论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1390-04

麝香酮联合灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的保护作用

徐 露[1],苏祖禄[2] (400016 重庆,重庆医科大学生化与分子药理学重点实验室[1];402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 探讨麝香酮联合灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤后 MMP-2 和 MMP-9 的表达及血脑屏障通透性的影响。**方法** 选择 SD 大鼠 504 只,按照简单随机化方法分为假手术组、模型组、麝香酮组(1 mg/kg)、灯盏花素组(200 mg/kg)和麝香酮(1 mg/kg)联合灯盏花素高、中、低剂量组(400、200、100 mg/kg),每组 72 只。采用线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型,再灌注伤后 3、6、12、24、48、72 h,Western blot 测定 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平;同时测定脑组织伊文思蓝(evans blue,EB)的含量观察血脑屏障通透性。**结果** 与模型组相比,灯盏花素组和麝香酮联合高、中、低剂量灯盏花素组可明显降低大鼠缺血再灌注损伤后 MMP-2 和 MMP-9 的表达($P<0.01$),降低脑组织中 EB 的含量($P<0.01$),而麝香酮组与模型组差异无统计学意义($P>0.05$);对所有组进行析因分析,表明 1 mg/kg 麝香酮和高、中、低剂量灯盏花素配伍具有叠加的交互作用($P<0.01$)。**结论** 麝香酮联合灯盏花素比单用灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障具有更好的保护作用。

[关键词] 大脑中动脉栓塞;麝香酮;MMP-2;MMP-9;血脑屏障
[中图法分类号] R285.5; R322.81; R743.31 [文献标志码] A

Protective effects of muscone combined with breviscapine on blood-brain barrier in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury

Xu Lu[1], Su Zulu[2] ([1]Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of combination of muscone and breviscapine on the expression of MMP-2 and MMP-9 and the permeability of blood-brain barrier in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** A total of 504 rats were randomly divided into sham operation group, model group, muscone group (1 mg/kg), breviscapine group (200 mg/kg) and combination groups (1 mg/kg muscone plus 400, 200 and 100 mg/kg breviscapine, respectively), 72 animals in each group. Middle cerebral artery occlusion model rats were established by suture-occluded method. After reperfusion for 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h, the levels of MMP-2 and MMP-9 in the brain tissue were evaluated by Western blotting, and the permeability of blood-brain barrier was evaluated by evaluating the contents of Evans Blue in brain tissue. **Results** Compared with model group, the expression levels of MMP-2 and MMP-9 and the content of EB in brain tissue were decreased significantly in the breviscapine group and the combination groups ($P<0.01$). But there was no significant difference in the expression levels and the content between the model group and the muscone group ($P>0.05$). Factorial analysis showed that muscone of 1 mg/kg combined with breviscapine of high, middle and low doses exerted synergetic effects ($P<0.01$). **Conclusion** Muscone combined with breviscapine shows better protective effects than breviscapine alone on the blood-brain barrier in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury.

[**Key words**] middle cerebral artery occlusion; muscone; MMP-2; MMP-9; blood-brain barrier

Supported by the Major Special Project of National Science and Technology Program (2010ZX09401-306-2-21). Corresponding author: Su Zulu, E-mail: 106334600@qq.com

[基金项目] 国家科技重大专项基金(2010ZX09401-306-2-21)
[通信作者] 苏祖禄,E-mail:106334600@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140107.2042.009.html(2014-01-07)

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury,CIRI)是指缺血的脑组织恢复血液灌注后,脑组织损伤反而加重,甚至发生不可逆性损伤的现象。近年来药理学研究表明,灯盏花素对脑缺血再灌注后的脑损伤具有显著的保护作用。然而灯盏花素不易通过血脑屏障,使得该药的利用率较低。麝香酮(muscone)为中医开窍药麝香的重要有效成分。麝香酮能通过血脑屏障(blood brain barrier,BBB),作用于BBB细胞和相关基因或蛋白,使麝香酮或同时应用的其他药进入脑中的浓度增加而发挥协同作用[1]。本实验观察麝香酮联合灯盏花素能否取得更佳的血脑屏障保护效果。

1 材料与方法

1.1 试剂

麝香酮(批号:20120125)购自广东致信中药饮片有限公司,用1%的吐温80配成0.1 mg/mL悬浊液。灯盏花素(批号:20120106)购自湖南恒生制药有限公司,给药时溶解于生理盐水中。鼠抗小鼠β-actin单克隆抗体、兔抗鼠MMP-2多克隆抗体、兔抗鼠MMP-9多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司。伊文思蓝购自FLUKa公司。

