DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.018

灯盏花制剂减轻大鼠脑缺血再灌流损害的作用*

史树贵** 邵淑琴 陈康宁 (第三军医大学附属西南医院神经内科) 重庆,400038

提 要 **目的**:观察灯盏花制剂对大鼠脑缺血再灌流损害的作用。**方法**:选用Wistar大鼠,制作大脑中动脉闭塞(MCAO)脑缺血再灌流(IR)模型,观察云南灯盏花制剂对大鼠MCAO后不同时相脑梗塞体积、一氧化氮(NO)表达及对细胞凋亡的作用。**结果**:使用灯盏花制剂后脑梗塞体积小,细胞凋亡数下降,尼克酰胺嘌呤二核苷酸磷酸黄递酶(NADPHd)表达无明显改变。**结论**:灯盏花制剂对脑缺血有效,其作用可能与增加局部脑血流量(rCBF)和神经元对NO毒性的耐受性有关。

关键词 灯盏花制剂;脑缺血;凋亡;一氧化氮;再灌注损伤;大鼠

中图法分类号 R743.31

兴奋性氨基酸参与脑缺血后细胞损伤过程已被认可,谷氨酸(Glu)通过谷氨酸受体(GluR)起作用,GluR分两种亚型:亲代谢性谷氨酸受体(mGluR)和亲离子性谷氨酸受体(iGluR),iGluR主要介导谷氨酸的毒性作用,而mGluR可通过几种信号途径如cAMP、蛋白激酶C(Protein kinase C,PKC)、肌醇磷酸化、离子超载和磷脂D等对细胞起保护作用。本研究观察了大鼠大脑中动脉闭塞(Middle cerebral artery occlusion,MCAO)后PKC的非竞争性抑制剂云南灯盏花(*Erigeron breviscapus* Hand-Mazz,EbHM)注射液[1]对尼克酰胺嘌呤二核苷酸磷酸黄递酶(NADPHd)表达和细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

Wistar大鼠,体重250 g~300 g,随机分成假手术组,IR组,治疗组,缺血后30 min再灌流,设缺血前(Pre),脑缺血再灌流组(IR) 30 min,IR 6 h,IR 24 h,IR 4 d共5个时相点;灯盏花制剂按每公斤体重黄酮苷27 mg腹腔给药,插入线栓前30 min和再灌流后30 min各一次。参照Laing等[2]法制做大鼠MCAO模型,线栓直径0.2 mm。以清醒后左前肢不能伸展,爬行时向左侧划圈为入选标准。

1.2 TTC染色观察大鼠MCAO后脑梗塞体积

大鼠断头取脑,经前联合冠状切片,层厚2 mm,2%TTC 37℃孵育60 min,4%多聚甲醛固定,按李敬诚等[3]方法计算体积百分比。

1.3 NADPHd组化染色

模型同上,4%多聚甲醛灌注固定,取脑,20%蔗糖浸泡过夜,冰冻切片厚20 μm,PBS漂洗,0.3% TritonX-100孵育30 min,加入含0.1 mg/ml NBT和1.0 mg/ml NADPHd的作用液中,37℃孵育45 min,终止染色[4]。

1.4 末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP切口末端标记(TUNEL)染色观察大鼠MCAO后细胞凋亡

灌注固定,取脑,石蜡包埋,经前联合冠状切片厚6 μm,脱蜡至水,20 μg/ml蛋白酶K 37℃作用15 min,0.3%甲醇/H_2O_2中室温作用30 min,TdT缓冲液37℃作用60 min行细胞凋亡染色,DAB显色[5]。

1.5 神经细胞凋亡荧光率分析

活体断头取脑,取前额叶缺血区脑组织10 g,胰蛋白酶消化后采用梯度离心法制成脑细胞悬液,加入荧光素标记的末端脱氧核苷酸转移酶37℃作用60 min,1 500 r/min离心10 min,弃上清,加1 ml RPMI 1640培养液摇匀,流式细胞仪测定荧光比率。

