·论著·

海风藤新木脂素成分对缺血鼠脑细胞间粘附分子 -1 及其 mRNA 表达的影响

王伟　王雪松　阮旭中

【摘要】 **目的**　探讨海风藤新木脂素类成分对缺血鼠脑细胞间粘附分子-1(ICAM-1)及其 mRNA 表达的影响。**方法**　建立大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型,应用 RT-PCR 及免疫组织化学的方法,观察海风藤新木脂素复合物以及银杏内脂对缺血鼠脑 ICAM-1 及其 mRNA 表达的影响。**结果**　免疫组织化学染色显示 ICAM-1 在假手术组鼠脑呈低表达;缺血 90 min 表达上调;缺血 90 min 再灌 24 h 后 ICAM-1 表达较前差异有非常显著性($P<0.01$);而海风藤新木脂素类成分以及银杏内脂治疗组于相同时限鼠脑 ICAM-1 表达与单纯缺血、缺血再灌注组比较显著下调($P<0.01$)。假手术组鼠脑 ICAM-1 mRNA 呈低表达;缺血 90 min/再灌 24 h 其表达水平较对照组显著上调($P<0.01$);药物治疗组于相同时限 ICAM-1 mRNA 的表达显著下调($P<0.01$)。**结论**　海风藤新木脂素类成分以及海风藤酮能明显降低缺血脑组织 ICAM-1 及其 mRNA 的表达,从而减轻脑缺血后炎性病理损害,达到脑保护作用。

【关键词】 海风藤新木脂素类成分;　细胞间粘附分子 -1;　脑缺血

The effects of Piper Futokadsura Neoligans on ICAM-1 and ICAM-1 mRNA expression in brain following focal cerebral ischemia in rats

WANG Wei, *WANG Xuesong*, *RUAN Xuzhong*. *Department of Neurology*, *Tongji Hospital*, *Tongji Medical College*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430030, China

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effects of Piper Futokadsura Neoligans on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-1 mRNA expression in brain following focal cerebral ischemia. **Methods**　The rat models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established with the suture method, and ICAM-1 protein and ICAM-1 mRNA were measured in rat brain in the ischemic group and that in the treatment groups treated with Piper Futokadsura Neoligans by using immunohistochemistry and RT-PCR techniques. **Results**　By down-regulating the expression of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA and alleviating inflammation in the cerebral ischemic region, Piper Futokadsura Neoligans exerted a potent protective effect in cerebral ischemia and reperfusion. **Conclusion**　The results suggested that platelet activating factor receptor antagonist Piper Futokadsura Neoligans had a potent effect in alleviating the impairments caused by cerebral ischemia and reperfusion.

【**Key words**】 Piper Futokadsura Neoligans;　ICAM-1;　Cerebral ischemia

缺血再灌注性脑损伤病理过程与局部的急性炎症反应有密切关系。当脑组织缺血时,在化学趋化因子/活化因子作用下白细胞活化,活化的白细胞可与血管内皮细胞粘附,白细胞与内皮细胞的相互作用是由表达在这两种细胞上的粘附分子所介导的,这有利于白细胞穿出血管的内皮层,游出至缺血脑组织中引起脑缺血区的急性炎症反应。而血小板活化因子(Platelet activating factor, PAF)是近年来日益受到重视的一种与花生四烯酸代谢密切相关的内源性活性脂质介质,其对脑缺血继发病理损害,尤其是脂质代谢异常具有明显调控作用。我们采用大鼠线栓法大脑中动脉闭塞及再通模型,观察 PAF 受体拮抗剂海风藤新木脂素类成分(包括海风藤新木脂素复合物及单一成分海风藤酮)对缺血脑组织中细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)及其 mRNA 表达的影响,同时比较研究了海风藤新木脂素类成分与银杏内脂的疗效差异,深入探讨 PAF 受体拮抗剂的脑保护作用机制,为 PAF 受体拮抗剂临床应用提供理论依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 39870260)

