

松龄血脉康胶囊对局灶性缺血损伤后大鼠脑组织 TNF- α 表达的影响

郑桂芝¹ 梁汝庆²

(1 济宁医学院中医教研室 山东 济宁 272000; 2 南京医科大学第一附属医院神经内科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨松龄血脉康预处理对大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤脑组织 TNF- α 表达的影响。方法:36 只雄性 SD 大鼠,随机分为松龄血脉康(SL-xmk)预处理组、假手术组、对照组,SL-xmk 预处理组采用 SL-xmk(937.5mg/kg)悬浮液对大鼠进行 4w 预防性灌胃处理,假手术组、对照组采用等容量生理盐水预防性灌胃处理,在预处理终点采用线栓法制作大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。观察 SL-xmk 预处理后 MCAO 大鼠脑组织含水量、脑梗死体积变化的影响,运用免疫组织化学法检测大鼠缺血脑组织 TNF- α 免疫反应阳性细胞表达。结果:SL-xmk 预处理后脑组织 TNF- α 表达显著下降,缺血脑组织含水量和脑梗死体积明显降低。结论:松龄血脉康可抑制急性局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织 TNF- α 的表达。

关键词: 脑缺血 - 再灌注; 肿瘤坏死因子 - α ; 松龄血脉康

中图分类号: R285, R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)02-249-03

Effect of Songling Xuemaikang Capsule on Cerebral TNF- α of Rats after Focal Cerebral Ischemia Injury

ZHENG Gui-zhi¹, LIANG Ru-qing²

(1 Department of Traditional Chinese Medicines of Jining medical college, Jining 272000, Shandong, China;

2 Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of Songling Xuemaikang preconditioning on the expression of tumor necrosis factor- α after focal cerebral ischemia injury in rats. **Methods:** 36 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups in which the sham-operation group (n=12) and the control group (n=12) were both treated with 1ml/100g isotonic saline, and the preconditioning groups of 4w were treated with 937.50mg/kg of SL-xmk before received 2h of MCAO followed by 24h reperfusion except sham-operation group. The brain water content and infarct area in right hemisphere were observed after ischemia for 2h followed by 24h reperfusion, then immunohistochemistry was used to detect the expression of TNF- α of ischemic brain tissue. **Results:** The pretreatment 4w periods of SL-xmk could significantly reduce ischemic brain tissue water content and infarct area in right hemisphere. Compared with the control group, the expression of TNF- α in ischemic brain tissue decreased obviously. **Conclusion:** SL-xmk pretreatment may have certain inhibition on the expression of tumor necrosis factor- α after focal cerebral ischemia-reperfusion injury.

Key word: Brain ischemia-Reperfusion; TNF- α ; Songling Xuemaikang

Chinese Library Classification: R285, R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-249-03

脑卒中是中老年人的常见病、多发病,是迄今人类死亡率最高的三大疾病之一,近年来中药制剂在缺血性卒中防治方面的益处逐渐显露出来^[1,2]。松龄血脉康胶囊采用松针、珍珠层粉、葛根等成分,经现代制剂技术加工、精制而成的复方中药制剂;主要有效成分为原花青素、葛根素、总黄酮、儿茶素、虎杖苷、芦丁、黄芪苷等。国外研究提示松树制剂有抗凋亡、抗炎作用^[3-4],国内已有研究提示松龄血脉康可通过抗细胞凋亡发挥脑保护作用^[5]。本实验拟用松龄血脉康对大鼠预防性给药,观察大鼠大脑中动脉阻塞后脑组织 TNF- α 表达变化以及缺血脑组织含水量和脑梗死体积变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和 MCAO 模型制作

作者简介:郑桂芝,女,硕士,讲师,主治医师,研究方向:中医药治疗神经血液病基础与临床。

电话:15863758076, E-mail: 409549358@qq.com

(收稿日期:2010-09-25 接受日期:2010-10-21)

成年健康雄性 SD 大鼠 36 只,2 月龄,体重 260 ± 20 g,由中国科学院上海实验动物中心提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。随机分为 3 组:松龄血脉康预处理 4w 组,12 只;松龄血脉康干粉(937.5mg/kg)加 0.9%生理盐水配制悬液灌胃。假手术组、对照组(n 均=12):给予等容量 0.9%生理盐水灌胃(1ml/100g);预处理周期同 4w 药物组。在干预周期终点,对大鼠行大脑中动脉阻塞处理,缺血 2h 再灌注 24h 后取材。

