

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.007

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190114.1302.034.html(2019-01-14)

白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注海马损伤的保护作用及对 MMP-9 表达的影响*

张跃奇¹,王媛²,张志强³,梁霞³,张桂青³

(1.新疆医科大学第五附属医院临床心理门诊,乌鲁木齐 830000;2.新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市第四人民医院精神一科 830000;3.石河子大学医学院第一附属医院康复心理科,新疆石河子 832000)

[摘要] **目的** 研究白藜芦醇(RES)对大鼠脑缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用及对基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。**方法** 将大鼠分为假手术组(Sham组)、I/R组和RES组,每组8只。采用线栓法建立短暂性右侧大脑中动脉闭塞模型,造模前连续10d给予药物干预,I/R后进行神经功能损害评价,并检测大脑中动脉血流量变化,最后应用免疫组织化学技术检测海马MMP-9表达。**结果** I/R组和RES组均表现出左侧肢体肌力降低,与Sham组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。与Sham组相比,I/R组和RES组大鼠均表现大脑中动脉血流量不同程度降低($P<0.05$)。Sham组的海马CA1和CA2区MMP-9的平均光密度值均明显低于I/R组和RES组($P<0.01$),I/R组明显高于RES组($P=0.011$)。**结论** I/R前预防性给予RES能有效改善大鼠神经功能损伤预后,其机制可能与RES抑制MMP-9的活性表达有关。

[关键词] 缺血再灌注损伤;白藜芦醇;基质金属蛋白酶;海马

[中图分类号] R741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)03-0386-04

Protective effects of resveratrol on hippocampus damage and its influence on MMP-9 expression in ischemia-reperfusion rats*

ZHANG Yueqi¹,WANG Yuan²,ZHANG Zhiqiang³,LIANG Xia³,ZHANG Guiqing³

(1. Department of Clinical Psychology, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830000, China; 2. Department of Psychiatry, Urumqi Municipal Fourth People's Hospital, Urumqi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830000, China; 3. Department of Rehabilitation and Psychology, First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 832000, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of resveratrol (RES) on the hippocampus damage and its influence on expression of MMP-9 in ischemia-reperfusion (I/R) rats. **Methods** The rats were divided into the sham operation group (Sham group), I/R group and RES group, 8 cases in each group. The transient right side middle cerebral artery occlusion model was established by adopting the suture-occluded method. The medication intervention was given for continuous 10 d before constructing the model. The damage of nerve function was evaluated after I/R and the change of middle cerebral artery blood flow was detected. Finally, the immunohistochemistry technique was adopted to measure the expressive level of MMP-9 in hippocampus. **Results** The left limb muscle strength in the I/R group and RES group was decreased, which showed the statistical difference compared with the Sham group ($P<0.05$). Compared with the Sham group, the I/R group and RES group manifested by different degrees of cerebral blood flow decrease ($P<0.05$). The average optical density value level of MMP-9 in the hippocampus CA1 and CA2 areas in the Sham group was significantly lower than that in the I/R group and RES group ($P<0.01$), while the I/R group was significantly higher than the RES group ($P=0.011$). **Conclusion** Prophylactically use of RES could effectively improve the prognosis in rat neural function damage and its mechanism might be related with RES inhibiting the MMP-9 active expression.

