

灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤 相关 CYP4A 的作用机制

曹小雨, 李钊飞, 陈琼芳, 王钢, 杨秀芬*
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**研究灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤相关细胞色素(cytochrome, CYP)4A1, CYP4A3, CYP4A8 的作用机制。**方法:**采用 SD 雄性大鼠 193 只,制备大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,在脑缺血 2 h,再灌注后立即尾静脉注射给予灯盏花素注射剂(12,6,3 mg·kg⁻¹),每日 1 次,连续 7 d,末次给药后,断头取右脑组织,用实时荧光定量 PCR 法检测脑组织内的 CYP 基因 CYP4A1, CYP4A3, CYP4A8 的表达情况,用酶联反应吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测大鼠内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)含量。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠脑损伤 168 h 后的死亡率、脑梗死体积、行为学评分显著升高($P < 0.01$),大鼠脑组织 CYP4A3, CYP4A8 显著上调($P < 0.01$),eNOS 含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,灯盏花素(12,6 mg·kg⁻¹)组可降低的大鼠脑损伤 168 h 的死亡率、脑梗死体积($P < 0.05$),降低 24 h 后行为学评分($P < 0.01$),下调大鼠脑组织 CYP4A3, CYP4A8 表达和血清 eNOS 含量($P < 0.05, P < 0.01$);灯盏花素(3 mg·kg⁻¹)组对降低大鼠脑损伤 168 h 后死亡率和脑梗死体积不明显,可明显降低 120 h 时行为学评分($P < 0.05$),显著下调 CYP4A3, CYP4A8 表达和脑组织 eNOS 含量($P < 0.01$)。**结论:**大鼠脑缺血再灌注损伤会加重大鼠死亡率、脑梗死体积、行为学评分,上调脑组织 CYP4A3, CYP4A8 的表达和增加脑组织及血清 eNOS 的含量。灯盏花素可降低大鼠脑缺血再灌注损伤大鼠死亡率和行为学评分,可能是通过下调脑组织 CYP4A3, CYP4A8 的表达来改善大鼠脑缺血再灌注损伤。

[关键词] 灯盏花素注射剂; 大脑中动脉栓塞模型; 细胞色素; 基因表达; 脑组织

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0101-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050101

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1620.050.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:20

Mechanism of Breviscapine on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury of Rats by CYP4A Pathway

CAO Xiao-yu, LI Zhao-fei, CHEN Qiong-fang, WANG Gang, YANG Xiu-fen*
(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of Breviscapine on cerebral ischemia reperfusion injury of rats by cytochrome (CYP) 4A1, CYP4A3, CYP4A8 pathways. **Method:** Totally 193 male SD rats were selected to establish the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO). After cerebral ischemia for 2 h and reperfusion, they were injected with Breviscapine at the doses of 12, 6, 3 mg·kg⁻¹, qd, for 7 days. After the final medication, tissue fluids isolated from brain tissues were prepared. Genes expressions of CYP4A1, CYP4A3 and CYP4A8 in brain tissues of rats were examined by Real-time PCR assays. The content of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was examined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with shame group, model group showed significant increase in motility ($P < 0.01$), volume of cerebral infarction and

[收稿日期] 20160408(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260652);广西壮族自治区“八桂学者”工程专项

[第一作者] 曹小雨, 硕士, 从事心脑血管药理学研究, E-mail: 652620945@qq.com

[通讯作者] * 杨秀芬, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事心脑血管药理学研究, Tel: 0771-2279423, E-mail: xiufenyang@163.com

