

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.20.005

20-羟基蜕皮甾酮对大鼠全脑缺血再灌注后海马神经元损伤和炎症反应的影响*

胡 军^{1,2} 张彦海³ 张 佳⁴ 潘 娜² 迟丽屹^{2Δ} 程 妮^{5Δ}

(1 陕西省人民医院神经内科 陕西 西安 710068; 2 中国人民解放军第 451 医院神经内科 陕西 西安 710054;

3 中国人民解放军第 451 医院干部病房 陕西 西安 710054; 4 中国人民解放军第 451 医院 ICU 陕西 西安 710054;

5 西安市第五医院内一科 陕西 西安 710082)

摘要 目的:观察 20-羟基蜕皮甾酮对全脑缺血再灌注后 SD 大鼠海马神经元和认知功能的保护作用,并探讨其相关机制。**方法:**采用四血管闭塞法建立 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型,脑电图和脑组织 Nissl 染色评估模型的可靠性。将实验动物分为假手术组,缺血再灌注组和缺血再灌注+20-羟基蜕皮甾酮组。TUNEL 染色观察海马神经元凋亡, Morris 水迷宫实验评价大鼠的认知功能,酶联免疫法测定缺血再灌注后 3-24 小时大鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的浓度。**结果:**全脑缺血再灌注后大鼠海马神经元凋亡率从 4.50 $\pm$ 1.90% 上升至 72.90 $\pm$ 8.40% ($p<0.01$), 给予 20 和 40 mg/kg 20-羟基蜕皮甾酮干预,大鼠海马神经元凋亡率分别下降至 51.40 $\pm$ 8.60% ($p<0.05$) 和 42.70 $\pm$ 6.80% ($p<0.01$)。与假手术组相比,全脑缺血再灌注后大鼠在 Morris 水迷宫定位航行试验中逃避潜伏期明显延长 ($p<0.01$), 在空间探索试验中目标象限停留时间和穿越目标象限次数明显减少 ($p<0.01$), 而 20-羟基蜕皮甾酮显著抑制上述变化,改善大鼠的认知功能。缺血再灌注后 3-24 小时,大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF α 浓度较假手术组显著升高, 20-羟基蜕皮甾酮能抑制上述各时间点大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF α 浓度的升高。**结论:**20-羟基蜕皮甾酮对全脑缺血再灌注后大鼠海马神经元和认知功能有显著保护作用,抑制缺血再灌注后的炎症反应是其保护机制之一。

关键词:20-羟基蜕皮甾酮;缺血再灌;神经保护;炎症

中图分类号:R33; R338; R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)20-3824-06

Effects of 20-hydroxyecdysone on Hippocampal Neuronal Damage and Inflammatory Response after Global Cerebral Ischemia and Reperfusion in SD Rats*

HU Jun^{1,2}, ZHANG Yan-hai³, ZHANG Jia⁴, PAN Na², CHI Li-yi^{2Δ}, CHENG Ni^{5Δ}

(1 Department of Neurology, Shaanxi People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of Neurology, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

3 Cadre ward, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

4 The intensive care unit, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

5 Department of internal medicine, Xi'an fifth hospital, Xi'an, Shaanxi, 710082, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effects of 20-hydroxyecdysone on hippocampal neurons and cognitive function and the related mechanisms in SD rats after global cerebral ischemia and reperfusion. **Methods:** The global cerebral ischemia reperfusion model was established by four vessel occlusion method in SD rats. The reliability of the model was evaluated by EEG and Nissl staining of brain tissue. The experimental animals were divided into sham operation group, ischemia-reperfusion group and 20-hydroxyecdysone-treatment after ischemia-reperfusion group. TUNEL staining was used to observe the apoptosis of hippocampal neurons. The cognitive function of rats was evaluated by Morris water maze test. The concentration of IL-1 and TNF in serum of rats at 3-24 hours after ischemia reperfusion was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** SD rats hippocampus neuron apoptosis rate was increased from 4.50 $\pm$ 1.90% up to 72.90 $\pm$ 8.40% after global cerebral ischemia reperfusion. After 20 and 40 mg/kg 20-hydroxyecdysone intervention, the apoptosis rate of rat hippocampal neurons decreased to 51.40 $\pm$ 8.60% ($P<0.05$) and 42.70 $\pm$ 6.80% ($P<0.01$). Compared with the sham operation group, the escape latency of rats in the Morris water maze navigation test was significantly prolonged ($P<0.01$) and the time spent in the target quadrant time and the number of traversing target quadrant in the Morris water maze space exploration test are significantly reduced ($P<0.01$). 20-hydroxyecdysone inhibited the above changes and

* 基金项目:陕西省卫生计生委科研基金项目(2016D061)

作者介绍:胡军(1980-),博士,主治医师,研究方向:脑缺血损伤与保护, E-mail: monkey8031@163.com

Δ 通讯作者:程妮, E-mail: chengni1982@163.com;

迟丽屹, E-mail: chi603@foxmail.com

(收稿日期:2018-02-28 接受日期:2018-03-23)

improved the cognitive function of rats. The concentrations of IL-1 and TNF in serum of rats were significantly increased at 3-24 hours after ischemia reperfusion, which were inhibited by 20-hydroxyecdysone. **Conclusion:** 20-hydroxyecdysone protected hippocampal neurons and cognitive function in SD rats after global cerebral ischemia by inhibited the inflammatory response after global cerebral ischemia and reperfusion.

