

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)。

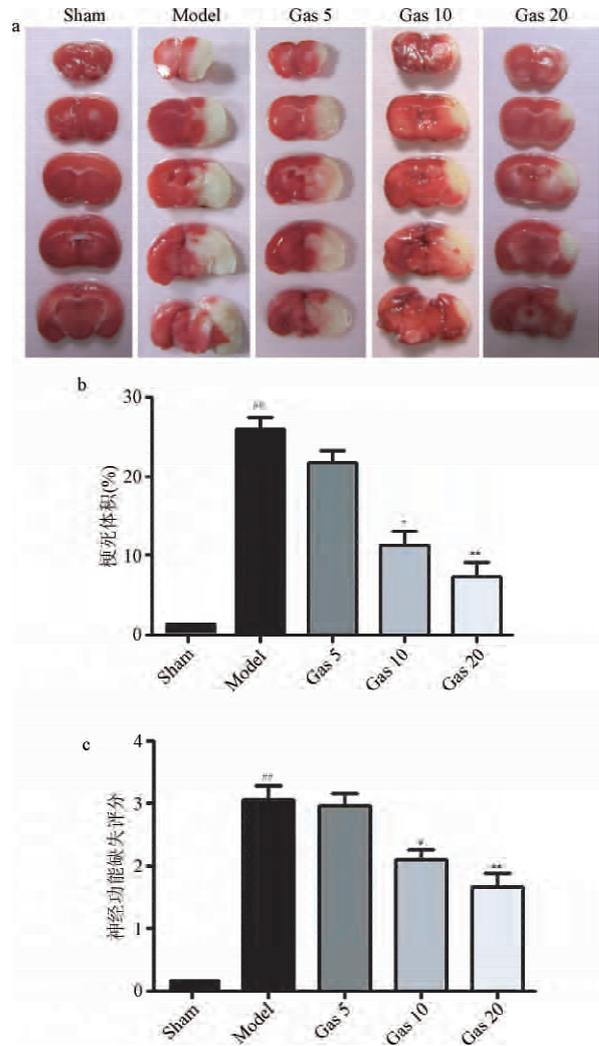


图 1 Gas 对大鼠脑缺血的保护作用

**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,表明脑缺血再灌注后 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)。

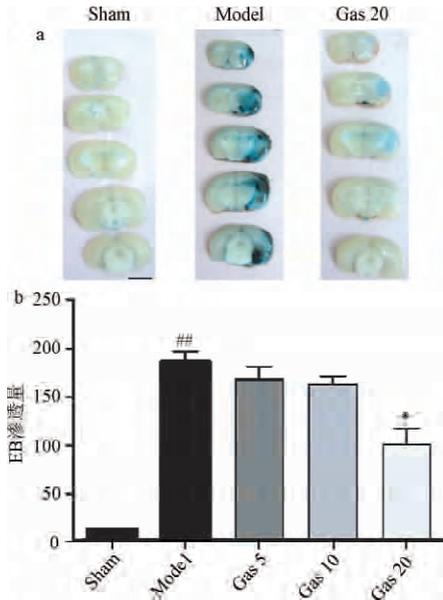


图 2 Gas 对大鼠脑缺血后 BBB 通透性的影响

^{##}*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)。

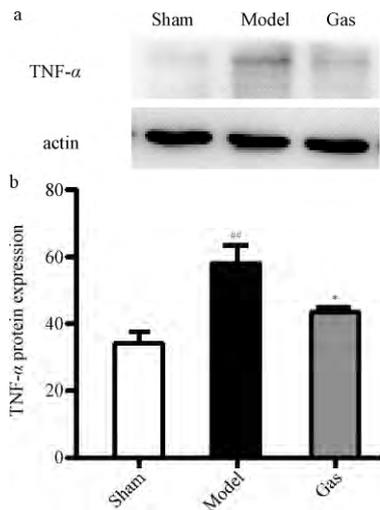


图 3 Gas 对大鼠脑缺血梗死半暗带皮层组织 TNF- α 蛋白表达的影响

^{##}*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)。

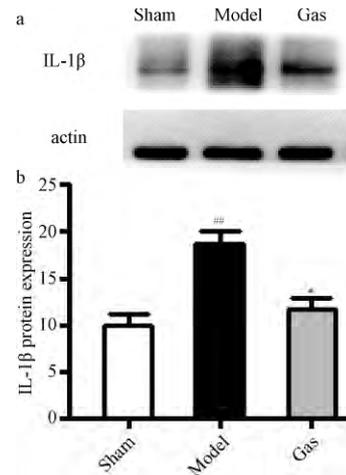


图 4 Gas (20 mg/kg) 对大鼠脑缺血梗死半暗带皮层组织 IL-1 β 的表达的影响

^{##}*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)。

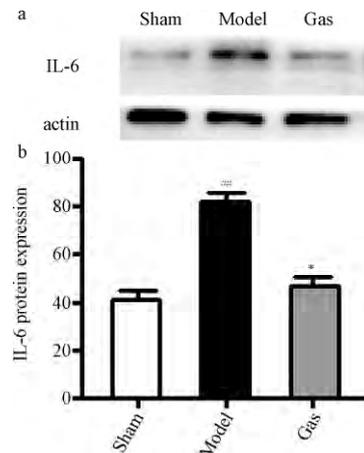


图 5 Gas (20 mg/kg) 对大鼠脑缺血梗死半暗带皮层组织 IL-6 的表达的影响

^{##}*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.

(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)