

## 曲古抑素 A 预处理对大脑中动脉闭塞模型大鼠脑保护作用 及其与 IL-1 $\beta$ 的关系

贺民, 郭曲练

(中南大学湘雅医院麻醉科, 长沙 410078)

**[摘要]** **目的:** 探讨曲古抑素 A(TSA) 预处理对大脑中动脉闭塞(MCAO) 模型大鼠的脑保护作用及其与 IL-1 $\beta$  之间的关系, 并评价年龄对 TSA 预处理所产生大鼠脑保护作用的影响。**方法:** 采用梭性头端线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型, 将 96 只 SD 青年雄性大鼠(3~4 月龄) 随机分为缺血再灌注对照组、二甲基亚砷(DMSO) 预处理组、小剂量 TSA 预处理组(0.03 mg/kg) 和大剂量 TSA 预处理组(0.1 mg/kg), 每组包括缺血再灌注 6 h 组、12 h 组、24 h 组、48 h 组, 每组 6 只大鼠。另将 18 只 SD 雄性大鼠分为老年组(22 月龄)、青年组(3~4 月龄)、幼年组(1 月龄), 均采用大剂量 TSA 预处理。采用方差分析比较不同处理组脑梗死体积比、脑脊液和血液 IL-1 $\beta$  含量的差异, Spearman 秩相关分析脑梗死体积比与脑脊液、血液 IL-1 $\beta$  含量的线性相关。**结果:** 大剂量 TSA 组大鼠脑梗死体积比在缺血再灌注各时间点均小于其余 3 组。大剂量 TSA 组缺血再灌注各时间点脑脊液中 IL-1 $\beta$  含量与对照组相应时间点相比明显减少。大剂量 TSA 组血清中 IL-1 $\beta$  含量在缺血再灌注各时间点均低于 DMSO 组和对照组, 小剂量 TSA 组与 DMSO 组无差别。脑梗死体积与血液 IL-1 $\beta$ 、脑脊液 IL-1 $\beta$  含量的相关系数分别为 0.841 和 0.618( $P < 0.05$ )。不同年龄组大鼠的脑梗死体积比较差异无统计学意义, 但老年组大鼠脑梗死体积大于其余两组。不同年龄组大鼠脑脊液中的 IL-1 $\beta$  含量差异无统计学意义( $P = 0.076$ )。**结论:** 大剂量 TSA 预处理可减小脑梗死体积比, 并降低脑脊液和血液 IL-1 $\beta$  含量; 年龄对大剂量 TSA 预处理大鼠脑梗死体积比、血液和脑脊液 IL-1 $\beta$  没有影响。

**[关键词]** 曲古抑素 A; 大脑中动脉闭塞; IL-1 $\beta$ ; 年龄

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.04.011

## Cerebral protection of Trichostatin A preconditioning in rats with middle cerebral artery occlusion and the relationship between Trichostatin A and IL-1 $\beta$

HE Min, GUO Qulian

(Department of Anesthesiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To explore the impact on cerebral protection of Trichostatin A (TSA) preconditioning in rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO); the relationship between cerebral protection of TSA and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ); and the impact of age on the mechanism of cerebral protection of TSA.

**Methods:** The modified suture method was used to create stable a MCAO model. A total of 96 male SD rats were assigned randomly to four groups: a control group, a dimethyl sulfoxide (DMSO)

收稿日期 (Date of reception): 2011-05-30

作者简介 (Biography): 贺民, 博士, 主治医师, 主要从事临床麻醉与脑保护研究。

通信作者 (Corresponding author): 郭曲练, Email: guoqulian@hotmail.com

preconditioned group, a low-dose (0.03 mg/kg) TSA-preconditioned group, and a high-dose (0.1 mg/kg) TSA-preconditioned group. Each group included four sub-groups for reperfusion for 6, 12, 24 and 48 hours, respectively, 6 rats per sub-group. An additional, eighteen healthy, male Sprague Dawley (SD) rats that received TSA preconditioning (0.1 mg/kg) were divided into three groups based on their age: young, mid-age, and old. One-way analysis of variance was used to compare the differences between groups, and the Spearman rank correlation was used to examine relationships between IL-1 $\beta$  concentrations in blood and cerebrospinal fluid and cerebral infarction volume.

