

A2AR基因敲除对小鼠脑缺血再灌注后SVZ区 星形胶质细胞激活的影响

娄 普¹ 黄婷婷¹ 冯小敏¹ 尹水贵¹ 黄托夫¹ 陈江帆² 陈 翔^{1*}(温州医学院附属第二医院康复科, 温州 325027; ²美国波士顿大学医学院, 波士顿 02215)

摘要 通过研究腺苷A2A受体(A2A receptor, A2AR)基因敲除对小鼠局灶性脑缺血再灌注后侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)星形胶质细胞(astrocyte, Ast)数目及形态的影响, 为腺苷类药物在脑卒中类疾病中的应用提供实验依据。采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)复制局灶性脑缺血再灌注模型, 动物分为假手术组(S)和模型组(M), 其中M组根据基因类型分为A2AR基因敲除模型组(MKO)和A2AR基因野生模型组(MWT), MKO组和MWT组根据再灌注时间都分为1 d组、3 d组和7 d组, S组分为A2AR基因敲除假手术组(SKO)和A2AR基因野生假手术组(SWT), 共8组; 对实验小鼠进行神经行为学评分, 脑组织用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色观察脑梗死灶, 苏木素伊红(HE)染色和尼氏(Nissl)染色观察脑组织大体形态, 以及应用免疫荧光法观察SVZ区Ast的特异性标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达。结果显示, 所有M组小鼠在脑缺血再灌注后均出现神经功能缺损症状, 神经行为学评分显示MKO 3 d组低于MKO 1 d组($P<0.05$); TTC显示M组小鼠脑组织均有白色梗死灶; 免疫荧光结果显示S组小鼠SVZ区域仅有少量Ast表达, M组表达明显增多, MKO 7 d组Ast表达量低于MWT 7 d组($P<0.05$); Ast表达与神经行为学评分呈显著负相关($r=-0.621$, $P<0.01$)。结果证明, A2AR基因敲除对小鼠局灶性脑缺血再灌注后, 在急性期能够减轻肢体活动障碍, 在恢复期能够调控Ast的激活, 减少胶质瘢痕形成, 是其促进后期神经再生的可能因素之一。

关键词 腺苷A2A受体; 脑缺血再灌注; 星形胶质细胞; 侧脑室下区; 小鼠

Effect of A2AR Knock out on Astrocyte Activation in SVZ of Focal Cerebral Ischemia-reperfusion in Mice

Lou Pu¹, Huang Tingting¹, Feng Xiaomin¹, Yin Shuigui¹, Huang Tuofu¹, Chen Jiangfan², Chen Xiang^{1*}¹Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;²Boston University School of Medicine, Boston 02215, USA)

Abstract This article investigates the effects of adenosine A2A receptor (A2AR) on astrocyte (Ast) activation in subventricular zone (SVZ) during focal cerebral ischemia-reperfusion in mice, to provide experimental evidences for application of adenosine drugs on Stroke. Focal cerebral ischemia-reperfusion was induced by middle

收稿日期: 2013-01-02 接受日期: 2013-05-06

浙江省科技厅钱江人才项目(批准号: 2009R10024)和温州市科技局对外合作项目(批准号: H20110018)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88002053, E-mail: chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

Received: January 2, 2013 Accepted: May 6, 2013

This work was supported by the Qianjiang Talents Project of Technology Office in Zhejiang Province (Grant No.2009R10024) and the Foreign Cooperation Projects of Wenzhou Municipal Science and Technology (Grant No.H20110018)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88002053, E-mail: chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-07-31 16:22

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130731.1622.005.html

cerebral artery occlusion (MCAO). The mice were randomly divided into Sham operated groups (S), model groups (M), and the model groups were divided into *A2AR*-gene-ko-model-groups (MKO) and *A2AR*-gene-wt-model-groups (MWT). According to the time after ischemia-reperfusion, MKO groups and MWT groups were divided into 1 d groups, 3 d groups and 7 d groups. And the S groups were divided into *A2AR*-gene-ko-sham-groups (SKO) and *A2AR*-gene-wt-sham-groups (SWT). Neurological behavior was assessed on each mice. Brain slices were observed for infarction by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC); general shape of brain was observed by HE&Nissl staining; and the specific markers glial fibrillary acidic protein (GFAP) of Ast was measured by Immunofluorescence. Abnormal neurological behavior was observed in the animals of M groups, but the neurological behavior of mice in MKO 3 d group was better than these in the MKO 1 d group ($P<0.05$). Typical cortical infarct lesion in M groups was found by TTC staining. The expression of GFAP in the brain of S groups was rather little, which was enhanced significantly in M groups; besides, the expression of GFAP in the MKO 7 d group was less than that in the MWT 7 d group. *A2AR*-gene-ko can mitigate handicap during acute stage of ischemia reperfusion, regulate activation of astrocyte during convalescence, which should be one of favorable factors for neuranagenesis.

