孕酮对缺血/再灌注脑损伤大鼠脑磁共振波谱和 ATP-P2X$_7$R 信号通路的影响

王建洲[1]，李卓[1]，张海三[1*]，李新娟[2]，魏林郁[2][1.新乡医学院第二附属医院(河南省精神病医院)放射介入科，河南 新乡 453002；2.新乡医学院基础医学院生理与神经生物学教研室，河南 新乡 453002]

摘要：目的 探讨孕酮(progesterone，PROG)对缺血/再灌注(ischemia-reperfusion，I/R)脑损伤大鼠的神经保护作用及其可能机制。**方法** 138 只大鼠随机等分为假手术(Sham)组、大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion，MCAO)组和 PROG+MCAO 组，分别采用 Longa 法和 Morris 水迷宫试验评估大鼠运动功能和认知功能；脑组织 TTC 染色法、磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy，MRS)法和 Annexin V-FITC/PI 双染法评估神经细胞损伤情况；ELISA 法检测脑脊液 ATP、IL-6、TNF-α 和 COX-2 含量；Western blotting 法检测脑组织 P2X$_7$R 和 NF-κB 蛋白表达的变化。**结果** 与 MCAO 组相比，PROG+MCAO 组大鼠 Longa 评分(第 5~7 天)和 Morris 水迷宫试验潜伏期(第 4~7 天)下降(P<0.05 或 P<0.01)，而目标交叉次数增高(P<0.05)；PROG+MCAO 组大鼠 NAA/Cr 和 Cho/Cr 比值较 MCAO 组升高，脑梗死体积和细胞凋亡率较 MCAO 组明显降低(P<0.05)；MCAO 组脑脊液 ATP、COX-2、TNF-α 和 IL-6 的含量明显高于 Sham 组，PROG+MCAO 组上述指标含量明显低于 MCAO 组(P<0.05)；MCAO 组脑组织 P2X$_7$R 和 NF-κB 蛋白的表达水平高于 Sham 组，而其在 PROG+MCAO 组表达水平又明显低于 MCAO 组(P<0.05)。**结论** PROG 通过降低神经细胞凋亡率、减轻神经元损伤及髓鞘降解而改善 I/R 脑损伤大鼠运动和认知功能，这一保护作用与其抑制 ATP-P2X$_7$R 信号通路密切相关。

关键词：孕酮；缺血/再灌注；磁共振波谱；细胞凋亡；P2X$_7$ 受体

中图分类号：R965.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2020)09-1040-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.004

引用本文：王建洲，李卓，张海三，等. 孕酮对缺血/再灌注脑损伤大鼠脑磁共振波谱和 ATP-P2X$_7$R 信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1040-1045.

Effects of Progesterone on Magnetic Resonance Spectroscopy and ATP-P2X$_7$R Signaling Pathways in Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

WANG Jianzhou[1], LI Zhuo[1], ZHANG Haisan[1*], LI Xinjuan[2], WEI Linyu[2](*1.Department of Radiology, The Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Mental Hospital, Xinxiang 453002, China; 2.Department of Physiology and Neurobiology, School of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453002, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the neuroprotective effects of progesterone(PROG) on cerebral in rats with ischemia- reperfusion(I/R) brain injury and its possible molecular mechanism. **METHODS** One hundred and thirty-eight rats were randomly divided into Sham group, middle cerebral artery occlusion(MCAO) group and PROG+MCAO group. Motor function and cognitive function of rats was evaluated by Longa method and Morris water maze test. TTC staining, magnetic resonance spectroscopy(MRS) and Annexin V-FITC/PI double staining were used to evaluate nerve cell injury. The levels of ATP, IL-6, TNF-α and COX-2 in rat cerebrospinal fluid was determined by ELISA. The expression of P2X$_7$ receptor(P2X$_7$R) and NF-κB protein in brain tissue was detected by Western blotting. **RESULTS** Compared with the MCAO group, the Longa score(Day 5−7) and the latency of Morris water maze test(Day 4−7) in the PROG+MCAO group decreased(P<0.05 or P<0.01), while the number of target crossovers increased(P<0.05). The ratio of NAA/Cr and Cho/Cr in the PROG+MCAO group was higher than that in the MCAO group, and the cerebral infarction volume and apoptosis rate were all significantly lower than that in the MCAO group(P<0.05). The levels of ATP, COX-2, TNF-α and IL-6 in the cerebrospinal fluid of MCAO group were significantly higher than those in sham group, and the PROG+MCAO group were significantly lower than MCAO group(P<0.05). The expression level of P2X$_7$ receptor and NF-κB in MCAO group were higher than that of the Sham group, while the PROG+MCAO group was significantly lower than that of the MCAO group(P<0.05). **CONCLUSION** PROG improves motor and cognitive function in rats with I/R brain injury by reducing neuronal apoptosis rate and alleviating neuronal damage and myelin degradation. This protective effect is closely related to its inhibition of ATP-P2X$_7$R signaling pathway.