作者单位:430030　武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

材料与方法

一、材料

1. 实验动物

Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 220 ~ 280 g(由同济医学院实验动物中心提供),自然喂养,随机分组。

2. 实验分组及给药方法

将 Wistar 大鼠随机分为假手术组、单纯缺血组(缺血组)、缺血再灌注组(再灌注组)、缺血再灌注海风藤新木脂素复合物治疗组(木脂素组)、缺血再灌注海风藤酮治疗组(海风藤酮组)、缺血再灌注银杏内脂治疗组(银杏内脂组),每组动物 6 只。

治疗组于缺血前和缺血后即刻分别经腹腔注射海风藤酮(每公斤体重每次 1 mg)、海风藤新木脂素复合物(每公斤体重每次 1 mg)、银杏内脂(每公斤体重每次 1 mg)各一次。

3. 仪器与试剂

包括免疫组织化学试剂盒(北京中山公司),抗 ICAM-1 抗体(北京中山公司),ICAM-1mRNA 引物(由上海深工公司合成),RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司),海风藤新木脂素复合物(同济医院神经科研究室),海风藤酮(北京医科大学药学院),银杏内脂(德国舒培大药厂),图象分析系统(HPIAS-1000 型高分辨病理图文分析系统、北航医学图象分析管理系统)、显微镜(Olympus U-CMAD-2, Japan)。

二、方法

1. 建立大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型

参照 Longa 等报道的方法[1,2]略加改进,缺血动物清醒后具备同侧 Horner 氏征,提尾时右前肢屈曲内收者方列为研究对象。所有缺血组及治疗组大鼠于缺血 90 min、再灌注 24 h 断头、取脑,置液氮中待用。

2. 标本制备

将已麻醉的大鼠用生理盐水 200 ml 快速左心室灌注冲洗,再用 4% 多聚甲醛(pH7.4、0.01 M PBS 配制)400 ml 灌注固定,恒定灌注(输液瓶高出心脏 1 米)时间 30 ~ 60 min。灌注完毕立即断头取脑,4% 多聚甲醛溶液中固定 2 ~ 3 h,然后浸泡在 20% 蔗糖溶液中过夜,制作冰冻切片用。余 42 只大鼠断头取脑,取右侧顶叶皮层约 100 mg 脑组织作 RT-PCR 的标本用。

3. 免疫组织化学染色

免疫组化采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(Strept-Avidin-Biotin-enzyme Complex, SABC)法,山羊抗大鼠 ICAM-1 多克隆抗体工作液浓度为 1:100,具体步骤略。

4. 逆转录多聚酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)测定缺血及再灌注后鼠脑组织中 ICAM-1 mRNA 的表达

100 mg 脑组织 + Trizol 1 ml 彻底匀浆,随后加入氯仿和冰异丙醇,将提取出的总 RNA 用紫外分光光度仪进行浓度测定后,用灭活 RNAase 的 DEPC 水稀释为 1μg/μl, -70℃保存。取样品 RNA 2 ~ 4μg, 5 × 逆转录酶缓冲液 4μl,逆转录酶 2μ,核酸酶抑制剂(Rnasin) 20μ, dNTPs 2μl, OligdT 181μl, 加去离子水至 25μl,72℃水浴 5min,37℃水浴 1 h,95℃灭活逆转录酶 5 ~ 10 min,立即置冰上冷却 -20℃保存。ICAM-1 引物工作液浓度为 10 pmol/l,引物序列[2]上游引物(P1):5′-ACAGACACTAGAGGAGTGAGCAGG-3′,下游引物(P2):5′-GTGAGCGTCCATATTTAGGCATGG-3′,此对引物扩增出一条 327 bp 的 ICAM-1 cDNA 片段。内参照三磷酸甘油醛(GAPDH)引物序列[3]:上游 5′-GAAGGGCTCATGACCACAG-3′,下游 5′-GGATGCAGGGATGTTC-3′,此对引物扩增出一条 166 bp 的 GAPDH cDNA 片段。PCR 反应条件为:95℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,72℃后延伸 10 min。

