维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0578-03

西维来司钠对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

杨佳丹[1],董 志[1],欧阳净[2]

(1.重庆医科大学药理教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学药剂教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究西维来司钠对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其作用机制。方法:体外培养大鼠神经元,以缺氧加缺糖培养建立神经元"缺血"性损伤模型,观察西维来司钠对培养神经元"缺血"性损伤的保护作用。结果:西维来司钠(10^{-8},10^{-7} 及 10^{-6}mol/L)能明显增高模型细胞的活性;能显著降低模型细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出率;明显降低裂解液中 MDA 含量,提高 SOD 活性。结论:西维来司钠对大鼠脑神经元"缺血"损伤具有保护作用,其机制可能与其抗过氧化作用有关。

【关键词】脑缺血再灌注损伤;西维来司钠;神经元;细胞培养

【中国图书分类法分类号】R743.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-16

Protective effect of sivelestat sodium on ischemia reperfusion brain injury in rats

YANG Jiadan, et al

(*Department of Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the protective effect of sivelestat sodium on cerebral ischemia reperfusion in rats and its mechanism. *Methods*: The neurons of neonate rat were cultured in vitro. The protective effects of sivelestat sodium on ischemia injury were observed by treating cells in glucose-free and oxygen-free medium. *Results*: Sivelestat sodium (10^{-8}、10^{-7} and 10^{-6}mol/L) increased the activity of neurons, reduced the leakage rate of LDH, increased the activity of SOD and reduced the content of MDA. *Conclusion*: sivelestat sodium protects the neurons against ischemia injury by suppressing the generation of lipid peroxide.

【Key words】Cerebral ischemia reperfusion damage; Sivelestat sodium; Neuron; Cell culture

急性缺血性脑损伤是非常复杂的病理生理过程,主要有缺血后能量代谢障碍、兴奋毒性作用、Ca^{2+}超载、氧自由基损伤和炎性因子等的相互影响,所以通过拮抗兴奋性氨基酸(EAA)毒性、抗炎、清除氧自由基和抑制脂质过氧化等措施都可以减轻脑损伤[1]。西维来司钠(Sivelestat sodium,SS)具有广泛药理活性,如抑制中性粒细胞释放弹性蛋白酶(Neutrophile lastase, NE)、减轻中性粒细胞募集、保护血管内皮细胞、改善能量代谢以及抗脂质过氧化等。但迄今为止对 SS 的研究大多为整体动物试验,从细胞水平研究的报道较少,SS 能缓解脑缺血再灌注损伤,其作用机制主要是通过抑制 NE[2,3]。而对无 NE 存在的体外培养的神经元建立缺血再灌注损伤模型,SS 是否具有直接保护作用,尚无文献报道。因此,本实验从细胞培养方法入手,观察模拟缺血及预先给予 SS 时神经元形态和生化变化,探讨 SS 对缺血再灌注神经元的直接保护作用及其机制。

作者介绍:杨佳丹(1982-),女,硕士生,主要研究方向:神经药理。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572074)。

1 材料与方法

1.1 材料

当天出生的 Wistar 大鼠,由重庆医科大学实验动物部提供。SS 购自重庆医药工业研究院有限责任公司。B27 培养基和血清为 Gibco 公司产品。3-[4,5- 二甲基磺胺噻唑]-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) 购自 Sigma 公司,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、SOD 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。其他均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 神经元原代培养[4] 无菌条件下分离出生 24h 内 Wistar 大鼠大脑皮层,迅速放入 4℃ D-hank's 液中,剔除软脑膜和血管,将分离出的皮层组织置于盛有 D-hank's 液的平皿内,用眼科剪剪成细胞悬液,100 目尼龙筛过滤。滤液以终浓度为 0.125% 胰酶 37℃消化 30min,用含 10% 胎牛血清和 10% 马血清的 DMEM (全培养液) 终止消化,800r/min 离心

维普资讯 http://www.cqvip.com

8min。吸弃上清液,加入全培养液吹打分散细胞,将细胞悬液经 200 目金属网过滤,调整细胞数至 1.0×10^9 cell/L。将制备好的神经细胞悬液接种到 0.01%多聚赖氨酸处理过的培养板中,置 37℃,5%CO_2 培养箱中培养。24h 后吸出全培养液,换成单纯的 B27 无血清培养液,以后每 3 天换 B27培养液 1 次,每次换半液。

1.2.2 细胞接种时存活率测定 接种前将 0.4%的台盼蓝溶液与细胞悬液等体积混合均匀,滴入细胞计数板后于倒置相差显微镜下记数,未着色的为活细胞,呈蓝色的为死细胞,计算细胞存活率。

