文章编号:1000-5404(2010)21-2273-04

论著

# 梓醇对大鼠慢性脑缺血白质损伤的保护作用

蔡其燕,陈兴书,姚忠祥 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所)

【摘要】 目的 初步探讨梓醇对慢性脑缺血所致白质损伤的保护作用及机制。方法 成年雄性 Wistar 大鼠 24 只,分为 4 组:假手术组,缺血组,生理盐水组和梓醇组。通过结扎大鼠双侧颈总动脉建立慢性脑缺血模型,同时腹腔注射 5 mg/kg 梓醇或生理盐水予以治疗,每天 1 次,连续 10 d。术后 30 d 处死,然后利用卢卡斯快蓝(luxol fast blue, LFB)染色法和免疫组织化学技术分别观察梓醇对脑白质髓鞘以及髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)、腺瘤性息肉蛋白(adenomatus polyposis coli,APC(CC-1)和星形胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidity protein,GFAP)表达的影响。结果 与假手术组比较,在缺血组和生理盐水组,LFB 染色变浅[(37 259.6 ±6 626.6)、(36 554.4 ±7 865.7) *vs* (90 470.5 ±5 004.6)],MBP 表达下降[(24 016.5 ±3 794.8)、(23 923.6 ±4 605.1) *vs* (65 055.4 ±6 839.9)],CC-1 阳性的少突胶质细胞(oligodendrocytes,OLs)减少[(33.0 ±9.6)、(32.0 ±9.8) *vs* (100.0 ±11.2)],GFAP 阳性的星形胶质细胞增多[(52.0 ±7.4)、(50.0 ±9.4) *vs* (14.0 ±6.6)],均有显著差异($P<0.01$);梓醇治疗后能显著地减轻白质损伤,它能使 LFB 染色加深(86 687.6 ±6 619.1),MBP 表达升高(61 604.5 ±6 319.9),CC-1 阳性细胞数增加(91.0 ±8.4),GFAP 阳性细胞数减少(17.0 ±7.8),与生理盐水组比较均有显著差异($P<0.01$)。结论 梓醇可通过抑制星形胶质细胞的增生进而抑制炎症反应来保护慢性脑缺血所致的白质损伤。

【关键词】 梓醇;脑缺血;髓鞘;白质;大鼠
【中图法分类号】 R285.5;R322.81;R743.31 【文献标志码】 A

# Protective effect of catalpol on white matter injury due to chronic cerebral ischemia in rats

Cai Qiyan, Chen Xingshu, Yao Zhongxiang (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the protective effect of catalpol on white matter injury due to chronic cerebral ischemia in rats and its mechanism. **Methods** Twenty-four adult male Wistar rats were randomly divided into sham-operation group, ischemia group, vehicle group and catalpol group, 6 rats in each group. A chronic cerebral ischemia model was established by ligating bilateral common carotid arteries. Ischemic rats were treated by intraperitoneal injection with catalpol or vehicle (normal saline) at 5 mg/kg per day for 10 days and killed 30 d after operation. Luxol fast blue (LFB) staining and immunohistochemical staining were used to observe the effects of catalpol on expressions of myelin sheath, myelin basic protein (MBP), adenomatus polyposis coli [APC (CC-1)], and glial fibrillary acidity protein (GFAP) in white matter of rats. **Results** The LFB staining was weaker, the expression level of MBP and the number of CC-1 -positive oligodendrocytes (OLs) were lower, and the number of GFAP-positive astrocytes was higher both in ischemia group and in vehicle group (37 259.6 ±6 626.6 *vs* 36 554.4 ±7 865.7, 24 016.5 ±3 794.8 *vs* 23 923.6 ±4 605.1, 33.0 ±9.6 *vs* 32.0 ±9.8, 52.0 ±7.4 *vs* 50.0 ±9.4) than in sham-operation group ($P<0.01$). The damage to white matter was more significantly alleviated in catalpol group than in vehicle group ($P<0.01$). The LFB staining was stronger (86 687.6 ±6 619.1), the expression level of MBP (61 604.5 ±6 319.9) and the number of positice CC-1 cells (91. ±8.4) were higher, and the number of GFAP positive cells was lower (17.0 ±7.8) in catalpol group than in vehicle group ($P<0.01$). **Conclusion** Catalpol protects against white matter injury due to chronic cerebral ischemia in rats by inhibiting the proliferation of astrocytes and inflammatory reactions.