behavioral score ($P < 0.01$) at 168 h, and up-regulation in the expressions of CYP4A3, CYP4A8 ($P < 0.01$). The content of eNOS was increased in brain tissues and serum. Compared with model group, Bre 12 mg·kg⁻¹ group and Bre 6 mg·kg⁻¹ group showed significant reduction in motility ($P < 0.05$), volume of cerebral infarction ($P < 0.01$) at 168 h, behavioral score ($P < 0.01$) after 24 h, and down-regulation in the expressions of CYP4A3, CYP4A8 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the content of eNOS ($P < 0.01$) in brain tissues and serum. Bre 3 mg·kg⁻¹ group showed significant reduction in the behavioral score ($P < 0.01$) at 120 h and the content of eNOS ($P < 0.01$), and down-regulation in the expression of CYP4A3, CYP4A8 ($P < 0.01$) in brain tissues. **Conclusion:** Motility, volume of cerebral infarction and behavioral score were increased by cerebral ischemia reperfusion injury, the expression of CYP4A3, CYP4A8 were up-regulated, and the content of eNOS was increased in brain tissues. Breviscapine injection could cure cerebral ischemia reperfusion injury of rats by reducing the volume of cerebral infarction, behavioral score, which may be correlated with down-regulation in the expressions of CYP4A3, CYP4A8 in brain tissues.

[Key words] Breviscapine injection; middle cerebral artery occlusion (MCAO); cytochrome (CYP); gene expression; brain tissue

灯盏花素 (Breviscapine, Bre)^[1] 为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* 中提取分离所得的黄酮类化合物, 其注射剂中灯盏乙素的纯度达到 98.0%, 并具有活血化瘀、通络止痛的药理作用, 可用于中风及其后遗症、冠心病、心绞痛等疾病的治疗。在治疗脑血管疾病的方面, 灯盏花素可通过降低血液黏稠度, 改变血液流变学, 抑制血小板凝聚, 减少脑水肿的程度, 对脑梗死、脑血栓、脑出血起到治疗作用^[2]。灯盏花素注射剂在临床上用于治疗缺血性脑血管疾病已较为广泛。CYP450 是一组含有亚铁血红素蛋白的酶, 属于单加氧酶系。通过研究发现, 调控 20-羟-二十烷四烯酸 (20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE) 是用来控制血管收缩重要的一条通路, 它是花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 经 CYP 途径产生的, 而 CYP4A 家族是这条通路上主要的代谢酶^[3], 同时也会使内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 解耦连, 释放出更多的活性氧簇 (ROS), 加重血管功能障碍。有研究显示, 抑制 CYP4A 可明显改善大鼠脑缺血再灌注损伤^[4-5]。通过调控 CYP4A 家族成员来治疗脑缺血再灌注损伤已成为新的研究方向, 并且灯盏花素注射剂经过 CYP 通路的机制尚未见有报道。因此, 本实验通过对 CYP4A1, CYP4A3, CYP4A8 表达以及 eNOS 含量的研究来探讨灯盏花素注射剂治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 240 ~ 300 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (桂) 2014-0002。本实验经广西中医药大

学伦理委员会批准, 实验动物符合中国伦理委员会指导原则, 大鼠饲养于广西中医药大学实验动物中心。

1.2 试剂 0.9% 氯化钠注射液 (贵州天地药业有限责任公司, 批号 G15022203); 注射用灯盏花素 (昆明龙津药业股份有限公司, 批号 20150122-2); 大鼠 eNOS (武汉华美生物工程有限公司, 批号 P26013105); Trizol, 无 RNA 酶的糖原 (Invitrogen Life Technologies 公司, 货号分别为 10296028, W450-1L); 甲醛上样染液 (Ambion 公司, 批号 Am8547); RNA 酶抑制剂, MMLV 反转录酶, 10 × RT 缓冲液 (Epicentre 公司, 货号分别为 SRI6310K, RF910100, RF910100); Oligo (dT)₁₈ (上海生工生物工程有限公司, 批号 C600214); 2 × PCR master mix (Superarray 公司, 货号 AS-MR-006-25); Gold View 染料 (上海赛百胜基因技术有限公司, 货号 HGV-II); 琼脂糖 (生工生物工程有限公司, 货号 AB0013); 引物设计软件 Primer 5.0, 由上海康成生物工程有限公司合成, CYP4A1 (288 bp): 上游 5'-ATGGCAGTGTTCAGGTGGAT-3', 下游 5'-CCATTCTGGCAAGTAAGAGGAT-3'; CYP4A3 (63 bp): 上游 5'-TACCTGCATTTGTTACTGGCTA-3', 下游 5'-CAGAGGATGGGAA TCAAAGAG-3'; CYP4A8 (224 bp): 上游 5'-TGCCCTTGTTATTTCTGTGAC-3', 下游 5'-GCTGGAACAATGGCTCTTTGA-3'; β-actin (202 bp): 上游 5'-CGAGTACAACCTTCTTGCAGC-3', 下游 5'-ACCCATACCCACCATCACAC-3'。

