论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0596-04

马来酸桂哌齐特对大鼠局灶性脑缺血再灌注后白介素-1β、白介素-6的表达及神经功能的影响

黄艳玲[1,2],秦新月[1],王恬竹[1],吴小慧[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科[1];400014 重庆,重庆市急救医疗中心神经内科[2])

【摘要】 **目的** 研究马来酸桂哌齐特(cinepazide maleate, CM)对大鼠急性脑缺血后IL-1β、IL-6的表达及神经功能的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠48只,采用随机数字表法分为正常组、假手术组、缺血再灌注组及CM治疗组,在缺血再灌注后第2、7天对脑组织进行HE染色、测定脑组织含水量及采用免疫组化法测定皮质IL-1β、IL-6的表达,并对动物进行神经功能评分。**结果** 脑缺血再灌注后第2天,CM治疗组与缺血再灌注组比较,脑内有较多的神经细胞存活,IL-1β、IL-6的表达被明显抑制($P<0.01$),但是CM治疗组脑组织含水量及神经功能评分与缺血再灌注组比较无明显改善($P>0.05$)。至缺血再灌注后第7天,缺血再灌注组IL-1β、IL-6的表达较早期有所降低($P<0.01$),同时伴随神经功能的改善($P<0.05$),CM治疗组的改善更为明显($P<0.01$)。**结论** CM对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有一定的脑保护作用,其作用机制可能与CM降低脑内IL-1β、IL-6的表达有关。

【关键词】 马来酸桂哌齐特;局灶性脑缺血;IL-1β;IL-6

【中图法分类号】 R743.31;R392.11;R972 【文献标志码】 A

Effects of cinepazide maleate on IL-1β and IL-6 expression and neural function in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion

Huang Yanling[1,2], Qin Xinyue[1], Wang Tianzhu[1], Wu Xiaohui[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, Emergency Medical Center, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effects of cinepazide maleate (CM) on the expression of IL-1β and IL-6 and neural function in rats after acute cerebral ischemia. **Methods** Forty-eight adult male SD rats were randomly divided into a control group, a sham operation group, an ischemia/reperfusion group, and a CM treatment group. On the 2nd and 7th days after ischemia/reperfusion, HE staining and immunohistochemical assay were employed to observe pathological changes of brain tissue and detect IL-1β and IL-6 expression in the cerebral cortex. Additionally, the water content of brain tissue and the neurological function scores of experimental animals were determined. **Results** On the 2nd day after acute cerebral ischemia, the CM treatment group exhibited more survived nerve cells, significantly inhibited expression of IL-1β and IL-6 ($P<0.01$) and no obvious improvement about the brain water content and neurological function score ($P>0.05$) in comparison with the ischemia/reperfusion group. On the 7th day after acute cerebral ischemia, the expression of IL-1β and IL-6 in the ischemia/reperfusion group decreased as compared with a previous level ($P<0.01$), accompanied by improvement in neurological function ($P<0.05$). Such changes in the CM treatment group were more significant ($P<0.01$). **Conclusion** CM has certain cerebroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats, the underlying mechanism of which may be associated with CM inhibiting IL-1β and IL-6 expression in brain tissue.

【**Key words**】 cinepazide maleate; focal cerebral ischemia reperfusion; IL-1β; IL-6

Corresponding author: Qin Xinyue, Tel: 86-23-89012478, E-mail: Qinxinyue@yahoo.com

【通信作者】 秦新月,电话:(023)89012478,E-mail:qinxinyue@yahoo.com

脑梗死后的病理生理过程复杂,涉及到多个机制及诸多的细胞因子,其中炎症反应与缺血性脑损伤密切相关[1]。钙离子通道阻滞剂马来酸桂哌齐特(cinepazide maleate, CM)可通过抑制腺苷(adenosine, ADO)的降解,降低氧耗,还能通过提高脑血管的血流量,改善脑的代谢。本研究拟观察CM对大鼠脑缺血后炎症相关蛋白白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达及神经功能及脑组织含水量的影响,从分子水平上探讨CM对缺血性脑损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年雄性SD大鼠48只,由重庆医科大学实验动物中心提供,SPF级,体质量250~280 g。按随机数字表法分为正常组、假手术组、缺血再灌注组和CM治疗组,每组12只。分别选取缺血再灌注后2、7 d两个时间点,每个时间点6只。

