

前列腺素 E₁ 对缺血再灌注脑损伤的干预作用

冯国清¹, 张贺鸣¹, 王振基¹, 戴伟娟², 付润芳¹, 翁世艾¹ (1. 郑州大学医学院药理学教研室, 河南 郑州 450052; 2. 山东济宁医学院药理学教研室, 山东 济宁 272145)

摘要:目的 探讨前列腺素 E₁ (PGE₁) 对缺血再灌注脑损伤的干预作用。方法 采用线栓法, 经颈内动脉(ICA)插入颅内深度 18~20 mm 阻断左侧大脑中动脉, 复制大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。缺血 60 min, 再灌注 24 h 对每只动物进行神经症状评分后, 断头取脑, 并进行脑梗死体积、脑含水量测定及病理学检查。结果 ①缺血再灌注模型组出现典型神经缺损症状, 而 PGE₁ 三剂量组均能改善大鼠神经功能障碍, 其行为评分与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。②缺血再灌注模型组脑梗死体积百分比高达 $(28.40 \pm 1.8269)\%$, 而 PGE₁ 中、高剂量组脑梗死体积百分比明显缩小 [$(10.25 \pm 2.772)\%$, $(12.90 \pm 2.5772)\%$], 与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。③缺血再灌注模型组栓塞侧脑含水量明显增加 $(83.03 \pm 0.6110\%)$, 而 PGE₁ 3 个剂量组脑含水量均低于模型组 [$(79.93 \pm 0.6950)\%$; $(79.67 \pm 1.1244)\%$; $(80.26 \pm 1.6325)\%$], 两者相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。④缺血再灌注模型组脑组织病理形态学检查可见: 大量神经细胞固缩坏死, 重度脑水肿, 部分可见软化灶形成, 而 PGE₁ 3 个剂量组脑水肿及神经细胞坏死程度均明显减轻, 两者相比有明显差异。结论 PGE₁ 能减轻脑缺血再灌注所致的组织损伤, 发挥保护作用。

关键词: 前列腺素 E₁; 缺血再灌注脑损伤; 神经症状; 脑梗塞体积; 脑含水量

中图分类号: R965; R972 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)06-0444-04

Intervient effect of prostaglandin E₁ on cerebral ischemia reperfusion injury in rats

FENG Guo-qing¹, ZHANG He-ming¹, WANG Zhen-ji¹, DAI We-juan², FU Run-fang¹, WONG Shi-ai¹ (1. Department of Pharmacology Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Pharmacology, Jining Medical College, Jining 272145, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the protective effect of prostaglandin E₁ (PGE₁) on cerebral ischemia reperfusion injury.

METHOD 40 male Wistar rats were randomly divided into five groups: sham operation group (sham), cerebral ischemia reperfusion group (model), and three doses of PGE₁ (12, 24, 48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively). Cerebral ischemia reperfusion injury was induced by 1 hour of middle cerebral artery occlusion followed by 24 hours of reperfusion. PGE₁ and dissolvent were given 5 minutes before artery occlusion and continued for 2 hours. The brains were assayed for infarct volume, water content and pathological changes. **RESULTS**

① Typical neurological symptoms were seen in the model but significantly reduced by three doses of PGE₁ ($P < 0.05$); ② The percentage of infarct volume in total forebrain for 24 and 48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of PGE₁ were $(10.25 \pm 2.77)\%$ and $(12.90 \pm 2.58)\%$ respectively, compared with $(28.40 \pm 1.83)\%$ in model group ($P < 0.05$); ③ Cerebral water contents for 12, 24, 48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of PGE₁ were $(79.93 \pm 0.70)\%$, $(79.61 \pm 1.12)\%$ and $80.26 \pm 1.63\%$ respectively, compared with $(80.03 \pm 0.61)\%$ in model group ($P < 0.05$). ④ There were wide-ranging cerebral edema, neuronal cells necrosis and partial formation of malactic focal in model group. These changes were significantly abated by all three doses of PGE₁. **CONCLUSION** PGE₁ can reduce cerebral ischemia reperfusion injury.

