

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0567-04

• 实验研究 •

## 藻酸双酯钠对实验性脑缺血大鼠急性期的干预

游咏<sup>1</sup>, 杨期东<sup>1</sup>, 谢红炬<sup>2</sup>, 廖端芳<sup>3</sup>, 张岳峰<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008;

2. 南华大学附属第一医院激光整形外科; 3. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内科学; 脑缺血; 藻酸双酯钠; 短暂性大脑中动脉闭塞; 细胞内钙离子浓度; 凋亡; 大鼠

[摘要] 目的 探讨不同给药时间藻酸双酯钠对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织神经细胞凋亡的保护机制。方法 经大鼠颈内动脉将一线栓插入右侧大脑中动脉 1.5 h 后再灌注 24 h 制成局灶性脑缺血再灌注大鼠模型。在再灌前 30 min 或再灌注后 5 h 经腹腔给予相同剂量的藻酸双酯钠。流式细胞术测定受损脑组织神经细胞内钙离子浓度及凋亡率, 同时观察大鼠的神经功能障碍评分。结果 藻酸双酯钠治疗组神经功能障碍较非治疗组明显减轻, 相应的藻酸双酯钠治疗组细胞内钙离子浓度增高受抑制、细胞凋亡减少。不同给药时间点组间上述指标差异亦有显著性。结论 藻酸双酯钠可以减轻脑组织神经再灌注损伤, 抑制神经细胞凋亡。抑制受损神经细胞内钙离子浓度增高是其保护作用的可能机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Intervention of Polysaccharidesulfate on the Acute Period in the Experimental Cerebral Ischemia Rats

YOU Yong<sup>1</sup>, YANG QF Dong<sup>1</sup>, XIE Hong-Ju<sup>2</sup>, LIAO Duar-Fang<sup>3</sup>, and ZHANG Yue-Feng<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. Department of Plastic Surgery, First Hospital Affiliated to the Nanhua University; 3. Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Ischemia/Reperfusion Injury; Neuroprotective Agents; Polysaccharidesulfate;  $[Ca^{2+}]_i$ ; Apoptosis; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of polysaccharidesulfate on cell apoptosis in focal cerebral Ischemia-Reperfusion injury rats. **Methods** Right middle cerebral artery was occlude by inserting a thread through internal carotid artery for 1 h and 30 min, and then reperused for 24 h. PSS were injected via intraperitoneal of the rats at 30 minutes before or 5 hours after reperfusion. Intracellular free calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and rates of apoptosis and death were measured by flow cytometry. The behavior of rats was investigated at the same time. **Results** The damage of rat's behavior in the PSS-treatment groups was small in comparison with untreated group. The numbers of apoptosis cells were dramatically reduced in the PSS-treatment groups in comparison with untreated group. While the increasing  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced by PSS. These significant difference between 30 min before onset and 5 h after reperfusion groups was also discovered. **Conclusions** PSS reduced the neuronal damage and inhibited apoptosis induced by ischemia reperfusion. The antiapoptosis effects of it might be attributed to its effects by bating the increasing of  $[Ca^{2+}]_i$ .

藻酸双酯钠(polysaccharidesulfate, PSS)是从褐藻中提取多糖,经酯化和磺化而制成的半合成药,是一种类肝素的新型海洋药物,具有降低血液粘滞度、抗凝和改善微循环的作用,用于脑缺血性疾病的抗凝治疗。近年来研究发现,PSS具有选择性钙拮抗作用,PSS对蜂毒肽诱导的皮质神经元凋亡具有明显的保护作用<sup>[1]</sup>,缺血性脑损伤与神经元凋亡相关,

有理由推测 PSS 在缺血神经损伤中具有保护作用,深入研究 PSS 的作用和机制具有重要的临床意义。为此,我们探讨了大鼠局灶性脑缺血时 PSS 对大鼠行为及神经元凋亡的影响,观察其对缺血性脑损伤是否具有保护作用。同时,为了探讨 PSS 神经保护的机制,我们就 PSS 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织神经细胞内  $Ca^{2+}$  浓度(intracellular free calcium,  $[Ca^{2+}]_i$ )的影响进行了研究。

[收稿日期] 2004-10-13

[修回日期] 2005-08-10

[作者简介] 游咏, 副主任医师, 主要从事脑血管病研究, 联系电话为 0731-4327216, E-mail 为 xhjy88@yahoo.com.cn。杨期东, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管病研究, 联系电话为 10731-4327216, E-mail 为 youyong1251@tom.com。通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管药理研究, 联系电话为 0734-8281308, E-mail 为 DFLiao@hotmail.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及模型制备

