

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0040-03

阿托伐他汀钙对实验性脑缺血再灌注后炎症反应的影响

谷文萍, 肖慧, 李伟, 李晓军, 刘福中, 宋小明, 杨期东

(中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 神经病学; 脑缺血再灌注; 阿托伐他汀钙; 炎症反应; 多形核白细胞; 核因子 κ Bp56; 细胞间粘附分子 1[摘要] 目的 研究阿托伐他汀钙对大鼠大脑中动脉缺血再灌注后脑组织中核因子 κ Bp56、细胞间粘附分子 1 蛋白表达及炎症细胞渗出的影响。方法 采用大鼠中动脉线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型, 参考 Longa 5 分制法在动物麻醉清醒后进行评分, 应用免疫组织化学检测核因子 κ Bp56 和细胞间粘附分子 1 蛋白表达, 运用 HE 染色观察多形核白细胞浸润的情况。结果 他汀组与缺血组比较, 大鼠缺血侧脑组织中核因子 κ Bp56 蛋白和细胞间粘附分子 1 蛋白表达减少 ($P < 0.05$), 多形核白细胞渗出减少 ($P < 0.05$), 神经病学评分也减少 ($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀钙能抑制缺血再灌注后脑组织中核因子 κ Bp56 和细胞间粘附分子 1 蛋白表达, 从而减少炎症细胞渗出, 抑制大鼠实验性脑缺血再灌注后炎症反应, 最终减轻其缺血再灌注损伤。

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on Inflammatory Response of Cerebral Ischemia—Reperfusion Injury in Rats

GU Weir-Ping, XIAO Hui, LI Wei, LI Xiaor-Jun, LIU Fur-Zhong, SONG Xiao-Ming, and YANG Qi-Dong

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Ischemia/Reperfusion; Atorvastatin Calcium; Inflammatory; Polymorphonuclear Leucocytes; Nuclear Factor κ Bp56; Intercellular Adhesion Molecule 1[ABSTRACT] Aim To investigate if the atorvastatin calcium protects the brain against injury induced by ischemia/reperfusion (I/R) and its impact on the expression of nuclear factor κ Bp56 (NF- κ Bp56) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).Methods Rats were subjected to cerebral I/R injury through the occlusion of the middle cerebral artery. Neurological deficits were determined by Longa's score. The expression of ICAM-1 and NF- κ B were detected by immunohistochemical analysis. The effusion of polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) in brain tissue was evaluated by HE staining.Results In group I/R+ statin, contrasting to group I/R, the expression of ICAM-1 and NF- κ B were decreased significantly ($P < 0.05$); the Longa's score were lower ($P < 0.05$); and the effusion of PMNLs were inhibited ($P < 0.05$).Conclusion Atorvastatin calcium has protective effects on the brain after experimental stroke and its probable mechanism involves the decreased expression of NF- κ Bp56 and ICAM-1.

研究证明他汀类药物对心血管疾病有明显的保护作用, 并具有调节炎症反应的作用^[1]。脑缺血再灌注后存在“再灌注损伤”, 与炎症反应密切相关, 而他汀类药物对脑缺血再灌注后炎症反应是否有影响少有报道。本实验以阿托伐他汀钙进行干预, 研究大鼠局灶性脑缺血再灌注后缺血侧脑组织内核因子 κ Bp65 (nuclear factor- κ Bp56, NF- κ Bp56) 和细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 蛋白的表达及多形核白细胞 (polymorphonuclear leucocytes, PMNLs) 的渗出, 探讨阿托伐他汀对脑缺血再灌注后炎症反应及脑缺血再灌注损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

健康雄性 SD 大鼠 30 只, 3~4 个月, 250~300 g, 购自中南大学湘雅医学院动物学部。阿托伐他汀钙 (Godecke GmbH 生产, 辉瑞制药有限公司分装), 核因子 κ Bp65、ICAM-1 单克隆抗体、SABC 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒、多聚赖氨酸购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物分组

将 30 只大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只。正常对照组; ④假手术组; ④实验对照组: 仅建立缺血模型; 安慰剂组: 术前每日 5 mg/kg 淀粉灌胃 20 天;

[收稿日期] 2006-08-22 [修回日期] 2006-12-30

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (02JJY3028); 湖南省卫生厅课题 (B2005023)

[作者简介] 谷文萍, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管疾病研究, 联系电话为 13973134058, E-mail 为 guwenping393@sohu.com。肖慧, 硕士研究生, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 xiaohui9701342@163.com。李伟, 硕士研究生, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 liveitd@126.com。

阿托伐他汀钙组:术前每日 5 mg/kg 阿托伐他汀钙灌胃 20 天。

1.3 动物模型的制备

大鼠大脑中动脉梗死模型制备参照本室方法^[2],缺血 2 h 后再灌注。假手术组仅剪开颈外动脉,不插入线栓。所有动物 24 h 后麻醉,打开胸腔,依次以 0.9% 生理盐水和 4% 多聚甲醛进行灌注,取脑组织用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 24 h 后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,连续冠状切片(厚度 4 μm)。