1.2 实验药品与用法

CM由北京四环生物制药有限公司生产,规格:2 ml:80 mg。于再灌注后立即从尾静脉注射CM(3.0 mg/kg),由注射用生理盐水稀释。

1.3 大脑中动脉闭塞(MCAO)模型的制作

参照Longa和Nagasawa等[2-3]的线栓法:用3.5%水合氯醛(1 ml/100 g,腹腔注射)麻醉大鼠。将麻醉后的大鼠仰卧位固定,备皮,术区消毒,铺无菌洞巾,颈正中切口,暴露并分离右侧颈总、颈外与颈内动脉,结扎颈外动脉并离断,于颈外动脉残端切口向颈内动脉插入栓线(18.0±0.5) mm,感觉有阻力即达大脑中动脉起始部,固定栓线,缝合伤口。缺血2 h后拔出栓线,实现再灌注。大鼠缺血再灌注模型的神经功能评分采用Zea Longa评分法[2]:1~3分入组,0分和4分者均被剔除。到达时间点后,取材时发现蛛网膜下腔出血者也剔除,随机补充。

1.4 脑组织含水量测定

各组在缺血再灌注第2、7天各取3只大鼠进行脑组织含水量的测定。大鼠深度麻醉后立即断头,剥离大脑,于预冷的培养皿上分离大脑半球。取右侧半球,经电子天平称量后放入干燥箱中烘干,再称量,计算脑组织含水量。

含水量=(脑湿质量-脑干质量)/脑湿质量×100%

1.5 脑组织HE染色和IL-1β、IL-6免疫组织化学染色

各组在缺血再灌注第2、7天各取3只大鼠用于HE和免疫组化染色。将大鼠深度麻醉后开胸,用生理盐水与4%多聚甲醛各150 ml进行灌流,断头取脑,4%多聚甲醛液中固定4~6 h,然后放入70%乙醇中送组织切片,片厚8 μm。取相同层面切片分别做HE染色和免疫组织化学染色。免疫组化采用S-P法,DAB显色。所用抗IL-1β、IL-6的一抗浓度均为1:100,购自博奥森公司;S-P即用型工作试剂盒由北京中杉生物公司提供,免疫组化步骤按照试剂盒说明书操作。IL-1β、IL-6阳性蛋白的平均光密度值用Image Pro Plus 6.0软件进行测定,具体操作参考软件教程。

1.6 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件进行统计分析,齐性资料组内比较行t检验,组间比较行单因素方差分析,非齐性资料则行秩和检验。

2 结果

2.1 神经功能评分

根据Longa的神经功能评分,达到3分的大鼠共5只(5/24,20.83%),2分的共15只(15/24,62.50%),1分的共4只(4/24,16.67%)。各组大鼠的神经功能评分见表1。在缺血再灌注后第7天,两组大鼠的评分较前明显改善($P<0.05$);此外,CM治疗组大鼠的神经功能改善程度较缺血再灌注组更明显($P<0.01$)。

表1 各组大鼠缺血再灌注后第2、7天神经功能评分($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第2天	第7天
缺血再灌注组	2.08±0.67	1.33±0.52[a]
CM治疗组	2.00±0.60	0.50±0.55[ab]

正常组、假手术组评分为0;a:$P<0.05$,与缺血再灌注第2天比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较

2.2 脑组织HE染色

缺血再灌注后第2天,CM治疗组与缺血再灌注组相比,坏死区及空泡区缩小,保存了较多的神经细胞,炎症反应也减轻,提示CM在早期即发挥了较理想的神经保护作用。缺血再灌注后第7天,CM治疗组可见梗死区遗留的囊状缺失,炎性浸润明显减少。

2.3 脑组织含水量

与正常组及假手术组比较,缺血再灌注组大鼠脑组织含水量于缺血第2天显著升高($P<0.01$);随后脑水肿逐渐改善,但仍高于正常组及假手术组($P<0.01$)。CM治疗组大鼠的脑组织含水量与缺血再灌注组比较并无统计学差异($P>0.05$),表明CM并没有表现出能减轻脑水肿的作用。见表2。

