

硝苯地平预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

李加善 杨德兵 彭志锋

摘要 目的:探讨硝苯地平对脑缺血/再灌注(I/R)大鼠大脑的保护作用。方法:将30只雄性Wistar大鼠随机分为假手术(sham)组、I/R组和硝苯地平+I/R组,每组10只大鼠。I/R组大鼠阻断左颈总动脉1h,再灌注24h;硝苯地平+I/R组于手术前2h通过导管口服给药硝苯地平($10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),手术方法同I/R组。根据2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法计算各组大鼠脑梗死体积,通过苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠缺血脑组织病理学改变,通过ELISA分析各组大鼠脑组织丙二醛(MDA)、总谷胱甘肽(tGSH)、环氧化酶1(COX-1)、环氧化酶2(COX-2)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。结果:与Sham组梗死体积(0)相比,IR组大鼠梗死体积[(35.3 ± 4.1)%]增加($P<0.05$);与IR组相比,硝苯地平组大鼠梗死体积[(23.6 ± 3.0)%]降低($P<0.05$);与Sham组相比,I/R组大鼠MDA[(15.0 ± 1.6) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$]和COX-2水平[(27.4 ± 2.9) $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$]增高,COX-1[(3.1 ± 0.4) $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$]、tGSH[(2.1 ± 0.2) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$]和SOD水平[(21.0 ± 2.3) $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$]降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与I/R组相比,硝苯地平组大鼠MDA[(5.7 ± 0.6) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$]和COX-2水平[(5.0 ± 0.6) $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$]降低,COX-1[(9.7 ± 0.9) $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$]、tGSH[(5.6 ± 0.6) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$]和SOD水平[(42.3 ± 4.6) $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$]增高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:硝苯地平对脑I/R损伤具有神经保护作用;这种作用可能与提高脑组织抗氧化能力,抑制炎症细胞因子过度分泌有关。

关键词 硝苯地平;缺血/再灌注;大鼠

中图分类号 R724.1 文献标志码 A 文章编号 1006-0588(2023)04-0247-04

Effect of Nifedipine on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

LI Jiashan, YANG Debing, PENG Zhifeng

Shanxi Datong University School of Medicine

Abstract Objective: To investigate the protective effect of nifedipine on cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in rats. Methods: Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: Sham group, I/R group, and nifedipine+I/R group, with 10 rats in each group. In the I/R group, the left common carotid artery was occluded for 1 hour to induce transient cerebral ischemia and reperused for 24 hours; Nifedipine + I/R group was given nifedipine orally through a catheter ($10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Then the infarct volume of rats in each group were calculated according to 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, the histopathology characteristics of rats in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the contents of Malondialdehyde (MDA), total glutathione (tGSH), cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2) and superoxide dismutase (SOD) in brain tissue of rats in each group were analyzed by ELISA. Results: Compared with the Sham group, the infarct volume of the IR group increased ($P<0.05$); Compared with the IR group, the infarction volume of rats in the nifedipine group decreased ($P<0.05$). Compared with the Sham group, the levels of MDA and COX-2 in the I/R group increased, while the levels of COX-1, tGSH, and SOD decreased (all $P<0.05$); Compared with the I/R group, the levels of MDA and COX-2 in the nifedipine group decreased, and the levels of COX-1, tGSH, and SOD increased (all $P<0.05$). Conclusion: Nifedipine has a protective effect on cerebral I/R injury. This effect may be related to improving the antioxidant capacity of brain tissue and inhibiting the excessive secretion of inflammatory cytokines.

Key words nifedipine; ischemia/reperfusion; rats

基金项目:山西省基础研究项目(202303021211326)

作者单位:山西大同大学医学院(山西大同037009)

作者简介:李加善,男,本科,实验师,研究方向:脑缺血的神经保护;通信作者:彭志锋,男,博士,副教授,研究方向:脑缺血的神经保护;

E-mail: pzf181@126.com。

脑缺血是世界范围内导致死亡的主要原因之一。脑缺血损伤临床治疗原则之一是尽早恢复血液再灌注。然而,再灌注本身可能导致脑损伤、脑水肿、脑出血和神经元死亡,这种现象被称为缺血/再灌注(Ischemia-reperfusion, I/R)损伤。氧化应激与炎症细胞因子过量产生与 I/R 密切相关^[1]。以往研究证实,不同中医药对脑 I/R 损伤具有神经保护作用^[2]。但临床常用西药的保护作用报道较少。有研究表明,二氢吡啶类钙通道阻滞剂硝苯地平对缺氧和 I/R 时细胞损伤具有保护作用^[3]。硝苯地平可抑制脂质过氧增加,并表现出抗氧化活性和抗凋亡性质^[4]。本研究通过测量 I/R 损伤大鼠脑梗死体积,并进行组织病理学检查,测定氧化应激指标、炎症和抗氧化指标,如丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、总谷胱甘肽(total glutathione, tGSH)、环氧化酶 1、2(Cyclooxygenase 1,2; COX-1 和 COX-2)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)水平。来探讨硝苯地平抑制脑 I/R 损伤的作用机制。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠(240~260 g),购于北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证号:SCXK(京)2019-0011)。大鼠随机分为 3 组:假手术(Sham 组)、I/R 组和硝苯地平+I/R 组,每组 10 只大鼠。

