

天麻素对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用研究

李文君 徐振田 索大琴 谢安智

(厦门大学医学院 基础医学部 福建 厦门 361000)

[摘要] 目的 探讨天麻素(Gastrodine, Gas)对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用及机制。方法 线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型,缺血2 h后再灌注。天麻素(5, 10, 20 mg/kg)再灌注同时腹腔给药,再灌注后24 h,测定大鼠神经功能缺失评分和脑梗死体积,伊文思蓝法观察血脑屏障破坏程度,Western blot检测梗死半暗带皮层组织炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的蛋白表达。结果 天麻素(10, 20 mg/kg)能改善大鼠脑缺血后神经功能缺失,减小脑梗死体积,降低血脑屏障的通透性。天麻素(20 mg/kg)对梗死半暗带皮层组织TNF- α 表达的抑制率为24%,对IL-1 β 表达的抑制率为34%,对IL-6表达水平的抑制率为38%。结论 天麻素可降低血脑屏障的通透性,其通过减低炎症反应而对局灶性脑缺血损伤发挥保护作用。

[关键词] 天麻素;脑缺血;血脑屏障;炎症

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-1678(2014)05-0040-04

Protective effect of Gastrodine on acute focal cerebral ischemia injury in rats

LI Wen-jun, XU Zhen-tian, SUO Da-qin, XIE An-zhi

(Department of Basic Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361000, China)

[Abstract] Objective To investigate the role of Gastrodine (Gas) in focal cerebral ischemia reperfusion injury and illustrate its possible mechanisms. Methods Focal cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion in rats for 2 h and then reperfusion. Gas (5, 10, 20 mg/kg) were intragastrically administered at the same time of reperfusion. The neurological deficit score, infarct volume and the extravasation of EB were determined 24h after reperfusion. The expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 proteins were detected by western blot. Results Gas (10, 20 mg/kg) ameliorated neurological dysfunction, reduced infarct volume and decreased the extravasations of EB. Gas (20 mg/kg) decreased the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in penumbra tissues, and the inhibition rates were 24%, 34% and 38%. Conclusion Gastrodine exerts protective effect against acute focal cerebral ischemia reperfusion injury by reducing inflammation in brain tissue and permeability of blood-brain barrier.

[Keywords] Gastrodine; cerebral ischemia; blood-brain barrier; inflammation

免疫性炎症反应参与了缺血性中风后的脑损伤。脑缺血后数小时,受损脑区域的炎症反应开始启动,持续数天后,使脑缺血所致的迟发性脑损伤加重。脑缺血后释放大量自由基、炎症因子和前列腺物质,损害中枢神经系统,促使神经细胞死亡,加重缺血性中风的损伤,因此脑缺血损伤中的炎症反应越来越受到关注^[1-3]。天麻(*Gastrodia rhizome*)为兰科植物的干燥块茎,其有效成分天麻素(Gastrodine)对中枢神经系统、心血管系统和免疫系统有较广泛的药理活性,能扩张脑血管、增加脑血流量、提高脑细胞抗缺氧能力^[4-5]。天麻素是否影响脑缺血再灌注损伤血脑屏障的通透性,是否影响到缺血半暗带的炎症反应,目前尚未见报道。

本研究在大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤模型基础上,通过测定天麻素对梗死半暗带皮层组织内TNF- α 、IL-1 β 、IL-6蛋白表达的影响,旨在深入研究天麻素对脑缺血过程中炎症反应

的作用,为临床治疗脑缺血提供理论依据和实验支持。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器 天麻素(Gas),上海永叶生物科技有限公司;兔抗鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6抗体,Abcam公司;兔抗鼠 β -actin单克隆抗体,Santa Cruz公司;ECL发光系统,联科生物公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC),美国Amresco公司;其它均为市售分析纯产品。

显微手术器械,上海医疗器械有限公司;多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司;Western blot装置,美国BioRad公司;Kodak IS4000R全自动图像工作站,美国Kodak公司。

1.2 实验动物 清洁级SD大鼠120只,雄性,体质量250~300 g,由厦门大学医学院实验动物中心提供,合格证号:SYXK(闽)2013-0003。术前12 h禁食,自由饮水。

1.3 方法

1.3.1 大鼠大脑中动脉栓塞脑缺血模型的制备:线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion,

