

· 论 著 ·

# 马来酸桂哌齐特对脑缺血后炎症反应、轴突蛋白的表达及神经功能的影响

黄艳玲, 张敏, 贺曦

(重庆市急救医疗中心神经内科 400014)

**摘要:**目的 研究马来酸桂哌齐特(CM)对大鼠急性脑缺血/再灌注后对脑组织炎症反应、神经丝蛋白-200(NF-200)的表达及神经功能的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠48只,随机设为正常组、假手术组、缺血/再灌注2d及7d组、CM治疗2d组及7d组,分别在两个时间点对动物进行神经功能评分,并用ELISA法测定脑组织IL-1 $\beta$ 、IL-6含量及免疫组化法测定缺血侧皮质NF-200的表达。**结果** 脑缺血/再灌注后第2天,缺血/再灌注组及CM治疗组大鼠脑内IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达明显高于正常组和假手术组( $P < 0.01$ ),而NF-200的表达明显降低( $P < 0.01$ ),神经功能缺损明显( $P < 0.05$ );经CM治疗后,大鼠脑内IL-1 $\beta$ 、IL-6的过度表达被明显抑制( $P < 0.01$ ),NF-200表达明显增加( $P < 0.01$ ),但是神经功能缺损较缺血/再灌注组无明显改善( $P > 0.05$ )。至缺血/再灌注后第7天,缺血/再灌注组各指标较第2天时明显改善( $P < 0.01$ ),而CM治疗组各指标的改善较缺血/再灌注组更为明显( $P < 0.01$ )。**结论** CM能减轻缺血再灌注大鼠脑内炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达,改善局部细胞外环境,促进轴突的再生及大鼠神经功能的恢复。

**关键词:**再灌注损伤;马来酸桂哌齐特;白细胞介素1 $\beta$ ;白细胞介素-6

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)05-0423-03

## Effects of cinepazide maleate on cerebral inflammation, neurite protein and neural function in rats with focal cerebral ischemia /reperfusion

Huang Yanling, Zhang Min, He Xi

(Department of Neurology, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effects of Cinepazide maleate (CM) on brain inflammation, NF-200 expression and neural function in rats after acute cerebral ischemia. **Methods** Forty-eight adult male SD rats were randomly divided into control group, sham group, MCAO/reperfusion group (2 d), MCAO/reperfusion group (7 d), CM treatment group (2 d) and CM treatment group (7 d). IL-1 $\beta$ , IL-6 in brain tissue, cortex NF-200 expression and neural function were observed at 2, 7 days respectively by ELISA, immunohistochemistry after ischemia. **Results** On 2 d after acute cerebral ischemia, IL-1 $\beta$ , IL-6 expression of rats in MCAO/reperfusion group and CM treatment group was obviously higher than that of the control group ( $P < 0.01$ ), while NF 200 expression reduced significantly ( $P < 0.01$ ), and nerve function defect worse ( $P < 0.05$ ). However, after CM treatment, rat brain IL-1 $\beta$ , IL-6 was significantly inhibited ( $P < 0.01$ ) and NF-200 increased ( $P < 0.01$ ) while neurological function score not improved ( $P > 0.05$ ). Until 7 d after ischemia, each index value in MCAO/reperfusion group was improved obviously ( $P < 0.01$ ), while improvement in CM treatment group was more significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Cinepazide maleate could alleviate IL-1 $\beta$ , IL-6 in brain tissue, improves regeneration of axons and the neural function of rats after focal ischemia/reperfusion.

**Key words:** reperfusion injury; cinepazide maleate; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6

白细胞介素(interleukin, IL)是主要由单个核细胞(包括淋巴细胞和单核-巨噬细胞)产生的一组免疫活性因子,作用于淋巴细胞、巨噬细胞和其他细胞,共同参与机体免疫反应、应激反应及炎症的调节。研究发现,IL在脑缺血后表达明显增加,产生神经毒性,介导脑缺血后炎症反应,参与缺血性脑损伤。本研究拟观察马来酸桂哌齐特(cinepazide maleate, CM)对大鼠脑缺血/再灌注后脑组织炎症反应、神经丝蛋白-200(NF-200)的表达及对神经功能的影响,更深入地探讨CM对缺血性脑损伤的保护作用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物与分组** 成年雄性SD大鼠48只,由重庆医科大学实验动物中心提供,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级,体质量250~280g。造模前适应性喂养1周。随机分为正常组、假手术组、缺血/再灌注2d组、缺血/再灌注

