equally randomized into four groups: sham, model, Pranlukast (0.1 mg/kg) and HAMI 3379 (0.1 mg/kg) groups. The later two

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(No. 2015BAI09B01-02);国家自然科学基金项目(No. 31301933, No. 81401566);浙江省医药卫生计划项目(No. 201477310);省科技计划项目(No. 2014C37011)。

Funded by State Supporting Technology Project (2015BAI09B01-02); National Natural Science Foundation of China (No. 31301933, No. 81401566); Supported by Scientific Research Foundation of Zhejiang Province, China (No. 2014C37011); Medical Scientific Research Foundation of Zhejiang Province, China (No. 201477310).

【作者简介】 石巧娟(1979-),女,副研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: shiqiaojuan@163.com

【通信作者】 褚晓峰(1968-),男,副研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: sydw@zjinfo.gov.cn

groups were treated with intraperitoneal injection of Pranlukast and HAMI 3379, respectively, once daily for 4 days before carotid artery occlusion, while the former two groups with saline only, all at 10 mL/kg. After 24 h reperfusion, neurological deficit scores were observed and the behavioral dysfunction was assessed. The neuron morphology of cerebral cortex and CA1 subregion of hippocampus were observed in brain sections stained with cresyl violet. The expression of autophagy-related proteins beclin-1 and LC3 in the homogenate of cerebral cortex and hippocampus were determined using western blotting analysis. The ultrastructure of autophagosomes in the CA1 subregion of hippocampus was observed by electron microscopy.

Results Compared with the model group, Pranlukast and HAMI 3379 attenuated neurological deficits, improved the behavioral dysfunction, inhibited the neuron injury and loss, decreased the expression of autophagy-related protein beclin-1 and LC3 and the number of autophagosomes. **Conclusions** cysteinyl Leukotriene receptor antagonist Pranlukast and HAMI 3379 can alleviate global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. The protective effects of Pranlukast and HAMI 3379 appear to be associated with the inhibition of autophagy.

【Key words】 gerbil; global cerebral ischemia; reperfusion injury; pranlukast; HAMI 3379; autophagy

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

心跳骤停、肺栓塞、溺水等都可引起全脑缺血,产生缺血缺氧性脑损害,也是致死致残的原因之一。但是,迄今仍缺乏有效的防治措施,寻找适合的神经保护药物,依然是当今的研究热点。

脑缺血后继发的炎症是产生脑损伤的主要因素之一,受许多炎症因子及介质的调节。半胱氨酰白三烯(cysteinyl leukotrienes, CysLTs, 含 LTD₄, LTC₄, LTE₄)是一类重要的炎症介质,在脑缺血损伤中起重要作用。CysLTs 是花生四烯酸的 5-脂氧酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)途径代谢产物, CysLTs 通过激活半胱氨酰白三烯受体(cysteinyl leukotriene receptor, CysLTR)起作用。目前,主要有两种 CysLTR(即 CysLT₁R 和 CysLT₂R)。CysLT₁R 有较多选择性拮抗剂,其中普鲁司特(Pranlukast)和孟鲁司特已用于呼吸系统疾病^[1]。CysLT₂R 选择性拮抗剂的代表为 HAMI 3379^[2-3]。已有研究表明 CysLT₁R 拮抗剂普鲁司特,孟鲁司特对大、小鼠全脑或局灶性脑缺血的急性和亚急性/慢性损伤均具有保护作用^[4-8]。CysLT₂R 拮抗剂 HAMI 3379 对大鼠局灶性脑缺血的急性损伤也具有保护作用^[9]。但 CysLTR 拮抗剂对全脑缺血再灌注损伤是否仍具有作用尚未见报道。本研究应用长爪沙鼠全脑缺血再灌注损伤模型,从对自噬的调节出发,探讨半胱氨酰白三烯受体拮抗剂(普鲁司特、HAMI 3379)对全脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级雄性长爪沙鼠,45~65 g,80 只,由浙江省医学科学院实验动物中心【SCXK(浙)2014-

0001】提供,实验在浙江省医学科学院实验动物中心的屏障完成【SYXK(浙)2014-0008】。所有操作均符合实验动物伦理学要求【伦理审批号:(2015)动伦审研第(06)号】。

1.1.2 药品和试剂

HAMI 3379 购自美国 Cayman Chemical 公司;普鲁司特为 Dr. Tsuboshima Masami 赠送;LC3-I/II, Beclin-1 抗体购自北京博奥森,小鼠抗 actin 单克隆抗体及总蛋白提取液购自上海康成。抗兔 IRdye700 及抗鼠 IRdye800 荧光二抗购自 Rockland 公司;甲酚紫(cresyl violet)购于 Sigma 公司;乙酸、戊二醛等均为市售分析纯产品。

1.1.3 仪器

激光多普勒血流仪(moorVMS-LDF2, 美国 Moor 公司);Leica CM 1900 型冰冻切片机(德国莱卡公司);立体定位仪(美国 Stoeling 公司);电泳转膜装置(美国 Bio-Rad 公司);免疫印迹膜荧光成像系统(美国 LICOR Biosciences 公司);荧光显微镜 Olympus BX51 型(日本 Olympus 公司)。手术器械购自华东医药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药