参照 Longa 法制备大鼠大脑中动脉阻塞模型^[6]。

神经功能评分:采用 Longa 等^[6]5 级标准评分法,动物苏醒后即评分,再灌注 24 时评分。0 分:无神经功能缺损;1 分:缺血对侧前肢内收、不能完全伸展;2 分:行走时向偏瘫侧转圈者;3 分:行走时向偏瘫侧倾倒;4 分:意识丧失,不能自发行走。1 分以上为造模成功(含 1 分),评分 0 分、4 分动物,癫痫发作者,取材时发现脑出血、蛛网膜下腔出血者均剔除,随机补充。

1.2 大鼠脑组织石蜡切片制备

取 6 只大鼠,末次给药 24h 内给予 10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射麻醉,迅速打开胸腔,充分暴露心脏(以

5ml 注射器抽取心尖部血液 3ml,37℃ 水浴 30 分钟后,3000rpm/min 离心 10min,取血清备用)。打开腹腔,翻开肝脏,用夹闭腹主动脉和下腔静脉。经左心室插管至升主动脉,快速推注 0.9%生理盐水(约 100ml)至右心耳流出清亮液体为止。快速推注 10%中性甲醛溶液 100ml 进行前固定,当大鼠出现上肢及头部抖动,表明灌注成功,固定液进入循环系统,继续快速滴注 10%中性甲醛溶液 15-20 分钟,至大鼠颈部及上肢出现僵硬,结束灌注,断头取脑,去处嗅球、小脑和低位脑干,室温下相同固定液后固定 24h,组织体积与固定液体积比例为 1:20。从视交叉向后以 2mm 间距连续取 3 个冠状切片,室温下相同固定液固定 48h.后常规制作石蜡切片。

1.3 Maxvision 法检测缺血脑组织 TNF- α , 按照试剂盒说明操作

常规脱蜡至水;PBS(Ph7.4)冲洗,水化,每张切片加 1 滴 3%过氧化氢,室温下孵育 10min 以阻断内源性过氧化氢酶活性,PBS(Ph7.4)冲洗三次,3 min $\times$ 3,除去 PBS;滴加 TNF- α 一抗(大鼠抗小鼠,1:50)置湿盒中 4℃ 过夜;PBS 洗 5min $\times$ 3,除去 PBS; 每张切片加 1 滴即用型 Maxvision 试剂, 室温孵育 15 min;PBS 洗 3min $\times$ 3,除去 PBS;加 2 滴新鲜配制 DAB 溶液;显微镜下观察 5min;水洗,苏木素染核;脱水,透明,封片。阴性对照:用 0.1mol/L PBS 代替一抗,余步骤同前。用带刻度的目镜在 10 $\times$ 40 倍光镜下计数缺血侧脑组织一个线性长度(1mm)内阳性细胞数,共取 3 个刻度范围,取其平均值。

1.4 脑含水量、梗死体积测定

干、湿重法检测脑含水量:缺血 2h 再灌注 24 h 后,每组取

3 只大鼠,断头取脑,左右脑分开,取右脑,除去小脑和低位脑干、嗅球。用双量程电子分析天平立即称湿重,然后称量在电热恒温干燥箱中 106℃ 干燥 48 h 后的干重,以计算含水量。公式如下:含水量=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%。

TTC 染色法测脑梗死体积:缺血 2h 再灌注 24 h 后,每组取 3 只大鼠,断头取脑,置 -4℃ 冰箱 30min,左右脑分开,将右前脑沿冠状面切成厚度基本相同的 5 片,脑片置于 30 ml 2% TTC 溶液中避光孵育 20 min。将脑片置于 10%的甲醛溶液中固定。缺血再灌注病灶呈苍白色,正常组织呈红色。分离苍白区(梗死区)和非苍白区(正常区),计算梗死比率。计算公式:梗死比率(%)=苍白区重/(苍白区重+非苍白区重) $\times$ 100%。

1.5 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件处理,计量资料以均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间分析用 One-way ANOVA 分析,组间两两比较用 LSD 法;以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑组织 TNF- α 测定

光镜下 TNF- α 阳性细胞染色呈棕黄色细小颗粒,主要位于胞质、突起和核膜中,胞核不着色,背景清晰,阳性细胞体积正常,细胞核大而圆与对照组比较,松龄血脉康预处理组大鼠缺血侧脑组织 TNF- α 阳性细胞表达均有减少(P<0.05),假手术组脑组织 TNF- α 阳性细胞表达较少[1.50 $\pm$ 0.55]。见表 1,图 1。

表 1 各组大鼠脑组织 TNF- α 变化($\bar{x}\pm s$,n=6)(个/mm)
Table 1 change of TNF- α in rat brain tissue in each group