1.2 实验试剂

硝苯地平控释片(拜耳医药保健有限公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC)和苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染料(美国 Sigma 公司);ELISA 试剂盒(南京博研生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 I/R 模型制备 腹腔注射戊巴比妥钠($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠。然后在颈部腹面作中线切口显露右侧颈总动脉,用钝性解剖法分离迷走神经附近邻近组织的肌肉,分离颈动脉分叉,仔细分离颈外动脉、颈内动脉、枕动脉和翼腭动脉。将细丝经颈外动脉插入颈内动脉阻断大脑中动脉(Middle cerebral artery occlusion, MCAO),阻断 60 min 后牵拉单丝诱导再灌注,在再灌 24 h 后进行

相关检测^[5]。模型成功标志是手术后出现手术侧肢体瘫痪,站立不稳。Sham 组除不插入细丝外,其余手术均相同。硝苯地平组在手术前 2 h 通过导管口服给药($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

1.3.2 TTC 染色 再灌注 24 h 后,大鼠在深麻醉后快速采集脑缺血半影区(正常脑组织和缺血病灶之间有一形态和结构过渡区,该区着色和细胞形态结构界于病灶和正常脑组织之间,即缺血半影区),冠状面切片,5 μm 厚。切片在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 TTC 染液中培养 30 min,非梗死区染为红色,梗死区呈灰白色。梗死体积=(对侧半球体积-非梗死同侧半球体积)/对侧半球体积 $\times 100\%$ 。

1.3.3 组织病理学检查 再灌注 24 h 后,各组大鼠脑缺血半影区用酒精(70%、80%、90%和 100%)处理样本,使组织脱水,然后在 10% 甲醛溶液中固定,组织通过二甲苯并包埋在石蜡中,取石蜡切片 5 μm ,HE 染色。

1.3.4 ELISA 分析 再灌注 24 h 后,各组大鼠脑缺血半影区在 10% 冰冷磷酸盐缓冲液中匀浆,然后离心($\times 4000 \text{ rpm}$),取上清液进行相关检测。按照 ELISA 试剂盒规定的步骤检测缺血半影区中 MDA、tGSH、COX-1、COX-2 和 SOD 水平。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS22.0 统计软件分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析及 Tukey's 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硝苯地平对脑梗死体积影响

与 Sham 组相比,I/R 组大鼠梗死体积增加($t = 58.673, P < 0.001$);与 IR 组相比,硝苯地平组大鼠梗死体积降低($t = 13.328, P < 0.001$)。见图 1、表 1。

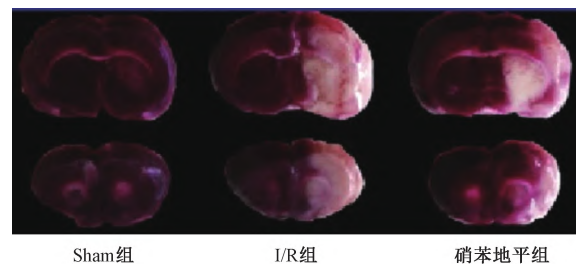


图 1 各组大鼠典型 TTC 染色

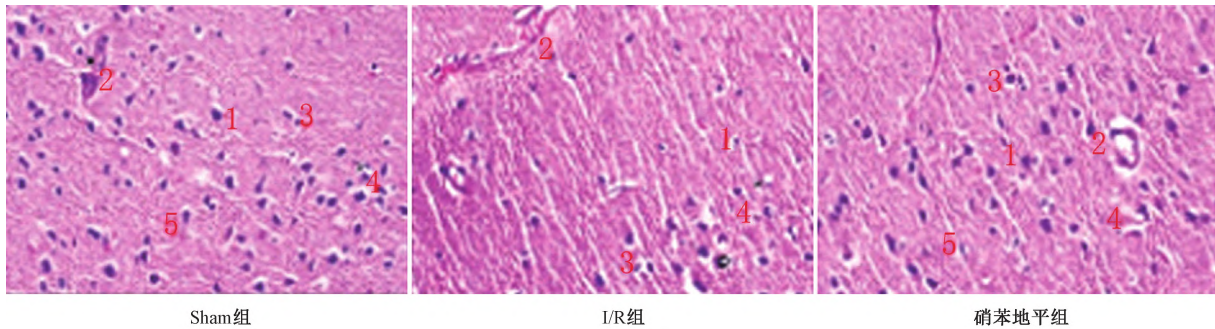
Fig.1 Typical TTC staining of rats in each group

