

青藤碱对大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*

吴 岚¹ 刘开祥¹ 俸军林¹ 曾爱源¹ 李 浩¹

摘要 目的:探讨青藤碱(sinomenine,Sin)对缺血再灌注损伤大鼠脑组织的保护作用及对环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2,COX-2) 表达和前列腺素 E2(prostaglandin E2,PGE2)含量的影响。**方法:**将大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组、Sin 低剂量治疗组和 Sin 高剂量治疗组,线栓法建立局灶性脑缺血再灌注模型。Sin 低剂量 (30mg/kg)、高剂量 (60mg/kg)治疗组于术前 30min 分别给予大鼠腹腔注射。用免疫组化法观察缺血 90min 再灌注 24h 大鼠额顶部皮质 COX-2 表达,放免法检测 PGE2 含量,检测脑含水量变化,并进行 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(tetrazolium chloride, TTC)染色和 HE 染色观察脑梗死体积及病理形态学变化。**结果:**①Sin 高、低剂量治疗组脑含水量、脑梗死体积较缺血再灌注组减小,Sin 高、低剂量组之间差异亦具有显著性意义($P<0.05$)。②Sin 高、低剂量治疗组脑组织缺血损伤病理学改变明显轻于缺血再灌注组,Sin 高剂量治疗组缺血改变亦轻于低剂量治疗组。③与假手术组比较,缺血再灌注组额顶部皮质 COX-2 表达明显增加;与缺血再灌注组比较,Sin 高、低剂量治疗组 COX-2 表达均显著减少($P<0.05$);高、低剂量组之间差异亦具有显著性意义($P<0.05$)。④与假手术组比较,缺血再灌注组额顶部皮质 PGE2 含量明显升高;与缺血再灌注组比较,Sin 高、低剂量治疗组 PGE2 含量明显降低($P<0.05$),高、低剂量组之间差异有显著性意义($P<0.05$)。**结论:** Sin 对缺血再灌注脑损伤具有保护作用,其机制可能与通过抑制再灌注损伤后 COX-2 表达,减少 PGE2 含量有关。

关键词 缺血再灌注;环氧化酶-2;前列腺素 E2;青藤碱

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0293-04

Effects of sinomenine on expressions of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 content following cerebral ischemic reperfusion injury in rats/WU Lan, LIU Kaixiang, FENG Junlin, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 293—296

Abstract Objective:To study the effects of sinomenine (Sin) on expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E2 (PGE2) content following cerebral ischemia reperfusion (I/R) injury in rats. **Method:**Rats were randomly divided into 4 groups:sham operated group, I/R group,low dose Sin (30mg/kg) treated group and high dose Sin(60mg/kg) treated group. The focal middle cerebral artery occlusion(MCAO) model was made by suture-occlusion method. Sin were given intraperitoneally 30min before focal cerebral ischemia operation respectively. After MCAO 90min and following 24h of reperfusion, expressions of COX-2 using immunohistochemistry and PGE2 content in frontal and parietal cortex were investigated. Water content of Brain was measured with TTC and HE staining. **Result:** ①Compared with that of I/R group, in low and high dose Sin treated group, water content of Brain and cerebral infarction volume reduced dose-dependently ($P<0.05$). ②The change of ischemic impairment in low or high dose Sin treated group was less than that in I/R group,and in high dose Sin treated group that was even lesser than that in low dose group. ③Compared with sham operated group,in I/R group the expressions of COX-2 in frontal and parietal cortex increased at 24h of reperfusion ($P<0.05$). Compared with I/R group,in low and high dose Sin treated group the expression of COX-2 reduced dose-dependence ($P<0.05$). ④Compared with sham operated group, in I/R group PGE2 content in frontal and parietal cortex increased at 24h of reperfusion ($P<0.05$). Compared with I/R group, in low and high dose Sin treated group PGE2 content was less dose-dependent ($P<0.05$). **Conclusion:**Sinomenine may obviously reduce cerebral infarct volume,reduce cerebral ischemia-reperfusion injury by decreasing the expressions of COX-2 and PGE2 content.Sinomenine plays protective effect on cerebral ischemia injury.