**Results:** The cerebral infarction volume of rats in the high-dose TSA group was less than that of the other 3 groups ( $P < 0.05$ ). The IL-1 $\beta$  in blood and the cerebrospinal fluid of rats in the high-dose TSA group was lower than that in control and DMSO groups ( $P < 0.05$ ); for the low-dose TSA group IL-1 $\beta$  levels were statistically the same as in controls. The Spearman rank coefficients were 0.841 and 0.618 for cerebral infarction volume correlate to blood IL-1 $\beta$  and to cerebrospinal fluid IL-1 $\beta$ , respectively ( $P < 0.05$ ). No statistical differences were found in cerebral infarction volume and IL-1 $\beta$  levels in blood or cerebrospinal fluid ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** High-dose TSA preconditioning reduces cerebral infarction volume and decreases IL-1 $\beta$  levels in blood and cerebrospinal fluid; age does not affect these parameters.

## KEY WORDS

Trichostatin A; MCAO; IL-1 $\beta$ ; age

脑缺血再灌注损伤是神经外科手术中最为常见的问题。虽然缺血预处理被认为是目前应对脑缺血再灌注损伤的最有效的保护手段<sup>[1]</sup>,但因脑缺血预处理是损伤性预适应,探讨基于药物诱导的预适应作为替代手段成为当前临床医学研究的热点之一。已有研究<sup>[2]</sup>提示:组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACIs)能减轻缺血性脑梗塞的损伤。曲古抑素A(trichostatin A, TSA)作为HDACIs的代表性药物之一,其预处理是否对脑缺血再灌注损伤具有保护作用目前尚未见报道。白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )作为触发免疫和炎症反应的重要介质,可通过多种方式影响脑缺血再灌注损伤的过程<sup>[3]</sup>。随着年龄的增长,机体的生理机能呈现了一个发育-成熟-衰老的过程。目前,尚无研究涉及大鼠年龄对TSA预处理所产生脑保护作用的影响。本研究拟探讨TSA预处理对大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠的脑保护作用及其与血液和脑脊液中IL-1 $\beta$ 含量之间的关系,并进一步探讨大鼠年龄对TSA预处理所产生脑保护作用的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

114只健康清洁SD雄性大鼠购自中南大学实验动物学部,其中老年SD雄性大鼠(22月龄)6只,体质量600~630g、青年SD雄性大鼠(3~4月龄)102

只,体质量270~320g、幼年SD雄性大鼠(1月龄)6只,体质量约100g。

三苯基氯化四氮唑(TTC)购自上海山浦化工有限公司;IL-1 $\beta$ 酶联免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;TSA购自美国Sigma公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶液将TSA粉末溶解为1, 3, 6 mg/mL 3种浓度后分装, -20℃保存,使用前解冻,用生理盐水稀释。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型制备

本实验参照牛建国等<sup>[4]</sup>提出的梭性头端线栓法阻断大鼠中动脉供血90 min,制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。MCAO模型大鼠缺血90 min再灌注后6, 12, 24, 48 h,依据大鼠体征改变,由非实验人员按照Zea-Longa的4分法评定两组大鼠的神经功能损害评分。其中无神经缺损症状为0分,右前肢不能完全伸直为1分,向右侧旋转为2分,向右侧倾倒入为3分,不能自己行走或昏迷为4分,1~3分表示模型复制成功<sup>[5]</sup>。神经功能评分为0分、4分或死亡大鼠被剔除,再从后备大鼠中随机补充。预试验结果显示:阻断实验大鼠大脑中动脉前20 min给予TSA能达到较理想效果,故在正式实验中将其确定为20 min。空白对照组经尾静脉注入1 mL生理盐水,其余各组则于缺血前20 min分别注入含相应药物的1 mL生理盐水。