KEYWORDS: progesterone; ischemia-reperfusion; magnetic resonance spectroscopy; apoptosis; P2X$_7$ receptor

基金项目：河南省科技发展计划(162300410246，202400410259)

作者简介：王建洲，男，副主任医师　Tel: 18537339676　E-mail: wjz66221@163.com　***通信作者：**张海三，男，博士，主任医师　Tel: (0373)3373615　E-mail: zhs386@163.com

脑卒中是全世界致残和致死的主要病种，其中脑血栓形成或脑栓塞所致血管突然闭塞所引起的缺血性脑卒中占所有脑卒中病例的 80%。目前，对缺血性脑卒中患者最充分的治疗是尽快重建大脑灌注[1]，然而再灌注可能会加剧脑损伤，即脑缺血/再灌注(ischemia-reperfusion，I/R)损伤。脑 I/R 可触发小胶质细胞和星形胶质细胞激活，释放大量腺苷三磷酸(adenosine triphosphate，ATP)，细胞外高浓度 ATP 作用于细胞膜门控离子通道 $P2X_7$ 受体($P2X_7$ receptor，$P2X_7R$)，在细胞膜形成“膜孔”，允许钙离子内流、钾离子外流和炎性细胞因子的释放，最终引起神经细胞的凋亡或坏死[2-3]。因此，抑制 ATP 介导的 $P2X_7R$ 活化和抗炎治疗可能是治疗 I/R 脑损伤的一种有前途的治疗策略[4]。

本课题组前期体外实验表明，孕酮(progesterone，PROG)可以抑制 ATP 诱导的 $P2X_7R$ 表达、“膜孔”形成和细胞内钙离子浓度升高，降低神经细胞的死亡率[5]；体内实验显示，PROG 可通过下调海马区 $P2X_7R$ 蛋白表达和清除氧自由基，改善全脑 I/R 损伤大鼠学习与记忆能力[6]。本研究拟于前期研究基础上，首先建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion，MCAO)局灶性 I/R 脑损伤模型。然后，通过神经行为功能评分、磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy，MRS)扫描、脑细胞凋亡检测等观察 PROG 对大鼠 I/R 脑损伤的保护作用，并对比观察其对 ATP-$P2X_7R$ 信号通路相关分子的影响，探讨 PROG 减轻 I/R 脑损伤的分子机制。

1 材料

1.1 试剂

PROG(美国 Sigma 公司，批号：57-83-0)；2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride，TTC，北京生化制药厂，批号：20160445)；Annexin V-F1TC/碘化丙啶(propidium iodide，PI)双染细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司，批号：556463)；ATP、白介素-6(interleukin -6，IL-6)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2，COX-2)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor alpha，TNF-α)ELISA 试剂盒均购自美国 eBscienc 公司，批号分别为 4298320，4321741，1223950，4279164；兔抗 $P2X_7R$ 抗体(以色列 Alomone Labs 公司，批号：APR-004)，兔抗核转录因子 κB(nuclear factor-kappa B，NF-κB)单抗(英国 Abcam 公司，批号：ab145954)；兔抗 β-actin 抗体(北京晶美生物技术有限公司，批号：20173700)。

1.2 动物

138 只 SPF 级健康 SD 大鼠，♂，周龄 8 周，体质量(270±20)g，由新乡实验动物中心提供，实验动物许可证号：SCXK(豫)2014-002；质量合格证号：0014875。

1.3 仪器

Anymaze 型水迷宫动物行为分析系统(美国 Anymaze 公司)；3.0T 超导磁共振扫描仪(德国西门子公司)；EPICSXL 型流式细胞仪(美国 BECKMAN COULTER 公司)；IXTI-12FL 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)；Synergy2 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)；Alpha Imager 5500 型凝胶成像系统(美国 AlphaInnotech 公司)。

