论著

文章编号:1000-5404(2008)19-1828-04

阿托伐他汀抑制脑缺血再灌注大鼠脑组织MMP-2、MMP-9表达

蔡志友[1],晏 勇[1],余昌胤[2],张 骏[2],黄良国[2],胡永涛[2],周 妮[2],王凤英[2] ([1]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;[2]遵义医学院附属医院神经内科,贵州 遵义 563003)

摘 要:目的 观察阿托伐他汀对大鼠脑缺血再灌注脑组织MMP-2、MMP-9表达的影响,探讨阿托伐他汀对脑缺血再灌注脑保护作用机制。**方法** 将Wistar大鼠随机分组:正常组(N组)、缺血再灌注组(IR组)、假手术组(NS组)、阿托伐他汀对照组(At组)、阿托伐他汀治疗组(AtT组)、阿托伐他汀预处理组(AtP组)。采用免疫组织化学法检测大鼠脑组织MMP-2、MMP-9表达,用图像分析仪测定光密度值,电镜下分析面密度。**结果** AtT、AtP组脑组织MMP-2、MMP-9表达较IR组明显降低($P<0.05$),较NS、N、At组明显增高($P<0.01$);梗死灶体积AtT、AtP组较IR组明显降低($P<0.05$),较NS、N、At组明显增高($P<0.01$)。**结论** 阿托伐他汀能抑制大鼠脑缺血再灌注后能脑组织MMP-2、MMP-9表达,发挥脑保护作用。

关键词: 脑缺血再灌注;阿托伐他汀;金属基质蛋白酶

中图法分类号: R741.02; R743.21; R972.6 **文献标识码:** A

Atorvastatin downregulates MMP-2, MMP-9 in brain of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion

CAI Zhi-you[1], YAN Yong[1], YU Chang-yin[2], ZHANG Jun[2], HUANG Liang-guo[2], HU Yong-tao[2], ZHOU Ni[2], WANG Feng-ying[2] ([1]Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To study the neuroprotective mechanism of atorvastatin against the injury induced by cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** Wistar rats were randomly divided into: normal group (N), ischemia-reperfusion group (IR), sham-operation group (NS), atorvastatin group (At), atorvastatin treatment group (AtT) and atorvastatin preconditioning group (AtP). The rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion was established by inserting a piece of nylon thread into the left internal carotid artery. Ischemia of 30 min and reperfusion of 30 min were carried out alternately for 12 h or 24 h respectively. Their expressions of MMP-2 and MMP-9 in brain tissues were measured by immunohistochemical methods and their optic density value was measured by imaging analysis system. The positive cells for MMP-2 and MMP-9 expressions were counted under optic microscope. **Results** The expressions of MMP-2 and MMP-9 in AtP and AtT groups were lower than those in IR group ($P<0.05$), significantly higher than those in NS, N, At groups ($P<0.01$); Infarct volume was smaller than that of in IR group ($P<0.05$), significantly higher than that in NS, N, At groups ($P<0.01$). **Conclusion** Atorvastatin can downregulate MMP-2 and MMP-9 expressions and restrain infarct volume during focal cerebral ischemia-reperfusion. The treatment with atorvastatin can protect neural function by maintaining the structural integrality of blood brain barrier.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion; atorvastatin; matrix metalloproteinase

他汀类药物(statins),即3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A(3-hydro-xy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶抑制剂,是一类强效降胆固醇药物,具有安全性高、耐受性好等优点。研究结果证明,该类药物除能明显调节血脂外,还具有多向性抗动脉粥样硬化作用,能显著降低冠心病及卒中的发病率,减少心、脑血管事件的发生率;在心、脑血管疾病的防治方面有着广泛的作用[1-3]。他汀类药物不但可以减少脑卒中的发生,而且还可以改善脑卒中患者的临床预后。本实验采用阿托伐他汀对大鼠脑缺血再灌注进行预处

作者简介:蔡志友,男,河南省固始县人,博士研究生,主治医师,主要从事痴呆方面的研究。电话:(023)62275320, E-mail: czy000806@163.com

收稿日期:2007-09-26;修回日期:2008-03-12

理和治疗干预,观察大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 的表达,探讨阿托伐他汀的脑保护作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物和主要试剂及设备