Key words *A2AR*; cerebral ischemia-reperfusion; astrocyte; SVZ; mice

脑卒中除了高致死率外,还具有高致残率和高复发率的特点,严重威胁国民生命和生活质量。目前最有效的治疗方法是溶栓疗法,但即使在有限的“时间窗口”内进行了溶栓,再灌注过程中又会产生“二次打击”,损伤主要是由急性期的胶质细胞分泌过多的炎性因子和后期的胶质化造成的。在中枢神经系统(central nervous system, CNS)中,神经胶质细胞对神经元的比例估计约为10:1^[1],脑缺血再灌注及后期康复过程中星形胶质细胞(astrocyte, Ast)会被激活并大量增殖,伴随其特异性标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达增加,对缺血的神经元有着复杂的作用,急性期Ast能够稳定内环境,减少神经元损伤^[2],但在后期Ast过度的增殖会形成胶质瘢痕,阻碍神经元的再生^[3]。在CNS缺血性损伤中,细胞外的腺苷浓度会快速地大幅度上升^[4]。尽管越来越多的研究发现,腺苷A2A受体(A2A receptor, A2AR)拮抗剂对脑缺血再灌注损伤模型或持续性局灶性脑缺血模型都具有明显的保护作用^[5],但关于A2AR在脑缺血再灌时对Ast的影响不是十分清楚。鉴于腺苷在脑缺血疾病中的重要作用,本实验采用小鼠大脑中动脉栓线法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模拟脑缺血再灌注,研究腺苷A2AR对脑缺血再灌注后侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)Ast的数目及形态的影响,为腺苷类药物临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 以C57/bl6小鼠为背景建立*A2AR*基因敲除小鼠,种鼠由美国波士顿大学陈江帆教授提供,饲养于温州医学院实验动物中心SPF实验室(SYXK(浙)2005-0061),房间灯光分日夜控制(12 h亮,12 h暗),室温25 °C,小鼠自由饮食活动。实验用小鼠16周龄,质量(25±2) g,实验前进行基因鉴定,其中*A2AR*(+/+)和*A2AR*(-/-)分别作为野生型(WT)和敲除型(KO)用于实验,同窝同期雌雄*A2AR*(+/-)用做种鼠以繁殖后代。

动物分组:56只小鼠随机分为模型组(M)和假手术组(S);M组按*A2AR*基因型分为*A2AR*基因敲除模型组(MKO)和*A2AR*基因野生模型组(MWT),MKO组和MWT组分别按缺血再灌注时间分为1 d组、3 d组、7 d组;S组分为*A2AR*基因野生型假手术组(SWT)和*A2AR*基因敲除型假手术组(SKO),共有8组,每组7只小鼠。

1.1.2 药物与试剂 TTC购自于Sigma-Aldrich中国公司;冰冻切片包埋剂(opti-mum cutting temperature compound, OCT)购自于日本樱花公司;水合氯醛购自于国药集团化学试剂有限公司;HE染色试剂盒、Nissl染色液试剂盒购自于上海碧云天生物技术有限公司;兔抗GFAP抗体购自英国Abcam生物技术有限公司(温州长丰生物科技有限公司代理);四甲基异硫氰酸罗丹明(Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanate,

TRITC)荧光标记驴抗兔二抗购自美国Jackson公司(上海博蕴生物公司代理);防荧光淬灭封片剂购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 仪器 德国LEICA公司CM 1900冰冻切片机;日本Olympus公司BX41光学显微镜;美国Media Cybernetics公司ImagePro Plus 6.0(IPP6.0)彩色医学图像分析系统;日本Fluo View FV1000激光扫描共聚焦显微镜;上海天平仪器厂FA2104型电子天平;上海博迅实业有限公司SSW型电热恒温水浴箱;北京沙东生物技术公司尼龙栓线。

1.2 实验方法

1.2.1 基因鉴定 在新生鼠出生后的第12 d取5 mm鼠尾尖加入200 μ L裂解液和10 μ L蛋白酶K(100 μ g/mL), 56 $^{\circ}$ C过夜裂解, 95 $^{\circ}$ C灭活蛋白酶K 15 min, 14 000 r/min离心10 min, 加入乙醇离心后舍去上清液, 干燥后加入1 \times TE溶解固体DNA, 作为PCR模版, 设计特异的DNA序列作为引物, 引物1正义链为: 5'-AGC CAG GGG TTA CAT CTG TG-3', 反义链为: 5'-TAC AGA CAG CCT CGA CAT GTG-3', 扩增片段长度为180 bp。引物2正义链为: 5'-TCG GCC ATT GAA CAA GAT GG-3', 反义链为: 5'-GAG CAA GGT GAG ATG AGA GG-3', 扩增片段长度为330 bp。扩增后凝胶电泳, 凝胶成像系统观察PCR反应结果。

1.2.2 动物造模 局灶性脑缺血再灌注模型采用改良后的小鼠栓线模型^[6], 动物麻醉采用腹腔注射水合氯醛法(350 mg/kg), 手术前后房间温度控制在25 $^{\circ}$ C, 常规颈部剃毛, 碘酊消毒, 借助解剖手术显微镜, 从中线切开颈部的皮肤, 小心分离皮下腺体和肌肉, 寻找左侧颈总动脉, 分离紧贴颈总动脉上的迷走神经, 结扎左侧颈总动脉的下端, 再向上分离出颈内动脉和颈外动脉, 丝线结扎颈外动脉, 用动脉夹夹住颈内动脉, 使用眼科小剪在颈总动脉处剪一小口, 将栓线插进颈总动脉内, 松开颈内动脉的动脉夹, 将尼龙单丝线从颈动脉分叉处经颈内动脉向前推进(9.0 \pm 0.5) mm, 此时栓线就完全阻塞了大脑中动脉, 阻断了血流。缺血30 min后向外拔出栓线, 结扎剪口上方, 靠基底动脉环回流血液进行血流再灌注。手术完毕后约1 h小鼠清醒。S组小鼠仅切开皮肤、分离左侧颈总动脉后即缝合, 放回饲养笼自由饮食。

