

• 基础论著 •

丁苯肽软胶囊对脑缺血大鼠神经保护作用研究

孙国兵 许康 赵薛旭 李平

【摘要】 目的 观察丁苯肽软胶囊(商品名:恩必普,NBP)对大鼠短暂局灶性脑缺血再灌注后神经功能缺损、脑梗死体积及核转录因子(NF- κ B)表达的影响。方法 44只大鼠随机分为缺血再灌注(IR)组和NBP治疗组,NBP治疗组于模型制作前4d,每天给予恩必普胶囊($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃。线栓法建立大鼠短暂局灶性脑缺血再灌注模型,缺血2h,再灌注24h及48h分别进行神经功能缺损评分,TTC染色测定脑梗死体积,免疫组化染色检测脑缺血区NF- κ B的阳性表达。结果 (1)NBP干预治疗降低脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分。(2)NBP明显减轻缺血再灌注后的脑组织损伤,再灌注24h脑梗死体积减少35.6%。(3)NBP显著降低脑缺血再灌注后24、48h缺血区NF- κ B的表达。结论 NBP能够降低NF- κ B的表达及减轻脑组织损伤,减轻神经功能缺损,有脑保护作用。

【关键词】 大脑中动脉; 再灌注损伤; NF- κ B; 丁苯肽软胶囊

Neuroprotective effect of butylphthalide in cerebral ischemic rats SUN Guo-bing, XU Kang, ZHAO Xue-xu, LI Ping. Department of Neurology, Hubei Xinhua Hospital, Wuhan 430015, China
Corresponding author: LI Ping, Email: 47348358@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the neuroprotective effect of butylphthalide on neurological deficit, cerebral infarct volume and the expression of NF- κ B in cerebral ischemic region of rats. **Methods** 44 rats were randomly divided into ischemia-reperfusion group and butylphthalide-treated group. The butylphthalide-treated group rats were intragastric administrated with butylphthalide ($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) everyday before 4 days of MCAO. We made the cerebral ischemia-reperfusion model of rats using an intraluminal monofilament. The neurological deficit scores were made with Zea Longa 5-point scale. TTC staining was used to evaluate the infarct volume. Immunohistochemistry was used to observe the expression of NF- κ B. **Results** (1) Butylphthalide could significantly decrease the neurological deficit scores in MCAO rats. (2) Butylphthalide could obviously reduce the brain damage after ischemia-reperfusion, and the infarct volume was significantly reduced by 35.6% in the butylphthalide-treated group after 24 h reperfusion. (3) Butylphthalide could decrease the expression of NF- κ B remarkably after 24 h and 48 h after reperfusion. **Conclusion** Butylphthalide may reduce the brain damage and the expression of NF- κ B. It has neuroprotective effect in cerebral ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Middle cerebral artery; Reperfusion injury; NF-kappa B; Butylphthalide

大量实验研究^[1-2]表明,急性脑缺血后缺血区存在以黏附分子表达、炎症细胞浸润及大量细胞因子释放为特征的免疫炎症反应,这进一步加重缺血神经元损伤。核转录因子(NF- κ B)作为一种氧化应激反应转录因子,激活后转位进入细胞核,参与许多基因表达的调控,被认为是脑缺血后炎症反应生、发展的“扳机点”^[3-4]。恩必普活性成分为dl-3-正丁基苯酞,动物实验研究证明^[5-6],dl-3-正丁基苯酞软胶囊对动物急性缺血性卒中具有多种机制的干预作用。本研究应用恩必普软胶囊干预治疗脑缺血再灌注大鼠,探讨其神经保

护作用机制。

材料与方

一、材料

选取健康雄性SD大鼠44只,体质量280~320g,由南京医科大学实验动物中心提供。NF- κ B p65大鼠IgG单抗(Santa Cruz公司生产,北京中山公司分装)、即用型SABC免疫组化试剂盒(购于武汉博士德生物工程公司),氯化2,3,5-三苯四氮唑(TTC,购于上海生化试剂公司),恩必普(丁苯肽)软胶囊(购于石药集团恩必普药业有限公司)。

二、方法

1. 动物分组:44只大鼠随机分为缺血再灌注组(22只)和丁苯肽软胶囊治疗组(22只),每组又分为大

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.10.115

作者单位:430015 武汉,湖北省新华医院脑科中心(孙国兵、许康、李平);南京医科大学附属南京脑科医院神经内科(赵薛旭)