雌性 Wistar 大鼠 54 只,体质量 200 ~ 250 mg,购于第三军医大学野战外科研究所实验动物中心,清洁级,许可证号:渝实动设施准第 260 号。Wistar 大鼠适应性喂养 1 周,经筛选,分为:正常组(N 组),阿托伐他汀对照组(At 组),假手术组(NS 组),阿托伐他汀预处理组(AtP 组,分为缺血 12 h 和 24 h 组),阿托伐他汀治疗组(AtT 组,分为缺血 12 h 和 24 h),缺血再灌注组(IR 组,分为缺血 12 h 和 24 h 组),每组 6 只。动物苏醒后参考 Longa 等[4] 的 5 分评分法,2 分或 2 分以上者入选本实验。阿托伐他汀钙片:北京红惠生物制药股份有限公司;MMP-2、MMP-9 检测试剂盒:福建福州迈新生物科技公司;Mias 图像分析系统(3.0):四川大学图像分析研究所。

1.2　动物模型制作方法

参照文献[5 -7]描述的大脑中动脉线栓方法制作,左侧颈内动脉插入线栓,建立大脑中动脉缺血再灌注模型,缺血 30 min 后再灌注。

1.3　给药方法

将阿托伐他汀用生理盐水稀释成 0.5 mg/ml 浓度备用。N 组不给予任何处理;At 组除予以 10 mg/kg 阿托伐他汀灌胃外,不作其他处理;假手术组插入 0.5 ~ 1.0 cm 线栓,予以与 At 组等量的生理盐水灌胃;在 IR 组的基础上,AtP 组于缺血前 30 min、AtT 组于缺血后 120 min 及 14 h 各给予阿托伐他汀 10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$灌胃;IR 组行缺血和再灌注处理并予以 At 组等量的生理盐水灌胃。阿托伐他汀剂量选择参考 Oria 等[8] 和 Hong 等[3] 的阿托伐他汀神经保护作用机制研究。

1.4　脑梗死体积检测

每组随机取 5 只大鼠,经过量麻醉后断头取脑,经速冻 20 min后。从视交叉向后连续冠状切片,片厚 2 mm。将脑片放入 2% TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)溶液,37 ℃温箱中染色 30 min,15 min 翻面,甲醛固定 24 h 后,见正常脑组织呈红色,梗死灶则为白色。用数码相机拍照,OSIRIS 图像处理软件计算各脑片右侧半脑梗死灶百分比(梗死面积/总面积),梗死体积 = 各层梗死面积之和 × 层面厚度, 计算平均值。

1.5　取材和检测方法

实验大鼠于再灌注后 12 h 和 24 h,用 3.5% 水合氯醛麻醉,快速断头取全脑,用生理盐水制成 10% 的脑组织匀浆。ELISA 法测定脑组织匀浆蛋白量 MMP-2、MMP-9 含量。同组大鼠麻醉后打开胸腔,经升主动脉快速灌注生理盐水,直至右心房流出液清亮为止。然后用 4% 多聚甲醛(pH7.4 的磷酸缓冲液配制)150 ml 灌注固定,断头取脑,将大脑置于 4% 甲醛中固定免疫组织化学法检测脑组织 MMP-2、MMP-9 备用。免疫组织化学染色法严格按照说明书实验步骤进行。采用 Mias 图像处理系统,每组大鼠各取一张免疫组化切片,每张随机取 5 个视野,分别分析 MMP-2、MMP-9 的光密度值、计算 MMP-2、MMP-9 的阳性细胞百分率。取平均值作为统计参数。

1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　阿托伐他汀对局灶性脑缺血大鼠梗死灶体积的影响

阿托伐他汀对局灶性脑缺血大鼠梗死灶体积的影响与 N 组、At 组、NS 组比较,局灶性脑缺血 12 h,IR 组梗死灶体积迅速扩大($P < 0.01$),随缺血时间延长,梗死灶体积缓慢进展,24 h 达到高峰($P < 0.01$);与同时点模型组比较,各治疗组、预处理组梗死灶体积均有不同程度缩小,以治疗组效果最为显著($P < 0.01$),且缺血 12h 治疗组梗死灶体积明显小于 IR 组($P < 0.01$,表 1)。

表 1　阿托伐他汀对局灶性脑缺血大鼠梗死灶体积的影响(mm^3, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	缺血时间	
	12 h	24 h
N 组	100.0 ± 10.6	100.0 ± 11.5
NS 组	100.0 ± 11.0	100.0 ± 11.3
At 组	100.0 ± 11.4	100.0 ± 11.2
AtP 组	136.2 ± 12.7[ab]	141.2 ± 12.8[ab]
AtT 组	126.3 ± 12.6[ab]	122.8 ± 12.5[ab]
IR 组	156.5 ± 12.1[a]	152.1 ± 12.4[a]

a:$P < 0.01$,与 N 组、NS 组、At 组比较;b:$P < 0.05$,与 IR 组比较

2.2　免疫组织化学法脑组织 MMP-2、MMP-9 表达

表 2 和表 3 对 MMP-2、MMP-9 光密度和面密度值研究显示,局灶性脑缺血 12 h 和 24 h ,IR 组脑组织 MMP-2、MMP-9 明显表达。与同时相点 IR 组比较,各治疗组、预处理组 MMP-2、MMP-9 光密度值均有不同程度升高($P < 0.05$),以 AtT 组变化最为显著(图 1、2)。