1.6 结果分析

采用双因素方差分析和CMIAS007图像分析系统处理。

2 结果

2.1 TTC染色

梗塞区脑呈白色,非梗塞区呈红色,经处理结果见表1。

表1 TTC染色所示脑梗塞体积($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Cerebral infarct volume(%) by TTC staining ($\bar{x}\pm s$)

	30 min	6 h	24 h	4 d
IR	11.04±2.20	19.18±2.98*	24.56±5.55*	19.68±1.97*
EbHM	11.56±3.34	17.74±4.70*△	20.16±1.01*△	18.53±2.07*

*: $P<0.05$ *vs* IR 30 min group; △: $P<0.05$ *vs* IR group

随着灌流时间延长,缺血灶不断扩大,治疗组随再灌流时间延长,缺血灶扩大不如IR组明显,且在IR6 h~24 h时与IR组同时相点相比显著减小;但IR 4 d时脑梗塞体积与IR组差别不明显。

2.2 NADPHd组化染色,见表2

IR30 min时,NADPHd表达增加,IR 6 h达高峰,IR 24 h

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670269

** 史树贵,男,29岁,住院医师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后 NADPHd 阳性细胞有所下降，但仍比缺血前增多（$P<0.05$），在 IR 4 d 时与缺血前水平相近（$P>0.05$）。治疗组 IR 30 min 至 4 d，NADPHd 表达与 IR 组差别不明显，但使用灯盏花制剂后早期（IR 30 min）在血管壁即有阳性染色。

2.3　TUNEL 染色，见表 3

非手术侧及对照组见少数阳性细胞，各组均取病灶中心（C 区）及边界区（B 区）两组图像，结果如表 3（$n=6$）（单位：细胞数/hP）。

各组随 IR 时间延长，病灶不断扩大，阳性细胞分布范围亦扩大，IR 组 IR 30 min 病灶侧即可见大量 TUNEL 阳性细胞，C 区较 B 区多；IR 6 h 时，阳性细胞明显增多，以后随 IR 时间延长，C 区阳性细胞逐渐减少，且逐渐与 B 区接近，除 IR 4 d 外，B 区阳性细胞变化不大，治疗组 IR 30 min 到 IR 6 h，缺血侧中心区及周边区 TUNEL 阳性细胞均较 IR 组明显减少，流式细胞仪（FCM）检查发现，随着缺血再灌流时间的延长，各组凋亡细胞阳性率均明显升高，与 IR 组相比，治疗组 IR 6 h～24 h 期间凋亡细胞阳性率明显下降（$P<0.05$），见附图。

表 2　脑缺血后 NADPHd 表达的改变（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　The changes of NADPHd expression in ischemic rat brain（$\bar{x}\pm s$）

	Pre	30 min	6 h	24 h	4 d
Control	27±3	31±8	36±4	29±11	31±7
IR	25±8	99±9#	106±8#	51±11	25±6
EbHM	27±5	86±4#	99±7#	47±5#	23±6