1.4 神经病学评分

参考 Longa5 分制法在动物麻醉清醒后进行评分^[3]。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。

1.5 多形核白细胞计数

切片脱蜡至水后哈瑞氏苏木精染核,1% 盐酸酒精分化,氨水返蓝,伊红染色,脱水,透明后中性树脂封片。在光学显微镜下进行观察,每张切片随机取 6 个高倍视野(200×)计数 PMNLs,取其均数。

1.6 免疫组织化学染色

采用 SABC 法检测核因子 κBp65 和 ICAM 分子 1,参照试剂盒说明书操作。核因子 κBp65 和 ICAM-1 一抗抗体浓度均为 1:100 稀释。DAB 显色,蒸馏水洗。苏木素复染 2 min、盐酸酒精分化,脱水、透明、封片。核因子 κBp65 蛋白阳性细胞为胞浆着色呈棕黄色,使用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像分析系统对切片进行图像分析,缺血侧取 6 个视野(浅层皮质、深层以及海马各 2 个)进行光密度值测定,取均数;ICAM-1 蛋白阳性细胞为胞膜着色呈棕黄色,高倍镜下(×200)随机观察缺血区 5 个视野,计数 5 个视野阳性血管数和为其值。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。成组设计多样本均数的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA 检验),组间比较用两样本 *t* 检验,数据使用 SPSS12.0 统计软件包进行统计分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经病学评分的比较

大鼠脑缺血再灌注后出现了程度不同的神经功能缺损症状,较正常对照组和假手术组比较有明显的统计学意义($P < 0.001$)。使用他汀干预治疗后,其神经功能评分与实验对照组和安慰剂组比较明显减少($P < 0.05$)(表 1)。

表 1. 各组神经病学评分和多形核白细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	神经病学评分	PMNLs 计数 (个/HP)
正常对照组	0 ± 0	0 ± 0
假手术组	0 ± 0	0 ± 0
实验对照组	2.66 ± 0.81 ^a	2.75 ± 0.73 ^a
安慰剂组	2.83 ± 0.98 ^a	2.75 ± 0.73 ^a
阿托伐他汀钙组	1.50 ± 0.54 ^{ab}	1.89 ± 0.55 ^{ab}

a 为 $P < 0.001$, 与正常对照组和假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与实验对照组和安慰剂组比较。

2.2 各组多形核白细胞浸润情况

正常对照组和假手术组镜下未见 PMNLs; 脑缺血后可见 PMNLs 附壁,部分细胞浸润于脑实质,可见胶质增生,部分血管完整性欠佳,微血管偶见血栓形成,组织间隙可见水肿,PMNLs 计数明显多于正常对照组和假手术组($P < 0.001$)。使用他汀干预治疗后,可见组织间隙水肿程度减轻,PMNLs 计数较实验对照组和安慰剂组明显减少($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 各组核因子 κBp65 蛋白水平和细胞间粘附分子 1 阳性血管数的变化

核因子 κBp65 在正常对照组和假手术组浅层皮质、深层皮质及海马区有少量表达,两组间比较无统计学意义;再灌注后 24 h 核因子 κBp65 表达明显增加($P < 0.001$);他汀干预治疗后核因子 κBp65 表达较实验对照组和安慰剂组明显减少($P < 0.01$)。ICAM-1 在正常对照组和假手术组深层皮质和海马区有表达,两组间比较无统计学意义;再灌注后 24 h ICAM-1 表达明显增加($P < 0.05$);他汀干预治疗后 ICAM-1 表达较实验对照组和安慰剂组明显减少($P < 0.05$)(表 2 和图 1)。

表 2. 各组核因子 κBp65 蛋白水平和细胞间粘附分子 1 阳性血管数的变化($\bar{x} \pm s$)

分 组	核因子 κBp65 蛋白	ICAM-1 阳性血管数
正常对照组	0.0616 ± 0.0144	1.33 ± 1.03
假手术组	0.0625 ± 0.0127	1.13 ± 1.06
实验对照组	0.3232 ± 0.0816 ^a	29.83 ± 5.11 ^a
安慰剂组	0.3230 ± 0.0789 ^a	28.62 ± 4.82 ^a
阿托伐他汀钙组	0.2138 ± 0.0095 ^{ac}	19.66 ± 4.03 ^{ab}

a 为 $P < 0.001$, 与正常对照组和假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与实验对照组和安慰剂组比较。

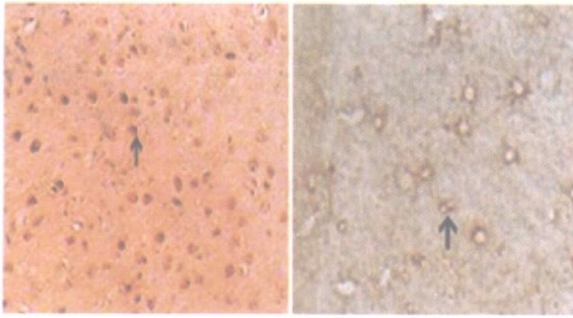


图 1. 缺血再灌注 24 h 核因子 κ Bp65(左)和细胞间粘附分子 1(右)免疫组织化学染色($\times 200$) \uparrow 示染色阳性细胞。