1.2 动物及分组

504只大鼠(SPF级,体质量250~300 g)按照简单随机化方法分为假手术组,模型组,麝香酮组(1 mg/kg),灯盏花素组(200 mg/kg),麝香酮(1 mg/kg)联合灯盏花素高、中、低剂量组(400、200、100 mg/kg),每组72只。各组于建模前30 min,缺血再灌注后30 min,6、12、24、48 h灌胃给药1次,共6次。假手术组和模型组给予等量的生理盐水。

1.3 动物模型的建立

参照改良的Longa等的线栓法[2]建立大鼠大脑中动脉缺血模型。用10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,仰卧固定,于下颌部1 cm颈正中处切1~2 cm的切口。分离并暴露右侧颈总动脉及颈内、颈外动脉。结扎右侧颈总动脉及颈外动脉根部,用微小动脉夹夹闭颈内动脉后,在颈总动脉近分叉处剪一小口,插入带栓子的尼龙线,插入长度(18.5±0.5)mm感到有轻微阻力时停止,扎紧并固定插线,缝合皮肤,缺血2 h后,拔线实现再灌注。假手术组不插线,剩余步骤与模型组相同。

1.4 脑组织总蛋白的提取

再灌注后3、6、12、24、48、72 h,处死大鼠,取病变侧,去除小脑和延髓,距额极2.5 mm向后切取病变侧皮层组织150 mg,液氮迅速冷冻组织块,低温下用研钵研碎组织。在玻璃匀浆器插入到碎冰中,放入脑组织,加入500 μL裂解液,迅速、充分匀浆。匀浆液于4 ℃下,12 000 r/min离心15 min。收集上清液,采用Bradford法定量蛋白后,-80 ℃保存备用。

1.5 Western blot检测MMP-2和MMP-9的表达

严格按照BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,100 ℃煮沸蛋白变性,计算得到上样体积,通过电泳,转膜,封闭,孵一、二抗体,发光得到Western blot结果。

1.6 血脑屏障通透性检测

动物在再灌注后3、6、12、24、48、72 h前30 min,经尾静脉注射伊文思蓝(evans blue,EB)2 mL/kg。30 min后在相应时间点麻醉大鼠,生理盐水进行心脏灌流,直至右心房流出液清亮,断头取脑,称量。将取出的大脑浸泡于5 mL甲酰胺中,再于45 ℃温箱中孵育72 h,浸泡液用721分光光度计在620 nm处测定其光密度值,甲酰胺做空白比色。然后根据标准曲线计算出脑内EB含量(mg/kg)。脑组织EB含量(μg/g)=待测样品EB含量(μg/mL)×甲酰胺容量(mL)/脑湿质量(g),根据标准曲线回归方程求得待测样品EB含量。

1.7 统计学方法

由Image Lab软件对Western blot图片进行处理,对条带的光密度值进行采集,结果用SPSS 18.0统计软件进行分析。各组MMP-2、MMP-9的表达水平及脑组织EB含量比较采用单因素方差分析和SNK-q检验。检验水准取$\alpha=0.05$。并用析因设计方差分析来分析麝香酮和灯盏花素配伍是否有交互作用。

2 结果

2.1 麝香酮联合灯盏花素对缺血再灌后各时间点MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响

与模型组相比,其他各组各时间点的脑组织MMP-2和MMP-9蛋白表达显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),以麝香酮和灯盏花素高剂量联用组降低最为显著;单用麝香酮组与模型组没有统计学差异($P>0.05$);麝香酮联合灯盏花素各组之间没有统计学差异($P>0.05$)。再对各组进行析因分析,表明1 mg/kg麝香酮和高、中、低剂量灯盏花素配伍后均具有叠加的交互作用($P<0.05$,$P<0.01$)。随着时间的变化,除假手术组外,各组MMP-2和MMP-9蛋白的表达呈现为先逐渐增加,在24 h达到高峰,24 h后又逐渐减少的趋势。说明在24 h血脑屏障损伤达到了高峰,24 h后血脑屏障开始自我修复,麝香酮联合灯盏花素各剂量组在各时间点MMP-2和MMP-9降低最明显,说明对血脑屏障的保护最强(图1,表1、2)。