【**Key words**】 catalpol; cerebral ischemia; myelin sheath; white matter; rat

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31071056). Corresponding author: Yao Zhongxiang, Tel: 86-23-68775266, E-mail: yaozhx@yahoo.com

【基金项目】 国家自然科学基金(31071056)
【通信作者】 姚忠祥,电话:(023)68775266, E-mail:yaozhx@yahoo.com

脑缺血是神经系统的多发病之一，与多种脑血管疾病如脑动脉硬化、血管性痴呆、老年性痴呆等密切相关。长期以来，脑缺血的基础和临床研究多集中于神经元或灰质的损伤反应上，而一直忽视对脑白质损伤的研究[1]，但是脑缺血后神经功能的最终恢复不仅依赖于对神经元和灰质的保护也有赖于对白质的保护。脑白质具有缺血易损性，其损伤主要表现为少突胶质细胞（oligodendrocytes，OLs）损伤和髓鞘破坏[2]。炎症反应作为脑缺血OLs损伤的主要机制之一，可导致OLs的凋亡坏死，从而影响髓鞘的形成和神经冲动的传导。因此，在保护脑白质缺血损伤的研究中，积极有效地抑制炎症反应和OLs凋亡，促进OLs存活、再生以及髓鞘形成，具有重要意义。梓醇（Catalpol）是从中药地黄根部分离得到的一种小分子环烯醚萜类化合物，具有止痛、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性。体内外实验表明，梓醇在脑缺血中具有明显的保护作用，能够抑制神经元和星形胶质细胞的凋亡[3,4]。那么，它对OLs是否也有同样的保护作用呢？为此，本研究采用大鼠永久性双侧颈总动脉结扎造成慢性脑缺血白质损伤模型，通过对OLs、星形胶质细胞及髓鞘的改变进行定量分析，观察梓醇对OLs及髓鞘的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及主要试剂

成年健康雄性Wistar大鼠24只，体质量250～300 g，由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。实验动物采用随机单位组设计分组法分为假手术组，缺血组，生理盐水组和梓醇组，每组6只动物。梓醇（中国药品生物制品检定所，批号110808-200508，纯度98%），小鼠抗CC-1单克隆抗体（美国Calbiochem公司），山羊抗MBP多克隆抗体（美国Santa Cruz公司），兔抗GFAP多克隆抗体（北京中杉生物公司），LFB染料（美国Sigma公司），SABC免疫组化试剂盒（武汉博士德生物公司），其他试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 慢性脑缺血模型制作及给药

用1%戊巴比妥钠将大鼠麻醉，使动物仰卧于手术台上，固定四肢及头部，作颈前正中切口，暴露两侧颈总动脉，剥离其周围组织、静脉和神经，用双重丝线永久性结扎两侧颈总动脉造成动物的慢性脑缺血模型[5]。假手术组除不结扎两侧颈总动脉外，其余操作均与制备脑缺血模型完全相同。动物于术后立即腹腔注射给药（梓醇组以5 mg/kg剂量一次性注射到大鼠体内，生理盐水组注射溶剂生理盐水），以后每天给药1次，连续给药10 d。各组动物于术后30 d后处死。

### 1.3 动物的取材、固定

大鼠麻醉后，暴露心脏，用剪刀在左心室剪开一道小口，插入灌注针头至主动脉，用生理盐水灌注，剪开右心耳，至流出液体变清亮为止。用2.5% Zamboni's液灌注固定。灌毕小心剥取鼠脑于Zamboni's液中，4 ℃后固定24 h，30%蔗糖脱水。OCT包埋，连续冰冻切片（厚20 μm），切片收集于Zamboni's液中，4 ℃保存备用。

### 1.4 LFB染色

组织切片贴于载玻片上，37 ℃烤干，0.01 mol/L PBS（pH=7.4）漂洗干净；将载玻片置于LFB液中染色，37 ℃过夜；95%酒精洗，然后转入蒸馏水洗；切片经0.05%碳酸锂分化10 s，蒸馏水立即冲洗终止；70%酒精分化至灰白质分辨明显；充分水洗后进行脱水，透明，封固。光镜下蓝色为正常髓鞘。