7d组、CM治疗2d组和CM治疗7d组,每组8只。

**1.1.2 实验药品与用法** CM由北京四环生物制药有限公司生产,规格为每支80mg。于再灌注后按3.0mg/kg进行稀释,立即从尾静脉注射,每日1次。

#### 1.2 方 法

**1.2.1 大脑中动脉闭塞(MCAO)模型的制作** 术前12h禁食。参照Longa等<sup>[1]</sup>及Nagasawa和Kogure<sup>[2]</sup>的线栓法:用3.5%水合氯醛(1mL/100g,腹腔注射)麻醉大鼠。将麻醉后的大鼠仰卧位固定,备皮,术区消毒,铺无菌洞巾,颈正中切口,暴露并分离右侧颈总、颈外与颈内动脉,电凝颈外动脉的分支,结扎并离断。将颈内动脉与颈外动脉之间的交通支离断,夹闭颈总动脉及颈内动脉,于颈外动脉残端切口向颈内动脉插入栓线(18.0 $\pm$ 0.5)mm,感觉有阻力即达大脑中动脉起始部,固定栓线,缝合伤口。缺血2h后拔出栓线,实现再灌注。大鼠缺血/再灌注6h后的神经功能评分采用Longa评分法<sup>[1]</sup>:0分

为无神经功能缺失症状;1分为轻度局灶性神经功能缺失症状(不能完全伸展左侧前肢);2分为中度局灶性神经功能缺失症状(向左侧转圈);3分为中、重度局灶性神经功能缺失症状(向左侧倾倒);4分为不能自发行走,意识水平降低。1~3分入组,0分和4分者均被剔除。到达时间点后,取材时发现蛛网膜下腔出血者也剔除,随机补充。

**1.2.2 脑组织 IL-1 $\beta$ , IL-6 含量测定** 各组大鼠在脑缺血/再灌注 2 d, 7 d 后断头取脑,于冰盘上迅速取缺血侧大脑半球,用全蛋白提取试剂盒提取蛋白(南京凯基),低温离心后留取上清液,采用 ELISA 测定 IL-1 $\beta$  及 IL-6,试剂购自 R&D 公司,以上 2 个指标均按试剂盒说明操作。

**1.2.3 脑组织 NF-200 免疫组织化学染色** 将大鼠深度麻醉后开胸,用生理盐水与 4% 多聚甲醛各 150 mL 进行灌注,断头取脑,4% 多聚甲醛液中固定 4~6 h,然后放入 70% 乙醇中送组织切片,片厚 8  $\mu$ m。取相同层面切片分别做 HE 染色和免疫组织化学染色。免疫组化采用 S-P 法, DAB 显色。所用抗 NF-200 的一抗浓度均为 1:100,购自博士德公司;S-P 即用型工作试剂盒由北京中杉生物公司提供,免疫组化步骤按照试剂盒说明书操作。NF-200 阳性蛋白的平均光密度值用 Imagepro-Plus 6.0 软件进行测定,具体操作参考软件教程。

**1.3 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,齐性资料组内比较行 *t* 检验,组间比较行单因素方差分析,非齐性资料则行秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 神经功能评分** 根据 Longa 等<sup>[1]</sup>评分法,术后 6 h 缺血/再灌注组和 CM 治疗组大鼠评分(共 32 只)达到 3 分的共 7 只(7/32, 21.9%), 2 分的共 19 只(19/32, 59.4%), 1 分的共 6 只(6/32, 18.7%)。在缺血/再灌注后第 7 天,两组大鼠的评分较

前明显改善( $P < 0.05$ );此外,CM 治疗组大鼠的神经功能改善程度较缺血/再灌注组更明显( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 两组大鼠缺血/再灌注后第 2、7 天神经功能评分( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	第 2 天 ( $n=16$ )	第 7 天 ( $n=16$ )
缺血/再灌注组	2.00 $\pm$ 0.76	1.25 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>
CM 治疗组	2.00 $\pm$ 0.76	0.50 $\pm$ 0.53 <sup>ab</sup>

正常组、假手术组评分为 0;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与缺血/再灌注第 2 天比较;<sup>b</sup>: $P < 0.01$ ,与缺血/再灌注组比较。

