

油酰乙醇胺对小鼠局灶性脑缺血的保护作用

杨立朝¹, 杨武双², 周宇¹, 金鑫¹

(1. 厦门大学医学院药理学系, 2. 厦门市中医院神经外科, 福建 厦门 361005)

中国图书分类号: R2332; R 3221.81; R 3291.24; R 7431.3301.53

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2009)09-1219-05

摘要: **目的** 观察新型 PPARA 激动剂油酰乙醇胺 (oleylethanolamide, OEA) 对小鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用及特点。 **方法** 线栓法制备小鼠大脑中动脉栓塞模型诱导脑缺血。OEA (10, 20, 40 mg# kg⁻¹) 在术前 3 d 开始每天灌胃给药 1 次; 或在缺血前 0.5 h, 1 h 再灌注同时、再灌注后 1 h 各单次灌胃给予 OEA 40 mg# kg⁻¹。脑缺血 11.5 h 再灌注 24 h 后, 测定小鼠神经功能缺失评分、脑梗死体积、脑水肿等评定脑缺血损伤的指标。 **结果** OEA (20, 40 mg# kg⁻¹) 术前多次给药及 OEA (40 mg# kg⁻¹) 缺血前 0.5 h 或再灌注同时单次给药可明显改善小鼠神经功能损伤, 减小脑梗死体积和减轻脑水肿程度, 且以再灌注同时单次给药效果最为明显。 **结论** 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 mg# kg⁻¹ 和 40 mg# kg⁻¹, 最佳治疗时间点为再灌注同时。

关键词: 油酰乙醇胺; 大脑中动脉栓塞; 脑缺血; 再灌注损伤; 有效剂量; 最佳治疗时间点; 小鼠

油酰乙醇胺 (oleylethanolamide, OEA) 是一种天然存在于组织和循环血液中的脂肪酸乙醇胺类化合物^[1]。OEA 在脑内的功能逐渐引起人们的重视, 在兴奋性脑损伤后, 脑内神经元释放 OEA, 且发挥明显的神经保护作用^[2]。另有研究报道^[3] 脑梗死患者脑组织内 OEA 大量释放, 且主要集中在脑缺血原发灶的周边区, 提示 OEA 对缺血后脑损伤可能具有保护作用。那么外源性应用 OEA 是否具有抗脑缺血损伤作用? 作用特点又如何呢? 本研究在小鼠局灶性脑缺血模型上观察新型 PPARA 激动剂 OEA 是否具有抗脑缺血损伤作用, 并进一步阐明其作用的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2009-04-15 修回日期: 2009-03-02

基金项目: 厦门市科技计划资助项目 (No 3502220084022)

作者简介: 杨立朝 (1983-), 男, 硕士生, 研究方向: 心脑血管药理学, Tel 059222188681, E2mail yangld00@163.com

周宇 (1976-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 心脑血管药理学, 通讯作者, Tel 059222188681, E2mail zhouyu@xmu.edu.cn

1.1.1 **实验动物** 健康昆明种小鼠, 体重 25~30 g 由厦门大学医学院实验动物中心提供 [合格证号: SYXK(闽)200820003]。自然光照周期饲养, 术前 12 h 禁食, 自由饮水。

1.1.2 **药品及试剂** 油酰乙醇胺 (OEA), 厦门大学医学院药理学系提供, 临用前用含体积分数为 0.11 的吐温-20 的生理盐水配置所需浓度; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC), 美国 Amresco 公司产品; 其余均为市售分析纯产品。

1.1.3 **实验仪器** DZ22 型电热恒温振荡水槽, 上海精宏实验设备有限公司; 显微手术器械, 上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂; 数码相机, 日本佳能公司。

1.2 方法

1.2.1 **局灶性脑缺血再灌注模型制备** 参照 Longa^[4] 等建立的方法制备小鼠右侧大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型。小鼠用质量浓度为 100 g# L⁻¹ 的水合氯醛 (400 mg# kg⁻¹) 腹腔注射麻醉后, 分离颈总动脉, 将头端用聚胺酯处理的直径为 0.108 mm 的尼龙丝线经颈总动脉切口插入颈内动脉, 线栓插入总长度自颈总动脉分叉部记为 (11.6±0.1) cm。缺血 11.5 h 后拔除线栓, 即恢复血供。动物术中及术后麻醉清醒前给予保温。动物苏醒后出现对侧肢体运动障碍即为模型制备成功。

