

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.011

丹龙醒脑片对老年大鼠脑缺血再灌注后炎症反应的影响*

何倩 李继红 余清平[△] 周小青 刘旺华 李花 李新华 陈红艳

(湖南中医药大学病理生理实验室 湖南长沙 410013)

摘要 目的:从肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素(IL-1 β)表达变化揭示丹龙醒脑片抗老年脑缺血再灌注损伤的保护机制。**方法:**用大脑中动脉栓塞再通法建立脑缺血再灌注模型,将动物随机分为假手术组、模型组、丹龙醒脑片组和尼莫地平组,采用免疫组化法,观察 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白的表达。**结果:**丹龙醒脑片能显著减轻神经细胞的损伤;假手术组有一定量的 TNF- α 和 IL-1 β 表达,缺血后 TNF- α 和 IL-1 β 迅速增加,丹龙醒脑片组显著抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,模型组和丹龙醒脑片组差异有统计学意义 ($P<0.01, P<0.05$)。**结论:**丹龙醒脑片抗老年脑缺血再灌注损伤的保护机制与其抑制由缺血再灌注损伤诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 等表达有关。

关键词:丹龙醒脑片;脑缺血再灌注;肿瘤坏死因子;白介素

中图分类号:Q95-3, R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)26-5042-03

Effect of Danlong Xingnao Tablet on Inflammatory Cascade Reaction after Cerebral Ischemia-Reperfusion in Elderly Rats*

HE Qian, LI Ji-hong, YU Qing-ping[△], ZHOU Xiao-qing, LIU Wang-hua, LI Hua, LI Xin-hua, CHEN Hong-yan

(Laboratory of Pathophysiology, Hunan university of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410013, China)

ABSTRACT Objective: To investigate protective mechanism of Danlong Xingnao tablets through the change of expression of TNF- α and IL-1 β after cerebral ischemia-reperfusion injury in elderly rats. **Methods:** An animal model of cerebral ischemia-reperfusion was made by middle cerebral artery occlusion-recanalization. Rats were randomly divided into sham-operation group, model group, Danlong Xingnao tablet group and nimodipine group. The expression of TNF- α and IL-1 β were detected by immunohistochemical method and image analysis technique. **Results:** Danlong Xingnao tablets could markedly alleviate the injury of neurons. TNF- α and IL-1 β were expressed in sham-operation group, increased rapidly after cerebral ischemia-reperfusion, and significantly inhibited in Danlong Xingnao tablets group. There was a significant difference between the model group and Danlong Xingnao tablet group ($P<0.01, P<0.05$). **Conclusions:** The brain-protective effect of Danlong Xingnao tablets is achieved possibly by inhibiting expression of TNF- α and IL-1 β induced by ischemia-reperfusion injury.

Key words: Danlong Xingnao tablet; Cerebral ischemia-reperfusion; TNF; IL

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5042-03

前言

脑缺血再灌注损伤是指发生缺血性脑卒中后,一定时间内恢复血流灌注后,脑组织细胞的损伤反而进行性加重的现象。脑缺血再灌注时,缺血区的炎症反应主要表现在白细胞聚集、溶酶体破坏、水解酶生成、氧自由基产生、炎症介质形成,导致脑组织缺血再灌注损伤^[1]。研究表明,脑缺血再灌注损伤主要与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 IL-1 β 等炎症细胞因子、黏附分子及由此介导的炎症介质失控、释放而形成的“瀑布效应”密切相关^[2,3]。丹龙醒脑片在治疗缺血性脑血管疾病方面具有显著效果,这可能与其脑缺血损伤后的抑制细胞因子及细胞凋亡有关^[4,7]。既往的脑缺血-再灌注的实验研究很少偏重于脑血管疾病中增龄因素。故本研究以老龄脑缺血损伤的大鼠为对象,重点

研究丹龙醒脑片在治疗脑缺血-再灌注损伤的抗炎作用的相关机制,为临床应用提供一定的科学依据。

1 材料和方法

健康 SD 老龄大鼠 48 只,体质量 450~600 g, (20~21)月龄,中南大学湘雅医学院动物学部提供。大鼠随机分为 4 组,即假手术组、模型组、尼莫地平组、丹龙醒脑片组,每组 12 只大鼠,雌雄各半。药物制备及给药剂量方式、动物模型制备、组织标本取材、组织 SABC 法 TNF- α 和 IL-1 β 免疫组织化学染色、图像分析与统计学处理均参照课题组文献进行^[5,7]。

2 结果

2.1 丹龙醒脑片对脑缺血后 TNF- α 表达的影响

* 基金项目:湖南省科技厅资助项目(2011FJ3141);湖南中医药大学校青年科研课题项目(99820001-39);

国家自然科学基金项目(81202632, 81373702)