取长爪沙鼠 80 只,随机分为假手术组、模型组、普鲁司特(0.1 mg/kg)、HAMI 3379 组(0.1 mg/kg),每组 20 只,术前 3 d 开始腹腔注射给药,1 次/日,术前 30 min 给药 1 次。假手术组和模型组给予等体积的生理盐水。每组 1 或 2 只动物取脑固定用于病理观察,另 1/2 动物取脑 -80℃ 冻存,用于免疫印迹检测。

1.2.2 全脑缺血再灌注模型制备

长爪沙鼠麻醉后,暴露双侧颈总动脉并用微动

脉夹夹闭,10 min 后松开夹子,恢复供血,制备全脑缺血再灌注 24 h 损伤模型。假手术组除不夹闭动脉外,其余操作同上。术中用激光多普勒血流监测仪记录大脑皮层血流。

1.2.3 局部脑血流监测

长爪沙鼠称重,麻醉后头部剃毛,用立体定位仪头位固定。消毒后作正中矢状切口,暴露前囟。以前囟为原点,在前囟后 1.5 mm,中线左旁开 2.0 mm 处固定直径 0.5 mm 光纤^[10]。将动物翻转,背位固定,连接光纤与激光多普勒血流仪,记录大脑皮层血流。以缺血前的血流平均值作为脑血流基准值(100%),血流下降率达到 80% 的动物并同时观察到以下现象的动物列为成功模型:即缺血后发生呼吸急促、瞳孔散大,动脉夹松开后,10 min 内脑血流恢复至基础血流量,呼吸频率规律和瞳孔缩小。

1.2.4 神经症状评分

术后 24 h 观察长爪沙鼠的神经症状,按五个等级评分:0,无症状;1,背部弓起;2,强直性癫痫发作;3,上睑下垂;4,无意识。

1.2.5 长爪沙鼠神经功能评价

神经行为学评分于再灌注 24 h 按以下方法进行^[6]。首先,平衡木测试,将长爪沙鼠置于直径为 2.0 cm 的平衡木上,记录动物保持平衡的时间,时间 ≥ 30 s,记为 3 分;其次,抓握牵引测试,将动物置于直径为 1.0 cm 的悬空尼龙绳上,记录动物的停留时间,时间 ≥ 5 s,记为 3 分。最后,网格测试,将长爪沙鼠置于 1 个面积为 20 cm $\times$ 40 cm 网格板上(网格尺寸 0.5 cm $\times$ 0.5 cm),记录平板从水平转为垂直过程中动物在网格的停留时间,时间 ≥ 15 s,记为 3 分。取 3 项测试计分之和。

1.2.6 脑片尼氏染色

长爪沙鼠麻醉后打开胸腔,用预冷生理盐水和 4% 多聚甲醛依次经心脏灌流固定后,取脑,置于 4% 多聚甲醛过夜,30% 蔗糖脱水,冰冻切片,用于脑片尼氏染色,观察神经元的数量及形态。

10 μ m 冰冻切片,室温晾干,依次浸于丙酮-氯仿溶液(1:1)15 min,100%、95%、70% 乙醇 10 min,水洗后,于 cresyl violet 染色 2~5 min,70% 乙醇分化 60 s,95%、100% 乙醇序贯脱水,二甲苯透明,封片,显微镜下观察、拍照、计数、分析皮层区和海马区的神经元密度。

1.2.7 免疫印迹及电镜样本的制备

全脑缺血再灌注 24 h 后,长爪沙鼠冷生理盐水

灌注后取脑,冰上分离皮层与海马。其中 1/3 海马组织用戊二醛固定,电镜下观察海马神经元自噬小体,每张切片随机选取 10 个神经元,每个神经元随机选取 3 个视野拍照计数,分析。剩余组织液氮冻存后,-80℃ 冰箱保存备用。

1.2.8 LC3-I/II 和 Beclin 蛋白检测

用免疫印迹法检测 LC3-I/II 和 beclin 的表达。皮层及海马蛋白按说明书提取定量。取蛋白电泳,一抗为兔抗 LC3-I/II(1:200),beclin(1:250)多克隆抗体及内参 actin(1:5000),室温孵育 2 h,抗兔/抗鼠荧光二抗(1:5000)室温孵育 2 h。电泳膜在免疫印迹膜荧光成像系统荧光扫描,计算分析与内参的比值。

1.3 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 9.0 for Windows 统计软件包,以 One way ANOVA 进行组间比较;神经症状评分结果用非参数 Mann-Whitney U test 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑血流监测

长爪沙鼠全脑缺血过程中,如方法中所述,脑血流下降率及临床现象相结合的标准筛选模型,分析数据。本实验全脑缺血长爪沙鼠淘汰率约为 26.7%(16/60)。全脑缺血过程中脑血流监测记录如图 1。

2.2 对全脑缺血复灌损伤神经症状及功能的影响

假手术组长爪沙鼠术后 24 h 内无明显神经症状;模型组动物,神经症状评分值明显升高,4/5 动物发生癫痫,部分伴有上睑下垂。与模型组比较,普鲁司特和 HAMI 3379 可减少神经症状评分(图 2-A)。在神经功能评分上,模型组神经功能评分明显降低,而普鲁司特和 HAMI 3379 可提高评分值,改善神经功能损伤(图 2-B)。