### 1.2.2 动物分组

既往研究认为按 0.01 mg/kg 静脉注射 TSA 即能产生药物效应<sup>[6]</sup>, 故本研究将静脉注射 TSA 0.03 mg/kg 定为小剂量, 0.1 mg/kg 定为大剂量。考虑到 TSA 最常采用 DMSO 溶解, 为排除 DMSO 对实验结果的影响, 本研究特设 DMSO 溶剂组。96 只健康清洁 SD 青年雄性大鼠 (3~4 月龄) 被随机分为缺血再灌注对照组 (对照组)、TSA 大剂量预处理组 (0.1 mg/kg, 大剂量 TSA 组)、TSA 小剂量预处理组 (0.03 mg/kg, 小剂量 TSA 组)、1% DMSO 预处理组 (DMSO 组), 每组又被分为缺血再灌注 6 h 组、12 h 组、24 h 组、48 h 组共 4 个亚组。参照国内外同类动物实验的经验作法, 每亚组包括 6 只大鼠。

另取 18 只 SD 雄性大鼠分为老年组 (22 月龄)、青年组 (3~4 月龄)、幼年组 (1 月龄)。因前期实验结果显示 TSA 大剂量预处理组的脑保护作用最明显, 缺血再灌注 24 h 时脑梗死体积比和神经功能损害评分最大, 故统一对老年组、青年组和幼年组大鼠采用 TSA 大剂量预处理 (0.1 mg/kg), 并在缺血再灌注 24 h 时测量脑梗死体积比和脑脊液和血液 IL-1 $\beta$  含量, 每组 6 只大鼠。

### 1.2.3 脑梗死体积比和大鼠脑脊液及血液采集

于再灌注各时间点, 以 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射深麻醉大鼠, 分别采集大鼠脑脊液和血液。取脑切片行 TTC 染色, 用图像处理软件 (Photoshop CS) 处理 TTC 染色照片, 测定每张脑片的总面积和梗死面积, 按公式  $V=t(A_1+A_2+\dots+A_n)-t(A_1+A_n)/2$  计算梗死体积, 其中  $V$  为脑梗死体积,  $t$  为切片厚度,  $A_1, A_2, \dots, A_n$  为第 1, 2,  $\dots, n$  张脑片的梗死面积<sup>[7]</sup>。脑梗死体积与全脑体积之比为梗死体积比, 以校正大鼠脑的个体差异及脑水肿造成的偏差。各组脑梗死总体积比是各时间点梗死体积百分比的算术均值。

### 1.2.4 大鼠脑脊液及血液 IL-1 $\beta$ 含量测定

按 IL-1 $\beta$  试剂盒 (ELISA 法) 说明配制试剂, 按照试剂盒说明操作, 检测前先将试剂盒放置在室温 20 $^{\circ}$ C ~25 $^{\circ}$ C 半小时后再试验。根据样品 OD 值在该曲线图上的位置得出大鼠脑脊液及血液标本中 IL-1 $\beta$  值。

## 1.3 统计学处理

采用 Excel 2007 建立数据库并录入数据。采用 SPSS18.0 完成统计分析。以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 描述计量资料, 采用条图、轮廓图描述不同组均值。采用两因素方差分析处理因素、时间因素及其交互

作用对脑梗死体积、脑脊液、血液 IL-1 $\beta$  含量的影响。如方差分析前提条件未得到满足, 采用相应的非参数检验或稳健方法作为替代。采用 Spearman 秩相关分析 4 组大鼠脑梗死体积比与脑脊液、血液 IL-1 $\beta$  的线性相关。选择  $\alpha=0.05$  为检验水准,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组脑梗死体积比比较

两因素析因方差分析结果显示: 4 个处理组之间脑梗塞体积比具有统计学差别 ( $F_{\text{分组}}=37.254, P<0.05$ ), 但时间、分组因素和时间交互作用均无统计学意义 ( $F_{\text{时间}}=0.340, P>0.05$ ;  $F_{\text{分组}\times\text{时间}}=0.340, P>0.05$ ), 故可忽略时间和分组因素和时间交互作用项的影响, 进一步采用单因素方差分析比较 4 个处理组之间脑梗塞体积比的差别。Welch 近似  $F$  检验显示: 4 组之间脑梗死总体积比差异有统计学意义 (Welch  $F=29.42$ ;  $P<0.01$ )。组间两两比较结果显示: 除小剂量 TSA 组与 DMSO 组脑梗死体积比之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 其余任两组间均存在差异 ( $P<0.05$ ), 大剂量 TSA 组脑梗死体积比明显低于其余 3 组 (图 1), TTC 染色结果见图 2。