选用雄性 SD 大鼠(由中国医学科学院动物研究所提供), 体重 250~300 g。采用持续局部脑缺血

模型,局灶缺血模型的制备参考文献[2]所述方法,建立右侧大脑中动脉缺血(MCAO)模型。假手术组除不插入栓子,其余相同。手术组和 PSS 组均缺血 90 min,麻醉后拔出线栓。线栓直径根据大鼠体重调节。PSS 组藻酸双酯钠(由青岛海尔第三制药厂惠赠)给药分别在线栓栓塞大脑中动脉完成后 60 min 或再灌注后 5 h,腹腔注射 PSS 溶液,剂量为 10  $\mu$ g/g。

## 1.2 大鼠功能障碍评分

再灌注后 6 h 参照 Longas 等方法对大鼠的功能障碍进行分级评分。

## 1.3 脑细胞悬液制备、 $[Ca^{2+}]_i$ 及细胞凋亡检测

再灌注 6 h 后,每组大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,断头处死,迅速取手术侧额顶背外侧皮质和基底节约 0.1 g,称重,取脑组织置于 1 mL 冰冷 Hanks 液的表面皿中,剪碎后移入试管中,加适量胰蛋白酶,置 37  $^{\circ}$ C 培养箱中 20 min。用 1 mL 冰冷的 DMEM 培养基(含 10% 小牛血清)终止消化,经 200 目过筛后 1 000 r/min 离心 10 min,去上清液,1 mL DMEM 培养基重悬浮制备成细胞悬液。台盼兰排斥实验检查,细胞成活率在 95% 以上。调细胞浓度为  $1 \times 10^9$  个/L,取 100  $\mu$ L 加入终浓度为 2  $\mu$ mol/L Fluor-3 中,加入 F-127,混合均匀后室温避光 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min。Annexin (FITC 凋亡检测:取  $2 \times 10^5$  个细胞悬液,加入 5  $\mu$ L Annexin (FITC 及 10  $\mu$ L PI(浓度为 250 mg/L),与 100  $\mu$ L buffer 混匀。暗处温育 30 min,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,PBS 洗 1 次,以 1 mL PBS 重悬,1 h 内上机检测。应用 ALTRA 型流式细胞仪进行分析,以未染色细胞为阴性对照。每份样品检测 10 000 个细胞,测定结果经 EXPO32 软件进行参数获取和数据分析。

## 1.4 统计学处理

SPSS11.0 统计软件进行数据分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异用  $t$  检验。显著性界值为  $P < 0.05$ 。

# 2 结果

## 2.1 藻酸双酯钠对神经功能障碍评分的影响

从表 1(Table 1)中可以看到假手术组大鼠无神经功能缺损,手术组神经功能障碍明显,而 PSS 各组神经功能障碍均有明显改善。尽管再灌注后 5 h 给药 PSS 对试验性缺血大鼠的功能障碍仍然有改善作用,但在再灌注前给药较再灌注后给药的功能改善更为明显。

表 1. 藻酸双酯钠对脑缺血大鼠神经功能障碍评分、脑细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度及细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Table 1. The effect of PSS on score of functional disturbance,  $[Ca^{2+}]_i$  and the rates of neuron apoptosis

分 组	功能障碍 评分	$[Ca^{2+}]_i$ (mmol/L)	凋亡率 (%)
假手术组	0	$0.53 \pm 0.19$	$0.83 \pm 0.11$
手术组	$3.40 \pm 0.65^a$	$2.82 \pm 0.30^a$	$27.29 \pm 0.22^a$
PSS 组	IR 前 $1.20 \pm 0.11^{bc}$	$0.96 \pm 0.21^{bc}$	$4.01 \pm 0.17^{bc}$
	IR 后 $2.02 \pm 0.22^b$	$1.82 \pm 0.26^b$	$9.91 \pm 0.32^b$

a:  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b:  $P < 0.05$ , 与手术组比较; c:  $P < 0.05$ , 与 IR 后 PSS 组比较。

## 2.2 藻酸双酯钠对细胞内 $Ca^{2+}$ 荧光强度的影响

表 1(Table 1)显示  $[Ca^{2+}]_i$  假手术组最低,手术组最高,PSS 组给予 PSS 后  $[Ca^{2+}]_i$  较单纯手术组均有不同程度下降,其中再灌前 30 min 给予 PSS 组的  $[Ca^{2+}]_i$  下降最为明显,约下降 70%。图 1(Figure 1)显示脑缺血处  $[Ca^{2+}]_i$  指数显著增高,给予 PSS 后脑缺血处  $[Ca^{2+}]_i$  指数增高程度减低,与手术组比较差异有显著性。