通讯作者:李平,Email:47348358@qq.com

脑中动脉闭塞 2 h 再灌注 24 h 及 48 h 两组, 每组各 11 只, 其中 6 只大鼠取脑后行 NF-κB p65 免疫组化染色, 5 只取脑后行 TTC 染色。

2. 大鼠大脑中动脉闭塞模型: 脑缺血模型制作参照 Longa 等^[7] 的线栓法。将大鼠用 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 颈部正中切口, 从右颈外动脉断端将 4-0 单股外科尼龙线(用火将头端烧圆)插入右颈内动脉颅内段, 深度距颈总动脉分叉约 18 mm。以大鼠清醒后左前肢不能完全伸展或爬行时向左侧转圈为模型成功标准。缺血 2 h 后, 在乙醚麻醉下拔出尼龙线恢复血流, 形成再灌注。丁苯肽软胶囊组大鼠于模型制作前 4 d 每天 9 点按照体重进行恩必普软胶囊混悬液(400 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃, 缺血再灌注组同上法灌胃生理盐水。

3. 神经功能缺损评分: 分别于再灌注后 24 h、48 h, 参考经典 Longa 法^[7] 对大鼠进行神经功能缺损程度评分。神经功能缺损评分标准为: 0 分, 无神经功能缺损症状, 活动正常; 1 分, 轻微神经功能缺损, 不能完全伸展对侧前爪; 2 分, 中度局灶性神经功能缺损, 爬行时出现向对侧转(追尾现象); 3 分, 重度局灶性神经功能缺损, 行走时身体向对侧倾斜; 4 分, 不能自发行走, 意识水平下降。

4. 切片制作及观察: 分别于再灌注后 24 h、48 h, 将大鼠用 10% 水合氯醛深度麻醉, 经升主动脉灌注肝素化生理盐水 5 min, 去除血液, 继以含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 400 ml 灌注固定, 取脑继续在上述固定液中后固定 24 h。从视交叉吻合端至尾端冠状连续切片, 片厚 3 mm。切片常规梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋后, 做石蜡切片 2 张, 片厚 5 μm, 进行 NF-κB p65 免疫组化染色。高倍镜下(×400)随机观察缺血区域不重叠的 3 个视野, 计数 NF-κB p65 胞质或胞核阳性细胞数。

5. 脑梗死体积测定: 分别于再灌注后 24 h、48 h, 10% 水合氯醛深麻醉下, 快速开胸暴露心脏, 经升主动脉快速灌注 37 °C 肝素化生理盐水 250 ml, 断头取脑, 将脑放入 -20 °C 冰箱冷冻 10 min 至脑变硬, 从大脑半球额极至枕极用特制切脑模具连续冠状切片 6 片, 片

厚 2 mm。将脑片放入 2% TTC 磷酸缓冲液中, 37 °C 避光孵育 30 min, 继续将脑片置于含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中避光后固定 24 h, 数码相机拍照。利用病理图像分析软件 Scion Image 分别测出梗死面积及缺血侧半球面积, 梗死体积 = 梗死面积 × 厚度。为了减小实验操作误差及水肿的影响, 我们以相对梗死体积, 即梗死体积占半球体积百分比 (V%) 表示, $V\% = \text{梗死体积} / \text{缺血半球体积} \times 100\%$ ^[8]。

三、统计学方法

观察数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠的神经行为学评分: 大脑中动脉闭塞 2 h 再灌注后 24、48 h, 缺血再灌注组大鼠神经功能缺损评分分别: 缺血再灌注 24 h 组 2.55 ± 0.69、缺血再灌注 48 h 组 2.64 ± 0.50; 丁苯肽软胶囊组对应时点评分分别为 2.18 ± 0.75、2.27 ± 0.47。和缺血再灌注组相比, 丁苯肽软胶囊组再灌注 24 h 及 48 h 神经功能缺损均有所改善, 差异均有统计学意义(均 P < 0.01)。见表 1。