表 2　各组大鼠不同缺血时间脑组织 MMP-2 表达($n = 6$)

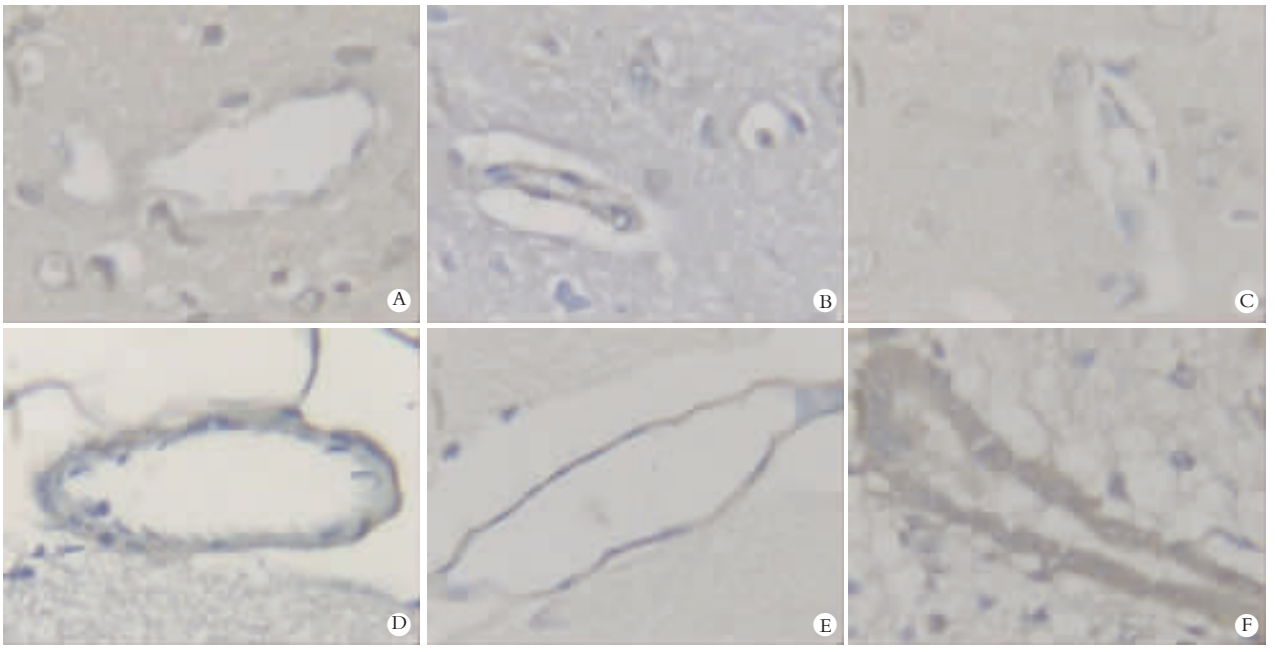
组别	光密度		面密度(%)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
N 组	215.3 ± 5.4	218.1 ± 5.6	11.6 ± 2.5	11.8 ± 2.3
NS 组	213.5 ± 5.4	218.6 ± 4.7	11.1 ± 3.2	11.6 ± 2.5
At 组	219.6 ± 3.5	211.6 ± 3.1	11.8 ± 6.2	11.4 ± 5.4
AtP 组	161.3 ± 6.0[ab]	162.7 ± 6.8[ab]	42.1 ± 5.2[ab]	42.6 ± 3.2[ab]
AtT 组	140.6 ± 5.5[ab]	142.3 ± 6.2[ab]	32.3 ± 5.2[ab]	32.3 ± 6.2[ab]
IR 组	102.3 ± 2.6[a]	102.6 ± 5.2[a]	51.2 ± 5.2[a]	50.5 ± 5.8[a]

a: $P < 0.01$, 与 N 组、NS 组、At 组比较; b: $P < 0.05$,与 IR 组比较

表 3　各组大鼠不同缺血时间脑组织 MMP-9 表达($n = 6$)

