

## 研究论文

# A2AR敲除对新生小鼠缺氧缺血脑区cyt C表达的影响

任素伟<sup>1</sup> 高勇<sup>1</sup> 周定富<sup>1</sup> 范海玲<sup>1</sup> 陈江帆<sup>2</sup> 王小同<sup>1</sup> 陈翔<sup>1\*</sup><sup>1</sup>温州医学院附属第二医院康复科, 温州 325027; <sup>2</sup>美国波士顿大学医学院, 波士顿 02215

**摘要** 腺苷(adenosine)A2A受体(A2A receptor, A2AR)作为腺苷四种受体亚型之一, 对新生鼠脑缺氧缺血的作用尚存在争议, 探讨其作用机制将有助于新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)的临床治疗。为此, 该实验观察了新生鼠脑缺氧缺血后A2AR敲除对其神经行为学的影响; 采用TUNEL技术结合HE染色检测神经细胞凋亡; 采用免疫组织化学法检测活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase 3)及胞浆中细胞色素C(cytochrome C, cyt C)的表达。结果发现, A2AR敲除损伤了新生鼠神经行为功能, 使神经细胞的凋亡和胞浆中cyt C的表达增加、caspase 3活化增强。其中, 在脑缺氧缺血后的1, 3, 7 d, 神经细胞凋亡和caspase 3活化较野生型显著增加( $P<0.01$ ), 而胞浆中cyt C的表达仅在脑缺氧缺血后的1, 3 d显著增加( $P<0.01$ ), 且其表达与神经细胞凋亡、caspase 3的活化均呈显著正相关。这提示, A2AR敲除后可能通过促使cyt C由线粒体释放出来增加新生鼠脑缺氧缺血后神经细胞的凋亡。

**关键词** A2AR; 敲除; 脑缺氧缺血; 新生鼠; 凋亡; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3; 细胞色素C

腺苷(adenosine)A2A受体(A2A receptor, A2AR)作为腺苷这一重要神经调质的四种受体亚型(A1R、A2AR、A2BR和A3R)之一, 在体内广泛分布, 能调节神经系统、心血管系统、免疫系统等多种系统的生理活动, 并介导多种疾病的效应过程。在中枢神经系统中, A2AR高表达于纹状体等部位, 在海马、皮层中也有一定表达。A2AR在机体内作用复杂, 不同模型、不同反应细胞中, A2AR可产生不同的生物学效应, 如阻断A2AR可减少星形孢菌素引起的海马神经元的凋亡<sup>[1]</sup>; 但也有研究表明, A2AR激活可以显著抑制内毒素诱导的炎性因子的释放<sup>[2]</sup>; A2AR缺失使得小鼠对炎症刺激因子的耐受程度降低<sup>[3]</sup>。当脑组织受到缺氧缺血刺激时, 能量代谢紊乱, ATP大量降解, 致使腺苷大量释放。成倍增加的腺苷可与A2AR结合, 产生重要的生物学效应。然而, A2AR在新生鼠与成年鼠缺血性脑损伤中的作用不尽相同。在大鼠局灶性脑缺血中, 选择性A2AR拮抗剂可减轻神经缺损症状、缩小脑梗死面积<sup>[4-7]</sup>, Chen等<sup>[8]</sup>采用A2AR基因敲除小鼠建立局灶性脑缺血模型进一步验证了A2AR失活可以减轻成年鼠缺血性脑损伤。然而, A2AR在新生鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxia-ischemia brain damage, HIBD)中的作用尚存有争

议: A2AR拮抗剂在新生大鼠HIBD中起到神经保护作用<sup>[9]</sup>, 而Adén等<sup>[10]</sup>则证实A2AR敲除加重了新生鼠HIBD后的脑损伤程度。

新生鼠HIBD模型可充分模拟新生儿的危重病——新生儿缺氧缺血性脑病的病理过程, 其发病机制涉及兴奋性毒性、钙超载、氧化应激、细胞凋亡等多环节的共同作用。细胞凋亡被认为在新生鼠HIBD神经细胞死亡中起主导作用, 凋亡途径有内、外源性之分, 线粒体途径作为重要的内源性凋亡途径, 在新生鼠HIBD后的细胞凋亡中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。缺氧缺血等刺激因素作用可使线粒体受到破坏、线粒体膜通透性增加, cyt C和其他死亡因子(如凋亡诱导因子AIF)可释放到胞浆中, 胞浆内cyt C与凋亡蛋白活性因子1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合使之活化, 后者可导致caspase 9的自身剪切与活化, 活化的caspase 9可激活caspase 3, 进而导致细胞凋亡<sup>[13-16]</sup>。

基于以上研究背景, 本实验采用改良Rice法建

收稿日期: 2012-03-21 接受日期: 2012-04-11

浙江省科技厅钱江人才项目(No.2009R10024)和温州市科技局对外合作项目(No.H20110018)资助项目

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

立新生小鼠HIBD模型,以对缺血刺激敏感的皮层及海马CA1区作为研究脑区,探讨A2AR敲除对新生鼠脑缺氧缺血后神经行为学的影响及对皮层、海马CA1区神经细胞凋亡及胞浆cyt C表达的影响,旨在明确A2AR敲除对新生鼠HIBD的作用及相关机制,为临床寻找HIE新的治疗靶点提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 以C57/BL6 A2AR基因杂合子小鼠作为种鼠,在温州医学院动物实验中心SPF实验室[合格证号:SYXK(浙)2005-0061]配种繁殖。选择7 d龄新生小鼠,雌雄不限,按以下标准筛选动物:(1)小鼠体重在(3.0±0.5) g范围内;(2)平面翻正反射成绩高于正常值(2 s)两倍或两倍以上的小鼠要剔除。