表1 各组大鼠脑梗死体积比较($\bar{x}\pm s$)Tab.1 Comparison of cerebral infarction volume in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	梗死体积/%
Sham组	5	0
I/R组	5	35.3±4.1
硝苯地平组	5	23.6±3.0

2.2 硝苯地平对组织病理学影响

Sham组大鼠神经元、胶质细胞、血管结构形态正常。I/R组大鼠神经元胞周水肿,星形胶质细胞形态异常变性,提示神经元/胶质细胞凋亡,凋亡小体和血管扩张充血。硝苯地平组血管充血减少,细胞周水肿消失,星形胶质细胞未变性。见图2。



1:神经元;2:血管;3:星形胶质细胞;4:少突胶质细胞;5:小胶质细胞

图2 各组大鼠病理学表现(HE染色,200×)

Fig.2 Typical HE staining of rats in each group (200×)

2.3 硝苯地平对氧化应激、炎症和抗氧化指标影响

与Sham组相比,I/R组大鼠MDA($t=17.872$, $P<0.001$)和COX-2($t=23.421$, $P<0.001$)水平增高,COX-1($t=16.327$, $P<0.001$)、tGSH($t=14.983$, $P<0.001$)和SOD($t=12.382$, $P<0.001$)水

平降低;与I/R组相比,硝苯地平组大鼠MDA($t=17.436$, $P<0.001$)和COX-2($t=21.279$, $P<0.001$)水平降低,COX-1($t=18.037$, $P<0.001$)、tGSH($t=13.362$, $P<0.001$)和SOD($t=11.873$, $P<0.001$)水平增高。见表2。

表2 各组大鼠氧化应激、炎症和抗氧化指标比较($\bar{x}\pm s$)Tab.2 Comparison of oxidative stress, inflammation, and antioxidant indicators in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	COX-1/(μ·mg ⁻¹)	COX-2/(μ·mg ⁻¹)	tGSH/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(μ·mg ⁻¹)
Sham组	5	4.9±0.5	10.5±1.4	4.3±0.1	6.0±0.6	44.6±5.1
I/R组	5	15.0±1.6	3.1±0.4	27.4±2.9	2.1±0.2	21.0±2.3
硝苯地平组	5	5.7±0.6	9.7±0.9	5.0±0.6	5.6±0.6	42.3±4.6

3 讨论

I/R损伤是多种病理生理机制参与的复杂反应,主要涉及氧化应激、炎症反应、凋亡、自噬,以及兴奋性氨基酸毒性作用等^[6]。减少脑梗死体积、减轻神经功能缺损症状,改善患者生存质量等是临床需要解决的难题。本研究旨在探讨硝苯地平对大鼠脑I/R损伤的神经保护作用,对于改善脑梗死患者临床症状、减轻神经缺损程度、提高生活质量具有重要意义。

本研究发现,硝苯地平显著减少I/R大鼠脑梗死体积。此前已有研究表明,硝苯地平通过抑制线粒体细胞色素c释放、caspase-9激活以及随后caspase-3激活来抑制缺血后细胞凋亡^[7]。根据组织病理学分析,硝苯地平预处理大鼠未见神经元胞周水肿、星形胶质细胞变性、血管结构扩张充血。研究表明细胞损伤与细胞内Ca²⁺升高有关^[8],而I/R导致组织中细胞内Ca²⁺增加^[9-10]。细胞内Ca²⁺增加激活依赖于Ca²⁺胞浆蛋白酶。胞质蛋白酶将细胞内次黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤

氧化酶,是活性氧的主要来源。活性氧产生增加,氧化细胞膜脂质,导致MDA等有害产物产生^[11]。本研究结果显示,硝苯地平组大鼠大脑组织中MDA水平降低,表明硝苯地平可能抑制了脑组织中活性氧增加,保护脑组织免受氧化损伤。COX-2水平升高与组织中氧化应激和炎症有关^[12]。缺血期间细胞内Ca²⁺增加激活磷脂酶A2是I/R损伤重要机制之一^[13]。磷脂酶A2增加膜磷脂产生花生四烯酸,然后COX-2激活并释放花生四烯酸中的前列腺素和活性氧^[14]。本研究结果显示,大鼠I/R损伤后大脑皮质组织中COX-2水平升高,经硝苯地平预处理后,COX-2水平降低。硝苯地平抑制I/R后COX-2活性升高可能是由于它阻断了缺血时Ca²⁺进入细胞通路。但在本研究中,硝苯地平组大鼠COX-1水平升高,而COX-2水平降低,对于COX-1与COX-2在I/R损伤中的作用,以及通过什么途径起不同的作用,均有待进一步研究。此外,过度产生活性氧被谷胱甘肽和其他内源性抗氧化剂中和,特别是包括SOD和tGSH等抗氧化酶在内的人体防御系统,在神经元细胞抵抗活性氧诱导的细胞死亡中起着关键作用^[14]。谷胱甘肽作为酶反应的辅助因子,可储存半胱氨酸,调节包括DNA和蛋白质合成、细胞因子产生、免疫反应和蛋白质谷胱甘肽化^[15]。硝苯地平可能通过Ca²⁺通道抑制I/R后组织中活性氧增加,从而降低tGSH消耗。

本研究仍存在不足之处。首先,成模样本量较小;其次,未对不同时间点(再灌注7d内)各指标变化趋势进行观察,将在后续研究中展开。总之,本研究结果表明,硝苯地平对大鼠脑I/R损伤有一定的保护作用,这种作用可能与提高脑组织抗氧化能力,抑制炎症细胞因子过度分泌有关。

参考文献

- [1] 杨帆,白抚生,尤林,等.依达拉奉对脑缺血再灌注损伤患者神经功能、氧化应激和炎症反应的影响[J].疑难病杂志,2020,19(9):880-883.
- [2] 俞璐,张秋娟.中医药对脑缺血再灌注损伤神经保护作用的

实验研究进展[J].辽宁中医杂志,2021,48(3):213-217.

[3] 凌震,王远航,蔡文锋,等.钙拮抗剂阈下剂量对大鼠心肌缺血再灌注损伤作用的研究[J].汕头大学医学院学报,2016,29(3):129-131.

[4] 柳满,陈润济,蔡文锋,等.硝苯地平 and 地尔硫草调控环氧合酶-2的表达和活性拮抗L型钙通道敲除H9c2细胞缺氧/复氧损伤[J].汕头大学医学院学报,2019,32(2):70-75.

[5] 彭志锋,张继红,杨德兵.早期跑步运动对大鼠脑缺血/再灌注损伤后神经行为与神经元凋亡的影响[J].中国应用生理学杂志,2020,36(1):39-42.

[6] 王璐,张士滨,华志鹏,等.脑缺血再灌注损伤发病机制研究进展[J].中风与神经疾病杂志,2023,40(2):168-170.

[7] 林泓,蔡文锋,王远航,等.钙拮抗剂通过非钙通道依赖机制抗缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡[J].汕头大学医学院学报,2017,30(3):133-136.

[8] WANG C, JIA Q, JING C, et al. Calcium sensing receptor contribute to early brain injury through the CaMKII/NLRP3 pathway after subarachnoid hemorrhage in mice - sciencedirect [J]. Biochem Bioph Res Co, 2020,530(4):651-657.

[9] BEHERA R, SHARMA V, GREWAL AK, et al. Mechanistic correlation between mitochondrial permeability transition pores and mitochondrial ATP dependent potassium channels in ischemia reperfusion [J]. Biomed Pharmacother, 2023,162:114599.

[10] HURST S, GONNOT F, DIA M, et al. Phosphorylation of cyclophilin D at serine 191 regulates mitochondrial permeability transition pore opening and cell death after ischemia-reperfusion [J]. Cell Death Disease, 2020,11(8):661.

[11] 朱文丽,沈晓燕,薛兴亚,等.活性氧簇介导的氧化应激及细胞焦亡在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用[J].医学分子生物学杂志,2022,19(6):490-495.

[12] 吴亭桦,舒清明,徐葳,等.大鼠脑损伤后COX-2、GluR2、PAFR表达变化及其与脑损伤的关系[J].武警后勤学院学报(医学版),2017,26(12):1022-1027.

[13] EL-MARASY SA, ABDEL-RAHMAN RF, ABD-ELSALAM RM. Neuroprotective effect of vildagliptin against cerebral ischemia in rats [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2018,391(10):1135-1145.

[14] 左全庭,金璐.中西医结合治疗对急性脑梗死患者血液流变学与超氧化物歧化酶及神经功能的影响[J].医疗装备,2020,33(8):71-72.

[15] RAE CD, WILLIAMS SR. Glutathione in the human brain: review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy [J]. Analytical Biochemistry, 2017,529:127-143.

(收稿日期:2023-04-20;修回日期:2023-05-08)