KEY WORDS: prostaglandin E₁; cerebral ischemia reperfusion injury; neurological symptom; cerebral infarct volume; cerebral water content

基金项目: 山东省科技厅自然科学基金项目, 项目号: 013130114

作者简介: 冯国清 (1957), 女, 副教授, 主要从事心血管生化药理研究及教学 0371-5138689

脑血管疾病的发病率占各种疾病的前三位,其中以缺血性脑血管病居多,并有逐渐上升和年轻化的趋势,随着药物溶栓及介入融栓疗法的应用,可使缺血的脑血管再通,对其营养的脑细胞进行再灌注。这些治疗方法,一方面挽救了大批濒临死亡的脑细胞,另一方面却出现了不容忽视的脑细胞再灌注损伤,因此,我们在以往对前列腺素 E_1 的系列研究基础上^[1~4]观察了 PGE_1 对缺血再灌注脑损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Olympus 显微镜(日本);前列腺素 E_1 粉针剂(沈阳市生物化学制药厂,批号 990301,规格 100 μ g/支);TTC 化学纯,批号 911205。雄性 Wistar 大鼠,体重 320~370g(山东医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:970101)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药方法 将体重 320~370g Wistar 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌模型组、 PGE_1 (12, 24, 48 μ g $\cdot$ kg⁻¹)组,共 5 组,每组 8~9 只。药物及溶剂于缺血前 5 min 经阴茎静脉开始滴注,持续 2h。

1.2.2 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立 参照 Longa 方法复制大鼠局灶性脑缺血再灌注模型^[5]:大鼠用水合氯醛(10%, 350mg $\cdot$ kg⁻¹)麻醉后,仰卧固定于大鼠手术板上,颈部左侧切口,无影灯下在左侧肩胛舌骨和胸锁乳突肌形成的三角处分离颈总动脉(CCA)及其分支颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),电凝 ECA 的分支,结扎游离 ECA 主干,分离 ECA 主干至翼腭动脉(PPA)并结扎,夹闭 CCA 及 ICA,在 ECA 残端剪一小口,将直径 0.20~0.26mm 的尼龙线自 ECA 经 CCA 分叉处插入 ICA,松开 ICA 继续将尼龙线推进入颅内段,当感到明显阻力,尼龙线插入长度约为 18~20mm 时,即可阻断大脑中动脉(MCAO)。再灌注时将尼龙线抽至 ECA 的残端。假手术对照组尼龙线插入深度为 1~2mm,不阻塞 MCA,余皆相同。

1.2.3 神经症状评分 按文献^[6]稍加改进,缺血 60min 再灌 24h 对每只动物进行评分,具体评分标准如下:(1)右肩内旋,右前肢内收,根据程度不同可分为 0~4 分;(2)将动物置平滑板面上,分别推右肩向对侧移动,检查抵抗推动阻力。正常大鼠双侧阻力对称,若左肩向右侧移动时发现阻力下降者,据下降的轻重评为 0~3 分。(3)将动物两前肢置金属网上,观察两前肢的肌张力。正常大鼠两前肢肌张力对称,发生右前肢肌张力下降者,据下降的轻重分 0~3 分。根据以上标准评分,满分 10 分。分数越高,说明动物的神经损伤越严重。

1.2.4 脑梗死体积的测定^[7] 脑缺血 60min 再灌 24h 后,断头取脑,剔除嗅脑、低位脑干及小脑,冰箱冷冻 5~10min,将脑沿冠状面切四刀,切成 5 片,第一刀约在脑前极与视交叉连线的中点处;第二刀为视交叉部位;第三刀在漏斗柄部位;第四刀漏斗柄与后叶尾极之间。然后迅速将脑片置 5mL 含有 4% TTC 及 1mol $\cdot$ L⁻¹ K₂HPO₄ 0.1mL 的溶液中,避光 37℃温孵 30min,其间每隔 7~8min 翻动一次,经染色后,正

