

· 基础研究 ·

疏血通注射液对局灶性脑梗死大鼠缺血周围区 细胞凋亡和 TLR4 表达的影响

钟艺华¹, 李光勤^{2△}, 唐显军¹

(1. 重庆市肿瘤研究所神经内科 400031; 2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016)

摘要:目的 观察疏血通注射液(SXT)对局灶性脑梗死大鼠缺血周围区细胞凋亡和 Toll 样受体 4(TLR4)表达的影响,探讨 SXT 对缺血脑损伤的神经保护机制。**方法** 采用线栓法制作 SD 大鼠大脑中动脉闭塞模型(MCAO),随机分为 3 组:假手术组、模型组、SXT 治疗组;分别在缺血 12、24、48 h 及 72 h 采用 DNA 原位末端缺口标记法(TUNEL)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化法检测缺血周围区神经细胞凋亡、TLR4 mRNA 和蛋白表达。**结果** 在模型组中,TUNEL 阳性细胞数、TLR4 mRNA 和蛋白表达在缺血 12 h 逐渐增加,24 h 达到峰值后表达有所下降,较假手术组仍维持高位表达($P<0.01$);在 SXT 治疗组中,上述表达在缺血 24 h 后均较模型组降低($P<0.05$),并随着治疗时间延长呈下降趋势($P<0.05$)。**结论** 在脑缺血损伤亚急性期,细胞凋亡与 TLR4 表达有关,SXT 能抑制细胞凋亡,下调缺血周围区 TLR4 表达,这可能是其发挥神经保护作用的机制之一。

关键词:脑梗死;炎症;疏血通

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.25.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)25-3011-04

Effects of Shuxuetong Injection on expressions of cell apoptosis and TLR4 around ischemic area after focal cerebral infarction in rats

Zhong Yihua¹, Li Guangqin^{2△}, Tang Xianjun¹

(1. Department of Neurology, Congqing Tumor Research Institute, Chongqing 400031, China;

2. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Shuxuetong Injection(SXT) on expressions of cell apoptosis and TLR4 around ischemic area after focal cerebral infarction in rats and to discuss its neuroprotective mechanism on ischemia-induced brain injury. **Methods** The SD rats were subjected to establish the model of middle cerebral artery occlusion(MCAO) by nylon monofilament suture, then were randomly divided into the sham-operated group, the model group and the SXT treatment group; the cell apoptosis and the expressions of TLR4 mRNA and protein around ischemic area at 12, 24, 48, 72 h after cerebral ischemia were detected respectively by TUNEL test mediated with DNA, RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** In the model group, the number of TUNEL positive cells, the expressions of TLR4 mRNA and protein were gradually increased at 12 h, reached the peak at 24 h, then decreased and were still higher than those in the sham-operated group($P<0.01$); in the SXT treatment group, these expressions after 24 h were lower than those in the model group($P<0.05$) and declined as the treatment time increase($P<0.05$). **Conclusion** In subacute stage of cerebral ischemia injury, apoptosis is related with the expression of TLR4, SXT may inhibit apoptosis, down-regulate the expression of TLR4 around ischemic area, this may be one of the mechanisms of neuroprotection.

Key words: cerebral infarction; inflammatory reaction; Shuxuetong

近年来研究表明, Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)作为中枢神经系统固有免疫反应的模式识别受体,在脑缺血损伤亚急性期,不但能调节促炎症介质的产生,还能通过诱导细胞凋亡维持神经损伤与保护之间的平衡^[1]。疏血通注射液具有抗凝、促纤溶、细胞保护的多重作用,能多环节、多途径、多靶点发挥抗脑缺血损伤作用。本研究通过观察疏血通注射液对大鼠脑缺血损伤后细胞凋亡及 TLR4 表达的影响,探讨其可能的神经保护机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组 健康成年雄性 SD 大鼠 56 只,体质量 230~280 g(由重庆医科大学动物中心提供)。用抽签法将动物分为 3 组:假手术组($n=8$)、模型组($n=24$)、疏血通注射液(SXT)治疗组($n=24$);再根据缺血时间(即线栓法阻断血管至取材的

时间)随机分为 12、24、48 h 及 72 h 共 4 个亚组。

1.2 药品与试剂 疏血通注射液(牡丹江友博药业有限公司,批号为 1206199);细胞凋亡检测试剂盒、兔抗大鼠 TLR4 单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(Takara 公司);SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物技术公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉生物技术公司)。

