

注射用七叶皂苷钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后环氧合酶 2 表达的影响

林霞¹ 刘宁^{2,3} 谷有全² 陈江君² 蒋珍秀¹

摘要

目的:研究注射用七叶皂苷钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达的影响。

方法:健康雄性 SD 大鼠 132 只,随机分为假手术组、模型组、治疗组,后两组再分为再灌注 6h、24h、48h、3d、5d 亚组,每亚组 12 只大鼠。应用大脑中动脉线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,造模成功治疗组即刻腹腔注射七叶皂苷钠 5mg/kg/d,其余各组均腹腔注射等量生理盐水。各组大鼠于不同时间点分别评定神经功能缺损评分,免疫组织化学法检测脑组织 COX-2 的表达,TTC 染色测定脑梗死体积。

结果:注射用七叶皂苷钠能显著减少脑组织 COX-2 的表达,改善神经缺损症状,与各时间点模型组比较, $P<0.05$ 。

结论:注射用七叶皂苷钠对局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其作用机制可能与减少脑组织 COX-2 的表达有关。

关键词 注射用七叶皂苷钠;SD 大鼠;脑缺血再灌注损伤;环氧合酶 2

中图分类号:R743,R493,R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-08-0729-04

Effect of aescinate on the expression of cyclooxygenase-2 in rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury/LIN Xia, LIU Ning, GU Youquan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(8): 729—732

Abstract

Objective: To study the effect of aescinate on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury.

Method: One hundred and thirty-two healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operated group, model group and treatment group. The latter two groups were separately subdivided into reperfusion subgroups at the 6th h, 24th h, 48th h, 3rd d and 5th d. There were 12 rats in each subgroup. Rats were selected to establish focal cerebral ischemia reperfusion model by middle cerebral artery thread embolism method. After successful modeling, the treatment group was applied instantly with intraperitoneal injection with aescinate 5mg/kg/d, while the rest groups were given with intraperitoneal injection with equal volume of saline. The neurological deficit scores of rats in each group were respectively conducted at different time points. The COX-2 expression in brain tissue was detected by immunohistochemistry method and the infarct sizes were measured with TTC staining.

Result: Aescinate could significantly reduce the expression of COX-2 in cerebral tissue and improve neurological symptoms comparing with model group at different time points($P<0.05$).

Conclusion: Aescinate played a protective role on focal cerebral ischemia reperfusion injury and the mechanism might be related to the reduction of COX-2 expression.

Author's address The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Gansu, 730000

Key words aescinate; SD rats; cerebral ischemia reperfusion injury; cyclooxygenase-2

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.08.003

1 兰州大学第一临床医学院,730000; 2 兰州大学第一医院神经内科; 3 通讯作者

作者简介:林霞,女,硕士研究生,医师; 收稿日期:2009-07-01

七叶皂苷钠是从七叶树植物天师栗(*Aesculus Wilsonii* Rehd)干燥成熟果实婆罗子中提取的一种纯天然植物药。主要作用为消肿、恢复毛细血管正常通透性、控制炎症和改善循环等。本实验观察注射用七叶皂苷钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达的影响,进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

①试剂:注射用七叶皂苷钠(山东绿叶制药有限公司,批号 200806062 国药准字 H20023113);COX-2 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物公司);多聚甲醛;水合氯醛;红四氮唑。②动物:成年健康雄性 SD 大鼠 132 只,体重 220—250g,清洁级,购自甘肃省中医学院实验动物中心。

1.2 方法

132 只大鼠按随机数字表法分为假手术组 12 只,缺血再灌注模型组 60 只,缺血再灌注治疗组 60 只,后两组再分为脑缺血 2h 再灌注 6h、24h、48h、3d、5d 组,每组 12 只。缺血再灌注治疗组脑缺血 2h 再灌注即刻腹腔注射七叶皂苷钠 5mg/kg/次,之后注射频率为 1 次/24h。假手术组、缺血再灌注模型组腹腔注射等量生理盐水。采用 Koizumi 等^[1-2]的改良大脑中动脉线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血模型。假手术组只分离颈总动脉及颈外动脉。大鼠在手术中均用白炽灯加热,以保持体温恒定(肛温 37℃左右),苏醒后出现血管栓塞的同侧 Horner 征和对侧肢体运动障碍即为模型成功,表现为左前肢不能伸展、行走时向左侧倾倒或按逆时针方向转圈,反之则被剔除。

1.3 神经功能缺损评分

参考 Longa 等^[3]的 6 级评分法分别在缺血 2h 再灌注 6h、24h、48h、3d、5d 进行神经功能缺损评分。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失;5 分:死亡。评分 0 分和 4 分予以剔除;符合评分但有蛛网膜下腔出血、术后死亡作为缺失值,予以剔除。剔除者均在后续实验中补足。