2.2 麝香酮联合灯盏花素对缺血再灌后各时间点血脑屏障通透性的影响

与模型组脑组织EB含量相比较,麝香酮组差异无统计学意义($P>0.05$),其他各组EB含量明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),其中麝香酮联合灯盏花素各组降低水平最为显著,但各组间无统计学差异。再灌注后,EB含量呈现为先增加又减少,且在24 h达到了高峰。再对所有组进行析因分析,表明1 mg/kg麝香酮和高、中、低剂量灯盏花素配伍具有叠加的交互作用($P<0.01$,表3)。

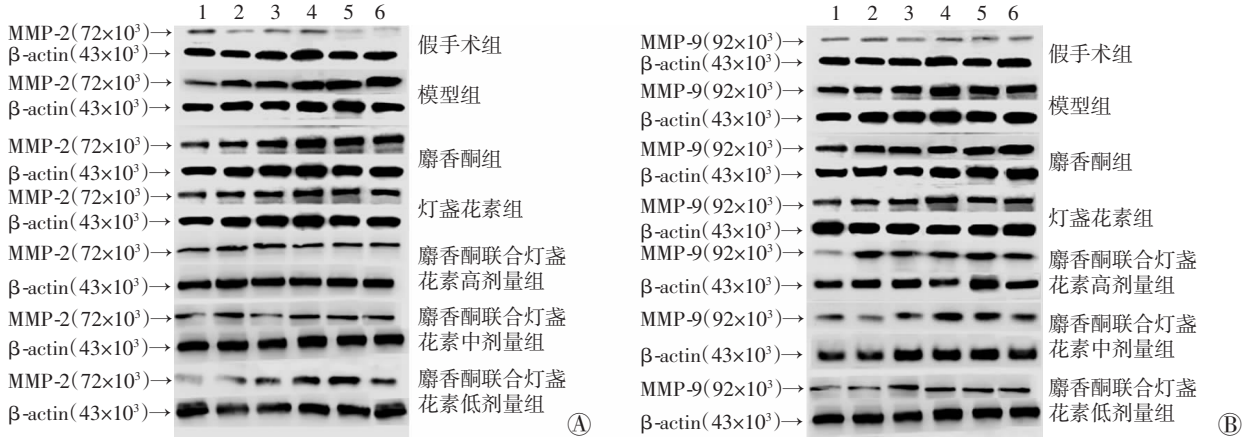


图1　Western blot检测各组大鼠缺血再灌注后不同时间脑组织中MMP-2(A)和MMP-9(B)的表达

表1　缺血再灌后不同时间各组大鼠脑组织MMP-2蛋白的相对表达（MMP-2/β-actin，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	0.12±0.02	0.14±0.05	0.17±0.02	0.13±0.01	0.17±0.05	0.16±0.03
模型组	0.26±0.04^{b}	0.37±0.10^{b}	0.46±0.09^{b}	0.63±0.10^{b}	0.52±0.11^{b}	0.41±0.10^{b}
麝香酮组	0.27±0.03^{bf}	0.34±0.11^{bf}	0.42±0.10^{bf}	0.65±0.14^{bf}	0.50±0.09^{bf}	0.44±0.12^{bf}
灯盏花素组	0.17±0.05^{d}	0.23±0.07^{bd}	0.34±0.06^{bce}	0.51±0.07^{bcf}	0.40±0.04^{bcf}	0.35±0.06^{bf}
麝香酮联合灯盏花素高剂量组	0.14±0.06^{d}	0.16±0.04^{d}	0.26±0.05^{bd}	0.32±0.05^{bd}	0.29±0.08^{ad}	0.23±0.07^{bd}
麝香酮联合灯盏花素中剂量组	0.13±0.02^{d}	0.15±0.06^{d}	0.28±0.03^{bd}	0.33±0.06^{bd}	0.27±0.05^{ad}	0.22±0.04^{bd}
麝香酮联合灯盏花素低剂量组	0.15±0.04^{d}	0.20±0.06^{bd}	0.29±0.07^{bd}	0.36±0.08^{bd}	0.30±0.07^{ad}	0.25±0.06^{bd}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与模型组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与麝香酮联合灯盏花素低剂量组比较