Key words: 20-hydroxyecdysone; Ischemia reperfusion; Neuroprotection; Inflammation

Chinese Library Classification(CLC): R33; R338; R743.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)20-3824-06

前言

脑卒中是导致全球人类致残、致死的三大主要病因之一^[1]。缺血性脑卒中是脑卒中的最常见类型,占 60%~80%^[2]。目前,溶栓和取栓术是治疗缺血性脑卒中最有效的方法^[3],但遗憾的是这些治疗的时间窗非常窄。神经保护剂治疗由于没有严格的时间窗限制,是治疗缺血性脑卒中中非常有前景的一种方法^[4]。炎症在缺血性脑卒中的病理生理进程中扮演着重要的角色。抑制脑缺血后的炎症反应,可以减轻脑缺血损伤^[5]。20-羟基蜕皮甾酮是一种天然甾体类化合物,调节昆虫等无脊椎动物的蜕皮、变态和繁殖。我们前期研究发现 20-羟基蜕皮甾酮对缺氧导致的 PC12 细胞损伤具有显著的保护作用^[6]。近期,研究发现 20-羟基蜕皮甾酮可以抑制 NF- κ B 信号,发挥抗炎效果^[7]。因此,我们推测 20-羟基蜕皮甾酮(20-hydroxyecdysone, 20E)可以通过减轻脑缺血后炎症反应发挥神经保护作用。故本研究拟建立大鼠全脑缺血再灌注模型,观察 20-羟基蜕皮甾酮对缺血神经元的保护效应以及对缺血后炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

实验动物:SD 雄性大鼠,体重 200-250 g,购自第四军医大学实验动物中心。主要药物和试剂:20-羟基蜕皮甾酮购自同田生物科技有限公司(Shanghai, China)。Nissl 染色液购自碧云天生物技术公司(haimen, China)。原位细胞凋亡检测试剂盒购自 Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)。IL-1 β 和 TNF- α 酶联免疫试剂盒(ELISA)购自 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型的建立 采用四血管闭塞法建立 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型^[8]。具体方法如下:取雄性 SD 大鼠(体重 200-250 g),戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg),俯卧在手术台上,沿背颈表面中线切开,分离颈部肌肉,暴露两侧第一颈椎翼孔,在解剖显微镜(OLYMPUS, Tokyo, Japan)下将电灼针(Bowie Electrocautery, Douglassville, TX)插入两侧翼孔,烧灼椎动脉,缝合伤口,送入笼中继续饲养。24 小时后,使用相同的方法再次麻醉 SD 大鼠,在大鼠左半球顶叶区安装电极,多导生理记录仪监测脑电图。然后把大鼠仰卧置于手术台,颈腹侧中线作 2 厘米切口,分离、暴露双侧颈总动脉,动脉夹夹闭两侧颈总动脉,夹闭时间 15 分钟,脑电图监测作为判断全脑缺血的标准。15 分钟后,撤出动脉夹,恢复血液供应,缝合伤口,送入笼中继续饲养。假手术组大鼠全部接受手术,但不灼烧双侧椎动脉和夹闭双侧颈总动脉。药物治疗组在全脑缺血 15 分钟

后,给予腹腔注射 20-羟基蜕皮甾酮(10, 20 和 40 mg/kg)。假手术组大鼠腹腔注射相同剂量的蒸馏水。

1.2.2 Nissl 染色和 TUNEL 检测 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉 SD 大鼠,开胸暴露心脏,灌注器针头自左心室插入主动脉,灌注 PBS,然后 4%多聚甲醛缓慢灌注固定。灌注结束后,取大鼠前脑,4%多聚甲醛后固定 3 天。修整脑组织,常规石蜡包埋,5 μ m 切片。Nissl 染色:常规石蜡切片透明、复水,Nissl 染色液室温染色 5 分钟,冲洗,分化,封片,显微镜下观察、拍照。TUNEL 检测按照原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche Diagnostics)操作手册进行。

1.2.3 Morris 水迷宫实验 40 只 SD 大鼠被随机分为 4 组,假手术组,缺血组,治疗 I 组(20-羟基蜕皮甾酮(20 mg/kg),治疗 II 组(40 mg/kg)。缺血再灌注后第 7 天开始进行实验。实验分为:定位航行实验和空间探索实验。前四天进行定位航行实验,站台位于第二象限,保持在水下 2 cm,每天进行 5 次实验,每次间隔 1 小时,共 20 次实验。具体步骤:将大鼠自任意一点面朝迷宫壁放入水中,记录大鼠发现并爬上平台的时间(潜伏期)。如果大鼠 120 秒内未找到平台,人工引导大鼠至平台,并停留 30 秒,潜伏期记为 120 秒。训练时间固定在上午 9:30-11:30,下午 3:00-5:00,水温保持在 20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C。第四天定位航行实验结束后,进行空间探索实验,具体步骤:将平台撤出,将大鼠自第三、四象限交接处,面朝迷宫壁放入水中,记录大鼠 120 秒内穿越平台区的次数以及在目标象限(第二象限)停留的时间。

1.2.4 血清 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白含量测定 根据实验所设计的时间点,大鼠尾静脉采血,并提取血清。血清中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度测定按照酶联免疫试剂盒(BD Pharmingen)操作手册进行。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS11.0 软件包进行分析,文章数据用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。两组数据间比较采用单因素方差分析(ANOVA)或 Turkey 检验法。 $p < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型的建立和评估

为了观察 20-羟基蜕皮甾酮对缺血神经元的保护效应以及对缺血后炎症反应的影响,我们用“四血管闭塞”法,建立了大鼠全脑缺血再灌注模型。在缺血前和缺血全过程,我们运用多导生理记录仪对大鼠脑电进行了监测,如图 1A 所示动脉夹夹闭 SD 大鼠两侧颈总动脉后,大鼠脑电变得明显低平,判定 SD 大鼠全脑处于缺血状态。缺血 15 分钟后,撤出动脉夹,恢复血液供应,缝合伤口,将大鼠送入笼中继续饲养。缺血后 1-3 天,缺血组和假手术组大鼠均精神萎靡,毛发蓬松,食量较

