

黄连素对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血脑区 细胞黏附分子表达的影响

甘露*

(辽宁医学院附属第三医院, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] 目的:观察大鼠局灶性脑缺血再灌注后缺血脑区细胞间黏附分子-1(ICAM-1)以及 P-选择素(P-selectin)的表达和黄连素对两者的影响。方法:将 36 只大鼠随机分为 3 组:假手术组,模型组,给药组。给药组分别于栓塞前 15 min 和栓塞后 2 h,再灌注时 ip 给黄连素 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;模型组和假手术组 ip 等量生理盐水。采用大脑中动脉线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。再灌注 24 h 后取脑,应用免疫组化方法检测 ICAM-1 和 P-selectin 的表达。结果:黄连素能够显著降低缺血再灌注引起的脑梗死体积以及脑组织 ICAM-1, P-selectin 的表达增高($P < 0.05$)。其中梗死体积从 25% 降至 17%;ICAM-1 阳性细胞百分率从平均 65% 降至 35%;P-selectin 从平均 60% 降至 30%。结论:黄连素能够通过脑缺血再灌注炎症反应的免疫调节机制保护脑缺血再灌注引起的损害。

[关键词] 脑缺血再灌注;黄连素;细胞间黏附分子;P-选择素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0240-03

Effect of Berberine on Expressions of Cell Adhesion Molecules in Rats with Middle Cerebral Artery Occlusion

GAN Lu*

(The 3rd hospital of liaoning medical college, Jinzhou 121000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of berberine on the expressions of cell adhesion molecules in rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Method:** Thirty-six rats were randomly divided into 3 groups: model group, Sham-operated group and berberine group. We used transient rat MCAO model for brain ischemia. Berberine ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was given twice intraperitoneally: 15 min pre-occlusion and 2 h post-occlusion at the time of reperfusion. The expressions of ICAM-1 and P-selectin berberine were analyzed by immunohistochemistry method. **Result:** Berberine significantly decreased the infarct volume and the expressions of ICAM-1 and P-selectin ($P < 0.05$). **Conclusion:** Berberine may protect the brain injury induced by ischemia-reperfusion through the immunoregulation to the inflammation reaction after brain ischemia.

[Key words] cerebral ischemia-reperfusion; berberine; interllular adhesion molecule; P-selectin

缺血性脑血管病是临床常见病,其发病率高、预后较差,现已成为中老年人第一致残和前三位致死原因^[1]。溶栓是当前唯一确切有效的方法,但由于时间窗的限制,仅适用约 5% 的患者^[2]。因此,寻找有效的神经保护剂显得尤为迫切。脑缺血再灌注损

伤机制十分复杂,大量证据表明:炎症反应是造成缺血再灌注后脑损伤的主要原因。炎症反应的关键步骤是白细胞与血管内皮细胞黏附、外渗,而这一过程的始动因素部分是由白细胞与血管内皮细胞表面表达的细胞间黏附分子和其配基介导。与脑缺血再灌注损伤有关的黏附分子有两类,即选择素家族和免疫球蛋白超家族。其中尤以 P-选择素(P-selectin)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)所起的作用更为重

[收稿日期] 2010-11-08

[通讯作者] *甘露, Tel: 0416-3999055, E-mail: 809105968@qq.com

要^[3]。黄连素是一种异喹啉生物碱,实验发现黄连素能够有效保护脑缺血^[4]。本研究主要观察其对缺血脑区 ICAM-1 以及 P-selectin 表达的影响,探讨黄连素抗脑缺血再灌注的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,体重 180 ~ 220 g,由南京大学实验动物中心提供(动物编号 JSNJ2009-0007)。

1.2 药物与试剂 黄连素购自上海源叶生物科技有限公司;P-selectin 和 ICAM-1 免疫组化试剂盒,多聚甲醛均购自德国 Merck 公司(批号 201091, 201099)。