2.3 对全脑缺血复灌损伤海马 CA1 区、皮层神经元的影响

脑切片尼氏染色显示,假手术组海马神经元形态完整,细胞大而圆,尼氏小体位于胞质,深染;模型组海马神经元排列紊乱,胞体缩小、变形,核固缩,部分细胞变性死亡,细胞数量明显减少;普鲁司特和 HAMI 3379 组海马神经元较模型组形态完整,排列较整齐,细胞大而圆,抑制了神经元死亡,锥体细胞的丢失减少(图 3)。

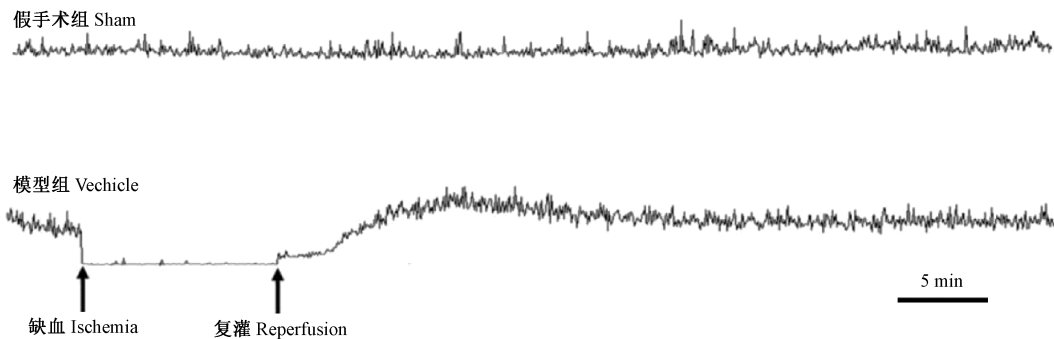
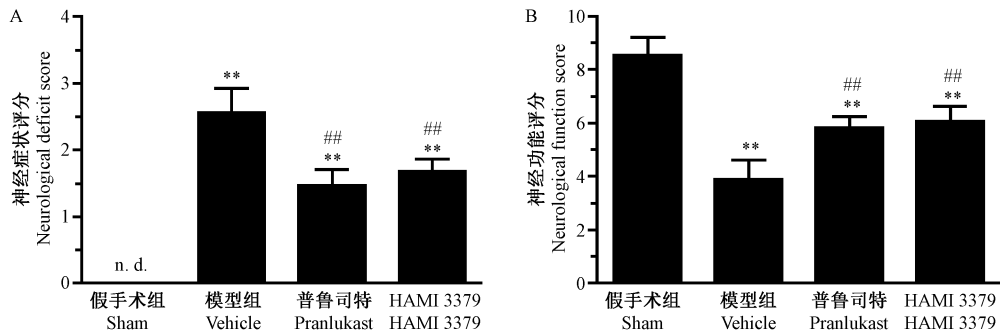


图 1 长爪沙鼠全脑缺血过程中脑血流监测记录

Fig. 1 A record of regional cerebral blood flow (rCBF) during global cerebral ischemia and reperfusion in a gerbil



注: * $P < 0.05$ vs. Sham 组; ** $P < 0.01$ vs. Sham 组; ## $P < 0.01$ vs. Vehicle 组 ($n = 6 \sim 10$)。(下同)

图 2 普鲁司特与 HAMI 3379 对长爪沙鼠全脑缺血 10 min 复灌 24 h 神经症状及神经功能评分的影响

Note. * $P < 0.05$ vs. the sham group, ** $P < 0.01$ vs. the sham group, ## $P < 0.01$ vs. the vehicle group ($n = 6 \sim 10$). The same in the following figures.

Fig. 2 Effects of pranlukast and HAMI 3379 on neurological deficit score and neurological dysfunction at 24 h after global cerebral ischemia and reperfusion in the gerbils

普鲁司特与 HAMI 3379 对皮层神经元同样具有保护作用。模型组皮层神经元尼氏小体减少,胞体固缩并且染色加深,普鲁司特与 HAMI 3379 可显著改善皮层神经元损伤,增加神经元数量(图 4)。

2.4 对全脑缺血复灌后海马 CA1 区自噬的影响

通过电镜观察到自噬小体,即泡状双层结构,是检测自噬发生的金标准。结果表明,与假手术组比较,模型组海马 CA1 区自噬小体明显增多 ($P < 0.01$),普鲁司特与 HAMI3379 可减少该区域自噬的发生,与模型组比较差异具有显著性(图 5)。