1.4 梗死灶体积的测量

大鼠分别于脑缺血 2h 再灌注 6h、24h、48h、3d、5d,以 10%水合氯醛过量麻醉后处死,迅速断头取脑,放入冰箱冷冻至适当硬度,取其前脑从视交叉处由额极到枕极切成 2mm 厚的冠状面脑片,置入 2% TTC 溶液中 37℃避光孵育 30min。然后用 4%多聚甲醛缓冲液固定。血供正常组织经 TTC 染色成红色,缺血或梗死组织为白色。6h 后将 TTC 染色照片扫描并存储,用图像采集与分析系统测定梗死体积。计算方法为:

梗死体积(%)=(直接梗死体积/全部脑片体积)×100%。

直接梗死体积(%)=各个脑片前后两面梗死面积均值×片厚的总和。

全部脑片体积(%)=各个脑片前后两面面积均值×片厚的总和。

1.5 免疫组化染色

将石蜡包埋标本行冠状切片,厚约 3μm 严格按试剂盒说明操作。光镜下 COX-2 在胞浆内出现棕黄色颗粒,每张切片随机选取 5 个不重复高倍(×400)视野,输入计算机进行图像分析,测定 COX-2 表达的灰度值。

1.6 统计学分析

用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析,结果用均数±标准差表示。各组间比较采用单因素方差分析法。方差齐用 Bonferroni 检验,方差不齐用 Tamhane T₂ 检验。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠神经功能损伤观察及评分

假手术组动物无神经功能缺损表现,活动自如。模型组、治疗组动物均出现不同程度的神经功能缺损症状,主要表现为扎堆蜷缩、精神萎靡、活动减少,不能完全伸展左侧前爪,行走时向右侧划圈、倾倒、旋转等。各用药组均可不同程度减轻神经功能缺损症状,降低神经功能评分,缺血 2h 再灌注后 6h 模型组与治疗组神经功能缺损评分差异无显著性意义($P>0.05$),其余各时间点模型组与治疗组神经功能评分比较均有显著性意义($P<0.01$),见表 1。

2.2 TTC 染色结果

假手术组大鼠脑组织无梗死灶,染色后呈均匀一致的红色。各模型组、治疗组大鼠脑组织均显示不

表 1 注射用七叶皂苷钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经功能评分的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 6 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 3 天	第 5 天
假手术组	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	2.25±0.36	2.94±0.35	3.08±0.29	3.11±0.33	2.90±0.33
治疗组	2.17±0.35	2.52±0.35 ^①	2.55±0.41 ^①	2.07±0.22 ^①	1.61±0.32 ^①

①表示治疗组与模型组比较 $P<0.01$

表 2 注射用七叶皂苷钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s, \%$)

组别	第 6 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 3 天	第 5 天
假手术组	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	25.63±0.39	26.28±0.49	27.65±0.58	27.82±0.70	27.20±0.85
治疗组	25.56±0.45	23.90±0.70 ^①	22.03±0.82 ^①	18.58±0.48 ^①	13.68±0.57 ^①

①治疗组与模型组比较 $P<0.01$

同范围的苍白色梗死灶。缺血 2h 再灌注后 6h 模型组与治疗组梗死体积差异无显著性意义 ($P>0.05$), 其余各时间点模型组与治疗组梗死体积比较有显著性意义($P<0.01$),见表 2。

2.3 注射用七叶皂苷钠对各组大鼠脑组织 COX-2 表达的影响

免疫组化结果显示, 假手术组大鼠 COX-2 阳性细胞表达较少。脑缺血 2h 再灌注后第 6 小时即可见病变侧皮质散在表达 COX-2 阳性细胞, 神经元胞

浆着色; 脑缺血 2h 再灌注后第 24 小时阳性细胞增多, 额、顶皮质及扣带回皮质神经元可见大量棕黄色阳性细胞, 部分血管内皮细胞及海马区神经元也有表达; 脑缺血 2h 再灌注后第 48 小时阳性细胞表达至高峰; 之后 COX-2 阳性细胞的表达逐渐下降; 注射用七叶皂苷钠干预后, 各组脑组织 COX-2 阳性细胞数减少, 灰度值均明显高于模型组 ($P<0.05$), COX-2 的表达强弱与灰度值成反比。见表 3、图 1。

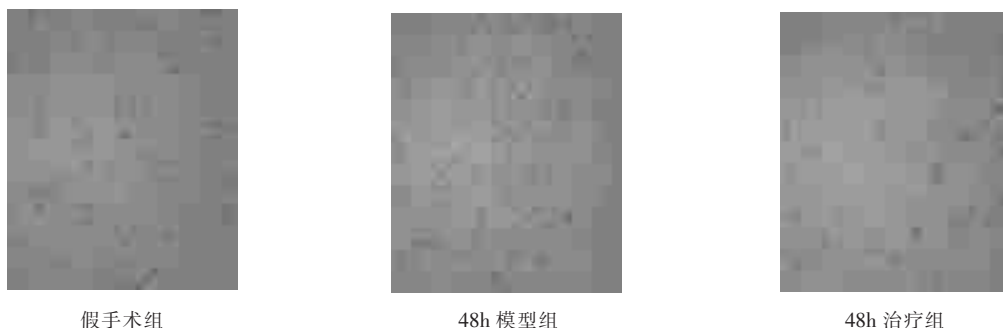
表 3 各组大鼠局灶性脑缺血再灌注后 COX-2 表达的灰度值 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 6 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 3 天	第 5 天
假手术组	133.90±1.89	133.90±1.89	133.90±1.89	133.90±1.89	133.90±1.89
模型组	126.90±3.05	124.48±1.36	121.15±0.70	125.71±0.45	128.36±0.89
治疗组	129.97±2.07 ^①	125.58±1.17 ^①	124.87±1.06 ^①	127.48±0.69 ^①	130.84±1.31 ^①