表2　缺血再灌后不同时间各组大鼠脑组织MMP-9蛋白的相对表达（MMP-9/β-actin，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	0.05±0.03	0.08±0.05	0.05±0.04	0.06±0.03	0.07±0.05	0.05±0.06
模型组	0.22±0.06^{bf}	0.19±0.07^{be}	0.25±0.08^{be}	0.33±0.10^{bf}	0.22±0.04^{bf}	0.20±0.03^{bf}
麝香酮组	0.17±0.03^{bf}	0.16±0.04^{be}	0.22±0.11^{be}	0.35±0.12^{bf}	0.24±0.09^{bf}	0.18±0.13^{bf}
灯盏花素组	0.09±0.05^{d}	0.12±0.04	0.14±0.03^{bc}	0.22±0.07^{bde}	0.18±0.03^{be}	0.15±0.02^{bde}
麝香酮联合灯盏花素高剂量组	0.07±0.04^{d}	0.09±0.04^{c}	0.11±0.05^{bd}	0.12±0.04^{ad}	0.11±0.05^{d}	0.06±0.03^{d}
麝香酮联合灯盏花素中剂量组	0.08±0.05^{d}	0.09±0.07^{c}	0.12±0.03^{bd}	0.13±0.06^{ad}	0.11±0.07^{ad}	0.08±0.05^{d}
麝香酮联合灯盏花素低剂量组	0.09±0.02^{ad}	0.10±0.06^{bc}	0.15±0.07^{bc}	0.16±0.06^{bd}	0.12±0.05^{ad}	0.09±0.04^{d}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与模型组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与麝香酮联合灯盏花素低剂量组比较

表3　缺血再灌后不同时间各组大鼠脑组织EB含量（μg/g，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	1.47±0.18	1.23±0.12	1.36±0.09	1.44±0.13	1.37±0.17	1.39±0.08
模型组	4.28±0.33^{a}	5.22±0.40^{a}	5.50±0.43^{a}	6.79±0.47^{a}	6.02±0.32^{a}	5.67±0.36^{a}
麝香酮组	4.16±0.30^{ac}	5.23±0.42^{ac}	5.37±0.33^{ac}	6.68±0.44^{ac}	5.87±0.36^{ac}	5.55±0.31^{ac}
灯盏花素组	3.20±0.25^{abc}	3.66±0.21^{abc}	4.14±0.24^{abc}	4.52±0.30^{abc}	4.19±0.28^{abc}	4.08±0.25^{abc}
麝香酮联合灯盏花素高剂量组	2.06±0.10^{ab}	2.84±0.16^{ab}	3.23±0.16^{ab}	3.49±0.27^{ab}	3.15±0.20^{ab}	2.77±0.13^{ab}
麝香酮联合灯盏花素中剂量组	2.15±0.17^{ab}	3.07±0.14^{ab}	3.38±0.19^{ab}	3.60±0.31^{ab}	3.22±0.21^{ab}	2.90±0.14^{ab}
麝香酮联合灯盏花素低剂量组	2.33±0.19^{ab}	3.11±0.16^{ab}	3.52±0.22^{ab}	3.87±0.35^{ab}	3.46±0.30^{ab}	3.05±0.23^{ab}

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较；c：$P<0.01$，与麝香酮联合灯盏花素低剂量组比较

3 讨论

脑缺血再灌注损伤后,血脑屏障(BBB)完整结构受到破坏,紧密连接开放,BBB通透性增加,引起脑水肿。MMPs是一类能够降解细胞外基质(ECM)的蛋白质,它们是锌离子依赖的蛋白酶,能够降解多种细胞外基质成分[3]。MMP-2和MMP-9是MMPs中十分重要的2种酶,能够直接降解紧密连接蛋白(TJ)如ZO-1、Claudin-5等,破坏血脑屏障[4]。MMP-2的表达与血管内皮细胞、组织细胞和反应性星型胶质细胞密切相关,而MMP-9的表达仅与炎症细胞相关[5]。近年来已有报道MMP-2和MMP-9与缺血性脑损伤后血脑屏障的破坏有密切的关系。研究发现,在缺血性脑损伤患者中,损伤部位脑组织有大量的MMP-2和MMP-9表达,而外周血和未受损脑组织中MMP-2和MMP-9表达与正常人无异[6]。Yang等[7]也发现在脑缺血早期使用MMPs抑制剂GM6001能够有利于神经血管的重塑。Hu等[8]也利用沉默基因的方式,抑制MMP-9的表达,发现对脑再灌注损伤有重要的治疗作用。因此,抑制MMPs的表达对脑缺血再灌注损伤有一定的治疗作用。

