

• 实验研究 Experimental research •

丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

张培蕾, 鲁海涛, 朱悦奇, 李明华, 赵俊功

【摘要】 目的 观察丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响及其对缺血再灌注损伤治疗时间窗的影响。**方法** SD 大鼠 72 只,随机分为假手术组 24 只,缺血再灌注组 24 只,丁苯酞治疗组 24 只。每组再分为缺血 2、3 和 4 h 后再灌注 3 个亚组,每亚组 8 只。采用改良线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,观察各组神经功能和脑梗死范围,免疫组化法检测脑组织中 VEGF 表达。**结果** 随着缺血时间延长,再灌注后,神经功能评分和脑梗死范围也随之增高,缺血再灌注组在缺血 2、3 和 4 h 的神经功能评分分别为 (2.6 ± 0.6) 分、 (3.7 ± 1.0) 分和 (4.2 ± 1.0) 分,脑梗死容积比率分别为 $(27.6 \pm 5.4)\%$ 、 $(33.1 \pm 6.1)\%$ 和 $(42.3 \pm 7.3)\%$;而在丁苯酞治疗组则分别为 (1.2 ± 0.5) 分、 (1.6 ± 0.7) 分、 (2.3 ± 0.9) 分和 $(9.8 \pm 1.6)\%$ 、 $(16.7 \pm 2.3)\%$ 和 $(20.7 \pm 3.9)\%$,与缺血再灌注组比较丁苯酞治疗组明显较低,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)。并发现丁苯酞治疗组的缺血 4 h 的症状评分和脑梗死容积比率与缺血再灌注组缺血 2 h 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。随着缺血时间的延长,丁苯酞治疗组和缺血再灌注组的 VEGF 表达均逐渐减弱。与假手术组比较,缺血再灌注组脑组织中 VEGF 表达明显减弱($P < 0.01$)。与其他两组比较,丁苯酞治疗组的 VEGF 表达明显较强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其作用机制可能与 VEGF 表达相关,并能延长缺血再灌注治疗时间窗。

【关键词】 脑缺血再灌注; 丁苯酞; 血管内皮生长因子; 预防

中图分类号:R743 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2012)-03-0239-04

The protective effect of dl-3n-butylphthalide on local cerebral ischemia-reperfusion injury in experimental rats ZHANG Pei-le, LU Hai-tao, ZHU Yue-qi, LI Ming-hua, ZHAO Jun-gong. Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: LU Hai-tao

【Abstract】 Objective To observe the effect of dl-3n-butylphthalide (NBP) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat model with focal cerebral ischemia-reperfusion injury and to discuss its impact on the therapeutic time window for cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Seventy-two SD rats were randomly and equally divided into three groups with 24 rats in each group: sham operation (SO) group, ischemia-reperfusion (I-R) group and NBP group; and each group was again randomly and equally subdivided into three subgroups: 2-hour, 3-hour and 4-hour reperfusion subgroup according to the reperfusion time after ischemia. By using modified suture embolus method the focal cerebral ischemia-reperfusion model was established. The experimental models were kept under close observation for the extent of cerebral infarction and the neurological deficit. The expressions of VEGF in the brain tissues were determined with immunohistochemical method. The results were statistically analyzed and compared among different groups. **Results** As the ischemia time went on, the extent of cerebral infarction and the neurological deficit after reperfusion increased. The severity of cerebral infarction and the neurological deficit in NBP group was significantly lower than that in I-R group, the difference between the two groups was significant ($P < 0.05$). The extent of cerebral infarction and the neurological deficit of ischemia observed in

the 4-hour subgroup of NBP group was quite similar to that observed in the 2-hour subgroup of I-R group, the difference was not significant ($P >$