作者简介:何倩(1971-),女,博士,副教授,主要从事心脑血管疾病中医证治研究,电话:13875976810, E-mail: heqian--2000@163.com

[△]通讯作者:余清平, E-mail: yuqingwww@163.com

(收稿日期:2014-02-28 接受日期:2014-03-23)

过氧化物酶-DAB显色显示各组大鼠海马区可见不同程度TNF- α 免疫阳性神经元和小胶质细胞,免疫反应阳性产物呈现均质状分布于胞浆内或胞核内,呈棕黄色(图1)。模型组海马区较假手术组TNF- α 的阳性细胞数显著增多($P<0.01$);丹龙醒脑片组较模型组TNF- α 阳性细胞数显著减少($P<0.01$);丹龙醒脑片组与尼莫地平组TNF- α 阳性细胞数比较,无显著性差异($P>0.05$);结果见图1和图3。

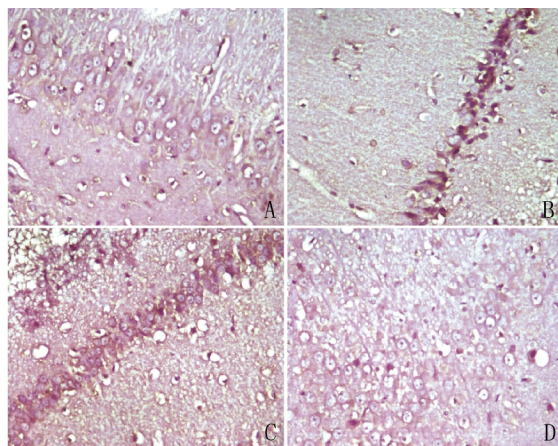


图1 大鼠海马区TNF- α 的免疫组织化学染色

A为假手术组,B为模型组,C为丹龙醒脑片组,D为尼莫地平组(400 $\times$)

Fig. 1 Immunohistochemistry of TNF- α in hippocampus of rats

A: sham-operation group; B: model group; C: Danlong Xingnao tablet group D: nimodipine group(400 $\times$)

2.2 丹龙醒脑片对脑缺血后IL-1 β 表达的影响

过氧化物酶-DAB显色显示各组大鼠海马区亦可可见不同程度IL-1 β 免疫阳性神经元和小胶质细胞,免疫反应阳性产物呈现均质状分布于胞浆内或胞核内,呈棕黄色(图2)。模型组海马区较假手术组IL-1 β 阳性细胞数显著增多($P<0.01$);丹龙醒脑片组较模型组IL-1 β 阳性细胞数显著减少($P<0.01$),丹龙醒脑片组与尼莫地平组IL-1 β 阳性细胞数比较,无显著性差异($P>0.05$);结果见图2和图3。

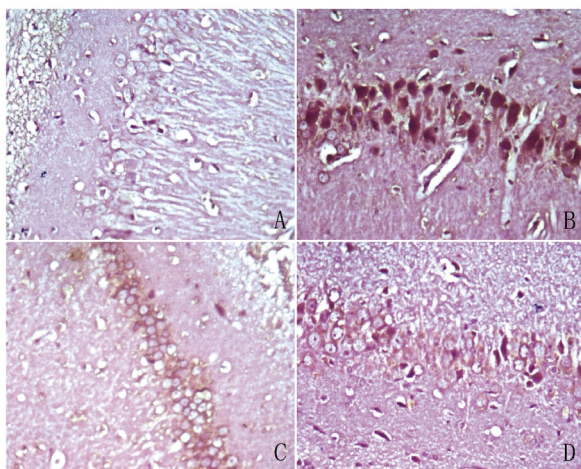


图2 大鼠海马区IL-1 β 的免疫组织化学染色

A为假手术组,B为模型组,C为丹龙醒脑片组,D为尼莫地平组(400 $\times$)

Fig. 2 Immunohistochemistry of IL-1 β in hippocampus of rats

A: sham-operation group; B: model group; C: Danlong Xingnao tablet group D: nimodipine group(400 $\times$)

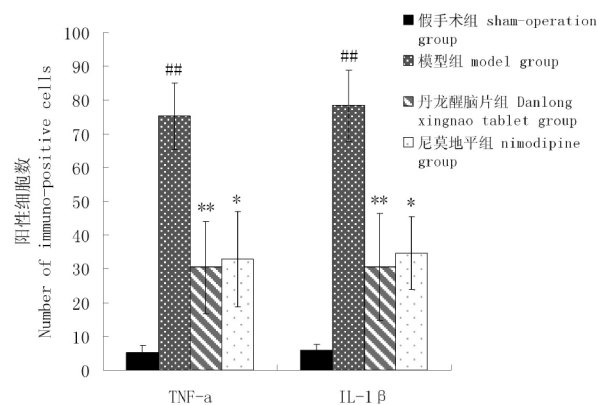


图3 大鼠海马区TNF- α 与IL-1 β 的各組阳性细胞数的比较($\bar{x} \pm s$,个)