### 1.5 免疫组织化学检测

切片用PBS漂洗，3% $H_2O_2$阻断内源性过氧化物酶15 min，PBS漂洗，5% BSA 37 ℃封闭30 min。入一抗（CC-1抗体1∶100稀释，MBP抗体1∶200稀释，GFAP抗体1∶200稀释），于37 ℃孵育3 h，之后转入4 ℃冰箱过夜。二抗37 ℃孵育3 h，PBS漂洗，SABC 37 ℃ 1 h，DAB显色，系列酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。Olympus显微镜观察，数码照相机照相，对照切片以0.01 mol/L PBS替代一抗，其余步骤相同，结果为阴性。

### 1.6 图像分析

用Image-Pro plus 5.0软件对胼胝体镜下（×40）LFB和MBP染色的积分光密度值及胼胝体镜下（×400）CC-1和GFAP阳性细胞数进行分析。

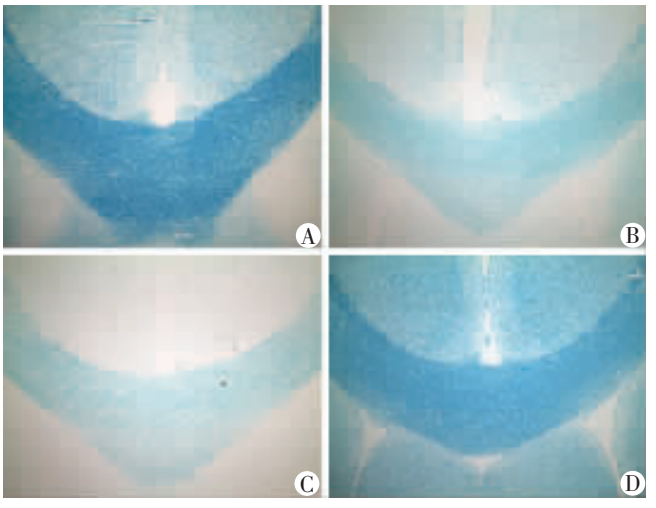
### 1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 12.0统计软件，进行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 LFB染色

实验大鼠相同部位脑组织进行LFB染色，光镜下见大小不等的蓝色组织，为正常髓鞘。染色的结果显示，在假手术组脑组织的胼胝体、扣带、尾壳核、内囊、外囊、视束、视神经等白质部位均可以看到较深的蓝色。缺血后，染成蓝色的髓鞘颜色变浅，髓鞘变得稀疏。对各组胼胝体的积分光密度值进行检测，发现假手术组的积分光密度值较高，缺血组和生理盐水组的积分光密度值均明显低于假手术组（$P<0.01$）。缺血动物经梓醇治疗后，积分光密度值显著升高，与生理盐水组比较有显著性差异（$P<0.01$）（图1、表1）。




A：假手术组 B：缺血组 C：生理盐水组 D：梓醇组

**图1 LFB在各组大鼠脑组织胼胝体的染色** （胼胝体镜×40）

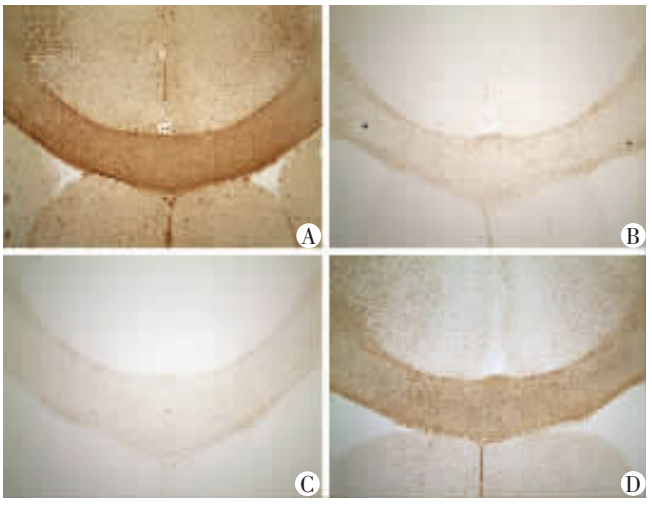
**表 1 各组大鼠脑组织胼胝体 LFB 染色结果和 MBP 的表达**
（积分光密度值，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | LFB | MBP |
|---|---|---|
| 假手术组 | 90 470.5 ±5 004.6 | 65 055.4 ±6 839.9 |
| 缺血组 | 37 259.6 ±6 626.6[a] | 24 016.5 ±3 794.8[a] |
| 生理盐水组 | 36 554.4 ±7 865.7[a] | 23 923.6 ±4 605.1[a] |
| 梓醇组 | 86 687.6 ±6 619.1[b] | 61 604.5 ±6 319.9[b] |

