

文章编号: 1007-6611(2007)10-0893-03

阿司匹林预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

杨迁妮, 马静萍 (山西医科大学第一临床医学院神经内科, 太原 030001)

摘要: 目的 观察阿司匹林(aspirin/acetylsalicylic acid, ASA)预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤(I/R)的保护作用,并对其作用机制进行探讨。方法 健康雄性 SD 大鼠,随机分为假手术组、模型+溶酶组、ASA 100 mg/kg 预处理组,以线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,24 h 后进行神经功能评分并断头取脑分别测定脑梗死体积、脑组织匀浆诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性和一氧化氮(NO)含量。结果 与模型+溶酶组相比,ASA 预处理组的脑梗死体积明显减小($P < 0.05$),神经功能缺损评分获不同程度改善($P < 0.05$),脑组织中 iNOS 活性、NO 含量明显下降($P < 0.01$)。结论 ASA 对大鼠脑缺血再灌注损伤有一定保护作用,其作用机制与抑制脑组织中 iNOS 活性,降低 NO 含量有关。

关键词: 再灌注损伤; 阿司匹林; 诱导型一氧化氮合酶; 一氧化氮

中图分类号: R364.12 **文献标识码:** A

Neuroprotective effect of aspirin preconditioning on cerebral ischemia reperfusion injury in Sprague-Dawley rats

YANG Qian-ni, MA Jing-ping (Dept of Neurology, First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: *Objective* To explore neuroprotective mechanism of aspirin preconditioning on cerebral ischemia reperfusion injury in Sprague-Dawley rats. *Methods* Adult male SD rats were randomly divided into the sham-operation group, ischemia control group, aspirin preconditioning group. The middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model was made by the suture method. After 24 h the animals were neurologically assessed on a 5-point scale, and then beheaded. The volume of infarction was measured by TTC staining, and nitric oxide(NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in brain tissue homogenate were measured.

Results Compared with ischemia control group, the volume of infarction significantly reduced in aspirin preconditioning group ($P < 0.05$), the neurological scores improved ($P < 0.05$), and NO levels and iNOS activities significantly decreased ($P < 0.01$).

Conclusion Aspirin preconditioning has neuroprotective effect on cerebral ischemia reperfusion injury, which may be related inhibition of iNOS activity and decrease of NO level.

Key words: reperfusion injury; aspirin; inducible nitric oxide synthase; nitric oxide

阿司匹林预处理是近年来研究的热门话题之一。阿司匹林(aspirin/acetylsalicylic acid, ASA),化学名为邻乙酰氧基苯甲酸,是一种有广泛药理作用及多个作用位点的非类固醇抗炎药,广泛应用于解热、镇痛、抗炎、抗风湿和抗血栓形成治疗。近年来的研究发现,除上述作用外预防性应用 ASA 不仅可以防止血栓形成,预防脑卒中,而且还有直接的脑保护作用^[1]。但国内外学者对 ASA 的脑保护作用机制尚有争议,故本实验对此进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 阿司匹林购于山西医科大学制药厂。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)为上海化学试剂公司产品;一氧化氮(nitric oxide, NO)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 主要仪器 SX721 分光光度计购于山东高密

分析仪器厂;低温高速离心机为上海医用离心机厂提供。JY92-II 超声波细胞粉碎机购于上海新芝生物技术研究所。

1.3 给药方法 ASA 用生理盐水配制成悬浮液,大鼠术前 5 d 灌胃,1 次/d,模型+溶酶组同法给予相同体积的生理盐水。

1.4 动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 36 只(山西医科大学实验动物中心提供),280-300 g,随机分为假手术组、模型+溶酶组、ASA 100 mg/kg 预处理组,每组 12 只,后两组分别给予生理盐水和 ASA 悬浮液灌胃 5 d(1 次/d),以线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。

1.5 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备 大鼠连续灌胃 5 d 后,以线栓法^[2]制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型(缺血 2 h,再灌注 24 h)。10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠后,分离右颈总动脉并剪一小口,将头端烧成光

滑杵状的国产尼龙线(直径 0.205 mm, 长 6 cm)插入, 以颈总动脉分叉处计算进线深度为(18±0.5) mm, 至大脑中动脉起始部以完全阻断血供。再灌注时外拉尼龙线, 即可恢复颈内动脉及大脑中动脉的血液供应。模型成功的标志是大鼠出现右眼 Horner 征; 提尾时左前肢内收屈曲; 爬行时向左侧倾倒或按逆时针方向转圈。假手术组除不插入线栓外, 其他操作步骤同上。

1.6 神经功能评分 参照 Zea Longa 等^[2]的方法在大鼠 MCAO/R 术后清醒时进行 5 分神经功能评分。0 分: 无明显神经功能缺损; 1 分: 不能伸展左侧前肢; 2 分: 行走时向左侧旋转; 3 分: 行走时向左侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。评分为 0 分和 4 分者均被剔除。