Group	n	TNF- α
Sham operation group	6	1.50 $\pm$ 0.55
Control group	6	24.67 $\pm$ 2.50
Precaution 4w group	6	17.33 $\pm$ 2.07 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较 Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

Note:Compared with control group Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

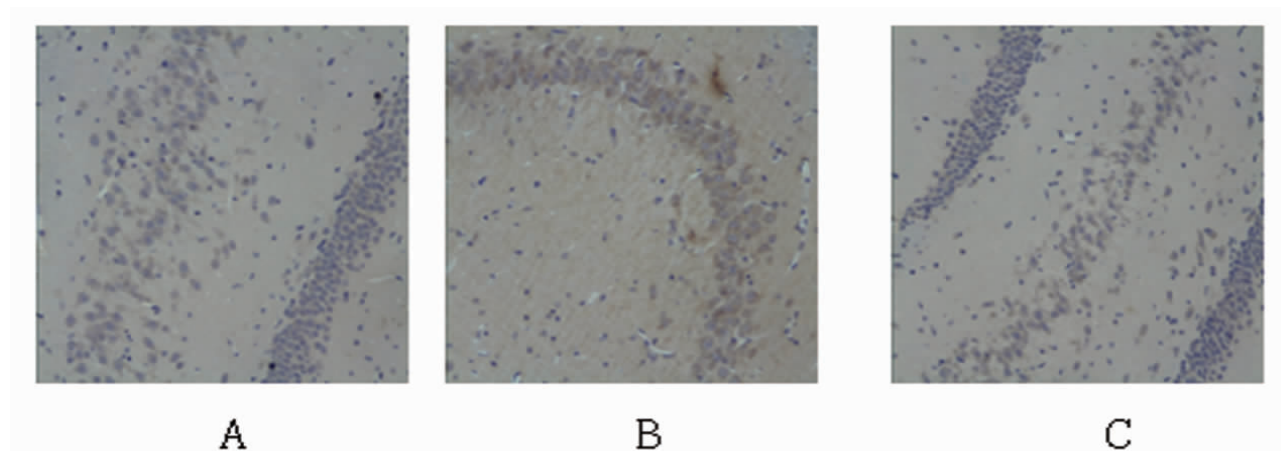


图 1 各组大鼠脑组织 TNF- α 免疫反应阳性细胞表达比较:A 假手术组;B 对照组;C 预防 4 周组;Maxvision 法 $\times$ 200

Fig 1 Comparison of brain tissue TNF- α immunoreactive cells in each group : A Sham operation group; B Control group; C Precaution 4w group; Maxvision $\times$ 200

2.2 脑含水量、梗死率测定

与对照组比较,松龄血脉康预处理组大鼠脑组织含水量降

低($P<0.05$)、脑梗死体积缩小($P<0.05$);假手术组大鼠脑组织正常。见表2。

表2 各组大鼠缺血侧脑含水量、梗死率比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$) %

Table 2 Comparison of water content and infarction rate of ischemic brain in each group

Group	n	Brain water content	Infarction rate
Sham operation group	3	68.60± 6.16	0
Control group	3	89.31± 7.65	29.52± 2.98
Precaution 4w group	3	76.63± 5.31 [▲]	24.73± 2.26 [▲]

注:与对照组比较[▲] $P<0.05$

Note: Compared with control group[▲] $P<0.05$

3 讨论

大量研究均支持炎症反应参与了缺血性脑损伤,它是由多种细胞因子介导的一种连锁过程^[7]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是重要的炎性细胞因子,在神经损伤中起重要作用^[8]。脑缺血早期即出现 TNF- α 及其受体表达上调^[9],从而促进神经细胞凋亡、坏死和脑水肿形成^[10]。沈氏等^[11]研究结果提示炎症反应遍及全脑并作用全身,贯穿脑缺血再灌注整个病理过程。

脑缺血再灌注后内皮细胞炎症反应使血脑屏障受损,加重了脑损害及脑水肿,此病理生理过程的基础是以 TNF- α 、IL-6 等细胞因子为代表的多种炎性介质失控、释放而形成的“瀑布效应”机制^[12]。有研究表明 TNF- α 水平增高能加重缺血性脑卒中, TNF- α 的水平在一定程度上体现了缺血的严重程度。并且可能提示病人的预后^[13]。早期针对 TNF- α 高表达的治疗可以改善脑缺血病人的预后^[14]。因此通过各种措施阻断 TNF- α 的表达可减少缺血性神经元损伤。