2. 丁苯肽软胶囊对大脑中动脉闭塞大鼠脑梗死体积的影响: 经 TTC 染色后, 脑梗死区呈苍白色。大脑中动脉闭塞 2 h 再灌注 24 h、48 h, 缺血再灌注组相对梗死体积分别为 (0.365 ± 0.075) V%、(0.315 ± 0.061) V%, 丁苯肽软胶囊组对应时点相对梗死体积分别为 (0.235 ± 0.052) V%、(0.295 ± 0.046) V%。和缺血再灌注 24 h 组比较, 丁苯肽软胶囊 24 h 组脑梗死体积减少 35.6% (P < 0.05); 和缺血再灌注 48 h 组相比, 丁苯肽软胶囊 48 h 组梗死体积虽有所减少, 但差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 1, 图 1。

3. 丁苯肽软胶囊对大脑中动脉闭塞大鼠脑缺血后 NF-κB p65 蛋白表达变化的影响: NF-κB p65 阳性反应主要表现为胞质或胞核的棕黄色深染, 在缺血再灌注组缺血对侧可见极少量弱阳性反应的神经元和血管内皮细胞。大脑中动脉闭塞 2 h 再灌注 24 h 及 48 h, 缺

表 1 各组 NF-κB p65、梗死体积、神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF-κB p65			梗死体积			神经功能评分		
	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	V%, $\bar{x} \pm s$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
缺血再灌注 24 h 组	68.5 ± 8.6	3.637	0.007	0.365 ± 0.075	2.425	0.042	2.55 ± 0.69	3.491	0.008
丁苯肽软胶囊 24 h 组	52.6 ± 6.8			0.235 ± 0.052			2.18 ± 0.75		
缺血再灌注 48 h 组	46.2 ± 7.4	5.516	0.003	0.315 ± 0.061	1.668	0.970	2.64 ± 0.50	3.795	0.005
丁苯肽软胶囊 48 h 组	32.3 ± 5.4			0.295 ± 0.046			2.27 ± 0.47		