1.2.3 实验分组 培养 7~9 天的神经元随机分为:①对照组,单纯加入 B27 培养液;②缺血缺氧组(HI 组),将培养板置于 37℃恒温水浴中的一密封罐中,并通入 95%N_2 和 5%$CO_2$4h 后,换为无血清 DMEM 培养液后置于 37℃、95%空气和 5%CO_2 培养箱中继续培养 24h 后取出进行检测。③HI+SS 组,在缺氧前 30min 给予不同浓度的 SS(10^{-8},10^{-7} 及 10^{-6}mol/L),其余处理同损伤组。复氧/糖 24h 后,测定神经元的存活率及 LDH。

1.2.4 存活率的测定 用 MTT 染色法测定细胞存活率。终止培养前 4h,加入 20μlMTT 溶液(5mg/ml),置于 37℃、5%CO_2 培养箱中继续培养,4h 后加入加入 200μl 二甲基亚砜,溶解生成的深蓝色结晶,在酶标仪(TECAN 公司)上读取光密度(测定波长为 570nm)。

1.2.5 乳酸脱氢酶活性测定 培养至 7~10 天,神经细胞经缺氧/复氧及给药处理后,收集各组细胞上清液,然后用胰酶消化贴壁细胞,将消化得到的各孔细胞收集到 EP 管内,离心去上清后加生理盐水,用高强度超声波细胞粉碎机破碎细胞(冰上操作),在倒置相差显微镜下观察细胞均破裂后,按试剂盒说明书分别测定培养液乳酸脱氢酶(LDH)总活性和细胞匀浆液 LDH 总活性,计算 LDH 漏出率。漏出率 = 培养液 LDH 总活性/(培养液 LDH 总活性 + 细胞匀浆液 LDH 总活性)×100%。

1.2.6 SOD、MDA 检测 培养至 7~10 天,神经细胞经缺氧/复氧及给药处理后,收集各组细胞上清液,然后用胰酶消化贴壁细胞,将消化得到的各孔细胞收集到 EP 管内,离心去上清后加生理盐水,用高强度超声波细胞粉碎机破碎细胞(冰上操作),在倒置相差显微镜下观察细胞均破裂后,按 SOD、MDA 测定试剂盒中操作说明书进行测定。用分光光度计于波长 550nm、532nm 处分别检测 SOD 及 MDA 水平。

1.2.7 统计处理 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行 F 检验,$P<0.01$ 为相差显著。

2 结 果

2.1 细胞接种时存活率测定

台盼蓝染色观察不到 5%细胞着色,细胞接种时存活率达 95%以上。

2.2 各组神经元 MTT-OD 值、LDH 释放量的比较(见表 1)

表 1 各组神经元 MTT-OD 值、LDH 漏出率比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	MTT-OD 值	LDH 漏出率(%)
HI 组	0.685±0.012*	41.23±5.85*
HI+SS 组(10^{-8}mol/L)	0.786±0.011△	27.25±1.53△
HI+SS 组(10^{-7}mol/L)	0.801±0.013△	24.12±2.91△
HI+SS 组(10^{-6}mol/L)	0.812±0.009△	21.15±2.65△
对照组	0.882±0.024	9.15±0.62

与对照组比较,*$P<0.01$;与 HI 组比较,△$P<0.01$

HI 组神经元的 MTT-OD 值显著低于对照组(均 $P<0.01$);两组神经元的 LDH 释放量显著高于对照组(均 $P<0.01$)。与 HI 组比较,SS 组神经元的存活率显著升高($P<0.01$),LDH 释放量有显著降低(均 $P<0.01$),且随着 SS 的浓度增加,存活率呈现升高趋势,LDH 释放量呈现降低趋势。

2.3 各组神经元 SOD 活性、MDA 含量的比较(见表 2)

表 2 各组神经元 SOD 活性、MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
HI 组	0.806±0.048*	15.012±2.013*
HI+SS 组(10^{-8}mol/L)	1.241±0.087△	8.012±1.004△
HI+SS 组(10^{-7}mol/L)	1.301±0.091△	7.812±0.918△
HI+SS 组(10^{-6}mol/L)	1.451±0.124△	6.549±0.521△
对照组	1.818±0.104	3.654±0.311

与对照组比较,*$P<0.01$;与 HI 组比较,△$P<0.01$

由表 2 可见,造模后细胞 MDA 含量增加,SOD 活性降低(与对照组比较 $P<0.01$)。SS 各组均可减少 MDA 生成,升高 SOD 活性,与 HI 组比较均有显著性差异($P<0.01$)。

