

丁苯酞对慢性低灌注后神经血管单元的保护作用

魏微, 徐琴, 黄勇华

(北京军区总医院神经内科, 北京市 100700)

[关键词] 慢性低灌注; 丁苯酞; 神经血管单元

[摘要] **目的** 研究丁苯酞对慢性低灌注后神经血管单元是否有保护作用。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 48 只随机分为假手术组、缺血模型组和丁苯酞组。缺血模型组与丁苯酞组大鼠结扎双侧颈总动脉。电镜观察神经血管单元的超微结构改变。**结果** 与缺血模型组相比, 丁苯酞组低灌注后血管内皮细胞周围肿胀减轻, 神经元线粒体嵴断裂程度减轻, 神经血管单元微环境较好。**结论** 丁苯酞对慢性低灌注后神经血管单元有保护作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Protective Effect of Di-n-butylphthalide on Neurovascular Unit in Rats Following Chronic Cerebral Hypoperfusion

WEI Wei, XU Qin, and HUANG Yong-Hua

(Neurology Department of Beijing Military General Hospital, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] Chronic Cerebral Hypoperfusion; Di-n-butylphthalide; Neurovascular Unit

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of Di-n-butylphthalide on neurovascular unit in rats following chronic cerebral hypoperfusion. **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into sham group, hypoperfusion model group and butylphthalide group. In the rats assigned to the ischemic model group and butylphthalide group, the bilateral common carotid arteries were ligated. The ultrastructure change on neurovascular unit was evaluated by electron microscopy. **Results** Compared with hypoperfusion model group, butylphthalide has a protective role of neurovascular unit in decreasing endothelial cells edema, reducing neuronal mitochondrial crista fragmentation. Butylphthalide can reduce the neurovascular unit micro environment disturbance. **Conclusion** Treatment with butylphthalide improved the neurovascular unit of hypoperfused rats.

神经血管单元是神经系统结构和功能单位, 它的结构基础是神经元、血脑屏障 (blood brain barrier), 包括基底膜、内皮细胞、星形胶质细胞的足突和周细胞、小胶质细胞和维持脑组织完整性的细胞外基质^[1,2]。我们用大鼠双侧颈总动脉结扎的方法制作慢性低灌注模型, 通过电镜观察慢性低灌注后大鼠神经血管单元的超微结构改变, 观察丁苯酞治疗是否对慢性低灌注后神经血管单元有保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 36 只, 体重 250 ~ 300 g, 由军事医学科学院提供 [动物合格证编号:

SCXK-(军)2007-004]。

1.2 主要试剂及设备

丁苯酞注射液 (购于石药集团股份有限公司)、H-7650 透射电子显微镜和 Gatan832CCD 相机。

1.3 大鼠分组及干预

雄性 Wistar 大鼠 36 只随机分为假手术组、缺血模型组和丁苯酞组, 每组 12 只, 每组大鼠按时间点分为缺血后 7 天和 14 天亚组。戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后大鼠取仰卧位固定, 沿颈正中切口切开皮肤, 剥离胸骨舌骨肌、胸锁乳突肌和肩胛舌骨肌, 暴露出颈总、颈外和颈内动脉, 并小心分离出颈总动脉和迷走神经 (避免牵拉迷走神经), 缺血模型组与丁苯酞组大鼠结扎双侧颈总动脉。在相同条件的层流动物室饲养 (大鼠总死亡率 8.3%, 共死亡大鼠 3

[收稿日期] 2014-02-28

[作者简介] 魏微, 博士, 主治医师, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 wei-wei-sohu@sohu.com。徐琴, 硕士研究生, 研究方向为脑血管病。通讯作者黄勇华, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 huangyh@163.com。

只,按需补足只数)。丁苯酞组大鼠腹腔注射丁苯酞注射液 2 mg/(kg·d),缺血模型组和假手术组大鼠腹腔注射生理盐水 1 mL/(kg·d),共 7 天。

1.4 电镜标本制备与观察

大鼠以腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,打开胸腔,经左心室穿刺入升主动脉,剪开右心耳,快速灌注生理盐水 250 mL,灌注 4℃ 2.5% 戊二醛-2% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 200 mL,在 30 min 内,断头取脑额颞叶皮层、海马,取材大小约 1 mm³,放入 2.5% 戊二醛-2% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定-漂洗,经 3% 饿酸液固定,70% ~ 10% 酒精、丙酮逐级脱水,环氧树脂 Epon-812 常规电镜包埋。LKB-V 型超薄切片机做半薄切片,天青II-亚甲基兰染色光镜观察;超薄切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重电子染色后,透射电镜观察,摄片。