作者简介:李文君,女,硕士,实验师,主要研究方向:脑缺血保护,E-mail:liwenjun@xmu.edu.cn。

MCAO)^[6]。大鼠称重、麻醉;分离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉;用动脉夹夹闭颈总动脉,在颈总动脉和颈内动脉分叉处剪一小口,将线栓经切口处插入大脑中动脉始端,栓塞大脑中动脉,造成局灶性脑缺血,缺血 2 h 后拔出线栓,即形成再灌注,动物苏醒后出现对侧肢体运动障碍即为模型制备成功。

1.3.2 分组及给药:为评价 Gas 对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响,50 只 SD 大鼠随机分为 5 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溶媒组(Model 组):造模后缺血 2 h 后再灌注;③~⑤Gas 给药组(5、10、20 mg/kg 组):脑缺血再灌注同时分别给予 Gas 5、10、20 mg/kg 腹腔注射。

1.3.3 免疫印迹:为检测 Gas 对大鼠脑缺血后梗死半暗带炎症因子的作用,在脑缺血后 24 h 处死大鼠,取梗死半暗带皮层组织,加入裂解液冰上裂解 30 min 后,14 000 r/min 离心 10 min,上清即为总组织蛋白溶解成分。SDS-PAGE 每孔上样量为 50 ug,蛋白经电泳分离后,将胶上蛋白转印到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,然后分别加入 1:1000 稀释的兔抗大鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 多克隆抗体,4℃孵育过夜,再加入 1:5 000 稀释的羊抗兔二抗,37℃孵育 1 h,用化学荧光试剂检测,使用 Kodak IS4000R 系统检测成像分析。实验以 β-actin 为内参蛋白。

1.3.4 脑损伤的评价

① 神经功能缺失评分:大鼠脑缺血后再灌注 24 h 参照 Longer 5 分法^[7]进行神经功能学评分。

② 脑梗死灶体积及脑水肿的测定:大鼠脑缺血后再灌注 2 h,断头取脑,于 -20℃中冷冻 30 min,切成 2.0 mm 厚的冠状切片,放于 1% TTC 溶液中,避光 37℃恒温孵育 20 min,4%多聚甲醛溶液中避光固定 24 h 后,运用图像分析处理软件计算脑梗死体积。

③ 血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏程度的观察和测定:大鼠脑缺血后再灌注 6 h,尾静脉注射质量浓度为 5%的伊文思蓝(evansblue, EB),剂量 10 mL/kg,18 h 后给予水合氯醛麻醉后打开胸腔,于右心耳部剪一小口,从左心室插入导管至主动脉,向主动脉内缓慢注入生理盐水,直到右心房流出液体变清亮,断头取脑,整脑拍照后,于 -20℃中冷冻 15 min,切成 2.0 mm 厚的冠状切片。未受损的正常脑组织无 EB 渗透呈白色;梗死侧脑组织有大量 EB 渗透呈蓝色,说明血脑屏障受损。用相机按顺序拍摄染色后的脑片,用图像分析与处理软件计算每个脑片 EB 渗透面积,EB 渗透体积为:面积求和后乘以切片厚度(2 mm)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计软件分析,正态计量数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较做单因素方差分析,两两比较选用 LSD-t 法分析。

2 结果

2.1 Gas 对大鼠脑缺血损伤的保护作用 大鼠脑缺血再灌注后 24 h,损伤侧脑组织出现明显的苍白梗死灶, Gas 10、20 mg/kg

再灌注同时给药可剂量依赖性减小脑梗死体积, Gas 5 mg/kg 无效(图 1a, 1b)。大鼠脑缺血再灌注 24 h,出现明显的神经功能损伤,与 Sham 组相比,神经功能缺失评分明显升高; Gas 给药组(10、20 mg/kg)可减少神经功能缺失评分,并呈剂量依赖性, Gas 5 mg/kg 组无影响(见图 1c)。