3 讨 论

MTT 法的原理是活细胞内线粒体脱氢酶能将四氮唑化物(MTT)由黄色还原成蓝色的甲臜,甲臜产量与活细胞数成正比。LDH 释放与细胞膜完整性相关,神经元受损时,胞内 LDH 释放,且释放量与神经受损程度呈正相关。因此,MTT 法和 LDH 含量是检测神经细胞受损程度和存活数量的主要指标。

SOD 是机体内清除自由基的重要抗氧化酶之一,其水平反映了机体清除氧自由基的能力。MDA

维普资讯 http://www.cqvip.com

是脂质过氧化物的降解产物，可引起膜损伤、酶抑制、溶酶体释放，造成机体多种疾病。我们的研究结果表明，神经元缺血再灌注后，SOD 活力明显下降，MDA 含量明显升高，SS 可升高脑缺血再灌注引起的 SOD 活力的下降，减少脑缺血再灌注引起的 MDA 含量的升高，说明西维来司钠具有抗氧化活性和清除自由基的能力。

缺血性脑血管疾病是中老年人的常见病、多发病，是现今人类死亡率最高的三大疾病之一，也是三大疾病中发展最快、恢复最慢、死亡最多、致残最重的病种。目前关于脑缺血/再灌注损伤的病理生理机制，比较公认的包括能量代谢障碍、氧自由基应激[5,6]、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸的兴奋毒性[7-9]、一氧化氮合酶(NOS)的过度激活、神经元细胞凋亡程序启动以及炎症反应等。大量证据表明，炎症反应介导了脑缺血/再灌注损伤，而中性粒细胞的聚集、浸润是炎症反应发生、发展的关键步骤。西维来司钠作为一种特异性的 NE 抑制剂，在有中性粒细胞介导的神经细胞发生缺血/再灌注损伤时可发挥保护作用，而本实验研究的是在无中性粒细胞介导的体外培养的神经细胞发生缺血/再灌注损伤时，西维来司钠仍具有保护作用。本实验结果显示：西维来司钠组对受损神经元有明显的保护作用，并呈现一定的浓度依赖性. 初步表明了西维来司钠能有效防止缺血再灌注对神经元的损伤，保护神经细胞的膜结构，提高细胞生存状态，同时西维来司钠可升高脑缺血再灌注引起的 SOD 活力的下降，减少脑缺血再灌注引起的 MDA 含量的升高，提示其机制可能与抗过氧化作用有关。

长期以来，中外学者研究西维来司钠，总是通过抑制 NE 入手，而本实验证明了在没有 NE 时，西维来司钠对神经细胞发生缺血/再灌注损伤仍具有保护作用。这为进一步深入研究西维来司钠防治缺血性脑血管疾病的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemicbrain damage[J]. Curr Cardiol Rep, 2003; 5(2): 160-167.

[2] Chen HM, Chen JC, Shyr MH, et al. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) attenuates reperfusion-induced hepatic microcirculatory derangement, energy depletion and lipid peroxidation in rats [J]. Shock, 1999; 12(6): 462-467.

[3] Kotake Y, Yamamoto M, Matsumoto M, et al. Sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, attenuates neutrophil priming after hepatoenteric ischemia in rabbits[J]. Shock, 2005; 23(2): 156-160.

[4] 丁爱石，王福庄. 新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长特性[J]. 细胞生物学杂志，1993; 15: 88-90.

[5] Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture[J]. Stroke, 2001; 32(11): 2712-2716.

[6] 张 玲，余绍祖，吴国样. 大鼠脑缺血再灌注后 TNF-α、IL-β 及细胞间黏附分子-1mRNA 的表达[J]. 卒中与神经疾病，2001; 8(2): 77-79.

[7] Matsushita Y, Shima K, Nawashiro H, et al. Real-time monitoring of glutamate following fluid percussion brain injury with hypoxia in the rat[J]. J Neurotrauma, 2000; 17(2): 143-153.

[8] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of Ischemic stroke; an integrated view[J]. Trends Neurosci, 1999; 22(9): 391 -397.

[9] Block F, Schwarz M. Neuroprotection in stroke. A critical overview[J]. Nervenarzt, 1999; 70(2): 101-110.

(上接第 577 页)

[10] Dai WJ, Waldvogel A, Siles LM, et al. Echinococcus multilocularis proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an αβ+ CD_4+T cell mediated immune responses[J]. Immunol, 2004; 112(3): 481-488.

[11] 李富荣，石佑恩，史大中，等. 泡状棘球蚴病宿主淋巴细胞的变化及意义[J]. 中国人兽共患病杂志，2003; 19(3): 91-94.