1.1.2 主要试剂和仪器 Anti-active caspase 3 antibody(ab2302)购自Abcam公司; Cytochrome C(H19) pAb(BS1089)购自Bioworld公司; PV-6001二步法试剂盒、DAB底物液、苏木精复染剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司; TUNEL检测试剂盒、蛋白酶K购自Roche公司; 引物由上海生工生物技术有限公司合成; 苏木精-伊红染液、Tris-HCl购自江苏碧云天生物技术有限公司; 水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司; BX51光学显微镜为日本Olympus公司产品; Image-Pro Plus 6.0(IPP 6.0)彩色医学图像分析系统为美国Media Cybernetics公司产品; 小鼠缺氧装置为自制。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组 将A2AR敲除型(A2AR(-/-), KO)和同期野生型(A2AR(+/+), WT)这两种基因型的C57/BL6新生小鼠(7 d龄)按照完全随机的分组方法分别分成假手术组(Sham-operated, S)、模型组(Model, M)。其中,模型组按照HIBD后取标本时间的不同又分为敲除型造模后1 d组(MKO1)、野生型造模后1 d组(MWT1),敲除型造模后3 d组(MKO3)、野生型造模后3 d组(MWT3),敲除型造模后7 d组(MKO7)、野生型造模后7 d组(MWT7),连同两种基因型的假手术组(SKO组和SWT组),共分为8个实验动物组,每组取小鼠8只( $n=8$ ),共64只。

1.2.2 模型制备 采用改良Rice法建立7 d龄新生小鼠缺氧缺血脑损伤模型(HIBD模型)。分离7 d

龄新生小鼠左侧颈总动脉,双重结扎,一次性缝合切口,返回母鼠身边喂养休息后吸入8% O<sub>2</sub>和92% N<sub>2</sub>的混合气体1 h。假手术组模拟皮肤切开分离颈总动脉,但不结扎,随即缝合伤口,无缺氧,返回母鼠身边,在模型组缺氧缺血后1 d与假手术模拟组同时进行新生鼠短期神经行为学评定。

1.2.3 神经行为学观察 (1)缺氧过程全程记录小鼠的体征变化,包括皮肤颜色变化、活动量、有无激惹或嗜睡等;(2)造模后1 d观察小鼠体征变化,包括肢体无力、侧向转圈情况等;(3)SKO组和SWT组分别各取10只、MKO组和MWT组分别各取30只于HIBD后1 d,进行三种新生鼠短期神经行为学评定:①翻正反射(righting reflex):从小鼠仰卧位置开始计时,到小鼠自行翻身成俯卧位、前后爪放平时计时停止;②悬崖逃避反射(cliff aversion reflex):将小鼠前爪悬于桌面边缘之外,桌面离地1 m,记录小鼠扭转身体(>90°)离开桌面边缘所用的时间;③趋地反射(geotaxis reflex):将小鼠头朝下置于倾斜度为40°的木板上,记录小鼠扭转身体(扭转角度>90°)为头朝上时所用的时间。若②和③项反射在20 s内不能完成,所用时间记为20 s。

1.2.4 标本处理及PCR鉴定基因型 按照实验分组,每组小鼠至相应时间点(假手术组和HIBD后1 d组同时取材)时,以10%水合氯醛麻醉后进行常规灌注、取脑、固定、脱水、石蜡包埋、冠状位切片,切片厚约4 μm。剪尾进行基因型鉴定:取0.5~1.0 cm小鼠尾巴,加入240 μL裂解液和10 μL蛋白酶K,55 °C水浴,振荡过夜;加入5 mol/L NaCl溶液,充分混匀后,置于-20 °C冰箱中30 min,于4 °C 13 000 r/min离心10 min后取上清,加入无水乙醇,离心沉淀DNA,弃去上清,加入70%乙醇混匀后离心,弃上清,干燥,加1×TE溶解DNA,即可用作PCR反应模板。

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。采用2%琼脂糖凝胶电泳,电压120 V,电泳30 min后,凝胶成像系统观察PCR反应结果。

1.2.5 脑组织病理光镜观察 小鼠脑组织切片常规脱蜡水化,按照说明书步骤进行苏木素-伊红(HE)

染色,光镜下观察脑组织病理学改变情况。

**1.2.6 TUNEL法检测神经细胞凋亡** 石蜡切片常规脱蜡水化,按照TUNEL试剂盒所示步骤进行操作,封片后,在统一放大倍数(400×)下,于海马CA1区、皮层分别随机选取5个阳性视野,采用美国IPP6.0分析软件进行图像分析,测定阳性细胞的累积吸光度值(ID)。

**1.2.7 免疫组织化学法检测caspase 3的活化** 每只动物随机取切片5张,采用免疫组化二步法检测皮层、海马CA1区活化caspase 3的表达,之后将切片置于高倍镜(400×)下,于皮层、海马CA1区均随机选取5个视野摄片,用美国IPP6.0分析软件进行图像分析,测定平均吸光度值(MD)。

