

· 论 著 ·

青藤碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用及机制*

李浩¹, 石胜良², 刘开祥¹, 吴岚¹

(1. 桂林医学院附属医院神经内科 541002; 2. 广西医科大学第一附属医院神经内科, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨青藤碱(Sin)对脑缺血再灌注损伤保护作用及机制。方法 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、脑缺血再灌注组、Sin 低剂量治疗组和 Sin 高剂量治疗组。用线栓法建立大脑中动脉局灶性缺血再灌注模型。于术前 30 min 分别给予治疗组动物 Sin 30、60 mg/kg 腹腔注射。各组动物于脑缺血 90 min 再灌注 24 h, 取脑标本采用 TUNEL 法检测神经细胞凋亡, 干湿质量法检测脑含水量, HE 染色观察脑组织病理改变, 分光光度法检测髓过氧化物酶(MPO)活性, 羟胺法和硫巴比妥酸盐反应法检测超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)变化。**结果** (1)与假手术组比较, 脑缺血再灌注组凋亡细胞和脑含水量明显增加($P < 0.05$); 与脑缺血再灌注组比较, Sin 高、低剂量治疗组凋亡细胞均明显减少, 脑含水量降低, Sin 高剂量治疗组凋亡细胞减少, 脑含水量降低较 Sin 低剂量治疗组更明显($P < 0.05$)。 (2)与假手术组比较, 脑缺血再灌注组 MPO 活性和 MDA 含量明显增加, SOD 活性下降; 与脑缺血再灌注组比较, Sin 高、低剂量治疗组 MPO 及 MDA 含量均明显减少, SOD 活性提高; Sin 高剂量治疗组 MPO 及 MDA 含量减少、SOD 活性提高较 Sin 低剂量治疗组更明显($P < 0.05$)。 (3) Sin 高、低剂量治疗组脑组织缺血损伤病理学改变明显轻于脑缺血再灌注组, Sin 高剂量治疗组缺血改变亦轻于 Sin 低剂量治疗组。**结论** Sin 对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 其机制可能与抗凋亡、抑制炎症反应和自由基生成有关。

关键词:青藤碱; 缺血再灌注; 凋亡; 髓过氧化物酶; 自由基

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.006

中图分类号: R365.743; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2558-03

Mechanism of neuroprotective effect of sinomenine after focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats*LI Hao¹, SHI Sheng-liang², LIU Kai-xiang¹, et al.

(1. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541002, China;

2. Department of Neurology, the first Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of neuroprotective effects of sinomenine after cerebral ischemia reperfusion(I/R) injury in rats. **Methods** In this experiment, rats were randomly divided into 4 groups, which were sham operated group, I/R group, low sinomenine treated group and high sinomenine treated group. The focal middle cerebral artery occlusion(MCAO) model was made by suture-occluded method. Sinomenine were given intraperitoneally to rats 30 min before focal cerebral ischemia operation respectively. After 90 min MCAO following 24 h of reperfusion, we investigated the neural cell apoptosis with TUNEL. Brain water content of the ischemic areal and HE staining were also investigated. The MPO activity and the content of SOD and MDA were also investigated. **Results** (1) Compared with sham operated group, neural cell apoptosis rate and brain water content increased at 24 h of reperfusion in the ischemic territory($P < 0.05$). Compared with I/R group, low and high dose sinomenine treated group reduced neural cell apoptosis rate and brain water content dose-dependently ($P < 0.05$). (2) Compared with sham operated group, MPO activity and the content of MDA were higher, SOD activity was lower in I/R group. Compared with I/R group, sinomenine treatment group may reduced MPO activity and the content of MDA, increased the content of SOD dose-dependently ($P < 0.05$) (3) The change of ischemic impairment in low or high dose sinomenine treated group was lighter than that of IR group, and high dose sinomenine treated group was lighter than that of low dose sinomenine treated group. **Conclusion** Sinomenine may reduced cerebral ischemia-reperfusion injure by decreasing neural cell apoptosis, and inflammation reaction and free radicals.

Key words: sinomenine; ischemia-reperfusion; apoptosis; myeloperoxidase; free radical

青藤碱(sinomenine, Sin)是从中药青藤(sinomenium acutum rehd etwils)中提取的生物碱单体。其具有抗炎、抑制免疫、镇痛、降压、抗心律失常等药理作用。作者前期研究证实,青藤碱对大鼠缺血再灌注脑损伤有保护作用^[1]。本实验通过观察青藤碱对脑缺血再灌注大鼠细胞凋亡和炎症反应及自由基的影响,进一步探讨其保护作用的可能分子机制。

1 材料与方

1.1 材料 雄性 Wistar 大鼠 80 只,清洁级,体质量(250 ± 30)g,由广西医科大学动物实验中心提供;721A 型分光光度计(四川仪表九厂)、奥林巴斯 VANOX 显微照相系统(OLYMPUS OPATICAL CO. LTD, 日本东京)、病理图像分析仪 DMR+