5. 统计学分析

采用北航医学图像分析管理系统、HPIAS-1000 型高分辨病理图文分析系统(同济千屏影像工程公司)进行图像分析处理得出平均面密度、吸光度值(MEAN ± SD),组间差异的显著性用方差分析进行检验,两两比较用 Q 检验法。

结 果

一、缺血脑组织中 ICAM-1 的表达(免疫组化 SABC 检测)

ICAM-1 在假手术组鼠脑组织呈低表达(面密度 0.020% ± 0.011%);缺血 90 min 在脑缺血边缘区 ICAM-1 表达上调(面密度 0.076% ± 0.028%);缺血 90 min 再灌注 24 h ICAM-1 表达较前更为明显(面密度为0.142% ± 0.031%),与假手术组比较均有明显差异($P < 0.01$)。治疗组于缺血 90 min、缺血 90 min 再灌 24 h ICAM-1 表达(面密度)分别为:木脂素组为 0.047% ± 0.028%、0.059% ± 0.021%;海风藤酮组为 0.039% ± 0.012%、0.035% ± 0.031%;银杏内脂组为 0.049% ± 0.034%、0.051% ± 0.023%。它们较对照组 ICAM-1 的表达均有显著下调($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 鼠脑缺血再灌后 ICAM-1 的表达(面密度, $\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血 90 min	缺血 90 min 再灌 24 h
假手术组	0.020 ± 0.011	0.023 ± 0.010
对照组	0.076 ± 0.028 *	0.142 ± 0.031 *
海风藤酮组	0.039 ± 0.012 * *	0.035 ± 0.031 * *
复合物组	0.047 ± 0.028 * *	0.049 ± 0.034 * *
银杏内脂组	0.049 ± 0.034 * *	0.051 ± 0.023 * *

注:* 与假手术组比较 $P < 0.01$;* * 与对照比较 $P < 0.01$

二、缺血鼠脑组织 ICAM-1mRNA 表达(RT-PCR 检测)

假手术组鼠脑组织 ICAM-1 mRNA 表达的 RT-PCR 扩增产物电泳扫描平均吸光度值为 10.7 ± 5.1;缺血 90 min ICAM-1 mRNA 表达的平均吸光度值为 39.8 ± 4.9;缺血 90 min 再灌 24 h ICAM-1 mRNA 表达为 51.3 ± 5.8。治疗组于缺血 90 min、再灌 24 h 时的吸光度值在新木脂素组为 25.6 ± 6.5、37.4 ± 3.1;海风藤酮组为 24.7 ± 7.8、36.8 ± 5.8;银杏内脂组为 26.

1 ± 7.2、36.9 ± 4.7。与对照组 ICAM-1 mRNA 表达相比均有显著下调($P < 0.01$),各组间内参照 GAPDH 阳性扩增产物电泳扫描平均吸光度值差异无显著性,表明药物能显著下调 ICAM-1 mRNA 的表达(见图 1, 表 2)。

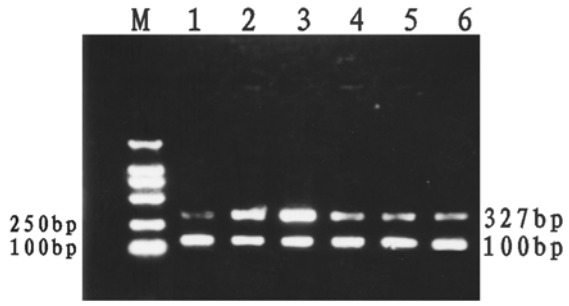

图 1　ICAM- mRNA 的表达

表 2　RT-PCR 检测鼠脑组织 ICAM-1mRNA 表达(吸光度,$\bar{x} \pm s$)

