

• 论 著 •

川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激、Ca²⁺-ATP 酶活性及炎症因子的影响*

葛 亮, 曹慧玲, 张 洁, 徐 敏, 朱小飞, 陈云峰[△]

南京中医药大学附属医院检验科, 江苏南京 210029

摘 要:目的 通过观察脑组织氧自由基、钙离子负荷及炎症反应变化研究川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤的治疗作用。方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、川芎嗪组($n=10$), 模型组、川芎嗪组采用大脑中动脉栓塞(MCAO)法建立大鼠脑缺血再灌注模型, 24 h 后腹腔注射川芎嗪(50 mg/kg, 每日 1 次, 连续 6 d), 造模第 1、3、7 天进行神经功能评分, 造模第 7 天通过 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色及扫描脑梗死区光密度计算梗死率, 检测脑组织氧自由基一氧化氮(NO)和丙二醛(MDA)水平、钙离子腺苷三磷酸酶(Ca²⁺-ATP 酶)活性、炎症因子基因相对表达水平。**结果** 造模第 7 天, 模型组大鼠神经功能评分、梗死率与假手术组比较均明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与模型组相比, 川芎嗪组大鼠神经功能评分和梗死率明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 脑组织 NO、MDA 水平及炎症因子基因表达均下调($P<0.05$), 超氧化物歧化酶(SOD)和 Ca²⁺-ATP 酶活性均升高($P<0.05$)。**结论** 川芎嗪通过调节大鼠脑组织氧化和抗氧化平衡, 清除氧自由基, 提高 Ca²⁺-ATP 酶活性, 抑制细胞内钙超载, 抑制炎症反应等起到改善脑缺血再灌注损伤, 保护神经细胞的作用, 为探讨临床中药治疗脑卒中机制奠定实验基础。

关键词: 川芎嗪; 脑缺血再灌注; 氧自由基; 炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.05.002

中图法分类号: R285.5

文章编号: 1673-4130(2021)05-0517-04

文献标志码: A

Effect of tetramethylpyrazine on oxidative stress, Ca²⁺-ATP activity and inflammatory factors after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats*

GE Liang, CAO Huiling, ZHANG Jie, XU Min, ZHU Xiaofei, CHEN Yunfeng[△]

Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Abstract: Objective To investigate the effects of tetramethylpyrazine on treatment in cerebral ischemia/reperfusion injury by the changes of oxygen free radical, calcium overload and inflammatory reaction. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and tetramethylpyrazine group ($n=10$). The model group and tetramethylpyrazine group were established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). After 24 h, the rats were intraperitoneally injected with ligustrazine (50 mg/kg, once a day, for 6 days). Neurological function score was performed on the first, third and seventh days of modeling. On the seventh day after modeling, the infarction rate was calculated by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and scanning optical density of cerebral infarction area. The levels of oxygen free radical nitric oxide (NO) in brain tissue and malondialdehyde (MDA), the activity of calcium adenosine triphosphatase (Ca²⁺-ATPase) and the relative expression levels of inflammatory factors genes in brain tissues were detected. **Results** On the 7th day after injury, compared with the sham group, the scores of the nervous function and ratio of cerebral infarct were significantly higher, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The oxidative stress indexes and the expression of inflammatory factors were also significantly changed; compared with the model group, the scores and ratio of treated rats were significantly decreased in the tetramethylpyrazine group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Also in tetramethylpyrazine group, the levels of NO and MDA as while as the gene expression of inflammatory factors were de-

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81703830)。

作者简介: 葛亮, 男, 副主任技师, 主要从事中西医结合基础研究。 [△] 通信作者, E-mail: cyf_1128@163.com。

本文引用格式: 葛亮, 曹慧玲, 张洁, 等. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激、Ca²⁺-ATP 酶活性及炎症因子的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(5): 517-520.

creased in the tissues ($P < 0.05$). And the activity of SOD and Ca^{2+} -ATPase were increased compared to the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tetramethylpyrazine can improve cerebral ischemia/reperfusion injury and protect nerve cells by regulating the balance of oxidation and antioxidation, scavenging oxygen free radicals, increasing Ca^{2+} -ATPase activity, inhibiting intracellular calcium overload and inhibiting inflammatory reaction, which lay the foundation of study on the mechanism of clinical Chinese medicine in the treatment of stroke.