Q550 型(德国莱卡公司)、细胞凋亡试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)等。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组与模型的建立 将大鼠分为 4 组,即假手术组,缺血再灌注组, Sin 高、低剂量治疗组。每组 20 只。参照 Longa 等^[2]的方法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。采用颈外动脉插入线栓法栓塞左侧大脑中动脉。线栓采用石蜡线栓。线栓直径约 0.27 mm,插入深度约 18 mm,此时线栓头位于大脑中动脉起始部。缺血 90 min 时,抽提线栓实现再灌注。术中保持室内温度 25 °C,保持肛温 37 °C。将麻醉苏醒后

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自 0848015);广西卫生厅科研课题基金资助项目(Z2008262)。

的大鼠放回鼠笼,单笼饲养,自由饮食。各组分别在再灌注 24 h 后按照 Longa 等^[2]评分标准进行神经功能缺陷评分,0 分:正常,无神经缺损征象;1 分:动物不能完全伸展右前肢;2 分:动物右侧肢体瘫痪,行走时向右侧转圈,出现追尾现象;3 分:动物行走向右侧跌倒,或不能站立或打滚;4 分:无自发活动,有意识障碍。神经功能缺陷评分达 1~3 分为模型成功。

1.2.2 给药途径与药量 Sin 低剂量治疗组(30 mg/kg)和高剂量治疗组(60 mg/kg)均于术前 30 min 分别给予大鼠腹腔注射 Sin,假手术组和缺血再灌注组给予等量生理盐水腹腔注射。

1.2.3 细胞凋亡检测 再灌注 24 h 后各组随机取 5 只大鼠,用生理盐水和多聚甲醛进行心脏灌注固定,断头取脑。在左侧大脑半球距离嗅球尖端 7~11 mm 冠状切取约 5 mm 厚脑组织块,固定、脱水、包埋成腊块,连续切片,厚 5 μm。连取 5 张,1 张作 HE 染色,其余 4 张作免疫组化染色。取上述脑切片,采用 TUNEL 法检测神经细胞凋亡,具体操作按试剂盒说明书进行。以胞核出现棕黄染色颗粒代表 TUNEL 阳性细胞数。每张切片分别随机选取左侧大脑半球额顶部皮质 5 个不重复高倍视野(×400),计数每个视野阳性细胞数,算出平均数即为每张切片阳性细胞数。计数 TUNEL 阳性细胞数和细胞总数,以 TUNEL 阳性率表示细胞凋亡。

1.2.4 MPO、MDA、SOD 活性测定 再灌注 24 h 后各组随机取 10 只大鼠,开颅取脑,置于 4 °C 冰箱 5 min,在冰浴下取左侧大脑半球,以试剂盒提供的匀浆介质制成脑组织匀浆,严格按试剂盒说明书操作,5 只匀浆检测 MPO 活性,5 只匀浆检测 SOD 活性和 MDA 含量。采用分光光度法在 460 nm,1 cm 光径处检测各管 OD 值,运用公式[(测定管 OD 值-对照管 OD 值)/11.3×取样量]计算 MPO 活性数值。取脑组织匀浆以羟胺法和硫巴比妥酸盐反应法进行 SOD 活性和 MDA 含量检

测。组织蛋白定量用考马斯亮蓝法,比色用 DU640 型核酸蛋白分析仪。

1.2.5 脑含水量检测 再灌注 24 h 后各组取 5 只大鼠,断头取脑后快速称取左、右大脑半球湿质量,置 110~115 °C 烤箱内烤至恒质量,再分别称其干质量,用(湿质量-干质量)/湿质量百分比作为衡量脑含水量质量指标。

1.2.6 HE 染色 取再灌注 24 h 后大鼠脑切片进行常规 HE 染色,观察病理形态学改变。

1.3 统计学方法 数据处理采用 SPSS11.5 统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Sin 对神经元凋亡的影响 假手术组可见少量凋亡细胞。缺血再灌注组凋亡细胞部位主要分布于缺血半暗带的额顶皮质,凋亡细胞阳性率增加,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。与缺血再灌注组比较,Sin 高、低剂量治疗组凋亡细胞阳性率均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),高、低剂量治疗组之间差异也有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 2~3。