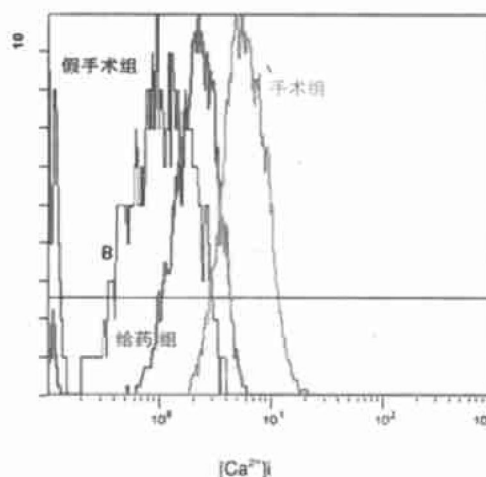


图 1. 流式细胞术测定假手术组、手术组及再灌注前藻酸双酯钠组细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度

Figure 1.  $[Ca^{2+}]_i$  measured by FCM

## 2.3 藻酸双酯钠对神经元凋亡的影响

表 1(Table 1)显示,缺血后大鼠缺血侧神经元凋亡明显增加( $P < 0.01$ )。给药后缺血侧神经元凋亡率明显下降,并呈时间依赖性,再灌注前给药较再灌注后给药抑制凋亡作用更明显。图 2(Figure 2)所示为假手术组(a)、手术组(b)及 IR 前 PSS 组测定细胞凋亡率的流式图代表。

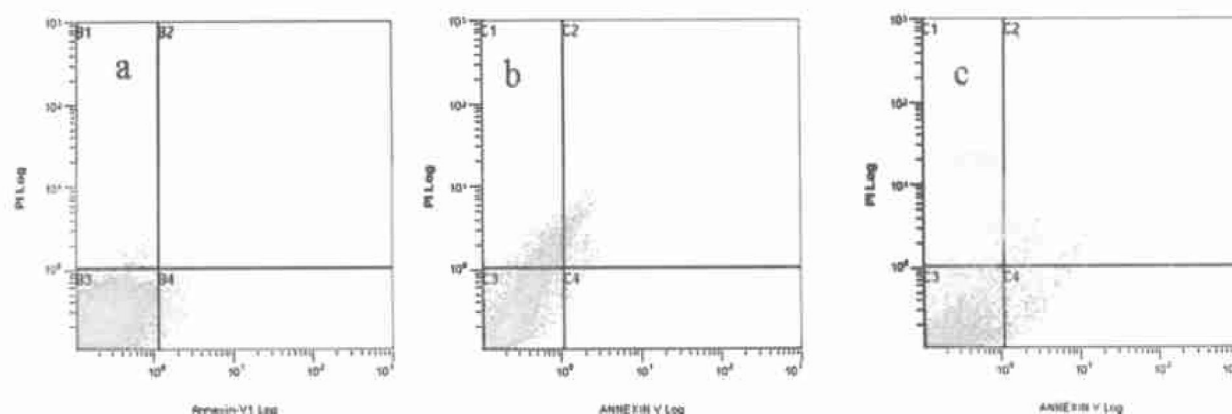


图 2. 流式细胞术测定假手术组、手术组及再灌注前藻酸双酯钠组细胞凋亡率

a 为假手术组; b 为手术组; c 为再灌注前 PSS 组。

Figure 2. Rates of apoptosis cells by FCM

## 2.4 行为障碍评分与细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光强度和凋亡率相关性比较

右侧大脑中动脉缺血大鼠功能障碍评分与细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度和凋亡检出率均呈明显的正相关 (相关系数  $r = 0.51, 0.62$ ;  $P < 0.05$ )。从图 1、图 2 可直观的看出细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度与 Annexin/PI 双标凋亡检出率亦呈正相关 (相关系数  $r = 0.84$ ;  $P < 0.05$ )。假手术组  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  最低, 相应的此组神经元凋亡率也最低; 给药后缺血侧的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  与细胞凋亡率均较单纯手术组有明显下降。

## 2.5 手术侧及非手术侧细胞凋亡率比较

假手术组大鼠手术侧及非手术侧脑细胞凋亡率无明显差异; 而单纯手术组大鼠脑缺血侧细胞凋亡率较缺血对侧有明显增高 ( $P < 0.01$ ), 手术组大鼠缺血对侧脑细胞凋亡率与假手术组细胞凋亡率比较差异无显著性 (表 2, Table 2)。

表 2. 脑缺血侧及对侧脑细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Figure 2. Comparison of apoptosis rates between cerebral ischemia side and its opposite side

分 组	手术侧	手术对侧
假手术组	$0.83 \pm 0.11$	$0.84 \pm 0.10$
手术组	$27.29 \pm 0.22^a$	$0.89 \pm 0.16$

a:  $P < 0.01$ , 与手术对侧比较。

## 3 讨论

早前研究表明, 脑缺血再灌注时神经元的损伤除坏死外, 还存在凋亡现象, 且凋亡细胞主要出现在梗死周边区域<sup>[3,4]</sup>。也有研究表明, 凋亡参与了脑缺血后神经损伤的形成和发展<sup>[5,6]</sup>。如果能阻止凋亡的发展, 就有可能减轻脑缺血再灌注时脑损伤程