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2012.03.017

作者单位:200233 上海市第六人民医院放射科
通信作者:鲁海涛

0.05). Along with the increased ischemia time the expressions of VEGF in brain tissues in both NBP group and I-R group were significantly decreased ($P < 0.01$). The expression level of VEGF in NBP group was significantly higher than those in both I-R group and SO group ($P < 0.01$). **Conclusion** The dl-3n-butylphthalide has a protective effect on focal cerebral ischemia-reperfusion injury. Its mechanism may be associated with VEGF expression level. The use of dl-3n-butylphthalide can prolong the therapeutic time window of reperfusion. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 239-242)

【Key words】 cerebral ischemia-reperfusion; dl-3n-butylphthalide; vascular endothelial growth factor; prevention

缺血性脑血管病严重危害人类健康,近年来研究发现,丁苯酞(dl-3n-butylphthalide, NBP)能从多个环节改善脑缺血性损伤,对缺血性脑卒中具有较佳的治疗作用^[1],对脑缺血再灌注损伤有重要的保护作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是已知作用最强和特异性最高的血管生长因子,与其受体结合后在血管生成和神经保护方面发挥着重要作用^[2]。本研究对局灶性脑缺血再灌注大鼠给予 NBP,并观察其疗效及对 VEGF 表达的影响,进一步探讨 NBP 对缺血再灌注损伤保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠,雌雄各半,体重(250 ± 20)g,由上海交通大学动物中心提供。

1.2 材料

血管内栓塞用 4 号尼龙丝线,头端烫成光滑球形,直径约 0.25 mm,消毒备用。NBP 由丁苯酞石药集团恩必普药业有限公司提供,批号 08100111。免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物制品有限公司。VEGF 单克隆抗体为 Santa Crus 公司产品,S-P 试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 缺血再灌注大鼠模型的建立 参照 Zea 线栓法^[3],并加以改良,6%水合氯醛 3.5 mg/kg 腹腔注射麻醉,颈正中切口,分离右侧颈总动脉,顺右侧颈总动脉经颈内动脉插入制备好的线栓,遇到阻力为止,阻断大脑中动脉血流。在灌注时小心拔出线栓即可实现血流再通。

1.3.2 动物分组与给药 将大鼠随机分为假手术组、单纯缺血再灌注组、NBP 治疗组,每组 24 只。将上述 3 组按缺血时间再分为缺血 2 h、3 h 和 4 h 3 个亚组,每亚组 8 只大鼠。剔除 24 h 内未存活合并有手术相关并发症大鼠。NBP 给药剂量为 200 mg/kg,

NBP 治疗组按缺血时间分别于缺血 2 h、3 h 和 4 h 后腹腔注射 NBP 稀释液,假手术组与缺血再灌注组在对应时间腹腔注射同体积的生理盐水。

1.4 观察指标

1.4.1 神经功能评分 按 Zea 评分标准,于再灌注 7 d 时对各组大鼠进行行为学评分记录。评分标准:0 分为正常,无神经体征;1 分为不能完全伸展左前肢;2 分为行走时向左侧转圈;3 分为行走时左侧跌倒;4 分为不能行走且意识水平下降。

1.4.2 脑梗死范围的测定 将进行完神经行为症状评分的大鼠深麻醉后,开胸暴露心脏,将注射器针头管经左心室插入升主动脉内,在右心耳处切一小口,注入 4℃生理盐水致右心耳流出液澄清后断头取脑,冠状面切成约 2 mm 厚的薄层 5 ~ 6 片,置 37℃、2%的 2,3,5 氯化三苯基四氮唑溶液(TTC, Sigma)中避光 30 min,染色后将脑片浸入 4%中性多聚甲醛固定保存,数码相机拍照后用图像分析系统[Imaging-Pro-Plus(OLYMPUS)]测量脑梗死体积。计算方法为每只大鼠脑梗死体积=各层梗死面积之和 × 层间隔,用脑梗死绝对体积(mm³)和脑梗死容积比率(%)表示。