Author's address Dept. of Neurology,the Affiliated Hospital of Guilin Medical College,Guilin,541002

Key words ischemia-reperfusion; cyclooxygenase-2; prostaglandin E2; sinomenine

前期研究证实^[1],脑缺血再灌注后炎症反应是造成再灌注损伤的主要原因之一。花生四烯酸环氧化酶途径在缺血后神经元损伤炎症机制中具有重要作

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

1 桂林医学院附属医院神经内科,广西,桂林,541002

作者简介:吴岚,女,主治医师

收稿日期:2008-07-28

用。诱导型环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 为催化花生四烯酸合成前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 的关键酶, PGE2 是炎症反应中最主要的炎症介质之一。青藤碱(sinomenine, Sin) 是从中药青风藤(sinomenium acutum Rehd et Wils) 中提取的生物碱单体。它具有抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心律失常等药理作用。体外实验表明^[2], Sin 对 COX-2 活性有选择性抑制作用, 但是否对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 COX-2 表达和 PGE2 含量有影响尚未见报道, 本实验进行了相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组:健康 Wistar 大鼠, 雄性, 清洁级, 共 80 只, 质量 250 ± 30 g (广西医科大学动物实验中心提供)。按随机分组原则分成假手术组 (20 只)、缺血再灌注组 (20 只)、Sin 低剂量治疗组 (20 只) 及 Sin 高剂量治疗组 (20 只)。

1.2 方法

1.2.1 给药方法:Sin 低剂量治疗组 (30mg/kg) 和高剂量治疗组 (60mg/kg) 均于术前 30min 分别给予大鼠腹腔注射, 假手术组和缺血再灌注组给予等量的生理盐水腹腔注射。缺血再灌注组和 Sin 低、高剂量治疗组建立脑缺血 90min 再灌注 24h 动物模型。

1.2.2 动物模型的建立:参照 Longa 等^[3]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, 各组均进行左侧大脑中动脉栓塞。线栓采用石蜡线栓。线栓直径约 0.27mm, 插入深度约 18mm, 此时线栓头位于大脑中动脉起始部。缺血 90min 时, 抽提线栓实现再灌注。神经功能缺陷评分: 按照 Longa 等^[3]评分标准, 各组分别在再灌注 24h 进行评分。0 分: 正常, 无神经学征象; 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, 或动物不能站立或动物打滚; 4 分: 无自发活动, 有意识障碍。神经功能缺陷评分在 1—3 分为模型成功。0 分和 4 分为模型不成功予剔除, 在后续实验中补充剔除出组的动物, 保证每组动物数。

1.2.3 COX-2 免疫组化染色:再灌注 24h, 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—11mm 之间冠状切取约 5mm 厚脑组织块, 固定、脱水、包埋成蜡块, 连续切片, 厚 $5 \mu\text{m}$ 。连取 5 张, 1 张作 HE 染色, 其余 4 张作免疫组化染色。用 SP 法进行 COX-2 的免疫组化染色, 以胞浆出现棕黄染色

代表阳性细胞。一抗由武汉博士德生物工程公司提供。阴性对照片用 PBS 液代替一抗。于每个鼠脑取 1 张切片, 每张切片分别随机选取左侧大脑半球额顶部皮质 5 个不重复高倍镜视野 ($\times 400$), 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。

1.2.4 PGE2 含量的测定:再灌注 24h, 各组随机取 5 只大鼠, 用肝素化的等渗盐水快速灌洗, 断头后用冰盘速取患侧脑组织, 分离额顶部皮质, 置微型匀浆器中加 0.1ml 无水乙醇研磨, 再加等渗盐水 0.9ml 充分研磨成匀浆, 置于 -20°C 以下环境保存。测定前低温 (4°C) 离心, 3500r/min, 15min, 取匀浆上清液 200 μl , 按放免试剂盒说明操作, 自动 γ 计数器预先编程, 直接测出样品浓度。

