

[文章编号] 1000- 4718(2005)09- 1829- 05

大黄素甲醚对大鼠脑缺血再灌注损伤的拮抗作用

张平¹, 苏立凯¹, 李会敏¹, 赵永晨², 杨章群³, 崔秀艳³(河北省职工医学院附属医院¹神经内科, ²中西医结合科, ³药剂科, 河北保定 071000)

[摘要] 目的: 探讨大黄素甲醚对脑缺血再灌注后 IL-1 β 含量和 ICAM-1 及 caspase-3 表达的影响。方法: 91 只 SD 大鼠随机分为正常组(normal), 假手术组(sham), 模型组(model), 大黄素甲醚大剂量(PHD) 及小剂量(PLD) 组。采用线栓法复制大鼠右侧大脑中动脉脑缺血再灌注模型, 用放射免疫法测定病变侧脑组织 IL-1 β 的含量, 用免疫组织化学方法测定 ICAM-1 和 caspase-3 表达的变化, 并进行组织病理学观察。结果: Model 组再灌注 6 h 病变侧 IL-1 β 含量明显升高且达高峰, 再灌注 24 h 病变侧 ICAM-1, caspase-3 表达明显升高, 中性粒细胞附壁浸润明显; 大黄素甲醚 PHD 组再灌注 12 h, 24 h 病变侧 IL-1 β , ICAM-1 和 caspase-3 表达明显低于 model 组相应时段 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中性粒细胞附壁浸润较少。结论: 大黄素甲醚可降低脑缺血再灌注后 IL-1 β , ICAM-1 和 caspase-3 水平, 减轻脑缺血再灌注损伤。

[关键词] 大黄素甲醚; 脑缺血; 再灌注损伤; 白细胞介素 1; 胞间粘附分子 1; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective effects of physcion against cerebral injury induced by ischemia-reperfusion in rats

ZHANG Ping¹, SU Li-kai¹, LI Hui-min¹, ZHAO Yong-chen², YANG Zhang-qun³, CUI Xiu-yan³(¹Department of Neurology, ²Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, ³Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Hebei Adult Medical College, Baoding 071000, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effect of physcion (P) on the level of IL-1 β and expression of ICAM-1 and caspase-3 during cerebral ischemia-reperfusion injury. **METHODS:** The 91 healthy adult SD rats were selected, and were randomly divided into normal group, sham-operated group, cerebral ischemia-reperfusion group (model), low-dose physcion (PLD) and high-dose physcion (PHD) treatment group. The level of IL-1 β was detected by radioimmunoassay. The expression of ICAM-1 and caspase-3 was detected by immunohistochemistry. The changes of tissue pathology were also investigated. **RESULTS:** The level of IL-1 β reached the peak at 6 h after ischemia-reperfusion (IR). The protein expression of ICAM-1 and caspase-3 reached the peak at 24 h after IR. The level of IL-1 β and the protein expression of ICAM-1 and caspase-3 in PHD group decreased obviously compared with those in model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), infiltration and adhesiveness of neutrophils were less serious at the same time. **CONCLUSION:** Physcion decreases the level of IL-1 β and the protein expression of ICAM-1 and caspase-3 to protect brain tissue from cerebral ischemia-reperfusion injury.

[KEY WORDS] Physcion; Brain ischemia; Reperfusion injury; Interleukin-1; Intercellular adhesion molecule-1; Caspase 3

脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR) 损伤主要与氧化应激反应、炎性反应、钙超载、脑水肿和细胞凋亡等有关^[1]。白细胞介素-1 β (interleukin-1, IL-1 β) 和细胞粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 为脑损伤后的主要促炎性因子, 参与再灌注区的炎性反应^[1]。形态学研究发现^[1,2], 脑缺血半暗带神经元死亡以凋亡为主, 半胱氨酸蛋白酶-3(cysteinyI aspartate-specific protease,

caspase-3) 是胱冬肽酶家族中的重要成员, 它通过介导和执行死亡指令在凋亡的发生和发展中起重要作用。大黄素甲醚(physcion, P) 属于蒽醌类物质, 可以通过血脑屏障, 具有抗菌活性^[3]。研究发现, 大黄素甲醚可以降低脑缺血组织中 IL-1 β 的含量, 抑制脑缺血组织的炎性反应, 减轻缺血损伤^[4]。本研究拟观察大黄素甲醚对上述 3 个因子表达的影响, 探讨其对脑缺血再灌注损伤的拮抗作用。

