基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0048-04

早期抗炎治疗对脑缺血/再灌注大鼠BDNF表达的影响

张小东,万 东,杨 琴,吕发金,牟 君,赵立波,李亚军,谢 鹏

(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)

【摘 要】目的:探讨脑缺血/再灌注损伤后早期抗炎治疗对脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor,BDNF)表达的影响。方法:雄性SD大鼠116只随机分成5组,即假手术组(SC组)、单纯缺血/再灌注组(I/R组)、缺血/再灌注秋水仙碱干预组(Col组)、缺血/再灌注秋水仙碱和环磷酰胺联合干预组(CC组)以及缺血/再灌注维生素C干预组(VitC组)。采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血/再灌注(MCAO)模型。造模成功后6h开始用药,每天给药1次,连续10d。检测BDNF在海马及梗死灶周边的表达情况。结果:I/R组大鼠海马及梗死灶周边BDNF阳性细胞较SC组和CC组明显增加($P<0.05$);VitC组和Col组与I/R组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:脑缺血/再灌注诱导了海马及梗死灶周边BDNF表达增强,秋水仙碱与环磷酰胺早期联合抗炎治疗明显地抑制了这种诱导作用,而单独的VitC和秋水仙碱对BDNF表达则没有影响。

【关键词】抗炎治疗;脑源性神经营养因子;缺血/再灌注

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

The effects of early anti-inflammatory therapy on the expression of bdnf in adult rats after reperfusion in focal cerebral ischemia

ZHANG Xiao-dong,et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of early anti-inflammatory therapy on the expression of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) in adult rats after reperfusion in focal cerebral ischemia. *Methods*: 116 male adult SD rats of middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO) made by intraluminal thread approach were randomly divided into 5 groups: 1) sham operation control group (SC group), 2)ischemia/reperfusion (I/R group), 3) cyclophosphamide and colchicin group (CC group), 4) colchicin group (Col group), 5)ascorbic acid group (VitC group). Medication was applied after 6 hours of operation, later once per day and last ten days.Then we detected the information of the expression of BDNF in hippocampus and peripheral focal cerebral ischemia. *Results*: The differences of BDNF positive cells counting in hippocampus and peripheral focal cerebral ischemia were not significant between the I/R group, Col group and VitC group ($P>0.05$),while compared with I/R group, the decrease of positive cells counting in the CC group was significance ($P<0.05$). *Conclusion*: Ischemia plus reperfusion can induced the expression of BDNF in hippocampus and peripheral focal cerebral ischemia;The anti-inflammatory therapy of combination of cyclophosphamide and colchicin notably inhibited the expression of BDNF. While VitC or colchicin had no effection on the expression of BDNF.

【Key words】Anti-inflammatory therapy;Brain-derived neurotrophic factor;Ischemia/reperfusion

缺血性卒中是一种高发病率、高致残率和高死亡率的常见病和多发病。神经保护在缺血性卒中的治疗模式中充当了重要角色,减轻缺血后炎性损伤成为脑保护的重要措施。目前有关脑缺血后炎症反应的研究多着眼于脑缺血后急性期,抗炎治疗的研究亦重在观察其脑保护作用,而罕有报道有关抗炎治疗对内源性神经保护因子表达的影响。因此,本研究通过建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型MCAO模型,观察早期抗炎治疗对BDNF表达的影响,

作者介绍:张小东(1972-),男,讲师,博士,
研究方向:脑血管疾病。
通讯作者:谢 鹏,男,教授,E-mail:pengxie58@gmail.com。

并选用常用的抗氧化剂VitC作为阳性对照。

1 材料和方法

1.1 动物分组

116只SD大鼠利用随机数字表随机分为5组，即假手术组(SC组)、缺血/再灌注组(I/R组)、缺血/再灌注加秋水仙碱组(Col组)、缺血/再灌注加秋水仙碱和环磷酰胺联合干预组(CC组)、缺血/再灌注加维生素C组(VitC组)。各组(假手术组除外)分别在术后0.5d、1d、3d、7d、10d、14d、21d时处死大鼠，每个时间点4只大鼠，各组28只；假手术组4只。

1.2 药品与试剂

秋水仙碱购自云南植物药业，环磷酰胺购自上海华联制药，维生素C注射液购自西南药业，兔抗大鼠BDNF多克隆抗体、SABC免疫组化试剂盒及DAB显色剂均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 模型制备

根据Longa及罗勇[1,2]报道的方法，线栓法制备右侧MCAO模型，缺血2h实现再灌注。模型参照Zea Longa5分制评分标准，评分大于或等于2分者纳入实验。

