维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2002年第11卷第3期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2002, Vol. 11, No. 3

Lubeluzole对大鼠脑缺血再灌流时神经元的保护作用

吴树亮* 金连弘* 孟祥和** 姜 哲*** 郑 沿*

【摘 要】 **目的** 为了观察lubeluzole对大鼠脑缺血再灌流时神经元的保护作用。**方法** 本实验采用阻塞SD大鼠大脑中动脉2h，再灌流1、3、6、12、24、48h制成局灶性脑缺血动物模型，用免疫组化方法观察给药前后神经生长因子、脑源性神经营养因子在神经元的表达特点。**结果** 神经生长因子、脑源性神经营养因子在脑组织的分布相似。正常组和假手术组的皮质、丘脑等处的神经元为阴性；缺血模型组的缺血区皮质、丘脑的神经元为阴性或弱阳性，阳性神经元主要位于非大脑中动脉供血区和缺血周边区；治疗组缺血区的皮质、丘脑等处的神经元为弱阳性至中等阳性，缺血周边区为强阳性。**结论** 在缺血后6h内使用lubeluzole能降低神经元受损伤的程度，促进神经元的生长。

【关键词】 lubeluzole；神经元；缺血再灌流；神经生长因子；脑源性神经营养因子；大鼠

Protective effect of lubeluzole on neuron after ischemia-reprefusion in rat brain *Wu Shuliang, Jin Lianhong, Meng Xianghe, et al. Department of Neurobiology, Harbin Medical University, Harbin 150086*

【**Abstract**】 **Objective** To observe the protective effect of lubeluzole in rat after ischemia-reperfusion. **Methods** The animal model of focal cerebral ischemia-reperfusion was established by occluding middle cerebral artery (MCA) of SD rat for 2 hours and reperfusion 1 ~ 48 h. Immunohistochemical method was used to observe the expression of NGF and BDNF in neuron in different time. **Results** The expression of NGF and BDNF was similar. In normal group and sham operated group NGF and BDNF were negative in neurons of cortex, thalamus et al. In ischemia model group, neurons in region of ischemic of cortex, thalamus were stained from negative to weakly positive. The positive neurons were chiefly located in non-MCA supplied areas and peri-ischemic regions. In therapeutic group, neurons in region of ischemia of cortex, thalamus et al were stained from weakly positive to moderately positive. The peri-ischemic regions were strongly positive. **Conclusion** Lubeluzole administrated within 6 h after ischemia may protect neuron from impairment and promote the growth of neuron.

【**Key words**】 Lubeluzole; Neuron; Ischmia-reprefusion; NGF; BDNF; Rat

缺血引起的神经细胞损伤是临床上最常见的类型，脑缺血后可诱导许多神经保护因子的表达，产生的神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)等对神经元具有保护和营养作用。如何保护神经细胞免受缺血的损伤是治疗神经疾病的一个重要方面[1]。Lubeluzole为化学合成的苯噻唑衍生物，可供静脉使用，化学结构式为(S)-4-(2-苯噻唑甲氧基)-a-[(3、4-二氟-苯氧基)-甲基]-1-六氢吡啶乙醇，是一种新型神经保护剂。但lubeluzole是否对脑缺血再灌流时引起神经元的损伤具有保护作用尚未见详细报道。故本文通过观察给药前后NGF、BDNF的表达特点，从而了解lubeluzole对脑缺血再灌流时神经元的保护作用，为lubeluzole的临床应用提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物及分组：雄性SD大鼠46只，体重180 ~ 240 g，随机分为10组，正常组和假手术组各5只，缺血2h分别再灌流1、3、6、12、24、48 h组各4只，缺血再灌流1 h、3 h治疗组各6只。

二、脑缺血动物模型的制作和组织处理：用插线法制备脑缺血再灌流动物模型[2]。治疗组Lubeluzole用量每只为1 mg/d静脉注射。在1%戊巴比妥钠麻醉下，经心脏依次灌流下列溶液：(1)PBS150 ml。(2)4%多聚甲醛300 ml。取出大脑，在前囟及前囟后5.5 mm处将脑沿冠状方向切成4部分，用4%的多聚甲醛固定24 h(4℃)，常规石蜡包埋并切片，片厚5 μm。

三、免疫组织化学反应：先将切片经0.01 mol/L PBS漂洗5 min × 3次后，浸入80%甲醛和0.3%过氧化氢封闭30 min，0.01 mol/L PBS漂洗10 min × 3次，再用1%牛血清白蛋白、3%羊血清和0.3% Triton X-100封闭1 h。同前漂洗之后，常规ABC方法进行免疫组织化学反应。NGF和BDNF均为多克隆抗体(1:

* 作者单位：150086 哈尔滨医科大学神经生物学教研室
** 哈尔滨轴承厂医院
*** 哈尔滨医科大学

维普资讯 http://www.cqvip.com

1000 Santa Cruz 公司); ABC 复合物稀释浓度为 1:500 (Sigma 公司)。最后根据显色的强弱,将免疫组织化学染色的结果分为四级:—为阴性,+为弱阳性,++为中等阳性,+++为强阳性。

结　果

一、正常组皮质、纹状体、丘脑、嗅结节、齿状回等处的神经元呈神经生长因子、脑源性神经营养因子免疫反应阴性(—)。

二、假手术组皮质、纹状体、丘脑、齿状回、嗅结节等处神经元的 NGF、BDNF 表达与正常组基本相同。

三、缺血 2 h 再灌流 1h 模型组,大脑中动脉(MCA)供血区皮质、纹状体、丘脑板内核团、视前内侧区、E-W 核、前庭内侧核、海马锥体层等处都有 NGF、BDNF 表达弱阳性(+)的神经元。

四、缺血 2 h 再灌流 3 ~ 12 h 模型组,缺血区皮质的神经元呈阴性至弱阳性(— ~ +),缺血周边区皮质呈中等阳性至强阳性(++ ~ +++),下丘、视交叉上核、脑桥核、海马锥体层等处的神经元呈强阳性(+++),见图 1,2。

五、缺血 2 h 再灌流 24 ~ 48 h 模型组,缺血区皮质的神经元呈弱阳性(+),缺血周边区皮质神经元呈强阳性(+++)。

六、缺血 2 h 再灌流 1 h 治疗组,缺血区皮质的神经元呈弱阳性至中等阳性(+ ~ ++),缺血周边区皮质神经元呈强阳性(+++),下丘、视交叉上核、脑桥核、海马锥体层等处有许多神经元呈强阳性(+++)。

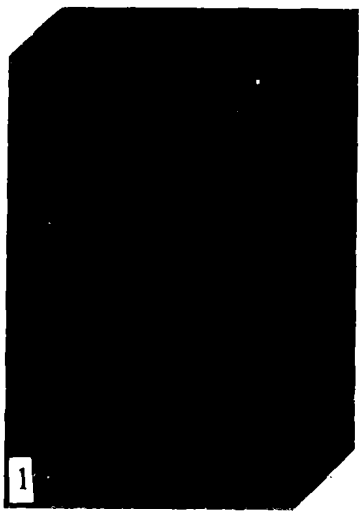


图 1　模型组,灌流 3 h 后大脑皮质神经生长因子呈中等阳性　×500

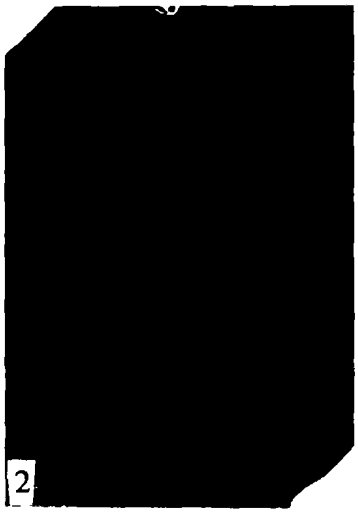


图 2　模型组,灌流 6 h 后海马区神经元脑源性神经营养因子呈强阳性　×500

七、缺血 2 h 再灌流 3 h 治疗组,缺血区皮质的神经元呈弱阳性至中等阳性(+ ~ ++),缺血周边区皮质神经元呈强阳性(+++),下丘、齿状回、视交叉上核、脑桥核、嗅内皮质等处的神经元呈强阳性(+++),见图 3。

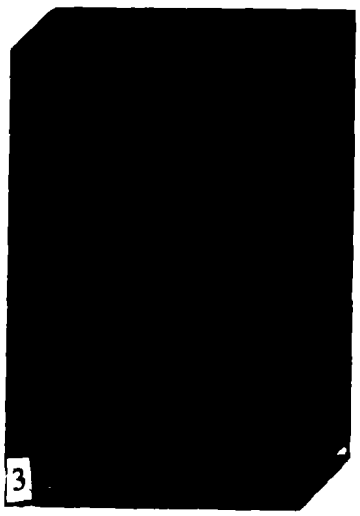


图 3　3 h 治疗组,海马梗塞区周围神经元脑源性神经营养因子呈强阳性　×500

讨　论

神经营养因子包括许多种,如神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等。脑缺血再灌流时可诱导许多神经营养因子的表