[收稿日期] 2004- 10- 08

[修回日期] 2005- 01- 13

材 料 和 方 法

1 实验动物及分组

选用健康雄性 SD 大鼠 91 只(由河北医科大学实验动物中心提供),体重(260 ± 50)g,随机分为正常组(normal),假手术组(sham)和缺血再灌注组(model):又分为再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h 各时间段组;小剂量 20 mg/kg (PLD)组和大剂量大黄素甲醚 40 mg/kg (PHD)组:又分为脑缺血再灌注 12 h、24 h 两组。每组均为 7 只。

2 模型的复制

采用线栓法复制大鼠右侧大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型,10%水合氯醛(0.33 g/kg)ip 麻醉后,暴露颈总动脉分叉,逆颈外动脉插入 1 根顶端粘有石蜡的尼龙丝线,丝线直径为 0.20 mm 左右,头端直径约 0.26–0.30 mm,深度为 19–21 mm,遇阻即止。2 h 后,给予异戊烷吸入麻醉后,将丝线拽出至深度 10 mm。以动物清醒后爬行时向左转圈(追尾现象),严重时向左跌倒,提尾时左前肢内收屈曲,为入选标准。假手术组拴线进入约 10 mm,其余步骤与上述相同。手术过程中保持动物直肠温度在 37 °C,术后动物自然苏醒,觅食。

3 药物干预

大黄素甲醚购自中国生物药品检测中心(批号 200112)。分别于缺血前 48 h、24 h、术前将药物溶于 2 mL 生理盐水中,鼻饲,PLD 组 20 mg/kg,PHD 组 40 mg/kg。

4 指标检测及方法

各组动物在规定的时点给予 25%乌拉坦(1.0 g/kg)ip 麻醉后,断头取脑,距额极 3–5 mm 冠状切取材,放入 4%多聚甲醛固定 24 h 后,制成石蜡切片,用于免疫组织化学染色和普通 HE 染色,链霉菌抗生物素蛋白过氧化物酶法(streptavidin peroxidase, SP)检测 ICAM-1 和 caspase-3 的表达(严格按照试剂盒说明书进行操作)。另取病变侧脑组织 1 g,用 PBS 清洗,剪碎匀浆,2 000 r/min 离心 15 min,取上清,–20 °C 冰箱保存,待测,放射免疫法测定 IL-1β 含量(操作程序严格按照药盒说明书进行)。

5 主要试剂

ICAM-1(小鼠 IgG 单抗)、caspase-3(小鼠 IgG 单抗)SP 试剂盒、DAB 显色剂均购自北京中山生物技术有限公司;IL-1β 检测试剂盒购自北京市东亚放免技术研究所。

6 图像分析

在 CMIAS 系列多功能病理图像分析系统下每只

动物选 5 张切片,400 倍光镜下选 10 个视野进行定量分析,测量黄褐色反应物的积分吸光度、面密度。

7 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件处理,进行方差分析,并进行两两比较(*q* 检验)。

结 果

1 光镜 HE 染色所见

脑缺血再灌注各组均可见皮质和纹状体区出现细胞肿胀,胞浆嗜酸性变,胞核碎裂、溶解、固缩,淋巴细胞和中性粒细胞浸润,以再灌注 24 h 上述变化明显(图 1)。大黄素甲醚治疗组上述变化较轻(图 2)。假手术组和正常组未见异常变化。