Key words: tetramethylpyrazine; cerebral ischemia/reperfusion; oxygen free radical; inflammatory factors

当前,缺血性脑卒中占脑血管病的 80% 左右,主要因为脑血管局部动脉粥样硬化、血栓脱落及血管损伤等导致脑供血动脉栓塞,从而引起相应脑组织缺血、坏死,临床上通过溶栓、使用抗凝药物等改善脑血液循环,但由于其存在出血的风险和治疗时间窗的狭窄性,使得绝大多数患者无法得到有效救治,且血管再通导致脑组织缺血再灌注,并通过诱发氧自由基连锁反应进一步加重脑组织损伤^[1]。川芎嗪是从中药伞形科植物川芎的根茎中提取的一种生物碱,有效成分为 2,3,5,6-四甲基吡嗪,具有活血、化瘀、理气的功能,以及扩张血管、改善微循环、抗氧化、拮抗钙离子及抗纤维化等作用,广泛应用于脑缺血疾病的治疗^[2]。本研究探讨川芎嗪通过改善脑组织氧化应激损伤、提高钙离子腺苷三磷酸酶(Ca^{2+} -ATP 酶)活性及抑制炎症因子等作用治疗脑缺血再灌注损伤,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠,雄性,250~300 g,由上海捷思杰实验动物有限公司提供,川芎嗪由美国 Sigma 公司提供。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI 公司提供荧光定量 PCR 仪;美国 MD Spectramac M3 公司提供多功能酶标仪。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染液,批号为 C428BA0042,由上海生工生物工程有限公司提供;一氧化氮(NO)、超微量 Ca^{2+} -ATP 酶、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,型号分别为 A012-3、A070-4、A003-1、A001-3; cDNA 合成试剂盒和 One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit II 均由日本 TaKaRa 提供。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 实验动物共分为 3 组,每组 10 只。假手术组:插入线栓但不阻塞大脑中动脉;模型组:线栓法造模,给予磷酸盐缓冲液(PBS);川芎嗪组:线栓法造模,造模 24 h 后,腹腔注射川芎嗪,剂量 50 mg/kg,每天注射 1 次,连续 6 d。

1.3.2 线栓法建立脑缺血再灌注模型 采用线栓法致大脑中动脉栓塞(MCAO)建立脑缺血再灌注模型。动物用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧位固定,颈正中中线切口,沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉,分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处用动脉夹

夹闭,然后近心端结扎 CCA、ECA。然后在距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口,将栓线插入到 ICA,这时用 CCA 远心端的细线轻轻系牢栓线。从血管分叉处开始算,当插入深度在 18 mm 时,紧紧系牢 CCA 远心端的细线,动作轻柔,不要使 ICA 有任何的牵拉,否则会使栓线脱出 CCA。血管外栓线不要留得过长,更不要缝在皮外,大鼠会自行拔出。缝合伤口,单笼饲养观察。缺血后 2 h 小心抽出栓线,形成再灌注模型,并于造模第 7 天处死大鼠,进行后续实验。

1.3.3 神经功能评分 分别于造模第 1、3、7 天对各组大鼠进行改良神经功能损伤严重程度评分(mNSS),各项神经功能实验分值之和作为该组大鼠 mNSS 行为学评分,分值越高,损伤越严重^[3]。

1.3.4 TTC 染色 用 0.2 mmol/L PBS 配制成 2% TTC 溶液,避光保存,大鼠麻醉后,快速取脑,将脑组织在 0℃的生理盐水中冰冻 5 min 后,由脑前极与视交叉连线中点向后沿冠状面每隔 2 mm 切片,切成 5 片,切片置于 2% TTC 溶液中,37℃避光孵育 30 min,不时翻动脑组织切片,使其均匀接触到染液。