[Key words] ischemia-reperfusion; resveratrol; metalloproteinases; hippocampus

因心脏骤停、严重缺氧等情况导致的短暂性脑缺血所引发的缺血性脑卒中最为多见^[1]。短暂性的脑缺血会诱发大脑敏感区如海马组织的神经细胞损伤,这些损伤往往在缺血后数天才表现出一系列的临床症状,因此被称为迟发型神经损伤。迟发型神经损伤的病理机制涉及炎症、氧化应激、细胞凋亡、神经毒性和神经保护等多方面^[2],目前尚未完全阐明。海马区对缺血十分敏感,脑缺血会导致谷氨酸过量分泌,引发大量钙离子进入神经细胞,从而激活多种蛋白酶,最终导致神经毒性,引起神经细胞损伤^[3],甚至凋亡^[4]。基质金属蛋白酶(MMP)在中枢神经系统病理生理过程中发挥重要作用^[5-6],其中 MMP-2 和 MMP-9 参与脑出血和神经损伤的病理过程^[7],与脑损伤密切相关^[8]。白藜芦醇(RES)是一种有丰富生物活性的天然多酚^[9],在缺血再灌注(I/R)损伤中可能起到神经保护的作用^[10-11]。本研究旨在探讨 RES 对短暂性脑缺血后大鼠神经细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 24 只 6 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重(180±25)g,由新疆医科大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(新)2003-0001],所有大鼠为同一批次,经一般体检均无异常。大鼠自由进食饮水,饲养于室温 20~23℃,湿度 50%~60%,严格 12 h:12 h 自然光照的动物房。实验开始前适应环境 1 周。实验过程严格遵守新疆医科大学关于利用实验动物开展研究的规定。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将大鼠分为假手术组(Sham 组)、I/R 组和 RES 组,每组 8 只。

1.2.2 右侧大脑中动脉闭塞大鼠模型建立 I/R 组和 RES 组大鼠采用国际成熟的线栓法建立动物模型^[12]。Sham 组大鼠操作大致与线栓法相同,区别为仅插入尼龙线约 2 mm,以确保不会造成大脑中动脉阻塞。待大鼠意识恢复,将其放于通风良好的原笼中精心饲养。

1.2.3 大鼠神经功能损害评价 根据预实验情况,于手术麻醉苏醒后 10 min 和 I/R 后 72 h 进行两次大鼠神经功能损害评价。采用国际惯用 5 级评价标准:0 分,无神经损害的症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,向外侧转圈;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自主行走,意识丧失^[13]。

1.2.4 激光多普勒大脑中动脉血流量检测 采用激光多普勒流量计(Periflux 5000 系统,Perimed 公司)检测大脑中动脉血流量,检测的 4 个时间点分别为:手术麻醉苏醒后 10 min 及 I/R 后 1、24、72 h。

1.2.5 RES 给药方法 采用无水乙醇溶解 RES(美国 Sigma 公司),并用 0.5% 临界胶束浓度(CMC)溶

液稀释。RES 组给药剂量为 40 mg/kg,每天 1 次腹腔注射,造模前连续 10 d 给药。Sham 组和 I/R 组给予腹腔注射 0.5% CMC,剂量及时间同给药组。

1.2.6 免疫组织化学检测大鼠海马 MMP-9 表达 造模后 72 h 将各组大鼠进行心脏灌注取脑,置于 4℃ 的 4% 多聚甲醛溶液浸泡 24 h。依次进行脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋操作,之后行冠状位连续切片,片厚 3 μm。所有大鼠等间隔选取位置大致相同的海马脑片各 10 张。一抗采用兔抗大鼠 MMP-9(英国 Abcam 公司)。实验设立空白对照(不加一抗和二抗,加磷酸盐缓冲液)和抗体特异性对照(加一抗,不加二抗)。免疫组织化学实验操作按照标准操作流程进行,最后中性树脂封片镜检。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测量视野下阳性表达区域的累积光密度(IOD)和面积(area),并计算最终平均光密度值(MOD=IOD/area)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间均数采用 LSD 检验,组间分析使用 Spearman 相关性检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组神经功能损伤评分 由图 1 所示,手术麻醉苏醒后 10 min 及 I/R 72 h 后进行神经功能损伤评分,I/R 组和 RES 组的大鼠均表现出左侧肢体肌力降低,而 Sham 组无明显神经功能受损表现,与前两组比较差异有统计学意义($F=75.93, P<0.01$)。RES 组评分明显低于 I/R 组,差异有统计学意义($F=4.90, P=0.033$)。I/R 组 I/R 后 72 h 评分较苏醒后 10 min 评分略有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