1.2.2 **动物分组与给药** 实验小鼠随机分为 5 组: 1 假手术组 (Sham 组): 术前用体积分数为 0.11 的吐温-20 灌胃 3 d (10 ml# kg⁻¹), 2 模型组 (Model 组): 术前用体积分数为 0.11 的吐温-20 灌胃 3 d (10 ml# kg⁻¹), 3 1/2 组分别为术前给予 OEA 10, 20, 40 mg# kg⁻¹ 灌胃 3 d, 4 进行手术造模。

另取实验小鼠随机分为 6 组: 1 假手术组 (Sham 组): 术前用体积分数为 0.11 的吐温-20 灌胃 (10 ml# kg⁻¹), 2 模型组 (Model 组): 术前用体积分数为 0.11 的吐温-20 灌胃 (10 ml# kg⁻¹), 3 1/2 组分别为缺血前 0.5 h, 1 h 再灌注同时、再灌注后 1 h 组, 在相应的时间点单次灌胃给予 OEA 40 mg# kg⁻¹。

1.2.3 神经功能缺失评分 参照 Bederson等^[5]建立的分级法,于缺血再灌注 24 h后对各组动物进行神经功能缺陷评分。0 无症状;1 提尾时,损伤对侧前肢不能伸直;2 向损伤对侧推力下降;3 向损伤对侧转圈。

1.2.4 脑梗死灶体积及脑水肿的测定 采用小鼠脑片 TTC染色法。小鼠于缺血再灌注 24 h后断头取脑,切成 210 mm 厚的冠状切片,置于质量浓度为 20 g# L⁻¹ 的 TTC 溶液中 37℃ 孵育 30 min。正常脑组织着深红色,梗死脑组织不着色。在质量浓度为 40 g# L⁻¹ 的多聚甲醛溶液中避光固定 24 h后数码相机拍照,应用图像分析系统测量脑梗死面积并计算脑梗死体积。用(损伤侧脑半球体积 - 非损伤侧脑半球体积) / 非损伤侧脑半球体积 0 来反映脑水肿程度。

1.3 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Prism 4 for Windows 软件 (GraphPad Software Inc USA) 进行统计学分析,组间比较用单因素方差分析,当方差分析差异有显著性时,进一步用 q 检验作两两比较。

2 结果

2.1 OEA对脑缺血小鼠神经功能缺失评分的影响

缺血再灌注后,小鼠出现明显的神经功能缺失症状,OEA (20, 40 mg# kg⁻¹)术前多次给药能明显减轻小鼠神经功能损伤 (P < 0.01), 见 Fig 1A; OEA (40 mg# kg⁻¹)术前单次给药及术后单次给药,可改善小鼠神经功能损伤,其中以再灌注同时单次给药效果最明显 (P < 0.01), 见 Fig 1B。

2.2 OEA对脑缺血小鼠脑梗死体积的影响

缺血再灌注后,小鼠缺血侧额顶叶皮层和皮层下区(纹状体,海马等)可见明显的苍白梗死灶 (Fig 2A), OEA (20, 40 mg# kg⁻¹)术前多次给药能明显减小脑梗死体积 (P < 0.01), 并且对皮层梗死体积改善更为明显,可降低大脑皮层梗死体积达 75.17% 和 77.53%; 对皮层下区梗死体积只降低 44.57% 和 59.13%, 见 Fig 2B, C。OEA (40 mg# kg⁻¹)不同时间单次给药,以再灌注同时单次给药效果最明显,其脑梗死体积较模型组小鼠减少 74.80% (P < 0.01), 见 Fig 2D。

2.3 OEA对脑缺血小鼠脑水肿程度的影响

OEA (20, 40 mg# kg⁻¹)术前多次给药呈剂量依赖性减轻脑水肿程度 (P < 0.05 或 P < 0.01), Fig 3A; OEA (40 mg# kg⁻¹)缺血前单次给药及缺血后单次给药均可减轻脑水肿程度,其中以再灌注同时单次给药效果最明显,与 Model 组比,其降低脑水肿程度达