常脑组织呈玫瑰红色,脑梗死区呈白色。将脑片置 10%的甲醛中固定。称取脑片的总重量,再用手术刀剔下梗死区称重,计算梗死区占全脑的百分比。

1.2.5 脑含水量的测定(干湿法)^[8] MCAO 60min 再灌注 24h 处死动物,分离前脑,取阻断侧大脑半球脑组织立即称重,置 120℃的烤箱中烘烤 24h 称干重。根据公式:脑含水量=(脑湿重-脑干重)/脑湿重 $\times$ 100%,计算脑含水量。

1.2.6 病理学检查 取各实验组各时段大鼠大脑视交叉至漏斗柄冠状切面的脑组织,常规石蜡包埋,做连续切片,切片厚度为 4~5 μ m。取切片的 1 和 5 片,常规 HE 染色,根据^[9]和 Krieg 大脑皮质的分区,光镜下观察各实验组各时段切片,记录大脑皮质 29b 和 29c 区、大脑顶、颞叶皮层、海马 CA1-4 区的病理变化。

1.3 数据处理

应用 SPSS(10.0 版),对数据进行单因素统计处理。多个样本均数间的比较,首先进行方差齐性检验(Test of homogeneity of variances),若方差齐,则进行方差分析(one-way ANOVA),进而进行多重比较(LSD-t 检验或 SNK-q 检验);若方差不齐,采用平方根反正弦变量变换,达到方差齐性要求后再作方差分析;若变量变换后仍达不到方差齐性,则采用多个独立样本的秩和检验。

2 结果

2.1 PGE_1 对缺血再灌注大鼠行为活动的影响

大鼠左侧大脑中动脉阻塞 60min 再灌注 24h 后,各组动物皆出现神经功能缺损症状,主要表现为提尾悬空时,阻断对侧肩部内旋,前肢屈曲内收,肌力下降。单纯缺血再灌模型组尤为显著。 PGE_1 3 个剂量组都能改善大鼠神经功能障碍症状,表现为肌力明显增强,静脉滴注 PGE_1 过程中大鼠血压及心律均无明显变化。有些动物提尾悬空时两前肢近对称地伸向地面,行为接近正常。其行为评分与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 PGE_1 对缺血再灌注大鼠行为活动的影响

Tab 1 The effect of prostaglandin E_1 on the activity of ischemia reperfusion rats

组别	例数 (只)	给药剂量 (μ g $\cdot$ kg ⁻¹)	神经症状评分
缺血再灌组	8	NS	6.250 $\pm$ 1.0351
前列腺素 E_1 组	8	12	5.125 $\pm$ 1.1260 ¹⁾
	8	24	4.375 $\pm$ 0.9161 ¹⁾
	8	48	5.375 $\pm$ 1.977 ¹⁾

注:与缺血再灌注组比较¹⁾ $P<0.05$

Note: ¹⁾ $P<0.05$ vs model

2.2 PGE_1 对脑梗死体积的影响

TTC 染色发现,左侧 MCAO 60min 再灌注 24h 后,各组动物同侧大脑中动脉供血区均出现大小不等的梗塞灶,缺血再灌模型组梗塞体积最大,占全脑的 28.40%,而 PGE_1 两剂量组脑组织梗塞体积显著缩小(与缺血再灌注模型组相比, $P<0.05$)。见表 2。

表 2 PGE₁ 对缺血再灌注大鼠脑组织梗塞体积的影响

Tab 2 The effect of prostaglandin E₁ on infarct volume of ischemia reperfusion rat brain

组别	例数 (只)	给药剂量 (μg·kg ⁻¹)	体积 (%)
缺血再灌注组	8	NS	28.40±1.8269
前列腺素 E ₁ 组	8	24	10.25±2.7709 ²⁾
	8	48	12.92±2.5772 ²⁾