### 2.2 各组脑脊液、血液 IL-1 $\beta$ 含量比较

脑脊液 IL-1 $\beta$  两因素析因设计方差分析结果显示: 分组因素和时间的主效应、二者的交互作用项均无统计学意义 ( $F_{\text{分组}}=1.451, P>0.05$ ;  $F_{\text{时间}}=0.586, P>0.05$ ;  $F_{\text{分组}\times\text{时间}}=0.049, P>0.05$ ; 图 3)。

血液 IL-1 $\beta$  两因素析因设计方差分析结果显示: 时间的主效应、分组因素和时间的交互作用无统计学意义 ( $F_{\text{时间}}=1.839, F_{\text{分组}\times\text{时间}}=0.608, P>0.05$ ), 分组因素的主效应具有统计学意义 ( $F_{\text{分组}}=16.993, P<0.05$ ; 图 4)。故可忽略时间因素和交互作用项, 采用单因素方差分析进一步分析 4 组间大鼠血液 IL-1 $\beta$  的差别。结果显示: 4 组之间大鼠血液 IL-1 $\beta$  总体差异有统计学意义 ( $F=17.182, P<0.05$ )。两两比较 (LSD- $t$  法) 结果进一步显示: 大剂量 TSA 组血液 IL-1 $\beta$  含量低于对照组和 DMSO 组 ( $P<0.05$ ), 但与小剂量 TSA 组没有差别 ( $P>0.05$ ); 小剂量 TSA 组与 DMSO 组差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但低于对照组 ( $P<0.05$ ); DMSO 组低于对照组 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 脑梗死体积比与脑脊液和血液 IL-1 $\beta$ 含量的相关分析

Spearman 秩相关分析显示: 脑梗死体积比与血液 IL-1 $\beta$ 、脑脊液 IL-1 $\beta$  含量高度相关, 对应的 Spearman 秩相关系数分别为 0.841 和 0.618( $P < 0.05$ )。

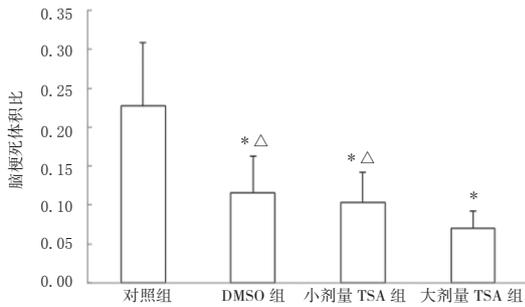


图 1 四组脑梗死总体积比的比较。与对照组比较,  $^*P < 0.05$ ; 与大剂量 TSA 组比较,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Figure 1 Comparisons of total cerebral infarction volume ratio between four groups of rats.  $^*P < 0.05$  vs the control group;  $^{\Delta}P < 0.05$  vs the high-does TSA-preconditional group.

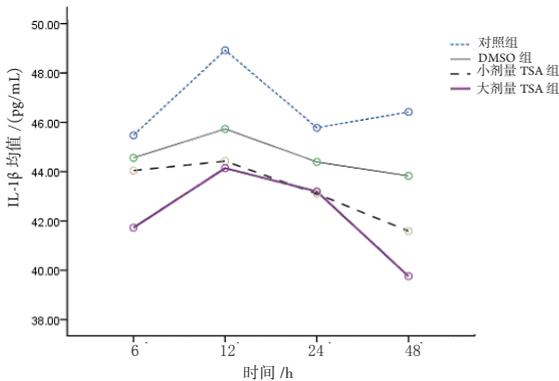


图 3 四组在不同时间点大鼠脑脊液 IL-1 $\beta$  含量比较。  
Figure 3 Comparisons of IL-1 $\beta$  concentration in cerebrospinal fluid between four groups of rats at the 6th, 12th, 24th, 48th hour after cerebral ischemia- reperfusion.