维普资讯 http://www.cqvip.com

达。Kokaia[3]利用阻塞大鼠一侧大脑中动脉(MCA)的动物模型,采用原位杂交方法检测缺血后 BDNF 基因表达变化,发现阻塞 MCA15 min 可诱导 BDNFmRNA 在阻塞侧缺血外周区的扣带回表达增加。阻塞 MCA 2 h,BDNFmRNA 的表达在缺血周边区明显增加。阻塞 MCA 2 h 还能诱导 NGF 在不同脑区表达的增加。Lindvall[4]在大鼠一过性缺血再灌流模型上发现:2 min 缺血再灌注 2 h,齿状回区 BDNFmRNA 表达增加,24 h 达高峰。Comelli、Takeda 和 Hus 等在他们各自的实验中也发现 BDNFmRNA 在缺血后的不同时间、不同区域表达增加。Lee[5]等的实验表明,缺血区皮质、纹状体、齿状回等的神经元 NGF 呈阴性,缺血周边区及非大脑中动脉供血区神经元 NGF 有不同程度的表达。本实验观察到正常组大鼠无 NGF、BDNF 的表达,缺血再灌流 1 h 模型组 NGF、BDNF 开始表达,随着灌流时间的延长,二者的表达逐渐增加,与文献报道一致。再灌流 1 h 治疗组缺血区皮质的神经元呈弱阳性至中等阳性(+ ~ + +),缺血周边区的神经元呈强阳性(+ + +),与模型组相比,NGF、BDNF 的表达明显增加。

目前对脑缺血再灌流导致的神经元损伤的分子机制还不十分清楚,但兴奋性氨酸的细胞毒性、自由基损伤、钙超载假说、程序性细胞死亡(PCD)[6]等正在被人们普遍接受。研究表明,谷氨酸受体可通过激活细胞膜配体门控性和电压门控性离子通道,促进 Ca^{2+} 内流,细胞内钙的增加可诱导钙依赖性酶,如蛋白酶、磷脂酶、氧化酶、蛋白激酶、ATP 酶等的激活及自由基的形成增加,最后导致神经元的损伤。BDNF 能使体外培养的神经元内清除自由基的酶的含量明显增加,使自由基减少,从而减轻自由基对神经元的损伤[7]。Kaddis、Hayes 和我国学者刘志敏、李军等也证明内源性或外源性给予 NGF、BDNF 对神经元具有保护作用。Albeck、Menei、Holtzman 等使用不同的方法外源性给予 NGF 或刺激内源性 NGF 的表达,结果证明 NGF 对神经元也具有明显的保护作用。Lubeluzole 作为一种新型神经保护剂,它不仅能阻断谷氨酸诱导 NO 活性的通路和钙离子通道[8],而且有加强神经营养因子表达的作用。Semkova[9]等证明 Lubeluzole 可刺激内源性 NGF、BDNF 的合成,从而提高神经元的存活率,改善预后。缺血再灌流 3 h 治疗组与模型组相比,NGF、BDNF 亦有明显的增加,但与缺血再灌流 1 h 组相比无明显差别。这一方面说明随着时间的延长,NGF、BDNF 的表达逐渐增加,另一方面说明在脑缺血 2 h 再灌流 3 h 内使用 Lubeluzole 能明显阻止神经元的损伤。

综上所述,Lubeluzole 是一种新型神经保护剂,Lubeluzole 可通过清除自由基、阻断钙离子通道、增加 NGF、BDNF 的表达,实现保护神经元抵御损伤的作用,说明 Lubeluzole 是一种有着较好发展前景的新型神经保护剂。

参 考 文 献

1. Lindsberg PJ, Roine RO, Tatisumak T, et al. The future of stroke treatment. Neural Clin, 2000,18 (2) :495 - 510.
2. 袁琼兰,李瑞祥,羊惠君,等. 改良的短暂局灶性大鼠脑缺血模型. 四川解剖学杂志,1998,6 :65 - 67.
3. Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, et al . Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. Experimental neurology, 1995,136(1) :73 - 88.
4. Lindvall O , Ernfors P, Bengzon J, et al . Differential regulation of mRNA for nerve growth factor , brain-derived neurotrophic factor , and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma . Proc Natl Acad Sci USA,1992, 89 (2) : 648 - 652.
5. Lee TH, Kato H, kogure K, et al . Temporal profile of nerve growth factor-like immunoreactivity after transient focal cerebral ischemia in rats. Brain Res ,1996 ,713 (3) :199 - 210.
6. Demerle-pallardy C , Gillard-Roubert V , Marin JG , et al . In vitro antioxidant neuroprotective activity of BN 80933 , a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation . J Neurochem .2000 ,74 (5) :2079 - 2086.
7. Lin L-FH, Doherty DH, Lile JD, et al. BDNF: A Glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science, 1993 ,260 (21): 2306 - 2317.
8. McGahan L, Hakim AM, Robertson GS, et al. Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia. Brain Res Mol Brain Res, 1998 ,56 (1 - 2) :133 - 145.
9. Semkova I, Krieglstein J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors . Brain Res Rev ,1999, 30 (2) : 176 - 188.

(收稿日期:2002-04-08)