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与生理盐水组比较

## 2.2 MBP 蛋白的表达

MBP 检测是反映 CNS 实质性损害，是髓鞘脱失变化较特异、敏感的指标。免疫组化结果显示，MBP 蛋白在假手术组、缺血组、生理盐水组和梓醇组的表达变化情况与 LFB 染色变化情况一致，即在假手术组的表达较强，为黄褐色；在缺血组和生理盐水组的表达明显减弱，着色较浅，且分布不均匀，显示髓鞘结构疏松紊乱。缺血组和生理盐水组的积分光密度值也显著低于假手术组（$P<0.01$）；梓醇治疗后 MBP 的表达增强，积分光密度值也显著升高，与生理盐水组比较差异显著（$P<0.01$）（图 2、表 1）。




A：假手术组 B：缺血组 C：生理盐水组 D：梓醇组

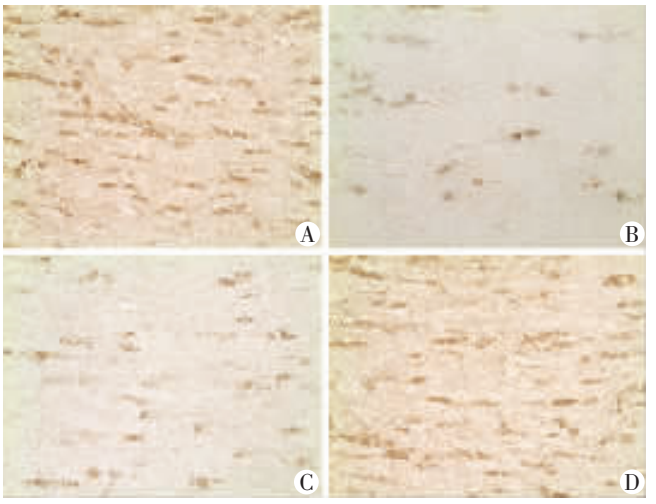
**图 2 MBP 在各组大鼠脑组织胼胝体的表达**（SABC ×40）

## 2.3 CC-1 蛋白的表达

CC-1 为成熟 OLs 的标志物之一，在假手术组，CC-1 的表达较强，阳性细胞数较多；缺血后 CC-1 的表达明显减弱，阳性细胞数明显减少；生理盐水治疗后其表达并没有明显增强。缺血组和生理盐水组的阳性细胞数与假手术组比较有显著差异（$P<0.01$）。梓醇治疗后 CC-1 的表达明显上升，阳性细胞数增多，与生理盐水组比较，有显著性差异（$P<0.01$）（图 3、表 2）。

## 2.4 GFAP 蛋白的表达

GFAP 是表达于星形胶质细胞内的一种酸性蛋白，是星形胶质细胞的典型标志物。免疫组化检测的结果显示，GFAP 蛋白的表达情况和 CC-1 相反，即在假手术组和梓醇组 GFAP 的表达较弱，阳性细胞数较少，细胞染色浅，且星形胶质细胞胞体较小，突起较少；在缺血组和生理盐水组 GFAP 表达增强，阳性细胞数增多，细胞着色深，星形胶质细胞胞体变大，突起增多。梓醇组的 GFAP 阳性细胞数与生理盐水组比较，有明显区别（$P<0.01$）（图 4、表 2）。