2 IL-1β 含量

Model 组再灌注 6 h 达高峰,随之开始逐渐下降。大黄素甲醚 PHD 组再灌注 12 h 及再灌注 24 h,以及 PLD 组再灌注 12 h 病变侧脑组织 IL-1β 含量明显低于 model 组相应时段(*P* < 0.01),PLD 组再灌注 24 h 时与 model 组相应时段比较没有显著差异(*P* > 0.05)(见表 1、2)。

表 1 脑缺血再灌注后各组脑组织中 IL-1β 的含量

Tab 1 The level of IL-1β in cerebral tissue at the different time point after IR (μg/L, $\bar{x} \pm s$, *n* = 7)

Group	Content of IL-1β			
	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham	0.2988 ± 0.0312	0.3063 ± 0.0398	0.2625 ± 0.0368	0.2725 ± 0.0294
Normal	0.2896 ± 0.0375	0.2896 ± 0.0375	0.2896 ± 0.0375	0.2896 ± 0.0375
Model	1.2950 ± 0.0352*	1.1180 ± 0.0283*	0.9240 ± 0.0274*	0.9030 ± 0.0212*

* *P* < 0.01 vs sham group.

表 2 药物各组脑组织中 IL-1β 的含量

Tab 2 The level of IL-1β in cerebral tissue in drug treating group (μg/L, $\bar{x} \pm s$, *n* = 7)

Group	Content of IL-1β	
	12 h	24 h
Model	1.1180 ± 0.0283	0.9240 ± 0.0274
PLD	0.5640 ± 0.0286*	0.8940 ± 0.0318
PHD	0.5231 ± 0.0321*	0.4900 ± 0.0234*

* *P* < 0.01 vs model group.

3 ICAM-1 水平

正常组及假手术组大鼠大脑皮层偶见少量黄褐色淡染的阳性血管,黄褐色反应物出现在血管内皮细胞的胞浆和细胞膜中。Model 组再灌注 6h 梗死灶周边区可见少量的阳性血管,再灌注 24 h 可见大血管的内皮细胞呈阳性表达,着色深(图 3),再灌注

48 h仍可见较多的阳性血管。大黄素甲醚 PHD 组再灌注 12 h、24 h 以及 PLD 组再灌注 24 h 梗死灶周围的阳性血管数较少(图 4)。图像分析结果见表 3、4。

4 Caspase-3 水平

正常组和假手术组大鼠大脑皮层可见 caspase-3 蛋白的表达,免疫阳性细胞散在性点状分布,胞浆为棕黄色,着色浅,细胞核为浅黄色。Model 组脑

缺血再灌注 24 h,右侧大脑皮层区阳性细胞数明显较多,位于坏死灶周边部,棕黄色细颗粒弥散分布在细胞浆内,着色深,细胞失去正常的形态,胞体增大呈多边形,胞核浓缩,深染(图 5),再灌注 48 h 仍有明显的 caspase-3 蛋白表达。大黄素甲醚 PHD 组病变侧 caspase-3 阳性细胞数较少,胞浆淡染(图 6)。图像分析结果见表 5、6。

表 3 脑缺血再灌注后各组脑皮质 ICAM-1 的积分吸光度和面密度值

Tab 3 The integral absorbance and area density of ICAM-1 in cerebral cortex at the different time point after IR ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Group	Integral absorbance				Area density			
	6 h	12 h	24 h	48 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham	5.43 ± 3.41	4.90 ± 3.35	3.89 ± 3.21	5.12 ± 4.63	0.0034 ± 0.0015	0.0044 ± 0.0026	0.0039 ± 0.0018	0.0051 ± 0.0022
Normal	5.44 ± 3.23	5.44 ± 3.23	5.44 ± 3.23	5.44 ± 3.23	0.0040 ± 0.0021	0.0040 ± 0.0021	0.0040 ± 0.0021	0.0040 ± 0.0021
Model	11.94 ± 6.90 [#]	21.95 ± 5.30 [*]	31.89 ± 4.38 [*]	28.41 ± 5.21 [*]	0.0088 ± 0.0018 [*]	0.0133 ± 0.0027 [*]	0.0185 ± 0.0031 [*]	0.0163 ± 0.0026 [*]

* $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs sham group.