2 结果

假手术组大鼠神经元细胞核大而圆,染色质分

布均匀,细胞器丰富,星型胶质细胞周边无异常,血管内皮细胞结构正常,无水肿。

缺血模型组 7 天亚组大鼠皮层神经元核染色质凝聚,细胞器明显扩张;星形胶质细胞水肿,神经元微环境破坏严重;内皮细胞周围水肿严重;神经元的线粒体嵴明显断裂(图 1)。丁苯酞组 7 天亚组大鼠皮层神经元线粒体嵴断裂较缺血模型组明显减轻,内皮细胞周围水肿相对减轻(图 1)。

缺血模型组 14 天亚组大鼠皮质的星型胶质细胞凋亡,核内染色质有边聚凝集,胞浆电子密度明显增加,细胞器轻度扩张,明显水肿;线粒体嵴断裂严重;内皮细胞凋亡,周围肿胀(图 2)。丁苯酞组 14 天亚组皮层神经元线粒体嵴断裂程度减轻,内皮细胞周围的肿胀减轻;神经血管单元微环境相对较好,神经元染色质边聚,髓鞘有半层离散但无明显脱髓鞘改变(图 2)。

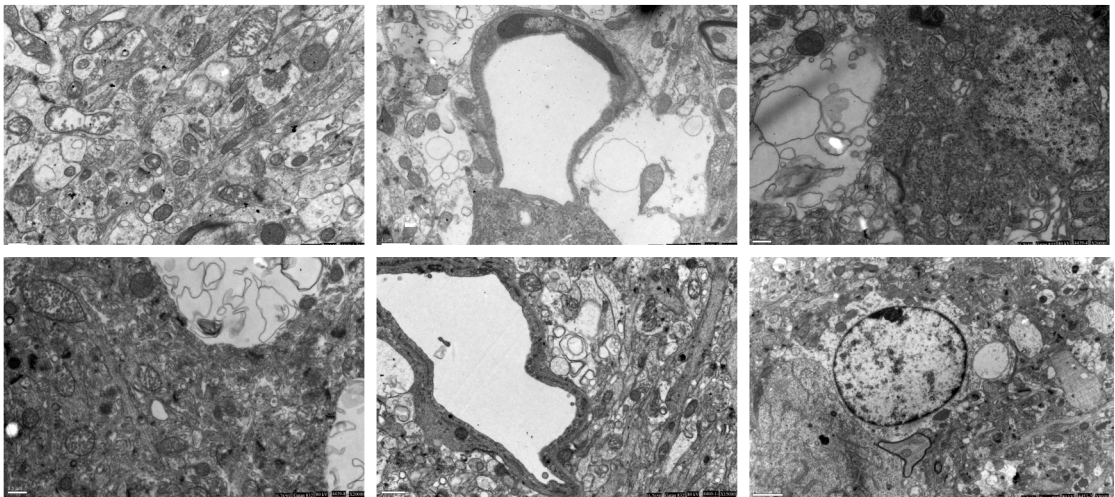


图 1. 缺血模型组(上图)及丁苯酞组(下图)大鼠低灌注 7 天后神经血管单元超微结构改变(×8000) 左为观察神经元线粒体嵴断裂,中为观察内皮细胞周围水肿,右为观察神经外周星形胶质细胞、神经元微环境及神经元核染色质。

Figure 1. The ultrastructure change on neurovascular unit of rats 7 days after cerebral hypoperfusion in hypoperfusion model group and butylphthalide group(×8000)

3 讨论

神经血管单元(neurovascular unit, NVU)的概念是 2003 年由 Lo 提出的。神经血管单元由神经元和血脑屏障构成,是血管内皮-基质-星形细胞足突复合体组成的完整结构^[3]。血脑屏障渗透性的改变会影响神经血管单元内环境稳定。内环境的稳定是保证神经血管单元各成分间及与神经元之间的信号传导联系保持正常进行的前提。神经元是神经血管单元中的核心成分。近年来人们逐渐开