缺血前明显减少。两组大鼠四肢均活动正常,但假手术组大鼠活动量较缺血组多。为了进一步验证大鼠全脑缺血再灌注模型的可靠性,我们对缺血 3 天后 SD 大鼠脑组织缺血再灌注最为敏感的区域 - 海马区神经元进行 Nissl 染色, 观察海马神经元的存活情况,如图 1B 所示,全脑缺血再灌注大鼠海马区神经元 Nissl 染色较假手术组明显变淡。这些结果提示本研究中,我们建立的 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型是可靠,稳定的,可以用于后续研究。

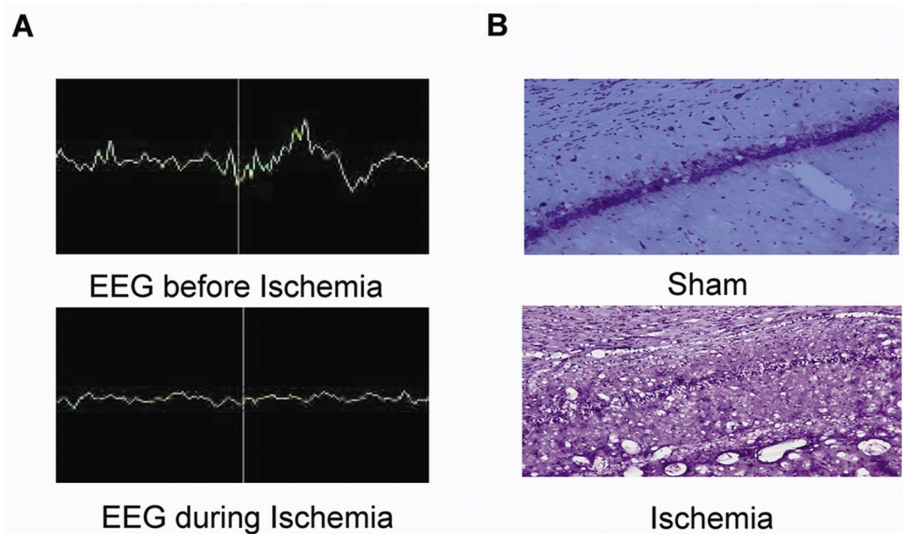


图 1 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型的建立和评估

A:多导生理记录仪对 SD 大鼠缺血前和缺血过程中脑电进行监测。B:缺血 3 天后,SD 大鼠海马区神经元 Nissl 染色($\times 100$ 倍)。

Fig.1 Establishment and evaluation of global cerebral ischemia reperfusion model in SD rats

A: EEG was monitored by polysomnography monitoring before ischemia and during ischemia in SD rats. B: hippocampal neurons in SD rats after 3 days of ischemia were stained by Nissl dye($\times 100$).

2.2 20- 羟基蛻皮甾酮抑制全脑缺血再灌注后 SD 大鼠海马神经元的凋亡

如图 2A 所示,全脑缺血再灌注后第 3 天,SD 大鼠海马神经元凋亡率从 $4.50 \pm 1.90\%$ 上升至 $72.90 \pm 8.40\%$ ($p < 0.01$)。为了观察 20- 羟基蛻皮甾酮对缺血再灌注后海马神经元的保护作用,我们在全脑缺血 15 分钟后,给予 SD 大鼠腹腔注射 10 mg/kg 20- 羟基蛻皮甾酮,但大鼠海马神经元凋亡率为 $65.30 \pm 7.20\%$,与缺血组相比无明显变化($p > 0.05$)。于是,我们增加 20- 羟基蛻皮甾酮的浓度,当腹腔注射 20 mg/kg 20- 羟基蛻皮甾酮时,大鼠海马神经元凋亡率为 $51.40 \pm 8.60\%$,显著低于缺血组 ($p < 0.05$)。进一步增加 20- 羟基蛻皮甾酮浓度至 40 mg/kg,大鼠海马神经元凋亡率进一步下降至 $42.70 \pm 6.80\%$ ($p < 0.01$, 与缺血组相比)。实验结果提示 20- 羟基蛻皮甾酮对全脑缺血再灌注后 SD 大鼠海马神经元损伤有保护作用,并且其保护作用具有浓度依赖性。

2.3 20- 羟基蛻皮甾酮改善全脑缺血再灌注后 SD 大鼠的认知功能

为了进一步确认 20- 羟基蛻皮甾酮对全脑缺血再灌注后 SD 大鼠海马神经元的保护作用。我们在 SD 大鼠全脑缺血再灌注后第 7 天,运用 Morris 水迷宫观察了 20- 羟基蛻皮甾酮对各实验组大鼠认知功能的影响。如表 1 所示,在 Morris 水迷宫定位航行试验中,随着试验次数的增加,各实验组大鼠逃避潜伏期逐渐缩短,但缺血组大鼠逃避潜伏期明显长于假手术组 ($p < 0.01$)。当腹腔注射 20 mg/kg 20- 羟基蛻皮甾酮后,大鼠逃避潜伏在第四天时明显比缺血组缩短 ($p < 0.05$)。当 20- 羟基蛻皮甾酮浓度升高至 40 mg/kg 后,大鼠逃避潜伏在第三天时就明

显比缺血组缩短 ($p < 0.05$), 第四天时非常明显比缺血组缩短 ($p < 0.01$)。如表 2 所示,在 Morris 水迷宫空间探索试验中,缺血组大鼠在目标象限停留时间和穿越目标象限次数与假手术相比,非常显著减少 ($p < 0.01$)。腹腔注射 20 mg/kg 20- 羟基蛻皮甾酮后,大鼠在目标象限停留时间比缺血组增加 ($p < 0.05$)。当 20- 羟基蛻皮甾酮浓度升高至 40 mg/kg 后,大鼠在目标象限停留时间比缺血组增加 ($p < 0.05$),大鼠穿越目标象限次数非常显著多于缺血组 ($p < 0.01$)。实验结果提示全脑缺血再灌注损伤导致 SD 大鼠的认知功能下降,20- 羟基蛻皮甾酮能抑制其认知功能下降,并且其抑制作用具有浓度依赖性。