**1.2.8 免疫组织化学法检测胞浆cyt C的表达** 每只动物随机取切片5张,采用免疫组化二步法检测皮层、海马CA1区胞浆cyt C的表达,封片后置于高倍镜(400×)下,于皮层、海马CA1区均随机选取5个视野摄片,用美国IPP6.0分析软件行图像分析,测定平均吸光度值(MD)。

### 1.3 统计学处理

所有资料均以均数±标准差表示,并进行正态性检验,应用SPSS16.0统计软件对数据进行分析,多组间比较用单因素方差(ANOVA)分析,组间比较用*t*检验,两组数据相关性采用Pearson线性相关分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义, $P<0.01$ 为差异具有显著性统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠缺氧时的神经行为学观察

缺氧10 min,动物开始烦躁不安;缺氧15~20 min,动物出现呼吸加深、加快,口周发绀;缺氧30 min,大部分动物开始站立不稳,偶有激惹现象;缺氧40~50 min,大部分动物活动明显减少、发绀明显;

缺氧1 h,几乎所有小鼠出现不能翻身、嗜睡现象。

缺氧缺血后1 d,模型组大部分小鼠出现走路不稳、向右侧旋转、肢体抖动现象,假手术组动物行走未见明显异常。

### 2.2 新生鼠短期神经行为学评定

模型组小鼠完成翻正反射、悬崖逃避反射、趋地反射的时间都明显长于假手术组小鼠( $P<0.01$ ),MKO组较MWT组各反射完成的时间均稍长(表1,翻正反射:  $P<0.01$ ; 趋地反射:  $P<0.01$ ; 悬崖逃避反射:  $P<0.05$ )。

### 2.3 小鼠基因型鉴定结果

PCR结果: 出现一条180 bp的条带,代表为A2AR(+/+),即野生型(WT)小鼠;出现分别为180 bp和330 bp的两条带,代表为A2AR(+/-),即杂合型小鼠;出现一条330 bp的条带,代表为A2AR(-/-),即敲除型(KO)小鼠(图1)。

### 2.4 脑组织病理光镜观察结果

两种基因型对照组皮层、海马CA1区细胞结构完整、形态正常、胞浆淡染、核膜清晰、核仁明显(图2A和图2D)。模型组缺氧缺血侧皮层、海马CA1区的神经细胞结构模糊、胞体肿胀、胞浆水肿,出现不同程度的核深染、细胞皱缩、空泡化现象,MKO1(图2B和图2E)病变最为明显,敲除型(图2B和图2E)的病例状况较同一时间点野生型(图2C和图2F)严重。

### 2.5 TUNEL技术检测细胞凋亡

TUNEL染色阳性细胞表现为胞浆不着色、胞核染成棕黄色,核固缩,图片经Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析后,TUNEL阳性细胞比例用累积吸光度值(ID)来表示(ID值越大,TUNEL阳性细胞比例越大)。实验结果显示:假手术组皮层、海马CA1区均偶可见极少量TUNEL阳性细胞表达(SK0: 图3A和图3D),SK0组与SWT组比较,差异无统计学意义。

表1 A2AR敲除对新生小鼠HIBD后短期神经行为学的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 The effect of A2AR knockout on the neurological behavior after HIBD in neonatal mice( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Groups	翻正反射(秒) Righting reflex(s)	悬崖逃避反射(秒) Cliff aversion reflex(s)	趋地反射(秒) Geotaxis reflex(s)
SKO	3.200 0±0.632 5	11.000 0±1.054 1	7.300 0±0.213 4
MKO	5.200 0±0.664 4* <sup>△</sup>	15.966 7±1.351 5* <sup>#</sup>	15.766 7±0.378 1* <sup>△</sup>
SWT	2.900 0±0.737 9	10.800 0±1.123 6	7.600 0±0.788 8
MWT	3.966 7±0.556 1*	15.366 7±0.889 9*	13.633 3±0.935 3

\* $P<0.01$ ,与同一基因型假手术组比较;<sup>△</sup> $P<0.01$ ,与野生型模型组比较;<sup>#</sup> $P<0.05$ ,与野生型模型组比较。

\* $P<0.01$  vs S group in the same genotype; <sup>△</sup> $P<0.01$  vs A2AR(WT) group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs A2AR(WT) group.

HIBD后, 缺氧缺血侧皮层、海马CA1区TUNEL阳性细胞表达均显著增加, 1 d后达高峰, 至7 d相较假手术组仍有显著差异( $P<0.01$ ), 同基因型模型组各时间点间比较均有显著差异( $P<0.01$ ), HIBD后同一时间点, *A2AR*敲除型(图3B和图3E)缺氧缺血侧皮层、海马CA1区TUNEL阳性细胞的表达均较野生型(图3C和图3F)显著增加( $P<0.01$ , 图3和图4)。

## 2.6 免疫组织化学法观察caspase 3的活化

缺氧缺血侧皮层、海马CA1区活化caspase 3的阳性表达表现为胞浆及部分胞核染成棕黄色颗粒。图片经过 Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析后, 阳性表达强度用平均吸光度值(MD)来表示(MD越大, 活化caspase 3的表达越强)。实验结果显示: 假手术组皮层、海马CA1区均偶可见极少量活化caspase 3