1.3.5 大鼠脑梗死率计算 应用 image proplus 软件对梗死灶脑组织区域的光密度进行分析,记录光密度值并计算梗死率。

1.3.6 各项指标检测 Ca^{2+} -ATP 酶活性、NO、MDA 及 SOD 水平测定采用化学比色法测定,脑组织炎症因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1、IL-6 及 IL-10]采用 PCR 法测定,具体操作方法参照试剂盒说明书。炎症因子基因相对表达水平采用 mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

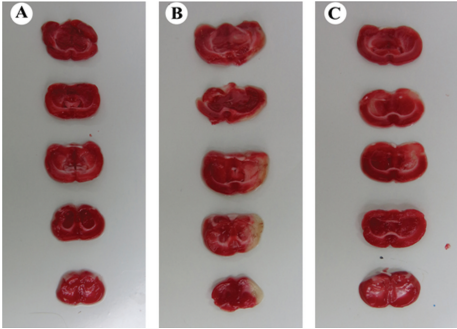
1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个时间点的行为评分数据采用重复测量方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经功能评分比较 各组大鼠造模前 mNSS 行为学评分均为 0 分,神经功能正常,造模后出现神经症状,如不能完全伸展对侧前爪,行走时向对侧倾倒,损伤严重者不能行走,参照评分标准,造模第 1 天模型组和川芎嗪组 mNSS 行为学评分(分别 15.0 分、13.5 分)与造模前比较,分数均明显增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$);造模第 3 天川芎嗪组 mNSS 行为学评分(9.5 分)与模型组(13.0 分)比较,

差异有统计学意义($P<0.05$);造模第 7 天川芎嗪组 mNSS 行为学评分(5.5 分)与模型组(10.0 分)比较,分数明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 TTC 染色结果 经 TTC 染色后,各组大鼠脑组织被染成红色,梗死区域为白色。假手术组大鼠脑组织为红色,结构对称性好;模型组鼠脑组织左侧皮质及纹状体出现白色梗死区域;川芎嗪组梗死区域有所缓解,但仍可见白色梗死灶。见图 1。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为川芎嗪组。

图 1 各组 TTC 染色

2.3 各组大鼠脑组织梗死率比较 与 TTC 染色结果一致,与模型组比较,川芎嗪组梗死率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织梗死率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	梗死灶光密度值	全脑光密度值	梗死率(%)
假手术组	—	908 268±34 886	—
模型组	116 074±14 669	878 386±32 804	13.21±1.67
川芎嗪组	14 510±2 309	855 194±30 431	1.70±0.27*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;—表示无数据。

2.4 川芎嗪对大鼠脑组织氧化应激指标 NO、MDA 及 SOD 水平的影响 造模第 7 天,模型组脑组织 NO 和 MDA 水平[分别为(4.11±0.05) $\mu\text{mol/gprot}$ 、(5.58±0.28)nmol/mg]与假手术组[分别为(1.34±0.24) $\mu\text{mol/gprot}$ 、(0.89±0.04)nmol/mg]比较明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);川芎嗪组 NO 和 MDA 水平[分别为(2.55±0.11) $\mu\text{mol/gprot}$ 、(3.19±0.22)nmol/mg]较模型组明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);川芎嗪组 SOD 活水平[(73.52±3.84) U/mgprot]与模型组[(46.90±4.37)U/mgprot]比较明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 川芎嗪对大鼠脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响 造模第 7 天,模型组大鼠脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶活性[(0.63±0.01) $\mu\text{molpi}/(\text{mgprot}\cdot\text{h})$]与假手术组[(1.42±0.07) $\mu\text{molpi}/(\text{mgprot}\cdot\text{h})$]比较明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$), Ca^{2+} -ATP 酶活性降低可减弱细胞 Ca^{2+} 外排,导致细胞钙超载,川芎嗪组 Ca^{2+} -ATP 酶活性较模型组升高 [(1.46±0.10) $\mu\text{molpi}/(\text{mgprot}\cdot\text{h})$],改善细胞内钙超载状况。