1.2.3 神经行为学评分 按照各组动物观察时间,

分别于麻醉清醒后1, 3, 7 d进行神经行为学评分, 以观察神经功能缺损程度。参照Longa等^[7]5分制评分标准: 0分为无神经缺损症状; 1分为不能完全伸展缺血对侧前肢; 2分为向缺血对侧转圈; 3分为向缺血对侧倾倒; 4分为无自发运动, 意识抑制; 5分为死亡。舍去评分为0分和5分的动物模型。

1.2.4 脑组织切片TTC染色 每组随机取1只小鼠观察至规定时间, 用10%水合氯醛(400 mg/kg)过量麻醉, 快速断头取脑, 置于-20 $^{\circ}$ C冰箱20 min, 以2 mm间距冠状切成5片, 将脑片浸在2% TTC缓冲液(37 $^{\circ}$ C, 30 min)中水浴, 置于4%多聚甲醛中固定过夜, 观察梗死灶并拍照。

1.2.5 标本处理 每组随机取6只小鼠以10%水合氯醛(400 mg/kg)过量麻醉后, 沿小鼠胸骨左侧剪开胸腔, 从左心室进针, 插入到主动脉, 固定针头, 剪开右心耳, 快速滴入预冷生理盐50 mL, 无血污后改滴入冷4%多聚甲醛30 mL, 断头取脑置于4%多聚甲醛固定6 h, 再依次置于10%、20%和30%蔗糖中梯度脱水至沉底, OTC剂包埋速冻后移入-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用, 或直接在-20 $^{\circ}$ C恒温冰冻切片机上从视交叉开始做连续冠状冰冻切片, 片厚20 μ m, 选取有SVZ区域的切片, 所有组织每隔3张取1张片子, 共取5张, 其中3张做GFAP免疫荧光染色, 余下2张做HE染色、Nissl染色。

1.2.6 HE染色和Nissl染色 按照试剂盒说明书步骤, 先将切片置0.01 mol/L PBS冲洗5 min \times 3次, 加入苏木素-伊红(HE)或者Nissl染色液, 再置于0.01 mol/L PBS冲洗5 min \times 3次, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 置于光学显微镜下观察并拍照。

1.2.7 GFAP免疫荧光染色 将切片置于0.01 mol/L PBS冲洗5 min \times 3次, 用5%驴血清封闭30 min, 加入兔抗GFAP一抗(1:100, Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育24 h, 后置于0.01 mol/L PBS冲洗5 min \times 3次, 暗室下加入TRITC标记的驴抗兔二抗(1:100, Jackson), 4 $^{\circ}$ C过夜, 后避光置于0.01 mol/L PBS冲洗5 min \times 3次, 加入防荧光淬灭剂并封片, 置于激光扫描共聚焦显微镜下观察。用人血清代替驴血清, 同时用PBS代替一抗做空白对照以检查免疫反应的特异性, 其余步骤同上。

Ast荧光计数: 用激光扫描共聚焦显微镜观察各组小鼠标本切片, 于400倍显微镜下随机选取SVZ区域4个视野拍照, 采用Image-Pro Plus6.0版软件进行图像处理, 计数每个视野中Ast免疫荧光阳性细胞,

计算平均值, 为避免计数重复, 不计算血管内的阳性细胞和侧脑室室壁最外层的阳性细胞。

1.3 统计学分析

所有计量数据资料都以均数±标准差(M±S.D.)表示, 采用SPSS 18.0统计软件对实验数据进行处理, 组间比较用*t*检验, 多组间比较用单因素方差(ANOVA)分析, 两组数据相关性采用Pearson线性相关分析, *P*<0.05为差异显著, *P*<0.01为差异极显著性。

2 结果

2.1 基因鉴定结果

仅在330 bp处出现1个条带的为敲除型(A2AR^{-/-}), 仅在180 bp处出现1个条带的为野生型(A2AR^{+/+}), 在180 bp和330 bp处都出现1个条带的为杂合型(A2AR^{+/-})^[8]; 在鉴定结果中杂合型约占51%, 野生型约占26%, 敲除型约占23%(图1和图2)。

2.2 神经行为学评分

术后约1.5 h小鼠清醒, 如模型制作成功, 小鼠

麻醉清醒后即有神经功能缺损表现。根据评分标准, 缺血再灌注后1, 3, 7 d给予小鼠评分, 其中S组小鼠评分全为0分, M组小鼠均有不同程度的行为功能缺损表现。两基因型组间对比无差异; 两基因型组内对比: 在7 d时同组内与1 d、3 d比较均有差异(*P*<0.05); MKO 3 d组与MKO 1 d相比有显著性差异(*P*<0.05), 但是MWT 3 d组与MWT 1 d组相比则无意义(图3)。