1.5 免疫组化检测 VEGF

深麻醉大鼠,开胸暴露心脏,将注射器针头管经左心室插入升主动脉内,在右心耳处切一小口,注入 4℃冰生理盐水致右心耳流出液澄清后,注入 4%多聚甲醛 250 ml,先快后慢持续约 1 h,断头取脑。将脑组织置于 4%多聚甲醛中在 4℃冰箱内固定 6 h,经脱水后石蜡包埋制成切片,用抗大鼠 VEGF (1:150)行免疫组化检测。具体步骤:①将烤好的切片脱蜡、水化;②胰蛋白酶修复液进行抗原修复 30 min;③滴加 3% H₂O₂,室温孵育 10 min;④滴加一抗(VEGF 1:150),4℃过夜;⑤滴加生物素标记的二抗,室温下孵育 30 min;⑥DAB 显色;⑦蒸馏水终止反应,封片。显微镜下观察 VEGF 染色细胞,胞质或胞核呈棕黄色颗粒者为阳性细胞。应用 HPIAS-

2000 显微图像处理系统采集图片,每张切片随机取 5 个高倍镜视野($400\times$),计数 VEGF 阳性细胞数,取其平均值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行统计。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 NBP 对缺血再灌注损伤的神经功能保护作用

从图 1 可见,随着缺血时间延长,再灌注后,缺血再灌注组的神经功能评分也随之增高,在缺血 2、3 和 4 h 的神经功能评分分别为(2.6 ± 0.6)分、(3.7 ± 1.0)分和(4.2 ± 1.0)分;而在 NBP 治疗组则分别为(1.2 ± 0.5)分、(1.6 ± 0.7)分和(2.3 ± 0.9)分,两组间差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)。并发现 NBP 治疗组的缺血 4 h 的症状评分与缺血再灌注组缺血 2 h 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

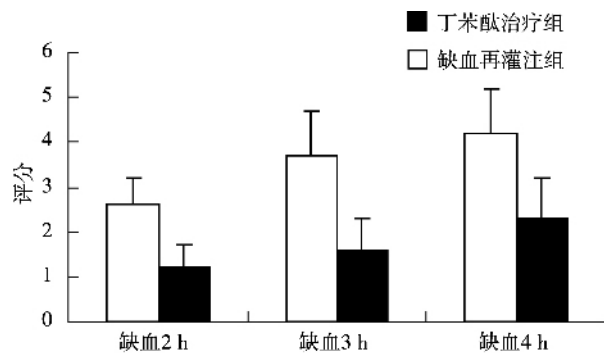


图 1 丁苯酞缺血再灌注损伤神经功能的保护作用

2.2 NBP 对缺血再灌注损伤的脑梗死范围的影响

从图 2 可见,随着缺血时间的延长,再灌注后,缺血再灌注组的脑梗死容积比率增大,在缺血 2、3 和 4 h 的脑梗死容积比率分别为 (27.6 ± 5.4)%、(33.1 ± 6.1)%和(42.3 ± 7.3)%;而 NBP 治疗组则分别为(9.8 ± 1.6)%、(16.7 ± 2.3)%和(20.7 ± 3.9)%,两组间差异有统计学意义(P 值均 < 0.01),并发现

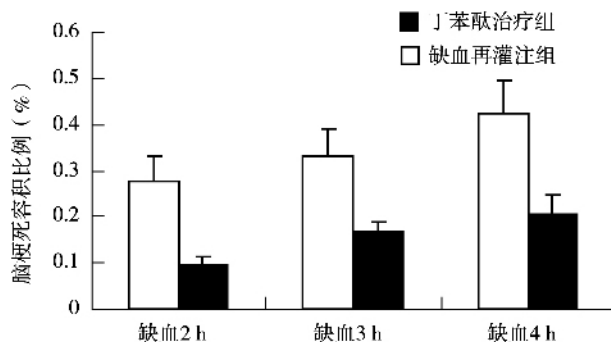
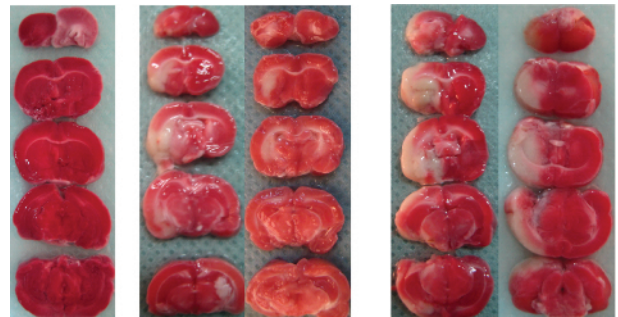