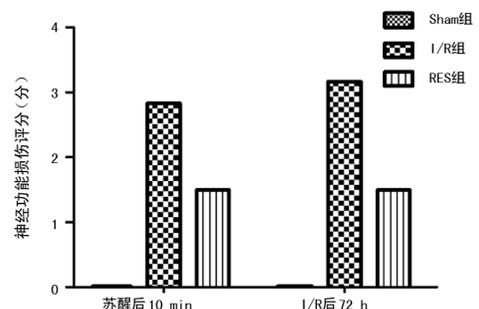


图 1 3 组神经功能损伤评分比较

2.2 大脑中动脉血流量变化检测 与 Sham 组相比,I/R 组和 RES 组大鼠均表现脑血流量不同程度降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。随时间延长,I/R 组和 RES 组大鼠均表现脑血流量逐渐增加,但这两组之间在 4 个时间点脑血流量比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

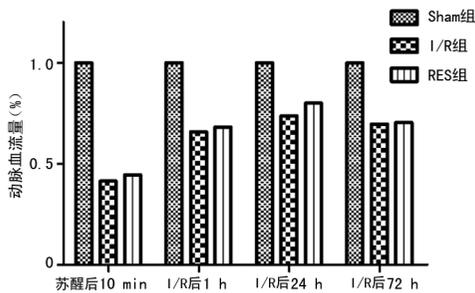


图 2 3 组大脑中动脉血流量比较

2.3 MMP-9 在大鼠海马的表达情况 3 组免疫组织化学图像由图 3 所示, MMP-9 主要定位于细胞质,

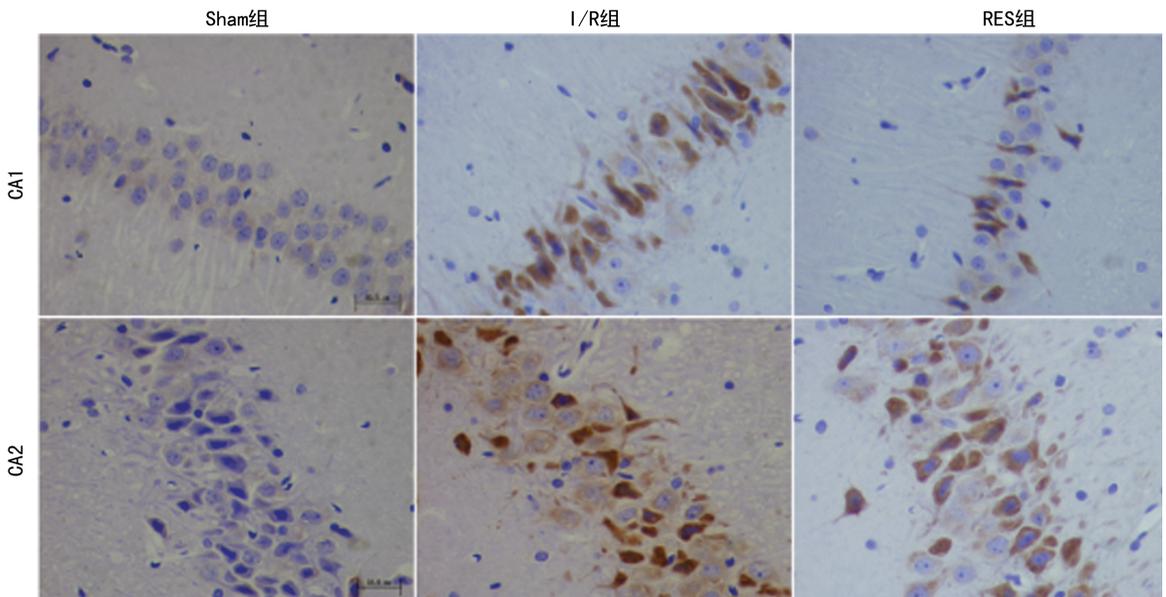


图 3 MMP-9 在大鼠海马 CA1 区和 CA2 区的免疫组织化学图像 (SP 染色法, $\times 400$)