1.3 仪器 DK-8D 型电热恒温水槽 (上海森信实验仪器有限公司), System9700 型 Gene AmpPCR (美

国 Applied Biosystems 公司), TaKaRa 型 PCR Thermal Cycler[宝生物工程(大连)有限公司]。

2 方法

2.1 分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 193 只,饲养于广西中医药大学动物实验中心,动物房和实验室温度(22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 5)%,12 h/12 h 明暗交替,避免强光、噪音等刺激。普通饲料喂养,自由进食进水。由于用于计算脑缺血再灌注损伤 168 h 后大鼠脑梗死体积的脑组织不可再用于其他指标的测定,故本次实验将大鼠分为 3 批,第 1 批,造模前随机分为 5 组,即假手术组 10 只,模型组 23 只,高剂量组 13 只,中剂量组 17 只,低剂量组 17 只,造模后进行大鼠死亡率统计、行为学评分及脑梗死体积的测定。第 2 批,造模前随机分为 5 组,即假手术组 7 只,模型组 10 只,高、中、低剂量组各 10 只,造模后进行大鼠死亡率统计、行为学评分及脑组织细胞色素(CYP)指标的测定。第 3 批,造模前随机分为 5 组,即假手术组 10 只,模型组 17 只,高、中、低剂量组各 13 只,造模后进行大鼠死亡率统计、行为学评分及脑组织和血清 eNOS 的测定。

2.2 给药剂量及方式 按说明书要求,注射用灯盏花素静脉注射剂量为 $20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,按体表面积换算法^[6],换算成大鼠静脉注射剂量为 $2.10 \sim 5.25 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。本课题组前期研究发现治疗性尾静脉注射观察 72 h, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤无改善作用。因此,此次实验给药剂量设置为灯盏花素高、中、低剂量($12, 6, 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,假手术组、模型组给予等体积 0.9% 氯化钠注射液,在脑缺血 2 h,再灌注后立即尾静脉注射,以后均按此剂量给药,1 次/d,连续给药 7 d。

2.3 大脑中动脉栓塞法模型复制 大鼠术前 12 h 禁食不禁水。采用大脑中动脉栓塞法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,参照文献[7]进行 MCAO 模型的建立,10% 水合氯醛溶液麻醉大鼠,在大鼠脖颈部中央切开 $20 \sim 25 \text{ mm}$ 开口,分离肌肉,找到颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎 ECA,并在这三条动脉的分叉处(三叉口)埋入 1 条 $10 \sim 15 \text{ cm}$ 长的缝合线,并打一虚结。用动脉夹夹紧 CCA 近心端与颈内动脉远心端,并用电凝笔将周围细小的血管电凝。在 ECA 远心端剪开,将线栓插入近心端,插至 CCA 处,扎牢三叉口处的虚结。移除动脉夹,剪断结扎于 ECA 远心端的线,将线栓抽回至三叉口处,将 ECA 与 ICA 成一直线,将线栓插入 ICA,当线栓进入约 20 mm 时停止,线栓插入

深度一般不超过 22 mm ,这样可使线栓刚好堵住大脑中动脉(MCA),缝合皮肤。大鼠右脑中动脉栓塞 2 h 后,恢复血流再灌注 168 h。假手术组仅分离血管。造模后,自然地提起鼠尾,大鼠对侧前肢内曲则说明造模成功。造模后参照文献,采用 18 分制法对大鼠进行行为学评分测定。评价标准,0~6 分为轻度损伤;7~12 分为中度损伤;13~18 分为重度损伤^[7]。

2.4 大鼠脑组织制备 术后 168 h,用 0.9% 冰氯化钠注射液进行心脏灌注,冲去大鼠脑部的血液,在冰面上取出大鼠大脑后立即液氮速冻, -80°C 保存,用于总 RNA 提取、基因表达分析及 eNOS 含量测定。利用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 eNOS 含量,使 eNOS 形成相对应的抗体-抗原-酶标抗体复合物,检测 450 nm 处吸光度 A 。