图 2 丁苯酞对缺血再灌注损伤的脑梗死范围的影响

NBP 治疗组缺血 4 h 的脑梗死容积比率与再灌注组缺血 2 h 相近,两者间差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 3)。

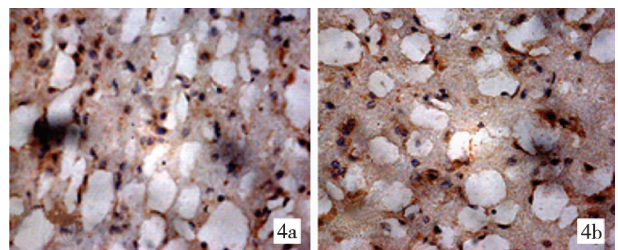


3a 假手术组的各层梗死面积 3b 缺血再灌注组缺血 2 h 的各层梗死面积 3c 丁苯酞治疗组缺血 4 h 各层梗死面积

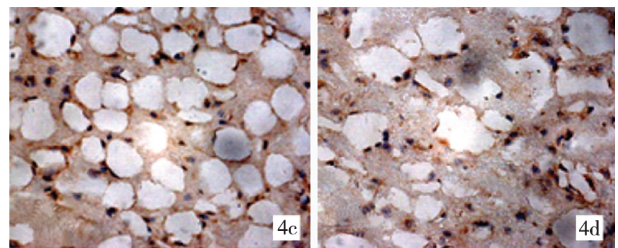
图 3 三组动物各层梗死面积比较

2.3 NBP 对缺血再灌注损伤组织 VEGF 表达的影响

从图 4、5 可见,NBP 治疗组和缺血再灌注组的 VEGF 表达均逐渐减弱。缺血再灌注组与假手术组



4a 缺血再灌注组缺血 2 h 4b 丁苯酞治疗组缺血 2 h



4c 缺血再灌注组缺血 4 h 4d 丁苯酞治疗组缺血 4 h

图 4 两组不同缺血时间梗死周围区血管内皮细胞生长因子蛋白表达(SP, $\times 400$)

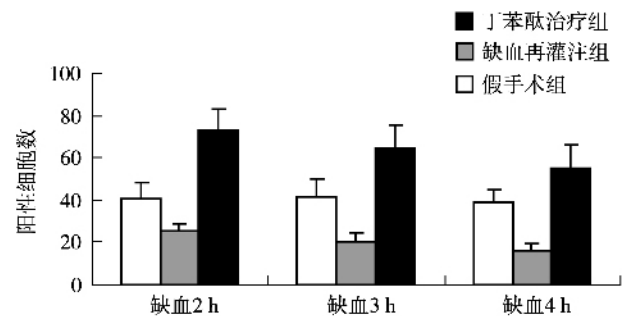


图 5 假手术组与丁苯酞治疗组脑组织血管内皮细胞生长因子蛋白表达

比较,脑组织中 VEGF 的表达明显减弱($P < 0.01$)。与其他两组比较,NBP 治疗组 VEGF 表达明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