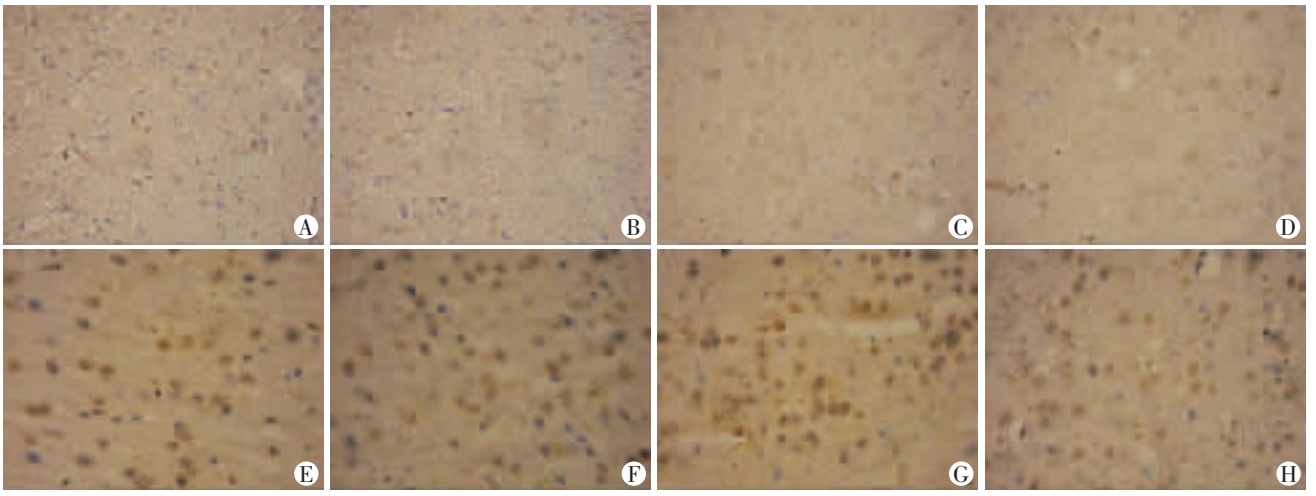
表2 各组大鼠缺血再灌注后第2、7天缺血侧脑组织含水量测定(%, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第2天	第7天
正常组	75.14±0.57	75.69±0.19
假手术组	76.22±0.33	75.50±0.96
缺血再灌注组	86.23±0.45[a]	77.48±0.87[ab]
CM治疗组	85.60±0.24[a]	76.95±0.56[ab]