2.5 大鼠血清制备 术后 168 h,大鼠经 10% 水合氯醛麻醉后,取仰卧位放置于手术板上,并用真空采血管腹主动脉取血, 4°C 静置 1 h 后以 $3\,000 \sim 3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清, -80°C 保存,采用 ELISA 测定 eNOS 含量,测定方法同 2.4 项。

2.6 总 RNA 的提取 取 100 mg 组织样品,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, -80°C 保存。使用 NanoDrop[®] ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 的完整性。

2.7 合成 cDNA 按试剂盒说明书配制退火混合物, 37°C 恒温 1 min, 50°C 温育 60 min, 70°C 温育 15 min 使酶失活,cDNA -20°C 保存。

2.8 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) DNA 模板的制备,针对需要测量的基因和管家基因,选择确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应,反应条件: 95°C 10 min, 95°C 10 s, 60°C 60 s,40 个循环。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,检测是否为单一特异性扩增条带。

PCR 反应,将所有 cDNA 样品分别配置 Real-time PCR 反应体系,置于 Real-time PCR 仪上进行 PCR 反应,反应条件: 95°C 10 min, 95°C 10 s, 60°C 60 s,40 个循环。建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按 95°C 10 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s;并从 60°C 缓慢加热到 99°C 。每个样品目的基因浓度/管家基因浓度,即为此样品基因的校正后相对含量。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件,组间比较采用单因素方差分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。死亡率采用 Fisher 精确概率检验法统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 灯盏花素对大鼠造模情况与死亡率的影响

第 1 批大鼠假手术组存活 10 只,模型组存活 12 只,灯盏花素高、中、低剂量组分别存活 10,12,7 只;第 2 批大鼠假手术组存活 7 只,模型组存活 5 只,灯盏花素高、中、低剂量组分别存活 7,7,6 只。第 3 批

大鼠假手术组存活 10 只,模型组存活 10 只,灯盏花素高、中、低剂量组分别存活 10,10,7 只;与假手术组比较,模型组造模后大鼠的死亡率显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,灯盏花素高、中剂量组死亡率明显降低($P < 0.05$);低剂量组对大鼠死亡率无明显影响。见表 1。

表 1 灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤不同时间点死亡数及死亡率的影响

Table 1 Effect of Breviscapine injection on mortality in different time of rats

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 4 h/只 | 8 h/只 | 24 h/只 | 48 h/只 | 72 h/只 | 96 h/只 |
|------|------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 假手术 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 模型 | - | 2 | 6 | 7 | 10 | 12 | 14 |
| 灯盏花素 | 12 | 0 | 2 | 2 | 2 | 5 | 6 |
| | 6 | 1 | 2 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| | 3 | 2 | 5 | 5 | 6 | 8 | 12 |

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 120 h/只 | 144 h/只 | 168 h/只 | 合计 h/只 | 总死亡率/% |
|------|------------------------|---------|---------|---------|--------|------------------|
| 假手术 | - | 0 | 0 | 0 | 27 | 0 |
| 模型 | - | 17 | 20 | 23 | 50 | 46 ¹⁾ |
| 灯盏花素 | 12 | 7 | 8 | 9 | 36 | 25 ²⁾ |
| | 6 | 8 | 9 | 11 | 40 | 27 ²⁾ |
| | 3 | 16 | 20 | 20 | 40 | 50 |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 灯盏花素对大鼠行为学评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 4~168 h 的行为学评分显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,再灌注 24 h 后,灯盏花素高、中剂量组评分明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),再灌注 48 h 后,灯盏花素高、中剂量组评分显著降低($P < 0.01$),且评分趋于稳定,变化波动幅度不大;再灌注 120 h 后,灯盏花素低剂量组行为学

评分明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 灯盏花素对大鼠脑梗死体积的影响

与假手术组比较,模型组大鼠再灌注 168 h 后脑梗死体积显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,再灌注 168 h 后,灯盏花素高、中剂量组大鼠脑梗死体积显著降低($P < 0.01$);而低剂量组大鼠脑梗死体积无明显变化。见表 3。