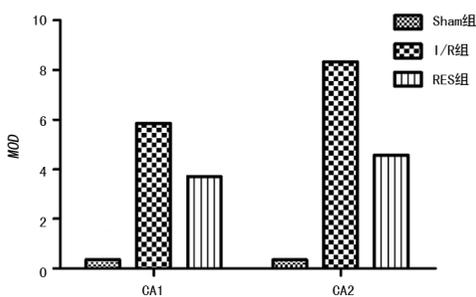


图 4 MMP-9 在大鼠海马 CA1 区和 CA2 区的 MOD 表达水平

3 讨论

脑卒中患者认知功能、运动能力的严重受损大多是由于 I/R 损伤对大脑神经细胞的损害^[14-15]。研究表明,这种缺血缺氧损伤对海马锥体细胞的伤害尤为明显,常引起神经细胞的凋亡改变^[16]。MMP 主要参与细胞外基质的降解过程,近年来病理研究发现, MMP 中特别是 MMP-2 和 MMP-9 参与了中枢神经系统损伤后的许多病理过程^[17]。正常状态下,大脑 MMP-9 的表达处于低水平,但受到外界刺激,尤其是

Sham 组在海马 CA1 区和 CA2 区均未见 MMP-9 免疫阳性细胞表达。I/R 组和 RES 组在海马 CA1 区和 CA2 区均可见 MMP-9 免疫阳性细胞表达。Sham 组在 CA1 区的 MOD 值为 0.362 ± 0.081 , 在 CA2 区的 MOD 值为 0.349 ± 0.044 , 均明显低于 I/R 组 (CA1 区 5.866 ± 1.230 , CA2 区 8.347 ± 2.428) 和 RES 组 (CA1 区 3.715 ± 0.925 , CA2 区 4.582 ± 1.642), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。I/R 组在两个海马区均明显高于 RES 组 ($P = 0.011$), 见图 4。

缺血缺氧改变,其水平会急剧升高,有研究发现, MMP 表达升高可导致血糖屏障 (BBB) 分解,从而引发脑水肿、脑出血,甚至神经细胞不可逆损伤^[18]。ZALEWSKA 等^[19]首次发现, MMP 活性的增加可破坏细胞基质,并导致海马神经细胞凋亡的发生。而当这种蛋白酶表达受控制时,海马神经细胞损伤会明显减少^[20]。本研究也发现了相同的结果,即在 I/R 组海马 CA1 区和 CA2 区的 MMP-9 水平均最高,同时这组大鼠的神经功能评分最高,因此本研究认为两者之间可能存在相关性。通过激光多普勒仪检测血流,本研究还发现 MMP-9 水平与大脑中动脉血流量之间无相关性。

RES 是存在于各种植物中的多酚类物质,在植物暴露于压力环境时会诱导这种物质的大量生成^[21]。近年来研究发现 RES 有神经保护作用,但其机制一直未被阐明。本研究发现,大鼠 I/R 前预防性地给予 RES $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射,可明显降低大鼠神经功能损伤评分。有研究表明,单次 RES 给药的神保护作用在脑内可维持 4 h^[22]。通过免疫组织化学

研究发现 RES 组大鼠海马 CA1 区和 CA2 区的 MMP-9 免疫阳性细胞表达均明显低于 I/R 组。因此本研究认为,RES 在短暂性脑缺血损伤后对大鼠海马神经细胞有一定的保护作用,且这种神经保护作用可能与 RES 降低了由短暂缺血增加的 MMP-9 活性有关。RES 在其他疾病模型的研究已多有报道^[23-24],最近研究进一步发现 RES 参与缺血缺氧性细胞损伤中限制 MMP 的表达上调过程,从而抑制心脏、肾脏及大脑等脏器的缺血受损^[25-26]。