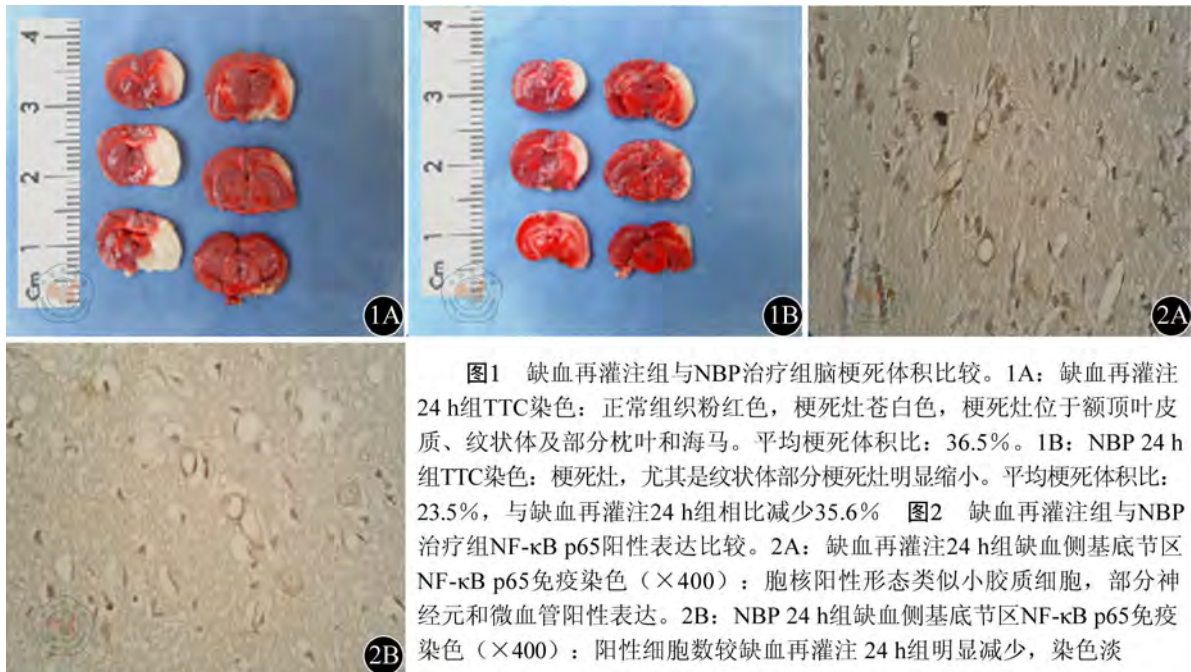


图1 缺血再灌注组与NBP治疗组脑梗死体积比较。1A: 缺血再灌注24 h组TTC染色: 正常组织粉红色, 梗死灶苍白色, 梗死灶位于额顶叶皮质、纹状体及部分枕叶和海马。平均梗死体积比: 36.5%。1B: NBP 24 h组TTC染色: 梗死灶, 尤其是纹状体部分梗死灶明显缩小。平均梗死体积比: 23.5%, 与缺血再灌注24 h组相比减少35.6%。图2 缺血再灌注组与NBP治疗组NF- κ B p65阳性表达比较。2A: 缺血再灌注24 h组缺血侧基底节区NF- κ B p65免疫染色($\times 400$): 胞核阳性形态类似小胶质细胞, 部分神经元和微血管阳性表达。2B: NBP 24 h组缺血侧基底节区NF- κ B p65免疫染色($\times 400$): 阳性细胞数较缺血再灌注24 h组明显减少, 染色淡

血再灌注组缺血侧可见大量 NF- κ B p65 蛋白表达阳性反应, 主要分部在缺血中心区的细胞核上, 其细胞形态类似小胶质细胞, 缺血半暗带区分部相对较少, 主要在血管壁和部分神经元胞质中。丁苯肽软胶囊组, 与缺血再灌注组相比, 再灌注 24 h 及 48 h 两个时间点 NF- κ B p65 蛋白表达阳性均有所减少, 差异均有显著性(均 $P < 0.01$)。见表 1, 图 2。

讨 论

脑缺血后的再灌注既可挽救濒临死亡的神经细胞, 又可加重缺血细胞的损伤, 甚至导致细胞死亡, 此称为再灌注损伤。有研究^[9]发现, 再灌注阶段的损伤占整个损伤的 70% 以上, 因此, 应用有效药物抑制缺血再灌注后的脑组织损伤, 有着十分重要的临床意义。本实验应用与临床人类缺血性脑卒中相类似的大鼠大脑中动脉阻塞模型, 观察丁苯肽软胶囊对脑缺血再灌注后 NF- κ B 表达变化影响, 探讨其抗炎症反应的神经保护作用机制。

NF- κ B 是一种核转录因子, 属于 Rel 蛋白家族, 有 5 种亚单位: RelA (p65)、RelB、c-Rel、p105/p50 (NF- κ B1) 和 p100/p52 (NF- κ B2)。一般静息状态下, NF- κ B 与 I κ B 形成受体/配体复合物(NF- κ B/I κ B), 以无活性体形式存在于胞质中。当细胞受刺激后, 在蛋白激酶作用下, I κ B 发生磷酸化并与 NF- κ B 解离, NF- κ B 活化即可快速移位进入胞核内, 引起靶基因转录表达。p65 组成的同源或异源二聚体是 NF- κ B 主要活性形式, 在激活靶基因转录过程中起着重要作用^[3], 因此, 本研究选择能够识别 p65 亚单位核内表位的单克隆抗体来检测

脑缺血再灌注后被激活并定位于胞核的核转录因子 NF- κ B 水平, 这可以在转录水平探讨丁苯肽对脑缺血大鼠的抗炎症反应神经保护作用机制。

本研究发现, 大脑中动脉闭塞 2 h 后, 缺血侧大脑半球 NF- κ B p65 免疫反应活性增强, 显著高于非缺血侧。阳性反应主要定位于缺血中心区域的细胞胞核内, 细胞形态类似小胶质细胞; 在缺血半暗带区和远隔区域 NF- κ B p65 阳性反应较弱, 主要表达在散在的血管内皮细胞和神经元上。脑缺血后细胞死亡可分为坏死和凋亡。在严重缺血的缺血中心区域以细胞坏死为主, 而在缺血中心区与正常组织交界的半暗带区以细胞凋亡为主。缺血中心区神经胶质细胞 NF- κ B 表达增加可能刺激前炎症细胞因子、黏附分子表达, 促进循环中的中性粒细胞浸润入脑缺血区域, 加速中心区域组织坏死; 而在缺血半暗带区神经元 NF- κ B 表达增强可能通过增强组织氧代谢、耗氧量及 NO、兴奋性氨基酸和氧自由基细胞毒性等级联反应, 促进神经细胞凋亡的发生。