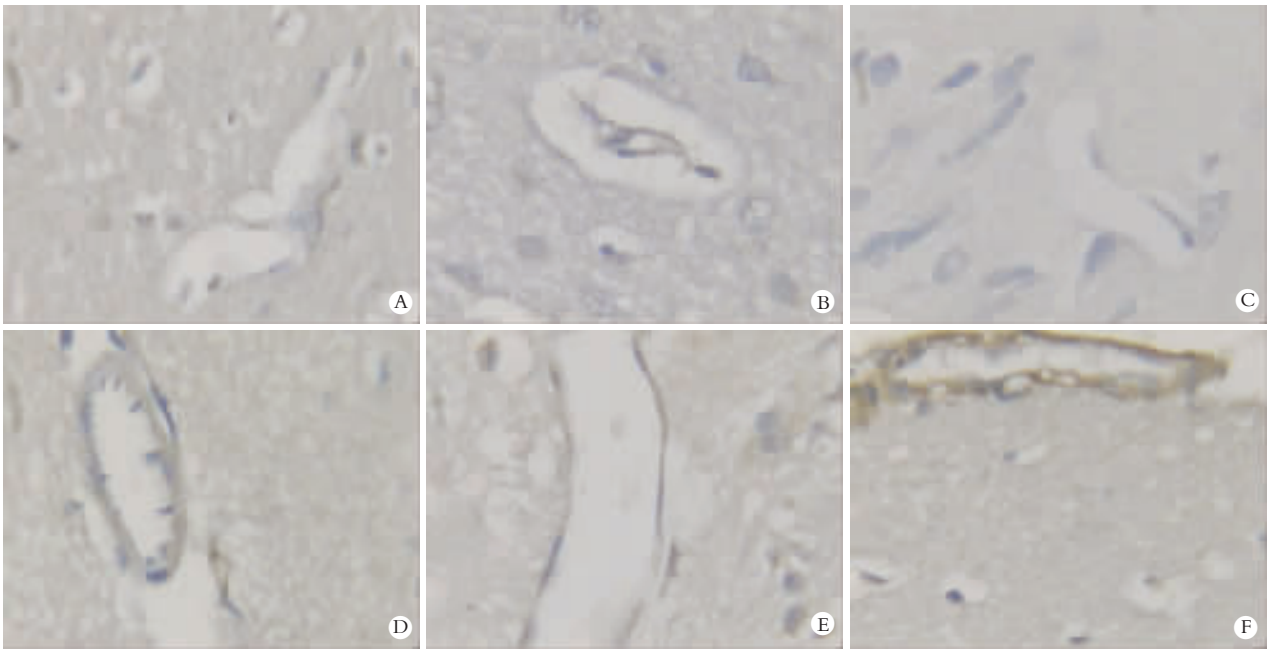
组别	光密度		面密度(%)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
N 组	215.6 ± 5.6	218.6 ± 4.6	11.6 ± 5.6	11.6 ± 6.6
NS 组	214.7 ± 4.4	214.6 ± 4.7	11.4 ± 4.2	11.4 ± 4.5
At 组	205.6 ± 5.1	211.5 ± 3.5	10.5 ± 5.2	11.5 ± 5.6
AtP 组	161.3 ± 6.0[ab]	162.7 ± 7.6[ab]	43.6 ± 5.6[ab]	41.6 ± 3.6[ab]
AtT 组	138.6 ± 6.5[ab]	135.3 ± 6.4[ab]	32.3 ± 5.7[ab]	33.4 ± 4.8[ab]
IR 组	103.3 ± 6.6[a]	102.6 ± 5.8[a]	52.2 ± 6.2[a]	50.5 ± 7.0[a]

a: $P < 0.01$, 与 N 组、NS 组、At 组比较;b: $P < 0.05$,与 IR 组比较



A(NS 组):血管周围基底部无黄染,MMP-2 无表达;B(AtT 组 12 h)、C(AtT 组 24 h)、D(AtP 组 12h)、E(AtP 组 24 h):细胞质和血管周围基底部少量黄染,细胞核无黄染, MMP-2 细胞质和血管周围基底部少量表达;F(IR 组):血管周围基底部黄染,MMP-2 明显表达

图 1 免疫组织化学法观察 MMP-2 的表达 (SABC×400)



A(NS 组):血管周围基底部无黄染,MMP-9 无表达;B(AtT 组 12 h)、C(AtT 组 24 h)、D(AtP 组 12 h)、E(AtP 组 24 h):细胞质和血管周围基底部少量黄染,细胞核无黄染,MMP-9 细胞和血管周围基底部少量表达,在细胞核中无表达;F(IR 组):血管周围基底部黄染,MMP-9 明显表达

