

## 脑卒中前敲减 HDAC2 改善光照脑缺血模型小鼠的行为学缺陷

袁红瑾,林瑜辉,董 健,朱东亚\*

(南京医科大学药学院药理实验室,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨脑卒中前蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2,HDAC2)对于光诱导血栓形成性脑缺血模型小鼠行为学缺陷的作用。方法:通过微量给药系统将腺相关病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre (2  $\mu$ L) 注射至 HDAC2<sup>flw/flw</sup> 鼠的运动皮层用以敲减 HDAC2,通过免疫荧光以及免疫印迹(Western blot)分析确证病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 与对照病毒 AAV-CAG-EGFP 的表达。7 d 后进行光诱导血栓形成性脑缺血造模,并于造模前第 3 天以及造模后第 8 天采用网格实验和圆筒实验分别检测造模前后 AAV-CAG-EGFP-Cre 组与 AAV-CAG-EGFP 组行为学的改变。结果:病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 相较于对照 AAV-CAG-EGFP 能特异性地敲减 HDAC2,免疫荧光表现为 GFP 与 HDAC2 双阳性细胞数减少,Western blot 显示针孔周围区 HDAC2 表达水平降低( $P<0.05$ )。脑缺血前后的行为学检测表明病毒干预后,HDAC2 的下调对缺血前行为学无影响,但显著降低了脑缺血后网格实验的失足率( $P<0.001$ )与圆筒实验的不对称指数( $P<0.001$ ),促进了行为学改善。结论:脑卒中前通过重组病毒敲减 HDAC2,可以改善脑卒中后小鼠行为学缺陷。

**[关键词]** 组蛋白去乙酰化酶 2;脑卒中;功能恢复

**[中图分类号]** R743.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1154-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170916

## HDAC2 knockdown before stroke improves behavioral deficits of photothrombotic stroke mice

Yuan Hongjin, Lin Yuhui, Dong Jian, Zhu Dongya\*

(Department of Pharmacology, Pharmacy College, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the influence of intervention of histone deacetylase 2(HDAC2) on behavioristics of mice after photothrombotic stroke. **Methods:** Adeno-associated virus AAV-CAG-EGFP-Cre(2  $\mu$ L) was microinjected through microcannula to the motor cortex of HDAC2<sup>flw/flw</sup> mice, aiming to knockdown HDAC2. And then, the expression of virus AAV-CAG-EGFP-Cre and its control AAV-CAG-EGFP was validated through immunofluorescence and Western blot. Seven days later, photothrombotic stroke was induced in the mice, and grid-walking task and cylinder task were conducted at day 3 before stroke and day 8 after stroke to detect behavior changes. **Results:** Compared with AAV-CAG-EGFP, AAV-CAG-EGFP-Cre significantly down-regulated HDAC2 expression, which was showed in the reduction of the number of GFP<sup>+</sup>/HDAC2<sup>+</sup> cells and the expression level of HDAC2 in the peri-pinhole zone ( $P<0.05$ ). Behavioral tests demonstrated that the decrease of HDAC2 didn't influence the behavior before ischemia, but significantly reduced foot faults in the grid-walking task ( $P<0.001$ ) and asymmetry index in the cylinder task ( $P<0.001$ ) after ischemia, which improved behavioral deficits. **Conclusion:** HDAC2 knock down by viral interference can promote functional recovery after photothrombotic stroke.

**[Key words]** HDAC2; photothrombotic stroke; functional recovery

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1154-1158]

脑卒中为脑部血管阻塞或破裂引起脑部血液循环障碍所致病症,发病率高、致残率高、死亡率高,严

重危害公共健康<sup>[1]</sup>。尽管神经科学家们一直在探索脑卒中治疗新方法,迄今为止,组织纤溶酶原激活物(tissue-plasminogen activator, tPA) 仍是 FDA 批准的唯一适用于脑缺血患者的药物<sup>[2]</sup>。但由于治疗时间窗窄( $\leq 4.5$  h),溶栓后存在出血风险等因素,临床上仅约 5% 的患者能接受 tPA 的治疗,其余大部分患

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(31530091);科技部 973 计划(2011CB504404)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dyzhu@njmu.edu.cn