表 4 药物各组 ICAM-1 的积分吸光度和面密度值

Tab 4 The integral absorbance and area density of ICAM-1 in drug treating group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

	Integral optical density		Area density	
	12 h	24 h	12 h	24 h
Model	21.95 ± 5.66	31.89 ± 4.38	0.0133 ± 0.0027	0.0185 ± 0.0031
PLD	17.12 ± 5.11	23.73 ± 4.51 [#]	0.0099 ± 0.0041 [#]	0.0141 ± 0.0038 [#]
PHD	13.33 ± 6.12 [#]	20.04 ± 4.65 [*]	0.0076 ± 0.0022 [*]	0.0129 ± 0.0036 [#]

* $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs model group.

表 5 脑缺血再灌注后各组脑皮质 caspase-3 的积分吸光度和面密度值

Tab 5 The integral absorbance and area density of caspase-3 in cerebral cortex at the different time point after IR ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Group	Integral optical density				Area density			
	6 h	12 h	24 h	48 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham	3.01 ± 2.01	3.56 ± 2.90	3.78 ± 2.10	4.10 ± 1.92	0.00104 ± 0.00050	0.00112 ± 0.00045	0.00096 ± 0.00036	0.00089 ± 0.00037
Normal	3.46 ± 2.31	3.46 ± 2.31	3.46 ± 2.31	3.46 ± 2.31	0.00091 ± 0.00032	0.00091 ± 0.00032	0.00091 ± 0.00032	0.00091 ± 0.00032
Model	7.11 ± 3.60 [#]	11.75 ± 3.69 [*]	15.44 ± 3.38 [*]	13.91 ± 3.21 [*]	0.00501 ± 0.00049 [*]	0.00756 ± 0.00038 [*]	0.01150 ± 0.00035 [*]	0.00987 ± 0.00056 [*]

* $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs sham group.

表 6 药物各组 caspase-3 的积分吸光度和面密度值

Tab 6 The integral absorbance and area density of caspase-3 in drug treating group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Group	Integral absorbance		Area density	
	12 h	24 h	12 h	24 h
Model	11.75 ± 3.69	15.44 ± 3.38	0.00756 ± 0.00038	0.01150 ± 0.00035
PLD	9.60 ± 3.21	12.21 ± 2.34	0.00770 ± 0.00057	0.00713 ± 0.00043 [*]
PHD	6.12 ± 3.12 [#]	8.69 ± 3.26 [*]	0.00692 ± 0.00038 [*]	0.00742 ± 0.00028 [*]

* $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs model group.

讨 论

IL-1 β 为 IL-1 基因家族成员之一,可促进 T、B 细胞活化,诱导其它炎性产物的生成,加强白细胞对血管内皮的粘附,还可与内皮细胞表面的 I 类受体

结合激活内皮细胞,使之表达粘附分子 ICAM-1 和其它细胞因子如 IL-8,而 ICAM-1 是最重要的白细胞-内皮细胞间粘附分子之一,一旦缺血区域血流恢复,ICAM-1 即可作为配基与白细胞上表达的淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)和巨噬细胞活化

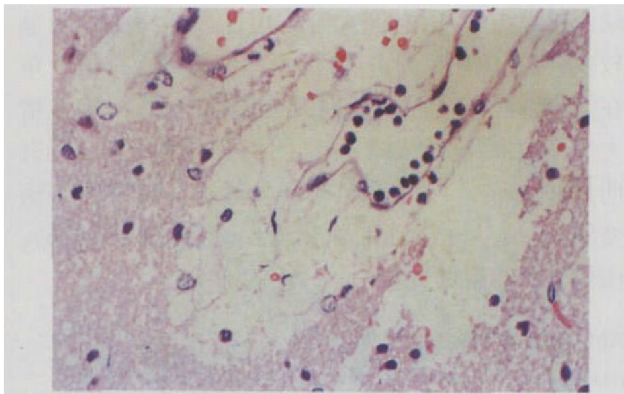


Fig 1 Tissue swell, the neutrophils' infiltration and adhesiveness to the vascular wall at 24 h after IR in model group (HE, × 200).