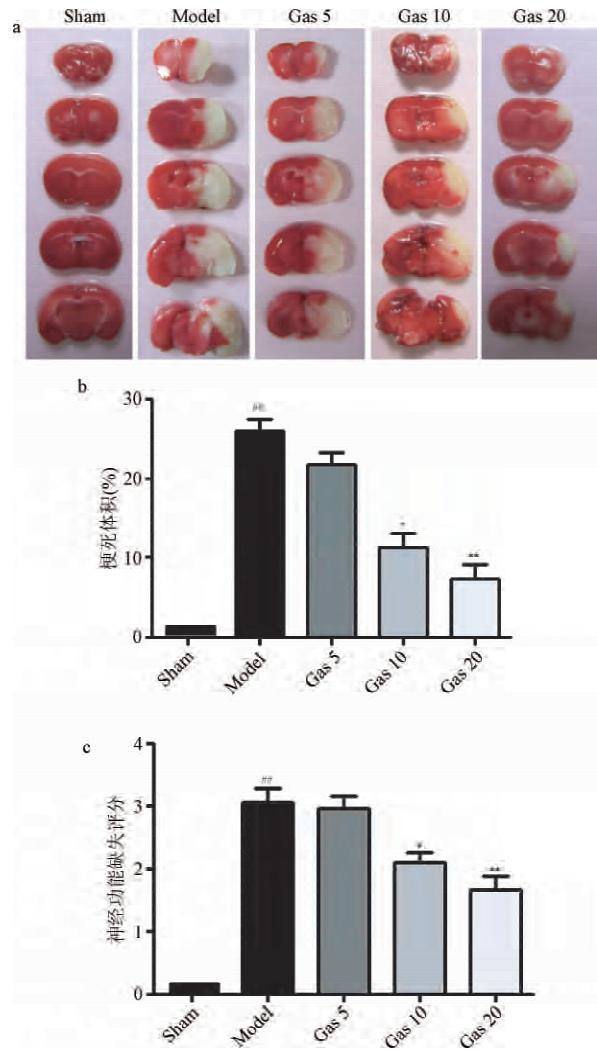


图 1 Gas 对大鼠脑缺血的保护作用

**P<0.01, 与 Sham 组相比; *P<0.05, **P<0.01, 与 Model 组相比

Fig. 1 Protection effect of Gas on cerebral ischemia rats

**P<0.01, compared with Sham group; *P<0.05, **P<0.01, compared with Model group

2.2 Gas 对大鼠脑缺血后 BBB 通透性的影响 通过 EB 渗漏法观察脑缺血再灌注后大鼠 BBB 通透性的变化,表明脑缺血再灌注 24 h,脑内 EB 渗漏量明显增大(见图 2a)。 Gas (20 mg/kg)再灌注后给药后 EB 的渗漏体积与 Model 组相比明显减少(P<0.05),表明 Gas(20 mg/kg)可减少 EB 在脑内的渗漏,减轻脑缺血再灌注后 BBB 的破坏程度(见图 2b)。

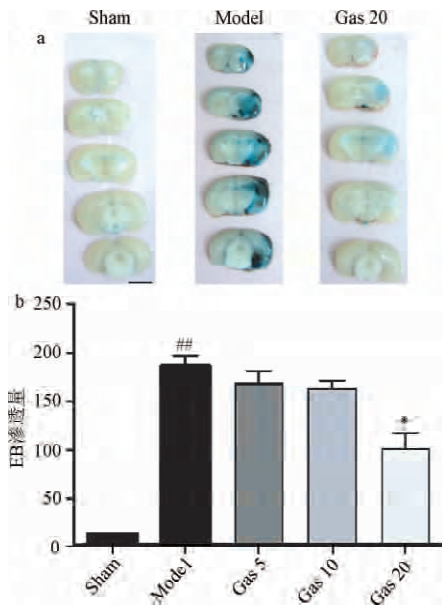


图 2 Gas 对大鼠脑缺血后 BBB 通透性的影响

^{##}*P* < 0.01 与 Sham 组相比; ^{*}*P* < 0.05 与 Model 组相比

Fig. 2 Effect of Gas on BBB disruption in brain ischemia rats

^{##}*P* < 0.01 , compared with Sham group; ^{*}*P* < 0.05 , compared with Model group

2.3 Gas (20 mg/kg) 对脑缺血后大鼠皮层梗死半暗带 TNF- α 蛋白表达的影响 大鼠脑缺血再灌注 24 h ,皮层梗死半暗带 TNF- α 蛋白表达明显增加 ,Gas (20 mg/kg) 脑缺血再灌注同时给药可降低梗死半暗带 TNF- α 蛋白表达 ,抑制率为 24% (见图 3)。

