

- [10] Leu J J ,George D L. Hepatic IGFBP1 is a prosurvival factor that binds to BAK ,protects the liver from apoptosis and antagonizes the proapoptotic actions of p53 at mitochondria [J]. *Genes Develop* , 2007 21(23) :3095-3109.
- [11] 庞 涛,陈婉蓉. 线粒体与细胞凋亡的研究进展[J]. *卫生毒理学杂志* 2003 ,17(2) :122-125.
- [12] 白 莉,曹传平,张映辉,等. 促凋亡蛋白 Bid 诱导肝细胞凋亡的机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报* 2004 20(5) :670-674.
- [13] 钱呈睿,葛海良,王 颖. p53 转录非依赖活性介导细胞凋亡[J]. *生命科学* 2007 ,19(3) :326-329.
- [14] 赛 燕,刘 勇,董兆君. 死亡底物 PARP 与细胞凋亡[J]. *免疫学杂志* 2002 ,18(3) :177-181.
- [15] Leu J J ,Pimkina J ,Frank A ,et al. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70[J]. *Mol Cell* 2009 36(1) :15-27.

油酰乙醇胺在小鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用及机制

刘金凤¹, 周 宇², 杨武双³, 马 昂², 郑城微², 励佳忆², 金 鑫²

(1. 厦门市中医院 药剂科, 2. 厦门大学 医学院 基础医学部, 3. 厦门市中医院 神经外科, 福建 厦门 361009)

摘要:目的 研究油酰乙醇胺(OEA)在脑缺血再灌注损伤中的作用及机制。方法 线栓法制备小鼠大脑中动脉栓塞模型,缺血90 min后再灌注。应用HPLC-MS/MS方法测定脑组织内OEA的含量。给予OEA(5,10,40 mg/kg, ig)或OEA水解酶抑制剂URB597(1 mg/kg, ig),观察其对小鼠急性脑缺血再灌注损伤的影响。测定脑组织丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)的活性。观察MK886对OEA抗脂质过氧化损伤的影响。结果 脑缺血再灌注后6 h,损伤侧脑内OEA含量开始升高,再灌注后24 h升高最明显。脑缺血再灌注后给予OEA(40 mg/kg)或URB597(1 mg/kg)可减少神经功能缺失评分,减小脑梗死体积,减轻脑水肿程度。OEA可减少脑内MDA含量,增加抗氧化酶SOD的活性。OEA这一抗氧化作用可被MK886所取消。结论 脑缺血再灌注可增加脑内OEA的含量,OEA通过激动PPAR α ,减轻脂质过氧化损伤发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

关键词: 油酰乙醇胺; 脑缺血; 再灌注损伤; 脂质过氧化

中图分类号: R961 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2012)06-0758-04

The protective effect of oleylethanolamide on acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice and its mechanism

LIU Jin-feng¹, ZHOU Yu², YANG Wu-shuang³, MA Ang², ZHENG Cheng-wei², LI Jia-yi², JIN Xin²

(1. Department of Pharmacy, Xiamen TCM Hospital, 2. Faculty of Basic Medicine, Medical School, Xiamen University, 3. Department of Neurosurgery, Xiamen TCM Hospital, Xiamen 361009, China)

Abstract: Purpose To investigate the role of oleylethanolamide(OEA) in focal cerebral ischemia reperfusion injury, and to illustrate its possible mechanisms. **Methods** Focal cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion in mice for 90 min and then reperfusion. The contents of OEA in brain tissue following cerebral ischemia reperfusion were measured by HPLC-MS/MS. OEA(5, 10, 40 mg/kg) and URB597(1 mg/kg) were intragastrically administered at the same time of reperfusion and

收稿日期: 2012-04-30

基金项目: 厦门市科技计划资助项目(NO. 3502Z20084022)

作者简介: 刘金凤,女,本科,副主任药师; 杨武双,通信作者,主任医师, Tel: 13959213145, E-mail: li200665@126.com。

2 h after reperfusion respectively. The neurological deficit score, infarct volume and brain edema degree were determined 24 h after reperfusion. The contents of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in brain tissue were measured. **Results** OEA content in brain tissue increased 6 h after reperfusion and markedly increased 24 h after reperfusion. OEA (40 mg/kg) and URB597 (1 mg/kg) ameliorated neurological dysfunction, reduced infarct volume, attenuated brain edema degree and decreased the extravasations of EB. OEA (40 mg/kg) increased the activity of SOD and attenuated the lipid peroxidation in brain tissues. MK886 abolished this anti-oxidant effect of OEA. **Conclusion** The content of OEA in brain tissue increased following focal cerebral ischemia reperfusion in mice. OEA exerts protective effect against acute focal cerebral ischemia reperfusion injury by activating PPAR α and reducing lipid peroxidation in brain tissue.