61.150%, Fig 3B。

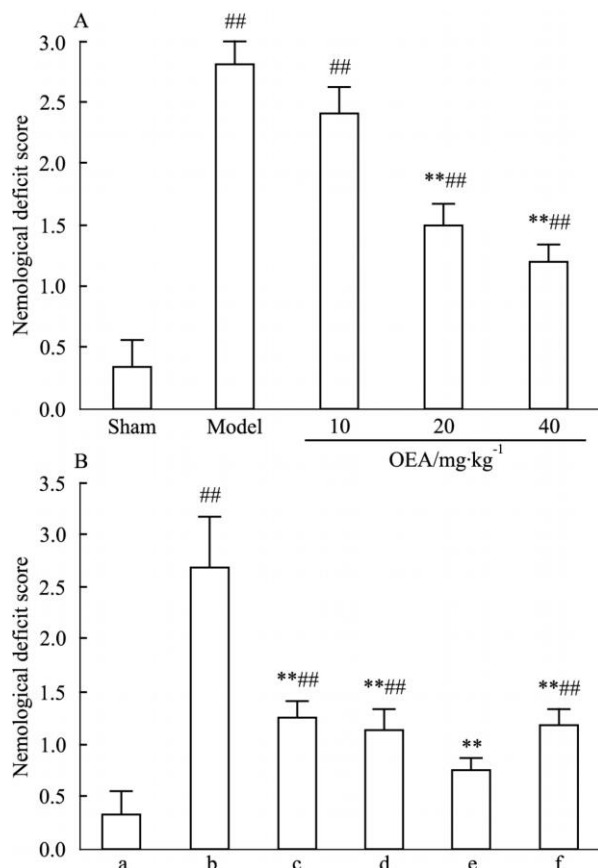


Fig 1 A: Effect of OEA administered with multiple doses before ischemia on neurological deficit score (x² s n = 8); B: Effect of OEA (40 mg# kg⁻¹) administered with single dose at different time points on neurological deficit score (x² s n = 8) ## P < 0.01 vs sham group; * * P < 0.01 vs model group; a Sham group; b: Model group; c 1 h before ischemia group; d 0.5 h before ischemia group; e Reperfusion group; f 1 h after reperfusion group

3 讨论

最近研究表明^[6, 7], OEA 是过氧化物酶体增殖物激活受体 A (peroxisome proliferator-activated receptor A, PPARA) 的天然高亲和激动剂,其激活 PPARA 的半数有效浓度 (EC₅₀) 仅为 120 nmol# L⁻¹。而现有研究提示^[8] PPARA 可能是一种内源性神经保护因子。研究发现^[9-11], PPARA 激动药非诺贝特可明显减少小鼠缺血后的脑梗死体积,减轻脑缺血后的氧化应激反应和炎症反应。最近又有研究报道 PPARA 基因敲除小鼠脑缺血后的梗死体积较野生型小鼠扩大^[12],提示 PPARA 可能直接参与了脑缺血后的神经保护机制。本实验应用新型的 PPARA 激动剂 OEA 亦观察到其对脑缺血损伤后的各种评价指标的改善作用,这一结果为阐明 PPARA 在抗脑缺血损伤中的保护作用提供了新的依据。