### 2.4 不同年龄组 TSA 预处理大鼠脑梗死体积比、脑脊液和血液 IL-1 $\beta$ 含量比较

单因素方差分析结果显示: 不同年龄组 TSA 预处理大鼠之间脑梗死体积比、脑脊液和血液 IL-1 $\beta$  含量差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 1)。不同年龄组缺血再灌注 24 h TTC 染色见图 5。

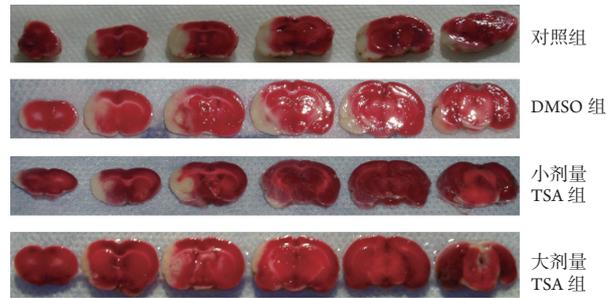


图 2 四组大鼠缺血再灌注 24 h TTC 染色比较。

Figure 2 Comparisons of TTC staining between four groups of rats at the 24th hour after cerebral ischemia- reperfusion.

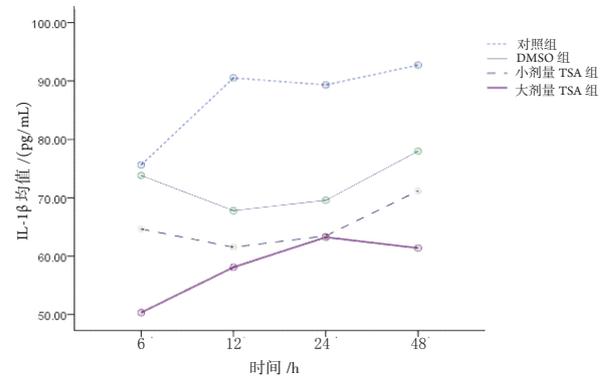


图 4 四组在不同时间点大鼠血液 IL-1 $\beta$  含量比较。  
Figure 4 Comparisons of IL-1 $\beta$  concentration in blood between four groups of rats at the 6th, 12th, 24th, 48th hour after cerebral ischemia- reperfusion.

表 1 不同年龄组大鼠脑梗死体积比和 IL-1 $\beta$  含量单因素方差分析结果 ( $n=6$ )

Table 1 Results of one-way analysis of variance of cerebral infarction volume ratio and IL-1 $\beta$  concentration between three age groups of rats ( $n=6$ )

组别	脑梗死体积比	脑脊液 IL-1 $\beta$ 含量/(pg/mL)	血液 IL-1 $\beta$ 含量/(pg/mL)
幼年组	0.084 $\pm$ 0.010	38.728 $\pm$ 8.608	72.139 $\pm$ 9.635
青年组	0.080 $\pm$ 0.006	43.193 $\pm$ 13.360	63.107 $\pm$ 16.680
老年组	0.081 $\pm$ 0.007	51.717 $\pm$ 5.716	58.569 $\pm$ 4.875
F	0.095	2.748	2.176
P	0.910	0.076	0.148

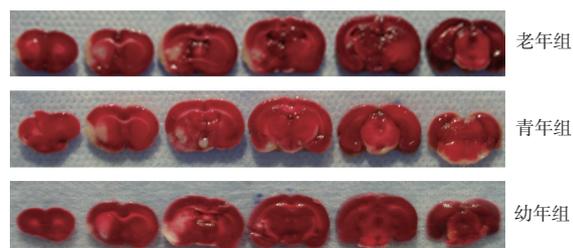


图 5 不同年龄组缺血大鼠再灌注 24 h TTC 染色比较。

Figure 5 Comparisons of TTC staining between three age groups of rats at the 24th hour after cerebral ischemia-reperfusion.