a:$P<0.01$,与正常组及假手术组比较;b:$P<0.01$,与第2天比较

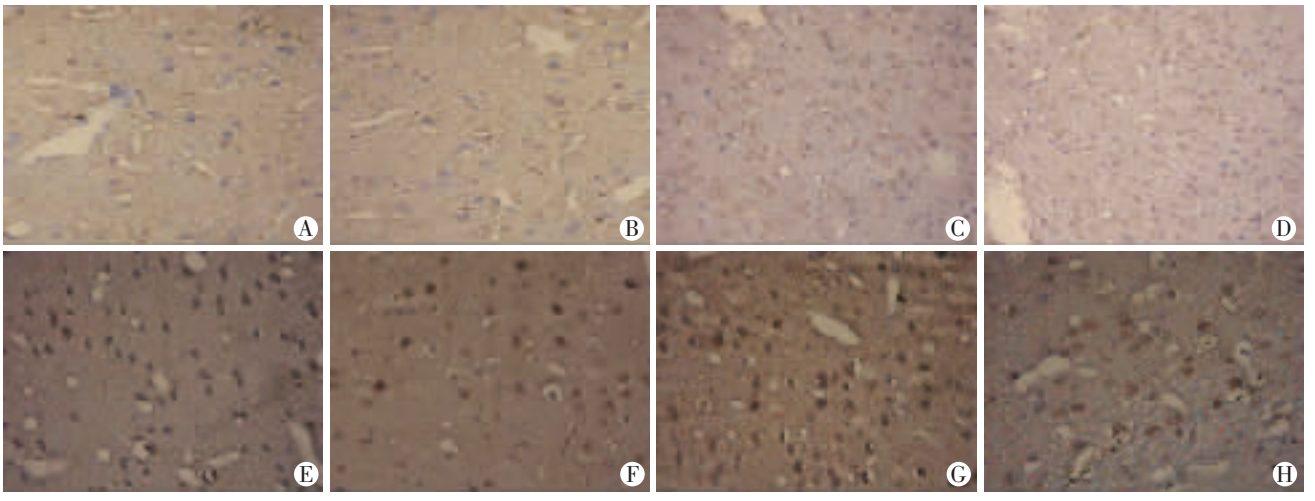
2.4 IL-1β、IL-6蛋白的表达

在缺血再灌注后第2天,与正常组及假手术组比较,缺血再灌注组IL-1β、IL-6的平均光密度值明显增高($P<0.01$)。应用CM干预的大鼠皮质内的炎症反应在早期就得到明显改善,IL-1β及IL-6的表达较缺血再灌注组明显降低($P<0.01$)。至缺血再灌注第7天,CM治疗组大鼠的IL-1β、IL-6表达水平比缺血再灌注组下降更为明显($P<0.01$),其中IL-1β的表达几乎达到正常水平($P>0.05$)。见图1、2,表3、4。



A～D:分别为正常组、假手术组、缺血再灌注组、CM治疗组第2天;E～H:分别为正常组、假手术组、缺血再灌注组、CM治疗组第7天

图1 各组大鼠缺血再灌注后第2、7天脑皮质IL-1β免疫组化染色 (S-P ×200)



A～D:正常组、假手术组、缺血组、治疗组第2天;E～H:正常组、假手术组、缺血组、治疗组第7天

图2 各组大鼠缺血再灌注后第2、7天脑皮质IL-6免疫组化染色 (S-P ×200)

表3 各组大鼠缺血再灌注后第2、7天缺血侧皮质IL-1β的光密度值($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第2天	第7天
正常组	0.204±0.017	0.203±0.018
假手术组	0.212±0.015	0.206±0.020
缺血再灌注组	0.301±0.017[a]	0.256±0.047[ab]
CM治疗组	0.260±0.014[ac]	0.211±0.032[bc]

a:$P<0.01$,与正常组及假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注第2天比较;c:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较

表4 各组大鼠缺血侧皮质IL-6的光密度值($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第2天	第7天
正常组	0.192±0.007	0.190±0.008
假手术组	0.198±0.006	0.194±0.007
缺血再灌注组	0.253±0.011[a]	0.233±0.005[ab]
CM治疗组	0.227±0.009[ac]	0.217±0.010[abc]

a:$P<0.01$,与正常组及假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注第2天比较;c:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较

3 讨论

在缺血性脑损伤中炎症释放的介质因子是加重脑损伤的重要机制之一。在急性脑缺血再灌注期间,脑组织缺血缺氧的应激刺激导致神经内分泌免疫调节功能紊乱。以肿瘤坏死因子α(TNF-α)、IL-1β、IL-6等细胞因子为代表的多种炎性介质失控释放而形成的"瀑布效应"是脑缺血再灌注损伤的免疫炎症反应的基础,其中IL-1β和IL-6的过量表达能加重神经细胞损伤[1,4]。TNF-α、IL-1β、IL-6相互作用,相互促进,包括诱导黏附分子的表达,增加白细胞浸润,促进NOS生成,使NO合成增加,诱导氨基酸和自由基产生,共同加剧了脑组织的广泛损伤。

CM作为新一代的哌嗪类钙拮抗剂,已广泛应用于临床,除治疗脑梗死外,还被用于治疗心绞痛、急性

心肌梗死、急性脑出血、颅脑损伤、椎-基底动脉供血不足、糖尿病并发症、蛛网膜下腔出血、周围血管缺血等疾病。目前对其作用机制的探讨集中于：通过腺苷增效，使磷酸肌醇酯被激活，松弛血管平滑肌，从而加强血管扩张的时效；拮抗钙超载，增强脑组织对葡萄糖的摄取能力；提高细胞抗缺血缺氧的能力，保护细胞功能；增加红细胞的柔韧性和变形能力，抑制血小板的聚集，降低血液黏度[5]。