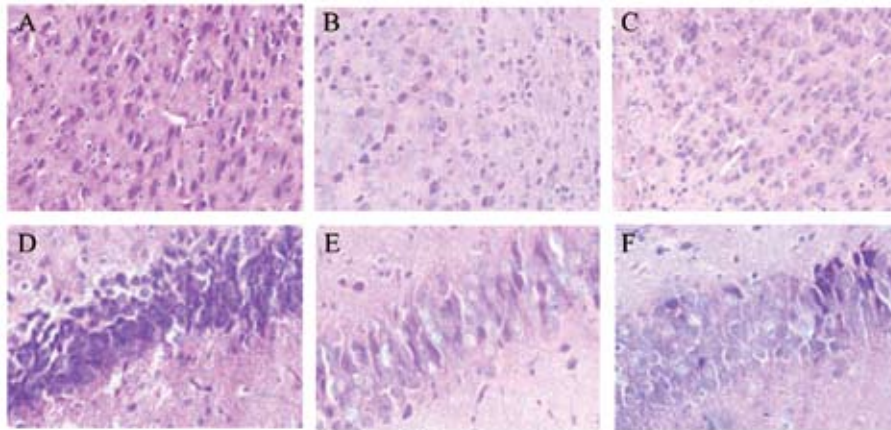
图1 *A2AR*基因鉴定结果

Fig.1 The result of *A2AR* gene identification

表达(图5A和图5D), SKO组与SWT组比较, 差异无统计学意义。HIBD后, 缺氧缺血侧皮层、海马CA1区活化caspase 3的表达增加, 1 d后达高峰, 之后逐渐降低, 至7 d时相较对照组仍有显著差异( $P<0.01$ ), 同一基因型模型组各时间点间比较, 差异均有显著性( $P<0.01$ )。HIBD后*A2AR*敲除型(图5B和图5E)缺氧缺血侧皮层、海马CA1区活化caspase 3的表达均较同一时间点野生型(图5C和图5F)显著增加( $P<0.01$ , 图5和图6)。

## 2.7 免疫组织化学法观察胞浆cyt C的表达

缺氧缺血侧皮层、海马CA1区cyt C阳性表达表现为胞浆染成棕黄色。图片经过 Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析后, 阳性表达强度用平均吸光度值(MD)表示(MD越大, 胞浆cyt C表达越强)。实验结果显示: (1)皮层: SKO组(图7A)和SWT组均可见少量胞浆cyt C表达, 差异无统计学意义。HIBD后, 缺氧缺血侧胞浆cyt C的表达迅速增加, 1 d后达高峰, 随后逐渐降低, 其中敲除型小鼠HIBD后任一时间点均较假手术组显著增加( $P<0.01$ ), 而野生型仅MWT1、MWT3组相较SWT组有显著差异( $P<0.01$ )。HIBD后同一时间点, 敲除型(图7B)胞浆cyt C表达多于野生型(图7C), 其中HIBD后1, 3 d两种基因型间有显著差异( $P<0.01$ )。 (2)海马CA1区: SKO组(图7D)和SWT组均可见少量胞浆cyt C表达, 差异无统计学意义。HIBD后, 缺氧缺血侧胞浆中cyt C表达迅速增加, 1 d后达高峰, 随后逐渐降低, 至7 d时相较同基因

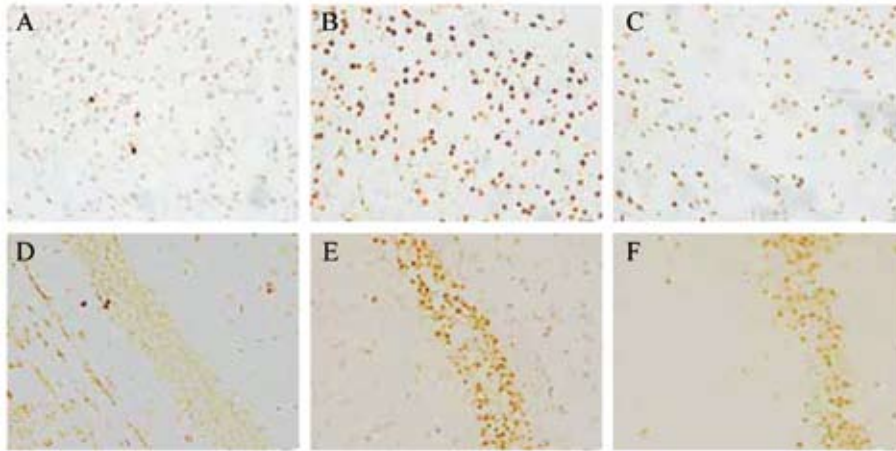


A: SKO组皮层; B: MKO1组皮层; C: MWT1组皮层; D: SKO组皮层海马CA1区; E: MKO1组海马CA1区; F: MWT1组海马CA1区。

A: the cortex of SKO; B: the cortex of MKO1; C: the cortex of MWT1; D: the hippocampal CA1 region of SKO; E: the hippocampal CA1 region of MKO1; F: the hippocampal CA1 region of MWT1.