### 3 讨论

本研究发现:大剂量 TSA 预处理 (0.1 mg/kg) 可明显减小 MCAO 模型大鼠脑缺血再灌注所致的脑梗死体积。由于本研究采取单次给药方式,故待 TSA 药效减退消失则脑损伤加重,即小剂量 TSA 组和大剂量 TSA 组大鼠在 12, 24 h 时间点之间脑梗死灶体积逐渐增大,但仍然小于同时时间点的对照组。此发现为临床上处理脑缺血再灌注损伤提供了新的思路,未来可考虑通过大规模临床试验进一步探讨大剂量 TSA 预处理的脑保护作用及其可能产生的不良反应。

大剂量 TSA 预处理可有效降低大鼠脑脊液和血液 IL-1 $\beta$  含量,大鼠血液、脑脊液 IL-1 $\beta$  含量与脑梗死体积比呈高度正相关,提示 IL-1 $\beta$  可能在 TSA 预处理所产生的脑保护过程中发挥重要作用,此发现与已有研究<sup>[7]</sup>相符。IL-1 $\beta$  作为触发免疫和炎症反应的重要介质,其在缺血再灌注脑组织内含量的上升可加重缺血性损伤<sup>[8]</sup>。急性脑梗死患者血清 IL-1 $\beta$  水平明显升高,且与脑梗死程度密切相关<sup>[9]</sup>。Caso 等<sup>[10]</sup>认为在 MCAO 大鼠预先用 IL-1 $\beta$  抗体阻断可以减小梗死体积。Acarin 等<sup>[11]</sup>认为 IL-1 $\beta$  可能在惊厥性脑损伤过程中发挥主要作用,是神经兴奋性损伤的重要介质。

本研究并未发现不同年龄组大剂量 TSA 预处理大鼠脑梗死体积比、血液和脑脊液 IL-1 $\beta$  之间差异有统计学意义。这一方面提示:大鼠年龄可能对 TSA 预处理所产生的脑保护影响不大;另一方面,可能与大剂量 TSA 预处理后抑制 IL-1 $\beta$  过度表达,从而产生接近一致的脑保护作用有关。此外,该结果还可能与本研究样本含量过小有关。尽管 3 个年龄组大剂量 TSA 预处理大鼠血液和脑脊液 IL-1 $\beta$  差异无统计学意义,但仍呈现了一定差别。

本实验仅探讨了两种剂量 TSA 单次静脉注射预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响,未能全面反映 TSA 预处理所产生脑保护作用的量效关系,今后可考虑探讨更多剂量组、不同 TSA 用药方式处理的

脑保护作用。此外,可考虑设置空白对照组、DMSO 组评价大鼠年龄对脑缺血再灌注损伤的影响,同时考虑 TSA 剂量和年龄对脑缺血再灌注损伤的影响差别。

### 参考文献

1. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. *Jpn J Stroke*, 1986, 8(1): 1-8.
2. Ren M, Leng Y, Jeong M, et al. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction [J]. *J Neurochem*, 2004, 89(6):1358-1367.
3. Yanmsaki Y. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of mchemic brain damage in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(4):676-680; discussion 681.
4. 牛建国, 王玉军, 张莲香, 等. 大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型改良的实验研究 [J]. *宁夏医学院学报*, 2008, 30 (1):7-10. NIU Jianguo, WEN Yujun, ZHANG Lianxiang, et al. An experimental study on the improved model of middle cerebral artery occlusion reperfusion [J]. *Journal of Ningxia Medical College*, 2008, 30 (1):7-10.
5. Zealanga EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
6. Kim HJ, Rove M, Ren M, et al. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(3): 892-901.
7. Hu S, Peterson PK, Chao C. Cytokine-mediated neuronal apoptosis [J]. *Neurochem Int*, 1997, 30(4/5): 427-431.
8. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(5): 932-940.
9. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Rothwell NJ, et al. Inflammation in human brain injury: in tracerebral concent rations of IL-1alpha, IL-1beta, and their endogenous inhibitor IL-1ra [J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(10): 1545-1557.
10. Caso JR, Moro MA, Lorenzo P, et al. Involvement of IL-1 $\beta$  in acute stress induced worsening of cerebral ischaemia in rats [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007, 17(9): 600-607.
11. Acarin L, González B, Castellano B, et al. Microglial response to N-methyl- D-aspartate- mediated excitotoxicity in the immature rat brain [J]. *J Comp Neurol*, 1996, 367(3):361-367.