者需接受支持性护理<sup>[3]</sup>。以往针对脑缺血治疗的方法主要基于病因学,如兴奋性毒性<sup>[4]</sup>、氧化应激<sup>[5]</sup>、细胞凋亡<sup>[6]</sup>、炎症反应<sup>[7]</sup>以及突触可塑性相关的环路重构<sup>[8]</sup>等几个方面。而这些治疗应用于临床试验后均以失败告终,究其原因,很可能是由于脑缺血是一个多方面失衡的疾病状态,仅仅调节单一分子或着眼于单一机制太过狭隘。

表观遗传学是指机体各个细胞内动态调节基因表达和功能的复杂分子过程<sup>[9]</sup>,是比较宏观的调节,并且针对其中一个因素的调节会引起下游一系列分子的变化,因此表观遗传学不失为治疗脑缺血新的突破方向。脑缺血后表观遗传学研究刚刚起步,大量研究证明组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)家族与恶性肿瘤<sup>[10]</sup>、损伤修复<sup>[11-12]</sup>、突触发生与可塑性<sup>[13]</sup>、学习记忆<sup>[14]</sup>、神经发生<sup>[15]</sup>以及某些器官缺血<sup>[16]</sup>等有着密切联系,但目前关于它在脑缺血中的作用报道甚少。

有研究表明,脑缺血后组蛋白 H3 乙酰化水平降低,而 HDAC 抑制剂可以逆转其下降、降低梗死面积、改善神经学评分<sup>[17]</sup>。另有研究发现使用 I、II 类 HDAC 抑制剂 Scriptaid 可以通过调节小胶质细胞/巨噬细胞而影响少突胶质细胞,从而降低脑损伤后白质的损伤<sup>[12]</sup>。HDAC 抑制剂曲古柳菌素 A、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、丁酸钠等都可以降低缺血损伤、改善功能缺失,其作用机制目前尚不明确,初步研究表明可能涉及到 P53、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 以及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )等一系列分子<sup>[18]</sup>。然而这些抑制剂都不是单个亚型特异性的抑制剂,目前关于 HDAC 各个亚型与脑缺血之间关系的研究很少。有研究表明抑制 HDAC2 可以降低氧化应激损伤<sup>[5]</sup>,提示 HDAC2 在脑缺血中可能扮演着重要角色。而缺血后缺血周围区突触可塑性的回升对于缺血后的功能恢复至关重要<sup>[19]</sup>,HDAC2 在突触发生以及可塑性中的作用也提示其很可能有助于缺血后功能恢复。近些年来,Cre/loxP 重组酶系统运用广泛,本研究通过在待敲除的目标基因 HDAC2 的 DNA 序列两端各放置 1 个 loxP 序列,得到 HDAC2<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠,这种小鼠某部位成功感染特异性表达 Cre 的病毒后,理论上可以实现特定部位 HDAC2 的敲减,便于探讨 HDAC 特定亚型 HDAC2 的减少对于脑卒中后小鼠运动功能是否有改善作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HDAC2<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠(C57/BL/6),7~8 周龄,(20±2)g,雄性纯合子,清洁级,从 Jackson Laboratory 引种,由南京大学模式动物中心饲养、繁育。

重组腺相关病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 以及对照病毒 AAV-CAG-EGFP(上海吉凯基因化学技术有限公司);HDAC2 抗体(Abcam 公司,英国),GAPDH 抗体(上海康成生物);硝酸纤维素(NC)膜、ECL 发光液(Millipore 公司,美国),十二烷基硫酸钠(SDS)、Tween-20、过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)、丽春红 S、苯甲基磺酰氟(PMSF)、Tris(Amersco 公司,美国);其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 脑缺血模型制备

通过光诱导血栓形成性脑缺血模型模拟脑缺血。使用 2%水合氯醛(0.02 mL/g)麻醉 HDAC2<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠后,固定小鼠于立体定位仪上,通过正中切口暴露头骨,清除结缔组织并吹干。用直径为 2.5 mm 的冷光源垂直贴于颅骨上方,并使其圆心较前囟向右偏移 1.5 mm。静脉注射玫瑰红(50 mg/kg)3 min 后进行冷光源照射 10 min,冷光源照射前用锡箔纸将小鼠尾部罩住避免损伤。照射结束后移除冷光源,缝合并消毒。在整个手术过程中,动物体温通过温控式红外灯调节,维持在(37±0.5)℃。手术结束后将动物放回各自饲养笼中,细心监护直至动物苏醒。造模成功的小鼠表现为前肢腕肘屈曲。