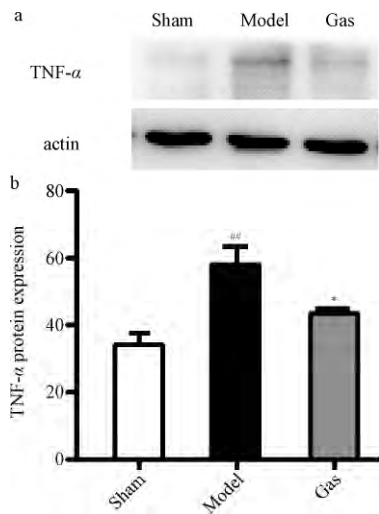


图 3 Gas 对大鼠脑缺血梗死半暗带皮层组织 TNF- α 蛋白表达的影响

^{##}*P* < 0.01 与 Sham 组相比; ^{*}*P* < 0.05 与 Model 组相比

Fig. 3 Effect of Gas (20 mg/kg) on TNF- α expression in penumbra of cortex tissue after cerebral ischemia

^{##}*P* < 0.01 , compared with Sham group; ^{*}*P* < 0.05 , compared with Model group

2.4 Gas (20 mg/kg) 对脑缺血后大鼠皮层梗死半暗带 IL-1 β 蛋白表达的影响 大鼠脑缺血再灌注后 24 h ,皮层梗死半暗带 IL-1 β 蛋白表达明显增加 ,Gas (20 mg/kg) 脑缺血再灌注同时给药可

降低梗死半暗带 IL-1 β 蛋白表达 ,抑制率为 34% (见图 4)。

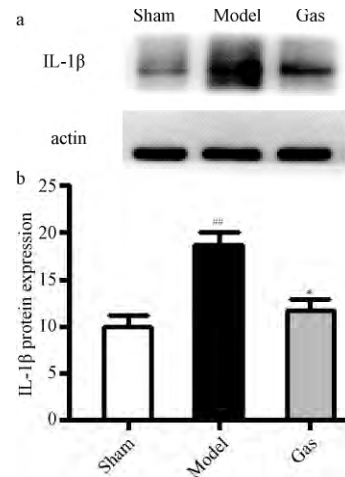


图 4 Gas (20 mg/kg) 对大鼠脑缺血梗死半暗带皮层组织 IL-1 β 的表达的影响

^{##}*P* < 0.01 与 Sham 组相比; ^{*}*P* < 0.05 与 Model 组相比

Fig. 4 Effect of Gas (20 mg/kg) on IL-1 β expression in penumbra of cortex tissue after cerebral ischemia

^{##}*P* < 0.01 , compared with Sham group; ^{*}*P* < 0.05 , compared with Model group

2.5 Gas (20 mg/kg) 对脑缺血后大鼠皮层梗死半暗带 IL-6 蛋白表达的影响 大鼠脑缺血再灌注后 24 h ,皮层梗死半暗带 IL-6 蛋白表达明显增加 ,Gas (20 mg/kg) 脑缺血再灌注同时给药可降低梗死半暗带 IL-6 蛋白表达 ,抑制率为 38% (见图 5)。

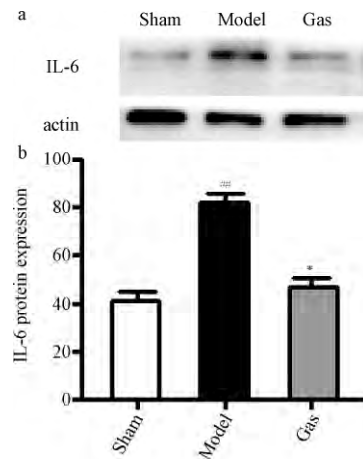


图 5 Gas (20 mg/kg) 对大鼠脑缺血梗死半暗带皮层组织 IL-6 的表达的影响

^{##}*P* < 0.01 与 Sham 组相比; ^{*}*P* < 0.05 与 Model 组相比

Fig. 5 Effect of Gas (20 mg/kg) on IL-6 expression in penumbra of cortex tissue after cerebral ischemia

^{##}*P* < 0.01 , compared with Sham group; ^{*}*P* < 0.05 , compared with Model group