2 方法

2.1 实验动物及分组

138 只 SD 大鼠随机等分为假手术(Sham)组、MCAO 组和 PROG+MCAO 组，每组各 46 只大鼠。PROG+MCAO 组：于建模型前 2 h 首次腹腔注射 PROG 芝麻油液(含 PROG 8 $mg·kg^{-1}$)，按 1 $mL·(50\ g)^{-1}$ 腹腔注射，然后每隔 24 h 腹腔给药 1 次；Sham 组和 MCAO 组：同样的时间节点腹腔注射等容积芝麻油液。各组每只大鼠均共给予腹腔注射 7 次。

2.2 动物模型

3 组大鼠均禁食不禁水 12 h，采用 10%水合氯醛(200 $mg·kg^{-1}$，腹腔注射)深度麻醉大鼠后，用聚维酮碘对皮毛和皮肤进行消毒。其中 MCAO 组和 PROG+MCAO 组大鼠参考 Zea-Longa 方法[7]制备 MCAO 局灶性 I/R 脑损伤模型：行颈部中线切口，解剖暴露右侧颈总动脉(common carotid artery，CCA)、颈内动脉(internal carotid artery，ICA)分叉和颈外动脉(external carotid artery，ECA)。使用缝线暂时阻断 ECA，动脉镊子夹住 ICA，以减少出血。在 ECA 中切割了 1 个小孔，用于将硅涂层的线栓插入 ICA 中，松开 ICA 镊子，插入约 18~20 mm 遇阻力停止。15 min 后取出线栓，恢复血流再灌注，缝合伤口和皮肤完成局灶性 I/R 脑损伤模型的建立。在手术过程中，用加热灯将大鼠直肠温度维持在(37±0.5)℃。Sham 组的大鼠暴露右侧 CCA、ICA 和 ECA，不实施 MCAO。本研究所有大鼠的外科手术均由同一个熟练的研究人员完成。

2.3 Longa 法评估大鼠神经运动功能

每组随机取 10 只大鼠，分别于建模后第 1 天

至第 7 天，由 2 名对本研究分组不知情的研究人员每天对大鼠进行神经运动功能评分。根据 Longa 法[8]评估神经运动功能缺损：评分 0，无神经功能缺损；评分 1，轻度缺损(未能完全伸展右前爪)；2 分和 3 分，中度局灶性神经功能缺损(向对侧转圈记为 2 分，向对侧倾倒记为 3 分)；评分 4 分，重度神经功能缺损(不能自发行走，意识水平下降)。神经运动功能缺损 Longa 评分越高，运动功能损伤越严重。

2.4 Morris 水迷宫试验评价大鼠认知功能

参考 Dong 等[9]报道的 Morris 水迷宫试验方法。每组选择 6 只大鼠，首先，于建模后第 1~7 天，分析计算大鼠找到目标平台的平均潜伏期。然后，于建模后第 7 天移走目标平台，再确定大鼠在 90 s 游动过程中与原目标平台所在位置的交叉次数。每次试验后，用吹风机彻底干燥大鼠并将其放回笼中，Morris 水迷宫试验重复 3 次。

2.5 脑 MRS 检查

于建立模型后第 4 天和第 7 天，每组各深麻醉 6 只大鼠，然后将大鼠俯卧位置于定制的固定架上，头部运动减至最小。使用配套有 MRS 功能软件和小关节线圈的核磁共振扫描仪采集 MRI 和 MRS 图像。采用快速自旋回波脉冲序列行三平面 T2 加权成像扫描，T2WI 扫面参数：FOV 32 mm×32 mm；矩阵 256×256；TR/TE 4 200 ms/55 ms；层厚 1 mm；间距 0 mm；脉冲重复时间/回波时间 4 min/51 s。单体素 1H-MRS 扫面，采用点分辨选择性光谱序列进行信号采集，成像参数：TR 1 500 ms，TE 135 ms，扫描时间 324 s。采集体素大小为 6 mm×6 mm×6 mm，放置在冠状 T2W 图像中心的海马和前额叶区域，尽量将体素避开脑室。利用自动分析软件对 MRS 光谱信号进行分析和数据处理。每个 MRS 代谢物由其每百万核谱位置所识别，包括氮乙酰门冬氨酸(N-acetylaspartate，NAA)2.02、肌酸(creatine，Cr) 3.05 和胆碱化合物(choline compounds，Cho) 3.20，定量分析峰下的代谢物面积。使用 Cr 峰作为内部光谱参考的相对定量方法，对 NAA/Cr、CHO/Cr 进行统计学分析。