#### 1.2.2 蛋白免疫印迹试验

将组织样品在预冷的中效裂解液中裂解 30 min,裂解结束后 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,加入上样缓冲液,煮沸。样品于 10%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,分离后的蛋白转移至硝酸纤维素膜。脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min; 孵育一抗兔抗 HDAC2(1:2 000),鼠抗 GAPDH(1:4 000) 4℃过夜;次日,弃去一抗, TBST 洗膜 4 次,每次 15 min; 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)30℃孵育 2 h, TBST 洗膜 4 次,每次 15 min; 末次洗膜后,以 ECL 曝光,凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)成像后进行数据分析。

#### 1.2.3 免疫组织化学染色

将小鼠麻醉后进行心脏灌流,取出脑组织并使用 4%多聚甲醛固定全脑,于所需皮层部位作冠状连续切片(40 μm)。切片使用兔抗 HDAC2(1:2 000)

4℃过夜,之后使用对应的Cy3-荧光二抗(1:200)室温孵育2h,PBS清洗后封片。AAV-CAG-EGFP-Cre以及AAV-CAG-EGFP绿色荧光可直接用荧光显微镜观察。免疫荧光照片使用Zeiss Axio Cam MRC 5(D)照相机配合Carl Zeiss Axio Observer A1倒置荧光显微镜获取。

#### 1.2.4 网格实验

将小鼠放置在钢制网格(长与宽分别为32 cm和20 cm,其上网格边长为1.2 cm×1.2 cm)上,网格下方放置摄像头拍摄整个行走过程,让小鼠在网格上自由行走5 min,记录四肢失足总数和总的步数。失足百分比(%)=失足数/(失足数+未失足数)×100%。行走过程中如果小鼠足下没有支撑住而穿过网格即被认为是失足,如果小鼠仅仅是腕部靠在网格边缘亦认为是失足。

#### 1.2.5 圆筒实验

圆筒实验依据动物垂直贴壁向上探索的特性而设计,评判动物对某一侧肢体的依赖程度。小鼠被放在一个透明有机玻璃筒内,当小鼠在筒内站立时会用其某一侧前肢或者两侧前肢放在筒壁上来支撑身体。圆筒直径10 cm,高15 cm。在摄像头斜对侧放置一面镜子以记录另一侧的前肢贴壁情况。摄像头采集视频5 min,播放时用1/5的正常速度播放,记录小鼠右肢、左肢单独以及左右肢同时放在筒壁上的时间。计算不对称指数=(对照侧前肢贴壁时间-患侧前肢贴壁时间)/左右肢贴壁总时间。

#### 1.3 统计学方法

数据采用STATA9.0统计学分析软件,定量资料用均值±标准误( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用单因素方差分析, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 成功感染 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠皮层细胞

通过微量给药系统将腺相关病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 以及对照病毒 AAV-CAG-EGFP 各 2 μL 注射至 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠的右侧运动皮层。1 周后的免疫荧光结果确证了病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 与对照病毒 AAV-CAG-EGFP 的表达,可见病毒感染效率高(图 1),重组病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 能成功感染 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠皮层细胞。

### 2.2 重组病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 显著抑制 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠 HDAC2 的表达

HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠皮层部位通过立体定位注射重

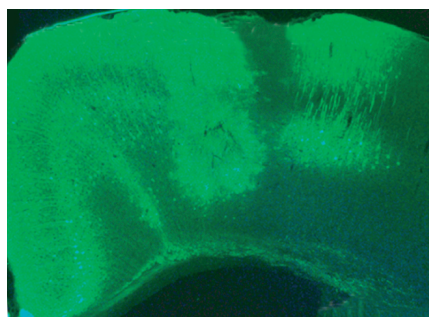


图 1 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠皮层感染腺相关病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 的代表图(×100)

Figure 1 Representative images in the cortex infected by AAV-CAG-EGFP-Cre of HDAC2<sup>fl/fl</sup> mice(×100)