目前，只有少数的动物研究对CM的药理作用及机制进行了研究[6-8]，但采用的模型是颅脑损伤及骨骼肌缺血模型，至于其在急性脑缺血后的神经保护作用及其机制尚少见报道。本研究表明，CM能够抑制大鼠急性MCAO后急性期（术后第2、7天）炎症细胞因子IL-1β、IL-6的表达，改善脑组织病理形态及大鼠神经功能，说明CM对脑缺血再灌注损伤有保护作用。但是在我们的实验中，并未发现CM能改善急性脑缺血引起的脑水肿，术后第2、7天的CM治疗组大鼠脑组织含水量较缺血再灌注组无明显变化（$P>0.05$）。这些结果提示：CM的脑保护作用与其抑制脑内炎症反应有关，而与改善脑水肿严重程度无关。其潜在机制可能是：CM能通过抑制腺苷脱氨酶的作用延迟了腺苷的降解，使腺苷在组织内蓄积，从而抑制机体对腺苷的清除。腺苷作为内源性保护因子在脑缺血损伤中表现出了显著的自稳态调节及神经调节作用[9]，尤其在神经代谢失衡处于可逆的条件下，大量释放的腺苷生成其代谢产物——肌苷，也能直接作用于腺苷受体A_1、A_{2a}、A_{2b}、A_3等[10-12]，发挥多种生物学效应。肌苷能抑制巨噬细胞，从而减弱缺血再灌注引起的TNF-α、巨噬细胞炎性蛋白α（macrophage inflammatory protein α，MIP-1α）和IL-6等的生成[13]。肌苷的抗炎作用并不依赖于细胞内转运，提示细胞表面受体机制的参与[14-15]。细胞内信号通路可能与$P2X_7/Ca^{2+}$途径有关。

CM可能通过增加内源性腺苷含量而减轻了急性脑缺血后大鼠脑组织内炎性细胞因子IL-1β、IL-6的表达，并改善了神经功能缺损症状，发挥了较好的脑保护作用，但对于缺血再灌注损伤后脑腺苷含量的动态变化及用药后增强脑内源性保护作用的分子机制有待进一步探讨。

参考文献：

[1] Basu A, Lazovic J, Krady J K, *et al*. Interleukin-1 and the interleukin-1 type 1 receptor are essential for the progressive neurodegeneration that ensues subsequent to a mild hypoxic/ischemic injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(1): 17-29.

[2] 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.

[3] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(8): 1037-1043.

[4] 向强，文亮，高强国. 内毒素预处理对大鼠全脑缺血/再灌注后炎性反应影响的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：694-696.

[5] 张丽，黄道飞，刘胜. 心脑血管病新药马来酸桂哌齐特药及临床综述[J]. 中国临床医药研究杂志，2002，76：7002-7003.

[6] 申传安，马杰，柴家科，等. 马来酸桂哌齐特对骨骼肌缺血-再灌注损伤的保护作用与机制研究[J]. 解放军药学学报，2008，24(5)：420-422，466.

[7] 张晓华，葛建伟，陆兆丰，等. 马来酸桂哌齐特对大鼠颅脑损伤作用效果的实验研究[J]. 医学信息：手术学分册，2007，20(7)：583-587.

[8] 殷玉华，陆兆丰，贾锋，等. 马来酸桂哌齐特对大鼠颅脑损伤的作用[J]. 诊断学理论与实践，2006，5(4)：319-322.

[9] Saransaari P, Oja S S. Mechanisms of adenosine release in the developing and adult mouse hippocampus[J]. Neurochem Res, 2002, 27(9): 911-918.

[10] Zalewska-Kaszubska J. Neuroprotective mechanisms of adenosine action on CNS neurons[J]. Neurol Neurochir Pol, 2002, 36(2): 329-336.

[11] Montesinos M C, Desai A, Delano D, *et al*. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(1): 240-247.

[12] Mabley J, Soriano F, Pacher P, *et al*. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5′-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 466(3): 323-329.

[13] Dowdall J F, Winter D C, Bouchier-Hayes D J. Inosine modulates gut barrier dysfunction and end organ damage in a model of ischemia-reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2002, 108(1): 61-68.

[14] Hasko G, Kuhel D G, Nemeth Z H, *et al*. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 1013-1019.

[15] Yang D, Zhang Y, Nguyen H G, *et al*. The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion[J]. J Clin Invest, 2006, 116(7): 1913-1923.

（收稿：2010-10-27 修回：2010-11-24）
（编辑 汪勤俭）