**2.2 脑组织 IL-1 $\beta$ , IL-6 的含量** 正常组和假手术组脑组织 IL-1 $\beta$ , IL-6 水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),缺血/再灌注后第 2 天,缺血/再灌注组与 CM 治疗组脑组织 IL-1 $\beta$ , IL-6 水平均较正常组明显升高( $P < 0.01$ ),但治疗组明显低于缺血/再灌注组( $P < 0.01$ )。随后 IL-1 $\beta$ , IL-6 逐渐下降,第 7 天时缺血/再灌注组和 CM 治疗组 IL-1 $\beta$ , IL-6 水平较前明显下降( $P < 0.01$ ),且 CM 治疗组较缺血/再灌注组下降更明显( $P < 0.01$ ),其中 IL-6 的水平与正常组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2.3 脑组织 NF-200 免疫组化检测** 显示正常组和假手术组大鼠皮质内神经元轴突形态规则, NF-200 阳性纤维较长,排布均匀。缺血/再灌注 2 d 组大鼠缺血侧皮质神经元 NF-200 阳性纤维缩短且数量显著减少( $P < 0.01$ ),排布紊乱;7 d 后阳性轴突数目有所增加,但仍低于正常水平( $P < 0.01$ )。与相同时间点缺血/再灌注组相比,CM 治疗组轴突形态较规则, NF-200 阳性纤维表达有所增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 2 各组大鼠脑组织 IL-1 $\beta$ , IL-6 含量的比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

指标	正常组	假手术组	缺血/再灌注组		CM 治疗组	
			第 2 天	第 7 天	第 2 天	第 7 天
IL-1 $\beta$	426.00 $\pm$ 35.43	430.38 $\pm$ 36.36	873.50 $\pm$ 68.41 <sup>a</sup>	616.75 $\pm$ 37.46 <sup>ab</sup>	649.50 $\pm$ 29.95 <sup>ab</sup>	489.25 $\pm$ 43.89 <sup>abc</sup>
IL-6	585.38 $\pm$ 82.52	592.25 $\pm$ 38.17	936.88 $\pm$ 99.57 <sup>a</sup>	776.88 $\pm$ 52.77 <sup>ab</sup>	808.38 $\pm$ 67.33 <sup>ab</sup>	639.50 $\pm$ 52.52 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.01$ ,与正常组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.01$ ,与缺血/再灌注第 2 天比较;<sup>c</sup>: $P < 0.01$ ,与缺血/再灌注第 7 天比较。

表 3 各组大鼠缺血/再灌注后第 2、7 天缺血侧皮质 NF-200 的平均光密度值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	平均光密度值	
	第 2 天	第 7 天
正常组	0.333 $\pm$ 0.064	0.333 $\pm$ 0.064
假手术组	0.315 $\pm$ 0.117	0.317 $\pm$ 0.118 <sup>ab</sup>
缺血/再灌注组	0.118 $\pm$ 0.084 <sup>a</sup>	0.207 $\pm$ 0.037 <sup>ab</sup>
CM 治疗组	0.186 $\pm$ 0.029 <sup>ab</sup>	0.289 $\pm$ 0.143 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.01$ ,与正常组及假手术组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.01$ ,与缺血/再灌注第 2 天比较;<sup>c</sup>: $P < 0.01$ ,与缺血/再灌注第 7 天比较。

## 3 讨论

炎性反应是缺血性卒中的一个重要病理过程,缺血状态下高浓度的炎性细胞因子可能参与了神经损伤。近期研究发现,

IL-1 等可激活局部血管内皮细胞和白细胞,诱导细胞大量牢固的黏附,导致微血管阻塞,从而加重脑细胞的损伤<sup>[3]</sup>。IL-6 也是中枢神经系统缺血相关的重要炎症反应分子之一, IL-1 mRNA 和 IL-6 mRNA 在中枢神经系统海马结构和齿状回均有定位<sup>[4]</sup>, IL-6 水平在脑缺血/再灌注早期升高,认为可能与中性粒细胞和巨噬细胞的浸润有关。在本实验中,通过对大鼠缺血/再灌注第 2 天的脑组织匀浆进行 ELISA 检测,作者发现 IL-1 $\beta$  和 IL-6 均较正常时明显增加,提示 IL 在脑缺血早期即参与了脑损伤的病理、生理过程。之后,在第 7 天, IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平均有所回落,表明了自身调节启动了内源性修复。

长久以来,中枢神经系统损伤后必然导致某些功能永久丧失的悲观理念一直在生物医学界占统治地位。然而,中枢神经系统损伤后丧失的功能是可以得到一定程度恢复的<sup>[5-6]</sup>。脑内神经元胞体只占据皮质总体积的 3%,而轴突、树突及神经胶质则占了 97%,当部分神经元死亡时,存活细胞中丰富的轴突