2.6 脑组织 TTC 染色观测脑组织梗死情况

于建模后第 7 天，深麻醉后将脑组织–20 ℃冻存 10 min 后进行冠状切片。然后，置入浓度为 20 g·L^{-1} 的 TTC 磷酸缓冲液(pH 7.4)中，37 ℃避光恒温孵育 30 min，然后采用 40 g·L^{-1} 的多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定 24 h 后拍照。

2.7 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡

于建模后第 7 天，每组各深麻醉 3 只大鼠。取右侧脑组织，然后采用机械-酶消化法把脑组织制成单细胞悬液。Annexin V-FITC/PI 试剂盒进行染色后，分别采用荧光显微镜观察细胞染色情况和流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.8 ELISA 法检测大鼠脑脊液 ATP、IL-6、TNF-α 和 COX-2 的含量

分别于建立模型后第 4 天和第 7 天每组各深麻醉 6 只大鼠。在大鼠枕下做一矢状切口，解剖并收集大鼠脑脊液。然后按照笔者所在团队之前报道[10]的方法使用 ELISA 试剂盒测定脑脊液样本的 ATP、IL-6、COX-2 和 TNF-α 的含量。100 μL 待测脑脊液加入 96 孔黑色透明底板，然后置于 700 r·min^{-1} 的轨道板振动筛，震荡 2 min，采用多孔板读数器测量荧光强度，而荧光强度与待测大鼠脑脊液中相应的目标蛋白浓度成正比。

2.9 Western blotting 检测大鼠脑组织 P2X$_7$R 和 NF-κB 的表达

于建模后第 7 天每组各深麻醉 3 只大鼠，取右侧脑组织，提取总蛋白。每组取等量蛋白质经 10% SDS-PAGE 进行分离，然后再经电转移到 PVDF 膜上，并用 5%脱脂奶粉封闭。膜与原代抗体兔抗 P2X$_7$R 抗体、NF-κB 抗体和 β-actin 抗体室温下孵育 2 h 后漂洗，然后再用羊抗兔 IgG 室温下孵育 2 h。漂洗后按化学发光试剂盒操作说明进行发光实验。使用 Alpha Imager 5500 凝胶成像系统进行拍照，相对密度用凝胶成像分析系统对蛋白条带进行灰度分析。

2.10 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件处理数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析或 t 检验，P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠神经运动功能评分

Sham 组大鼠 Longa 评分 0 分，无神经运动功能损害；PROG+MCAO 组大鼠神经运动功能 Longa 评分较 MCAO 组改善明显，其中在 PROG 治疗后的第 5~7 天，Longa 评分数值组间比较差异均有统计学意义($t_{5\text{天}}$=2.747 4，$P_{5\text{天}}$=0.013 2；$t_{6\text{天}}$=3.391 6，$P_{6\text{天}}$=0.003 3；$t_{7\text{天}}$=4.326 1，$P_{7\text{天}}$=0.000 4)，提示 PROG 治疗对 MCAO 诱导的神经运动功能损

伤具有保护作用。结果见图 1。

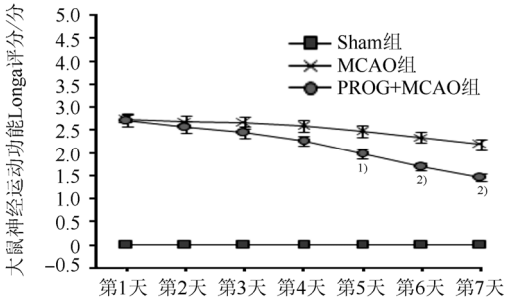

图 1 各组大鼠神经行为功能 Longa 评分变化情况

与 MCAO 组比较，1)P<0.05，2)P<0.01。

Fig. 1 Changes of Longa score of neurobehavioral function in rats of each group

Compared with MCAO group, 1)P<0.05, 2)P<0.01.