Key words: oleoylethanolamide; cerebral ischemia; reperfusion injury; lipid peroxidation

油酰乙醇胺 (oleoylethanolamide, OEA) 是一种内源性脂质分子,对脑缺血再灌注损伤具有治疗作用,OEA (20~40 mg/kg) 术前多次给药及 OEA (40 mg/kg) 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^[1]。本研究在小鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤模型上,测定脑内 OEA 的含量,并观察外源性给予 OEA 或 OEA 水解酶抑制剂 URB597 对脑缺血再灌注损伤的作用,并从氧化应激的角度来探讨 OEA 抗脑缺血再灌注损伤的可能机制。

1 材料

OEA 及 10-十一烯酰乙醇胺 (内标) 由厦门大学医学院合成; URB597、MK886, 美国 Cayman Chemical 公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 及过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

HP 1200 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; Qtrap 3200 质谱仪, 美国 AB 公司。

健康昆明种小鼠, δ , 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) 2008-0003。自然光照周期饲养, 术前 12 h 禁食, 自由饮水。

2 方法

2.1 小鼠大脑中动脉栓塞模型制备

线栓法制备小鼠右侧大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型^[2], 缺血 90 min 后拔出线栓, 即形成再灌注。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。

2.2 动物分组及给药

为测定脑缺血再灌注后不同时间点脑内 OEA 的含量, 小鼠随即分为 6 组: ①假手术组 (sham 组):

仅手术暴露右侧颈总动脉及颈内动脉, 不做缺血处理; ②~⑥再灌注组: 制模后缺血 90 min 后分别再灌注 1, 3, 6, 12 和 24 h。

为评价 OEA 及 URB597 对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响, 小鼠随机分为 6 组: ①假手术组 (sham 组); ②溶媒组 (vehicle 组): 制模后缺血 90 min 后再灌注; ③~⑤ OEA 给药组 (O5、O10、O40 组): 脑缺血再灌注同时及再灌注后 2 h, 分别给予 OEA 5, 10, 40 mg/kg 灌胃; ⑥ URB597 给药组 (U1 组): 脑缺血再灌注同时及再灌注后 2 h, 给予 URB597 1 mg/kg 灌胃。

为研究 OEA 抗脑缺血再灌注损伤作用机制, 实验小鼠随机分为 4 组: ①假手术组 (sham 组); ②溶媒组 (vehicle 组); ③ OEA 给药组 (O40 组): 脑缺血再灌注同时及再灌注后 2 h, 给予 OEA 40 mg/kg; ④ MK886 干预组 (MK + O40 组): 在灌胃给予 OEA (40 mg/kg) 前 30 min 灌胃给予 MK886 10 mg/kg。OEA 及 MK886 临用前用 10% 吐温 80 生理盐水配成相应的浓度, 按 10 mL/kg 灌胃给药。假手术组和溶媒组以相同的方式给予相应的溶媒。

2.3 HPLC-MS/MS 法测定脑内 OEA 含量

2.3.1 脑组织样本制备 脑缺血 90 min 再灌注后 1, 3, 6, 12 和 24 h, 在冰上快速分离出损伤侧及损伤对照侧脑组织, 漂洗, 称重, 测定前每 100 mg 组织加入含有内标的生理盐水 1 μ L, 用匀浆机制备脑组织匀浆, 加入丙酮沉淀蛋白, 4 $^{\circ}$ C, 离心 10 min, 取上清, N_2 吹干后, 加入萃取液 200 μ L 提取脂质, 取下层有机相, N_2 吹干, 分析前样品用甲醇 100 μ L 复溶进行 HPLC-MS/MS 分析。

2.3.2 HPLC-MS/MS 分析 参考已报道的方法^[3]略加改进, 应用 HP 1200 高效液相仪联用 3200 Q

TRAP 质谱仪系统进行 OEA 含量的测定, 色谱柱采用 ODS-2 HYPERSIL C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相为水和甲醇, 采用大气压化学电离正离子扫描方式, 多反应检测模式检测, 应用 analyst 1. 4.1 分析软件进行数据的采集和分析。

2.4 脑损伤的评价

2.4.1 神经功能缺失评分 脑缺血后再灌注 24 h, 给予 URB597 1 mg/kg 及 OEA 40 mg/kg 再灌注后参照 Longer 5 分法^[4] 进行神经功能学评分。

2.4.2 脑梗死灶体积及脑水肿的测定 小鼠再灌注 24 h 和 URB597 1 mg/kg 再灌注后取脑, 切成 2 mm 厚切片, 将切片置于 1% TTC 溶液中避光 37 °C 恒温孵育 20 min, 4% 多聚甲醛溶液中避光固定 24 h 后, 应用图像分析处理软件计算脑梗死体积及脑半球体积的近似值。