注:与缺血再灌注组比较²⁾ P<0.05

Note:²⁾ P<0.05 vs model

2.3 PGE₁ 对缺血再灌注脑组织含水量的影响

大鼠左侧 MCAO 60 min 再灌注 24h 后,该侧脑含水量明显增加,与假手术对照组比较有显著性差异。应用 PGE₁ 脑组织治疗的各组,鼠脑含水量有所降低,与缺血再灌注模型组相比有显著性差异(P<0.05)。见表 3。

表 3 PGE₁ 对缺血再灌注脑组织梗塞含水量的影响

Tab 3 The effect of prostaglandin E₁ on water of ischemia reperfusion rat brain

组别	例数 (只)	给药剂量 (μg·kg ⁻¹)	脑含水量 (%)
假手术组	8	NS	78.86±0.6532
缺血再灌注组	8	NS	83.03±0.6110 ¹⁾
前列腺素 E ₁ 组	8	12	79.93±0.6950 ²⁾
	8	24	79.67±1.244 ²⁾
	8	48	80.26±1.6325 ²⁾

注:与假手术组比较,¹⁾ P<0.05;与缺血再灌注组比较,²⁾ P<0.05

Note:¹⁾ P<0.05 vs model;²⁾ P<0.05 vs model

2.4 PGE₁ 对缺血再灌注脑组织病理形态学的影响

模型对照组缺血 60 min 再灌注 60 min,切片经 HE 染色后,镜下可见大脑皮层 29b 和 29c 区,大脑顶、颞叶皮层,海马 CA1~4 叶区出现轻度水肿,大量神经细胞呈固缩坏死,表现为细胞体积缩小,染色加深,核固缩、核消失。随着再灌注时间的延长(6,12,24h)上述区域均呈现重度脑水肿,神经细胞固缩坏死更加明显、严重和广泛,部分病例可见软化灶形成,健侧脑组织未见明显异常。不同剂量的 PEG₁ 处理后,脑水肿及神经细胞坏死程度均明显减轻。缺血 60 min 再灌注 1,6,12,24h,大脑皮层 29b、29c 区及顶叶、颞叶、海马 CA1~4 区呈轻微脑水肿,见少量散在或小灶状神经细胞固缩坏死。模型对照组与药物组间有明显差异。

3 讨论

PGE₁ 为二十碳不饱和羟基脂肪酸的衍生物,具有较强的扩张血管、抑制血小板聚集、稳定细胞膜、溶酶体膜,改善微循环,抑制单核巨噬细胞,炎症细胞浸润及免疫复合物和抗体形成等作用^[10,11]。晚近国内外研究发现它对心、肢体、肺、肾、肝等器官缺血再灌注损伤有保护作用^[12-14]。临床应用其治疗卒中,发现患者的肌力、语言能力大部分得到恢复,且治愈后复发率较低,血液流变学指标及血脂明显下降^[15,16],但其治疗机制尚不十分清楚,治疗效果缺乏必要的实验工作支持。据此,本研究采用最接近人类脑卒中的缺血再灌注脑损伤模型,以神经症状缺损程度、脑含水量、脑梗死

体积、病理形态学改变为指标,初步评价了 PGE₁ 对缺血再灌注脑损伤的保护作用。

脑缺血再灌注后可引起严重的脑水肿,根据其病理特点分为细胞源性水肿和血管源性水肿,大鼠大脑中动脉受阻后因缺氧造成能量代谢障碍,细胞膜上的离子泵功能难以发挥作用,细胞内 Na⁺、Ca²⁺ 离子浓度增高,细胞肿胀而形成细胞源性水肿^[17]。血管源性脑水肿的形成是由于血脑屏障受损,通透性增加所致。另外,脑缺血再灌注后由于炎症反应,血管内皮细胞与白细胞的黏附性增强,一方面机械性阻塞微循环通道,影响组织血液供应,另一方面活化的白细胞可释放大量的氧自由基和蛋白水解酶,损害局部的血管导致血管通透性增强,进一步加重脑水肿,导致神经细胞损伤^[18]。本研究结果显示,缺血再灌注损伤组大鼠在缺血 60 min,再灌注 24h 后,脑含水量增加,神经功能缺损症状较为严重,脑片经 TTC 染后出现大面积梗死灶,体积达 28%;病理形态学 HE 染色发现,大量神经细胞固缩坏死、水肿,并有软化灶的形成。应用 PGE₁ 治疗的大鼠,神经缺损症状明显改善,肌力有所恢复,与临床治疗结果相一致^[15,16],PGE₁ 也能减少脑含水量,并使脑梗死体积明显缩小,这与它缩小缺血再灌注心肌、肢体损伤范围,减轻这些组织水肿的结果相符^[19,20],提示 PGE₁ 能减轻缺血再灌注所致的脑组织损伤,发挥其保护作用。