NF- κ B 表达增加, 促进包括黏附分子在内的各种炎症因子的表达, 介导脑缺血后循环中的中性粒细胞黏附并穿越内皮、浸润入缺血区脑组织, 促进缺血区炎症反应, 这奠定了缺血区脑组织由缺血性损伤向炎症性损伤转变的基础。本实验通过丁苯肽软胶囊提前干预治疗, 发现大脑中动脉闭塞 2 h, 再灌注 24 h 及 48 h 丁苯肽软胶囊组缺血区 NF- κ B 表达均显著低于缺血再灌注组, 神经功能缺损评分明显改善, 这可能是丁苯肽软胶囊神经保护作用机制的一方面; 同时, 丁苯肽软胶囊干预治疗后, 再灌注 24 h 脑梗死体积明显缩小, 与缺

血再灌注组相比,脑梗死体积缩小 35.6%。

已有学者^[10-11]研究证实通过抑制 NF-κB 的表达可以显著减轻梗死动物模型的缺血性脑损伤,但由于抗体价格昂贵且有排斥作用,应用于临床尚不成熟。多年动物实验研究证实^[5-6,12],dl-3-正丁基苯酞可增加缺血区脑血流量和改善脑缺血区微循环,缩小局灶性脑缺血后的梗死灶,保护线粒体功能,促进新生突触的形成和受损神经的修复,减轻神经功能损伤的程度。丁苯酞软胶囊 I、II、III 期临床研究结果表明该药对急性缺血性卒中疗效显著,具有良好的安全性^[13-14],《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010》推荐其在脑梗死急性期应用^[15]。本研究结果显示,丁苯酞软胶囊可以显著降低大脑中动脉闭塞 2 h 后缺血区 NF-κB 的表达,减轻脑缺血再灌注后的脑组织损伤,脑梗死体积减少,神经功能缺损改善,这显示了丁苯酞软胶囊抗脑缺血后再灌注损伤的脑保护作用,为丁苯酞软胶囊临床应用提供了更多理论支持。

参 考 文 献

[1] Choe CU, Lardong K, Gelderblom M, et al. CD38 exacerbates focal cytokine production, postischemic inflammation and brain injury after focal cerebral ischemia. *PLoS One*, 2011, 6: e19046-19053.

[2] Chamorro A, Hallenbeck J. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke*, 2006, 37: 291-293.

[3] Chen L, Wang L, Zhang X, et al. The protection by Octreotide against experimental ischemic stroke; up-regulated transcription factor Nrf2, HO-1 and down-regulated NF-κB expression. *Brain Res*, 2012, 1475: 80-87.

[4] Liu Y, Zhang XJ, Yang CH, et al. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB ex-

pression. *Brain Res*, 2009, 1268: 174-180.

[5] 殷雁, 辛世萌. 丁苯酞预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29: 715-718.

[6] 黄如训, 李常新, 陈立云, 等. 丁苯酞对实验性动脉血栓形成性脑梗死的治疗作用. *中国新药杂志*, 2005, 14: 985-988.

[7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.

[8] Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, et al. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke*, 1999, 30: 1110-1117.

[9] Arnowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Flow Metab*, 1997, 17: 1048-1056.

[10] Jiang T, Gao L, Guo J, et al. Suppressing inflammation by inhibiting the NF-κB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*, 2012, 167: 1520-1532.

[11] Raza SS, Khan MM, Ahmad A, et al. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-κB signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience*, 2013, 230: 157-171.

[12] 李秋霞, 陈浙冷, 王欣东, 等. 丁苯酞注射液对血管性痴呆大鼠海马区生长相关蛋白-43 及突触素 P38 表达的影响. *实用医学杂志*, 2012, 28: 1067-1069.

[13] 崔丽英, 李舜伟, 吕传真, 等. 恩必普软胶囊治疗中度急性缺血性卒中的多中心开放临床研究. *中国脑血管病杂志*, 2005, 2: 112-115.

[14] 崔丽英, 刘秀琴, 朱以诚, 等. D1-3-正丁基苯酞治疗中度急性缺血性脑卒中的多中心、随机、双盲和安慰剂对照研究. *中华神经科杂志*, 2005, 38: 251-254.

[15] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010. *中华神经科杂志*, 2010, 43: 146-153.

(收稿日期:2013-04-22)

(本文编辑: 戚红丹)

孙国兵, 许康, 赵薛旭, 等. 丁苯酞软胶囊对脑缺血大鼠神经保护作用研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(10): 4391-4394.