1.2.5 脑含水量检测:再灌注 24h, 各组随机取 5 只大鼠, 断头取脑后, 快速称取左右大脑半球湿重, 置 $110-115^\circ\text{C}$ 烤箱内烤至恒重, 再分别称其干重, 用 (湿重 - 干重) / 湿重的百分比, 作为衡量脑含水量指标。

1.2.6 三苯基氯化四氮唑 (tetrazolium chloride, TTC) 染色:再灌注 24h, 将各组另外 5 只大鼠深麻后开颅取脑。将鼠脑置于 -4°C 冰箱 20min 后, 将其切成 5 等份冠状位切片, 置于 2% TTC 溶液中, 水浴、多聚甲醛液固定。用计算机病理图像分析仪及梯形法计算出梗死灶体积, 各脑片梗死灶体积之和即为梗死体积。

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

1.3 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理, 结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间差异显著性检验采用方差分析。

2 结果

2.1 各组缺血侧脑组织病理学改变的比较

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 (图 1, 见彩色插页)。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 (图 2, 见彩色插页)。Sin 不同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, 细胞间质水肿轻, 高剂量组与低剂量组之间比较, 缺血改变更轻。

2.2 各组脑梗死体积的比较

见表 1。TCC 染色后, 缺血再灌注 24h 左侧大脑半球梗死灶区呈白色, 主要为额顶部皮质和尾壳核, 正常组织呈红色。部分组织表现为由白色向红色过渡区(图 3, 见前置彩色插页)。Sin 高、低剂量治疗组梗死体积较缺血再灌注组显著减小($P<0.05$)。高、低剂量组之间差异亦具有显著意义($P<0.05$)。

2.3 各组脑水肿的比较

见表 1。与假手术组比较, 缺血再灌注组缺血侧脑组织含水量明显升高, 差异具有显著意义($P<0.05$); 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, 差异具有显著意义($P<0.05$)。高、低剂量组之间差异亦具有显著意义($P<0.05$)。

2.4 各组 COX-2 表达的比较

见表 2。假手术组脑组织中未见 COX-2 阳性表达。缺血再灌注组和 Sin 高、低剂量治疗组在缺血中心区及未缺血侧大脑半球内亦均未见 COX-2 表达, 而半暗带和邻近皮质区表达强烈, 表达部位为神经元胞浆。COX-2 免疫阳性细胞主要存在于额顶部皮质, 纹状体区也可见阳性表达, 但少于皮质区(图 4, 见前置彩色插页)。Sin 高、低剂量治疗组额顶部皮质 COX-2 表达较缺血再灌注组减少(均 $P<0.05$); 高、低剂量组之间差异具有显著意义($P<0.05$)(图 5、6, 见前置彩色插页)。

2.5 各组 PGE2 含量的比较

见表 2。与假手术组比较, 缺血再灌注组缺血侧额顶部皮质 PGE2 含量明显升高($P<0.05$)。与缺血再灌注组比较, Sin 高、低剂量治疗组 PGE2 含量明显降低(均 $P<0.05$)。高、低剂量组之间差异具有显著性意义($P<0.05$)。

表 1 各组脑梗死体积和脑含水量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	脑梗死体积(mm ³)	脑含水量(%)
假手术组	5	0	78.71±1.18
缺血再灌注组	5	188±10.71 ^①	96.92±2.27 ^①
Sin 低剂量治疗组	5	136.9±8.37 ^②	89.24±1.25 ^②
Sin 高剂量治疗组	5	112.82±9.03 ^③	83.79±1.97 ^③

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与缺血再灌注组比较 $P<0.05$; ③与 Sin 低剂量治疗组比较 $P<0.05$

表 2 各组 COX-2 表达和 PGE2 活性的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	COX-2(个/400 倍)	PGE2(ng/ml)
假手术组	5	0	4.888±0.882
缺血再灌注组	5	77.6±7.76 ^①	11.276±1.244 ^①
Sin 低剂量治疗组	5	65.8±7.09 ^②	9.025±0.982 ^②
Sin 高剂量治疗组	5	52.2±5.07 ^③	7.603±0.779 ^③