本实验还进一步探讨了 OEA 神经保护作用的

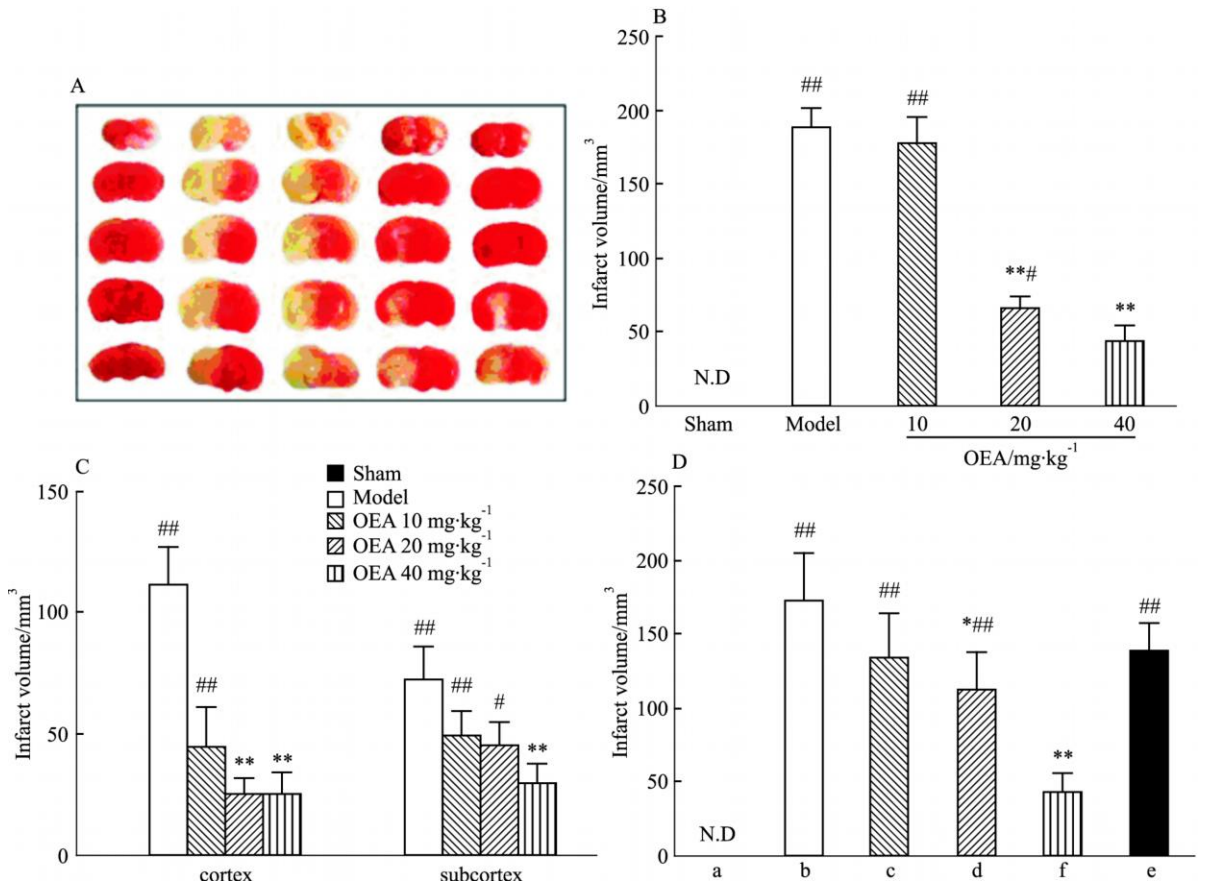


Fig 2 A: Coronal slices stained with TTC; B: Effect of OEA administered with multiple doses before ischemia on infarct volume (x? s n= 8); C: Effect of OEA administered with multiple doses before ischemia on cortical and subcortical infarct volume (x? s n= 8); D: Effect of OEA (40 mg# kg⁻¹) administered with single dose at different time points on infarct volume (x? s n= 8)

#P < 0.05, ##P < 0.01 vs sham group * P < 0.05 ** P < 0.01 vs model group a Sham group; b Model group c 1 h before ischemia group; d 0.5 h before ischemia group; e Reperfusion group; f 1 h after reperfusion group N. D= not detectable