①治疗组与模型组比较 $P<0.05$

图 1 大鼠脑组织免疫组化染色后 COX-2 的表达

(免疫组化染色, ×400)



假手术组

48h 模型组

48h 治疗组

3 讨论

脑缺血再灌注导致脑组织损伤, 其病因学机制涉及自由基损伤、兴奋性氨基酸毒性、神经细胞内钙超载、高能磷酸化合物的缺乏、血脑屏障破坏、白细胞的作用^[4]及神经细胞凋亡等多种分子生物学机制。

脑缺血激发花生四烯酸释放以及环氧合酶产物如前列腺素、血栓烷素水平增高, 被认为是脑缺血再灌注损伤的重要机制之一。COX 是前列腺素合成过程中一个重要限速酶, 有 COX-1、COX-2 和 COX-3 三种同工酶。COX-2 是花生四烯酸代谢的限速酶, 后者

产生的前列腺素及血栓素是脑缺血后炎症级联反应的重要介质。COX-2 可通过加重氧化应激损伤;增强兴奋性氨基酸的毒性作用;增加细胞内钙超载^[5];降解细胞外基质导致细胞凋亡等多种途径加重脑缺血再灌注损伤^[6]。姚小梅等^[7]研究表明脑缺血再灌注后 COX-2 阳性神经元分布多位于梗死边缘,提示 COX-2 表达对缺血半暗带神经元的生存和死亡起重要作用。Eduardo Candelario-Jalil^[8]等研究表明,应用 COX-2 抑制剂尼美舒利 2h 后即可起到改善神经功能的作用,随着剂量的增大,可显著减少大鼠永久性大脑中动脉梗死体积,其作用强弱呈现剂量依赖性。由于 COX-2 是即早基因,在生理状态下以极低拷贝数表达,只有当细胞受炎症信号、生长因子等刺激后表达才增加。因此认为,脑缺血后 COX-2 的大量产生可能是损伤加剧的重要因素。张秋玲等^[9]研究表明雌激素能增强脑细胞对缺血再灌注损伤的耐受性,故实验全部选用雄性大鼠,避免了性激素对实验结果的影响。实验结果显示,大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 COX-2 的表达多位于梗死边缘及额、顶、扣带回皮层和海马区,而在梗死中心、病变对侧及假手术组脑组织 COX-2 表达较少。此结果与刘豪等^[10]的结果相似。大鼠局灶性脑缺血再灌注后第 6 小时 COX-2 表达开始增高,第 48 小时达高峰,然后开始降低,第 5 天时降至较低水平,但仍高于正常。注射用七叶皂苷钠干预后治疗组各时间点脑组织 COX-2 的表达均较模型组减少($P<0.05$),其可降低大鼠神经功能缺损评分,减少脑梗死体积,表明注射用七叶皂苷钠能减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,与缺血再灌注模型组比较有显著性意义($P<0.05$)。

4 结论

注射用七叶皂苷钠对局灶性脑缺血再灌注损伤

具有保护作用,其机制可能与降低脑组织 COX-2 的表达,减少毒性代谢产物的产生有关。

参考文献

- [1] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986, 8: 1—8.
- [2] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1998, 29(8): 1037—1043.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [4] 杨佳丹,董志.脑缺血再灌注损伤的病因学研究进展[J].中国康复医学杂志,2006,21(10):935—938.
- [5] Mirjany M, Ho L, Pasinetti GM. Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 301 (2): 494—500.
- [6] Nishikawa M, Stapleton PP, Freeman TA, et al. NS-398 inhibits tumor growth and liver metastasis of colon cancer through induction of apoptosis and suppression of the plasminogen activation system in a mouse model [J]. J Am Coll Surg, 2004, 199(3): 428—435.
- [7] 姚小梅,王纪佐,朱学良,等. COX-2 在脑缺血再灌注后的表达[J]. 中华神经医学杂志,2004,3(3):167—169.
- [8] Candelario-Jalil E, Mhadu NH, González-Falcón A, et al. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on cerebral infarction and neurological deficits induced by permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. [J]. J Neuroinflammation, 2005, 2(1):3.
- [9] 张秋玲,孙远标,王海英,等.雌激素对去势大鼠脑缺血再灌注致脑损伤的保护作用[J].中国康复医学杂志,2008,23(7):638—642.
- [10] 刘豪,李琴,毕明俊,等.肌苷对大鼠脑缺血再灌注后钙调神经磷酸酶和环氧合酶-2 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2004,19(11):839—842.