组病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 或对照病毒 AAV-CAG-EGFP 2 μL,于注射后第 7 天,检测针孔周围 HDAC2 的表达。Western blot 结果表现为,与 AAV-CAG-EGFP 组相比,AAV-CAG-EGFP-Cre 组小鼠针孔周围皮层组织中的 HDAC2 表达水平显著降低( $P<0.05$ ,图 2A),免疫荧光检测结果显示绝大部分 GFP 阳性细胞不再表达 HDAC2,表明病毒对 HDAC2 敲减作用强,而对照病毒 AAV-CAG-EGFP 注射后,GFP 与 HDAC2 共标率依旧很高(图 2B)。以上结果说明病毒感染效率高,当病毒中 Cre 表达时,发生 Cre/loxP 基因重组,将 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠中 2 个 loxP 位点之间的 HDAC2 DNA 片段删除,实现对 HDAC2 的条件性敲减。

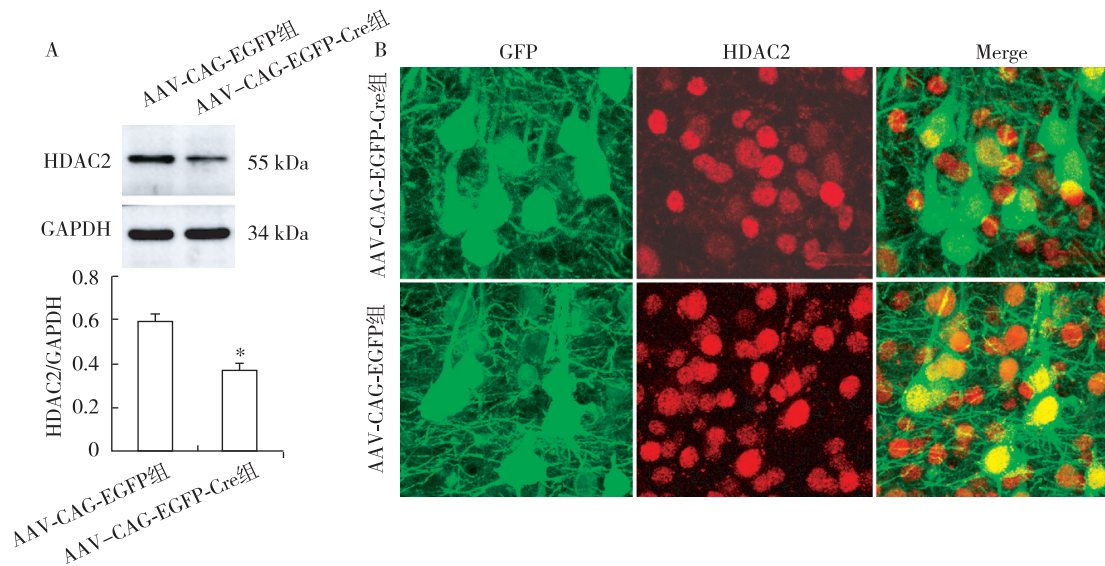
### 2.3 阻断 HDAC2 表达促进脑缺血后行为学的改善

HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠于注射病毒后 1 周进行光诱导血栓形成脑缺血造模,并于造模前第 3 天以及造模后第 8 天进行圆筒实验与网格实验(图 3A),评价 AAV-CAG-EGFP-Cre 组与 AAV-CAG-EGFP 组运动功能的改变。造模前,2 组小鼠网格实验的失足百分比和圆筒实验的不对称指数无统计学差异(图 3B~F)。造模后,与对照组相比,AAV-CAG-EGFP-Cre 组小鼠圆筒实验不对称指数(图 3B)以及网格实验左前肢失足百分比(图 3C)显著降低( $P<0.001$ ),左后肢失足百分比也显著降低(图 3E, $P<0.01$ ),而右侧肢失足百分比差异无统计学意义(图 3D、3F)。以上结果表明小鼠右侧脑缺血造模后左侧肢体运动功能受损,阻断 HDAC2 的表达可促进损伤侧肢体行为学的改善。

## 3 讨论

本研究通过将腺相关病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 注射至 HDAC2<sup>fl/fl</sup> 鼠的运动皮层用以敲减 HDAC2,通过免疫荧光以及 Western blot 分析确证重组病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 与对照病毒 AAV-CAG-EGFP