2 方法

2.1 脑缺血再灌注造模与给药 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、给药组,每组 12 只。参照 Longa^[5]等报道的线栓法加以改进。栓线采用直径为 0.26 ~ 0.28 mm 的尼龙鱼线,大鼠以 7% 水合氯醛 5 mL·kg⁻¹ ip 麻醉后,仰卧固定,分离并暴露右侧颈总及颈内外动脉,从颈外动脉至颈内动脉插入大脑中动脉遇阻即止,进线长度约为 18 mm,栓塞成功的大鼠在缺血 2 h 后,拔除尼龙鱼线进行再灌注。缝合切口后,室温下禁食给水喂养。假手术组大鼠麻醉切开颈部皮肤后,仅分离颈总动脉及颈内动脉至翼腭动脉,不进行栓塞。给药组分别于栓塞前 15 min 和栓塞后 2 h,再灌注时 ip 黄连素 30 mg·kg⁻¹。

2.2 神经行为学评分 参照文献报道^[4]的方法:0 分:无显著异常;1 分:将大鼠尾尖提起对侧前肢不能伸直;2 分:能自由向各个方向活动,但按压尾巴时只向对侧旋转;3 分:大鼠自发地向对侧旋转;4 分:无外在刺激大鼠无自发运动;5 分:评分前已死亡。

2.3 梗死体积的测定 采用 TTC 染色的方法:再灌注 24 h 后,将各组 5 只大鼠处死后开颅取脑。将鼠脑置 -4 °C 冰箱 20 min 后,将其切成 5 等份冠状位切片,置于 2% TTC 溶液中,水浴、多聚甲醛液固定。用 imagine2 病理图像分析软件计算出梗死灶体积,各脑片梗死灶体积之和即为梗死体积。

2.4 免疫组化检测 ICAM-1, P-selectin 再灌注 24 h 后,麻醉,多聚甲醛透心灌注后,迅速取脑,置于多聚甲醛中 4 °C 外固定 24 h。将固定后的脑组织常规脱水、浸蜡、包埋后切成 5 μm 厚的连续冠状石蜡切片,每隔 10 张取 1 张,每份组织各取 4 张分别做

ICAM-1 和 P-selectin 染色。在高倍视野下(400 ×)沿缺血侧大脑皮层和基底节区以阳性染色的单个微血管内皮细胞作为阳性细胞,随机选取 5 个视野,用计算机图像分析仪计数各组阳性细胞(细胞核中有棕色颗粒),并计算阳性细胞百分率。

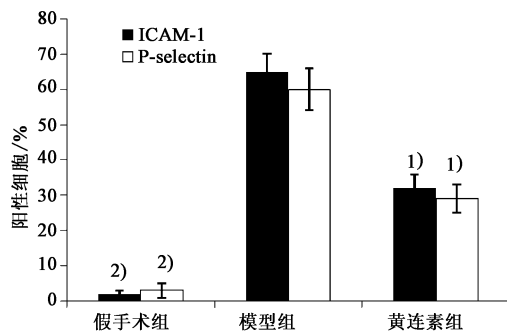
2.5 统计分析 采用 SPASS 12.0 软件,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间采用方差分析。 $P < 0.05$ 为有显著差异。

3 结果

3.1 黄连素对大鼠缺血再灌注梗死体积的影响 TTC 染色后,缺血再灌注 24 h 左侧大脑半球梗死区呈白色,正常组织呈红色。部分组织表现为由白色向红色过度区。用 Imagine tool 2. 软件扫描计算。梗死体积以梗死体积/半脑体积 × 100% 表示。模型组梗死体积为(47.2 ± 2.5)%。黄连素组梗死体积为(24.1 ± 4.8)% ,较模型组显著减小($P < 0.05$)。

3.2 神经行为学评分 模型组为(2.5 ± 0.5)分;给药组为(1.5 ± 0.5)分,两组比较 $P < 0.05$ 。可见黄连素不仅能缩小梗死体积,同时也能改善缺血再灌注损伤造成的行为学障碍。

3.3 黄连素降低缺血脑区 ICAM-1 和 P-selectin 表达 模型组缺血脑区 ICAM-1 和 P-selectin 阳性细胞表达明显高于假手术组($P < 0.01$)。给药组能显著降低其表达($P < 0.05$)。见图 1。



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 1 黄连素对脑缺血再灌注后脑组织 ICAM-1 和 P-selectin 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

4 讨论

缺血性脑血管病在缺血和再灌注早期伴随着细胞因子、黏附分子表达并促使缺血性损伤向炎症损伤转变^[6]。黏附分子(adhesion molecules)是一类由细胞产生、存在于细胞表面、介导细胞间或细胞与间质间相互接触和结合的糖蛋白分子。其中免疫球蛋白超家族和选择素家族两类黏附分子与缺血性脑损