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与缺血再灌注组比较 $P<0.05$; ③与 Sin 低剂量治疗组比较 $P<0.05$

3 讨论

COX 又称前列腺素合成酶(prostaglandin

synthase, PGS), 是花生四烯酸代谢转化为前列腺素(prostaglandin, PG)的催化酶。COX 以两种形式存在于组织中, 其中诱导型 COX-2 在大多数正常组织内检测不到, 但在如脂多糖、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和血小板活化因子等多种病理生理刺激下均可诱导表达。COX-2 催化花生四烯酸合成的主要代谢产物为 PGE2、PGI2 和血栓素 TXA2, 三者至少可在脉管系统、血脑屏障和神经元本身 3 个环节加重缺血性脑损伤。COX-2 代谢产物介导脑损伤机制可能为: 血栓素 TXA2 和前列腺素具有趋化血小板和中性粒细胞黏附于血管内皮细胞作用^[4], 并促进血脑屏障开放^[5]; PGE2 能够促进兴奋性氨基酸介导细胞毒性^[6]; 增加氧自由基的生成和 NO 毒性效应; 加重缺血后神经细胞的凋亡等。本实验结果显示, 脑缺血 90min 再灌注 24h, 缺血再灌注组大鼠脑组织 COX-2 表达和 PGE2 含量均明显增加, 表明缺血再灌注损伤后 COX-2 表达增多, 并催化花生四烯酸代谢生成更多 PGE2。PGE2 被认为是 COX-2 活性的标记之一^[7-8]。本实验结果还显示, COX-2 主要表达在缺血半暗带的神经元, 额顶部皮质区表达明显高于纹状体区, 而在缺血中心、对侧半球及假手术组脑组织未见表达, 此结果与国外研究结果相似^[9-10]。这可能与大脑中动脉阻塞后缺血区的细胞功能和形态严重受损, 随着缺血时间延长细胞丧失了表达 COX-2 的能力有关。研究发现, 阻断缺血再灌注后 COX-2 表达及其代谢产物对缺血脑组织的毒害成为研究再灌注损伤的新靶点。本课题组前期研究已证实^[11], 给予缺血再灌注大鼠 COX-2 抑制剂赛来昔布治疗可通过抑制 PGE2 含量, 对缺血脑组织具有脑保护作用。

防己科植物青藤及毛青藤的干燥藤茎称清风藤, Sin 是从中提取的生物碱单体, 在治疗类风湿性关节炎等各种风湿病及心律失常中发挥了较好疗效。梁健等^[12]给予缺血再灌注大鼠 Sin 治疗, 显示 Sin 对缺血再灌注脑损伤有保护作用。但具体机制尚不清楚。本实验结果也表明, 脑缺血再灌注损伤大鼠给予不同剂量的 Sin 治疗, 可明显减少脑含水量和梗死体积, 对缺血脑组织有保护作用, 并且高剂量 Sin 的脑保护效果更显著。近年来发现 Sin 具有抑制 IL-1 β 等细胞因子和核转录因子表达及抗脂质过氧化作用^[13-16]。体外细胞培养研究发现^[2], Sin 对 COX-2 活性具有一定的选择性抑制作用。本研究通过给予 Sin 治疗脑缺血再灌注损伤大鼠, 显示 Sin 可减少再灌注损伤后 COX-2 表达及 PGE2 含量, 表明