1.7 脑梗死体积的测定 术后 24 h 予以 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉, 断头取脑, 迅速置于 -20℃ 冰箱冻存 20 min; 去除嗅球、小脑和低位脑干, 其余部分行冠状位切片, 从额极向后作每 2 mm 切片, 共 5-6 片, 然后迅速将脑片置于 2% TTC 溶液中, 避光, 37℃ 温孵 30 min, 温孵完毕后数码相机照相, 将染色结果输入计算机, 利用图像处理软件 AutoCAD 分别计算出各个脑片缺血侧的总体积和梗死区域的体积, 求出梗死区域占大脑半球总体积的百分比。

1.8 脑组织匀浆 NO 含量、iNOS 活性测定 术后 24 h 予以 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉, 快速断头取脑, 去除低位脑干和嗅束, 用生理盐水冲洗脑表面血液, 滤纸吸干表面水分, 剥除软脑膜, 取右侧大脑半球。以质量(g)/体积(ml)比 1:9 加入 0.9% 的冰生理盐水, 用超声波细胞粉碎机制成匀浆, 低温离心机离心 20 min, 取上清液 0.05 ml 用分光光度法测定活性, 组织蛋白含量用 Folin 酚法^[3]测定。每 mg 组织蛋白含 1 mmol/L NOS 为 1 个活性单位(U)。化学比色法检测 iNOS 活性, 硝酸还原酶法检测 NO 含量, 并按考马斯亮蓝法标定蛋白含量, 所有操作均严格按说明书进行。

1.9 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件包, 所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表明统计学有意义。

2 结果

2.1 ASA 预处理对大鼠脑梗死体积及神经功能的影响 TTC 染色结果可见, 假手术组经 TTC 染色后脑片全红, 模型 + 溶酶组大鼠右侧额、顶叶皮质

及纹状体可见明显的白色梗死灶, 预处理组与模型 + 溶酶组相比梗死体积明显减小($P < 0.05$), 缺血再灌注后模型组大鼠表现出明显神经运动功能障碍, 而预处理组大鼠神经功能缺损评分均获不同程度改善, 肌力明显增加, 与模型 + 溶酶组相比差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组 SD 大鼠脑梗死体积、神经功能评分的变化
Tab 1 Changes of cerebral infarction volume and neurological scores in all groups

组别	n	脑梗死体积(%)	神经功能评分
假手术组	6	0	0
模型 + 溶酶组	6	0.365±0.078*	2.50±1.05*
ASA 预处理组	6	0.236±0.014 [#]	1.23±0.45 [#]

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型 + 溶酶组比较, [#] $P < 0.05$

2.2 ASA 预处理对大鼠脑组织 iNOS 活性、NO 含量的影响 模型 + 溶酶组与假手术组相比, 脑组织中 iNOS 活性、NO 含量明显升高, 差异显著($P < 0.01$)。与模型 + 溶酶组相比, ASA 预处理组 iNOS 活性、NO 含量明显下降, 差异显著($P < 0.01$)。

表 2 各组 SD 大鼠脑组织 iNOS 活性、NO 含量的变化
Tab 2 Changes of iNOS activity and NO level in all groups

组别	n	iNOS(U/mg)	NO(μmol/L)
假手术组	6	0.97±0.20	7.05±0.82
模型 + 溶酶组	6	2.33±0.42*	11.23±0.63*
ASA 预处理组	6	1.35±0.11 [#]	8.16±0.46 [#]

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型 + 溶酶组比较, [#] $P < 0.01$

3 讨论

近年来一氧化氮, 一氧化氮合酶在脑缺血再灌注损伤中的变化及作用引起人们的广泛关注。NO 是一种活性很强的气体分子自由基, 由左旋精氨酸氧化途径产生, 其限速酶是一氧化氮合酶(NOS)。一氧化氮合酶分为神经元型一氧化氮合酶(neuronal NOS, nNOS)、内皮细胞型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)3 种亚型^[4]。强文安等^[5]观察到脑缺血再灌注后 iNOS 活性增强, 特别在海马部位持续性增高, 表明其在中枢神经损伤过程中起着重要作用。Chen 等^[6]利用同源重组技术获得 NOS 基因敲除的小鼠, 研究结果显示, iNOS 基因敲除小鼠在脑缺血再灌注损伤后梗死灶体积减小, 说明 iNOS