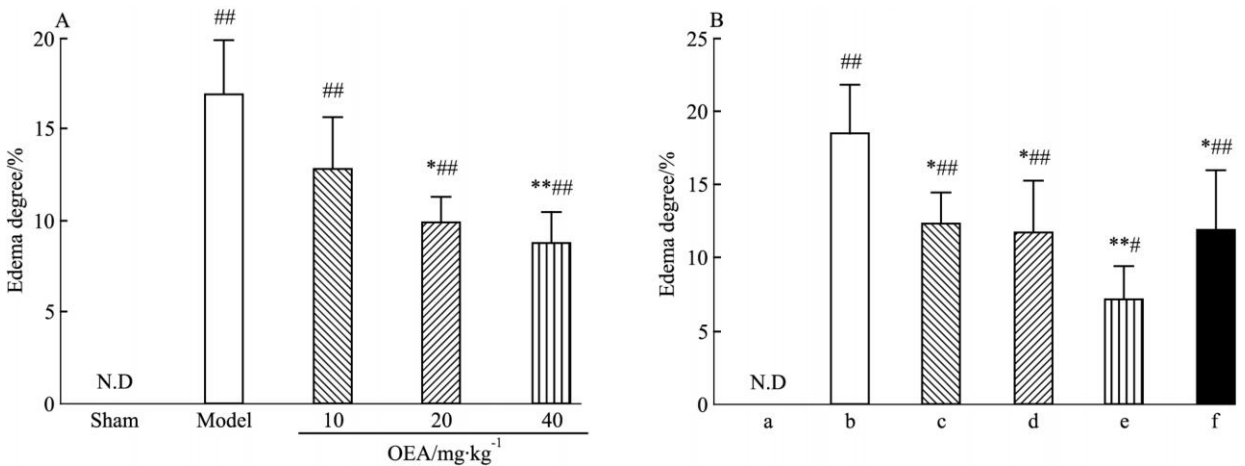


Fig 3 A: Effect of OEA administered with multiple doses before ischemia on brain edema (x? s n= 8);

B: Effect of OEA (40 mg# kg⁻¹) administered with single dose at different time points on brain edema (x? s n= 8)

#P < 0.05, ##P < 0.01 vs sham group * P < 0.05 ** P < 0.01 vs model group a Sham group; b Model group c 1 h before ischemia group; d 0.5 h before ischemia group; e Reperfusion group; f 1 h after reperfusion group N. D= not detectable

剂量依赖性。OEA 抗脑缺血损伤作用具有剂量依赖性,有效剂量是 20 mg# kg⁻¹和 40 mg# kg⁻¹,小剂量 10 mg# kg⁻¹无保护作用。并发现 OEA 对皮层

梗死体积的改善作用更为明显,而对皮层下区的改善作用并不明显,其原因可能是作为脑缺血中心部位的纹状体和海马损伤较为严重,药物难以改善;而

位于缺血周边区的脑皮质区损伤较轻, 药物可发挥明显的保护作用, 是药物重点救治的部位。

另外本实验还观察了 OEA 神经保护作用的时间依赖性。OEA 在缺血前多次给药及在缺血前 0.5h 或再灌同时单次给药均能改善小鼠脑缺血损伤, 其中以再灌同时单次给药效果最明显。研究表明: 脑缺血后, 脑组织从可逆性损伤到不可逆行损伤转变的关键时期是恢复血供过程, 而非缺血过程^[13]。因此, 再灌同时应是药物救治的关键时机。本研究结果也表明 OEA 在再灌注同时给药, 其抗脑缺血损伤效果最为明显, 掌握好这一最佳的治疗时间点是 OEA 发挥脑缺血损伤后神经保护作用的关键。

总之, 本研究结果表明 OEA 具有抗脑缺血损伤作用, 其有效剂量为 20 mg# kg⁻¹ 和 40 mg# kg⁻¹, 最佳治疗时间点是再灌注同时。脑缺血是危害人类健康的主要疾病, 亟需开发有效的治疗药物。OEA 内源性存在于组织中, 毒副作用小, 可作为治疗脑缺血损伤的一种先导化合物, 为今后开发毒副作用小而疗效明显的抗脑缺血损伤药物提供思路。

参考文献:

[1] Guiffrida A, Rodriguez de Fonseca F, Pimelli D. Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2000, 280(1): 87- 93.

[2] Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, et al An endogenous cannabinoid (2AG) is neuroprotective after brain injury[J]. *Nature* 2001, 413(6855): 527- 31.

[3] Schabitz W R, Guiffrida A, Berger C, et al Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study [J]. *Stroke* 2002, 33(8): 2112- 4.

[4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*,

1989, 20(1): 84- 91

[5] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of model and development of neurologic examination[J]. *Stroke* 1986, 17(3): 472- 6

[6] Guzman M, Lovvorne J, Fu J, et al Oleylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor A (PPAR2A) [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 27849- 54.