Fig. 3 Comparison of amount of each group of TNF- α and IL-1 β in hippocampus of rats($\bar{x} \pm s$)

注:与假手术组比较(compared with sham-operation group) ## $P<0.01$; 与模型组比较(compared with model group) * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤与炎症反应的密切关系已成为共识,损伤所致的炎症反应的基础是以TNF- α 与IL-1 β 等细胞因子为代表的多种炎性介质失控、释放而形成的瀑布效应^[8]。TNF- α 是活化的单核-巨噬细胞分泌的可溶性细胞因子,作为炎症反应的始发细胞因子,可引起白细胞聚集和激活并释放炎症介质^[9];脑缺血再灌注损伤后,TNF- α 与其他炎性细胞因子相互作用,诱导血管内皮细胞的黏附分子的表达,促进炎症反应及血栓形成,加重血脑屏障损伤,致脑损伤和脑水肿的发生^[8-10]。IL-1 β 存在于脑组织中,是一种能触发免疫和炎症反应的前炎性细胞因子,可参与免疫及炎症反应,能够诱导其他炎性介质的产生,调节TNF- α 的表达^[11,12]。大量研究表明,脑缺血-再灌注损伤后IL-1 β 可通过多个环节参与缺血性神经元损伤机制,IL-1 β 可诱导神经元和神经胶质细胞产生并释放细胞因子、粘附分子^[13],增加中性粒细胞粘附、聚集,使血栓形成、脑血管狭窄及血流减少^[14];促使炎性细胞浸润,诱发炎症反应^[15];促进兴奋性氨基酸释放、脑缺血后NMDA受体的激活及钙超载损伤的级联效应,进而促使氧自由基生成增加和诱发神经元脂质过氧化反应,引起大脑神经元的损伤和凋亡^[16,17]。Van den Tweel ER等^[10]实验测得脑组织缺血缺氧6h后脑组织中TNF- α 和IL-1 β mRNA及蛋白的表达均明显增高,促进其他细胞因子释放及细胞粘附分子增加。因此,合理有效调控TNF- α 和IL-1 β 的表达、抑制炎症级联反应的发生发展,成为了缺血性脑病治疗中潜在的面临的治疗靶点。

本课题组研究证实,脑缺血再灌注后,老龄大鼠脑组织TNF- α 及IL-1 β 表达明显增强,这与近年来的报道相似^[9,10,13,14,16,17]。丹龙醒脑片是治疗缺血性脑卒中的有效复方,具有活血化痰及温阳之功效,而无伤正和无刚燥的缺陷,正适合本病病机,可一定程度上抑制脑缺血再灌注损伤后促炎作用的细胞因子的表达,发挥拮抗老年脑缺血再灌注损伤作用^[5,6]。我们对脑缺血再灌注老龄大鼠给予丹龙醒脑片后,证实大鼠海马区TNF- α 和IL-1 β 表达明显下调;这表明丹龙醒脑片阻抑了脑缺

血再灌注后 TNF- α 和 IL-1 β 介导的对脑组织的炎性损伤,进而发挥一定的神经元保护作用。

众多的研究表明,传统的中医药对脑缺血中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达有不同程度的抑制作用^[18]。局灶性脑缺血属于中医学“卒中”范畴,传统中医学一般认为脑中风多为本虚标实,卒中的发生不外乎与风、火、气、痰、血瘀、虚六者有密切相关^[19,20]。丹龙醒脑片是临床治疗缺血性卒中的有效复方中药,可显著提高卒中患者神经功能及改善生活质量。本实验证实老龄大鼠脑缺血再灌注后脑组织海马区 TNF- α 和 IL-1 β 表达明显增强,而丹龙醒脑片能显著抑制脑缺血再灌注后脑组织 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,这可能是丹龙醒脑片对老龄大鼠脑保护作用的机制之一。

参考文献(References)