再灌注损伤后,由于血脑屏障通透性的改变,Sin 能进入损伤脑组织,通过抑制 COX-2 表达,减少 PGE2 含量,减轻其对缺血脑组织毒害作用,并且高剂量 Sin 对 COX-2 抑制作用更显著。Sin 对缺血再灌注损伤 COX-2 表达的抑制作用机制是否与减少 IL-1 等炎症细胞因子或核转录因子表达有关尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 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—544.
- [2] 王文君,王培训,李晓娟.青藤碱抗炎机理—青藤碱对外周血单个核细胞环氧化酶活性及其基因表达的影响[J].中国中药杂志,2003,28(4):352—355.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989,20(1): 84—91.
- [4] Stanimirovic D, Shapiro A, Wrong J, et al. The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells(HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion[J]. J Neuroimmunol, 1997,76(1—2):193—205.
- [5] Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, et al. Post-ischemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischemia in rats. [J]. J Neurochem, 2007,100(4):1108—1120.
- [6] Takadera T, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 deteriorates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated cytotoxicity possibly by activating EP2 receptors in cultured cortical neurons [J]. Life Sci, 2006,78(16):1878—1883.
- [7] Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity [J]. Nat Med, 2006,12(2):225—229.
- [8] Madrigal JL, Morro MA, Lizasoain I, et al. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain [J]. Neuropsychopharmacology, 2003, 28: 15792—588.
- [9] Yokota C, Kaji T, Kuge Y, et al. Temporal and topographic profiles of cyclooxygenase-2 expression during 24 h of focal brain ischemia in rats [J]. Neurosci Lett, 2004,357(3):219—222.
- [10] Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E, et al. 1 Expression of c-fos, Heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate [J]. J Neurotrauma, 2001,18(4): 435—451.
- [11] 罗传铭,毕桂南,曹立梅,等.塞来昔布对大鼠局灶性脑缺血再灌注的保护作用及机制研究[J].中风与神经疾病杂志,2007,24(2):160—163.
- [12] 梁健,郑平香,梁京生.青藤碱对脑缺血再灌注大鼠行为及脑梗塞范围的影响[J].广州医学院学报,1999,27(1):9—12.
- [13] 刘良,李晓娟,王培训,等.青藤碱对外周血单个核细胞 IL-1 β 和 IL-8 细胞因子基因表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(4):241—244.
- [14] 黄小鲁,郝飞,王勇,等.青藤碱对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞 NF- κ B 的抑制作用 [J]. 第三军医大学学报,2007,29(13): 1269—1272.
- [15] 杨帆,季刚,陈彦彬,等.青藤碱对大鼠心脏移植排斥反应期间 ICAM-1 和 IL-2 的影响[J].细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3):240—241.
- [16] 刘刚,王辉,张先洲,等.青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J].中草药,2006,31(1):84—87.

2009 年全国老年脑血管病康复治疗学术会议征文通知

为了促进全国老年脑血管病康复治疗领域的学术交流和发 展,中国康复医学会老年脑血管病康复治疗专业委员会及河北省康复医学会主办的“2009 年全国老年脑血管病康复治疗学术会议”定于 2009 年 9 月召开(确切时间与地点详见第二轮通知)。届时将邀请国内、外著名的神经康复治疗 and 脑血管病等方面的专家进行专题讲座和治疗示范,同时,将进行这一领域的大会学术交流,会议征文要求如下:

征文内容:有关神经系统疾病康复治疗的基础研究和临床诊治经验及进展。如现代康复医学现状及发展;老年脑血管病和其他脑损伤的康复机制研究;神经系统疾病的针灸、理疗治疗研究;神经系统疾病康复治疗中新技术、新方法的应用及进展;神经功能障碍和康复治疗的功能评定技术;神经康复方面的高压氧治疗;神经心理干预和康复治疗学,以及与神经再生和康复治疗的相关基础、临床和药物治疗等方面的研究。

投稿要求:会议投稿交流的论文要求 4000 字以内,并附 800 字以内的中文摘要。截稿日期:2009 年 6 月 30 日。投稿方式:投稿请寄至“河北省唐山市新华东道 57 号开滦医院综合办公室,杨小星,邮编 063000”,同时请将稿件电子版发送至邮箱 qglmkf@sina.com,并注明联系人姓名、地址及电话,邮件请注明“康复会议征文”。咨询电话:0315-3025585 或 13513073092,王淑娟。本次学术活动授予国家继续教育学分。

主办单位:华北煤炭医学院附属开滦医院 唐山市医学会神经病学分会

协办单位:中国康复医学会老年康复专业委员会 中国康复医学会脑血管病专业委员会 河北省康复医学会