[7] Fu J, Gaetani S, Oveisi F, et al Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR2A[J]. *Nature* 2003, 425(6953): 90- 3.

[8] 张慧灵, 顾振纶, 秦正红. PPARs 与神经退行性疾病 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(4): 397- 402.

[8] Zhang H L, Gu Z L, Qin Z H. Peroxisome proliferator-activated receptors and neurodegenerative diseases[J]. *Chin Pharmacol Bull* 2006, 22(4): 397- 402

[9] Deplanque D, Gel P, Prault Q, et al Peroxisome proliferator-activated receptor2alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment[J]. *J Neurosci* 2003, 23(15): 6264- 71

[10] Inoue H, Jiang X F, Katayama T, et al Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice[J]. *Neurosci Lett* 2003, 352(3): 203- 6.

[11] 董文鹏, 章翔, 高大宽, 等. 白藜芦醇对小鼠局灶性缺血/再灌注后急性期的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(8): 1032 - 5

[11] Dong W P, Zhang X, Gao D K, et al Resveratrol effect on acute phases of focal cerebral ischemia in mice[J]. *Chin Pharmacol Bull* 2008, 24(8): 1032- 5

[12] Piatek J B, Cho T H, Beuf Q, et al MR imaging of focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)2-deficient mice[J]. *NMR Biomed*, 2007, 20(3): 335- 42.

[13] Rothrock J F, Hart R G. Antithrombotic therapy in cerebrovascular disease[J]. *Ann Intern Med*, 1991, 115(11): 885- 95

Protective effect of oleylethanolamide on focal cerebral ischemia in mice

YANG Li¹, YANG Wu², ZHOU Yu¹, JIN Xin¹

(1. Dept of Pharmacology, College of Medicine, Xiamen University;

2 Dept of Neurosurgery, Xiamen Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen Fujian 361005, China)

Abstract Aim To investigate the effect of oleylethanolamide (OEA), a new PPARA agonist, on focal cerebral ischemia in mice. Methods Transient focal cerebral ischemia in mice was induced by middle cerebral artery occlusion for 115 h. OEA was orally administered either with multiple doses (10, 20, 40 mg# kg⁻¹) once a day for 3 days before ischemia or single dose (40 mg# kg⁻¹) at 0.5 h before or 1 h before ischemia, the same time of reperfusion or 1 h after reper-

fusion respectively. Neurological deficit score, infarct volume and brain edema were determined. Results Pretreatment with multiple doses (20, 40 mg# kg⁻¹) of OEA before ischemia or single dose (40 mg# kg⁻¹) of OEA at 0.5 h before ischemia or at the same time of reperfusion significantly attenuated neurological deficit score, decreased infarct volume and alleviated brain edema, and the treatment at the time of reperfusion had the most marked effect. Conclusion Oleylethanol-

罗红霉素通过诱导型一氧化氮合酶 / 一氧化氮途径抑制哮喘大鼠气道炎症

夏晓东¹, 吴立琴¹, 徐慧¹, 戴元荣¹, 杨雷²

(温州医学院 1. 附属第二医院呼吸内科、2 生物学实验教学中心, 浙江温州 325027)

