

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520071152569

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

PPAR- α 激动剂 OEA 对小鼠局灶性脑缺血的保护作用及特点

Protective effect and characteristic of PPAR- α agonist
Oleylethanolamide on focal cerebral ischemia in mice

杨立朝

指导教师姓名: 金鑫 教授

周宇 讲师

专业名称: 药理学

论文提交日期: 2010 年 04 月

论文答辩时间: 2010 年 05 月

2010 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(金鑫教授)课题(组)的研究成果,获得(金鑫教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(金鑫教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 杨立朝

2010 年 05 月 28 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：杨立朝

2010年05月28日

摘要

过氧化物酶体增植物激活受体 (PPARs) 是一类由配体激活的核转录因子, 是核受体超家族成员之一。过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR α) 是 PPARs 中的一个亚型, 它是脂质、脂肪酸, 以及脂蛋白代谢的调节因子。PPAR α 的配体可分为天然配体和合成配体。天然配体主要来源于饮食和机体的代谢产物, 如长链不饱和脂肪酸, 包括油酸、亚油酸、花生四烯酸等。合成配体有贝特类降血脂药, 如 WY14643、非诺贝特等等。脑缺血是我国常见高发病之一, 脑缺血性损伤主要是由于短暂或持久脑部血液供应的障碍造成的。研究发现, PPAR α 激动药非诺贝特可明显减少小鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后脑梗死体积, 并且这种保护作用不依赖于其外周降脂效应, 而与其直接激动 PPAR α 受体, 减轻脑缺血后的氧化应激反应, 抑制 VCAM 和 ICAM 的表达, 减轻炎症反应有关。最近又有研究报道 PPAR α 基因敲除小鼠脑缺血后的梗死体积较野生型小鼠扩大, 进一步提示了 PPAR α 可能直接参与了脑缺血后的神经保护机制。因此 PPAR α 是目前脑缺血治疗研究中的热点之一。

油酰乙醇胺 (OEA) 是一种天然的脂肪酸乙醇胺, 属于脂肪酸乙醇胺家族 (FEA), 已有实验表明, OEA 是 PPAR α 的一个具有高亲和性的天然配体, 在兴奋性脑损伤如脑外伤后, 脑内的神经元释放 OEA, 且发挥明显的神经保护作用, 其机制可能部分与其抑制谷氨酸能神经递质的释放有关, 且在激活 PPAR α 时存在结构选择性。本论文探讨了 PPAR α 是否可作为抗脑缺血损伤治疗的靶点及 PPAR α 的新型高效激动剂 OEA 在脑缺血损伤中作用及特点。本论文主要采用整体动物脑缺血模型, 通过对神经功能缺失评分、脑梗死体积、脑水肿程度等指标, 阐明 OEA 对小鼠局灶性脑缺血保护作用的剂量依赖性时间依赖性; 采用荧光定量 PCR 及 Westernblot 分别检测脑缺血后脑组织 PPAR α 变化特点及 PPAR α 激动剂 OEA 对脑缺血损伤后 PPAR α 表达的影响。实验结果表明, OEA 剂量及时间依赖性的保护小鼠局灶性脑缺血急性损伤, 有效剂量为 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 最佳治疗时间点为再灌注同时; 与正常组相比, PPAR α mRNA 表达量

在脑缺血损伤后显著下降，而且在再灌后 6 h 和再灌后 24 h 存在两个表达峰值；给予 OEA 后 PPAR α mRNA 表达量显著提高，仍然存在两个表达峰值，即再灌后 3 h 和再灌后 24 h；OEA 可以明显地增强 PPAR α 蛋白表达，并且在再灌后 24 h 存在一个表达高峰。