1.4 药物干预

CC组：用生理盐水1ml溶解环磷酰胺(15mg/kg·d)后腹腔注射，同时用生理盐水1ml溶解秋水仙碱(100μg/kg·d)后灌胃；Col组：用生理盐水1ml溶解秋水仙碱(100μg/kg·d)后灌胃；VitC组：用生理盐水1ml稀释VitC(50mg/kg·d)后腹腔注射；缺血再灌注组：腹腔注射等量生理盐水。缺血再灌注(I/R)后6h开始给药，每天1次，连续10d。

1.5 实验取材

到达观察时相点，用3.5%水合氯醛麻醉动物，予4%多聚甲醛缓冲液心脏灌注至流出液清亮，断头取脑，放入4%多聚甲醛缓冲固定液固定40min。梯度酒精脱水、浸蜡，石蜡包埋，切片(片厚6μm)。取材部位：在对耳线3.5~7mm取海马，在对耳线7~10.5mm取梗死灶周边组织(见图4)。

1.6 指标检测

检测BDNF的表达：切片常规脱蜡至水；3%过氧化氢室温下孵育15min，0.01mol/L PBS冲洗5min×3次；将切片浸入0.01mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)，电炉加热至沸腾后断电，间隔5~10min，反复1、2次。冷却后PBS(pH7.2~7.6)洗涤1、2次；5%BSA封闭液室温下孵育50min；兔抗大鼠BDNF(1:150)4℃过夜，复温40min，0.01mol/L PBS冲洗5min×3次；生物素化山羊抗兔IgG25℃孵育2h，0.01mol/L PBS冲洗5min×3次；SABC室温下孵育2h，0.01mol/LPBS冲洗5min×3次；DAB显色5~10min，显微镜下观察终止显色；苏木素轻度复染，二甲苯透明，封片。

1.7 半定量分析

每只动物每个部位各选取切片1张，海马选择齿状回呈"<"处的切片进行观察(包括齿状回，CA1、2、3区)，梗死灶周边选对耳线8处的切片进行观察(离坏死区约半个高倍视野，见图4)，切片统一放大10×40倍，选择5个视野，Olympus BX14型生物医学图像分析系统进行分析，以胞浆内出现明显棕黄色颗粒者为阳性。对每个视野的阳性细胞进行计数，计算每只鼠所要分析部位的平均阳性细胞数，再在同一组之间取平均值(见表1、2)。

1.8 统计学分析

各组数据用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用SAS9.0统计分析软件(序列号834961)进行方差分析，检验水准$\alpha=0.05$，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

脑缺血/再灌注后，海马和缺血周围区BDNF表达增强，齿状回阳性细胞为圆形，海马CA1、2、3区阳性细胞多为多角形，梗死灶周边阳性细胞为多角形，细胞较大，突起很长，表达高峰期均在7d，与SC组比较，差异有统计学意义。CC组与单纯脑缺血/再灌注组比较，阳性细胞数明显减少，差异有统计学意义；Col组或VitC组较SC组表达明显增加，但与单纯脑缺血/再灌注组比较，差异无统计学意义(见图1~8和表1、2)。

3 讨 论

研究发现，BDNF能够减少神经细胞的凋亡，减低谷氨酸受体介导的兴奋性毒性损伤，抑制各种毒素、缺血、自由基等造成的神经元损伤，保护缺血缺氧的神经元，参与钙稳定[3]；并具有很强的刺激和促进神经细胞生长分化的作用，从而维持神经细胞存活和正常功能、促进损伤细胞的修复[4]。它尤其对运动神经元有突出的生物学效应，在运动神经元的发育、成年后运动神经元的存活以及病变运动神经元的存活和轴突再生中都起着十分重要的作用[5,6]。

脑缺血一方面使缺血中心区细胞坏死，出现相应的神经功能缺损；另一方面，缺血坏死所产生的物质又刺激了一系列内源性神经保护因子表达的上调，分泌增加，最终诱导了诸如BDNF等神经生长因子的表达，启动了机体的自身保护和修复机制[7]。研究发现大鼠脑缺血缺氧性损伤后，在一些未受损的细胞中BDNF水平显著上升[8]。临床研究也证实，缺氧缺血性脑损伤患儿脑脊液内BDNF水平显著升高[9]。我们的结果与之一致。虽然刘凌等[10]报道，环磷酰胺和秋水仙碱治疗急性脑梗塞可以减轻脑水肿，

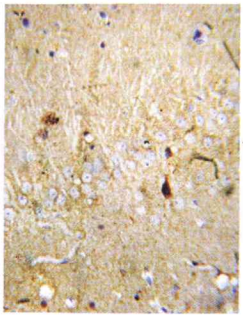


图 1　CC 组 7d 海马 BDNF 阳性表达(400×)