参考文献

[1] 冯国清,刘洁,付润芳,等.前列腺素 E₁ 对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J].河南医科大学学报,1997,32(3):79.

[2] 冯国清,付润芳,刘洁,等.前列素 E₁ 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].河南医学研究,1997,3:216.

[3] 付润芳,冯国清,刘洁,等.前列腺素 E₁、川芎嗪合用对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国药理学通报,1998,14(6):548.

[4] 王振基,冯国清,付润芳等.前列腺素 E₁ 预处理对异丙肾上腺素性心肌损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2000,16(16):648.

[5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989; 20 (1):84.

[6] 张均田.现代药理实验方法学(下册)[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1241.

[7] Lundy EF, Solik BS, Frank RS, et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils [J]. J Pharmacol Methods, 1986, 16: 201.

[8] Young W, Rappaport ZH, Chal it DJ, et al. Regional brain sodium, potassium and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia [J]. Stroke, 1987, 18: 751.

[9] 王平宇.大白鼠中枢神经系统解剖学基础[M].北京:人民卫生出版社,1986:153.

[10] Ney P, Braun M, Szymanski C, et al. Antiplatelet, antineutrophil and vasodilating properties of 13, 14-Dihydro PGE₁-an in vivo metabolite of PGE₁ in man [J]. Endocrinology, 2004; 142 (12): 446-451.

1994, 4: 77.

- [11] Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, *et al.* Prostaglandin E₁ protects against ischemia reperfusion. Injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells[J]. Transplantation, 1997, 15: 64 (11): 1514.
- [12] Bengisun J, Koksog C, Bengisun JS, *et al.* Ischemia and reperfusion injury: Prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia[J]. Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids, 1997, 56 (2): 117.
- [13] Gupta PC, Matsushita M, Oda K, *et al.* Attenuation of renal ischemia reperfusion injury in rats by allopurinol and prostaglandin E₁[J]. Eur Surg Res, 1998;3 (2): 102.
- [14] Hossain MA, Hamamoto I, Wakabayashi H, *et al.* Experimental study of effect of intraportal prostaglandin E₁ on hepatic blood flow during reperfusion after ischemia and hepatectomy[J]. Br J Surg 1999, 86(6): 776.
- [15] 李连,王建明.前列腺素 E₁ 治疗急性脑梗塞的疗效观察[J]. 脑与神经疾病杂志, 2000, 8(1): 34.
- [16] 郑泽斌.前列腺素 E₁ 治疗脑梗塞 55 例临床观察[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(2): 193.
- [17] Menxies SA, Betx AL, Hoff BT, *et al.* Contribution of ions and albumin to the formation and resolution of ischemia brain edema[J]. J Neurosurg, 1993, 78: 257.
- [18] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils[J]. N Engl J Med, 1989, 320: 365.
- [19] 王凌燕,吴金义,孙晓莉,等.前列腺素 E₁ 对心肌缺血一再灌注损伤的保护作用[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(2): 98.
- [20] 董淑云,张连元,张立伟,等.脂质携载前列腺素 E₁ 对大鼠肢体缺血一再灌注损伤有保护作用[J]. 中国药理学通报, 1996, 12(6): 506.

收稿日期: 2003-04-21