关键词：油酰乙醇胺；大脑中动脉栓塞；脑缺血；再灌注损伤；小鼠

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a group from the ligand-activated nuclear transcription factor and a member of the nuclear receptor superfamily. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is a subtype of PPARs, it is the lipids, fatty acids, and lipoprotein metabolism regulator. PPAR α ligands can be divided into natural ligands and synthetic ligands. Natural ligand are mainly from the diet and body metabolites, such as long-chain polyunsaturated, including oleic acid, linoleic acid, arachidonic acid and so on. Synthetic ligands are mainly fibrates, such as WY14643, fenofibrate, etc. Cerebral ischemia is one of high incidence in China. Cerebral ischemic injury was mainly caused by transient or persistent ischemia. PPAR α agonist fenofibrate can be significantly reduced cerebral infarct volume after middle cerebral artery occlusion (middle cerebral artery occlusion, MCAO) in mice. And this protective effect does not depend on its lipid-lowering of peripheral, Instead PPAR α receptor was directly excited and reduced post-ischemic oxidative stress and inhibited the expression of VCAM and ICAM and reduced inflammation. Recently, studies have reported that the infarct volume after cerebral ischemia expanded in PPAR α knockout mice than wild-type mice, it further suggests that PPAR α may be directly involved in neural protection after cerebral ischemia. Therefore, PPAR α is one of the hot spots in cerebral ischemia.

Oleylethanolamide (OEA) is a naturally occurring lipid that binds with high affinity to the PPAR α , serves as an endogenous agonist of PPAR α . In the excited brain damage such as brain trauma, neurons release of OEA that play a significant neuroprotective effect. This paper discusses whether PPAR α could be used as a treatment for ischemic brain injury and what is the role of PPAR α agonist OEA in cerebral ischemic injury. In this paper, using animal model of cerebral ischemia, neurological deficit scores, the infarct size, brain edema and other indicators being evaluated, We draw that OEA has dose-dependent and time-dependent protective

effect on in focal cerebral ischemia in mice. Fluorescent quantitative PCR and Westernblot were been used to detect the changes of PPAR α and the effect of OEA on PPAR α in cerebral ischemic injury. The results show that effective dose of OEA is 20 mg•kg⁻¹ and 40 mg•kg⁻¹ and the optimal therapeutic time point of the same time of reperfusion. Compared with the normal group, PPAR α mRNA expression significantly decreased after cerebral ischemia, and there are two expression peaks in 6h after reperfusion and 24 h after reperfusion. OEA significantly increased the expression PPAR α mRNA, and there are still two expression peaks in 3 h after reperfusion and 24 h after reperfusion. OEA can significantly enhance the expression of PPAR α protein, and there is an expression of the peak at 24 h after reperfusion.

key words: Oleoyl ethanolamine; middle cerebral artery occlusion; cerebral ischemia; reperfusion injury; mice

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 前 言	1
1.1 过氧化物酶体增殖物激活受体- α	1
1.1.1 PPAR 的发现及分类	1
1.1.2 PPAR α 的结构、功能	2
1.1.3 PPAR α 的激动剂	3
1.2 脑缺血与 PPAR α 的关系	5
1.2.1 脑缺血损伤	5
1.2.2 脑缺血后大脑中的炎症反应	6
1.2.3 脑缺血与 PPAR α 及其激动剂	8
1.3 油酰乙醇胺 (OEA) 的概述	8
1.3.1 OEA 的生理活性	8
1.3.2 OEA 作为 PPAR α 的内源性配体	11
参考文献	11
第二章 复制线栓法小鼠脑缺血模型	18
2.1 材料与方法	18
2.1.1 药品及器材	18
2.1.2 实验动物及分组	18
2.1.3 线栓的制备	18
2.1.4 小鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备	19
2.1.5 神经功能缺失评分	19
2.1.6 TTC 染色及脑梗死体积和脑水肿程度的测定	19
2.1.7 统计学方法	20
2.2 结果	20
2.2.1 神经功能缺失评分	20

2.2.2 脑梗塞体积测定	21
2.2.3 脑水肿程度	21
2.3 讨论	21
2.3.1 小鼠大小的选择	21
2.3.2 栓塞线段的处理	21
2.3.3 麻醉是实验成功与否的影响因素之一	22
2.3.4 手术时间的长短影响小鼠能否成活	22
2.4 本章小结	22
参考文献	22
第三章 OEA 对小鼠脑缺血再灌注损伤后剂量及时间依赖的保护作用	24
3.1 OEA 对小鼠脑缺血再灌注损伤后剂量依赖的保护作用	24
3.1.1 材料与方法	24
3.1.2 观察值标记测定方法	25
3.1.3 统计学处理	26
3.1.4 结果	26
3.2 OEA 对小鼠脑缺血再灌注损伤后时间依赖的保护作用	29
3.2.1 材料与方法	29
3.2.2 观察值标记测定方法	30
3.2.3 统计学处理	30
3.2.4 结果	31
3.3 本章小结	33
参考文献	34
第四章 PPARα 在脑缺血后不同时间点表达和活性的变化及 OEA 缺血后 PPARα 表达和活性的影响	37
4.1 实验仪器和试剂	37
4.2 主要试剂的配制	38
4.3 实验方法	39
4.3.1 荧光定量 PCR	39
4.3.2 蛋白免疫印迹 (Western Blotting)	41