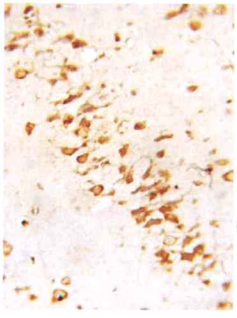


图 2　I/R 组 7d 海马 CA3 区 BDNF 阳性表达(400×)

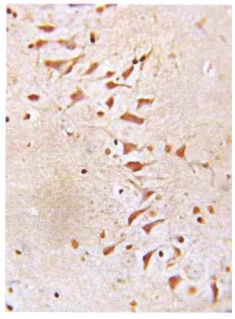


图 3　VitC 组 7d CA3 区 BDNF 阳性表达(400×)

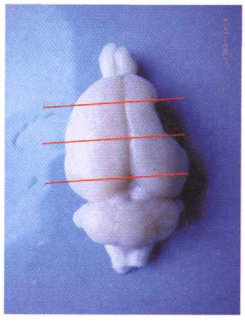


图 4　取材部位示意图

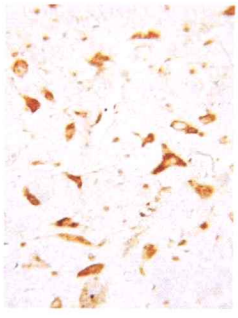


图 5　I/R 组 7d PER 区 BDNF 阳性表达(400×)

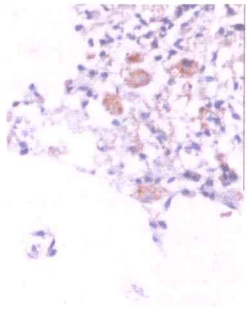


图 6　I/R 组 7d 后梗死灶内的 BDNF 阳性表达(400×)

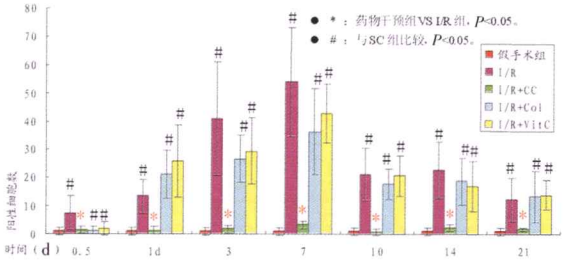


图 7　I/R 后不同时间点 HJ 处 BDNF 阳性细胞数的变化

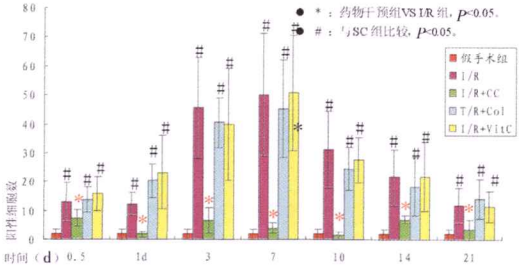


图 8　I/R 后不同时间点 PER 处 BDNF 阳性细胞数的变化

表 1　脑梗死后不同时间点海马 BDNF 阳性细胞数的变化($\bar{x} \pm s$)

时间	SC 组	I/R	I/R+Col+Cyc	I/R+Col	I/R+VitC
12h	1.0 ± 1.4	7.5 ± 6.0	1.5 ± 1.3	1.3 ± 1.3	2 ± 2.2
1d	1.0 ± 1.4	13.5 ± 6.0	1.3 ± 1.3	21.3 ± 8.4	25.8 ± 12.8
3d	1.0 ± 1.4	40.8 ± 20.1	1.8 ± 1.3	26.8 ± 8.2	29.5 ± 11.7
7d	1.0 ± 1.4	54 ± 19.3	3.3 ± 1.3	36.5 ± 15.4	43 ± 10.4
10d	1.0 ± 1.4	21.3 ± 9.2	0.8 ± 1.0	17.8 ± 5.5	20.8 ± 7.1
14d	1.0 ± 1.4	22.8 ± 10.2	2.3 ± 1.0	18.8 ± 8.4	17 ± 8.8
21d	1.0 ± 1.4	12.3 ± 7.8	1.8 ± 0.5	13.5 ± 9.1	14 ± 5.2

表 2 脑梗死后不同时间点梗死灶周边的 BDNF 阳性细胞数的变化($\bar{x} \pm s$)