3.2 大鼠认知行为组间比较

Morris 水迷宫试验中，MCAO 组大鼠平均潜伏期大于 Sham 组，而 PROG+MCAO 组平均潜伏期又较 MCAO 组降低，其中第 4~7 天，组间比较差异均有统计学意义(P<0.05)。Sham 组、MCAO 组和 PROG+MCAO 组大鼠平均目标交叉次数分别为(6.3±1.5)，(2.2±0.4)和(4.2±1.3)次，组间比较差异具有统计学意义(F=18.45，P=0.000 1)。结果见表 1。

3.3 脑 MRS 检查结果

建立模型后第 4 天和第 7 天，MCAO 组与 Sham 组相比，表现为 NAA/Cr 和 Cho/Cr 比值下降(P<0.05)。而经 PROG 预处理后，PROG+MCAO 组与 MCAO 组相比，NAA/Cr 比值和 Cho/Cr 比值升高，组间单因素方差分析均显示差异具有统计学意义(P<0.05)。结果见表 2。

表 1 Morris 水迷宫实验中各组大鼠平均潜伏期($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab. 1 Average latency of rats in each group in Morris water maze test($\bar{x}\pm s$, n=6) s

分组	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
Sham 组	49.7±5.3	48.2±5.6	43.5±5.7	34.6±3.6	26.5±2.9	19.7±2.6	18.2±2.8
MCAO 组	53.9±6.5	52.6±6.9	48.2±5.9	44.6±3.8[1)]	38.4±3.6[1)]	36.4±3.7[1)]	33.5±3.5[1)]
PROG+MCAO 组	52.8±5.8	50.4±6.7	46.1±4.5	38.5±4.2[1)2)]	34.5±3.3[1)2)]	29.9±3.1[1)2)]	27.4±2.7[1)2)]

注：与 Sham 组比较，1)P<0.01；与 MACO 组比较，2)P<0.01。

Note: Compared with Sham group, 1)P<0.01; compared with MACO group, 2)P<0.01.

表 2 各组大鼠 MRS 检查结果组间比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab. 2 Comparison of MRS results in rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=6)

分组	NAA/Cr		Cho/Cr	
	第 4 天	第 7 天	第 4 天	第 7 天
Sham 组	1.41±0.27	1.47±0.22	1.16±0.19	1.13±0.18
MCAO 组	1.01±0.17[1)]	0.87±0.19[1)]	0.67±0.14[1)]	0.63±0.13[1)]
PROG+MCAO 组	1.24±0.22[1)2)]	1.18±0.24[1)2)]	0.88±0.15[1)2)]	0.85±0.14[1)2)]

注：与 Sham 组比较，1)P<0.05；与 MACO 组比较，2)P<0.05。

Note: Compared with Sham group, 1)P<0.05; compared with MACO group, 2)P<0.05.

3.4 脑组织梗死和细胞凋亡情况

Sham 组大鼠脑组织 TTC 染色无苍白色梗死组织，脑细胞 Annexin V-FITC/PI 双染细胞荧光度极弱；MCAO 组大鼠部分脑组织 TTC 染色呈苍白色，Annexin V-FITC/PI 双染显示荧光明显增强，即梗死脑组织和凋亡细胞明显增多；PROG+MCAO 组苍白色梗死脑组织体积明显小于 MCAO 组，Annexin V-FITC/PI 双染荧光强度明显弱于 MCAO 组，即 PROG+MCAO 组脑组织梗死体积和凋亡细胞均少于 MCAO 组，结果见图 2。流式细胞仪检测 Sham 组、MCAO 组和 PROG+MCAO 组平均细胞凋亡率分别为(4.4±0.6)%，(32.4±3.7)%和(21.5±2.8)%，MCAO 组明显高于 Sham 组，而 PROG+MCAO 组明显低于 MCAO 组，组间单因素方差分析结果显示，组间比较差异具有统计学意义(F=168.79，P=0.000 0)。

3.5 脑脊液 ATP、IL-6、TNF-α 和 COX-2 含量组间比较

建立模型后第 4 天和第 7 天，与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠脑脊液 ATP、IL-6、TNF-α 和 COX-2 含量明显增加，而经 PROG 治疗的 PROG+MCAO 组大鼠脑脊液 ATP、IL-6、TNF-α 和 COX-2 含量均低于 MCAO 组，单因素方差分析显示组间差异均具有统计学意义(P<0.05)。结果见表 3。

3.6 脑组织 P2X$_7$R 和 NF-κB 蛋白表达情况组间比较

建立模型后第 7 天，MCAO 组大鼠脑组织 P2X$_7$R 蛋白和 NF-κB 蛋白表达较 Sham 组明显升高(P<0.05)，而 PROG+MCAO 组大鼠脑组织 P2X$_7$R 和 NF-κB 蛋白表达水平低于 MCAO 组，蛋白表达水平灰度值组间比较差异均有统计学意义(P<0.05)。结果见图 3~4。