2.5 脑组织 MDA 含量及 SOD、CAT 活性的测定

脑缺血再灌注后 24 h, 取缺血侧脑组织, 用冰生理盐水制成 10% 脑组织匀浆, 离心取上清, 置于 -80 °C 保存, MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定, SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定, CAT 活性采用紫外分光光度法测定, 采用考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。

2.6 统计学处理

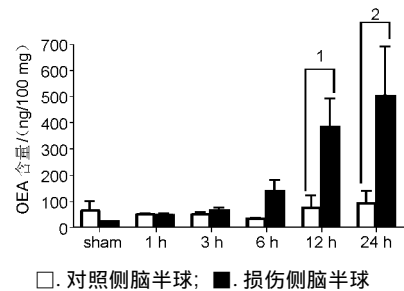
所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Prism 4 for windows 软件进行统计学分析, 组间比较用单因素方差分析, 当方差分析有显著性差异时, 进一步用 *q* 检验作两两比较。

3 结果

3.1 脑缺血再灌注后不同时间点脑内 OEA 含量的变化

脑缺血再灌注后 6 h, 脑组织内 OEA 的含量较对照侧有升高趋势, 但无统计学意义; 再灌注后 12 h 和 24 h, 损伤侧脑组织内 OEA 含量较非损伤侧明显

升高, 分别升高达 4 和 5 倍。在脑缺血再灌注后不同时间点, 非损伤侧脑组织内 OEA 含量没有明显变化。见图 1。



□. The contralateral brain hemisphere; ■. The ipsilateral brain hemisphere of injury

与损伤对侧比较: ¹*P* < 0.05, ²*P* < 0.01

Compared with injury contralateral: ¹*P* < 0.05, ²*P* < 0.01

图 1 小鼠脑缺血再灌注后不同时间点脑内 OEA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

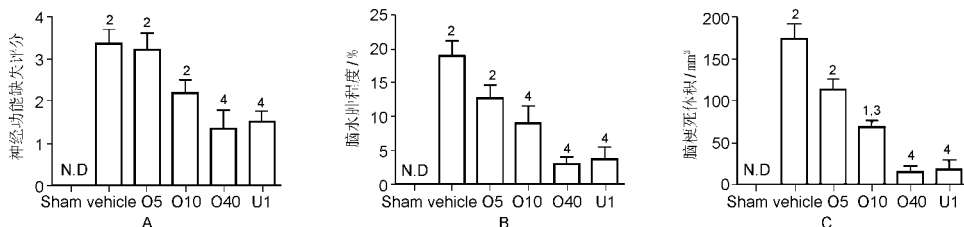
Fig. 1 OEA content in brain tissue following focal cerebral ischemia/reperfusion in mice ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

3.2 OEA 及 URB597 对小鼠脑缺血再灌注损伤的作用

脑缺血再灌注后 24 h, 小鼠出现明显的神经功能障碍, 神经功能缺失评分较假手术组明显升高, URB597 1 mg/kg 及 OEA 40 mg/kg 再灌注后给药可减少神经功能缺失评分 (图 2A)。OEA 5 和 10 mg/kg 无效, 呈剂量依赖性。

脑缺血再灌注后 24 h, 损伤侧脑组织出现明显的苍白梗死灶和脑水肿, OEA 10, 40 mg/kg 再灌注后给药可减少脑梗死和减轻脑水肿程度, OEA 5 mg/kg 无效, 呈剂量依赖性。URB597 1 mg/kg 再灌注后给药可明显减小脑梗死体积, 减轻脑水肿程度, 与溶媒组相比降低脑梗死体积达 90% (图 2B), 减轻水肿程度达 80.4% (图 2C)。

3.3 OEA 对脑内 MDA 含量及 SOD、CAT 活性的影响



与假手术组比较: ¹*P* < 0.05, ²*P* < 0.01; 与溶媒组比较: ³*P* < 0.05, ⁴*P* < 0.01

Compared with sham group: ¹*P* < 0.05, ²*P* < 0.01; Compared with vehicle group: ³*P* < 0.05, ⁴*P* < 0.01

图 2 OEA 及 URB597 对小鼠局灶性脑缺血再灌注后神经功能缺失评分 (A), 脑梗死体积 (B), 脑水肿程度 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Fig. 2 Effect of OEA and URB597 on neurological deficit score (A), infarct volume (B) and brain edema degree (C) after focal cerebral ischemia reperfusion in mice ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