始对各种神经系统疾病的神经血管单元损害进行系统研究。在缺血性脑损害和变性病方面均取得了一定的研究成果^[4-6]。脑缺血不仅影响神经元,还影响神经元支持结构的小胶质细胞和星形胶质细胞以及传递信号的轴突及供应神经元的微血管。病理状态下血脑屏障完整性被破坏,为满足神经组织对代谢的需求,常伴随有脑血流和脑灌注压的改变,因此,神经血管单元是一个整体结构,各组分之间的联络及功能维持相互影响,对神经血管单元的整体保护研究十分必要。

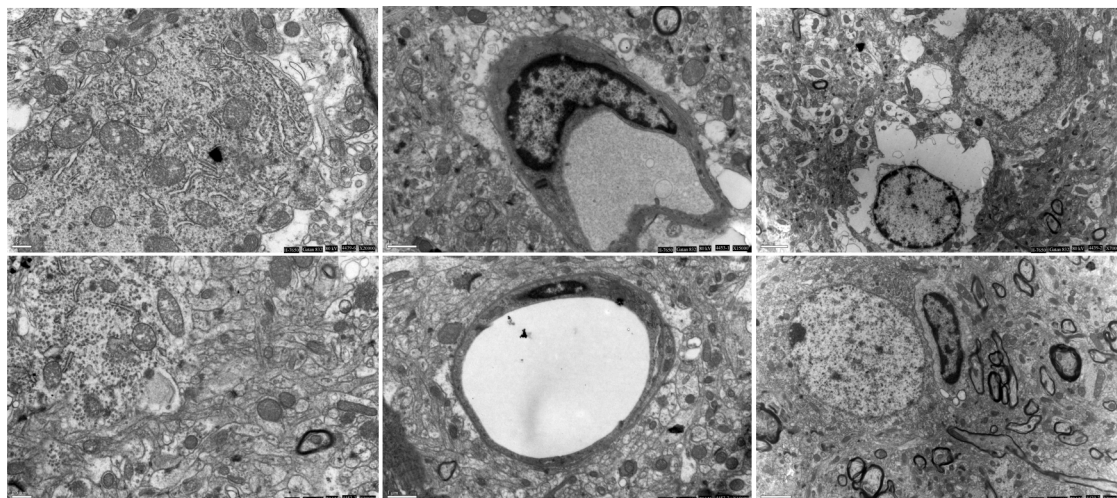


图 2. 缺血模型组 (上图) 及丁苯酞组 (下图) 大鼠低灌注 14 天后神经血管单元超微结构改变 ($\times 8000$) 左为观察神经元线粒体嵴断裂, 中为观察内皮细胞周围肿胀, 右为观察神经元微环境。

Figure 2. The ultrastructure change on neurovascular unit of rats 14 days after cerebral hypoperfusion in hypoperfusion model group and butylphthalide group ($\times 8000$)

本实验我们研究了脑慢性低灌注条件下神经血管单位的动态变化。电镜观察结果表明, 脑慢性低灌注后有皮层神经元的凋亡, 有内皮细胞紧密连接增宽, 周围星形胶质细胞的足突肿胀, 血脑屏障受到破坏。慢性低灌注后血脑屏障破坏可能有基质金属蛋白酶降解细胞外基质参与的过程。慢性低灌注缺血损伤对血脑屏障的损伤与急性脑缺血相比相对较轻。慢性低灌注后 7 天血脑屏障破坏较重, 与 Farkas 等^[7,8]的研究结果一致。缺血后期有胶原增生, 修复基底膜。我们在慢性低灌注的研究中发现神经血管单元的变化包括: 神经元核内染色质凝聚、细胞器的扩张, 线粒体嵴明显断裂; 星形胶质细胞凋亡、核内染色质边聚凝集、胞浆电子密度增加、细胞器轻度扩张明显水肿以及内皮细胞周围严重水肿。神经血管单元各组分随着损伤周期有一致性变化趋势, 提示神经血管单元各组分间存在相互影响和作用。目前, 神经保护的目标已经从单一对神经元保护扩展为全面对神经血管单元各组分的保护。前期研究结果针对神经血管单元理论脑缺血再灌注损伤的治疗靶点开发了潜在靶点治疗药物, 如针对神经元保护的 L-型钙通道激动剂等。但是缺血性卒中引起的脑损伤是复杂的病理过程, 众多有益或有害的因子均在此过程中发挥了不同的作用, 神经血管单元各个成分都会受损, 多方位而且全面的保护将使缺血性卒中的治疗更加理想^[9-11]。丁苯酞是一种新型抗脑缺血药物, 可缓解微血管痉挛、抑制血栓素 A₂ 的合成及抗血小板聚集等多个环节来阻断脑缺血引起的病理发