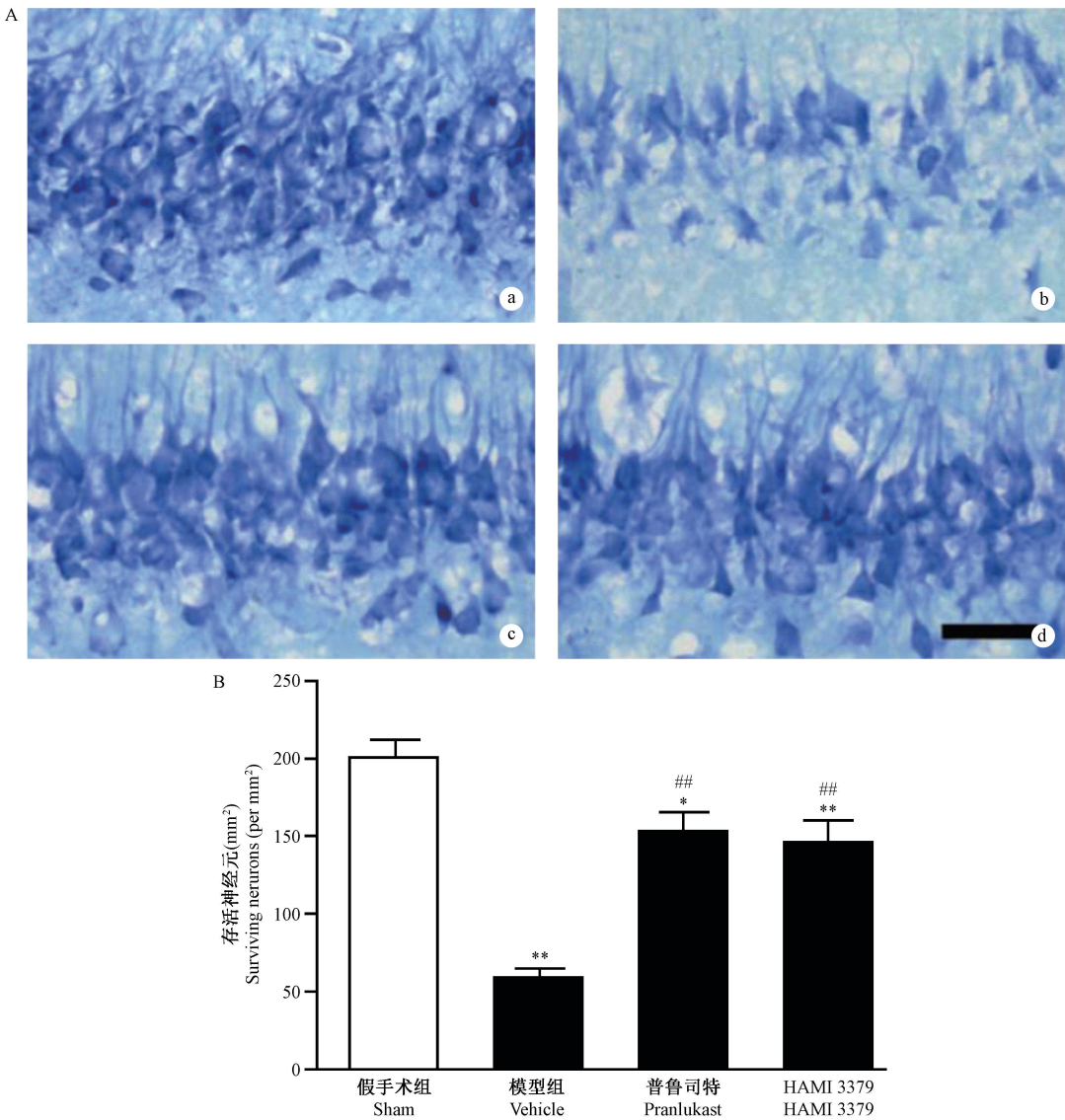
2.5 普鲁司特与 HAMI 3379 对全脑缺血复灌后自噬有关蛋白的影响

本研究用免疫印迹法检测皮层及海马自噬相关蛋白 Beclin-1, LC3II/I 的表达。结果表明,与假手术组比较,模型组 Beclin-1 蛋白上调(图 6),LC3 的活化增强(LC3II/I 比值增高, $P < 0.01$,图 7),普鲁司特与 HAMI 3379 可抑制 Beclin-1 蛋白上调,及 LC3 的活化,与模型组比较差异具有显著性。因此普鲁司

特与 HAMI 3379 可减少长爪沙鼠全脑缺血复灌后脑组织的自噬。

3 讨论

长爪沙鼠由于其脑底动脉 Willis 环缺失,被普遍认为是研究全脑缺血的理想模型^[11-12]。尽管如此,由于脑底动脉 Willis 环缺失类型多变,故仅有 30%~40% 的动物结扎颈总动脉后出现典型脑缺血症状,成为可用的脑缺血动物模型^[13-15]。为克服该难点,本研究将脑血流及临床症状相结合的办法对模型进行筛选。即在长爪沙鼠全脑缺血手术过程中用血流仪监测大脑血流的变化,双侧颈总动脉结扎后血流下降率大于 80% 的动物列为缺血成功模型,该标准亦国际公认^[13-15]。图 1 即为长爪沙鼠全脑缺血再灌注过程中脑血流监测图,图中可看出该动物双侧颈总动脉结扎可以降低脑部 80% 以上的供血,达到脑缺血要求,并且复灌初期显示缺血/复灌损伤中较为典型的高灌注和滞后灌注减少症状,进一步从血流



注:A. 缺血 10 min 复灌 24 h 后海马 CA1 区尼氏染色结果;a 为 Sham 组,b 为 vehicle 组(即模型组),c 为 Pranlukast 组,d 为 HAMI 3379 组。bar = 50 μ m。B. 全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后海马 CA1 区神经元数量统计结果(个/mm²)。

图 3 普鲁司特和 HAMI 3379 抑制长爪沙鼠全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后海马 CA1 区的神经元丢失

Note. A. Cresyl violet staining show the changes of neuronal density in the CA1 subregion of hippocampus. a: Sham group, b: Vehicle group, c: Pranlukast group, d: HAMI 3379 group. Scale bar = 50 μ m. B. Number of neurons in the CA1 subregion of hippocampus.