麝香酮是麝香的主要成分,具有芳香开窍、通经活络的作用,因此中医上认为麝香酮能够"芳香走窜,引药上行",能快速透过血脑屏障并且能促进药物透过血脑屏障。现代药理研究表明,大鼠灌胃麝香酮后,能很快透过血脑屏障并迅速进入脑组织。小鼠灌胃麝香酮后,5 min即可透过血脑屏障,30 min达峰值[9];小鼠尾静脉注射麝香酮后2 min,麝香酮即可透过血脑屏障[10]。灯盏花素是临床上常用的活血化瘀药物,已有大量研究证明灯盏花素对缺血性脑病有一定的治疗作用。但也有研究证实灯盏花素较难透过血脑屏障,极大影响其在脑部的药物浓度和治疗效果[11]。

本实验采用麝香酮和灯盏花素联用后对缺血再灌注损伤的防治作用进行初步研究,由于灯盏花素都是灌胃给药,吸收较慢,所以本实验在造模前给药1次,使得大鼠体内有一定的血药浓度,在建模后能更快表现出差异。本研究显示,缺血再灌注后3、6、12、24、48、72 h,随着MMP-2和MMP-9表达变化,脑组织EB含量也发生相应变化,说明MMP-2和MMP-9与血脑屏障的通透性密切相关。在再灌注后24 h,MMP-2和MMP-9表达最高且血脑屏障通透性最强,说明是脑损伤最为严重的时期,这与之前的研究吻合。麝香酮单独作用于脑缺血再灌注损伤的结果与模型组均无统计学差异,说明麝香酮可能对脑缺血再灌注损伤没有保护作用。而麝香酮联合3种剂量的灯盏花素治疗后,能够降低脑缺血再灌注大鼠脑部MMP-2和MMP-9的表达,降低EB在脑组织中的含量,且比单用灯盏花素治疗更为显著,说明两者具有协同作用。但麝香酮联合高、中、低剂量的灯盏花素3组之间无统计学差异,说明没有量效关系,究其原因可能与灯盏花素作用的受体饱和有关,值得进一步的研究探讨。总的来说,麝香酮与灯盏花素配伍使用后,对血脑屏障具有比单用灯盏花素更好的保护作用。究其机制,可能与麝香酮促进灯盏花素进入血脑屏障,增加其有效药物浓度有关,从而抑制MMP-2和MMP-9的表达,保护血脑屏障,减轻神经损伤。

参考文献:

[1] 邹亮, 林俊芝, 王战国, 等. 麝香酮在大鼠肠灌注液中GC-MS/MS测定方法及其大鼠肠吸收动力学特征[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16): 2456-2460.

[2] 李艳红, 孙晓萍, 欧丽娟, 等. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型制作方法的改进及评价[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(5): 597-601.

[3] Stein V M, Puff C, Genini S, *et al*. Variations on brain microglial gene expression of MMPs, RECK, and TIMPs in inflammatory and non-inflammatory diseases in dogs[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 144(1/2): 17-26.

[4] Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P, *et al*. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke[J]. Brain Pathol, 2012, 22(2): 133-141.

[5] Alam M, Shuaib A. Complexity in differentiating the expression of truncated or matured forms of MMP-2 and MMP-9 through zymography in rat brain tissues after acute ischaemic stroke[J]. J Neurosci Methods, 2013, 216(1): 22-27.

[6] 焦海霞, 王萍, 马腾, 等. 缺血再灌注损伤大鼠脑组织MMP-2、MMP-9动态变化与脑水肿改变[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(11): 1193-1197.

[7] Yang Y, Thompson J F, Taheri S, *et al*. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(7): 1104-1114.

[8] Hu Q, Chen C, Yan J, *et al*. Therapeutic application of gene silencing MMP-9 in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model[J]. Exp Neurol, 2009, 216(1): 35-46.

[9] 沈强, 刘亚敏. 麝香在神经系统疾病中的临床运用及其药理作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(4): 217-219.

[10] 沈强, 刘亚敏, 张赐安. 麝香、冰片对全脑缺血再灌注大鼠脑微血管内皮细胞ICAM-1表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(3): 136-138.

[11] 盛艳梅. 基于"钙信号通路-血脑屏障"偶联的中药脑神经保护有效组分筛选方法研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.

(**收稿**:2013-11-21;**修回**:2013-12-16)

(编辑 张 维)