组　别	缺血 90 min	缺血 90 min 再灌 24 h
假手术组	10.7 ± 5.1	10.0 ± 4.8
对照组	39.8 ± 4.9 *	51.3 ± 5.8 *
海风藤酮组	24.7 ± 7.8 * *	36.8 ± 5.8 * *
复合物组	25.6 ± 6.5 * *	37.4 ± 3.1 * *
银杏内脂组	26.1 ± 7.2 * *	36.9 ± 4.7 * *

注:* 与假手术组比较 $P < 0.01$;* * 与对照比较 $P < 0.01$

讨　论

ICAM-1 是 LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) 的配体之一,其广泛分布于造血和非造血细胞,而活化的 T 细胞、单核细胞、EBV 转化的 B 细胞以及建株的 T 细胞和髓系细胞都表达高水平的 ICAM-1。在炎症时,血管内皮细胞的 ICAM-1 表达达到高峰,某些炎症细胞因子如白介素-1(IL-1)、干扰素-r(IFN-r)、肿瘤坏死因子-a(TNF-a)等可刺激血管内皮细胞使 ICAM-1 表达迅速上调。脑缺血时 ICAM-1 及其 mRNA 在脑血管内皮细胞表达上调已在许多缺血再灌注动物模型中证实。在大鼠缺血再灌注模型研究中显示[4,5],血管闭塞后 1 h ICAM-1mRNA 表达增高,血管再通后 10 h 达高峰,ICAM-1mRNA 表达增高持续一周。血管内皮细胞的 ICAM-1 表达于血管再通后 2 h 开始明显增高,46 h 达高峰,增高持续至再通后一周。Shyu 等[6]应用 ELISA 方法测定 54 名缺血性脑血管疾病患者缺血 24 h 内血清中 ICAM-1 水平显著高于正常对照组。应用 ICAM-1 单抗亦能明显减轻缺血再灌注鼠脑组织损伤[7]。表明 ICAM-1 在脑缺血后白细胞介导的脑缺血早期炎症损伤机制中发挥重要作用。本实验结果与以往文献资料一致,脑缺血/再灌注损伤时 ICAM-1 及 ICAM-1 mRNA 表达明显上调,提示 ICAM-1 在脑缺血早期介导白细胞与血管内皮细胞的粘附,白细胞游出血管至脑缺血区引起脑组织急性炎症病理损害。

海风藤[Piper Kadsura(choisy)Ohwi]系胡椒科胡椒属植物,主要产于我国福建、台湾、浙江、广东等省区,其茎藤入药始于清代,用以祛风湿、通经络、止痹痛。海风藤化学成分分析发现[8,9,10],其提取物中所含各类木脂体如海风藤酮(kadsurenone)、galgravin、galbelgin、veraguensin 和新木脂素如风藤素 K(dudsurenink)、风藤素 L、风藤素 M 以及巴豆环氧素、细叶青菱藤醌醇等成分皆具有抗血小板活化因子(PAF)的作用,其中海风藤酮的活性最强,能有效抑制由 PAF 所诱导的血小板聚集。动物实验研究表明[11,12],海风藤能显著降低缺血后神经细胞内的钙含量,降低脑组织内兴奋性氨基酸含量和磷脂酶 A_2 活性,增加 SOD 活性,使自由基清除量增加。海风藤对 ADP 引起的血小板聚集也有明显抑制作用[13]。海风藤可直接对抗 PAF 引起的脑血管舒缩功能障碍导致的脑血流量下降,亦可通过抑制 PAF 对磷脂酶 A_2 的活化作用,降低磷脂酶 A_2 活性,减少磷脂代谢产物血栓烷 A_2 的生成、释放,从而达到改善缺血区局部脑血流量的作用,并使梗死区病灶面积缩小,改善神经功能缺损。