4.3.3 统计学处理	42
4.4 脑缺血后 PPAR α mRNA 表达变化特点及 OEA 对 PPAR α mRNA 表达的影响	42
4.4.1 实验动物分组	42
4.4.2 总 RNA 浓度的测定	43
4.4.3 PCR 引物的设计	44
4.4.4 荧光定量 PCR 结果	45
4.5 OEA 对 PPAR α 蛋白表达的影响	48
4.6 本章小结	50
参考文献	51
第五章 结论与展望	53
本人在硕士期间所发表的论文	54
缩略语表	55

Catalogue

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1	1
1.1 Peroxisome proliferator activated reportor alpha	1
1.1.1 Discovery and class of PPAR α	1
1.1.2 Structure and function of PPARs	2
1.1.3 Ligands of PPAR α	3
1.2 Relation of PPAR-α and cerebral ischemia	5
1.2.1 cerebral ischemia	5
1.2.2 cerebral ischemia and inflammtory response	6
1.2.3 cerebral ischemia and PPAR α	8
1.3 Overview of oleoyethanolamide (OEA)	8
1.3.1 Bioactivities of OEA	8
1.3.2 OEA is an endogenous agnoist of PPA α	11
Reference	11
Chapter 2 Copy the model of focal cerebral ischemia in mouse	18
2.1 Materials and methods	18
2.1.1 Materials and methods.....	18
2.1.2 Animal	18
2.1.3 Preparation of suture.....	18
2.1.4 Mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion preparation.....	19
2.1.5 Neurological deficit scoring.....	19
2.1.6 TTC staining and infarct volume and measure the degree of brain edema	19
2.1.7 Statistical methods.....	20
2.2 Results	20

2.2.1 Neurological deficit scoring	20
2.2.2 Determination of infarction volume	21
2.2.3 Brain edema	21
2.3 Discussion	21
2.3.1 Select the size of mice	21
2.3.2 Embolization in the treatment line	21
2.3.3 Anesthesia is the experimental one of the factors affecting the success of	22
2.3.4 The length of surgery can affect the survival of mice	22
2.4 Summary	22
References	22
Chapter 3 Oleoylethanolamide,dose- and time-dependently protects against focal cerebra ischemia in mice	24
3.1 Oleoylethanolamide,dose-dependently protects against focal cerebral ischemia in mice	24
3.1.1 Materials and methods	24
3.1.2 Index	25
3.1.3 Statistical analysis	26
3.1.4 Results	26
3.2 Oleoylethanolamide, time-dependently protects against focal cerebral ischemia in mice	29
3.2.1 Materials and methods	29
3.2.2 Determination of observations marked	30
3.2.3 Statistical analysis	30
3.2.4 Results	31
3.3 Summary	33
References	34
Chapter 4 Expression and activity of PPARα at the different time points after ischemia and the effect of OEA on the expression of PPARα after ischemia	37

4.1 Instruments and reagents	37
4.2 Preparation of solutions	38
4.3 Experimental methods	39
4.3.1 Real-time PCR.....	39
4.3.2 Western Blotting.....	41
4.3.3 Statistical analysis.....	42
4.4 PPARα mRNA expression after cerebral ischemia and the changes of OEA on the expression of PPARα mRNA	42
4.4.1 Experimental animal groups.....	42
4.4.2 Determination of the concentration of total RNA.....	43
4.4.3 design of PCR primers.....	44
4.4.4 Quantitative PCR results.....	45
4.5 OEA on PPARα protein expression	48
4.6 Summary	50
References.....	51
Chapter 5 Conclusion and expectation	53
Papers of published during the Master	54
List of Abbreviations	55