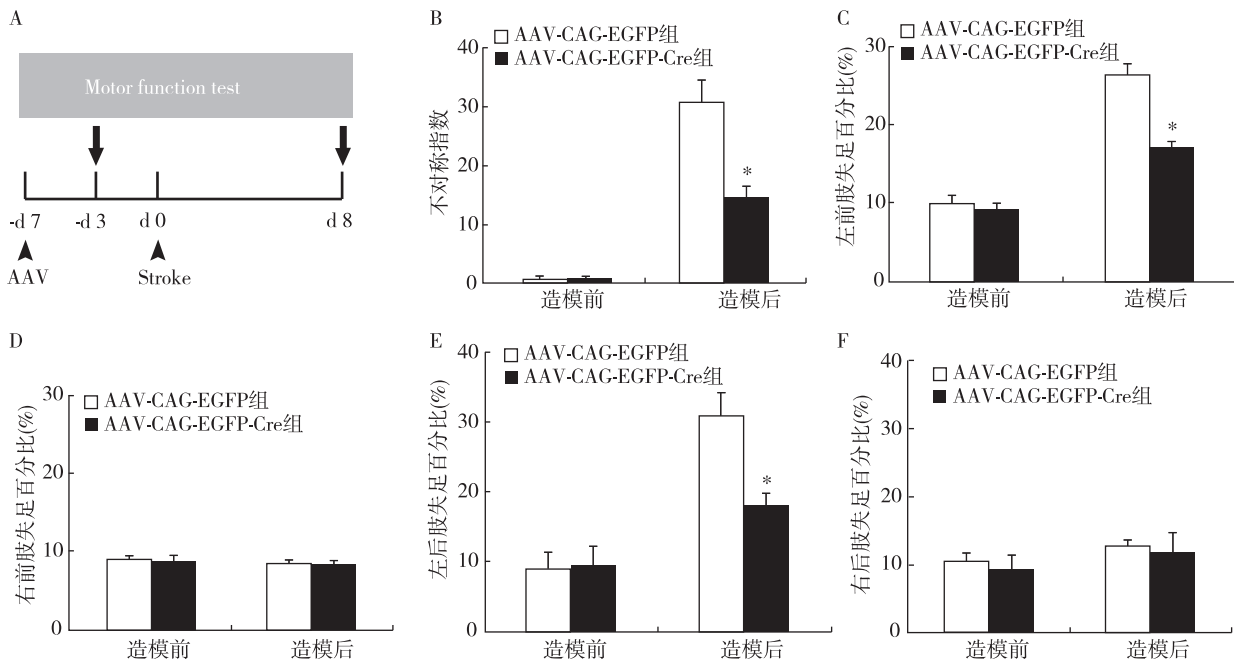




A:腺相关病毒感染后针孔周围 HDAC2 蛋白的表达情况,与 AAV-CAG-EGFP 组相比,\* $P<0.05$ , $n=5$ ;B:病毒 AAV-CAG-EGFP-Cre 注射后,绝大部分 GFP 阳性细胞不再表达 HDAC2;对照病毒 AAV-CAG-EGFP 注射后,GFP 与 HDAC2 共标率高( $\times 400$ )。

图 2 针孔周围 HDAC2 蛋白表达情况

Figure 2 Representative images showing HDAC2 expression in the peri-pinhole zone



A:运动功能行为学检测的流程图;B:两组小鼠圆筒实验不对称指数比较,与 AAV-CAG-EGFP 组比较,\* $P<0.001$ ( $n=12$ );C:两组网格实验左前肢失足百分比,与 AAV-CAG-EGFP 组比较,\* $P<0.001$ ( $n=12$ );D:两组网格实验右前肢失足百分比;E:两组网格实验左后肢失足百分比与 AAV-CAG-EGFP 组比较,\* $P<0.01$ ( $n=12$ );F:两组网格实验右后肢失足百分比。

图 3 阻断 HDAC2 的表达促进脑缺血后行为学的改善

Figure 3 Blocking HDAC2 expression improves behavioral deficits of stroke

的表达。并采用网格实验和圆筒实验证实了通过病毒敲减 HDAC2,可以促进脑卒中后小鼠运动功能的恢复。采用 Cre/loxP 重组酶系统实现了 HDAC2 的条件性敲减,Cre/loxP 重组酶系统的优点在于能使靶基因 HDAC2 的缺失发生在特定部位,即病毒注射的运动皮层,而不影响其他脑区,便于研究,同时