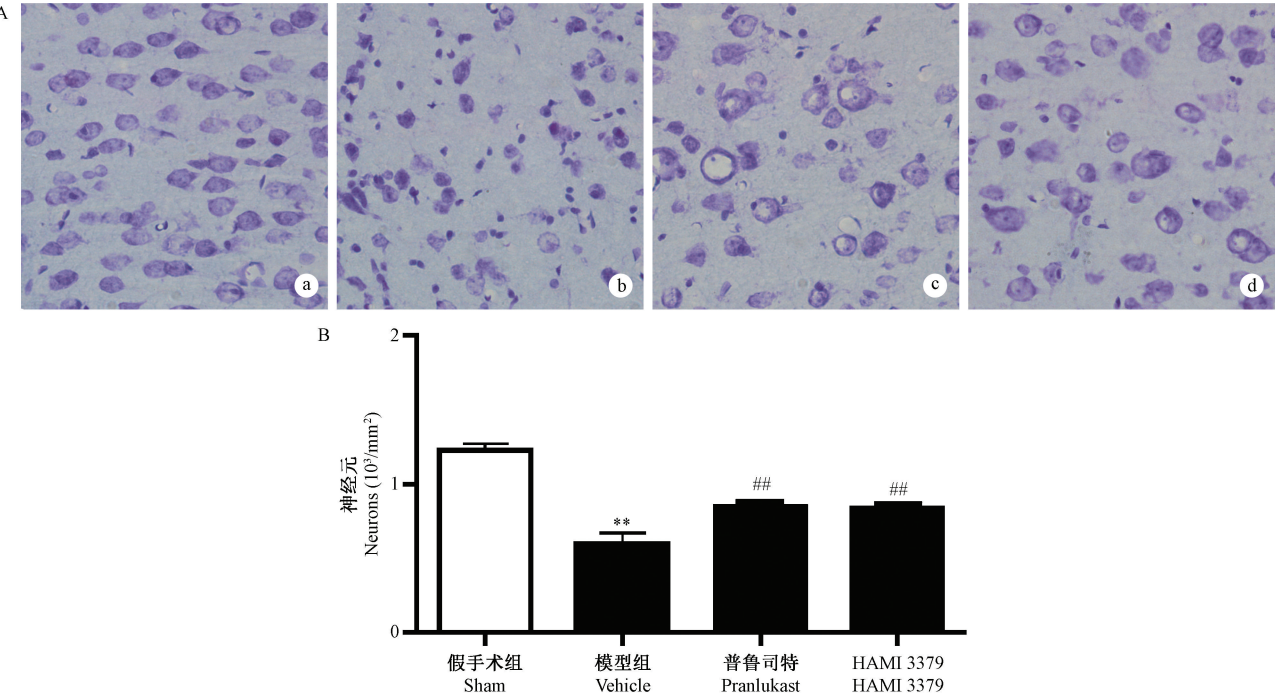
Fig.3 Pranlukast and HAMI 3379 reduce the neuron loss in CA1 subregion of hippocampus at 24 h after global cerebral ischemia and reperfusion in the gerbils

动力学角度证明了该模型的可行性。另全脑缺血后,动物出现呼吸加深加快,肢体痉挛的症状,该现象结合脑血流监测数据,作为动物淘汰依据。

脑缺血后的炎症变化是脑损伤的重要基础之一。CysLTs 是一类重要的炎症介质,在脑损伤疾病中通过 CysLTR 发挥重要作用^[1]。CysLTs 是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)的 5-LOX 途径代谢产物。当细胞膜受到刺激时,胞内磷脂酶 A (cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂) 活化,裂解膜

磷脂生成 AA,随着细胞的激活,5-LOX 移位到核膜上与 5-LOX 激活蛋白(FLAP)结合,促进 AA 逐步转变为 LTC₄、LTD₄ 和 LTE₄,该类物质统称为 CysLTs(图 1)^[16]。

本课题组亦证明 CysLTs 参与脑缺血损伤过程,CysLTR 拮抗剂亦可保护神经元,但该拮抗剂对全脑缺血后的损伤是否仍有保护作用,具体作用机制等都有待于深入研究。1999 年,Rao AM 等^[17]报道,长爪沙鼠全脑缺血后,CysLTs 增加,其合成酶 5-