第一章 前言

脑缺血是我国常见高发病之一，脑缺血性损伤主要是由于短暂或持久脑部血液供应的障碍造成的。大脑组织对缺血损伤非常敏感。缺血中心区的神经元由于能量代谢障碍，几乎在缺血的即刻死亡，因此尽快恢复缺血区的血液供应是脑缺血治疗的最主要措施。但由于溶栓治疗的时间窗很短（一般是症状发生后 3 小时内），只有少部分病人能得到及时有效的治疗^[1]。大部分病人预后不良，脑缺血成为当今社会长期严重致残的主要原因。脑缺血治疗新靶点的寻找及抗脑缺血药物的开发成为医药学界的一个重大课题。

然而，在抗脑缺血损伤药物的研究中发现，很多在临床前研究中有效的神经保护剂，在临床实验中却没有效果，甚至出现严重的副作用，加重缺血后的脑损伤^[2,3]。动物实验和临床效果的差别提示我们，从已知临床用药入手寻找治疗脑缺血的有效药物可能是解决这个问题的一种方法。

以非诺贝特为代表的贝特类药物作为降脂药在临床中已使用了 40 多年，近来的研究发现它不仅能在外周系统调节糖脂代谢，降血脂，预防动脉粥样硬化的发生^[4,5]，在中枢神经系统中对脑缺血后的神经损伤亦有保护作用，且其神经保护作用主要是通过激动过氧化物酶增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)产生^[6]。PPAR α 可望成为治疗脑缺血的新靶点。

1.1 过氧化物酶体增殖物激活受体- α

1.1.1 PPAR 的发现及分类

PPAR 是过氧化物酶体激活受体的简称，在此之前人们一直以为 PPAR 是一种孤儿受体，直至 1990 年 Issemann 等人在脂细胞分化过程中才发现它是一类配体依赖的转录因子，是基因转录中传递过氧化物酶体增长因子效应的一类细胞核受体，属于核受体超家族成员^[7]。

根据结构和功能上的差异，PPAR 可分为三种亚型，分别为 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ ^[8]，而且这三种亚型在不同的组织中表达各不相同，其中 PPAR α 主要分布

于肝细胞、心肌细胞、肠上皮细胞、肾近曲小管上皮细胞, PPAR β 在脑、结肠和皮肤相对较高, 肾脏和心脏有少量的表达, PPAR γ 则主要特异性表达在脂肪细胞, 是最具脂肪组织特异性的成员^[9-11]。

1.1.2 PPAR α 的结构、功能

PPAR 三种亚型均由不同的基因编码, 其中 PPAR α 是由 468 个氨基酸残基组成, 位于鼠 15 号染色体, 人 22 号染色体。和其他核受体类似^[12], PPAR 是由六个结构域组成的 (A-F) (图 1.1)。其中 N 端的 A/B 结构域具有非配体依赖的反式激活功能 (AF-1), 该结构域在三种亚型中的保守性比较低, A/B 结构域上还具有蛋白磷酸化位点, 中间的 C 结构域是 DNA 结合域 (DNA binding domain), 又称 DBD, 它含有两个锌指结构, 这样能使受体特异性地结合到靶标 DNA 上, 同时该区域还具有弱的二聚化, 该区域的保守型很高。D 结构域为铰链区, 它连接 DNA 结合域和由 E 域组成的配体结合域。E 结构域组成配体结合域 (Ligand binding domain) 又称为 LBD, 它具有配体依赖的反式激活功能 (AF-2), AF-2 在对靶标基因的转录调节中起着关键作用。LBD 是激素转录信息的主要传递者; 同时, LBD 是受体发生二聚化的主要部位, 而二聚化是受体具备转录激活活性所必需的。该区域具有较高的序列保守性, C 端 F 域的功能还不是非常清楚^[13-15]。