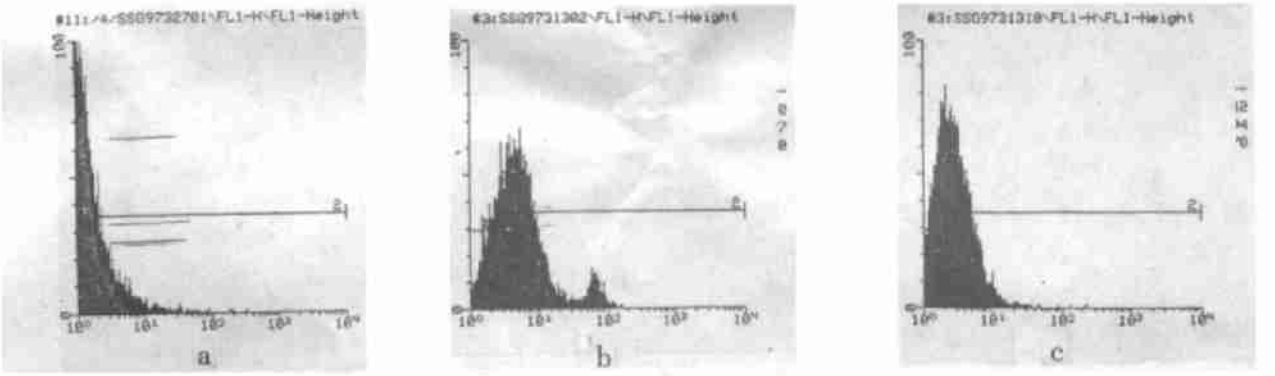
#：$P<0.05$ *vs* preischemia group

表 3　TUNEL 染色所示的细胞凋亡变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　The changes of cell apoptosis examined by TUNEL staining（$\bar{x}\pm s$）

		Pre	30 min	6 h	24 h	4 d
IR	C 区	0～4	171±12	209±14*	129±14*	77±6*
	B 区		150±17	131±13*	136±21	37±5*
EbHM	C 区		136±19△	165±14*△	118±19*△	83±9*
	B 区		126±16△	109±9*	98±10*△	5±7*△

*：$P<0.05$ *vs* IR 30 min group；△：$P<0.05$ *vs* IR group



附图　FCM 检测凋亡细胞阳性率

Fig 1　The percentage of apoptotic cells examined by FCM

a：Preischemia　b：IR 24 h　c：EbHM IR 24 h

3　讨论

3.1　NADPHd 染色作为 NOS 代表的可行性

NOS 在体内有神经性、内皮细胞性和巨噬细胞性 3 种异构体，3 种酶的活性均必需还原性 NADPH[4]，尽管有报道在嗅上皮、梨鼻骨区等部位，NADPHd 的染色并不依赖于 NOS[5]，但在包括大脑皮层和纹状体在内的神经系统和许多器官中，NOS 和 NADPHd 的分布是一致的。因此，本研究采用 NADPHd 组化染色代表 NOS 在脑中的存在部位有很好的可行性。

3.2　灯盏花制剂对 NOS 表达的影响

在体内，NO 通过介导 Glu 的神经传递，扩张血管系统等参与神经系统的生理活动，NOS 在体内有 cNOS 和 iNOS 两种存在方式，其中 cNOS 主要存在于神经元和内皮细胞，在基础条件下参与调节机体的生理活动，仅在生成过量时才有细胞毒性；iNOS 在基础条件下活性极微，但许多损伤因素可使之激活，并且是造成损伤的主要因素[6]。我们的研究发现，灯盏花制剂不影响神经细胞 NOS 的表达，但在早期增加血管壁 NOS 的表达，由于血管壁 NOS 的表达可通过扩张血管而增加 rCBF[6]。因此我们认为灯盏花对脑缺血的保护作用之一可能是增加 rCBF 所致；另外，目前已发现，PKC 和 NO 之间存在着相互作用以调节血管的张力与紧张度[7]，PKC 通过对 nNOS 的磷酸化作用而参与对 NOS 活性的调节，抑制 PKC 活性可使神经元免受缺血、缺氧及 NO 毒性[6]。因此，灯盏花制剂对脑缺血的保护作用可能还与抑制 PKC 活性有关。

3.3　灯盏花可抑制脑缺血后细胞凋亡

过去的研究认为脑缺血后的细胞死亡是坏死，但

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

最近发现凋亡也是脑缺血后细胞死亡的方式。凋亡细胞形态上皱缩，致密，早期染色质边聚，晚期染色质凝集和固缩。尽管有报告说细胞坏死时也可出现TUNEL阳性反应，但多数作者仍然认为TUNEL染色是一种相对特异的识别细胞凋亡的方法。