1.3 动物模型制备与给药 参照 Longa 等^[2]的插线方法,采用线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,假手术组操作步骤同模型组,但线栓只插入距离 CCA 分叉 5 mm 处的 ICA 内。在大鼠麻醉苏醒后,采用 Longa 等^[2]的 5 分制评分标准进行评分,评分为 1~3 分的大鼠纳入实验。SXT 治疗组在造模成功后按照 0.7 mL/kg 剂量对大鼠进行腹腔注射,

12 h 和 24 h 亚组:每天 1 次,持续 1 d;48 h 亚组:每天 1 次,持续 2 d;72 h 亚组:每天 1 次,持续 3 d;假手术组和模型组在相同时间点则给予等量生理盐水替代。

1.4 标本制备 每个亚组中一半大鼠在各观察时间点用3.5%水合氯醛(1 mL/100 g)进行深度麻醉,经左室灌注生理盐水 200 mL 和 4%多聚甲醛溶液(PFA)200 mL 进行内固定,断头取视交叉前后各 2 mm 的脑组织进行石蜡包埋后作连续冠状切片。每个脑组织共取片 3 套,分别进行 HE 染色、TUNEL 和 TLR4 免疫组化染色。另一半大鼠则断头取脑,分离缺血周围区残存的大脑皮质,提取 RNA 进行 RT-PCR 检测。

1.5 指标检测

1.5.1 HE 染色 标本切片常规脱蜡、水化、HE 染色、封片、光镜下观察。

1.5.2 凋亡细胞表达检测 标本切片常规脱蜡、水化,按照 TUNEL 试剂盒提供的实验步骤进行操作,DAB 显色,光镜下观察到 TUNEL 阳性细胞表现为:细胞体积缩小,包膜发泡,核内染色质浓聚,细胞核内可见棕黄色的 TUNEL 反应产物。用图像信号采集分析系统分别测量计数各亚组缺血周围区阳性细胞高表达的部位中 5 个互不重叠视野(10×20 倍)下的阳性细胞数,将所得平均值作为统计资料。

1.5.3 TLR4 蛋白表达检测 标本切片常规脱蜡、水化,按照 SABC 免疫组化试剂盒提供的实验步骤进行操作,DAB 显色,光镜下观察到细胞质或细胞膜上中出现粗细不等的棕黄色颗粒为阳性细胞。用图像信号采集分析系统分别测量计数各亚组中缺血周围区皮层阳性细胞高表达部位中互不重叠的 3 个视野(10×40 倍)下的阳性细胞数,将所得平均值作为统计资料。

1.5.4 TLR4 mRNA 表达检测 按照 Trizol 试剂盒说明书提取缺血脑组织中的总 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 浓度。用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 第一链:37 ℃ 孵育 15 min,85 ℃ 5 s 终止反应,灭活反转录酶。TLR4 引物序列上游为 5'-TAA ATG CCA ACT GGA ACA-3',下游为 5'-TCT GCT AAG AAG GCG ATA-3'(862 bp)。内参采用 GAPDH,上游为 5'-GTG GAG TCT ACT GGC GTC TT-3',下游为 5'-ATC ATA CTT GGC AGG TTT CT-3'(483 bp)。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,进入循环 94 ℃ 变性 30 s,57 ℃

退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共进行 35 次循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶上进行电泳,运用 Quantity-one 凝胶自动成像仪成像,以看家基因 GAPDH 为内对照进行质控和标化,测定 TLR4/ GAPDH 的灰度比值作为 TLR4 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理 应用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析,正态分布数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,即 *F* 检验;其中两两比较采用 LSD 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色结果 假手术组未见缺血梗死灶,皮层神经细胞排列整齐,层次分明,包膜完整,核仁清楚,无核固缩、核碎裂及核溶解,神经间质无水肿(图 1A)。模型组可见白色梗死灶,表现为组织结构疏松,间质水肿,呈海绵状,有炎性细胞浸润,神经细胞结构模糊,胞体缩小,胞核固缩,碎裂及溶解,胞质尼氏小体减少或消失(图 1B)。SXT 治疗组可见缺血坏死区范围明显缩小,皮层神经细胞结构清楚,胞体肿胀、核固缩、核碎裂及核溶解现象较模型组明显减轻(图 1C)。