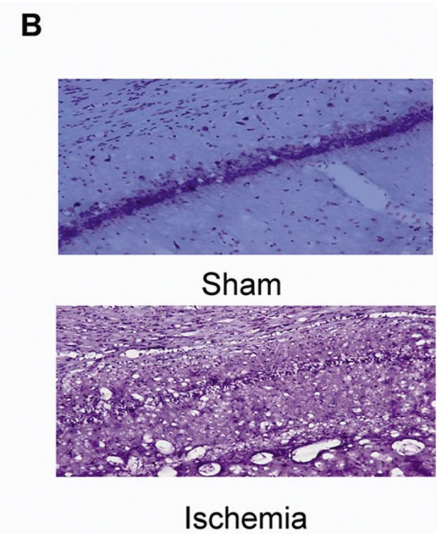


图 1 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型的建立和评估

A:多导生理记录仪对 SD 大鼠缺血前和缺血过程中脑电进行监测。B:缺血 3 天后,SD 大鼠海马区神经元 Nissl 染色($\times 100$ 倍)。

Fig.1 Establishment and evaluation of global cerebral ischemia reperfusion model in SD rats

2.4 20- 羟基蛻皮甾酮抑制全脑缺血再灌注后 SD 大鼠的炎症反应

炎症是导致神经元缺血再灌注损伤的重要原因^[9]。为了研究 20- 羟基蛻皮甾酮对缺血神经元损伤的保护机制,我们观察了 20- 羟基蛻皮甾酮对缺血再灌注后 SD 大鼠炎症反应的影响。如图 3A 所示,全脑缺血再灌注后 3 小时,大鼠血清 IL-1 β 浓度从 37.50 ± 6.98 pg/mL 上升至 72.17 ± 7.39 pg/mL ($p < 0.01$, 与假手术组相比)。全脑缺血再灌注后 6 小时,大鼠血清 IL-1 β 浓度从 58.42 ± 5.74 pg/mL 上升至 112.18 ± 12.57 pg/mL ($p < 0.01$, 与假手术组相比)。全脑缺血再灌注后 12 小时,大鼠血清 IL-1 β 浓度从 72.39 ± 6.23 pg/mL 上升至 318.79 ± 18.65 pg/mL ($p < 0.01$, 与假手术组相比)。当腹腔注射 20 mg/kg 20- 羟基蛻皮甾酮后,大鼠血清 IL-1 β 浓度在缺血后 6 小时和 12 小时分别明显下降至 86.17 ± 10.34 ($p < 0.05$, 与缺血组相比)和 197.58 ± 12.99 pg/mL ($p < 0.01$, 与缺血组相比)。当 20- 羟基蛻皮甾酮浓度升高至 40 mg/kg 后,大鼠血清 IL-1 β 浓度在缺血后 3 小时、6

A

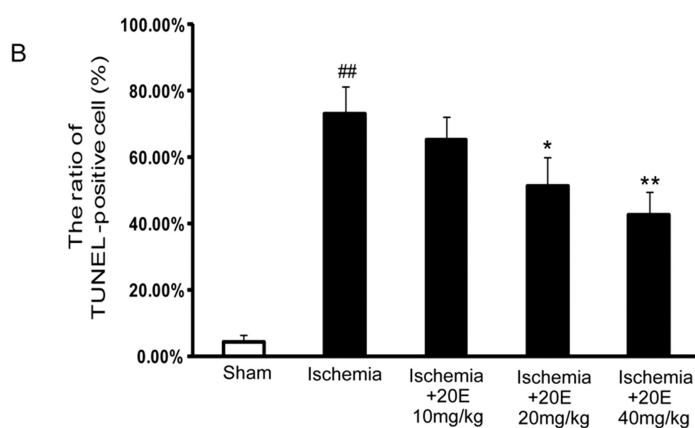
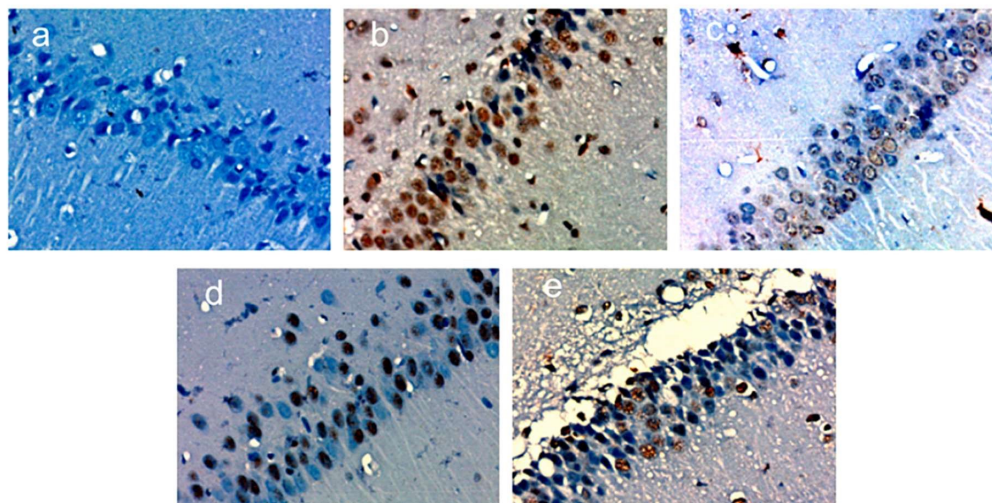