本实验采用松龄血脉康预防性给药,在相同时间点采用线栓法建立缺血再灌注大鼠模型,模拟人类缺血性脑血管病再灌注状态,于再灌注 24h 后检测脑组织 TNF- α 免疫反应阳性细胞表达,同时检测缺血侧脑组织含水量、梗死体积,了解松龄血脉康预处理对局灶性脑缺血再灌注后 TNF- α 细胞因子表达变化及其对脑水肿和脑梗死体积的影响,探讨其脑保护作用。结果显示,松龄血脉康预处理后 MCAO 大鼠,与对照组比较,松龄血脉康药物干预后缺血侧脑组织 TNF- α 免疫反应阳性细胞表达数降低,实验过程中我们观察到松龄血脉康预处理组在 MCAO 后,缺血侧脑组织含水量、脑梗死体积率较对照组均降低。

综上所述,松龄血脉康预处理大鼠 MCAO 后,脑组织 TNF- α 表达明显降低,缺血脑组织含水量、梗死体积均有改善,结果提示松龄血脉康预处理可抑制大鼠脑缺血再灌注后 TNF- α 的表达,减轻脑水肿和脑梗死体积,改善神经损伤,发挥了一定的抗炎反应作用。

参考文献(References)

- [1] 左彦方,郭毅,姜昕,等.小檗碱对兔动脉粥样硬化及其血脂的影响[J].中国脑血管病杂志,2006,3(5):204-207
Zuo Yan-fang, Guo Yi, Jiang Xin, et al. Effect of berberine on atherosclerosis and plasma levels of lipid in atherosclerotic rabbits [J]. Chinese Journal of Cerebrovascular Diseases, 2006, 3(5): 204-207
- [2] 李振光,于占彩,姚存珊,等.养血清脑颗粒治疗短暂性脑缺血发作或疑似患者的临床对照研究[J].中华老年多器官疾病杂志,2008,7(5):424-426
Li Zhen-guang, Yu Zhan-cai, You Cun-shan, et al. Yangxueqingnao

Treatment of transient ischemic attack or clinical controlled study of patients with suspected[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2008,7(5): 424-426

- [3] Cisá r P, Já ny R, Waczulí ková I, et al. Effect of Pine Bark Extract (Pycnogenol®) on Symptoms of Knee Osteoarthritis [J]. Phytother. Res, 2008,22(8), 1087-1092
- [4] Zibadi S, Rohdewald PJ, Park D, et al. Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation[J]. Nutr Res, 2008;28(5):315-320
- [5] 梁汝庆,姜婧,丁新生,等.松龄血脉康对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤和细胞凋亡的影响 [J]. 中国新药与临床杂志,2010,29(3): 221-224
Liang Ru-qing, Jiang Jing, Ding Xin-sheng, et al. Effect of Songling Xuemaikang on focal cerebral ischemia-reperfusion injury and neuron apoptosis in rat[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2010,29(3)221-224
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [7] 张冬梅,刘举祥,陈红兵,等.NF- κ B 和 IL-6 在局灶脑缺血 / 再灌注损伤大鼠脑组织中的表达[J].中国老年学杂志,2005;25:1364-1366
Zhang Dong-mei, Liu Ju-xiang, Chen Hong-bing, et al. Expressions of NF- κ B, IL-6 in cerebral tissue of rats with ischemic reperfusion injury[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2005; 25: 1364-1366
- [8] Zhu Y, Saito K, Murakami Y, et al. Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia[J]. Neurosci Lett, 2006 ;393 (2-3):122-126
- [9] Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke[J]. Nat Med, 2002,8(12):1363-1368
- [10] Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, et al.. Polymorphisms of the inflammatory system and risk of ischemic cerebrovascular events[J]. Clin Chem Lab Med, 2006;44(8):918-923
- [11] 沈丽华,叶民,丁新生,等.大鼠脑缺血再灌注后全脑及血清炎性因子水平研究[J].中风与神经疾病杂志,2009,26(4):456-458
Shen Li-hua, Ye Min, Ding Xin-sheng, et al. Study on cytokine changes of brain and serum in rats with cerebral ischemia-reperfusion[J]. J Apoplexy and Nervous Diseases, 2009,26(4):456-458
- [12] Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, et al. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon[J]. Neurosurgery, 1998, 43 (6):1382-1397
- [13] Zaremba J, Losy J. Early TNF-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity[J]. Acta Neuro Scand, 2001, 104(5):288-295
- [14] Dawson DA, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat[J]. Neurosci Lett, 1996, 218(1):41-44