表 1 Sin 对神经元凋亡的影响

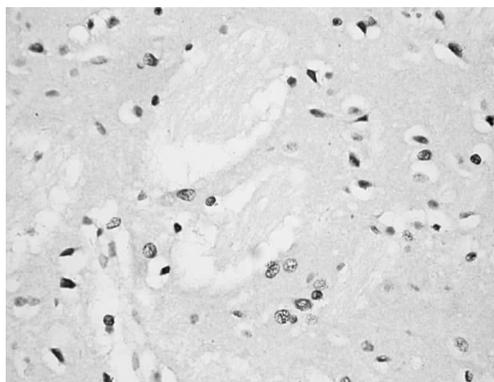
组别	n	凋亡细胞阳性率(%, $\bar{x} \pm s$)
假手术组	5	3.52±1.11
缺血再灌注组	5	42.51±5.28 [△]
Sin 低剂量治疗组	5	34.87±2.46*
Sin 高剂量治疗组	5	21.37±3.84*▲

与假手术组比较,[△]: $P < 0.05$;与缺血再灌注组比较,*: $P < 0.05$;与 Sin 低剂量治疗组比较,▲: $P < 0.05$ 。

表 2 Sin 对 MPO、SOD、MDA 和脑含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MPO 活性(u/g)	SOD 活性(u/mgprot)	MDA 含量(nmol/mgprot)	脑含水量(%)
假手术组	15	0.033±0.005	306.91±6.37	4.21±0.32	81.09±1.47
缺血再灌注组	15	0.421±0.030 [△]	224.03±9.82 [△]	6.93±0.24 [△]	92.13±2.62 [△]
Sin 低剂量治疗组	15	0.321±0.027*	276.24±28.35*	5.53±0.38*	88.24±1.25*
Sin 高剂量治疗组	15	0.22±0.031*▲	289.19±17.20*▲	5.04±0.41*▲	84.24±1.81*▲

与假手术组比较,[△]: $P < 0.05$;与缺血再灌注组比较,*: $P < 0.05$;与 Sin 低剂量治疗组比较,▲: $P < 0.05$ 。

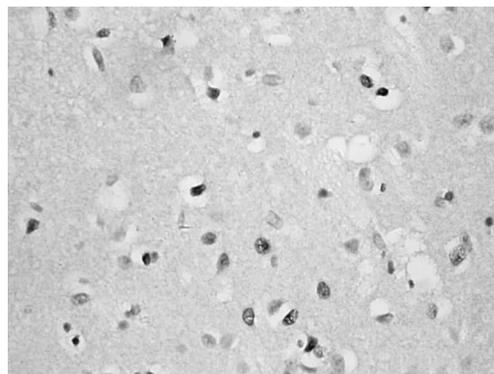


可见较多凋亡阳性细胞表达。

图 1 脑缺血再灌注组 SP 染色结果(×400)

2.2 Sin 对 MPO、MDA 和 SOD 活性的影响 假手术组 MPO 活性为(0.026±0.013)u/g。与假手术组比较,缺血再灌注组缺血侧额顶部皮质 MPO 活性明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与缺血再灌注组比较,Sin 高、低剂量治疗组缺血侧额顶部皮质 MPO 活性明显降低($P < 0.05$),高、低剂量治疗组之间差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。与假手术组比较,缺血再灌注组缺血侧额顶部皮质 SOD 含量下降,MDA 含量升高,

差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与缺血再灌注组相比较,Sin 高、低剂量治疗组 SOD 含量升高,MDA 含量下降($P < 0.05$),高、低剂量治疗组之间差异亦有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。



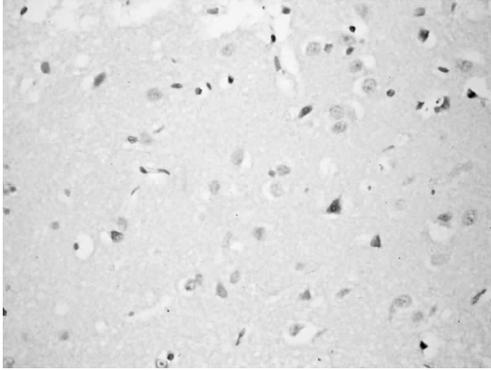
凋亡阳性细胞较脑缺血再灌注组减少。

图 2 Sin 低剂量治疗组 SP 染色结果(×400)