展^[12,13]。丁苯酞注射液对慢性低灌注大鼠神经保护的实验研究少见报道。血脑屏障的重要部分内皮细胞在缺血损害过程中, 线粒体功能受损从而影响细胞能量代谢, 紧密连接的增宽, 细胞的水肿, 是血管源性水肿的发生基础。我们通过电镜观察发现, 丁苯酞治疗后神经元及内皮细胞线粒体嵴断裂与缺血模型组相比有明显减轻, 内皮细胞周围的水肿也明显减轻; 神经血管单元微环境相对稳定, 神经元的染色质边聚, 有髓鞘的半层离散但无明显脱髓鞘的改变。大量研究表明, 丁苯酞可以通过改善线粒体膜的流动性, 提高细胞线粒体复合酶 IV 的活性, 恢复线粒体的膜电位, 增加超氧化物歧化酶的活性及提高线粒体磷酸腺苷酶活性, 升高线粒体谷胱甘肽过氧化物酶的活性从而保护线粒体^[14,15]。因此, 丁苯酞对内皮细胞的线粒体保护作用是对神经血管单元整体性保护作用的基础。此外, 丁苯酞抑制细胞炎症因子因而影响基质金属蛋白酶 2 对细胞外基质的降解途径, 在保护血脑屏障中也发挥了相当重要的作用^[16,17]。

丁苯酞对脑慢性低灌注后皮质神经血管单元的整体性保护作用可能是多靶点的网络效应, 采用系统生物学的方法对丁苯酞治疗引起的多靶点效应是一个亟待研究的工作。

[参考文献]

- [1] Hawkins BT, Davis TP. Blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57 (2): 173-185.

- [2] del Zoppo GJ. The neurovascular unit in the setting of stroke[J]. *J Intern Med*, 2010, 267(2): 156-171.
- [3] del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 972-982.
- [4] Quaegebeur Lange C, Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease; molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. *Neuron*, 2011, 71(3): 406-424.
- [5] Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(12): 723-738.
- [6] 李大勇, 马贤德, 陈文娜. 内皮细胞功能的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(10): 871-875.
- [7] Attwell D, Buchan AM, Charpak S, et al. Glial and neuronal control of brain blood flow[J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 232-243.
- [8] Farkas EI, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases[J]. *Brain Res*, 2007, 54(1): 162-180.
- [9] Barreto G, White RE, Ouyang Y. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke[J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2011, 11(2): 164-173.
- [10] Orellana JA, Figueroa XF, Sánchez HA. Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10(3): 404-414.
- [11] Guo S, Lo EH. Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease[J]. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl): S4-7.
- [12] Li J, Li Y, Ogle M, et al. DL-3-n-butylphthalide prevents neuronal cell death after focal cerebral ischemia in mice via the JNK pathway[J]. *Brain Res*, 2010, 1359: 216-226.
- [13] Peng Y, Hu Y, Xu S, et al. L-3-n-butylphthalide reduces tau phosphorylation and improves cognitive deficits in A β PP/PS1-Alzheimer's transgenic mice[J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 29(2): 379-391.
- [14] Zhang L, Lu L, Chan WM, et al. Effects of DL-3-n-butylphthalide on vascular dementia and angiogenesis[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(5): 911-919.
- [15] Kaor S. DL-3-n-butylphthalide and its emerging beneficial effects in neurology[J]. *Chin Med J*, 2012, 125(18): 3360-3361.
- [16] 梁星, 杨丽霞, 郭瑞威. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子和尿激酶型纤溶酶原激活物在载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(8): 673-677.
- [17] Feng S, Cen J, Huang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins[J]. *Plos One*, 2011, 6(8): e20599.

(此文编辑 许雪梅)