3 讨论

脑血管疾病是继恶性肿瘤和心血管疾病之后 ,威胁人类生存与健康的第三大疾病 ,因具有高发病率、高致残率、高死亡率的特点 ,给社会家庭带来严重的经济和精神负担 ,其中缺血性脑血管病占全部脑血管病的 80% [7]。随着我国老龄化趋势增强 ,缺血性脑血管病患者人数急剧上升。因此 ,寻找脑缺血保护作用的药物意义重大。

天麻素是天麻的有效成分。以往研究表明天麻素可不同程

度地增加脑血流量,降低血管阻力,抑制神经细胞凋亡^[8-9],改善老龄大鼠的学习记忆等功能^[10]。BBB 是存在于血液和脑组织之间的一道屏障,对维持中枢神经系统内环境稳定起着重要作用。本实验采用 EB 为示踪剂,观察脑缺血再灌注后脑内 BBB 通透性的变化,选取 EB 在脑内渗漏最明显的时间即再灌注 6 h 作为观察药物作用的时间点^[11]。脑缺血再灌注会破坏 BBB 完整性,导致血液中的成分渗入脑组织,形成血管源性脑水肿,进一步加重脑损伤。本实验结果表明:脑缺血再灌注同时给药 Gas (20 mg/kg, i. p) 可明显减少 EB 在脑内的渗漏,说明 Gas 对脑缺血/再灌注后的 BBB 具有保护作用,其通过保护 BBB 的完整性减轻脑缺血再灌注损伤。此外,本研究还表明 Gas 在改善 BBB 的同时可减少脑梗死体积及改善神经功能缺失。

炎症反应是造成脑卒中后继发性损伤的主要因素之一^[12-13]。脑缺血后再灌注损伤可激活大量炎症细胞释放炎症介质,加重局部脑组织损伤。如何抑制炎症因子释放,是减轻缺血性脑损伤中一个非常重要的环节。TNF- α 是一种在诱导炎症反应中很重要的细胞因子,其在脑缺血早期生成的增加是脑梗塞形成的主要原因^[14]。IL-6 对于多种细胞的生长、分化与调控都有影响,其过度表达与缺血性脑损伤密切相关。缺血再灌注大鼠与临床卒中患者的中枢神经系统均会产生 IL-6,其表达水平的高低是评价缺血再灌注损伤程度的一个重要指标^[15]。本研究通过建立大鼠脑缺血/再灌注模型,证实了 Gas 可减轻脑缺血神经功能损伤和降低脑梗死体积,且具有剂量依赖性,Gas 20 mg/kg 的保护作用更为明显。为了进一步研究 Gas 脑保护的作用机制,检测了 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 在梗死半暗带皮层组织中的表达,结果显示脑缺血后半暗带 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达明显升高,而 Gas 20 mg/kg 可抑制 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达。说明 Gas 也可通过减轻脑缺血后的炎症反应,进一步减轻缺血性脑损伤。

本研究结果表明 Gas 对大鼠脑缺血/再灌注损伤具有保护作用。通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放,改善血脑屏障的完整性可能是 Gas 保护缺血性脑损伤的机制。☐

参考文献

[1] Chrissobolis S, Millera A, Drummond GR, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease [J]. Front Biosci, 2011, (16):1733-1745.

[2] Zhang YY, Liu Y, Fu ST, et al. Cerebral ischemic damage and inflammatory reaction [J]. Chin Pharmacol Bull 2006 22(1):5-9.

[3] 刘金凤,周宇,杨武双,等. 油酰乙醇胺在小鼠急性局灶性脑缺血再灌注中的作用及机制 [J]. 中国生化药物杂志,2012,33(6):758-761.

[4] 邓华. 天麻素注射液治疗慢性脑供血不足的疗效观察 [J]. 生物医学工程 2011,19(11):70-71.

[5] 聂晶,杜亮,陆远富,等. 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的抑制作用 [J]. 重庆医学 2012,41(18):1841-1842.

[6] Mao Y, Yang GY, Zhou LF, 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.

[7] Liu PK, Grossman RG, Hsu CY, et al. Ischemic injury and faulty gene transcripts in the brain [J]. Trends in neurosciences, 2001, 24(10):581-588.

[8] 陶陶,徐坚,董佑忠,等. 天麻超微粉与普通粉对大鼠脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的研究 [J]. 中国医药学报,2004,19(7):409-411.