中国图书分类号: R2332 R 3221.34 R 3451.44 R 5621.2501.53 R 9781.15

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2009)09-1223-05

摘要: **目的** 探讨罗红霉素对哮喘大鼠支气管诱导型一氧化氮合酶 (NOS) 及一氧化氮 (NO) 的影响。 **方法** 24 只成年哮喘大鼠随机分成对照组、哮喘组以及罗红霉素组。对支气管肺泡灌洗液 (BALF) 细胞总数及嗜酸性粒细胞计数, 免疫组织化学检测大鼠支气管上皮细胞 NOS 蛋白表达, RT-PCR 检测肺组织 NOS mRNA 表达, 分光光度计检测肺组织 NOS 活性及 NO 含量。双抗体夹心法检测肺组织白细胞介素 24 (IL24) 及干扰素 γ (IFN γ)。 **结果** 哮喘组大鼠 BALF 细胞总数及嗜酸性粒细胞分类分别为 (7128 ± 1165) × 10⁸ L⁻¹、(7173 ± 1154)%, 均高于对照组 (3176 ± 0197) × 10⁸ L⁻¹、(1127 ± 0160)%; 罗红霉素组 BALF 细胞总数及嗜酸性粒细胞分类分别为 (5168 ± 0195) × 10⁸ L⁻¹、(5154 ± 1153)%, 明显低于哮喘组, 差异有统计学意义。哮喘组肺组织 IL24 浓度、NOS 活性及 NO 含量高于对照组, 罗红霉素组肺组织 IL24 浓度、NOS 活性及 NO 含量低于哮喘组。哮喘组肺组织 IFN γ 浓度低于对照组, 罗红霉素组肺组织 IFN γ 浓度高于哮喘组。哮喘大鼠支气管上皮细胞 NOS 蛋白及肺组织 NOS mRNA 表达分布吸光度值分别为 (0125 ± 0106)、(0152 ± 0114), 较对照组 [(0114 ± 0105)、(0133 ± 0105)] 明显增强; 但罗红霉素组 NOS 蛋白及 mRNA 表达为 (0115 ± 0103)、(0135 ± 0107), 均明显较哮喘组减弱。 **结论** 罗红霉素通过干预哮喘大鼠气道 IL24、IFN γ 以及 NOS/NO 体系, 抑制哮喘气道炎症反应。

关键词: 罗红霉素; 哮喘; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 气道炎症; 细胞因子

收稿日期: 2009-05-21 修回日期: 2009-06-19

基金项目: 温州市科委基金资助项目 (No Y2006A039)

作者简介: 夏晓东 (1973-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 支气管哮喘及慢性阻塞性肺疾病发病机制, E-mail: xia_xiaodong@hotmail.com

杨雷 (1970-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 疾病分子生物学, E-mail: yelei@sohu.com

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸产生, 一氧化氮合酶包括神经元型 (nNOS)、内皮型 (eNOS) 及诱导型 (iNOS) 共 3 种。支气管哮喘 (以下简称哮喘) 是由嗜酸性粒细胞等多种细胞和细胞组分参与的慢性气道炎症性疾病, NOS/NO 体系的变化可能与哮喘气道炎症反应密切相关^[1]。已有研究显示临床上常用的大环内酯类抗生素可以通过纠正 Th1/Th2 细胞因子失衡, 起抑制炎症作用。罗红霉素是临床应用广泛的大环内酯类抗生素之一, 哮喘患者服用罗红霉素其临床症状及其支气管高反应性能得到明显的改善^[2]。为此, 本研究通过复制哮喘大鼠模型, 观察罗红霉素对哮喘大鼠气道 NOS 基因及其蛋白表达、NO 含量以及 Th1/Th2 细胞因子白细胞介素 4 (IL24)、干扰素 γ (IFN γ) 水平变化的影响, 以期探讨罗红霉素在哮喘气道炎症形成中的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料 Sprague Dawley (SD) 大鼠由温州医学院动物实验中心提供, 鸡卵清蛋白购自 Sigma 公司, 罗红霉素片购自法国 Uspifar 公司, 兔抗大鼠 NOS 多克隆抗体购自武汉博士德公司, NOS/GAPDH 引物由上海生工合成, NO 及 NOS 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, IL24 及 IFN γ ELISA 试剂盒购自上海晶美生物工程公司。

1.2 动物模型复制及标本处理 清洁级、健康 SD 大鼠 24 只, 随机均分为 3 组 (n = 8), 分别为: 正常对照组、哮喘组以及罗红霉素组。大鼠哮喘模型制作: d 1 腹腔内注射 10% 的鸡卵清蛋白和 10% 的氢氧化铝混合液 1 ml, d 8 相同剂量、相同方法加强致敏 1 次; 致敏后 d 15 开始予 1% 鸡卵清蛋白雾化吸入刺激, 每周 3 次, 每次 30 min, 连续 8 wk。正常对

lamide has a dose and time dependent neuroprotective effect on the injury in the acute phase of transient focal cerebral ischemia in mice with effective doses of 20 mg/kg and 40 mg/kg and the optimal therapeutic

time point of the same time of reperfusion
Key words: oleylethanolamide, middle cerebral artery occlusion, cerebral ischemia, reperfusion injury, effective doses, optimal therapeutic time point, mice