2.6 川芎嗪对大鼠脑组织炎症因子的影响 造模第 7 天,模型组各项炎症因子基因相对表达水平与假手术组比较均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);川芎嗪组 TNF- α 、IL-1、IL-6 及 IL-10 基因相对表达水平与模型组比较均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 造模第 7 天川芎嗪对大鼠脑组织炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)

组别	TNF- α	IL-1	IL-6	IL-10
假手术组	0.93±0.11	0.96±0.08	1.06±0.05	0.99±0.11
模型组	3.76±0.15*	4.11±0.29*	1.86±0.07*	2.30±0.15*
川芎嗪组	1.71±0.14 [#]	2.59±0.21 [#]	1.33±0.07 [#]	1.54±0.06 [#]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨 论

缺血性脑卒中是一种由多种机制参与的复杂的病理过程,缺氧导致的氧自由基的生成,细胞 Ca^{2+} 调节失衡,进而炎症反应的激活等环节最终导致神经细胞的坏死或凋亡。临床上缺血性脑卒中首选治疗方案为采用药物或介入等方法进行溶栓,尽快恢复缺血区的血液供应,减少缺血面积,挽救半暗带神经细胞,最大限度减轻对脑组织结构和功能的损伤。然而事实上溶栓治疗易继发再灌注损伤诱发氧自由基反应进而破坏血脑屏障的完整性,引起血管性脑水肿,促进炎症细胞浸润,造成更为严重的病理性损伤^[4]。

近年来,川芎嗪及其衍生物作为中医治疗缺血性脑血管病的常用药物,具有抗氧化、抗凋亡等功效,有研究表明川芎嗪可通过 JNK/MARK 信号通路抑制缺血再灌注损伤导致的神经细胞凋亡^[2];川芎嗪还可以通过升高 SOD 水平及降低 MDA 水平保护神经细胞^[5];其衍生物川芎嗪硝酮易通过血脑屏障,减轻大鼠脑缺血后的脑梗死,保护和/或恢复神经功能,促进神经发生和少突胶质生成^[6]。本文也证实,川芎嗪可有效缓解大鼠 MCAO 模型神经功能损伤状态,减少梗死脑组织的体积,降低梗死率。然而,目前对川芎嗪治疗机制的研究仍不全面,因此,本研究从氧自由基、 Ca^{2+} -ATP 酶及炎症反应等多个方面进一步研究川芎嗪改善脑缺血再灌注损伤的作用机制,为川芎嗪的临床治疗提供实验依据。

缺血再灌注损伤导致脑组织产生大量的氧自由基,其中 NO 是研究的热点,缺血再灌注过程中 NO 水平呈现先升高后下降再升高的过程,内皮细胞型 NOS(eNOS)产生的 NO 在缺血早期具有保护神经作用,但作用甚小,神经元型 NOS(nNOS)和诱导型 NOS(iNOS)产生的 NO 对神经组织有损伤,前者作用甚微,在病理状态下,后者大量增加,产生过量的 NO,进而发挥神经毒作用,TARKOWSKI 等^[7]探讨了急性脑卒中患者 NO 及其主要代谢产物与脑损伤的关系,发现缺血早期 NO 具有一定保护作用,然而

晚期 NO 具有明显的神经毒性作用,导致严重的神经功能缺损。MDA 是脂质氧化的最终产物,其水平变化可间接反映组织中氧自由基的变化,SOD 作为主要的清除氧自由基的酶,对抗氧自由基对细胞损伤有重要作用^[8-9]。本研究中大鼠在造模后,氧化应激指标 NO 和 MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低,说明造模引起的缺血再灌注损伤激活了脑组织的氧自由基,氧化与抗氧化平衡破坏,川芎嗪治疗后氧化指标显著下降,抗氧化指标明显提高,提示川芎嗪可有效调节损伤后脑组织的氧化平衡状态,进而降低氧自由基带来的损伤作用,保护神经细胞。