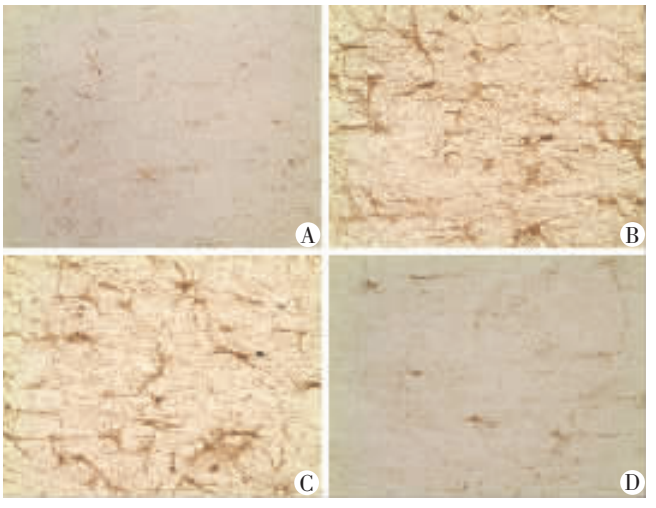

A：假手术组 B：缺血组 C：生理盐水组 D：梓醇组

**图 3 CC-1 在各组大鼠脑组织胼胝体的表达**（SABC ×400）

**表 2 CC-1 和 GFAP 在各组大鼠脑组织胼胝体的阳性细胞数**（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | CC-1 | GFAP |
|---|---|---|
| 假手术组 | 100.0 ±11.2 | 14.0 ±6.6 |
| 缺血组 | 33.0 ±9.6[a] | 52.0 ±7.4[a] |
| 生理盐水组 | 32.0 ±9.8[a] | 50.0 ±9.4[a] |
| 梓醇组 | 91.0 ±8.4[b] | 17.0 ±7.8[b] |

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与生理盐水组比较




A：假手术组 B：缺血组 C：生理盐水组 D：梓醇组

**图 4 GFAP 在各组大鼠脑组织胼胝体的表达**（SABC ×400）

## 3 讨论

1992 年 de-la-Torre 等[5]首次永久性结扎大鼠双侧颈总动脉制作慢性脑缺血的动物模型。经证实，这一模型可导致脑白质损伤，包括髓鞘脱失、星形胶质细胞增生变性、OLs 凋亡减少等[6]。该模型能使脑血流量明显减少并可持续数月之久，且不同脑区血流下降的程度不同，从而导致脑白质不同区域受损的程度也不同。研究表明，胼胝体由于脑血管解剖上的特点，是慢性脑缺血中白质的易受损区域之一[7]。据此，本研究拟采用结扎大鼠双侧颈总动脉造成慢性脑缺血来研

究白质的损伤，并选择胼胝体作为观察的重点区域。

LFB染色法主要用于染正常的有髓神经纤维。在本研究中，我们发现在假手术组LFB染色强，髓鞘结构完整均一；缺血后LFB染色下降，髓鞘变得稀疏，其在胼胝体的积分光密度值显著低于假手术组（$P < 0.01$），这说明慢性脑缺血可造成髓鞘的缺失。然而有髓神经纤维只占髓鞘的小部分，所以不能完全依赖于LFB的染色结果来判断髓鞘含量的变化。MBP是神经髓鞘特有的膜蛋白，占髓鞘总蛋白的30%，由成熟的OLs合成分泌，其表达已成为OLs在脱髓鞘病变时的敏感性指标，可用于量化白质损伤[8]。本实验发现MBP在假手术组白质染色深，免疫反应阳性强。缺血后，MBP染色浅，表达减弱。且缺血组与假手术组的MBP积分光密度值具有非常显著的差异（$P < 0.01$），这进一步证实了缺血可造成了大鼠脱髓鞘的形态学改变。梓醇治疗后，LFB染色和MBP表达明显增强，表明梓醇对髓鞘的缺血损伤具有保护作用。

CC-1为成熟OLs的标志物之一，因此可通过CC-1免疫组化染色来检测OLs的变化。本实验结果显示脑缺血后，CC-1表达下降，OLs细胞数减少。经梓醇治疗后，CC-1表达升高，OLs的减少可得到明显改善，且梓醇治疗组和生理盐水组的OLs细胞数有显著性差异，这说明梓醇可抑制OLs的凋亡。体外实验还显示梓醇可促进PC12细胞分化[9]。Li等[3]研究发现梓醇短期应用并不能提高认知能力低下的沙土鼠的认知水平，这表明梓醇在该研究中主要是以神经保护功能为主。因此，在脑缺血中梓醇一方面有可能通过神经营养作用促进OLs前体细胞的分化成熟，补充凋亡坏死的OLs；另一方面有可能通过神经保护作用促进损伤OLs的存活，以维持OLs的数目。