脑缺血再灌注后 24 h,小鼠脑组织内脂质过氧化产物 MDA 含量明显增加,SOD 和 CAT 活性降低,OEA(40 mg/kg)脑缺血再灌注后给药可降低脑内 MDA 含量,提高 SOD 活性,对 CAT 活性无影响,MK886 可阻断 OEA 的抗脂质过氧化损伤作用(表 1)。

表 1 OEA 对小鼠局灶性脑缺血再灌注后脑内 MDA 含量,SOD 和 CAT 活性的影响($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

Tab.1 Effect of OEA on MDA content,SOD and CAT activity in brain tissue after focal cerebral ischemia reperfusion in mice ($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	MDA /(nmol/mg·pro)	SOD /(u/mg·pro)	CAT /(u/mg·pro)
假手术组	4.14 ± 0.41	179.60 ± 16.87	5.41 ± 0.80 ¹
溶媒组	7.10 ± 0.90 ¹	57.22 ± 8.40 ¹	2.78 ± 1.93 ¹
O40 组	2.43 ± 0.34 ²	86.5 ± 12.08 ²	1.44 ± 0.58
MK + O40 组	4.75 ± 0.51 ²	56.52 ± 7.30 ²	1.73 ± 1.60

与假手术组比较:¹ $P < 0.01$; 与溶媒组比较:² $P < 0.01$

Compared with sham group:¹ $P < 0.01$; Compared with vehicle group:² $P < 0.01$

4 讨论

我们研究发现脑缺血再灌注后 6 h,损伤侧脑组织内 OEA 含量开始增加,再灌注后 24 h 升高最明显,而损伤对侧脑组织 OEA 含量无明显改变,提示脑缺血再灌注可升高脑内 OEA 的水平,外源性给予 OEA 或应用 URB597(选择性脂肪酸氨基水解酶抑制剂)内源性增加脑内 OEA 水平,可减轻大鼠神经功能缺失,减小脑梗死体积,减轻脑水肿程度,对急性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,脑缺血再灌注后损伤侧脑组织内 OEA 含量的升高可能和 OEA 的合成增加或降解减少有关。具体机制有待进一步研究。

通过外源性给予 OEA 及内源性增加 OEA 水平来研究 OEA 在脑缺血再灌注中的作用,结果发现脑缺血再灌注后外源性给予 OEA,剂量依赖性的发挥抗脑缺血再灌注损伤作用,最佳剂量为 40 mg/kg,URB597 可上调脑内 OEA 水平,进而产生一系列中枢效应,如加强小鼠的学习记忆功能^[5],促进大鼠维持觉醒状态^[6]。我们的研究表明 URB597 再灌注后给药与 OEA 类似,亦可发挥抗脑缺血再灌注损伤作用,并且比 OEA 具有更好的效果,只需 1 mg/kg

就可发挥类似的作用。

我们的研究结果还表明,OEA 抗脑缺血再灌注损伤可能和其抗氧化应激作用有关,氧化应激损伤是急性脑卒中造成脑水肿和脑梗死的重要机制。脑缺血再灌注时产生大量的自由基,而体内 SOD、CAT 等抗氧化酶活性下降,导致氧自由基大量堆积,进一步加重脑损伤^[7]。OEA 在发挥抗脑缺血再灌注损伤的同时,可明显降低脑组织内脂质过氧化产物 MDA 含量,提高 SOD 的活性,可对抗脑组织的脂质过氧化损伤。PPAR α 拮抗剂 MK886 可取消 OEA 的抗氧化作用,说明 OEA 的抗氧化作用和其激动 PPAR α 相关。

总之,OEA 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其作用机制与激动 PPAR α 提高抗氧化酶活性,减轻脑缺血再灌注引起的脂质过氧化损伤有关,外源性给予 OEA 或内源性增加脑内 OEA 可能是治疗急性脑卒中的一条新的途径。

参考文献:

- [1] 杨立朝,杨武双,周宇等.油酰乙醇胺对小鼠局灶性脑缺血的保护作用[J].中国药理学通报,2009,25(9):1219-1223.
- [2] Mao Y, Yang G Y, Zhou L F, et al. Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 63(2): 366-370.
- [3] 郑城微,金鑫,沈燕慧等.液相色谱-质谱联用法对大鼠体内 s-油酰丙醇胺的组织分布研究[J].药学学报,2011,46(8): 962-967.
- [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] Mazzola C, Medalie J, Scherma M, et al. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors[J]. Learn Mem, 2009, 16(5): 332-337.
- [6] Murillo-Rodriguez E, Palomero-Rivero M, Millan-Aldaco D, et al. Administration of URB597, oleoylethanolamide or palmitoylethanolamide increases waking and dopamine in rats[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e20766.
- [7] Chrissobolis S, Miller A A, Drummond G R, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease[J]. Front Biosci, 2011, 16: 1733-1745.