2.2 凋亡细胞表达结果 在假手术组中可见零星散在分布的凋亡细胞;模型组中可见大量凋亡细胞,以缺血灶边缘区内侧及皮层分布最明显,呈簇状分布,在缺血 24 h 表达达到峰值后随着缺血时间的延长,表达开始下降,但在各缺血时间点较假手术组仍维持高水平表达(*P* < 0.01)。SXT 治疗组中细胞凋亡表达情况与模型组基本一致,在缺血 24 h 达到峰值后,在各对应时间点 TUNEL 阳性细胞表达均较模型组低,二者比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。并且,随着治疗时间的延长,SXT 治疗组中 TUNEL 阳性细胞表达呈进行性下降,与前一时间点比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

2.3 TLR4 蛋白表达结果 假手术组中可见少量 TLR4 阳性细胞表达(图 2A);在模型组中,TLR4 蛋白在缺血 12 h 表达逐渐增加,24 h 时达到高峰,颜色加深(*P* < 0.01)(图 2B);随着缺血时间延长,其表达逐渐下降,但与假手术组比较仍维持高位表达。SXT 治疗组在缺血 24 h 后 TLR4 蛋白表达均较模型组下调,二者比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)(图 2C);随着治疗时间延长,与前一时间点比较,其表达呈下降趋势(*P* < 0.05),见表 2。

表 1 各组大鼠不同缺血时间点凋亡细胞表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	2.34±0.82	2.78±0.49	3.02±0.27	3.29±0.57
模型组	32.48±0.24*	68.93±0.38*△	67.42±0.54*	65.32±0.37*
SXT 治疗组	31.89±0.68*	51.73±0.93*△▲	43.26±0.28*△▲	37.28±0.75*△▲

*:*P* < 0.01,与假手术组比较;△:*P* < 0.05,与前一时间点比较;▲:*P* < 0.05,与模型组比较。

表 2 各组大鼠不同缺血时间点 TLR4 蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

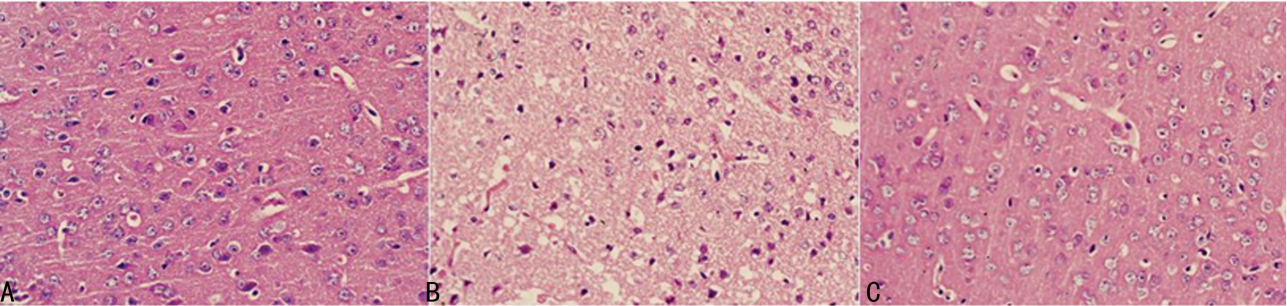
组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	1.05±0.24	1.32±0.39	1.83±0.13	1.89±0.18
模型组	3.32±0.87	28.32±0.49*△	22.72±0.36*△	18.53±0.24*△
SXT 治疗组	3.02±0.42	21.07±0.29*△▲	16.72±0.38*△▲	15.32±0.75*△▲

*:*P* < 0.01,与假手术组比较;△:*P* < 0.05,与前一时间点比较;▲:*P* < 0.05,与模型组比较。

表 3 各组大鼠不同缺血时间点 TLR4 mRNA 表达情况比较(̄x±s)

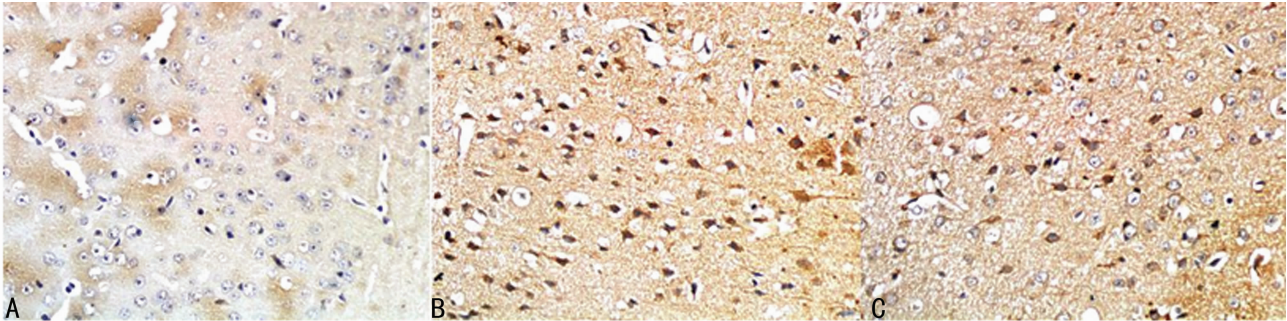
组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	0.428±0.037	0.457±0.074	0.431±0.052	0.487±0.023
模型组	0.582±0.027	1.124±0.038*△	1.012±0.046*△	0.823±0.047*△
SXT 治疗组	0.512±0.046	0.879±0.056*△▲	0.793±0.028*△▲	0.762±0.083*▲