综上所述,本研究结果表明,I/R 前预防性给予 10 d RES 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,能有效改善大鼠神经功能损伤预后,其机制可能与 RES 抑制 MMP-9 的活性表达有关。本研究的局限性在于没有设立 RES 浓度梯度,因此不能确定其剂量反应关系,还需后续进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会中华医学会神经病学分会脑血管病学组,刘鸣,蒲传强.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J].中华神经科杂志,2015,48(4):246-257.
- [2] 魏礼洲,刘卫平,费舟,等.丹酚酸 A 对大鼠脑缺血/再灌注损伤及抗氧化酶活性的影响[J].现代生物医学进展,2014,23(14):4447-4450.
- [3] HONG J H,LEE H,LEE S R. Protective effect of resveratrol against neuronal damage following transient global cerebral ischemia in mice[J]. J Nutr Biochem,2016,27(1):146-152.
- [4] WESTPHAL N,LOERS G,LUTZ D, et al. Generation and intracellular trafficking of a polysialic acid-carrying fragment of the neural cell adhesion molecule NCAM to the cell nucleus[J]. Sci Rep,2017,7(1):8622-8635.
- [5] 贾玲玲,万乾炳.基质金属蛋白酶抑制剂的研究进展[J].华西口腔医学杂志,2017,35(2):208-214.
- [6] KLEIN T,BISCHOFF R. Physiology and pathology of matrix metalloproteinases[J]. Amino Acids,2011,41(2):271-290.
- [7] 林铭燕,洪炎国. MMPs 在疼痛和吗啡耐受中的作用[J].中国细胞生物学学报,2014,36(12):1695-1701.
- [8] ABDUL-MUNEER P M,PFISTER B J,HAORAH J, et al. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of traumatic brain injury[J]. Mol Neurobiol,2016,53(9):6106-6123.
- [9] 苗玉连,武传龙,刘金波,等.白藜芦醇对高脂饮食去卵巢肥胖大鼠脑组织炎症反应及海马 A β ₁₋₄₂水平的影响[J].山东大学学报(医学版),2013,51(8):17-21.
- [10] SONG J,CHEON S Y,JUNG W, et al. Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia[J]. Int J Mol Sci,2014,15(9):15512-15529.
- [11] VAN CAUWENBERGHE C,VANDENDRIESSCHE C,LIBERT C, et al. Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease[J]. Mamm Genome,2016,27(7/8):300-319.
- [12] JANG M,CAI L,UDEANI G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science,1997,275(5297):218-220.
- [13] TILLEMENT J P. In vitro protection of cerebral mitochondrial function by E-resveratrol in anoxia followed by reoxygenation[J]. Bull Acad Natl Med,2001,185(8):1429-1443.
- [14] RITZEL R M,PATEL A R,GRENIER J M, et al. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke[J]. J Neuroinflammation,2015,12(1):106.
- [15] HANEY M J,KLYACHKO N L,ZHAO Y L, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy[J]. J Control Release,2015,207(10):18-30.
- [16] 王正,孙晓,郑元林,等.紫甘薯花青素对高脂饮食导致小鼠脑部炎症反应的保护作用[J].医学研究杂志,2014,43(4):118-121.
- [17] VANDENBROUCKE R E,LIBERT C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? [J]. Nat Rev Drug Discov,2014,13(12):904-927.
- [18] LEPETA K,KACZMAREK L. Matrix metalloproteinase-9 as a novel player in synaptic plasticity and schizophrenia [J]. Schizophr Bull,2015,41(5):1003-1009.
- [19] ZALEWSKA T,ZIEMKA-NALECZ M,SARNOWSKA A, et al. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia [J]. Acta Neurobiol Exp (Wars),2002,62(2):53-61.
- [20] CHATURVEDI M,KACZMAREK L. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke[J]. Mol Neurobiol,2014,49(1):563-573.
- [21] QUINCOZES-SANTOS A,BOBERMIN L D,LATINI A, et al. Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against Hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1[J]. PLoS One,2013,8(5):e64372.
- [22] WANG Q,XU J F,ROTTINGHAUS G E, et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils[J]. Brain Res,2002,958(2):439-447.
- [23] 宋蕊,陈艳宇,李婉秋,等.白藜芦醇对动脉粥样硬化兔血脂及血清中抗氧化酶水平的影响[J].重庆医学,2014,43(31):4169-4171.
- [24] 陈兰,胡沙,李素萍.白藜芦醇对卵泡颗粒细胞线粒体的调节作用及人工辅助生殖效果的影响[J].重庆医学,2016,45(29):4080-4082.
- [25] CORBI G,CONTI V,DAVINELLI S, et al. Dietary phytochemicals in neuroimmunaging: a new therapeutic possibility for humans? [J]. Front Pharmacol,2016,7(10):364.
- [26] CHANDER V,CHOPRA K. Protective effect of nitric oxide pathway in resveratrol renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Arch Med Res,2006,37(1):19-26.