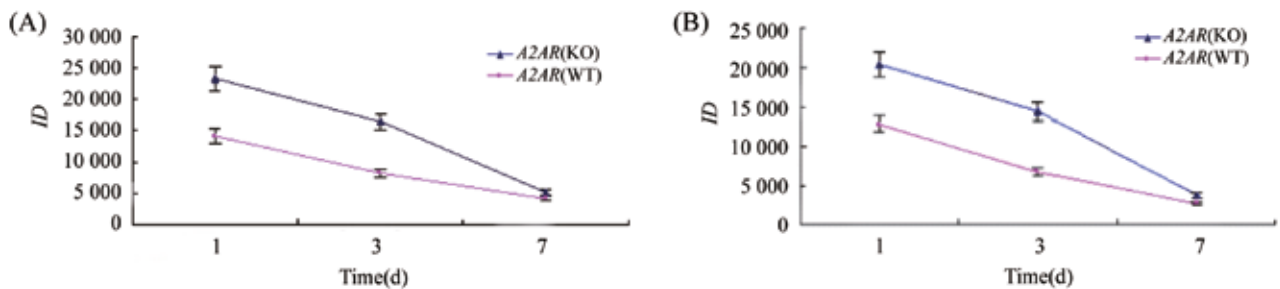
图2 皮层及海马CA1区HE染色(400×)

Fig.2 HE staining in the cortex and hippocampal CA1 region(400×)



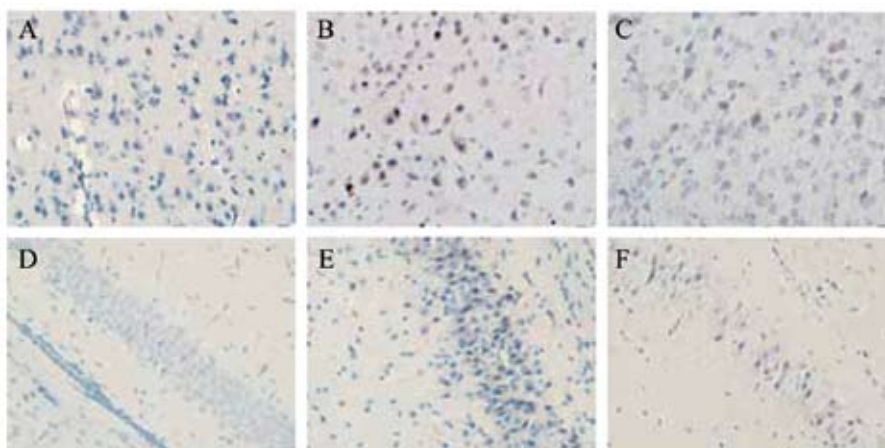
A: SKO组皮层; B: MKO1组皮层; C: MWT1组皮层; D: SKO组海马CA1区; E: MKO1组海马CA1区; F: MWT1组海马CA1区。  
A: the cortex of SKO; B: the cortex of MKO1; C: the cortex of MWT1; D: the hippocampal CA1 region of SKO; E: the hippocampal CA1 region of MKO1; F: the hippocampal CA1 region of MWT1.

图3 TUNEL技术检测皮层及海马CA1区神经细胞凋亡(400×)  
Fig.3 Detection of apoptosis in the cortex and hippocampal CA1 region by TUNEL assay(400×)



A: A2AR敲除对缺氧缺血皮层细胞凋亡的影响; B: A2AR敲除对缺氧缺血海马CA1区细胞凋亡的影响。  
A: effect of A2AR knockout on the expression of apoptosis in the cortex after neonatal hypoxia-ischemia brain damage; B: effect of A2AR knockout on the expression of apoptosis in the hippocampal CA1 region after neonatal hypoxia-ischemia brain damage.

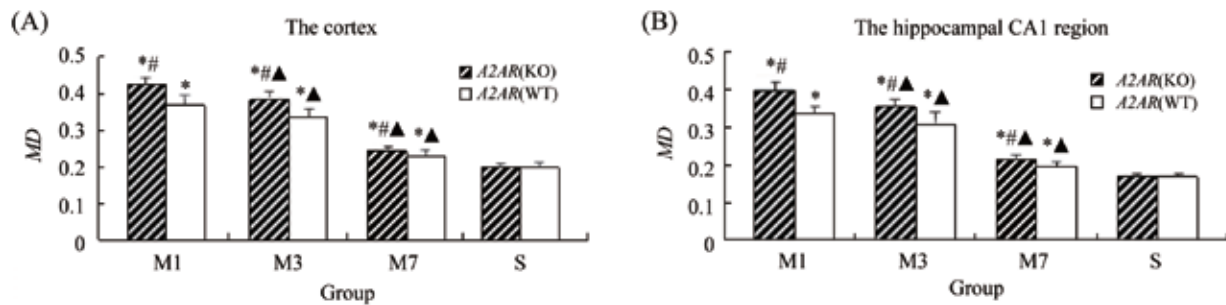
图4 A2AR敲除对缺氧缺血皮层、海马CA1区细胞凋亡的影响  
Fig.4 Effect of A2AR knockout on the expression of apoptosis in the cortex and hippocampal CA1 region after neonatal hypoxia-ischemia brain damage



A: SKO组皮层; B: MKO1组皮层; C: MWT1组皮层; D: SKO组海马CA1区; E: MKO1组海马CA1区; F: MWT1组海马CA1区。  
A: the cortex of SKO; B: the cortex of MKO1; C: the cortex of MWT1; D: the hippocampal CA1 region of SKO; E: the hippocampal CA1 region of MKO1; F: the hippocampal CA1 region of MWT1.