2.3 脑组织切片TTC染色

TTC染色后正常脑组织染成深红色, 缺血坏死的脑组织则不能被染色而呈苍白色^[9]。结果显示: S组全部脑组织红染; M组均有白色梗死灶, 其中M 3 d组梗死面积较大, M 7 d组的梗死灶体积有所减少甚至消失, 两基因型间对比无差别(图4)。

2.4 小鼠脑组织病理光镜观察结果

2.4.1 HE染色结果 S组脑组织染色未见病理改变; M组半暗区(梗死灶周围)均可见细胞数明显减少, 细胞肿胀, 部分细胞核固缩、深染或溶解; 梗死灶中心

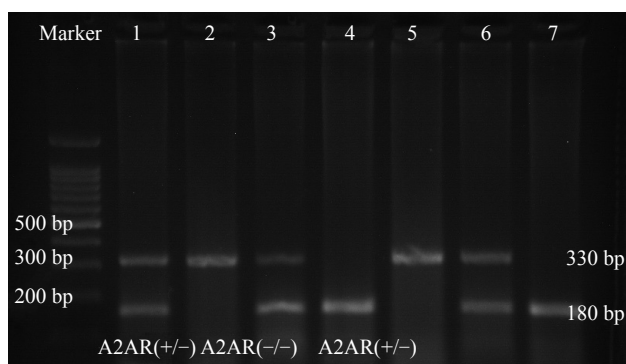


图1 PCR法检测小鼠基因型的结果

Fig. 1 The result of the mice's genotype was detected with PCR

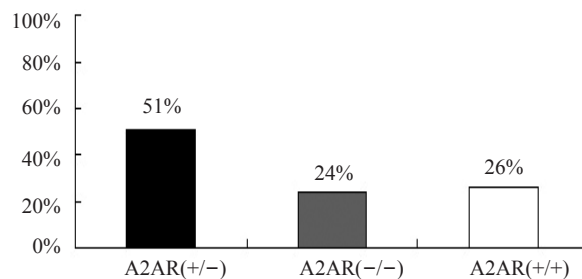
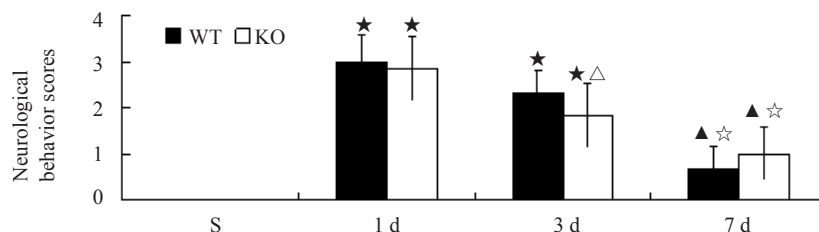


图2 三种基因型所占比例

Fig. 2 The percentage of three genotypes

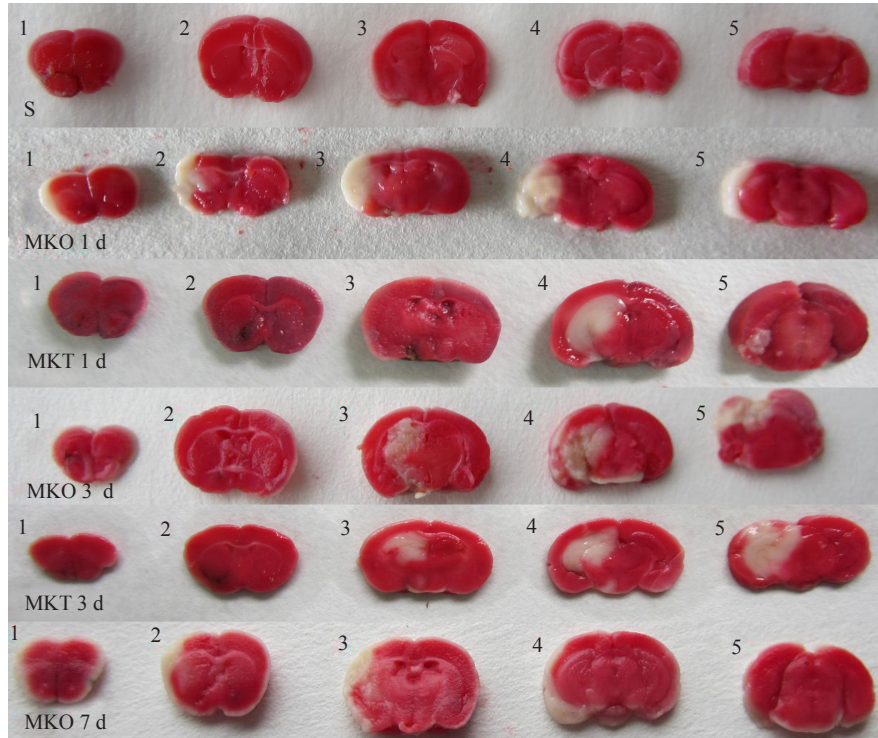


▲*P*<0.05, 与S组比较; ★*P*<0.01, 与S组比较; △*P*<0.05, 与MKO 1 d组对比; ☆*P*<0.01, 与同基因型其他时间点对比。

▲*P*<0.05 vs Sham groups; ★*P*<0.01 vs Sham groups; △*P*<0.05 vs MKO 1 d group; ☆*P*<0.01 vs other groups in same genotype.