还是条件性敲减,解决了 HDAC 抑制剂非单个亚型特异性抑制以及全身广泛抑制的不足。利用该方法,发现 HDAC2 可以作为脑缺血治疗的新靶点。

脑缺血后机体会启动一系列自适应和自我修复过程,来改善脑缺血的预后,但是这样的自我修复并不足以逆转缺血造成的损伤<sup>[20]</sup>。希望能通过有效的

干预措施,促进大脑自我修复,改善功能修复。脑缺血后细胞大量坏死的区域为缺血核心区,而梗死周围的区域为缺血周围区,缺血后周围区细胞大量继发性凋亡亦是缺血损伤修复的重要阻碍<sup>[21]</sup>。若可以通过一系列分子调节,阻止细胞凋亡,也不失为有效的促进功能恢复的方法<sup>[22-23]</sup>。大量研究表明,HDAC家族尤其是HDAC2与神经元活性、树突生长以及突触可塑性有密切联系<sup>[13-15]</sup>,缺血后干预HDAC2可能通过改变神经元活性、树突生长以及突触可塑性而影响功能恢复。提示抑制HDAC2对于缺血后促进运动功能恢复的作用很可能与其调节树突生长、突触可塑性以及凋亡有关,这些都将是未来进一步探究的方向。

#### [参考文献]

- [1] Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease[J]. *Stroke*, 2015, 46(5):121-122
- [2] Chapman SN, Mehndiratta P, Johansen TL, et al. Current perspectives on the use of intravenous recombinant tissue plasminogen activator(tPA) for treatment of acute ischemic stroke[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2014, 10:75-87
- [3] Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: Asking the brain for directions[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(11):1363-1368
- [4] Zhou L, Li F, Xu HB, et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95[J]. *Nat Med*, 2010, 16(12):1439-1443
- [5] Peng S, Zhao S, Yan F, et al. HDAC2 selectively regulates foxo3a-mediated gene transcription during oxidative stress-induced neuronal cell death[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(3):1250-1259
- [6] Ma T, Huang C, Meng X, et al. A potential adjuvant chemotherapeutics, 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid, inhibits renal tubular epithelial cells apoptosis via enhancing BMP-7 epigenetically through targeting HDAC2 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25396
- [7] Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(2):84-97
- [8] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behavior[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12):861-872
- [9] Verma M. The role of epigenomics in the study of cancer biomarkers and in the development of diagnostic tools[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867:59-80
- [10] Khabele D, Son DS, Parl AK, et al. Drug-induced-inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: Implications for therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 6(5):795-801
- [11] Fitzgerald O'Connor EJ, Badshah II, Addae LY, et al. Histone deacetylase 2 is upregulated in normal and keloid scars [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(4):1293-1296
- [12] Wang G, Shi Y, Jiang X, et al. HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 $\beta$ /PTEN/AKT axis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(9):2853-2858
- [13] Graff J, Rei D, Guan JS, et al. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain [J]. *Nature*, 2012, 483(7388):222-226
- [14] Morris MJ, Mahgoub M, Na ES, et al. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(15):6401-6411
- [15] Luo CX, Lin YH, Qian XD, et al. Interaction of nNOS with PSD-95 negatively controls regenerative repair after stroke [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(40):13535-13548
- [16] Fan J, Alsarraf O, Dahrouj M, et al. Inhibition of HDAC2 protects the retina from ischemic injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(6):4072-4080
- [17] Kim HJ, Rowe M, Ren M, et al. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: Multiple mechanisms of action [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(3):892-901
- [18] Langley B, Brochier C, Rivieccio MA. Targeting histone deacetylases as a multifaceted approach to treat the diverse outcomes of stroke [J]. *Stroke*, 2009, 40(8):2899-2905
- [19] Brown CE, Murphy TH. Livin' on the edge: Imaging dendritic spine turnover in the peri-infarct zone during ischemic stroke and recovery [J]. *Neuroscientist*, 2008, 14(2):139-146
- [20] Ortega FJ, Jolkkonen J. Restorative therapies to enhance sensorimotor recovery following cerebral ischemia [J]. *Acta Neurobiol Exp*, 2013, 73(1):66-78
- [21] Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4):469-477
- [22] Takatsuru Y, Eto K, Knaneko R, et al. Critical role of the astrocyte for functional remodeling in contralateral hemisphere of somatosensory cortex after stroke [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(11):4683-4692
- [23] Hinman JD, Rasband MN, Carmichael ST. Remodeling of the axon initial segment after focal cortical and white matter stroke [J]. *Stroke*, 2013, 44(1):182-189