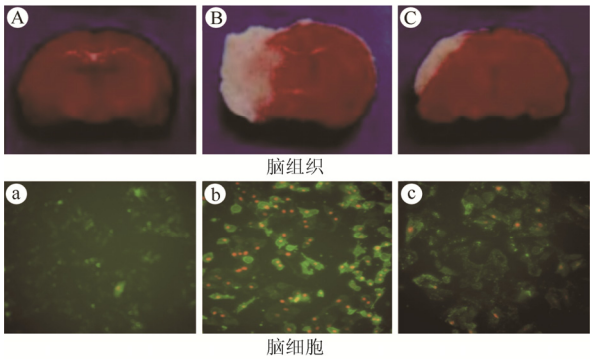

图 2　各组大鼠脑组织梗死和脑细胞凋亡情况观察(200×)

A、a–Sham 组；B、b–MCAO 组；C、c–PROG+MCAO 组。

Fig. 2　Observation of cerebral infarction and apoptosis in rats of each group(200×)

A, a–Sham group; B,b–MCAO group; C, c–PROG+MCAO group.

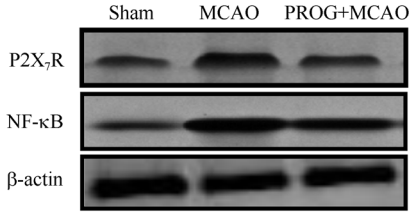

图 3　大鼠脑组织中 $P2X_7R$ 和 NF-κB 蛋白表达水平

Fig. 3　Expression of $P2X_7R$ and NF-κB protein in rats' brain tissue

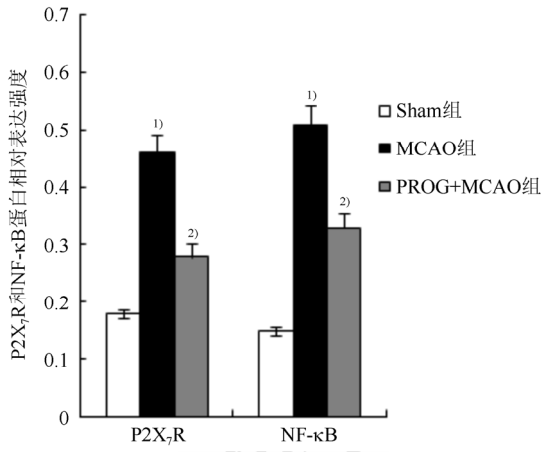

图 4　大鼠脑组织 $P2X_7R$ 和 NF-κB 蛋白灰度值组间比较

与 Sham 组比较，$^{1)}P<0.05$；与 MCAO 组比较，$^{2)}P<0.05$。

Fig. 4　Gray value comparision of $P2X_7R$ and NF-κB in rats' brain tissue

Compared with Sham group, $^{1)}$ $P<0.05$; compared with MCAO group, $^{2)}P<0.05$.

4　讨论

I/R 脑损伤是除了脑卒中原发性损伤外，由于药物或其他措施干预后缺血脑组织恢复血液供应引起的继发性脑损伤，又称二次损伤，与损伤区局部水肿、缺血/缺氧、氧化应激、炎症反应等所致神经细胞自噬、凋亡和坏死有关[11]。因此，如何在快速恢复缺血性脑卒中血供的同时减少 I/R 脑损伤，一直都是关于缺血性脑卒中药物研发的热点和难点[12]。近年来研究表明，PROG 既具有营养神经细胞的作用，又可以通过减轻脑水肿、抑制炎症反应、清除氧自由基、缓解神经兴奋毒性等效应而具有保护神经细胞作用[13-14]。本研究通过建立 MCAO 局灶性 I/R 脑损伤模型，采用 PROG 进行预处理和干预治疗以探讨 PROG 对 I/R 脑损伤的可能保护作用，结果显示，PROG+MCAO 组大鼠神经运动功能 Longa 评分明显低于 MCAO 组，即 PROG+MCAO 组大鼠运动功能损伤明显减轻；PROG+MCAO 组大鼠 Morris 水迷宫试验平均潜伏期明显短于 MCAO 组，目标交叉次数明显多于 MCAO 组，即 PROG+MCAO 组大鼠认知功能损害轻于 MCAO 组大鼠。上述研究结果提示 PROG 可以改善 I/R 脑损伤大鼠的运动功能和认知功能损害。