图3 *A2AR*基因敲除对小鼠脑缺血再灌注后神经行为学评分的影响($\bar{x}\pm s$, *n*=7)

Fig. 3 The effect of *A2AR* knockout on the changes of neurological behavior scores in mice model of focal cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x}\pm s$, *n*=7)



1-5是指大脑切片从额叶到枕叶排列。白色区域为梗死灶, M组均有梗死灶, S组则无梗死灶。

1-5 represent sequence from frontal to occipital lobe of brain slices. White areas are infarction size, and all of M groups have infarction compared with S groups.

图4 脑组织切片TTC染色图
Fig.4 TTC staining of brain slices

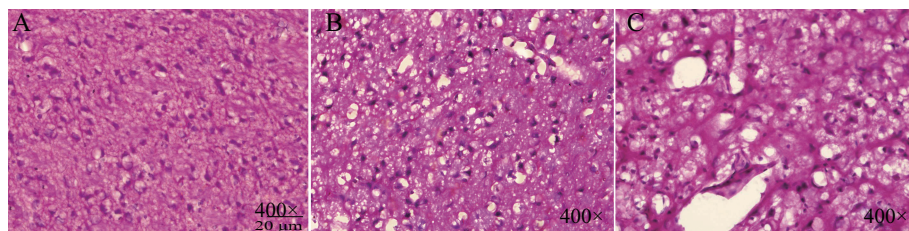
大量细胞坏死, 组织溶解后留下空洞(图5A-图5C)。

2.4.2 Nissl染色结果 S组脑组织染色未见病理改变; M组梗死灶及其周围神经细胞数目减少, 突触消失, 胞体肿胀, 部分尼氏小体出现溶解、空泡化(图6A-图6C)。

2.5 脑缺血再灌注损伤后SVZ区Ast的表达结果

M组Ast表达增多, 大部分Ast胞体肥大, 突触增多、增粗、伸长并且数目增加; 而S组Ast相对较少, Ast形态无变化, 胞体较小, 分支纤细(图7)。

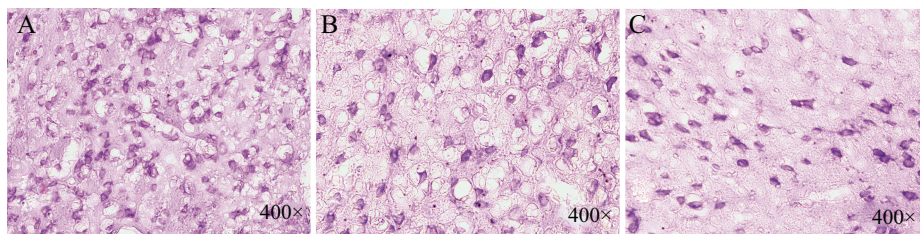
S组Ast数目明显低于M组, 各M组对比S组 P 值均有意义。MKO组和MWT组小鼠在脑缺血再灌注1, 3 d后SVZ区可见Ast表达增多, 7 d后显著增加; 两基因型组间对比, 在1, 3 d时对比无差异, 而7 d时对比有显著差异($P<0.01$); 同基因型组内对比, MKO组内对比: MKO 7 d组对比MKO 1 d组差异极显著($P<0.01$), MKO 7 d组对比MKO 3 d组有显著差异($P<0.05$), MWT组内对比: MWT 7 d组对比MWT 1 d组和MWT 3 d组均差异极显著($P<0.01$), 另外MWT



A: S组的大脑皮层; B: M组缺血半暗区的大脑皮层; C: M组梗死灶中心大脑皮层。

A: the cerebral cortex of S groups; B: the cerebral cortex in ischemic penumbra of M groups; C: the cerebral cortex in infarction of M groups.

图5 大脑切片HE染色
Fig. 5 HE staining of brain slices



A: S组的大脑皮层; B: M组缺血半暗区的大脑皮层; C: M组梗死灶中心大脑皮层。
A: the cerebral cortex of S groups; B: the cerebral cortex in ischemic penumbra of M groups; C: the cerebral cortex in infarction of M groups.