图1 Model组缺血再灌注24h中性粒细胞附壁及浸润和组织水肿



Fig 2 Tissue swell, the neutrophils' infiltration and adhesiveness to the vascular wall at 24 h after IR in PHD group (HE, × 200).

图2 PHD组缺血再灌注24h中性粒细胞附壁及浸润和组织水肿

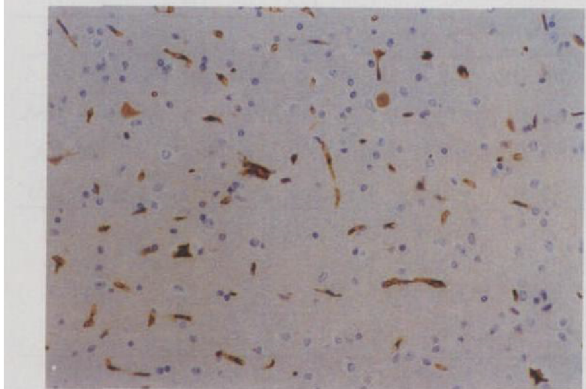


Fig 3 The expression of ICAM-1 on vascular endothelial cells at 24 h after IR in model group (immunohistochemistry, × 200).

图3 Model组缺血再灌注24h脑皮质ICAM-1的表达

趋化因子-1(Mac-1)相作用,使大量白细胞与微血管内皮细胞发生粘附,引起一系列的病理变化,导致再灌注损伤^[5]。实验中我们证实脑缺血再灌注后6h IL-1 β 达到高峰,再灌注24h ICAM-1达到高峰,与文献报道相同^[6,7]。Caspase-3是细胞凋亡过程中的关键酶之一,Namura等^[8]观察到,缺血后神经元凋亡的发生与caspase-3的活性及其裂解产物的增加密切相关。本实验随着脑缺血再灌注时间的延

长,炎性细胞的粘附及浸润加剧,caspase-3的表达也发生改变,再灌注24h达高峰,且caspase-3阳性细胞主要存在于坏死灶周围的部位,与Lee等^[9]报道一致。实验表明,IL-1 β 抗体和ICAM-1单克隆抗体均可减轻脑缺血再灌注后的炎症反应,减少梗死面积,减轻再灌注损伤^[10,11]。Caspase-3的抑制剂zDEVD-fmk可显著抑制缺血易损区caspase-3的活性,阻止PARP的裂解,从而抑制神经元凋亡改善神经功能^[12]。

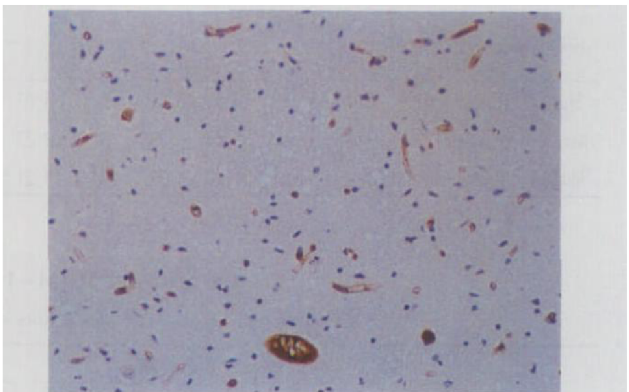


Fig 4 The expression of ICAM-1 on vascular endothelial cells at 24 h after IR in PHD group (immunohistochemistry, × 200).