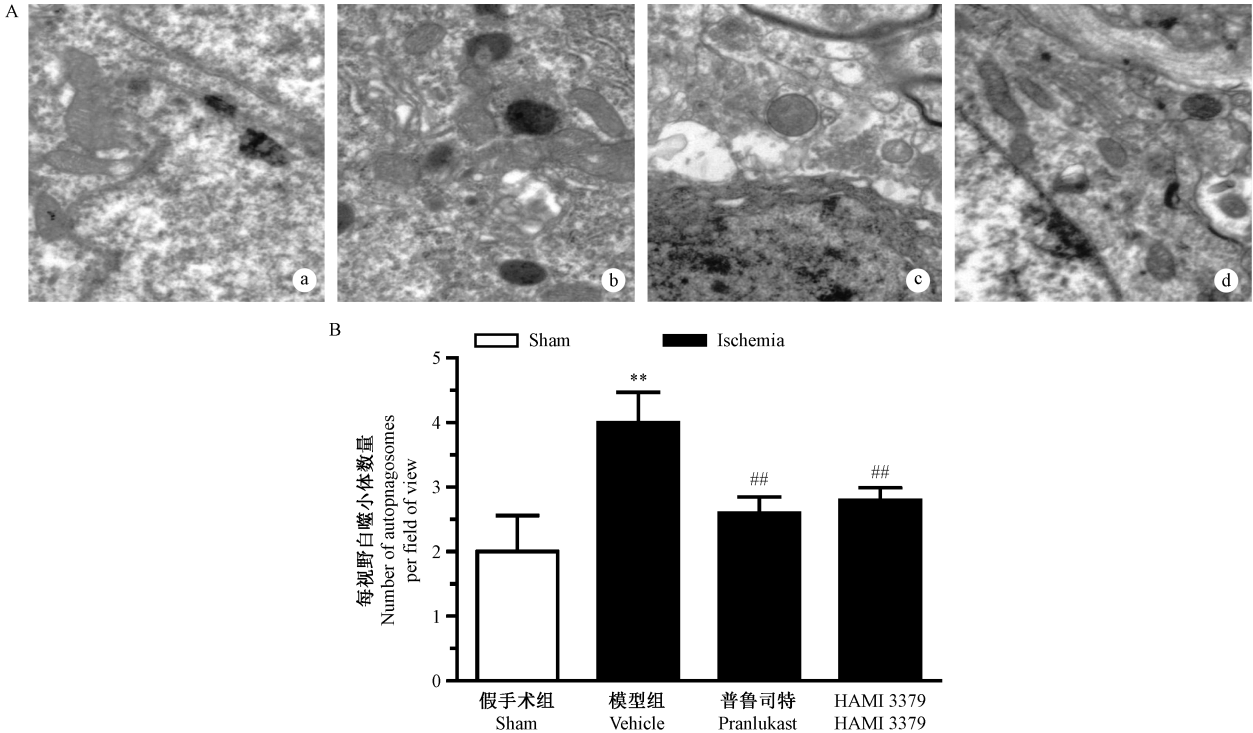


注:A. 缺血 10 min 复灌 24 h 后 大脑皮层区尼氏染色结果;a 为 Sham 组,b 为 Vehicle 组(即模型组),c 为 Pranlukast 组,d 为 HAMI 3379 组。标志:50 μm 。B. 全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后皮层区神经元数量统计结果(个/ mm^2)。

图 4 普鲁司特和 HAMI 3379 抑制长爪沙鼠全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后皮层神经元丢失

Note. A. Cresyl violet staining show the changes of the neuronal density in cortex. a: Sham group,b: Vehicle group,c: Pranlukast group,d: HAMI 3379 group. Scale bars = 50 μm . B. Number of neurons in the cortex.

Fig. 4 Pranlukast and HAMI3379 reduce the cerebral cortex neuron loss at 24 h after global cerebral ischemia and reperfusion in gerbils



注:A. 缺血 10 min 复灌 24 h 后 海马 CA1 区电镜结果;a 为 Sham 组,b 为 Vehicle 组(即模型组),c 为 Pranlukast 组,d 为 HAMI 3379 组。放大倍数:10 $\times$ 5000。B. 全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后海马 CA1 区自噬小体数量统计结果(个/视野)。

图 5 普鲁司特与 HAMI 3379 减少长爪沙鼠全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后海马 CA1 区的自噬

Note. (A) Ultrastructural micrograph shows autophagosomes in the CA1 subregion of hippocampus. a: Sham group,b: Vehicle group,c: Pranlukast group,d: HAMI 3379 group. Magnification: 10 $\times$ 5000. (B) Number of autophagosomes in the CA1 subregion of hippocampus.

Fig. 5 Pranlukast and HAMI 3379 reduce the number of autophagosomes in the CA1 subregion of hippocampus at 24 h after global cerebral ischemia and reperfusion in the gerbils

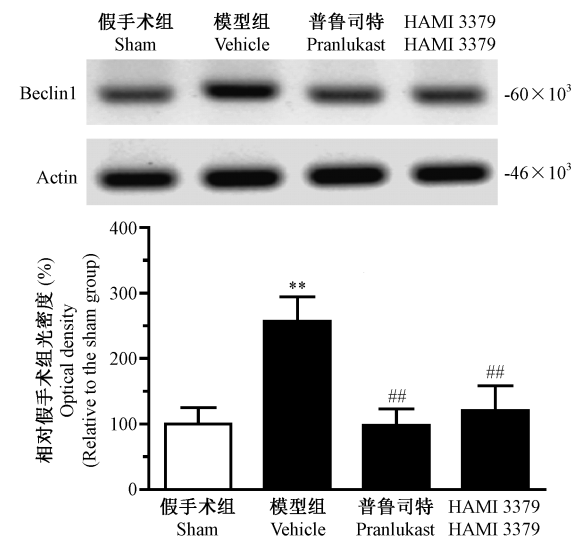


图 6 普鲁司特与 HAMI 3379 降低长爪沙鼠全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后 beclin1 表达,减少自噬的发生