图6 大脑切片Nissl染色

Fig.6 Nissl staining of brain slices

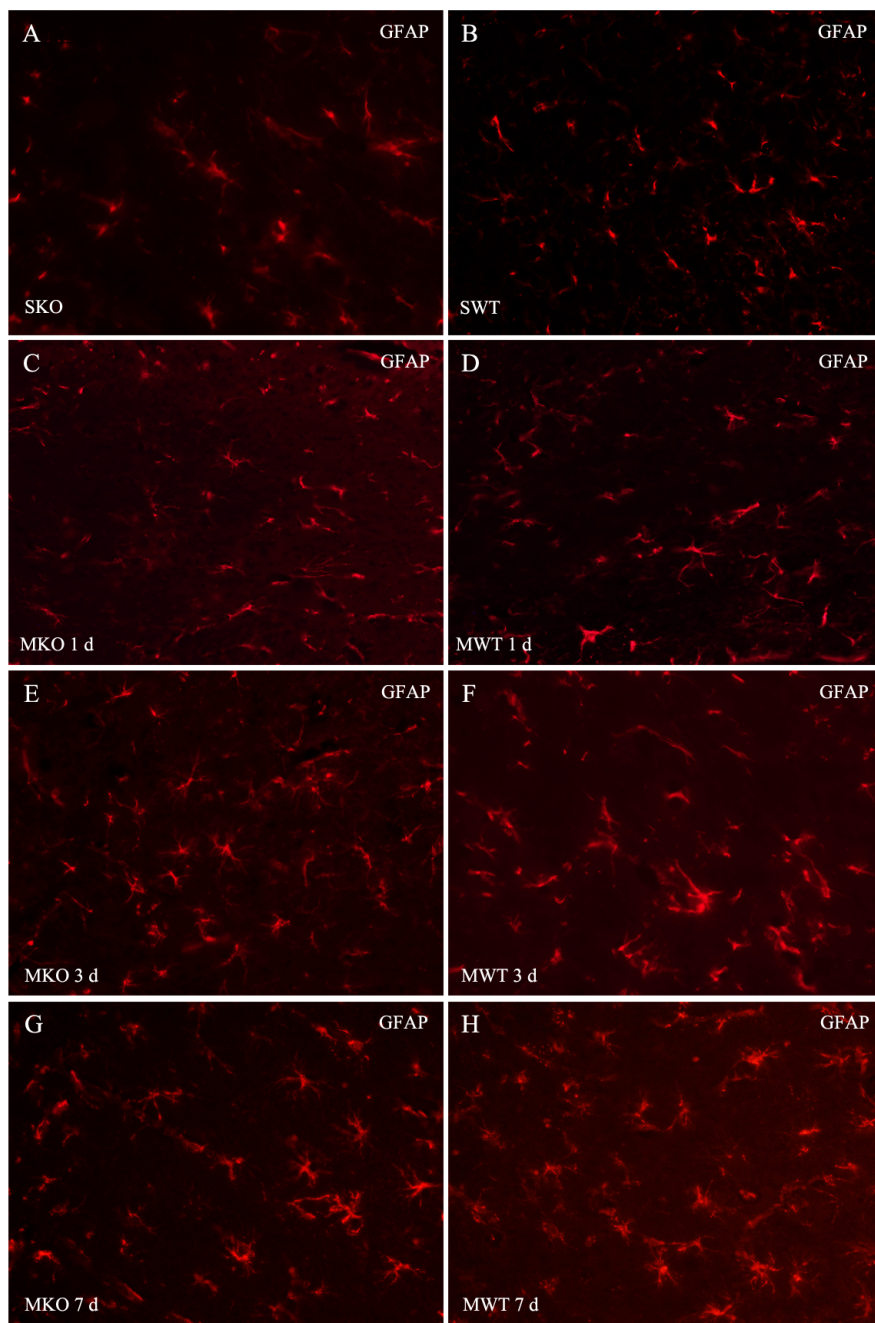
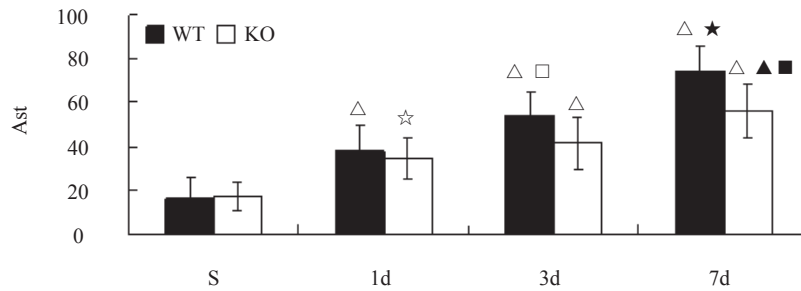


图7 各组小鼠SVZ区Ast的荧光染色(400×)

Fig.7 Immunofluorescence staining of Ast in SVZ of each group (400×)



$\Delta P < 0.01$, 与S组比较; $\ast P < 0.05$, 与S组比较; $\blacktriangle P < 0.01$, 与MWT 7 d组和MKO 1 d组比较; $\blacksquare P < 0.05$, 与MKO 3 d组比较; $\square P < 0.05$, 与MWT 1 d组; $\star P < 0.01$, 与MWT 1 d组和MWT 3 d组比较。

$\Delta P < 0.01$ vs S groups; $\ast P < 0.05$ vs S groups; $\blacktriangle P < 0.01$ vs MWT 7 d group & MKO 1 d group; $\blacksquare P < 0.05$ vs MKO 3 d group; $\square P < 0.05$ vs MWT 1 d group; $\star P < 0.01$ vs MWT 1 d group & MWT 3 d group.