多项基础与临床研究已证明 NBP 可阻断缺血性脑卒中所致脑损伤的多个环节,具有较强的抗缺血作用,可明显缩小大鼠局部脑缺血的梗死面积,减轻脑水肿,改善脑能量代谢和缺血区的微循环和血流量^[4]。对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[5]。但有关其对缺血再灌注治疗时间窗的延长作用尚少见相关研究。本研究选择与临床缺血性脑卒中病理相似的大脑中动脉阻塞动物模型,采用神经功能评分评价 NBP 对延长缺血再灌注治疗时间窗的作用。结果显示:随着缺血时间延长,再灌注后,神经功能评分和脑梗死范围也随之增加;而经 NBP 治疗后,神经功能评分和脑梗死范围与缺血再灌注组比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。并发现 NBP 治疗组缺血 4 h 的症状评分与缺血再灌注组缺血 2 h 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 NBP 对脑缺血再灌注损伤有保护作用,故能延长缺血再灌注治疗时间窗。

VEGF 在体外是一种作用很强的内皮细胞有丝分裂原,可特异地作用于内皮细胞,在体内可增加血管通透性及新生血管形成^[6]。VEGF 的作用是由靶细胞上的受体所介导的在脑缺血梗死灶中 VEGF 受体 Flt-1 的反应性增加发生在神经元、神经胶质及内皮细胞;而另一受体 Flt-1 的免疫反应主要发生在神经胶质细胞,并且不同程度出现在内皮细胞之中,这都表明,在灶性脑缺血后 VEGF 及其受体的表达与减轻损伤有关^[7]。局灶性脑缺血时,VEGF 表达增高是单向的,主要见于缺血半暗带区,缺血中心表达较少^[8]。造成这种分布上的差异可能与梗死区神经元受损或死亡细胞过多致 VEGF 蛋白合成障碍有关,半暗带区存活细胞越多,VEGF 的表达越高,反之半暗带区存活的脑细胞越少,VEGF 的表达越少,由此可以推测 VEGF 的表达多少,反映了半暗带区脑细胞存活的多少,所以通过半暗带区

VEGF 的表达多少,可以界定缺血半暗带的存在与否,并可判定缺血半暗带的大小,从而为缺血性脑血管病能否进行溶栓治疗提供理论依据。

本研究中,应用 NBP 的大鼠脑缺血再灌注后 VEGF 蛋白表达明显上调,而且脑缺血时间越短,用药时间越早,缺血再灌注后脑组织中 VEGF 的表达越强,对半暗带区脑细胞的保护作用越明显,从而为缺血性脑血管病的溶栓治疗提供了更多的可能性,应用 NBP 可延长溶栓治疗的时间窗,但需要进一步证实。随着研究的进一步深入,NBP 有望成为缺血性脑卒中的一种经济有效的治疗药物。

[参考文献]

- [1] Liao SJ, Lin JW, Pei Z, et al. Enhanced angiogenesis with dl-3n-butylphthalide treatment after focal cerebral ischemia in RHRSP[J]. Brain Res, 2009, 1289: 69 - 78.
- [2] Schmidt NO, Koeder D, Messing M, et al. Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche[J]. Brain Res, 2009, 1268: 24 - 37.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84 - 91.
- [4] 郑献召,张三军,石莉,等. 丁苯酞治疗大鼠脑缺血再灌注损伤作用机制的研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12: 59 - 61.
- [5] 焦东亮,倪秀石,高艳,等. 丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 caspase-3 表达的影响[J]. 中国临床神经科学, 2007, 15: 19 - 23.
- [6] Lennmyr F, Ata KA, Funa K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1998, 57: 874 - 882.
- [7] Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue-beyond blood vessels[J]. Exp Neurol, 2004, 187: 246 - 253.
- [8] Cao WY, Deji QZ, Li QF, et al. Effects of dl-3n-butylphthalide on the expression of VEGF and bFGF in transient middle cerebral artery occlusion rats [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2009, 40: 403 - 407.

(收稿日期:2011-09-19)

(本文编辑:侯虹鲁)