图5 皮层及海马CA1区活化caspase 3表达(400×)  
Fig.5 The expression of active caspase 3 in the cortex and hippocampal CA1 region(400×)



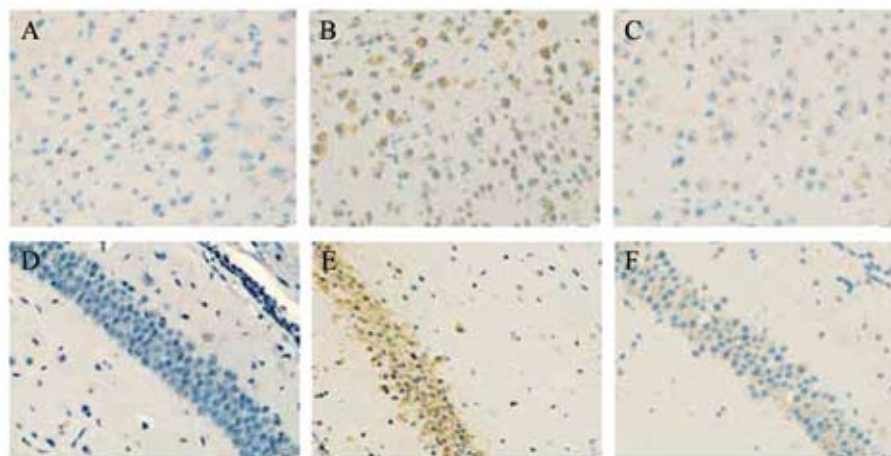


A: 新生鼠缺氧缺血侧不同组别皮层活化caspase 3的表达; B: 新生鼠缺氧缺血侧不同组别海马CA1区活化caspase 3的表达。与同基因型假手术组比较,  $*P<0.01$ ; 与同基因型前一时间点模型组比较,  $^{\wedge}P<0.01$ ; 与野生型同一时间点比较,  $^{\#}P<0.01$ 。

A: the expression of active caspase 3 in the cortex; B: the expression of active caspase 3 in the cortex and hippocampal CA1 region.  $*P<0.01$  vs S group in the same genotype;  $^{\wedge}P<0.01$  vs M group at the previous time point in the same genotype;  $^{\#}P<0.01$  vs A2AR(WT) group at the same time point after HIBD.

图6 新生鼠缺氧缺血侧不同组别皮层及海马CA1区活化caspase 3的表达(MD,  $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Fig.6 The expression of active caspase 3 in the cortex and hippocampal CA1 region after hypoxia ischemia brain damage in neonatal mice(MD,  $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )



A: SKO组皮层; B: MKO1组皮层; C: MWT1组皮层; D: SKO组海马CA1区; E: MKO1组海马CA1区; F: MWT1组海马CA1区。

A: the cortex of SKO; B: the cortex of MKO1; C: the cortex of MWT1; D: the hippocampal CA1 region of SKO; E: the hippocampal CA1 region of MKO1; F: the hippocampal CA1 region of MWT1.

图7 皮层及海马CA1区胞浆cyt C表达(400 $\times$ )

Fig.7 The expression of cytosolic cyt C in the cortex and hippocampal CA1 region(400 $\times$ )

型对照组仍有显著差异( $P<0.01$ )。HIBD后同一时间点, 敲除型(图7E)胞浆cyt C表达多于野生型(图7F), 其中HIBD后1, 3 d两种基因型间有显著差异(表2,  $P<0.01$ )。

## 2.8 相关性分析

TUNEL阳性表达与胞浆cyt C表达相关性分析: 皮层、海马CA1区TUNEL阳性表达与胞浆cyt C表达均呈显著正相关(皮层:  $r=0.946$ ,  $P<0.01$ ; 海马CA1区:  $r=0.956$ ,  $P<0.01$ ); 活化caspase 3的表达与胞浆cyt C的表达相关性分析: 皮层、海马CA1区活化caspase 3的表达与胞浆cyt C的表达均呈显著正相关(皮层:

$r=0.990$ ,  $P<0.01$ ; 海马CA1区:  $r=0.992$ ,  $P<0.01$ )。

## 3 讨论

腺苷A2AR是腺苷的四种受体亚型之一, 因其在体内的重要作用及以A2AR基因缺失为遗传背景的小鼠品系的建立, 使得A2AR逐步成为研究热点。对于腺苷A2AR的干预可能成为多种疾病治疗的新策略。但由于A2AR复杂的生物学效应, 使得其在某些疾病的临床应用中的功能还有待深入研究, 本实验以A2AR对新生鼠HIBD后的作用和为HIE寻找新的临床治疗靶点为着眼点而进行实验设计, 结果发