图8 各组小鼠SVZ区Ast的表达结果

Fig.8 The expression of Ast in SVZ about each group

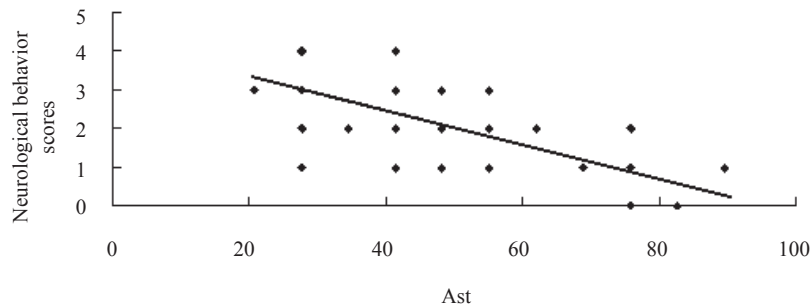


图9 神经行为学评分与Ast表达的相关性分析

Fig.9 Correlation analysis between neurological behavior scores and expression of Ast

3 d组对比MWT 1 d组有显著差异($P < 0.05$)(图8)。

2.6 直线相关性分析

小鼠脑缺血再灌注后各个时间点的神经行为学评分和SVZ区Ast表达呈显著负相关($r = -0.621$, $P < 0.01$)(图9)。

3 讨论

在CNS中Ast是神经细胞的主要部分,它可以分泌20余种细胞因子^[10],在脑缺血再灌注及后期康复过程中Ast会被激活并大量增殖,Ast对缺血性神经元有着复杂的作用^[11],理论趋向于既能够在急性期稳定内环境、平衡炎症因子,又可以在后期形成胶质瘢痕,从而阻碍了新生神经元及其突触穿透至中央梗死灶进行再生修复^[12],这些变化对脑卒中后病理改变及功能康复起着重要作用。Ast的活化调控机制未完全明了,对该机制进一步探讨,有利于脑卒中等疾病的治疗及神经功能

康复。近些年来,多篇文献报道称脑缺血再灌注时腺苷生成明显增多。腺苷既是神经调节剂又是免疫调节剂,作为一种受损时产生的分解产物,它能够应对刺激反应和影响免疫功能,从而减少过度的炎症反应^[13]。迄今为止,腺苷受体共发现的包括A1R、A2AR、A2BR和A3R四种受体,它们都属于G-蛋白偶联受体^[14],几乎出现在每种细胞,从而在多种病理情况下成为药理干预的途径^[15]。最新文献表明,纹状体缺血时神经元损伤程度与该部位A2AR密度有密切关系^[16]。在其他部位如心肌,也明确腺苷受体激活会加重缺血再灌注损伤^[17],而在脊髓损伤中A2AR拮抗剂能够提高神经元存活量^[18]。Ast上存在着大量的A2AR^[19],体外实验证明A2AR能够调节海马区Ast释放谷氨酸的多少,并能够调动细胞内钙储存^[20]。体外实验已有文献支持拮抗A2AR能够抑制Ast的增值^[21]。既然A2AR与Ast的活性密切相关,有必要对在脑缺血再灌注时A2AR对

Ast的调控作用进行研究。GFAP是Ast的骨架蛋白,是Ast的标志物,因而被认为是CNS中标记Ast反应的敏感且可靠的指标。SVZ区域是大脑内源性增生区域,该部位增生的细胞能够迁移到受损部位形成新生组织,所以能够较早的反映出细胞数目及形态的变化^[22]。

本实验模型采用改良后的MCAO模型,基本符合脑中风病理生理变化^[23]。在脑缺血再灌注后,小鼠出现不同程度的神经功能缺损症状,术后3 h即出现,多于24 h达到高峰,后期有所改善,7 d基本恢复正常,这与国际上该模型相符合^[24]。TTC染色是最常用的脑梗死模型评价指标,它能够快速地与正常脑组织结合,呈现红色,而梗死灶区域则不能结合而呈现白色^[25]。本实验经多次前期造模实验,结合TTC染色,发现线栓插入深度(9.0±0.5) mm,缺血时间30 min能够得到稳定的梗死区域。梗死灶主要位于大脑中动脉支配区域,术后7 d内小鼠存活率为96.1%,因TTC染色后的组织无法再用于免疫荧光染色,故采取随机法从各组抽取一只小鼠做TTC染色。HE和Nissl染色发现,所有模型组小鼠脑组织均有梗死中心和缺血半暗区,部位多位于额顶颞叶皮层、尾壳核区,与TTC染色范围基本一致。本实验模型小鼠出现稳定的神经缺损症状,TTC染色全部有白色梗死灶,脑组织细胞病理形态观察到梗死灶中心、缺血半暗区及正常脑组织间的边界,说明模型制备成功。通过观察实验小鼠的行为学评分,本实验发现*A2AR*基因敲除小鼠肢体活动功能恢复较早,野生组恢复较晚。

本实验采用以C57/bl6为背景的*A2AR*基因敲除小鼠,由陈江帆教授采用基因打靶得来,首先用*PGK-Neo cassette*替换*A2AR*基因片段的第二个外显子及其内含子,后电转入胚胎干细胞细胞,并注射到囊胚得到嵌合体小鼠^[26],后代由同窝同期杂合子成年小鼠繁殖后进行*A2AR*基因鉴定后挑选得来,鉴定结果显示杂合子数目约占1/2,两种纯合子数目分别约占1/4,符合遗传规律。我们观测了*A2AR*基因敲除对小鼠MCAO模型脑内SVZ区域GFAP的表达的影响,从而反映出Ast的形态和数目的改变。研究中发现,S组Ast无变化;MWT组Ast胞体肥大,突触增多、增粗、伸长并且数目增加;MKO组也有相应表现,但不显著,7 d后两基因型组间对比有显著差异,说明