MRS 是一种非侵入性和非放射性检测病变区化学代谢产物浓度改变的新技术方法，本研究采用 MRS 检测了各组大鼠脑组织 NAA 和 Cho 的浓度。NAA 是一种特殊的氨基酸，主要存在于神经元和轴突中，其浓度可一定程度反映神经元的密度、缺失和功能失活。神经元损伤越明显，大脑中 NAA 含量越低[15]。Cho 是乙酰胆碱的重要神经递质前体化合物，其代表神经元髓鞘降解产物，与髓鞘的完整性密切相关[16]。有研究显示，维持额叶皮质和海马区 Cho 的稳定含量对记忆、识别和情绪行为至关重要[17]。本实验研究中，MCAO 组大鼠脑组织 NAA 和 Cho 含量较 Sham 组明显下降，PROG+MCAO 组大鼠脑组织 NAA 和 Cho 含量又明显高于 MCAO 组大鼠。另外，本研究中

表 3　大鼠脑脊液 ATP、IL-6、TNF-α 和 COX-2 含量组间比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab. 3　Comparison of ATP, IL-6, TNF-α and COX-2 in cerebraspiral fluid of rats($\bar{x}\pm s$, n=6)

分组	ATP/nmol·L^{-1}		IL-6/pg·L^{-1}		TNF-α/pg·L^{-1}		COX-2/pg·L^{-1}	
	第 4 天	第 7 天	第 4 天	第 7 天	第 4 天	第 7 天	第 4 天	第 7 天
Sham 组	0.31±0.09	0.34±0.08	0.71±0.29	0.79±0.11	0.32±0.02	0.33±0.03	0.75±0.12	0.77±0.13
MCAO 组	0.73±0.11$^{1)}$	0.69±0.16$^{1)}$	1.68±0.23$^{1)}$	1.64±0.16$^{1)}$	0.51±0.09$^{1)}$	0.49±0.08$^{1)}$	1.39±0.18$^{1)}$	1.33±0.13$^{1)}$
PROG+MCAO 组	0.53±0.16$^{2)}$	0.47±0.11$^{2)}$	1.37±0.24$^{2)}$	1.19±0.17$^{2)}$	0.45±0.04$^{2)}$	0.37±0.05$^{2)}$	1.11±0.16$^{2)}$	0.95±0.12$^{2)}$

注：与 Sham 组比较，$^{1)}P<0.05$；与 MACO 组比较，$^{2)}P<0.05$。

Note: Compared with Sham group, $^{1)}P<0.05$; compared with MACO group, $^{2)}P<0.05$.

MCAO 组大鼠神经细胞凋亡率高于 Sham 组，PROG+MCAO 组大鼠神经细胞凋亡率明显低于 MCAO 组，这一结果与 MRS 检测 NAA 和 Cho 含量的变化相一致，说明 PROG 可以减少神经细胞凋亡、减轻神经元损伤和髓鞘降解，进而能够改善 I/R 脑损伤所致的大鼠的运动和认知功能损害。

在 I/R 脑损伤模型中，首先急性缺血缺氧可直接引起不可逆的神经元和胶质细胞凋亡或坏死。其次，缺血缺氧又可引起持续的脑组织炎症，是进一步加重 I/R 脑损伤的第二机制。脑组织炎症中小胶质细胞、星形胶质细胞等释放 ATP 增加，细胞外高浓度的 ATP 可激活小胶质细胞膜上 $P2X_7R$ 形成阳离子和<900 Da 的有机物质通过的“膜孔”通道[3,5]。“膜孔”通道开放加速钙离子内流，钾离子外流，进而激活下游信号分子(NF-κB、JNK、P38 和 PI3K/Akt 等)和诱导炎症介质(COX-2、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 等)的释放增加[18-19]。炎症介质释放至细胞外，反过来加速神经元的损伤、胶质细胞进一步激活和 ATP 释放，形成上述脑组织炎症的恶性循环环路，是 I/R 脑损伤的重要病理生理过程[20]。本研究中，MCAO 组大鼠脑脊液 ATP 含量、脑组织 $P2X_7R$、NF-κB 表达水平以及脑脊液炎症介质 COX-2、IL-6 和 TNF-α 含量均明显高于 Sham 组，提示 ATP-$P2X_7R$ 信号通路与 I/R 脑损伤模型脑组织炎症密切相关。经 PROG 预处理和同期治疗的 PROG+MCAO 组，上述指标明显低于 MCAO 组，提示 PROG 能够抑制 I/R 脑损伤所致的 ATP-$P2X_7R$ 轴和下游炎症因子的激活。

综上所述，PROG 通过抑制 ATP-$P2X_7R$ 信号通路而打破神经元和神经胶质细胞损伤的恶性循环，可能是其降低神经细胞凋亡率，减轻神经元损伤、髓鞘降解和改善 I/R 脑损伤大鼠运动和认知损害的分子机制。

REFERENCES

[1] XU R, YIN S W, WANG Z, et al. The treatment of acute ischemic stroke: Comparison between stent-retrieval thrombectomy and intraarterial thrombolysis [J]. J Interv Radiol(介入放射学杂志), 2016, 25(12): 1027-1030.