表 2 灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤不同时间点行为学评分的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Breviscapine injection on score of ethology in different time of rats($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | n | 4 h | 8 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|------|------------------------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 模型 | - | 27 | 12.2 ± 0.40 ¹⁾ | 12.2 ± 0.65 ¹⁾ | 12.5 ± 0.49 ¹⁾ | 12.5 ± 0.50 ¹⁾ | 12.2 ± 0.77 ¹⁾ |
| 灯盏花素 | 12 | 27 | 11.5 ± 0.77 | 11.4 ± 0.69 | 11.0 ± 0.91 ³⁾ | 10.3 ± 0.57 ³⁾ | 10.4 ± 0.77 ³⁾ |
| | 6 | 29 | 12.0 ± 0.64 | 11.7 ± 0.57 | 11.7 ± 0.42 ²⁾ | 11.2 ± 0.64 ³⁾ | 11.0 ± 0.54 ³⁾ |
| | 3 | 20 | 12.3 ± 0.92 | 12.4 ± 0.69 | 12.2 ± 0.56 | 11.9 ± 0.83 | 11.6 ± 0.93 |

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | n | 96 h | 120 h | 144 h | 168 h |
|------|------------------------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 模型 | - | 27 | 12.2 ± 0.77 ¹⁾ | 12.3 ± 0.93 ¹⁾ | 11.6 ± 0.94 ¹⁾ | 11.6 ± 0.70 ¹⁾ |
| 灯盏花素 | 12 | 27 | 9.88 ± 0.58 ³⁾ | 9.29 ± 0.89 ³⁾ | 9.06 ± 0.53 ³⁾ | 8.65 ± 1.08 ³⁾ |
| | 6 | 29 | 10.8 ± 0.64 ³⁾ | 10.5 ± 0.60 ³⁾ | 10.2 ± 0.78 ²⁾ | 9.94 ± 0.72 ³⁾ |
| | 3 | 20 | 11.4 ± 0.79 | 11.2 ± 0.75 ²⁾ | 11.1 ± 0.74 | 10.9 ± 0.79 |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 3 灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注 168 h 后脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Breviscapine injection on volume of cerebral infarction at 168 h after cerebral ischemia-reperfusion($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | n | 梗死体积/% |
|------|------------------------|----|---------------------------|
| 假手术 | - | 10 | 0.00 ± 0.00 |
| 模型 | - | 12 | 32.5 ± 5.00 ¹⁾ |
| 灯盏花素 | 12 | 10 | 17.5 ± 7.00 ²⁾ |
| | 6 | 12 | 19.6 ± 4.00 ²⁾ |
| | 3 | 7 | 29.5 ± 6.00 |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。

3.4 灯盏花素对大鼠脑组织 CYP4A1, CYP4A3, CYP4A8 mRNA 表达的影响

表 4 灯盏花素对脑组织 CYP4A1, CYP4A3, CYP4A8 mRNA 相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Breviscapine injection on CYP4A1, CYP4A3, CYP4A8 mRNA expression in brain homogenate of rats($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | CYP4A1 | CYP4A3 | CYPCYP4A8 |
|------|------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 假手术 | - | 1.000 ± 0.000 1 | 1.000 ± 0.000 4 | 1.000 ± 0.000 1 |
| 模型 | - | 1.000 ± 0.000 3 | 9.780 ± 0.000 5 ¹⁾ | 1.600 ± 0.000 2 ¹⁾ |
| 灯盏花素 | 12 | 0.800 ± 0.000 2 | 0.460 ± 0.000 6 ³⁾ | 0.620 ± 0.000 7 ²⁾ |
| | 6 | 0.930 ± 0.000 2 | 0.310 ± 0.000 1 ³⁾ | 0.430 ± 0.000 3 ³⁾ |
| | 3 | 0.950 ± 0.000 2 | 0.130 ± 0.000 1 ³⁾ | 0.570 ± 0.000 1 ³⁾ |

表 5 灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注 168 h 脑组织及血清 eNOS 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of Breviscapine injection on eNOS level in brain homogenate and serum of rats($\bar{x} \pm s, n = 5$) U·mL⁻¹