图 2 20- 羟基蜕皮甾酮对全脑缺血再灌注后 SD 大鼠海马神经元凋亡的影响

A: SD 大鼠海马神经元 TUNEL 检测。全脑缺血 15 分钟后, 给予 SD 大鼠腹腔注射 10-40 mg/kg 20- 羟基蜕皮甾酮, TUNEL 染色, 显微镜下观察各组大鼠海马神经元凋亡 ($\times 200$ 倍)。a: 假手术组; b: 缺血组; c: 缺血 + 10 mg/kg 20- 羟基蜕皮甾酮干预组; d: 缺血 + 20 mg/kg 20- 羟基蜕皮甾酮干预组; e: 缺血 + 40 mg/kg 20- 羟基蜕皮甾酮干预组。B: 各实验组 SD 大鼠海马神经元凋亡率。^{##} $p < 0.01$, 与假手术组相比; ^{*} $p < 0.05$, 与缺血组相比; ^{**} $p < 0.01$, 与缺血组相比。

Fig.2 Effect of 20-hydroxyecdysone on apoptosis of hippocampal neurons in SD rats after global cerebral ischemia and reperfusion

A: TUNEL detection of hippocampal neurons in SD rats. After 15 minutes of global cerebral ischemia, 10-40 mg/kg 20-hydroxyecdysone was injected intraperitoneally into SD rats. After TUNEL staining, the apoptosis of hippocampal neurons in each group was observed by microscope ($\times 200$).

a: Sham; b: Ischemia; c: Ischemia+20-hydroxyecdysone (20E) 10 mg/kg; d: Ischemia+20-hydroxyecdysone (20E) 20 mg/kg;

e: Ischemia+20-hydroxyecdysone (20E) 40 mg/kg. B: The apoptosis rate of hippocampal neurons in SD rats was observed. ^{##} $p < 0.01$ vs. Sham, ^{*} $p < 0.05$ vs. Ischemia group, ^{**} $p < 0.01$ vs. Ischemia group.

表 1 SD 大鼠 Morris 水迷宫定位航行试验逃避潜伏期(秒)

Table 1 The escape latency of positioning navigation test in SD rats (seconds)

Groups	1d	2d	3d	4d
Sham	52.23 $\pm$ 6.12	32.97 $\pm$ 7.29	25.73 $\pm$ 6.74	15.63 $\pm$ 2.09
Ischemia	82.31 $\pm$ 15.98 ^{##}	61.37 $\pm$ 10.11 ^{##}	49.46 $\pm$ 9.91 ^{##}	39.28 $\pm$ 4.26 ^{##}
Ischemia +20E(20 mg/kg)	71.41 $\pm$ 14.73	56.77 $\pm$ 11.36	37.33 $\pm$ 8.92	28.71 $\pm$ 4.39 [*]
Ischemia +20E(40 mg/kg)	69.23 $\pm$ 16.12	52.33 $\pm$ 10.98	31.56 $\pm$ 7.03 [*]	25.84 $\pm$ 5.04 ^{**}

Note: ^{##} $p < 0.01$ vs. Sham, ^{*} $p < 0.05$ vs. Ischemia group, ^{**} $p < 0.01$ vs. Ischemia group.

小时和 12 小时分别明显下降至 55.49 $\pm$ 7.71 ($p < 0.05$, 与缺血组相比)、68.13 $\pm$ 9.48 ($p < 0.01$, 与缺血组相比) 和 127.16 $\pm$ 10.45 pg/mL ($p < 0.01$, 与缺血组相比)。如图 3B 所示, 全脑缺血再灌注

后 3 小时, 大鼠血清 TNF α 浓度从 24.13 $\pm$ 5.14 pg/mL 上升至 56.76 $\pm$ 6.63 pg/mL ($p < 0.01$, 与假手术组相比)。全脑缺血再灌注后 6 小时, 大鼠血清 TNF α 浓度从 56.32 $\pm$ 5.74 pg/mL 上升至

表 2 SD 大鼠 Morris 水迷宫空间探索试验结果

Table 2 Results of space exploration test in SD rats

Groups	Time spent in the target quadrant (second)	Number of passes through target area
Sham	56.90± 6.63	10.10± 2.87
Ischemia	32.18± 5.21 ^{##}	3.70± 0.69 ^{##}
Ischemia +20E(20 mg/kg)	38.70± 7.16	5.90± 2.10*
Ischemia +20E(40 mg/kg)	46.59± 8.34*	8.10± 1.20**

Note: ^{##} $p < 0.01$ vs. Sham, * $p < 0.05$ vs. Ischemia group, ** $p < 0.01$ vs. Ischemia group.

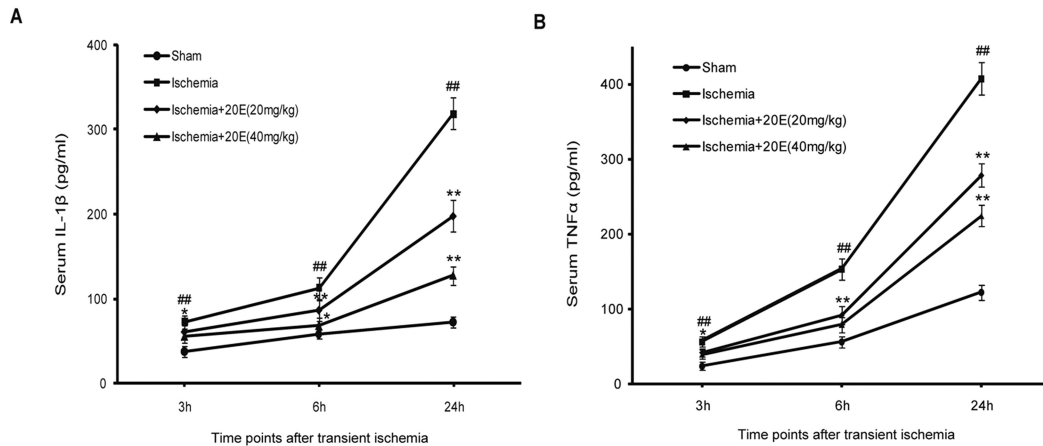


图 3 20- 羟基蜕皮甾酮对全脑缺血再灌注后 SD 大鼠炎症反应的影响

A: 缺血再灌注后 3-24 小时各实验组 SD 大鼠血清中 IL-1β 的浓度。B: 缺血再灌注后 3-24 小时各实验组 SD 大鼠血清中 TNFα 的浓度。