*: $P<0.01$,与假手术组比较;△: $P<0.05$,与前一时间点比较;▲: $P<0.05$,与模型组比较。



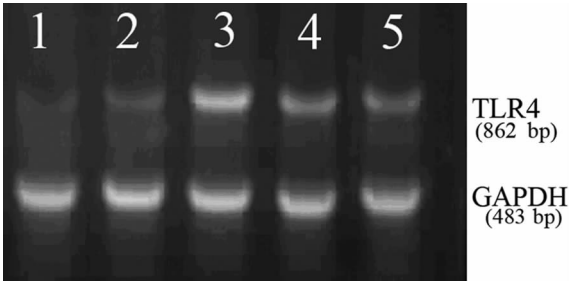
A:假手术组;B:模型组;C:SXT 治疗组。

图 1 各组 HE 染色情况



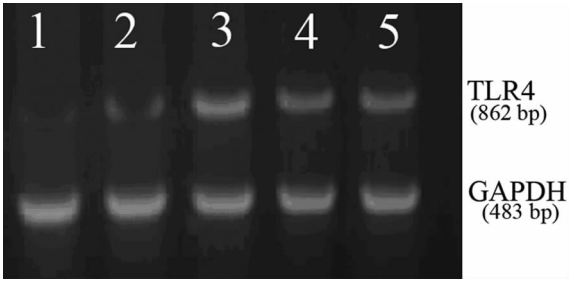
A:假手术组;B:模型组;C:SXT 治疗组。

图 2 各组第 24 小时缺血周围区大脑皮层 TLR4 蛋白表达(ABC×400)



1:假手术组;2:模型组缺血 12 h;3:模型组缺血 24 h;4:模型组缺血 48 h;5:模型组缺血 72 h。

图 3 各缺血时间点模型组大鼠 TLR4 mRNA 表达



1:假手术组;2:SXT 治疗组缺血 12 h;3:SXT 治疗组缺血 24 h;4:SXT 治疗组缺血 48 h;5:SXT 治疗组缺血 72 h。

图 4 各缺血时间点 SXT 治疗组大鼠 TLR4 mRNA 表达

2.4 TLR4 mRNA 表达结果 在模型组中,TLR4 mRNA 在缺血 12 h 后表达逐渐增强,24 h 达到峰值,48~72 h 表达有所下降,与假手术组比较仍维持高水平表达($P<0.01$),见图 3。在 SXT 治疗组中,TLR4 mRNA 表达规律与模型组一致,在缺血 24 h 后 TLR4 mRNA 表达在各缺血时间点均较模型组低,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3、图 4。

3 讨 论

脑缺血损伤是一个复杂的病理生理过程,可分为 3 个阶段:急性期兴奋毒性产生和血脑屏障破坏;亚急性期免疫炎症反应和神经细胞凋亡;慢性期神经修复和再生。近年来研究表明,在亚急性期阶段(缺血后数小时至数天),促炎症介质的产生和释放作为介导细胞凋亡的主要因素之一,能加重缺血半暗带区神经细胞的损伤^[3-4]。TLRs 作为固有免疫反应关键的模式识别受体(pattern recognition receptor,PRR)之一,在诱导炎症反应和炎症介质产生中扮演着重要角色^[5]。其中,TLR4 主要表达在小胶质细胞,在神经元及星形胶质细胞中也有表达^[6]。当脑缺血损伤释放大量内源性激活物,TLR4 能通过识别相应的配体诱导 MyD88 依赖和 TRIF 依赖的两个信号通路触发一系列级联免疫炎症反应,引起相关细胞因子和炎症因子的表达,最终导致炎症反应失控^[7]。本实验研究发现:TLR4 基因水平和蛋白表达规律一致,模型组在缺血 12 h 表达逐渐增强,24 h 达到峰值后逐渐回落,48~72 h 较假手术组仍然维持高位表达,其表达规律与国内外研究结果相符^[8-9],提示