*A2AR*基因敲除能够抑制小鼠在脑缺血再灌注损伤后SVZ区Ast的激活,并随着时间延长作用更明显。神经行为学评分显示敲除型小鼠能够较早地恢复肢体功能,这可能与Ast活性减低并分泌炎症因子量减少有关。另外,神经行为学评分和Ast表达呈显著负相关,进一步验证了Ast的激活会影响到肢体功能的恢复。实验结果证明,*A2AR*基因敲除对小鼠局灶性脑缺血再灌注后,在急性期内能够减轻肢体活动障碍,在恢复期能够调控Ast的激活,减少胶质瘢痕形成,是其促进后期神经再生的可能因素之一。我们的研究仅仅从Ast形态和数目上比较了*A2AR*基因敲除型组与*A2AR*基因野生型组间的差异,对于*A2AR*基因敲除是通过何种通路抑制Ast的改变尚有待研究;而且*A2AR*对脑再灌注损伤的保护作用还可能与局部炎症因子的减少、神经元再生的增加有关,有待进一步阐述及科研证明。

参考文献 (References)

- 1 Pfrieger FW. Role of glia in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(5): 486-90.
- 2 Dienel GA, Hertz L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia. *Glia* 2005; 50(4): 362-88.
- 3 Hawthorne AL, Hu H, Kundu B, Steinmetz MP, Wylie CJ, Deneris ES, *et al.* The unusual response of serotonergic neurons after CNS injury: lack of axonal dieback and enhanced sprouting within the inhibitory environment of the glial scar. *J Neurosci* 2011; 31(15): 5605-16.
- 4 Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 2001; 79(3): 463-84.
- 5 Pugliese AM, Traini C, Cipriani S, Gianfriddo M, Mello T, Giovannini MG, *et al.* The adenosine A2A receptor antagonist ZM241385 enhances neuronal survival after oxygen-glucose deprivation in rat CA1 hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 2009; 157(5): 818-30.
- 6 Chiang T, Messing RO, Chou WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp* 2011; 48: 2761.
- 7 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1): 84-91.
- 8 Day YJ, Huang L, McDuffie MJ, Rosin DL, Ye H, Chen JF, *et al.* Renal protection from ischemia mediated by A2A adenosine receptors on bone marrow-derived cells. *J Clin Invest* 2003; 112(6): 883-91.
- 9 Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp* 2012; 69: 4048.
- 10 Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 2012; 122(4): 1164-71.
- 11 Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis.

- Glia 2005; 50(4): 427-34.
- 12 Nagahiro S, Uno M, Sato K, Goto S, Morioka M, Ushio Y. Pathophysiology and treatment of cerebral ischemia. *J Med Invest* 1998; 45(1-4): 57-70.
- 13 Sitkovsky MV. T regulatory cells: Hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol* 2009; 30(3): 102-8.
- 14 Chen JF, Chern Y. Impacts of methylxanthines and adenosine receptors on neurodegeneration: Human and experimental studies. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 200: 267-310.
- 15 Klotz KN. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(4/5): 382-91.
- 16 Arcangeli S, Tozzi A, Tantucci M, Spaccatini C, de Iure A, Costa C, *et al.* Ischemic-LTP in striatal spiny neurons of both direct and indirect pathway requires the activation of D1-like receptors and NO/soluble guanylate cyclase/cGMP transmission. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33(2): 278-86
- 17 Lee SK, Kim JH, Kim JS, Jang Y, Kim J, Park YH, *et al.* Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate-induced cardioprotection may attenuate ischemia-reperfusion injury through adenosine receptor activation: A preliminary study. *Korean J Anesthesiol* 2012; 63(4): 340-5.
- 18 Paterniti I, Melani A, Cipriani S, Corti F, Mello T, Mazzon E, *et al.* Selective adenosine A2A receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 31.
- 19 Lopes LV, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Curr Top Med Chem* 2011; 11(8): 1087-101.
- 20 Kanno T, Nishizaki T. A(2a) adenosine receptor mediates PKA-dependent glutamate release from synaptic-like vesicles and Ca efflux from an IP(3)- and ryanodine-insensitive intracellular calcium store in astrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2012; 30(6): 1398-412.
- 21 Ke RH, Xiong J, Liu Y, Ye ZR. Adenosine A2a receptor induced gliosis via Akt/NF-kappaB pathway *in vitro*. *Neurosci Res* 2009; 65(3): 280-5.
- 22 Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 2005; 36(6): 1278-82.
- 23 Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse Model of Intraluminal MCAO: Cerebral Infarct Evaluation by Cresyl Violet Staining. *J Vis Exp* 2012; 69: 4038.
- 24 Choi BI, Park D, Lee SH, Bae DK, Yang G, Yang YH, *et al.* Neurobehavioural deficits correlate with the cerebral infarction volume of stroke animals: A comparative study on ischaemia-reperfusion and photothrombosis models. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 33(1): 60-9.
- 25 Ruiz-Crespo S, Trejo-Gabriel-Galan JM, Coma-Del-Corral MJ. Localizing coordinates of cerebral ischemic tissue without the need of staining in a rat model of focal cerebral infarct. *Metab Brain Dis* 2013; 28(1): 21-4.
- 26 Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, *et al.* A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* 1999; 19(21): 9192-200.