^{##} $p < 0.01$, 与假手术组相比; * $p < 0.05$, 与缺血组相比; ** $p < 0.01$, 与缺血组相比。

Fig.3 Effect of 20-hydroxyecdysone on inflammatory response in SD rats after global cerebral ischemia and reperfusion

A: The concentration of IL-1β in serum of SD rats at 3-24 hours after ischemia and reperfusion was determined. B: The concentration of TNFα in serum of SD rats at 3-24 hours after ischemia and reperfusion was determined. ^{##} $p < 0.01$ vs. Sham,

* $p < 0.05$ vs. Ischemia group, ** $p < 0.01$ vs. Ischemia group.

153.44± 13.75 pg/mL($p < 0.01$, 与假手术组相比)。全脑缺血再灌注后 12 小时, 大鼠血清 TNFα 浓度从 122.33± 10.49 pg/mL 上升至 407.77± 21.98 pg/mL($p < 0.01$, 与假手术组相比)。当腹腔注射 20 mg/kg 20- 羟基蜕皮甾酮后, 大鼠血清 TNFα 浓度在缺血后 3 小时、6 小时和 12 小时分别明显下降至 42.33± 5.92($p < 0.05$, 与缺血组相比), 92.43± 12.16 pg/ml($p < 0.01$, 与缺血组相比)和 278.34± 15.39 pg/mL($p < 0.01$, 与缺血组相比)。当 20- 羟基蜕皮甾酮浓度升高至 40 mg/kg 后, 大鼠血清 TNFα 浓度在缺血后 3 小时、6 小时和 12 小时分别明显下降至 39.67± 5.87 ($p < 0.05$, 与缺血组相比), 79.11± 10.27($p < 0.01$, 与缺血组相比)和 224.65± 14.27 pg/mL($p < 0.01$, 与缺血组相比)。实验结果提示 20- 羟基蜕皮甾酮通过降低 SD 大鼠血清 IL-1β 和 TNFα 浓度来抑制全脑缺血再灌注后炎症反应。

3 讨论

在中国,随着人民生活水平的提高以及高血压和糖尿病的流行,缺血性脑卒中的发病率逐年升高。缺血性脑卒中已成为我国国民主要的死亡和致残病因^[9]。缺血性脑卒中基础的病理过程是脑血管狭窄或闭塞,脑血流中断,脑组织死亡。因此,及时开通闭塞血管,恢复血流是治疗缺血性卒中的关键。目前,循证学证据已经证实:溶栓和脑血管介入机械取栓是治疗缺血性卒中有效的方法,但是溶栓和取栓的时间窗一般在 4.5 小时

或 6 小时,如此狭窄的治疗时间窗严重限制了受益的患者群体^[10]。脑缺血后,神经元损伤涉及兴奋性氨基酸的释放,钙内流,氧化应激,一氧化氮生成,炎症反应以及细胞凋亡等多种病理生理机制^[11],使用药物中断这些病理生理机制,让缺血神经元存活,这就是神经保护剂的理论基础^[12]。由于神经保护剂治疗没有严格时间窗限制,近 20 年来,寻找神经保护剂一直是缺血性脑血管疾病研究的热点。但遗憾的是,到目前为止,临床上并没有经循证学证实效果明确的神经保护剂。因此,进一步深入研究神经保护剂是治疗缺血性卒中迫切需要的^[13]。

20- 羟基蜕皮甾酮是一种昆虫类固醇激素,属于蜕皮激素家族,主要调节节肢动物的蜕皮,变形与繁殖。20- 羟基蜕皮甾酮在植物中广泛存在,特别是中药牛膝的主要活性成分。尽管 20- 羟基蜕皮甾酮是昆虫类固醇激素,但它在人体有多种生物效应,例如促进人体蛋白质合成,调节糖代谢和脂代谢,促进干细胞分化等^[14,15]。2008 年, Liu 等首次报道 20- 羟基蜕皮甾酮改善蛛网膜下腔出血后兔的神经功能,其机制与 20- 羟基蜕皮甾酮缓解脑血管痉挛有关^[16]。但是,20- 羟基蜕皮甾酮改善蛛网膜下腔出血后兔的神经功能,也可能与 20- 羟基蜕皮甾酮直接对神经元的缺血损伤保护有关。因此,我们建立 pc12 细胞缺氧模型,观察到 20- 羟基蜕皮甾酮对 pc12 细胞缺氧损伤有显著保护作用^[6]。进一步,我们在 SD 大鼠大脑中动脉闭塞模型中,观察到 20- 羟基蜕皮甾酮可见减小脑梗死的面积^[17]。这些研究结