时间	SC 组	I/R	I/R+Col+Cyc	I/R+Col	I/R+VitC
12h	1.8 ± 1.8	12.8 ± 6.9	7.3 ± 2.8	13.8 ± 4.3	15.8 ± 6.0
1d	1.8 ± 1.8	12.3 ± 4.0	1.8 ± 1.0	20.3 ± 5.9	23.3 ± 12.8
3d	1.8 ± 1.8	45.5 ± 17.6	6.5 ± 4.4	40.5 ± 8.5	39.8 ± 19.2
7d	1.8 ± 1.8	50.0 ± 21.3	3.8 ± 1.7	45.3 ± 16.9	50.8 ± 19.9
10d	1.8 ± 1.8	31.0 ± 13.2	1.5 ± 1.3	24.3 ± 7.4	27.5 ± 7.9
14d	1.8 ± 1.8	21.5 ± 9.7	7.0 ± 1.4	18.3 ± 10.0	21.8 ± 11.9
21d	1.8 ± 1.8	11.8 ± 6.0	3.25 ± 3.4	14.0 ± 6.8	11.3 ± 5.4

显著的改善患者的神经功能缺损和预后，同时对缺血神经细胞有保护作用，但本研究发现环磷酰胺和秋水仙碱对BDNF的表达却有抑制作用。原因可能是抗炎剂在减少一些炎性因子生成的同时，也减少了BDNF的表达。另有报道秋水仙碱有神经保护作用[11,12]，单用秋水仙碱也能缩小脑梗死体积，减轻神经功能缺损，改善急性脑梗死患者的预后[13]，但本试验中发现秋水仙碱对BDNF的表达同样无促进作用。VitC虽然对发育中的脑组织[14]和体外培养的神经细胞的生长有促进作用[15]，虽然能够减少自由基，具有抗氧化损伤的作用，但本研究却发现它对BDNF的表达也无促进作用。因此推测抗炎药物和VitC可能不能够促进损伤后的自身保护。鉴于缺血时既有细胞的死亡，也随之伴随有细胞的保护和新生，因此在脑缺血的治疗中，可能既要考虑减轻病理损伤，也要兼顾治疗药物尽量不要损害有益的保护和修复反应，有必要在有害反应与有益反应之间寻找一个平衡点，或者说两者均要兼顾，尽量促进机体自身的保护和修复作用。

参 考 文 献

[1] Longa EZ,Weinstein PR,Carlson S,et al.Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989;20(1):84-91.

[2] 罗 勇，董为伟.Wistar大鼠插线法局灶脑缺血/再灌注模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报，2002;27(1):1-4.

[3] Moechetti I,Wrathall JR.Neurotrophic factors in central nervous system trauma[J]. J Neurotrauma,1995;12(5): 853-870.

[4] Cheng Y,Cidday JM,Yan Q,el al.Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Ann Neurol,1997;41(4):521-529.

[5] 陈英辉，王根发，陈兴华.脑源性神经营养因子抗体对大脑中动脉阻塞大鼠缺血损伤的影响[J]. 中国临床康复，2003;7:135-136.

[6] 孙鹏飞，杜富会，周怀琪，等.脑源性神经生长因子与脑缺血性损伤[J]. 中国临床康复，2003;7(22):3112-3114.

[7] Walton M,Connor B,Lawlor P,et al.Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage[J]. Brain Res Rev,1999;29(2):137-168.

[8] Walton M,Connor B,Lawlor P,et al.Neuronal death and survival in two models of hypoxic ischemic brain damage[J]. Brain Res Rev,1999;29(2-3):137-168.

[9] Korhonen L,Riikonen R,Nawa H,et al.Brain derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia[J]. Neurosci Lett,1998;240(3):151-154.

[10] 刘 凌，罗祖明，何 俐，等.环磷酰胺和秋水仙碱联合应用治疗急性脑梗塞患者的多中心随机对照试验[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2002;4:108.

[11] Kimura M,Saji M.Protective effect of a low dose of colchicine on the delayed cell death of hippocampal CA1 neurons following transient forebrain ischemia[J]. Brain Res,1997;774(1-2):229-233.

[12] Pratt J,Roux M,Henneguelle E,et al.Neuroprotective effects of colchicine in the gerbil model of cerebral ischaemia[J]. Neurosci Lett,1994;169(1-2): 114-118.

[13] 马建芳，曾爱萍，张 宁，等.秋水仙碱对急性脑梗死预后的影响[J]. 中国基层医药，2005;12(3):334-335.

[14] Lee JY,Chang MY,Park CH,et al.Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes[J]. J Neurosci Res,2003;73(2):156-165.

[15] Yan J,Studer L,McKay RD.Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors[J]. Journal of Neurochemistry,2001;76(1):307-311.