2.4 核因子 κ Bp65 与细胞间粘附分子 1 表达的相关性分析

核因子 κ Bp65 蛋白表达水平和 ICAM-1 阳性血管数呈正相关(图 2), 相关系数 r 为 0.798(均 $P < 0.001$)。

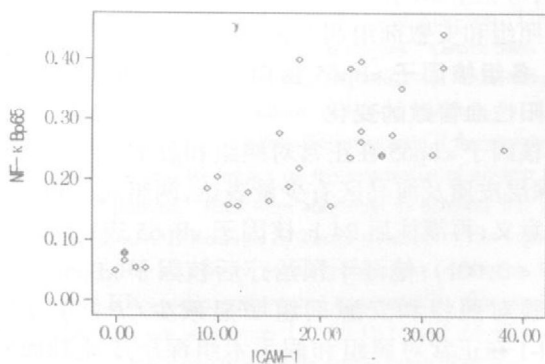


图 2. 核因子 κ Bp65 与细胞间粘附分子 1 表达相关散点图

3 讨论

大量研究表明, 炎症反应在脑缺血再灌注损伤中起着重要作用, 通过对炎症进行干预能明显减轻脑缺血再灌注损伤^[4]。

炎症细胞的渗出是炎症反应的最重要特征, PMNLs 的渗出在整个过程中起关键作用。在本研究中我们观察到脑缺血后缺血侧脑组织中 PMNLs 渗出明显多于正常对照组和假手术组, 说明炎症反应参与了大鼠脑缺血再灌注后的病理过程。

大量研究证明核因子 κ B 在绝大多数炎症反应中起重要作用。核因子 κ B 能促使编码包括 ICAM-1 在内的细胞因子、趋化因子、粘附分子、c 反应蛋白及可诱导的效应酶的基因转录^[5,6]。内皮细胞表面

的粘附分子——ICAM-1 对白细胞和内皮细胞之间的粘附起关键作用。而粘附是中性粒细胞渗出的关键环节, 是炎症反应的触发点, 也是干预炎症反应的着力点。本研究证实脑缺血后缺血组织核因子 κ Bp65 和 ICAM-1 的表达较正常对照组和假手术组织明显增多, 提示核因子 κ Bp65 和 ICAM-1 作为重要炎症介质参与了大鼠脑缺血再灌注后炎症反应。

他汀类(statins)药物是近 10 年开发的三羟基三甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA)抑制剂, 具有调脂作用。近年来, 大量实验证实他汀对动脉粥样硬化病变中的炎症反应有调节作用, 这种调节作用可通过抑制核因子 κ B 等炎症介质的表达和活性来实现^[7-10]。本研究发现阿托伐他汀钙可以明显减少核因子 κ Bp65 和 ICAM-1 蛋白的表达($P < 0.05$); 减轻大鼠脑缺血再灌注后 PMNLs 的渗出($P < 0.05$); 提高脑缺血再灌注后神经病学评分($P < 0.05$), 提示阿托伐他汀钙可能通过抑制大鼠脑缺血再灌注后脑组织中核因子 κ Bp65 和 ICAM-1 的表达及其所介导的炎症反应, 减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

[参考文献]

- [1] 董少红, 温隽珉, 罗林杰, 陈科奇, 梁新剑, 李宜富, 等. 大剂量阿托伐他汀对急性冠状动脉综合征的调脂及抗炎作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(7): 613-616.
- [2] Gu W, Zhao H, Yenari MA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia [J]. *Neuroreport*, 2004, 15(3): 413-416.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-291.
- [4] Han HS, Yenari MA. Cellular targets of brain inflammation in stroke [J]. *Curr Opin Invest Drugs*, 2003, 4(5): 522-529.
- [5] Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemic reperfusion brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(9): 1068-079.
- [6] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle [J]. *Cell*, 2002, 109 (Suppl): S81-S96.
- [7] Madonna R, Di Napoli P, Massaro M, Grilli A, Felaco M, De Caterina A, et al. Simvastatin attenuates expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase in embryonic cardiac myoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13503-511.
- [8] Hernandez-Presa MA, Martir-Ventura JL, Ortego M, Gomez-Hernandez A, Tunon J, Hernandez-Vargas P, et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase 2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cell [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 160(1): 49-58.
- [9] Landsberger M, Wolff B, Jantzen F, Rosenstengel C, Voelkelqesang D, Staudt A, et al. Cerivastatin reduces cytokine-induced surface expression of ICAM-1 via increased shedding in human endothelial cell [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190(1): 43-52.
- [10] Kleemann R, Kooistra T. HMG-CoA reductase inhibitors: effects on chronic subacute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol [J]. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2005, 5(6): 441-453.

(此文编辑 朱雯霞)