在脑缺血后的表达具有神经毒性作用。在本实验中,我们发现大鼠脑缺血再灌注后脑组织中 iNOS 的活性以及 NO 含量明显升高,与假手术组相比差异显著($P < 0.01$),与上述结果相符。在缺血后期高含量的 NO 可通过多条途径产生神经毒性:①通过超氧自由基(O_2^-)发挥细胞毒性作用,引起级联式神经损伤;②作用于含铁蛋白产生毒性作用,使含铁酶失活,从而抑制线粒体呼吸并导致 ATP 生成减少,致使神经元损伤;③扩大 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体介导的神经毒性;④产生炎症反应;⑤诱导细胞凋亡。因此寻求一种能降低脑缺血后脑组织中 iNOS 活性及 NO 含量的脑保护剂已迫在眉睫。

有研究证实,ASA 除抗血栓形成外,还具有直接的神经保护作用。Kwon 等^[7]发现,ASA 可影响脑缺血再灌注后诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达水平,使一氧化氮合成减少。张红梅等^[8]研究结果显示,ASA 治疗组沙土鼠脑组织中的一氧化氮合酶及一氧化氮水平明显下降,与缺血再灌注组相比具有显著性差异($P < 0.01$),表明 ASA 可降低缺血再灌注后脑组织中一氧化氮合酶及一氧化氮水平,从而抑制一氧化氮介导的神经毒性作用,起到脑保护作用。

在本实验中,我们在制作大鼠脑缺血再灌注模型的前 5 d 用 ASA 灌胃,发现 ASA 预处理组的脑梗死体积和神经功能评分均较模型组减少,结果显示 ASA 具有神经保护作用,同时,ASA 预处理组可以降低缺血再灌注后脑组织中 iNOS 活性和 NO 的含量,与模型组相比差异显著($P < 0.01$),从中可以看出 ASA 的神经保护作用可能是通过降低 iNOS 活性,减少 NO 的释放,起到抑制超氧自由基、细胞毒性、减少线粒体损伤、减轻蛋白质的核糖化以及抑制多巴胺大量释放而达到脑保护作用。实验结果提示,脑缺血前 5 d 给 ASA 100 mg/kg 即能达到脑保护作用,减轻缺血性脑损伤。另外 ASA 神经保护作用的机制可能还有抑制兴奋性氨基酸的释放^[9]、减少自由基的生成^[10]、抑制核转录因子(NF- κ B)的激活^[11]、延缓 ATP 的消耗^[12]、提高 Bcl-2/Bax 的比值^[13]、抑制炎症反应^[14]等。

综上所述,ASA 可通过多条途径起到神经保护作用,其中一条较重要的途径可能是抑制 iNOS 的活性、减少 NO 的产生,进而抑制 NO 以多种作用机

制介导的神经毒性作用及其诱导的细胞凋亡减轻缺血性脑损伤。然而有关 ASA 神经保护作用的分子学基础以及量效和时效关系尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Jean WC, Spell man SR, Nussbaum ES, *et al.* Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon[J]. *Neurosurgery*, 1998, 43: 1382 - 1397.
- [2] Zea Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion with out craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84 - 91.
- [3] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin-phenol reagent[J]. *J Biolchem*, 1951, 193: 265 - 275.
- [4] 韩群颖, 顾振, 王鹤鸣, 等. 大鼠局灶性脑缺血后一氧化氮合酶活性与细胞凋亡关系[J]. *南京医科大学学报*, 2002, 22 (2): 135 - 137.
- [5] 强文安, 左萍萍, 刘景生. 大鼠脑缺血再灌注后 NMDA 受体、NO 及 cGMP 含量的变化[J]. *中国医学科学院学报*, 1999, 21 (3): 175 - 178.
- [6] Chen J, Zacharek A, Zhang C, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice[J]. *J Neurosci*, 2005, 25 (9): 2366 - 2375.
- [7] Kwon G, Hill JR, Corbett JA, *et al.* Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RINn5F cell and islets[J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 52(1): 398 - 405.
- [8] 张红梅, 李义召, 袁海鹰, 等. 阿司匹林对沙土鼠全脑缺血再灌注后脑内一氧化氮合酶及一氧化氮的影响[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2004, 4(2): 87 - 90.
- [9] Grilli M, Pizzi M, Memo M, *et al.* Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation[J]. *Science*, 1996, 274(5291): 1383 - 1385.
- [10] 蔡英敏, 薛荣亮, 李伟, 等. 全脑缺血再灌注对大鼠氧自由基和内皮素的影响[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(4): 656 - 657.
- [11] 李金秀, 邓军卫, 张广森. 小鼠脑缺血再灌注早期核因子- κ B 活性的变化[J]. *湖南医科大学学报*, 2003, 28(4): 365 - 370.
- [12] Cristobal J, Cordenas A, Lizasoam I, *et al.* Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. *Stroke*, 2002, 33(1): 261.
- [13] Ouyang YB, Giffard RG. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function[J]. *Cell Calcium*, 2004, 36: 303 - 311.
- [14] Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke[J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62: 127 - 137.

作者简介: 杨迁妮, 女, 1981-06 生, 在读硕士。

[收稿日期: 2007-07-23]