[2] ZHENG B, YING Y L, ZHANG S C, et al. Effects of $P2X_7$ receptor antagonist BBG on cognitive dysfunction of elderly rats induced by isoflurane anesthesia [J]. Anat Res(解剖学研究), 2016, 38(3): 165-168.

[3] WEI L Y, CASELEY E, LI D L, et al. ATP-induced P2X receptor-dependent large pore formation: How much do we know? [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 5.

[4] DEL PUERTO A, FRONZAROLI-MOLINIERES L, PEREZ-ALVAREZ M J, et al. ATP-$P2X_7$ receptor modulates axon initial segment composition and function in physiological conditions and brain injury [J]. Cereb Cortex, 2015, 25(8): 2282-2294.

[5] LI L, WANG J J, YANG K L, et al. Correlation study of H_2S inhibits the apoptosis of SH-SY_5Y cells induced by high concentration of ATP and $P2X_7$ receptors [J]. Chin J Neuroanat(神经解剖学杂志), 2017, 33(2): 123-130.

[6] LI X J, HE R F, LI S, et al. Effects of progesterone on learning and memory and $P2X_7$ receptor expression in the hippocampus after global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志), 2012, 28(5): 472-475.

[7] LU C, DU X, HE X L, et al. Neuroprotective effect of active components of Xiaoxuming decoction on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats during early recovery period [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2016, 32(7): 938-944.

[8] HUANG J, YOU X F, LIU W L, et al. Electroacupuncture ameliorating post-stroke cognitive impairments via inhibition of peri-infarct astroglial and microglial/macrophage P2 purinoceptors-mediated neuroinflammation and hyperplasia [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 480.

[9] DONG X R, LUO M, HUANG G D, et al. Relationship between irradiation-induced neuro-inflammatory environments and impaired cognitive function in the developing brain of mice [J]. Int J Radiat Biol, 2015, 91(3): 224-239.

[10] LI Z, ZHANG H S, LI X J, et al. Protective effect of progesterone on brain injury induced by radiation in mice and its molecular mechanism [J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2018, 53(2): 204-209.

[11] DEGRACIA D J. Towards a dynamical network view of brain ischemia and reperfusion. Part I: Background and preliminaries [J]. J Exp Stroke Transl Med, 2010, 3(1): 59-71.

[12] LU Y, HAN H M. Progress in the clinical transformation study of neuroprotectants in ischemic stroke [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(6): 683-688.

[13] 雷贤明, 曹云涛. 孕酮神经保护作用研究进展[J]. 海南医学, 2014, 25(4): 544-546.

[14] LI X J, WEI L Y, LI C K, et al. Neuroprotective effect of progesterone on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and its mechanism [J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志), 2015, 31(3): 231-234.

[15] HE J, ZHAO C K, LIU W L, et al. Neurochemical changes in the hippocampus and prefrontal cortex associated with electroacupuncture for learning and memory impairment [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(2): 709-716.

[16] STOILJKOVIC M, LEVENTHAL L, CHEN A, et al. Concentration-response relationship of the α7 nicotinic acetylcholine receptor agonist FRM-17874 across multiple *in vitro* and *in vivo* assays [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 97(4): 576-589.

[17] LIU H D, WANG X M. Correlation of iron deposition and change of gliocyte metabolism in the basal Ganglia region evaluated using magnetic resonance imaging techniques: An *in vivo* study [J]. Arch Med Sci, 2016, 12(1): 163-171.

[18] BAI H Y, LI A P. $P2X_7$ receptors in cerebral ischemia [J]. Neur Bull, 2013, 29(3): 390-398.

[19] YANG Y, HAN C Y, GUO L, et al. Effect of 1-methyltryptophan on the activation of microglia in rat model of cerebral ischemia reperfusion [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(12): 1776-1781.

[20] LAMBERTSEN K L, BIBER K, FINSEN B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(9): 1677-1698.

收稿日期：2019-06-09

(本文责编：李艳芳)