TLR4 作为炎症损伤因子与缺血后脑损伤有关。TUNEL 检测结果显示:模型组在缺血 12 h 时阳性细胞表达明显升高,24 h 达到高峰后有所减少,至 72 h 仍高于假手术组。上述研究结果显示 TLR4 表达与细胞凋亡达到高峰的时间基本一致,说明在脑缺血损伤亚急性期,由 TLR4 介导的炎症信号通路的过度激活,能引起大量与脑损伤密切相关的炎症介质的释放,并且可能通过诱导细胞凋亡加重脑组织损伤。这与 Jung 等^[9]用革兰阴性菌的脂多糖(LPS)作为外源性配体激活 TLR4 信号通路刺激试管内培养的鼠的小胶质细胞,导致细胞凋亡的结果相符,提示 TLR4 与细胞凋亡之间可能存在关联。

TLR4 作为启动炎症反应的跨膜蛋白受体之一,在非生物性炎症损伤过程中发挥着重要作用。研究证实多种具有明确抗炎疗效的中药能以 TLR4 为作用靶点,通过抑制相关炎症因子的释放发挥抗炎效应。相关实验研究^[8,10]均以 MCAO 大鼠为模型,分别采用黄芩苷、木犀草素和氧化苦参碱腹腔注射给药,发现在缺血 24 h 后 TLR4 表达都出现下调,脑梗死体积缩小和脑水肿减轻,提示中药能通过抑制 LPS 介导的 TLR4 炎症信号通路发挥神经保护作用。疏血通注射液是由水蛭和地龙两味动物药材按科学配方提取的复方中药制剂,其有效成分为水蛭中的水蛭素和地龙中的蚓激酶。水蛭素作为凝血酶抑制剂具有强大的抗凝作用,而蚓激酶具有类纤溶酶原激活物(tPA)作用,能发挥很强的溶栓作用。动物实验及临床研究均证明该药抗凝、溶栓作用显著。本研究结果显示:SXT 治疗组在缺血 24 h 后,TUNEL 阳性细胞、TLR4 mRNA 和蛋白表达在各时间点均较模型组降低;并且随着治疗时间的延长,TLR4 蛋白及 TUNEL 阳性细胞表达均呈下降趋势,说明疏血通注射液可能通过抑制 TLR4 信号通路调节促炎症介质的产生和神经细胞的凋亡,这可能是其发挥脑保护作用的机制之一。

综上所述,本研究结果从分子水平证实了脑梗死亚急性期,在缺血周围区存在细胞凋亡和免疫炎症反应能加重脑缺血损伤。疏血通注射液可能通过抑制细胞凋亡和下调启动炎症免疫反应的上游核心因子 TLR4 的表达发挥神经保护作用,但该药抗脑缺血损伤的具体作用机制还有待进一步研究论证。

参考文献:

[1] Zhang Y,Jin FH,Ren ZP,et al. TLR4 signaling transduc-

tion and microglia activation after brain ischemia[J]. Inter J Path Clin Med,2008,28(4):334-338.

[2] Longa EZ,Weistein PR,Calson S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.

[3] Fagan SC,Hess DC,Hohnadel EJ,et al. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke[J]. Stroke,2004,35(9):2220-2225.

[4] Iadecola C,Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation[J]. Curr Opin Neurol,2001,14(1):89-94.

[5] Zwagerman N,Plumlee C,Guthikonda M,et al. Toll-like receptor-4 and cytokine cascade in stroke after exercise[J]. Neurological Research,2010,32(2):123-126.

[6] 胡晓松,宋海星,刘静,等. 缺血预处理对局灶性脑缺血大鼠脑梗死周围 TLR4 及 GFAP 表达的影响[J]. 重庆医学,2012,41(29):3076-3079.

[7] Guo J,Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis[J]. Fibrogenesis Tissue Repair,2010,3-21.

[8] Tu XK,Yang WZ,Shi SS,et al. Baicalin inhibits TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent cerebral ischemia[J]. Inflammation,2011,34(5):463-470.

[9] Jung DY,Lee H,Jung BY,et al. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker[J]. J Immunol,2005,174(10):6467.

[10] Qiao H,Zhang X,Zhu C,et al. Luteolin downregulates TLR4, TLR5, NF-κB and p-p38MAPK expression, up-regulates the p-ERK expression, and protects rat brains against focal ischemia[J]. Brain Res,2012,1448(1):71-81.

(收稿日期:2013-03-10 修回日期:2013-05-22)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。