- [1] Gu JH, Ge JB, Li M, et al. Inhibition of NF- κ B activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 47(4): 652-660
- [2] Zhang S, Qi Y, Xu Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation [J]. Neurochem Int, 2013, 63(5): 522-532
- [3] Oh WS. Effect of fentanyl on TNF- α and IL-1 β levels during global ischemia/reperfusion in rats [J]. Int J Tissue React, 2002, 24(1): 11-21
- [4] 周小青,刘旺华,李花,等. 丹龙醒脑片对血管性痴呆大鼠学习记忆及脑组织脂质过氧化和钙超载的影响 [J]. 湖南中医学院, 2002, 22(3): 1-4
Zhou Xiao-qing, Liu Wang-hua, Li Hua, et al. An Experimental Study on the Effects of DLXNP on Learning and Memory Ability, Cerebral SOD, MDA and Ca²⁺ in Rats with Vascular Dementia [J]. Journal of TCM University of Hunan, 2002, 22(3): 1-4
- [5] 何倩,周小青,李花,等. 丹龙醒脑片对大鼠局灶性脑缺血再灌注后海马区肿瘤坏死因子 α 表达和细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(3): 37-38
He Qian, Zhou Xiao-qing, Li Hua, et al. Effect of Danlong Xingnao Tablet on the Expression of TNF- α and Apoptosis after Focal Cerebral Ischemia Reperfusion in Rat Hippocampus [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2009, 16(3): 37-38
- [6] 何倩,李花,周小青,等. 丹龙醒脑片对大鼠局灶性脑缺血再灌注后海马区 AI 及 Fas/FasL、TNF- α 表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(2): 23-25
He Qian, Li Hua, Zhou Xiao-qing, et al. Effect of Danlong Xingnao tablet on expression of AI, Fas/FasL and TNF- α after cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. Journal of TCM University of Hunan, 2009, 29(2): 23-25
- [7] 何倩,周小青,李新华,等. 丹龙醒脑片对老龄大鼠脑缺血再灌注后 NF- κ B、ICAM-1 表达的影响[J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(5): 141-143
He Qian, Zhou Xiao-qing, Li Xin-hua, et al. Effect of Danlong Xingnao tablets on NF- κ B and ICAM-1 expression in elderly rats after cerebral ischemia/reperfusion [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 28(5): 141-143
- [8] Wang H, Xu L, Venkatachalam S, Trzaskos JM, et al. Differential regulation of IL-1 β and TNF- α RNA expression by MEK1 inhibitor after focal cerebral ischemia in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(5): 869-874
- [9] Rostami F, Oryan S, Ahmadiani A, et al. Morphine preconditioning protects against LPS-induced neuroinflammation and memory deficit [J]. J Mol Neurosci, 2012, 48(1): 22-34
- [10] Van den Tweel ER, Kavelaars A, Lombardi MS, et al. Bilateral molecular changes in a neonatal rat model of unilateral hypoxic-ischemic brain damage[J]. Pediatr Res, 2006, 59(3): 434-439
- [11] Zhang S, Qi Y, Xu Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation [J]. Neurochem Int, 2013, 63(5): 522-532
- [12] Qin WY, Luo Y, Chen L, et al. Electroacupuncture Could Regulate the NF- κ B Signaling Pathway to Ameliorate the Inflammatory Injury in Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Model Rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 924541
- [13] Rostami F, Oryan S, Ahmadiani A, et al. Morphine preconditioning protects against LPS-induced neuroinflammation and memory deficit [J]. J Mol Neurosci, 2012, 48(1): 22-34
- [14] Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, et al. Common variants in interleukin-1-Beta gene are associated with intracranial hemorrhage and susceptibility to brain arteriovenous malformation[J]. Cerebrovasc Dis, 2009, 27(2): 176-182
- [15] Genovese T, Mazzon E, Paterniti I, et al. Modulation of NADPH oxidase activation in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Brain Res, 2011, 1372: 92-102
- [16] Fan T, Jiang WL, Zhu J, et al. Arctigenin protects focal cerebral ischemia-reperfusion rats through inhibiting neuroinflammation [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(11): 2004-2009
- [17] Hu YY, Huang M, Dong XQ, et al. Ginkgolide B reduces neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain: possible involvement of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(3): 1462-1468
- [18] 易健,黄昕,俞悦,等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血后白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 10(22): 599-601
Yi Jian, Huang Xin, Yu Yue, et al. Effect of Buyang Huanwu decoction on interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α expression in rats after cerebral infarction [J]. Chinese Emergency Treatment for Serious and Critic, 2010, 22(10): 599-601
- [19] 杨小清. 论补阳还五汤治疗中风病气虚血瘀证的作用机理[J]. 中国中医急症, 2005, 14(4): 342-343
Yang Xiao-qing. The Discussion on the Mechanism of Buyanghuanwu Decoction Treating Stroke, the Type of Syndrome of Blood Stagnancy Due to Deficiency of Qi [J]. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine, 2005, 14(4): 342-343
- [20] 瞿明杰,刘志顺,刘保廷. 试论中风后痉挛性瘫痪病机及针灸取穴原则[J]. 针刺研究, 2006, 31(6): 365-368
Zi Ming-jie, Liu Zhi-shun, Liu Bao-yan. Analysis on the Pathogenesis of Apoplectic Spastic paralysis and the Principles for Selecting Acupoints[J]. Acupuncture Research, 2006, 31(6): 365-368