[9] Wang Y, Wu Z, Liu X, et al. Gastrodin ameliorates Parkinson's disease by downregulating connexin 43 [J]. Molecular Medicine Reports 2013, 8(2):585-590.

[10] 高南南,于澎仁,徐锦堂. 天麻对老龄大鼠学习记忆的改善作用 [J]. 中国中药杂志,1995,20(9):562-568.

[11] Strbian D, Durukana, Pitkonen M, et al. The blood brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia [J]. Neuroscience 2008, 153(1):175-181.

[12] Chen B, Liao WQ, Xu N, et al. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action [J]. Brain Res 2009, 1273(4):129-137.

[13] 丁丽君,董志,乐乐,等. 西维来司钠对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 中国药理学通报 2011,27(1):54-58.

[14] Clark IA, Alleva LM, Vissel B, et al. The roles of TNF in brain dysfunction and disease [J]. Pharmacol Ther 2010, 128(3):519-548.

[15] Suzuki S, Tanaka K, Nagata E, et al. Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils [J]. Neurosci Lett, 1999, 262(2):117-120.

[7] Sapra P, Moase EH, Ma J, et al. Improved therapeutic responses in axenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab fragments [J]. Clin Cancer Res 2004, 10(3):1100-1111.

[8] Ferretti E. Targeting acute myeloid leukemia cells with cytokines [J]. J Leukoc Seke Etet PF. Biol 2012, 92(3):567-575.

[9] Seke Etet PF, Vecchio L, Nwabo kamdje AH. Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: Key role of stromal microenvironment [J]. Cell Signal 2012, 24(9):1883-1888.

[10] Han H. Physalins A and B inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth through activation of cell apoptosis and down regulation of androgen receptor expression [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(10):1584-1588.

[11] Soriano-Hernandez AD. Antitumor effect of meclofenamic acid on human androgen-independent prostate cancer: a preclinical evaluation [J]. Int

Urol Nephrol 2012, 44(2):471-477.

[12] 徐尔迪,肖延风. 三氧化二砷对人胃癌裸鼠移植瘤 Flt-1、KDR 和 VEGFR-3 表达的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(8):943-946.

[13] 李海燕,曹励民,王娟. 三氧化二砷对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(11):2572-2574.

[14] 刘洪义,王权,于金海,等. 紫杉醇联合三氧化二砷作用人结肠腺癌 LS-474T 细胞增殖及凋亡的实验研究 [J]. 中国实验诊断学杂志, 2009, 13(3):324-326.

[15] Jianqin Lu, Huang Y, Zhao W, et al. PEG-derivatized embelin as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel to breast and prostate cancers [J]. Biomaterials 2013, 34(5):1591-1600.

(编校:吴茜)

(上接第 39 页)

[7] Sapra P, Moase EH, Ma J, et al. Improved therapeutic responses in axenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab fragments [J]. Clin Cancer Res 2004, 10(3):1100-1111.

[8] Ferretti E. Targeting acute myeloid leukemia cells with cytokines [J]. J Leukoc Seke Etet PF. Biol 2012, 92(3):567-575.

[9] Seke Etet PF, Vecchio L, Nwabo kamdje AH. Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: Key role of stromal microenvironment [J]. Cell Signal 2012, 24(9):1883-1888.

[10] Han H. Physalins A and B inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth through activation of cell apoptosis and down regulation of androgen receptor expression [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(10):1584-1588.

[11] Soriano-Hernandez AD. Antitumor effect of meclofenamic acid on human androgen-independent prostate cancer: a preclinical evaluation [J]. Int

Urol Nephrol 2012, 44(2):471-477.

[12] 徐尔迪,肖延风. 三氧化二砷对人胃癌裸鼠移植瘤 Flt-1、KDR 和 VEGFR-3 表达的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(8):943-946.

[13] 李海燕,曹励民,王娟. 三氧化二砷对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(11):2572-2574.

[14] 刘洪义,王权,于金海,等. 紫杉醇联合三氧化二砷作用人结肠腺癌 LS-474T 细胞增殖及凋亡的实验研究 [J]. 中国实验诊断学杂志, 2009, 13(3):324-326.

[15] Jianqin Lu, Huang Y, Zhao W, et al. PEG-derivatized embelin as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel to breast and prostate cancers [J]. Biomaterials 2013, 34(5):1591-1600.

(编校:吴茜)