近年研究表明，星形胶质细胞在过度激活增生的状态下，会对机体产生一些不利影响。活化的星形胶质细胞胞体肥大、突触增多并延长、GFAP表达增加，还会分泌、释放一系列毒性因子，诱导免疫炎症反应，加剧机体的神经损伤[10]。在本实验中，我们应用星形胶质细胞的典型标志物GFAP来观察缺血及梓醇对星形胶质细胞的影响，发现在脑缺血后GFAP表达升高，星形胶质细胞数目增加，说明脑缺血导致了星形胶质细胞的活化增生。Zhang等[11]的研究表明梓醇能通过稳定线粒体的功能和抑制NF-κB的活性抑制胶质细胞的激活及炎症因子的产生来发挥神经保护作用，促进细胞存活。同样，我们也发现梓醇能下调GFAP的表达，使星形胶质细胞数恢复至缺血前水平，这说明梓醇有可能通过抑制星形胶质细胞的活化增生及其随后释放的炎症因子来抑制白质的炎症损伤。

此外，其他研究还发现梓醇能通过多种机制发挥神经保护作用，如在体外实验中梓醇能通过提高内源性抗氧化酶活力，增加自由基清除，抑制神经元和星形胶质细胞的凋亡[12,4]。Liu等[13]的研究结果表明梓醇还能提高老年大鼠的神经可塑性。因此，在本研究中梓醇除了抑制星形胶质细胞增生发挥抗炎症作用外，还有可能通过其他途径保护白质的缺血损伤。

总之，通过结扎大鼠双侧颈总动脉制作的慢性脑缺血模型可造成脑白质的髓鞘损伤，OLs减少和星形胶质细胞增生。缺血后用梓醇进行治疗，可抑制星形胶质细胞的增生、OLs的减少和髓鞘的损伤，这表明梓醇可通过抑制星形胶质细胞的增生进而抑制炎症反应来保护慢性脑缺血所致的白质损伤。

## 参考文献：


[1] Dewar D, Yam P, McCulloch J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter[J]. Eur J Pharmacol, 1999, 375(1/3): 41-50.

[2] Pantoni L, Garcia J H, Gutierrez J A. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia[J]. Stroke, 1996, 27(9): 1641-1647.

[3] Li D Q, Duan Y L, Bao Y M, *et al*. Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils[J]. Neurosci Res, 2004, 50(2): 169-177.

[4] Li Y, Bao Y, Jiang B, *et al*. Catalpol protects primary cultured astrocytes from *in vitro* ischemia-induced damage[J]. Int J Dev Neurosci, 2008, 26(3/4): 309-317.

[5] de-la-Torre J C, Fortin T, Park G A, *et al*. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. Brain Res, 1992, 582(2): 186-195.

[6] Lee J H, Park S Y, Shin Y W, *et al*. Neuroprotection by cilostazol, a phosphodiesterase type 3 inhibitor, against apoptotic white matter changes in rat after chronic cerebral hypoperfusion[J]. Brain Res, 2006, 1082(1): 182-191.

[7] Farkas E, Donka G, de-Vos R A, *et al*. Experimental cerebral hypoperfusion imposes white matter injury and microglial activation in the rat brain[J]. Acta Neuropathol(Berl), 2004, 108(1): 57-64.

[8] Skoff R P, Bessert D A, Barks J D, *et al*. HypoxiC-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice[J]. Int J Devl Neurosci, 2001, 19(2): 197-208.

[9] Yamazaki M, Chiba K, Mohri T. Neuritogenic effect of natural iridoid compounds on PC12h cells and its possible relation to signaling protein kinases[J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(6): 791-795.

[10] Sastre M, Klockgether T, Heneka M T. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms[J]. Int J Dev Neurosci, 2006, 24(2/3): 167-176.

[11] Zhang A, Hao S, Bi J, *et al*. Effects of catalpol on mitochondrial function and working memory in mice after lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation[J]. Exp Toxicol Pathol, 2009, 61(5): 461-469.

[12] Wang Z, An L J, Duan Y L, *et al*. Catalpol protects rat pheochromocytoma cells against oxygen and glucose deprivation-induced injury [J]. Neurol Res, 2008, 30(1): 106-112.

[13] Liu J, He Q J, Zou W, *et al*. Catalpol increases hippocampal neuroplasticity and up-regulates PKC and BDNF in the aged rats[J]. Brain Res, 2006, 1123(1): 78-79.


（收稿：2010-06-13 修回：2010-07-28）

（编辑 吴培红）