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 脑组织 | 血清 |
|------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术 | - | 226 ± 44.2 | 124 ± 11.7 |
| 模型 | - | 258 ± 34.9 ¹⁾ | 394 ± 19.0 ¹⁾ |
| 灯盏花素 | 10 | 167 ± 26.7 ²⁾ | 196 ± 17.3 ²⁾ |
| | 6 | 188 ± 27.9 ²⁾ | 272 ± 23.7 ²⁾ |
| | 3 | 158 ± 25.3 ²⁾ | 380 ± 36.1 |

4 讨论

20-HETE 是 AA 通过细胞色素 P450 酶代谢的产物,有多种生物学功能,包括对多种器官中血流的控制,其中主要分布在脑细胞和脑部血管中。20-HETE 被认为在使平滑肌细胞对抑制刺激物和增加血管肌源性紧张度的敏感上,促进内皮细胞失活、激活都起着重要的作用;YANG 等^[8]研究发现,20-HETE 是造成全脑损伤的主要蛋白质,其抑制剂可通过抑制氧化应激来减少脑损伤。ZHANG 等^[9]研究发现,20-HETE 抑制剂 HET1006 可有效的减少大脑血管以及中风所形成的脑损伤。Renic 等^[10]研究

模型组 CYP4A3 基因表达显著下调($P < 0.01$), CYP4A8 基因表达明显上调($P < 0.05$)。与模型组比较,灯盏花素高、中、低剂量组 CYP4A3 表达显著下调($P < 0.01$),CYP4A8 表达明显下调($P < 0.05, P < 0.01$);灯盏花素高、中、低剂量组对 CYP4A1 的表达无影响。见表 4。

3.5 灯盏花素对大鼠脑组织及血清 eNOS 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织和血清中 eNOS 的含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,灯盏花素高、中、低剂量组脑组织 eNOS 含量显著下调($P < 0.01$);灯盏花素高、中剂量组血清 eNOS 含量显著下调($P < 0.01$)。见表 5。

发现,HET1006 可保护糖氧剥夺模型(OGD)中的海马组织,减少脑组织的损害。Dunn 等^[11]研究发现,当抑制了 20-HETE 的合成,自发性高血压大鼠和卒中中性自发性高血压大鼠在脑梗 1 h 后,脑梗死体积分别减少了 59% 和 87%。20-HETE 可通过解耦连 eNOS 抑制 NO 产生和刺激超氧阴离子的形成,这就表明,20-HETE 活性的增强减少了 NO 的生物利用率,更加容易诱发氧化应激^[12]。当 CYP4A 表达上调,20-HETE 的含量也随之增多,使 eNOS 解耦连,释放出更多的 ROS,加重血管功能障碍^[13]。这就说明,CYP4A 家族和 ROS 的释放以及脑缺血再灌注损伤有着密切的关系。

AA 也主要通过 20-HETE 这条通路来完成代谢的,CYP4 家族主要负责脑部血管中 20-HETE 的产生,CYP4A3 是在大鼠脑部血液循环中最主要的,CYP4A11 和 CYP4F2 主要在人体中存在;CYP4A1, 4A2/3, CYP4A8, CYP4F1 和 CYP4F4 主要分布在大鼠脑部血液循环中^[14];CYP4A12 主要分布在小鼠体内^[15]。通过抑制 20-HETE 水平则可减少由于中风所带来的脑损伤,因此 CYP4A 酶的代谢产物是心脑血管疾病以及神经功能失调重要的调控受体。