图4 PHD组缺血再灌注24h脑皮质ICAM-1的表达



Fig 5 The expression of caspase-3 at 24 h after IR in model group (immunohistochemistry, × 200).

图5 Model组缺血再灌注24h脑皮质caspase-3的表达



Fig 6 The expression of caspase-3 at 24 h after IR in HD group (immunohistochemistry, × 200).

图6 HD组缺血再灌注24h脑皮质caspase-3的表达

本实验证实, 大黄素甲醚药物组脑组织损伤程度减轻, 中性粒细胞附壁浸润减少; 大黄素甲醚可下调脑缺血再灌注后 IL-1 β ICAM-1 的表达, 推测可能的机制为大黄素甲醚拮抗再灌注脑组织中 IL-1 β 的合成和分泌^[4], 从而减轻对血管内皮细胞的作用, 降低 ICAM-1 的表达, 抑制白细胞在血管内皮上的粘附, 减轻炎症反应; 大黄素甲醚还可以抑制缺血半暗带区神经细胞凋亡的发生, 下调 caspase-3 的表达, 研究表明 IL-1 β 的水平与神经细胞凋亡有着密切关系, IL-1 β 参与细胞凋亡的通路^[13], 抑制脑缺血再灌注中 IL-1 β 的升高可抑制神经元凋亡的发生。实验证实 ICAM-1 单克隆抗体可抑制细胞凋亡的发生, 主要是通过干扰可以介导细胞凋亡的细胞因子或肿瘤抑制基因的表达, 从而抑制细胞凋亡^[14]。可见大黄素甲醚下调 caspase-3 的表达与抑制脑缺血再灌注后 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达密切相关, 而大黄素甲醚是否可以抑制控制凋亡的细胞因子或肿瘤抑制基因的表达, 尚待继续探讨。

[参 考 文 献]

- [1] 任 丽, 孙善全. 脑缺血再灌注后神经损伤的机制[J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2002, 10(6): 458-460.
- [2] 赵炜疆, 徐 超. Caspase-3 参与缺血性神经元凋亡通路的研究[J]. 国外脑血管疾病杂志, 2002, 10(5): 391-394.
- [3] 韩国柱 主编. 中草药药代动力学[M]. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1999. 345-346.
- [4] 苏立凯, 王淑仙, 代瑞亭, 等. 大黄素甲醚对沙土鼠脑缺血损伤时肿瘤坏死因子、白介素-1 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(1): 46-48.
- [5] Sobel RA, Mitchell ME, Fondren C. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system[J]. Am J Pathol, 1990, 136(6): 1309-1316.
- [6] Liu T, McDonnell PC, Young PR, et al. Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex[J]. Stroke, 1993, 24(11): 1746-1751.
- [7] Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient NCA occlusion in the rat[J]. Brain Res, 1995, 682(1-2): 182-188.
- [8] Namura S, Zhu J, Fink K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 1998, 18(10): 3659-3668.
- [9] Lee SH, Kim M, Kim YJ, et al. Ischemic intensity influences the distribution of delayed infarction and apoptotic cell death following transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2002, 956(1): 14-23.
- [10] Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, et al. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator on ischemic brain damage in rats [J]. Stroke, 1995, 26(4): 676-681.
- [11] Zhang RL, Chopp M, Jiang N, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat[J]. Stroke, 1995, 26(8): 1438-1442.
- [12] Himi T, Ishizaki Y, Murota S. A caspase inhibitor blocks ischemia-induced delayed neuronal death in the gerbil[J]. Eur J Neurosci, 1998, 10(2): 777-781.
- [13] Mizushima H, Zhou CJ, Dohi K, et al. Reduced postischemic apoptosis in the hippocampus of mice deficient in interleukin-1[J]. J Comp Neurol, 2002, 448(2): 203-216.
- [14] Soriano SG, Wang YF, Lipton SA, et al. ICAM-1 dependent pathway is not involved in the development of neuronal apoptosis after transient focal cerebral ischemia[J]. Brain Res, 1998, 780(2): 337-341.