果初步证实 20- 羟基蜕皮甾酮对缺血神经元有保护效应。本研究中,我们发现 20- 羟基蜕皮甾酮抑制全脑缺血再灌注后海马神经元的凋亡。海马是大鼠认知功能的功能承担脑区,本研究也发现 20- 羟基蜕皮甾酮改善全脑缺血再灌注后大鼠的认知功能,这也反证了 20- 羟基蜕皮甾酮对全脑缺血再灌注后海马神经元损伤的保护效应。本文的研究结果,进一步夯实了 20- 羟基蜕皮甾酮对缺血神经元的保护作用。此外,在小鼠急性毒性实验中,20- 羟基蜕皮甾酮毒性非常低,对人类无明显副作用^[18]。基于 20- 羟基蜕皮甾酮这些药理特点,我们有理由相信 20- 羟基蜕皮甾酮是一个非常具有前景的神经保护剂,值得深入研究。

缺血后脑组织会发生级联反应,一系列复杂的相互联系的分子和细胞层面的病理生理机制共同导致了神经元坏死或凋亡,最终导致脑梗死。其中,炎症反应贯穿于急性脑缺血的各个阶段^[19]。细胞因子是炎症的介质。促炎细胞因子 IL-1 β 在脑缺血损伤中起重要作用。有研究报道大鼠大脑中动脉闭塞后,血清中 IL-1 β 浓度显著升高,并且其升高水平与梗死面积相关^[20]。脑室注射重组 IL-1 β 增加大脑中动脉闭塞后,大鼠脑梗死面积,加重脑水肿^[21]。而 IL-1 受体拮抗剂可以减轻大鼠神经元缺血损伤^[22]。此外,TNF α 是一个与缺血性卒中临床预后以及脑梗死面积密切相关的明星促炎细胞因子。脑卒中患者,在出现症状后 6-12 小时,血清和脑脊液中 TNF α 明显升高,并与梗死体积呈正相关^[23]。抗 TNF α 抗体减少缺血后脑梗死体积,改善缺血大鼠认知功能。与这些研究结果一致^[24],我们研究发现在 SD 大鼠全脑缺血再灌注后 3-24 小时,缺血大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF α 浓度显著升高。更重的是,我们还发现 20- 羟基蜕皮甾酮以浓度依赖的方式,显著抑制缺血大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF α 浓度的升高。这提示我们 20- 羟基蜕皮甾酮抑制大鼠全脑缺血再灌注后的炎症反应,这也是 20- 羟基蜕皮甾酮对缺血神经元的保护机制之一。对于 20- 羟基蜕皮甾酮是怎样下调大鼠全脑缺血再灌注后的炎症反应,可能与 20- 羟基蜕皮甾酮抗氧化应激,抑制细胞钙内流,拮抗 NF κ B 信号通路活化等有关^[25]。20- 羟基蜕皮甾酮抑制大鼠全脑缺血再灌注后炎症反应具体的分子机制还需进一步研究。

综上所述,我们研究发现 20- 羟基蜕皮甾酮不仅能抑制全脑缺血再灌注后大鼠海马神经元的凋亡,还能改善全脑缺血再灌注后大鼠的认知功能。20- 羟基蜕皮甾酮下调全脑缺血再灌注后大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF α 的浓度,抑制炎症反应是实现神经保护的一个机制。本研究的完成夯实了 20- 羟基蜕皮甾酮对缺血神经元的保护作用,为进一步研究 20- 羟基蜕皮甾酮对缺血神经元的保护机制提供了实验依据。

参考文献(References)

- [1] Narayanaswamy Venketasubramanian, Byung Woo Yoon, Jeyaraj Pandian, et al. Stroke Epidemiology in South, East, and South-East Asia: A Review[J]. J Stroke, 2017, 19(3): 286-294
- [2] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2016, 133: e38-360
- [3] Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, et al. Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility [J]. Brain, 2017, 140 (8): 2079-2092
- [4] Broussalis E, Trinko E, Killer M, et al. Current therapies in ischemic stroke. Part B. Future candidates in stroke therapy and experimental studies[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(13-14): 671-684
- [5] Chen C, Chu SF, Liu DD, et al. Chemokines play complex roles in cerebral ischemia[J]. Neurochem Int, 2017, S0197-0186(17)30252-8
- [6] Hu J, Zhao TZ, Chu WH, et al. Protective effects of 20-hydroxyecdysone on CoCl₂-induced cell injury in PC12 cells [J]. J Cell Biochem, 2010, 111(6): 1512-1521
- [7] Zhang X, Xu X, Xu T, Qin S. β -Ecdysterone suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF- κ B signaling pathway[J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195-201
- [8] Zhao TZ, Ding Q, Hu J, et al. GPER expressed on microglia mediates the anti-inflammatory effect of estradiol in ischemic stroke [J]. Brain Behav, 2016, 6(4): e00449
- [9] Sun H, Zou X, Liu L. Epidemiological factors of stroke: a survey of the current status in china[J]. J Stroke, 2013, 15(2): 109-114
- [10] Peña ID, Borlongan C, Shen G. Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need[J]. J Stroke, 2017, 19(1): 50-60
- [11] Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke[J]. Neurol Sci, 2017, 38(7): 1167-1186
- [12] Patel RAG, McMullen PW2. Neuroprotection in the Treatment of Acute Ischemic Stroke[J]. Prog Cardiovasc Dis. 2017, 59(6): 542-548
- [13] Moretti A, Ferrari F, Villa RF. Neuroprotection for ischaemic stroke: current status and challenges[J]. Pharmacol Ther, 2015, 146: 23-34
- [14] Parr MK1, Zhao P, Haupt O, et al. Estrogen receptor beta is involved in skeletal muscle hypertrophy induced by the phytoecdysteroid ecdysterone[J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(9): 1861-1872
- [15] Jian CX, Liu XF, Hu J, et al. 20-Hydroxyecdysone-induced bone morphogenetic protein-2- dependent osteogenic differentiation through the ERK pathway in human periodontal ligament stem cells [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 698(1-3): 48-56
- [16] Liu Z, Zhu G, Zhang JH, et al. Ecdysterone attenuates vasospasm following experimental subarachnoid haemorrhage in rabbits[J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 104: 297-302
- [17] Hu J, Luo CX, Chu WH, et al. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- κ B and JNK pathways [J]. PLoS One, 2012, 7 (12): e50764
- [18] Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update[J]. J Insect Sci, 2003, 3: 7
- [19] Vidale S, Consoli A, Arnaboldi M, et al. Postischemic Inflammation in Acute Stroke[J]. J Clin Neurol, 2017, 13(1): 1-9
- [20] Brough D, Tyrrell PJ, Allan SM. Regulation of interleukin-1 in acute brain injury[J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(10): 617-22
- [21] Brough D, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 as a pharmacological target in acute brain injury [J]. Exp Physiol, 2015, 100(12): 1488-1494
- [22] Girard S, Sebire H, Brochu ME, et al. Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries [J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(8): 1331-1339