Fig. 6 Pranlukast and HAMI 3379 reduce the expression of beclin1 at 24 h after global cerebral ischemia and reperfusion in gerbils

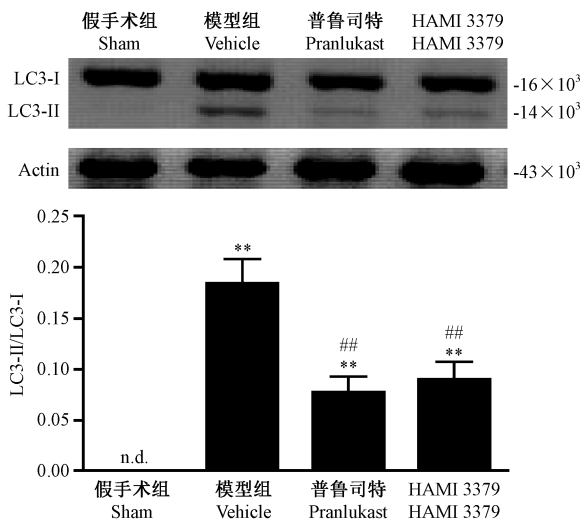


图 7 普鲁司特与 HAMI 3379 降低长爪沙鼠全脑缺血 10 min 复灌 24 h 后 LC3- II/LC3- I 比例,减少自噬的发生

Fig. 7 Pranlukast and HAMI 3379 reduce the ratio of LC3-II/LC3-I at 24 h after global cerebral ischcemia and reperfusion in the gerbils

LOX 的抑制剂能抑制 CysLTs 产物增加和缺血引起的神经损伤。本文研究表明,腹腔注射普鲁司特、HAMI 3379 可改善神经症状及功能评分,减少长爪沙鼠全脑缺血后 24 h 皮层、海马 CA1 区神经元丢失,证实了该拮抗剂对全脑缺血后的损伤亦有保护

作用。

自噬是细胞通过隔离膜包裹细胞质和(或)细胞器等物质形成自噬体,再通过微管系统与溶酶体结合成自噬溶酶体,实现细胞代谢更新的过程^[18]。自噬是亦细胞死亡的途径之一,Koike 等用实验证明自噬可能位于众多死亡机制的上游^[19]。

海马神经元经氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)损伤后,出现自噬激活^[20]。星形胶质细胞 OGD 后自噬与凋亡相继发生在损伤进程中,抑制 mTOR,诱导自噬,近年来亦证实,大鼠局灶性脑缺血神经元、星形胶质细胞自噬被激活^[21-23]、长爪沙鼠全脑缺血再灌注也可发现自噬体样结构^[24]。由此可见,自噬对缺血缺氧性神经元损伤具有调节作用,并且影响神经细胞的生存和死亡。

自噬是细胞高度保守的降解途径,亦是一种宿主防御机制,在免疫系统中发挥重要作用。AA 合成代谢通路在炎症相关的免疫应答中同样具有十分重要的地位,那么两条看似十分独立的免疫反应是否存在相互关系呢?

1995 年, Nitatori 等^[24]发现长爪沙鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元自噬体样结构在缺血性脑损伤后 3 d 显著增多。2010 年, Grzegorz A. 等^[25]用 LPS 研究腹腔注射 C57BL/6 小鼠, AA 代谢酶如 cPLA₂, 5-LOX 的 mRNA 在海马表达增加,电镜检测发现自噬小体明显增多,由此表明 AA 代谢通路的激活与自噬的发生具有同步性。2011 年, Qi 等^[26]进一步证实 cPLA₂ 及其代谢产物(AA, LTD₄, LTC₄ 和 LTE₄)可以诱导 RAW246.7 巨噬细胞系及原代培养单核细胞自噬的发生,并与 Atg5 密切相关,该结果直接证明 CysLTs 对细胞自噬具有调控作用。因此,我们推测 CysLTR 拮抗剂对全脑缺血再灌注损伤后的保护作用是由自噬介导的,本研究电镜结果表明普鲁司特、HAMI 3379 可减少全脑缺血再灌注损伤后海马神经元中的自噬,免疫印迹显示普鲁司特、HAMI 3379 减少自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达,可降低 LC3-II/LC3-I 比例,减少自噬的发生。因此我们认为长爪沙鼠全脑缺血后,CysLTR 表达上调(待发表文献),自噬过度导致神经元死亡,CysLTR 拮抗剂通过抑制自噬,从而保护神经元,发挥对全脑缺血再灌注损伤的治疗作用。

参 考 文 献(References)