可通过侧枝出芽的方式取代损伤的轴突,代偿其功能<sup>[7-8]</sup>。NF 是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分,在维护神经元的功能和轴浆转运等一系列与脊髓损伤修复相关的病理、生理变化中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。NF 依据相对分子质量的不同可分为 NF-68、NF-140 及 NF-200 三种。其中 NF-200 在正常情况下只存在于轴索中,而胞体不含或很少含有,故正常时 NF-200 胞体为阴性。有研究发现,在脊髓损伤区附近的神经元在创伤刺激及多种诱导因子的作用下,能大量合成及积存 NF-200 以适应神经再生的需要,此时 NF-200 可在神经元胞体内着色<sup>[10-11]</sup>。脊髓不完全损伤后 NF-200 阳性神经元的数量及神经元胞体着色的程度与后肢的功能恢复情况有密切的关系,说明 NF-200 染色不仅能显示伤后神经元的形态,也能反映其功能状态<sup>[12]</sup>。在缺血/再灌注后,NF-200 在皮质的表达明显减少,这与神经元缺血/再灌注损伤的发生是一致的。轴突的损伤及缺失,必然对神经细胞间的功能联系和传递有着不可避免的影响,因此大鼠的神经功能受损后恢复存在困难。这也与本实验结果是一致的。

CM 作为新一代的哌嗪类钙离子拮抗剂,除了能够抑制钙离子内流、扩张血管外,研究还发现它能通过抑制腺苷脱氨酶的作用延迟腺苷的降解,减少肌酐和次黄嘌呤的生成,使腺苷在组织内蓄积。腺苷作为内源性保护因子在脑缺血损伤中表现出了显著的自稳态调节及神经调节作用<sup>[13]</sup>。本研究运用 CM 对脑缺血/再灌注大鼠进行急性期治疗,从减轻脑组织炎症反应、促进轴突再生及改善神经功能 3 个方面,探讨了 CM 对急性缺血性脑损伤的保护作用。CM 治疗组与缺血/再灌注组比较后发现:CM 能够显著抑制脑内 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的过度表达,明显增加脑皮质 NF-200 的表达,还伴随神经功能缺损的明显改善。这些都提示,CM 可能从以上环节对缺血性脑损伤发挥了较好的保护作用,且这种保护作用随着用药时间的延长更加突出。

#### 参考文献:

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1989, 20(8): 1037-1043.
- [3] 王素香. 脑梗死的治疗 [J]. *中国全科医学*, 2004, 7(4): 215.
- [4] Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S. Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(11): 1256-1262.
- [5] Dong Y, Dobkin BH, Cen SY, et al. Motor cortex activation during treatment may predict therapeutic gains in paretic hand function after stroke [J]. *Stroke*, 2006, 37(6): 1552-1555.
- [6] Meintzschel F, Ziemann U. Modification of practice-dependent plasticity in human motor cortex by neuromodulators [J]. *Cereb Cortex*, 2006, 16(8): 1106-1115.
- [7] Dickson TC, Chung RS, McCormack GH. Acute reactive and regenerative changes in mature cortical axons following injury [J]. *Neuroreport*, 2007, 18(3): 283-288.
- [8] Fenrich KK, Skelton N, MacDermid VE, et al. Axonal regeneration and development of de novo axons from distal dendrites of adult feline commissural interneurons after a proximal axotomy [J]. *J Comp Neurol*, 2007, 502(6): 1079-1097.
- [9] Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice [J]. *Spine*, 2002, 27(5): 480-486.
- [10] Yabe JT, Wang FS, Chylinski T, et al. Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2001, 50(1): 1-12.
- [11] Brook GA, Plate D, Franzen R, et al. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat [J]. *J Neurosci Res*, 1998, 53(1): 51-65.
- [12] 胥少汀, 郭世绂. 脊髓损伤基础与临床 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [13] Saransaari P, Oja SS. Mechanisms of adenosine release in the developing and adult mouse hippocampus [J]. *Neurochem Res*, 2002, 27(9): 911-918.
- [14] Culhane AC, Quackenbush J. Confounding effects in "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis" [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7480-7485.
- [15] Landemaine T, Jackson A, Bellahcene A, et al. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6092-6099.

(收稿日期: 2011-09-22 修回日期: 2011-11-08)

(上接第 422 页)

- [12] Tutt A, Wang A, Rowland C, et al. Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature [J]. *BMC Cancer*, 2008(8): 339.
- [13] Yau C, Esserman L, Moore DH, et al. A multigene predictor of metastatic outcome in early stage hormone receptor-negative and triple-negative breast cancer [J]. *Breast*

*Cancer Res*, 2010, 12(5): R85.

- [14] Culhane AC, Quackenbush J. Confounding effects in "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis" [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7480-7485.
- [15] Landemaine T, Jackson A, Bellahcene A, et al. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6092-6099.

(收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-11-01)