本研究发现,当大鼠脑缺血再灌注损伤 168 h 后,CYP4A3 和 CYPCYP4A8 的表达有不同程度的

上调,在用高、中、低剂量的灯盏花素注射剂干预后,可使 CYP4A8, CYP4A3 的表达下调。Dunn 等^[11]研究发现,在大鼠脑梗 1 h 后,卒中型自发性高血压大鼠脑组织 CYP4A1, CYP4A3, CYP4A8 的表达明显上调,并且上调程度高于自发性高血压大鼠,但其并未对 eNOS 的表达或含量进行测定, eNOS 是 CYP4A 家族代谢通路上最为重要的靶点之一^[16]。本实验发现,当大鼠脑组织受到缺血性再灌注损伤后 CYP4A3, CYP4A8 的表达也呈现出上调,并发现 eNOS 的含量会随之增加,当灯盏花素注射剂干预后 CYP4A3, CYP4A8 的表达下调, eNOS 的含量减少。灯盏花素 3 种剂量对 CYP4A1 的表达均无任何影响, Birnie 等^[17]研究发现,在大脑损伤 24 h 时 CYP4A1 的表达可上调 3 倍,但在 168 h 时未见表达,这可能是本实验未检测出灯盏花素注射剂 3 种剂量对大鼠脑缺血再灌注损伤 168 h 后 CYP4A1 表达的原因。

综上所述,灯盏花素注射剂可能通过调控 CYP4A3, CYP4A8, 从而减少 ROS 的释放,进而减轻大鼠脑缺血再灌注 168 h 后的损伤。

[致谢]上海康成生物工程有限公司为实验的 Real-time PCR 提供技术服务!

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 147-148.

[2] 周莉. 灯盏花素的心脑血管药理及临床研究进展[J]. 中医药信息, 2013, 36(10): 134-138.

[3] Imig J D, Simpkins A N, Marija R, et al. Cytochrome P450 eicosanoids and cerebral vascular function[J]. Expert Rev Mol Med, 2011, 13(3): 267-286.

[4] Toth P, Csiszar A, Sosnowska D, et al. Treatment with the cytochrome P450 ω -hydroxylase inhibitor HET0016 attenuates cerebrovascular inflammation, oxidative stress and improves vasomotor function in spontaneously hypertensive rats[J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(8): 1878-1888.

[5] Renic M, Klaus J A, Omura T, et al. Effect of 20-HETE inhibition on infarct volume and cerebral blood flow after transient middle cerebral artery occlusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(3): 629-639.

[6] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[7] Longa Z E, Weinstein E R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in

rats[J]. Stoke, 1989, 20(1): 84-92.

[8] YANG Z J, Carter E L, Kibler K K, et al. Attenuation of neonatal ischemic brain damage using a 20-HETE synthesis inhibitor[J]. J Neurochem, 2012, 121(1): 168-179.

[9] ZHANG Y, Hoda M N, ZHEN X, et al. Combined therapy with COX-2 inhibitor and 20-HETE inhibitor reduces colon tumor growth and the adverse effects of ischemic associated with COX-2 inhibitor[J]. Am J Physiol Integr Comp Physiol, 2014, 307(6): R693-703.

[10] Renic M, Kumar S N, Gebremedhin D, et al. Protective effect of 20-HETE inhibition in a model of oxygen-glucose deprivation in hippocampal slice cultures[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302(6): H1285-H1293.

[11] Dunn K M, Renic M, Flasch A K, et al. Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. Am J Physiol Circ Physiol, 2008, 295(6): H2455-H2465.

[12] Gainer J V, Bellamine A, Dawson E P, et al. Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension[J]. Circulation, 2005, 111(1): 63-69.

[13] Lukaszewicz K M, Lombard J H. Role of the CYP4A/20-HETE pathway in vascular dysfunction of the Dahl salt-sensitive rat[J]. Clin Sci: Lond, 2013, 124(12): 695-700.

[14] XU F, Falck J R, Ortiz de Montellano P R, et al. Catalytic activity and isoform-specific inhibition of rat cytochrome p450 4F enzymes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308(3): 887-895.

[15] Muller D N, Schmidt C, Barbosa-Sicard E, et al. Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation[J]. Biochem J, 2007, 403(1): 109-118.

[16] CHEN J, OU J S, SING H, et al. 20-hydroeicosatetraenoic acid causes endothelial dysfunction via eNOS uncoupling[J]. Am J Physiol Circ Physiol, 2008, 294(2): H1018-H1026.

[17] Birnie M, Morrison R, Camara R, et al. Temporal changes of cytochrome P450 (Cyp) and eicosanoid-related gene expression in the rat brain after traumatic brain injury[J]. Bmc Genomic, 2013, 14(1): 69-75.

[责任编辑 张丰丰]