伤有密切关系。ICAM-1 和 P-selectin 分别是免疫球蛋白家族和选择素家族较为经典的代表^[7]。本研究主要针对 SAC 对缺血再灌注损伤过程中的 ICAM-1 和 P-selectin 表达的影响进行。

P-selectin 是一种跨膜糖蛋白,是血管内皮细胞与血小板活化的特异性标志物^[8]。脑缺血再灌过程中,由于大量自由基的产生,血管内皮细胞受到、氧自由基刺激后,胞浆内的 α -颗粒和 Weibel-Palade 小体迅速与胞膜融合,在细胞表面快速而短暂地表达 P-selectin^[9]。P-选择素通过 1ectin 区和上皮生长因子(EGF)区与中性粒细胞、单核细胞寡糖决定簇相结合,在钙离子参与下,介导中性粒细胞、单核细胞黏附至内皮细胞表面,穿过血管内皮细胞向血管外炎症区域浸润聚集^[10]。脑缺血后在致炎因子如 NF- κ B, IL-1, TNF- α 等的诱导下 ICAM-1 表达升高,一旦缺血区域血流恢复,ICAM-1 可作为配基与白细胞上表达的淋巴细胞功能相关因子(LFA-1)和巨噬细胞活化趋化因子-1 结合^[11],介导中性粒细胞黏附网。一方面可机械性堵塞微循环通道,影响组织的血液供应;另一方面活化的以及已浸润于脑组织的白细胞可释放大量的毒性氧自由基、蛋白水解酶、炎症递质、细胞因子等,损害局部血管,导致血管通透性增加,造成组织水肿,破坏幸存的神经元、胶质细胞,从而加重组织损伤,并吸引更多的白细胞进入脑组织,形成恶性循环,从而加重组织损伤^[12]。

国内有研究表明黄连素对缺血再灌注大脑有保护作用^[4],本实验验证了这一观点,同时发现模型组大鼠脑组织 ICAM-1 以及 P-selectin 显著升高,黄连素组能够显著降低 ICAM-1 和 P-selectin 表达,这表明黄连素的脑保护机制不仅与其抗氧化作用相关,也可能与抑制缺血再灌注 ICAM-1 的表达、进而抑制炎症反应有关。

[参考文献]

- [1] Lees K R, Zivin J A, Ashwood T, et al. NXY-059 for acute ischemic stroke [J]. *N. Engl J Med*, 2006, 354:588.
- [2] Wardlaw J M, Warlow C P, Counsell C. Systematic review of evidence on thrombolytic therapy for acute ischaemic stroke [J]. *Lancet*. 1997, 350: 607.
- [3] Kryzhanovskii G N, Shandra A A, Makul'kin R F. Effect of nicotinamide on epileptic activity in the cerebral cortex [J]. *Bull Exp Biol Med* 1980, 89:37.
- [4] Zhou X Q, Zeng X N, Kong H. Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 447:31.
- [5] Yang G Y, Chen S F, Kinouchi H, et al. Edema, cation content and ATPase activity after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1992, 23: 1331.
- [6] 蔡飞,李彩蓉,樊基颢,等. 茶黄素对大鼠脑缺血再灌注炎症细胞因子的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(1):23.
- [7] 黄启福,王元勋,卫洪昌,等. 病理学 [M]. 北京:科学出版社, 2004, 345.
- [8] Suzuk H, Abe K, Tojo S, et al. Post ischemic expression of P-selectin immunoreactivity in rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 228:151.
- [9] 阎俊,周红. 选择素与缺血性脑血管病 [J]. *国外医学:脑血管疾病分册*, 2005, 1(11):857.
- [10] 曾丽莉,刘振国. 选择素与缺血性脑卒中 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2002, 22(2):182.
- [11] 陈邦国,毛庆菊,孔立红. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血脑区细胞黏附分子表达的影响 [J]. *湖北中医学院学报*, 2006, 8(4):3.
- [12] Danton G H, Diet rich W D. Inflammatory mechanism after ischemia and stroke [J]. *Stroke*, 2003, 62(2): 127.

[责任编辑 何伟]