我们研究发现，灯盏花制剂不仅可减小脑梗塞体积，而且TUNEL法和流式细胞仪检测均发现其抑制IR 30 min～IR 4 d期间的细胞凋亡，尽管我们对其作用机制缺乏彻底研究，但参考国外文献，我们认为灯盏花制剂对IR后细胞凋亡的抑制作用可能与影响mGluR通路的作用有关[8]。该通路中，在缺血缺氧和NO毒性的条件下，神经元的激活需要彻底抑制PKC活性、激活PKA并保持钙的稳态[8]。Joo F等[9]也发现抑制PKC活性能够减轻局部缺血时的脑水肿并使脑梗塞体积缩小。我们的结果与上述研究相一致。其原因可能与抑制PKC活性增加了细胞对NO毒性的耐受性有关。

3.4 灯盏花制剂产生上述作用的机制

本研究发现，灯盏花制剂不能影响IR后神经细胞NOS的表达，但可在缺血早期增加血管壁NOS的表达，减少IR后脑梗塞体积并抑制细胞凋亡。其机制可能为：①通过抑制PKC活性，缓解血管收缩从而增加脑组织rCBF减轻脑组织损伤；②通过增加内皮性NOS表达使血管扩张而增加rCBF；③抑制PKC活性使神经细胞对NO毒性的耐受性增加；④是否作用于PKC信号途径的其它部位尚需进一步研究。

参考文献

1 徐 光，张礼萍，沈慧芬等. 野黄芩苷元及其类似物对蛋白激酶C的抑制作用. 上海医科大学学报，1993；20(3)：187

2 Laing R T, Jakubowski J, Laing R W. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats: which method works best? Stroke, 1993; 24(2): 294

3 李敬诚，董为伟，傅雅各. Sprague-Dawley鼠局部脑缺血后脑电功率及电位分布图研究. 重庆医科大学学报，1992；17(1)：38

4 McMillan K, Bredt D S, Hirs D S *et al*. Cloned, Expressed rat cerebellar nitric oxide synthase containing stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89(23): 11141

5 Santer R M, Symons D. Distribution of NADPHd positive cells in cerebral cortex following focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 1995; 15(2): 378

6 Klburn R G, Belloni P. Endothelial cell production of nitric oxide in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin -1, or endotoxin. J Natl Cancer Inst, 1990; 82(7): 772

7 Nishizawa S, Yamamoto S, Uemara K. Interrelation between protein kinase C and nitric oxide in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Neuro Res, 1996; 18(1): 89

8 Maiese K, Boccone L. Neuroprotection by peptide growth factors against anoxia and nitric oxide toxicity requires modulation of protein kinase C. J Cereb Blood Flow Metab, 1995; 15(5): 440

9 Joo F, Tosaki A, Olah Z *et al*. Inhibition by H7 of the protein kinase C prevents formation of edema in Sprague-Dawley CFY rats. Brain Res, 1989; 490(2): 141

(收稿：1997-10-14；修回：1998-05-15)

(编辑 汪勤俭)

Study of therapeutic effects of *Erigeron breviscapus* Hand-Mazz preparation on cerebral ischemia-reperfusion damages in rats*

Shi Shugui, Shao Shuqin, Chen Kangning (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the therapeutic effects of the preparation of *Erigeron breviscapus* Hand-Mazz (EbHM) on cerebral damages due to ischemia-reperfusion. Methods: Focal ischemia was created in Wistar rats with ligation of the right middle cerebral artery. EbHM was injected intraperitoneally 30 minutes before artery ligation and 30 minutes after reperfusion. The size of cerebral infarct was determined with TTC staining, the changes of NO content in cerebral tissue was measured with NADPHd histochemistry and neuronal apoptosis was investigated with TUNEL method and the proportion of apoptotic cells was determined with FCM technique. Results: EbHM did not change the number of NADPHd positive cells but decreased the volume of cerebral infarct and neuronal apoptosis. Conclusion: EbHM exerts therapeutic effects on cerebral ischemia through the increase of regional cerebral blood flow and the tolerance of the neurons toward NO toxicity.

Key words apoptosis; NO; *Erigeron breviscapus* Hand-Mazz; reperfusion injury; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670269

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net