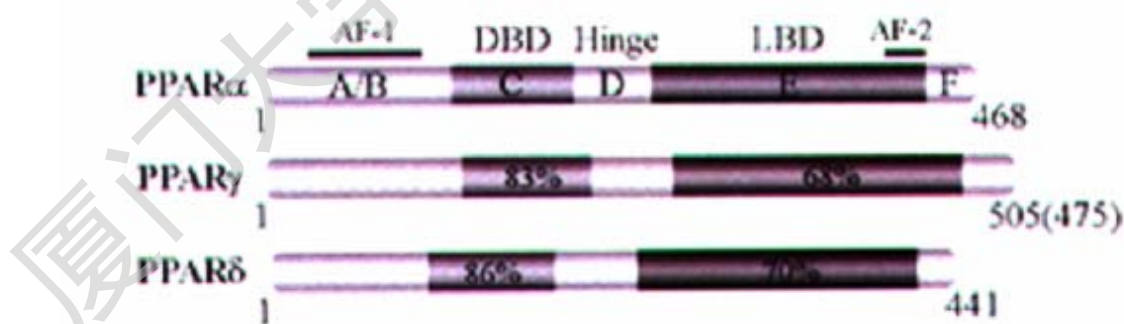


图 1.1 PPAR 结构域组成

PPAR 通过与其靶基因如酰基辅酶 A 氧化酶 (AOX) 和脂肪酸结合蛋白的启动子中的过氧化物酶体增殖剂反应元件 (Peroxisome proliferator response element, PPRE) 结合而发挥转录调控功能。PPRE 是由两个半位组成的, 它们是两个同向重复序列, 所以又称为 DR-1 反应元件 (Direct Repeat-1 response

element)。每个半位由序列为 AGGTCA 的六个核苷酸组成，两个半位间相隔一个核苷酸。PPAR 通过与视黄醛 X 受体 (Retinoid X Receptor, RXR) 形成异源二聚体后结合到 PPRE 上，其中的 PPAR 结合在 PPRE 的 5'半位上，RXR 结合在 PPRE 的 3'半位上。当 PPAR/RXR 异源二聚体与激动剂结合时，它们的构像发生了改变，从而释放出共抑制因子 (Corepressor)，而与共激活因子 (Coactivator) 相结合，进而激活靶基因的转录^[16-19]。

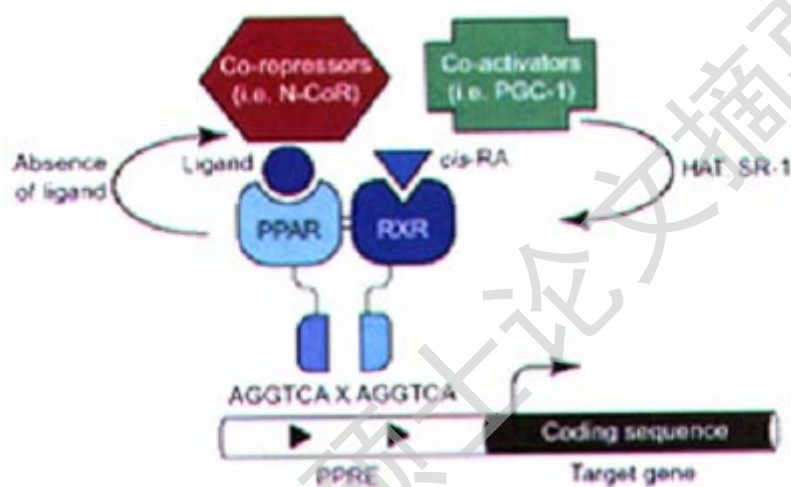


图 1.2 为 PPAR 激活靶基因转录

1.1.3 PPAR α 的激动剂

根据 PPAR 配体来源的不同，可分为天然配体及合成配体。且二者可竞争性结合 PPARs，说明它们具有相似的结合点。

许多饱和、不饱和脂肪酸，类花生酸类物质及其衍生物大都是 PPAR 的天然配体^[20]，其中饮食中的不饱和脂肪酸如亚油酸，亚麻酸，花生四烯酸与 PPAR α 的亲合力最高，花生四烯酸通过脂氧合酶途径合成的衍生物 8-s 羟基二十碳四烯酸 (8s-HETE) 和白三烯 B₄(LTB₄)与 PPAR α 的亲合力比脂肪酸本身还高^[21]。而前列环素是 PPAR β 的内源性配体，二十碳五烯酸、花生四烯酸以及一些二十烷酸类衍生物可能是 PPAR β 的天然配体。PPAR γ 的天然配体主要以多不饱和脂肪酸及其衍生物为代表，如 15-脱氧前列腺素 J₂(15d-PGJ₂)及白三烯等^[22]。

PPAR α 的合成配体主要包括临床上用于治疗高脂血症的贝特类药物如：氯贝

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库