图 2 免疫组织化学法观察 MMP-9 的表达 (SABC×400)

3 讨论

MMPs 是分解 ECM 的蛋白酶类中最重要的一类。MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族的主要成员。脑缺血后缺血灶内和周边内皮细胞 MMP-9 的表达可能是脑血管壁受损导致脑水肿和白细胞浸润的机制。早期选择性抑制 MMP-2、MMP-9 可显著减轻脑梗死[9,10],表明了这种酶在促进局灶缺血性脑损伤中的重要作用。近年来大量研究证实他汀类药物是一类有效的脑保护剂,但机制具体不明。所以,本实验采用阿托伐他汀对大鼠脑缺血再灌注进行预处理和治疗干预,我们研究发现阿托伐他汀对脑缺血再灌注大鼠脑梗死灶体积均

有不同程度缩小,可以降低大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 的表达。

研究表明脑缺血后 MMPs 分解细胞外基质、破坏基底膜并开放血脑屏障是脑出血病情加重的重要因素。MMP-2、MMP-9 是 MMPs 家族的两个重要成员,其作用底物包括Ⅳ型胶原酶、V 型胶原酶、纤维连接蛋白、弹性蛋白和变性的基质胶原。颅内直接注射 MMP-2 可引起血管周围细胞外基质降解,血脑屏障开放,导致脑缺血性损伤的发生,提示 MMP-2 和 MMP -9 降解血管基底膜,从而造成脑血管病变。本实验采用阿托伐他汀对缺血再灌注大鼠预处理和缺血后的治疗均发现,IR 组大鼠脑组织中 MMP-2、MMP-9 的表达均高于对照组; AtP、AtT 各组与 IR 组比较,MMP-2、MMP-9 的表达显著降低;AtP、AtT 各组大鼠脑组织中 MMP-2、MMP-9 的表达均高于对照组,本实验进一步证实了 MMP-2、MMP-9 参与了脑缺血脑损伤的病理生理过程。阿托伐他汀可以抑制大鼠脑组织中 MMP-2、MMP-9 的表达,可以维持血脑屏障完整性,减轻脑缺血组织损伤,证明了阿托伐他汀对血管性痴呆大鼠的脑保护治疗作用。本实验也通过对脑缺血再灌注大鼠病理学观察,发现局灶性脑缺血大鼠梗死灶体积与同时点模型组比较,各治疗组、预处理组梗死灶体积均有不同程度缩小,以治疗组效果最为显著($P<0.01$),说明了阿托伐他汀对脑缺血再灌注病理改变具有脑保护作用。

本实验证实阿托伐他汀能有效抑制抑制 MMP-2、MMP-9 表达,可能通过维持血脑屏障完整性,是一种有效的脑保护剂。由于本组实验观察时相点少,观察时间短,对阿托伐他汀脑保护作用机制未进行充分研究。但是,阿托伐他汀的耐受性好,安全性高,是值得推广的脑保护剂,其脑保护具体机制和临床应用有待进一步研究。

参考文献:

[1] 赵水平, 吴　军, 谭利明, 等. 他汀类药物对急性脑梗死的抗炎作用[J]. 中华医学杂志, 2005,85(40):2841 - 2845.

[2] Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, 3rd., *et al*. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack[J]. N Engl J Med, 2006, 355(6): 549 - 559.

[3] Hong H, Zeng J S, Kreulen D L, *et al*. Atorvastatin protects against cerebral infarction *via* inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(5): H2210 - H2215.

[4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[5] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al*. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472 - 476.

[6] 李建生, 刘敬霞, 于海滨, 等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(5): 272 - 274.

[7] Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, *et al*. Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique[J]. Acta Neurochir (Wien), 1991, 109(3 - 4): 126 - 132.

[8] Oria-de-Suarez C, Suarez-Rodriguez S, Ponce-Hernandez L, *et al*. Effect of atorvastatin on Fas (CD95/Apo-1) expression in normal or ischemic brain[J]. An Med Interna, 2006, 23(4): 156 - 160.

[9] Kamada H, Yu F, Nito C, *et al*. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction[J]. Stroke, 2007, 38(3): 1044 - 1049.

[10] Maier C M, Hsieh L, Yu F, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 and myeloperoxidase expression: quantitative analysis by antigen immunohistochemistry in a model of transient focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2004, 35(5): 1169 - 1174.

(编辑　汪勤俭)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如:公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称,1995 年不能写成 95 年或 95′年;1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5 位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部