[1] 魏尔清. 半胱氨酰白三烯受体调节脑内炎症病变的研究展望 [J]. 浙江大学学报医学版 2011, 40(2): 117-122.
Wei EQ. Prospects for research in regulation of brain inflamma-

- tion by cysteinyl leukotriene receptors [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2011, 40(2):117-122.
- [2] Ni NC, Yan D, Ballantyne LL, et al. A selective cysteinyl leukotriene receptor 2 antagonist blocks myocardial ischemia/reperfusion injury and vascular permeability in mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 339(3):768-778.
 - [3] Wunder F, Tinel H, Kast R, et al. Pharmacological characterization of the first potent and selective antagonist at the cysteinyl leukotriene 2 (CysLT₂) receptor [J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(2):399-409.
 - [4] 张晶, 郭继东, 邢淑华, 等. 褪黑素对沙土鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 药理学报 2002, 37(5):329-333.
Zhang J, Guo JD, Xing SH, et al. The protective effects of melatonin on global cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 37(5):329-333.
 - [5] Zhang LH, Wei EQ. Neuroprotective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on transient global cerebral ischemia in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(12):1241-1247. (in English)
 - [6] Zhang WP, Wei EQ, Mei RH, et al. Neuroprotective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on focal cerebral ischemia in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(10):871-877. (in English)
 - [7] Chu LS, Wei EQ, Yu GL, et al. Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in brain after focal cerebral ischemia in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(3):282-288. (in English)
 - [8] Qian XD, Wei EQ, Zhang L, et al. Pranlukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, protects mice against brain cold injury [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 549(1-3):35-40.
 - [9] Shi WZ, Qi LL, Fang SH, et al. Aggravated chronic brain injury after focal cerebral ischemia in aquaporin-4-deficient mice [J]. Neurosci Lett, 2012, 520(1):121-125.
 - [10] Yuzawa I, Yamada M, Fujii K. An oral administration of cilostazol before focal ischemia reduces the infarct volume with delayed cerebral blood flow increase in rats [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2008, 17(5):281-286.
 - [11] Choi JH, Yoo KY, Lee CH, et al. Comparison of neurogenesis in the dentate gyrus between the adult and aged gerbil following transient global cerebral ischemia [J]. Neurochem Res, 2012, 37(4):802-810.
 - [12] Kim JM, Kim S, Kim DH, et al. Neuroprotective effect of forsythiaside against transient cerebral global ischemia in gerbil [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660(2-3):326-333.
 - [13] Ichiki H, Kuroiwa T, Taniguchi I, et al. Delayed recovery of cortical auditory evoked potentials and blood flow precede cortical neuronal death after transient cerebral ischemia in gerbils [J]. J Med Dent Sci, 1998, 45(4):221-232.
 - [14] 周好乐, 杜小燕, 路静, 等. 长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失遗传特性分析及脑缺血模型高发群体的初步培育 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8):40-43.
Zhou HL, DU XY, LU J, et al. Characterization of the variations in the circle of willis in gerbils and selective breeding of an ischemia-prone gerbil group [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(8):40-43.
 - [15] 郑振峰, 杜小燕, 王迎, 等. 长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失类型与脑缺血模型症状相关性分析 [J]. 中国兽医学报, 2011, 31(6):908-912.
Zheng ZF, Du XY, Wang Y, et al. Analysis of the relationship between the variation of Willis circle and the symptoms of ischemic model in gerbils [J]. Chin J Vet Sci, 2011, 31(6):908-912.
 - [16] Austen KF, Maekawa A, Kanaoka Y, et al. The leukotriene E4 puzzle: finding the missing pieces and revealing the pathobiologic implications [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(3):406-414; quiz 415-406.
 - [17] Rao AM, Hatcher JF, Kindy MS, et al. Arachidonic acid and leukotriene C4: role in transient cerebral ischemia of gerbils [J]. Neurochem Res, 1999, 24(10):1225-1232.
 - [18] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9):814-822.
 - [19] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury [J]. Am J Pathol, 2008, 172(2):454-469.
 - [20] 苏方, 张培, 姜治伟, 等. 海马神经元缺血/再灌注后自噬的表达及其作用 [J]. 中国应用生理学杂志 2011, 27(2):187-191.
Su F, Zhang P, Jiang ZW, et al. Expression and function of autophagy after ischemia/reperfusion in rats hippocampus neuron [J]. Chin J Appl Physiol, 2011, 27(2):187-191.
 - [21] Gao L, Jiang T, Guo J, et al. Inhibition of autophagy contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats [J]. PLoS One, 2012, 7(9):e46092.
 - [22] Yan W, Zhang H, Bai X, et al. Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2011, 1402:109-121.
 - [23] Wang JY, Xia Q, Chu KT, et al. Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2011, 70(4):314-322.
 - [24] Nitatori T, Sato N, Waguri S, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis [J]. J Neurosci, 1995, 15(2):1001-1011.
 - [25] Czapski GA, Gajkowska B, Strosznajder JB. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus [J]. Brain Res, 2010, 1356:85-94.
 - [26] Qi HY, Daniels MP, Liu Y, et al. A cytosolic phospholipase A2-initiated lipid mediator pathway induces autophagy in macrophages [J]. J Immunol, 2011, 187(10):5286-5292.