本实验结果表明,海风藤新木脂素复合物及单一成分海风藤酮能明显下调鼠脑缺血后 ICAM-1 及其 mRNA 的表达,与传统 PAF 受体拮抗剂银杏内脂相比较无显著差异。海风藤新木脂素类成分下调脑缺血后鼠脑组织 ICAM-1mRNA 及其蛋白的表达的机制可能与海风藤直接拮抗 PAF 的作用有关,通过拮抗 PAF 来抑制 IL-1、TNF 等炎性细胞因子的生成,从而导致 ICAM-1mRNA 及其蛋白表达 的下调。

总之,海风藤新木脂素类成分通过下调 ICAM-1 及其 mRNA 的表达,从而减轻脑缺血后的炎症性病理损害,减轻脑水肿,改善局部脑血液循环,从而发挥脑保护作用。我们认为海风藤新木脂素复合物及单一成分海风藤酮具有脑保护作用。进一步研究开发这一具有中国特色的中药脑保护剂,可为临床脑梗死治疗提供广阔的发展前景。

参　考　文　献

1　Longa E Z, Weinstein P R, Carlsons, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without crainectomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84.

2　Kita Y, Takashi T, Iigo Y, et al. Sequence and expression of rat ICAM-1. Biochim Biophys Acta, 1992, 1131: 108-110.

3　Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, et al. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. Hepatology, 1999, 29: 1760-1767.

4　Wang X, Siren AL, Liu Y, et al. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain endothelial cells in rat ischemic cortex.

Brain Res Mol Brain Res, 1994, 26: 61- 68.
5 Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. Brain Res, 1995, 682: 182- 188.
6 Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke. J Neurol, 1997, 244: 90- 93.
7 Zhang RL, Chopp M, Li Y, et al. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. Neurology, 1994, 44: 1747- 1751.
8 陈泽乃, 俞培忠, 徐佩娟. 海风藤对抗血小板活化因子成分 2, 5-二芳基四呋喃型木脂体的研究. 中国中药杂志, 1993, 5: 292- 294.
9 马迎, 韩桂秋, 刘志坚. 海风藤中新木脂素类 PAF 拮抗活性成分的研究. 药学学报, 1993, 28: 207- 211.
10 陈泽乃, 徐佩娟. 海风藤中巴豆环素的衍生物研究. 药学学报, 1993, 28: 876- 880.
11 何英, 王东武, 邓志宽. 海风藤对犬脑干缺血后细胞内钙含量和超微病理改变影响的研究. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13: 199- 200.
12 李黔宁, 王东武. 海风藤、氟桂嗪和绞股蓝皂甙对脑干缺血保护作用的对比研究. 中国神经精神疾病杂志, 1996, 22: 88- 90.
13 孙绍美, 於兰, 刘佥等. 海风藤及其代用品药理作用的比较研究. 中草药, 1998, 10: 627- 629.

(收稿日期: 2001- 11- 22)
(本文编辑: 郭铁成)

---

iiii致本刊作者一

临投稿前，您还需要做些什么?

稿件投寄前, 请您注意再次对所有材料进行核对, 看信封中是否包括了以下各项:

1. 三份原始打印稿(全文隔行单面打印, 论文文题、中英文摘要、关键词、正文、图表、照片、参考文献、致谢等各项齐全)。
2. 随函附上以 WORD(. doc 文件)方式录有原文的软盘一份。请您在软盘上适当作好标记。
3. 所有图表及照片均应一式三份。
4. 参考文献请顺序编号, 并请一定按本刊要求的格式排列打印。
5. 另纸列出通讯作者姓名、地址、电话和传真号码以及 E - MAIL 地址。
6. 本单位科研部门出具的关于您的文章无一稿多投、数据可信及作者署名无争议等的证明信。
7. 提供两位您认为比较适合于审阅您的稿件的专家的姓名及联系方式(地址、电话和 E - mail 等)。请勿推荐您本单位的人员。
8. 将以上材料装于同一个大信封中寄给本刊编辑部。请勿折叠, 请勿邮寄给个人。

有关稿件撰写及投稿方面的详细要求, 请参阅本刊 2002 年第一期所刊登的稿约。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部