- secretion of MMP-2 and MMP-9 and is involved in serous ovarian cancer metastasis[J]. Cancer Letters, 2015, 359(2): 241-249
- [12] Ou S I, Ahn J S, De P L, et al. Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study[J]. Journal of Clinical Oncology, 2016, 34(7): 661-668
- [13] Bidoli P, Zilembo N, Cortinovis D, et al. Randomized phase II three-arm trial with three platinum-based doublets in metastatic non-small-cell lung cancer. An Italian Trials in Medical Oncology study[J]. Annals of Oncology, 2016, 18(3): 461-467
- [14] Quantin X. Brain metastases at the time of presentation of non-small cell lung cancer: a multi-centric AERIO* analysis of prognostic factors[J]. British Journal of Cancer, 2015, 84(7): 903-909
- [15] Barlesi F, Mazieres J, Merlio J P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT)[J]. Lancet, 2016, 387(10026): 1415-1426
- [16] Sellers K, Fox M P, Slone S P, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation [J]. Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(2): 687-698
- [17] Sun B, Yang N, Jiang Y, et al. Antagomir-1290 suppresses CD133 cells in non-small cell lung cancer by targeting fyn-related Src family tyrosine kinase[J]. Tumor Biology, 2015, 36(8): 6223-6230
- [18] Jamalhanjani M, Wilson G A, Mcgranahan N, et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. New England Journal of Medicine, 2017, 376(22): 2109-2121
- [19] Lastwika K J, Rd W W, Li Q K, et al. Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT/mTOR pathway in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Research, 2015, 76(2): 227-238
- [20] Gao Y, Guan Z, Chen J, et al. CXCL5/CXCR2 axis promotes bladder cancer cell migration and invasion by activating PI3K/AKT-induced upregulation of MMP2/MMP9[J]. International Journal of Oncology, 2015, 47(2): 690-700
- [21] Ni Y, Ye X, Wan C, et al. Percutaneous microwave ablation (MWA) increased the serum levels of VEGF and MMP-9 in stage I non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. International Journal of Hyperthermia, 2017, 33(4): 435-439
- [22] Zhao L, Liu L, Dong Z, et al. miR-149 suppresses human non-small cell lung cancer growth and metastasis by inhibiting the FOXM1/cyclin D1/MMP2 axis[J]. Oncology Reports, 2017, 38(6): 3522-3530
- [23] Zhen Y, Liu J, Huang Y, et al. miR-133b Inhibits Cell Growth, Migration, and Invasion by Targeting MMP9 in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Oncology Research, 2017, 25(7): 1109-1116
- [24] Huang H, Du T, Xu G, et al. Matrine suppresses invasion of castration-resistant prostate cancer cells by downregulating MMP-2/9 via NF- κ B signaling pathway [J]. International Journal of Oncology, 2017, 50(2): 640-648
- [25] Yang L, Song X, Zhu J, et al. Tumor suppressor microRNA-34a inhibits cell migration and invasion by targeting MMP-2/MMP-9/FNDC3B in esophageal squamous cell carcinoma [J]. International Journal of Oncology, 2017, 51(1): 378-388
- [26] Schwegmann K, Bettenworth D, Hermann S, et al. Detection of Early Murine Colorectal Cancer by MMP-2/-9-Guided Fluorescence Endoscopy[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2015, 22(1): 82-91
- [27] Välimäki J, Uusitalo H. Matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-9, and TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) and markers for vascularization in functioning and non-functioning bleb capsules of glaucoma drainage implants [J]. Acta Ophthalmologica, 2015, 93(5): 450-456
- [28] Su Y, Wan D, Song W. Dryofragin inhibits the migration and invasion of human osteosarcoma U2OS cells by suppressing MMP-2/9 and elevating TIMP-1/2 through PI3K/AKT and p38 MAPK signaling pathways[J]. Anti-cancer drugs, 2016, 27(7): 660-668
- [29] Huang L L, Wang Z, Cao C J, et al. AEG-1 associates with metastasis in papillary thyroid cancer through upregulation of MMP2/9 [J]. International Journal of Oncology, 2017, 51(3): 812-822
- [30] Li Z, Takino T, Endo Y, et al. Activation of MMP 9 by membrane type 1 MMP/MMP 2 axis stimulates tumor metastasis [J]. Cancer Science, 2017, 108(3): 347-353

(上接第 3829 页)

- [23] Martínez-Sánchez P, Gutiérrez-Fernández M, Fuentes B, et al. Biochemical and inflammatory biomarkers in ischemic stroke: translational study between humans and two experimental rat models [J]. J Transl Med, 2014, 12: 220-233
- [24] Tuttolomondo A, Pecoraro R, Pinto A. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date[J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 2221-2238
- [25] Thiem B, Kikowska M, Maliński MP, et al. Ecdysteroids: production in plant in vitro cultures[J]. Phytochem Rev, 2017, 16(4): 603-622