2.3 Sin 对脑含水量的影响 与假手术组比较,缺血再灌注组缺血侧脑组织含水量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与缺血再灌注组比较,Sin 高、低剂量治疗组脑组织含

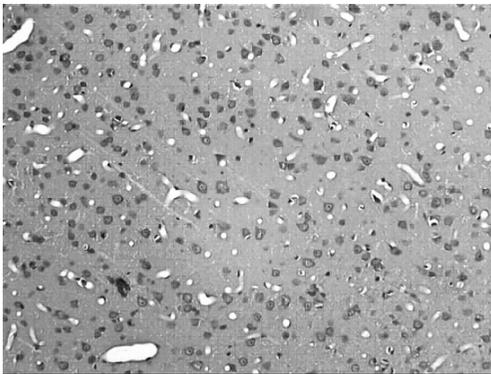
水量降低($P < 0.05$),高、低剂量治疗组之间差异也有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.4 Sin 对脑组织病理学改变的影响 假手术组脑组织切片可见神经细胞、胶质细胞及毛细血管形态正常,结构完整,锥体细胞核大而圆,核仁明显,见图 4。缺血再灌注组呈缺血改变,梗死区正常组织结构消失,结构不清,间质水肿,有炎细胞浸润;锥体细胞体积缩小,细胞核固缩深染,胞浆嗜伊红;部分细胞坏死,并可见呈筛状坏死的坏死灶,见图 5。Sin 高、低剂量治疗组脑组织缺血改变较缺血再灌注组明显减轻,坏死范围缩小,细胞结构较完整,细胞核固缩少,细胞间质水肿轻,高剂量治疗组与低剂量治疗组比较,缺血改变更轻。



凋亡阳性细胞较 Sin 低剂量治疗组减少。

图 3 Sin 高剂量治疗组 SP 染色结果($\times 400$)



神经细胞、胶质细胞及毛细血管形态正常,结构完整,锥体细胞核大而圆,核仁明显。

图 4 假手术组大鼠 HE 染色结果($\times 200$)



呈缺血改变,正常组织结构消失,结构不清,间质水肿,锥体细胞体积缩小,细胞核固缩深染,部分细胞坏死。

图 5 脑缺血再灌注组大鼠在再灌注 24 h 后 HE 染色结果($\times 200$)

3 讨论

目前已有多种 Sin 制剂应用于临床治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病,取得较好疗效,且不良反应小^[3]。作者前期研究证实,脑缺血再灌注损伤大鼠给予 Sin 治疗,能缩小脑梗死体积,推测可能与 Sin 抑制脑缺血再灌注损伤后环氧化酶-2 表达及前列腺素 E2 含量有关^[1]。本研究结果表明, Sin 能减轻脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织含水量,减轻缺血再灌注损伤后的病理损害,再次证实 Sin 对缺血再灌注脑损伤有明显的保护效应,并且高剂量的保护效应更显著。

作者前期研究还证实,脑缺血再灌注损伤后存在中性粒细胞浸润的炎症级联反应过程^[4]。本研究结果显示,给予脑缺血再灌注损伤大鼠 Sin 治疗能减少 MPO 活性,提示 Sin 对缺血再灌注损伤后中性粒细胞浸润为标志的炎症反应有抑制作用。本研究还发现, Sin 给药能减少再灌注损伤后 MDA 含量,提高 SOD 活性,表明 Sin 能降低氧化应激程度,减少体内自由基的形成,并具有增加机体清除自由基的能力。

既往研究表明,脑缺血后神经元的死亡主要表现为坏死和凋亡两种形式。细胞凋亡是在生理和病理条件下的一种主动死亡方式,是受细胞内、外因子调控的生物学过程。在脑缺血急性期,神经元坏死与凋亡并存,细胞坏死位于缺血中心区,细胞凋亡主要出现在缺血半暗带。抑制细胞凋亡发展、防止损伤区域扩大是治疗缺血性脑损伤的关键。近期研究表明, Sin 具有抑制心肌细胞凋亡的作用^[5]。本研究发现,缺血再灌注组凋亡细胞增加,部位主要分布于缺血半暗带的额顶叶皮质,并且凋亡细胞阳性率增加,表明缺血再灌注后缺血半暗带发生了明显的神经元细胞凋亡反应。Sin 干预后,凋亡细胞阳性率降低,表明 Sin 具有抗凋亡作用,抑制了缺血后细胞凋亡的发展,延缓或阻止缺血区域尤其是周边区神经细胞的死亡进程,在一定程度上挽救了受损的神经细胞,从而防止最终梗死灶的扩大,对缺血再灌注脑损伤起到一定的保护作用,并且高剂量的保护效应更显著。

综上所述, Sin 对脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用。其机制可能与抑制凋亡、抑制炎症反应和自由基的生成有关,其抗凋亡的具体机制将进一步探讨。

参考文献:

- [1] 吴岚,刘开祥,俸军林,等.青藤碱对鼠脑缺血再灌注损伤环氧化酶-2 表达及前列腺素 E2 含量的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(4):293.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84.
- [3] 叶仙蓉,颜克序,吴克美,等.青藤碱衍生物的合成及其抗炎镇痛活性[J].药学学报,2004,39:180.
- [4] 李浩,毕桂南,罗传铭,等.鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应及环磷酸腺苷影响[J].中风与神经疾病杂志,2006,23(5):541.
- [5] 李乐,高小利,丁宝兴.青藤碱抑制 H_2O_2 诱导乳鼠心肌细胞凋亡[J].中国中药杂志,2008,33(8):940.

(收稿日期:2010-03-29 修回日期:2010-04-13)