表2 新生鼠缺氧缺血侧不同组别皮层及海马CA1区胞浆cyt C的表达(MD,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 The expression of cytosolic cyt C in the cortex and hippocampal CA1 region after HIBD in neonatal mice(MD,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	皮层	海马CA1区
Groups	n	The cortex	The hippocampal CA1 region
SKO	8	0.178 9 $\pm$ 0.010 9	0.150 9 $\pm$ 0.009 3
MKO1	8	0.406 1 $\pm$ 0.012 7*#	0.376 6 $\pm$ 0.014 9*#
MKO3	8	0.363 0 $\pm$ 0.010 3* $\Delta$ #	0.333 6 $\pm$ 0.009 8* $\Delta$ #
MKO7	8	0.201 9 $\pm$ 0.011 7* $\Delta$	0.193 8 $\pm$ 0.009 8* $\Delta$
SWT	8	0.179 4 $\pm$ 0.019 0	0.148 8 $\pm$ 0.010 5
MWT1	8	0.347 0 $\pm$ 0.010 6*	0.316 6 $\pm$ 0.011 6*
MWT3	8	0.314 3 $\pm$ 0.023 9* $\Delta$	0.287 1 $\pm$ 0.025 1* $\Delta$
MWT7	8	0.194 1 $\pm$ 0.015 8 $\Delta$	0.181 4 $\pm$ 0.012 1* $\Delta$

与同一基因型假手术组比较, \* $P<0.01$ ;与同一基因型前一时间点模型组比较,  $\Delta P<0.01$ ;与野生型同一时间点模型组比较, # $P<0.01$ 。

\* $P<0.01$  vs S group in the same genotype;  $\Delta P<0.01$  vs M group at the previous time point in the same genotype; # $P<0.01$  vs WT group at the same time point after HIBD.

现, A2AR敲除加重了新生鼠HIBD后的脑损伤程度, 表现为既影响其短期神经行为学, 又增加了新生鼠HIBD后皮层及海马CA1区的神经细胞凋亡, 且此过程可能与cyt C被释放至胞浆中密切相关。

Cyt C由线粒体释放至胞浆, 继而激活caspase 3诱发细胞凋亡, 这是典型的内源性凋亡途径。cyt C能否由线粒体释放出来与其膜稳定性密切相关, 多种上游因子都可紊乱线粒体的功能, 导致其通透性增加, 从而引发cyt C的释放。脑缺氧缺血后, 成倍增加的腺苷受体可能通过一系列信号通路最终影响了线粒体的膜稳定性, 促使了cyt C的释放。HIBD后, A2AR敲除型小鼠缺氧缺血侧皮层、海马CA1区活化caspase 3的表达均较同一时间点野生型小鼠显著增加, 而胞浆cyt C的表达仅于HIBD后1, 3 d在不同基因型间存在显著差异, 提示A2AR敲除可能同时通过其他凋亡途径诱导了神经细胞凋亡, 且不同于cyt C仅在HIBD早期大量释放至胞浆, 这些路径在HIBD稍晚期的神经细胞凋亡中仍能发挥重要作用。而通过HIBD后不同时间点的对比, 提示通过干预腺苷A2AR治疗HIBD, 越早进行可能达到的效果越好。

我们的实验结论中, A2AR敲除对新生小鼠HIBD的作用和其在成年鼠缺血损伤中的作用相矛盾, 这可能与未成熟脑发育不够完善有关。A2AR不仅在中枢神经系统内分布, 在外周血液炎性细胞、免疫细胞等处也有广泛分布, 且研究证实, A2AR激活可显著抑制外周炎性细胞和免疫细胞的黏附和迁移,

减少炎性因子的分泌<sup>[17]</sup>, 新生小鼠体内的A2AR可能通过对炎性效应的调控产生机体保护作用, A2AR敲除导致这一效应缺失, 而新生小鼠脑发育不够完善, 缺氧缺血等应激刺激可能导致血脑屏障受影响, 通透性增加, 外周血炎性细胞渗透入脑实质, 紊乱中枢神经系统的免疫体系, 从而加重局部脑组织损伤。同时, A2AR的一些外周效应, 如血管舒张改善脑循环、抑制自由基的释放等也因A2AR的基因敲除而缺失, 而伴随的血压、心率降低等可能会致使脑损伤部位缺乏营养, 加重脑损害。而A2AR敲除与A2AR拮抗在新生鼠HIBD中的不同作用, 提示A2AR适度的活化可能对新生鼠是有益的, 这可能与A2AR在不同损伤程度及不同的微环境中有不同的生物学效应相关。

本研究以7 d龄新生小鼠为实验对象, 采用可充分模拟HIE病理改变的HIBD模型, 首次观察了A2AR敲除对新生鼠HIBD后短期神经行为学的影响, 并首次证实了A2AR敲除可能通过促使cyt C释放至胞浆, 激活caspase 3而导致神经细胞凋亡、加重脑损伤。然而, 我们的实验在时间点的设置上还不够精细, 难以充分观察各指标的动态变化。研究表明, Bcl-2家族蛋白在线粒体凋亡路径中扮演着重要角色, 影响cyt C、凋亡诱导因子的释放<sup>[18-19]</sup>, 但这是否是A2AR敲除增加神经细胞凋亡重要的中间过程尚需证实, 这也给我们下一步的研究提供了启示。