在中枢神经系统中, Ca^{2+} 参与神经细胞兴奋、神经递质释放等重要功能。钙超载被认为是各种有害因素导致神经元变性的最后共同通道,可通过激活氧化应激反应、损伤线粒体等途径引起神经细胞死亡。正常神经细胞内 Ca^{2+} 与细胞外相近,主要通过电压依赖型钙通道、 Ca^{2+} -ATP 酶等维持 Ca^{2+} 梯度。缺血时,细胞能量代谢发生障碍,导致细胞膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降,细胞 Ca^{2+} 内流增加,外排减少,从而引起钙超载^[10]。本研究中川芎嗪可保护线粒体,提高 Ca^{2+} -ATP 酶活性,促进 Ca^{2+} 排出,降低钙超载状态,保护神经组织。

缺血再灌注损伤发生后,大量白细胞浸润脑组织,产生炎症因子进而加重了脑损伤,已有大量实验证明 IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF- α 等细胞因子参与炎症反应^[11],但有关川芎嗪对炎症因子调节的报道较少见。本研究结果表明 MCAO 模型建立后大鼠脑组织中炎症反应活跃,各类炎症因子表达明显增加,继而造成神经细胞的损伤,川芎嗪各项炎症因子基因相对表达水平均显著下降,说明川芎嗪可通过抑制炎症发生改善脑组织微环境,促进神经细胞恢复,进一步探究临床川芎嗪治疗脑卒中的作用机制。

参考文献

[1] YANG G, QIAN C, WANG N, et al. Tetramethylpyrazine protects against oxygen-glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial cells injury via Rho/Rho-kinase

signaling pathway[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(4): 619-633.

- [2] ZHONG M, MA W, ZHANG X, et al. Tetramethyl pyrazine protects hippocampal neurons against anoxia/reoxygenation injury through inhibiting apoptosis mediated by JNK/MARK signal pathway[J]. Med Sci Monit, 2016, 22(1): 5082-5090.
- [3] CHEN J, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [4] KOH S H, PARK H H. Neurogenesis in Stroke Recovery[J]. Transl Stroke Res, 2017, 8(1): 3-13.
- [5] WANG S, XIA B, QIAO Z, et al. Tetramethylpyrazine attenuated bupivacaine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through regulating apoptosis, autophagy and oxidative damage[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13(1): 1187-1196.
- [6] ZHANG G, ZHANG T, LI N, et al. Tetramethylpyrazine nitron activates the BDNF/Akt/CREB pathway to promote post-ischaemic neuroregeneration and recovery of neurological functions in rats[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(3): 517-531.
- [7] TARKOWSKI E, RINGQVIST A, ROSENGREN L, et al. Intrathecal release of nitric oxide and its relation to final brain damage in patients with stroke[J]. Cerebrovasc Dis, 2000, 10(3): 200-206.
- [8] GUO M, LU H, QIN J, et al. Biochanin a provides neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by Nrf2-mediated inhibition of oxidative stress and inflammation signaling pathway in rats[J]. Med Sci Monit, 2019, 25(1): 8975-8983.
- [9] COJOCARU I M, COJOCARU M, SAPIRA V, et al. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke[J]. Rom J Intern Med, 2013, 51(2): 97-106.
- [10] HU H J, SONG M. Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26(12): 2706-2719.
- [11] LAMBERTSEN K L, BIBER K, FINSEN B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(9): 1677-1698.

(收稿日期:2020-08-28 修回日期:2021-01-11)

(上接第 516 页)

- [11] DARISIPUDI M N, KULKARIN O P, SAYYED S G, et al. Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1): 116-124.
- [12] CHONG B F, MOHAN C. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in systemic lupus erythematosus[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(10): 1147-1153.
- [13] SHA W G, SHEN L, ZHOU L, et al. Silencing of CXCL12 performs a protective effect on C5b-9-induced injury in podocytes[J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50(8): 1535-

1544.

- [14] XU X, WANG G, CHEN N, et al. Long-team exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(12): 3739-3746.
- [15] WU X, LIU L, GUO Y, et al. Clinical value of a serum anti-PLA2R antibody in the diagnosis and monitoring of primary membranous nephropathy in adults[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2018, 11(1): 241-247.

(收稿日期:2020-05-25 修回日期:2021-02-11)