度, 缩小梗死范围。有报道凋亡细胞在脑缺血后 30 min 即出现, 24~48 h 达高峰, 凋亡细胞可持续存在 4 周左右。因此可以认为, 抗神经细胞凋亡药物的治疗时间窗较长, 不仅可以用于脑缺血急性期的治疗, 而且在慢性期也可取得一定疗效。脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生机制目前还不十分清楚。多数学者认为, 半暗带的神经元发生凋亡主要是通过细胞色素 C 依赖性的线粒体凋亡途径起作用的, 脑缺血引起的细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载是其中一个重要环节, 也可能是多种因素引起神经细胞死亡的最后共同通路<sup>[7,8]</sup>。Tantral 等<sup>[9]</sup>研究发现, 敲除了三磷酸基醇脂受体 ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) 的细胞可以对抗 T 细胞受体 (TCR) 诱导的细胞凋亡的发生, 并指出主要是由于此细胞缺乏胞内内质网释放  $\text{Ca}^{2+}$  的能力, 从而抑制凋亡蛋白 Caspase-3 及 Caspase-9 的形成。因此, 如何防止胞内  $\text{Ca}^{2+}$  失衡, 减少脑组织损伤, 是脑保护研究的重点。

许多研究发现, 肝素对中枢神经元具有保护作用<sup>[10]</sup>, 由于肝素的化学本质是氨基多糖, 但口服不能吸收, 且有明显的副作用, 因而在脑缺血疾病的应用中受到限制。但是许多具有抗衰老作用的中药都富含具有生物活性的多糖类物质, 其临床应用在国内已经得到证实, 因此, 推测某些天然生物多糖可能具有防止中枢神经元迟发性损伤的作用。藻酸双酯钠 (PSS) 是从褐藻中提取的多糖, 经酯化和磺化而制成的半合成药。是一种类肝素药物, 此前研究显示 PSS 对蜂毒肽诱导的皮质神经元凋亡具有明显的保护作用<sup>[1]</sup>, 徐岩等<sup>[11]</sup>研究显示: PSS 明显抑制心肌细胞 L 型钙通道, 降低钙内流, 减轻细胞内的钙超载。本试验结果发现: PSS 可抑制受损神经细胞内钙离子浓度的增高, 相应地减少 tMCAO 大鼠神经元凋亡和功能障碍评分, 并呈剂量依赖性。表明 PSS 可通

过抗凋亡起到神经保护作用。其抗凋亡机制可能与其抑制 tMCAO 大鼠神经元胞内钙离子浓度增高有关。试验结果发现:再灌注前给予 PSS 较再灌注后给药其抑制 tMCAO 大鼠受损神经细胞内钙离子浓度增高,减少凋亡的作用更强,但再灌注后 5 h 给药仍显示良好的抗凋亡作用。由此可见两种给药时间点及两个剂量 PSS 均可对抗 tMCAO 大鼠的脑细胞凋亡,但其调控受损神经细胞内钙离子浓度的详尽机制有待进一步探讨。

综上所述, PSS 能通过抑制胞内钙离子浓度增高发挥抗凋亡效应,从而起到神经保护作用,最终改善神经功能障碍。

#### [参考文献]

- [1] 唐孝礼, 邱鹏新, 黎明涛, 苏兴文, 林穗珍, 颜光美. 藻酸双酯钠对蜂毒肽诱导的皮质神经元凋亡的保护作用. *中国药理学通报*, 1999, **15** (5): 407-410
- [2] 丰岩清, 郭云良, 梁秀龄. 神经生长因子对脑缺血再灌注大鼠突触素表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 123-125
- [3] Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*, 1995, **146** (5): 1 045-051
- [4] Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1995, **26** (7): 1 252-258
- [5] Charriat MC, Margaill I, Represa A. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: Anisitu DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, **16** (2): 186-189
- [6] Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, **15** (3): 389-397
- [7] Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, et al. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **298** (1): 249-256
- [8] Rosenstock TR, Carvalho AC, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem*, 2004, **88** (5): 1 220-228
- [9] Tantral L, Malathi K, Kohyama S, Silane M, Berenstein A, Jayaraman T. Intracellular calcium release is required for caspase-3 and -9 activation. *Cell Biochem Funct*, 2004, **22** (1): 35-40
- [10] Libersan D, Khalil A, Dagenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, et al. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res*, 1998, **37** (3): 656-666
- [11] 徐岩, 陈旭华, 王腾, 高世明. 藻酸双酯钠对豚鼠心室肌细胞动作电位及 L 型钙电流的影响. *中国药理学通报*, 2002, **18** (5): 536-538

(此文编辑 朱雯霞)