## 参考文献 (References)

- 1 Silva CG, Porciúncula LO, Canas PM, Oliveira C, Cunha RA. Blockade of adenosine A(2A) receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 2007; 27(2): 182-9.
- 2 Tofovic SP, Zacharia L, Carcillo JA, Jackson EK. Inhibition of adenosine deaminase attenuates endotoxin-induced release of cytokines *in vivo* in rats. *Shock* 2001; 16(3): 196-202.
- 3 Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866): 916-20.
- 4 Pedata F, Gianfriddo M, Turchi D, Melani A. The protective effect of adenosine A2A receptor antagonism in cerebral ischemia. *Neurol Res* 2005; 27(2): 169-74.
- 5 Melani A, Pantoni L, Bordoni F, Gianfriddo M, Bianchi L, Vannucchi MG, *et al.* The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 reduces striatal transmitter outflow, turning behavior and ischemic brain damage induced by permanent focal ischemia in the rat. *Brain Res* 2003; 959(2): 243.
- 6 Melani A, Gianfriddo M, Vannucchi MC, Cipriani S, Baraldi PG, Giovannini MG, *et al.* The selective A(2A) receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. *Brain Res*

- 2006; 1073-1074: 470-80.
- 7 Trincavelli ML, Melani A, Guidi S, Cuboni S, Ciprian S, Pedata F, *et al.* Regulation of A2A adenosine receptor expression and functioning following permanent focal ischemia in rat brain. *J Neurochem* 2008; 104(2): 479-90.
  - 8 Chen JF, Huang ZH, Ma JY, Zhu JM, Moratalla R, Standaer 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.
  - 9 Bona E, Aden U, Gilland E, Fredholm BB, Hagberg H. Neonatal cerebral hypoxia ischemia: the effect of adenosine receptor antagonists. *Neuropharmacology* 1997; 36(9): 1327-38.
  - 10 Adén U, Halldner L, Lagercrantz H, Dalmau I, Ledent C, Fredholm BB. Aggravated brain damage after hypoxic ischemia in immature adenosine A2A knockout mice. *Stroke* 2003; 34(3): 739-44.
  - 11 Gill MB, Perez-Polo JR. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochem Res* 2008; 33(12): 2379-89.
  - 12 Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Xiaoyang Wang. Apoptotic mechanisms in the immature brain: Involvement of mitochondria. *J Child Neurol* 2009; 24(9): 1141-6.
  - 13 Gill R, Soriano P, Blomgren K, Hagberg H, Wybrecht R, Miss MT, *et al.* Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(4): 420-30.
  - 14 Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(10): 1589-97.
  - 15 Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(1): 95-100.
  - 16 Gao Y, Liang W, Hu X, Zhang W, Stetler RA, Vosler P, *et al.* Neuroprotection against hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting the apoptotic protease activating factor-1 pathway. *Stroke* 2010; 41(1): 166-72.
  - 17 Sipka S, Kovacs I, Szanto S, Szegedi G, Brugos L, Bruckner G, *et al.* Adenosine inhibits the release of interleukin-1beta in activated human peripheral mononuclear cells. *Cytokine* 2005; 31(4): 258-63.
  - 18 Landshamer S, Hoehn M, Barth N, Duvezin-Caubet S, Schwake G, Tobaben S, *et al.* Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15(10): 1553-63.
  - 19 Gill MB, Bockhorst K, Narayana P, Perez-Polo JR. Bax shuttling after neonatal hypoxia-ichemia: Hyperoxia effects. *J Neurosci Res* 2008; 86(16): 3584-604.

## Effect of Adenosine A2A Receptor Knockout on the Expression of cyt C in Partial Cerebral Tissues After HIBD in Neonatal Mice

Ren Suwei<sup>1</sup>, Gao Yong<sup>1</sup>, Zhou Dingfu<sup>1</sup>, Fan Hailing<sup>1</sup>, Chen Jiangfan<sup>2</sup>, Wang Xiaotong<sup>1</sup>, Chen Xiang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

<sup>2</sup>Boston University School of Medicine, Boston 02215, USA)

**Abstract** The role of adenosine A2A receptor (A2AR), an important subtype of adenosine receptors, in neonatal mice after hypoxia-ischemia brain damage (HIBD) is still controversial. Studies about the mechanism of A2AR in HIBD will contribute to the clinical treatment of neonatal hypoxia-ischemia encephalopathy (HIE). Our experiment observed the effect of A2AR knockout mice on neurological behavior. We used TUNEL assay combined with HE staining to detect neuronal apoptosis, also we used immunohistochemical assay to detect the expression of active caspase 3 and cytosolic cyt C after HIBD in neonatal mice. In our study, we found that A2AR knockout damaged neurobehavioral function of neonatal mice and increased the expression of apoptotic neuron, active caspase 3 and cytosolic cyt C. The differences of neuronal apoptosis between A2AR knockout mice and wild type mice were significant at 1, 3, 7 d after HIBD in neonatal mice, as well as the differences of active caspase 3 ( $P < 0.01$ ), while the significant differences of cytosolic cyt C between these two genotypes appeared at 1, 3 d after HIBD ( $P < 0.01$ ). The expressions of cytosolic cyt C and neuronal apoptosis were positively related, as well as the expressions of cytosolic cyt C and active caspase 3. This prompted that A2AR knockout possibly increased neuronal apoptosis by promoting cyt C released into the cytosolic after HIBD in neonatal mice.

**Key words** adenosine A2A receptor; knockout; hypoxic-ischemic; brain; neonatal mice; apoptosis; caspase 3; cytochrome C

Received: March 21, 2012 Accepted: April 11, 2012

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

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