

脑泰方提取物干预大鼠脑缺血后 MMP-9-mRNA 及 PA-mRNA 表达研究*

廖 君¹, 陈 懿¹, 夏 兴¹, 石咏梅¹, 易亚乔¹, 张 薇², 陈 安¹, 葛金文^{1△}

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆万州 404120)

摘要: **目的** 研究大鼠脑缺血后益气活血中药脑泰方提取物(黄芪、川芎、地龙、僵蚕)干预对缺血区脑水肿及 MMP-9-mRNA、PA-mRNA 表达的影响。**方法** 随机将 SD 大鼠分为假手术组、模型组、脑泰方提取物(NTE)低、中、高剂量组(3, 9, 27g/kg)。各组大鼠预处理 ig 给药连续 3d, 每日 1 次, MCAO 模型制备术后 ig 给药 1d。术后 1d 取材检测各组脑组织含水量, RT-PCR 检测 MMP-9-mRNA 及 PA-mRNA 表达。**结果** 实验表明高、中 NTE 组与模型组比较, 脑含水量均有明显降低($P<0.05$)。NTE 高剂量组脑缺血区 MMP-9-mRNA、PA-mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。**结论** 脑泰方提取物干预可减轻脑水肿的发生, 可能是通过降低 MMP-9-mRNA 及 PA-mRNA 的表达, 减少 MMP-9、PA 的生成, 发挥保护急性脑缺血血脑屏障的作用。

关键词: 脑缺血; 脑泰方提取物(NTE); 基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9); 纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA); 血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)04-0005-04

脑缺血, 即脑部动脉因痉挛或栓塞导致该动脉供血区的血流暂时或永久地减少所致。全世界每年因缺血性中风死亡的人数近 1 000 万人, 已成为人类死亡病因最高的“头号杀手”。急性期脑缺血血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)的破坏与 MMP-9 的大量表达有密切的关系, MMP-9 是基质金属蛋白酶(MMPs)家族中的一员, 其通过降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 破坏内皮细胞间的紧密连接, 增加微血管的通透性, 导致脑水肿的发生。近年来, 如何抑制脑缺血后 MMP-9 的表达已成为减少脑缺血损伤的研究热点^[1]。MMP-9 的活化方法是通过纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)启动瀑布式酶联激活反应, PA 活化为 MMP-9 前体^[2]。益气活血中药脑泰方提取物具有治疗脑缺血的良好效果^[3-4]。本实验通过观察脑泰方提取物对 MMP-9-mRNA、PA-mRNA 表达的影响, 探讨益气活血法治疗脑缺血的新机制。

1 材料

1.1 动物

80 只 SD 雄性大鼠, 体重 250~280g。由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(湘)2009-0004, 符合清洁级实验动物标准。

1.2 药物

脑泰方由黄芪、川芎、地龙、僵蚕组成, 经水煎、醇提后制成浸膏粉(由湖南中医学院药学院制剂教研室提取)。临用时以生理盐水调成所需浓度。

1.3 试剂与仪器

TRIzol-invitrogen, 氯仿, 酒精, 异丙醇, DNaseI, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas), centrifuge 5415R-eppendorf, LKA T-25basic 匀浆器。

2 方法

2.1 分组及给药方法

SD 大鼠 80 只, 随机分 5 组, 每组 16 只, 分别

* 基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目基金(NO:11B090); 湖南省自然科学基金(NO:12JJ6076); 湖南省自然科学基金(NO:13JJ3100); 湖南省中医药管理局基金(NO:201240)

收稿日期: 2013-06-30 修回日期: 2013-07-25

作者简介: 廖君(1978~), 女, 湖南邵阳人, 讲师, 博士研究生在读, 从事脑血管病的中医药防治研究。

△通信作者: 葛金文, E-mail: 40831556@qq.com

为高剂量脑泰方组(27 g/kg),中剂量脑泰方组(9 g/kg),低剂量脑泰方组(3 g/kg),假手术组,模型组。药物剂量按人鼠体表面积折算等效比率计量表,计算出大鼠的等效剂量。术前模型组予生理盐水、治疗组分别给予相应药物灌胃 3d,术后灌胃 1d。每组实验动物 16 只,6 只进行脑组织含水量测定,10 只进行 RT-PCR 检测。

2.2 大脑中动脉栓塞法(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型制备(参照 Rupadevi M 建立的方法^[9]改进)

实验大鼠选用 250~280g SD 大鼠,线栓用直径 0.26mm 的鱼线,前端蘸蜡成光滑膨大的球形。动物用 10%水合氯醛(35mg/kg)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和筋膜,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处挂线备用,结扎 CCA 近心端和 ECA。微动脉夹暂时夹闭 ICA,然后在距 CCA 分叉部 4mm 处剪一小口,松动脉夹,迅速将栓线插入到 ICA,用眼科镊轻推栓线,从血管分叉处开始插入深度在 18mm 时,系牢 CCA 远心端的细线,缝合伤口,单笼饲养观察。

2.3 指标检测

2.3.1 脑组织含水百分率

大鼠行 MACO 术后 24h,断头取材,快速取脑,去除大脑皮质表面软脑膜,电子分析天平称脑湿重,将标本置于 100 度红外线干燥箱内 24h,至恒重后称取干重。干湿重比较法测定脑组织含水百分率,公式:脑组织含水量 (%)=(湿重-干重)/湿重*100%。

2.3.2 RT-PCR

提组织总 RNA,将约 100mg 组织加到 1mL TRIZOL 中,用组织匀浆机匀浆(加 TRIZOL 的量可为 1mL/g 组织,样品体积不能超过加 TRIZOL 的 10%);mRNA 逆转录;2X pcr mix:10μL,Template:3μL,Primer F:1μL,Primer R:1μL,ddH₂O:5μL,PCR 程序:94℃:4min,94℃:15sec,56℃:30sec,72℃:30sec,72℃:5min,Cycles:28。

MMP-9 引物设计:

Sense 5' TTCGACGCTGACAAGAAGTG 3'

Antisense 5' AGGGGAGTCCTCGTGCTAGT 3'

引物长度 156 bp 退火温度 60.18~59.99℃

PA 引物设计:

Sense 5' GAGATGCTTCAATGGGGGTA 3'

Antisense 5' TGCTCCATGTGCCTCTGTAG 3'

引物长度 155 bp 退火温度 59.89~60.01℃

2.4 统计方法

采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,实验数据以均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 脑组织含水量检测

与假手术组比较,模型组含水量增多,提示模型成功(*P*<0.05);与模型组比较,脑泰方高、中剂量组脑组织含水量明显减少(*P*<0.05);而 NTE 高剂量组与假手术组的脑含水量无明显差异。见表 1

表 1 各实验组脑组织含水量

组别	n	剂量/(g/kg)	脑组织含水量/%
假手术组	6	—	74.62±0.65 [#]
模型组	6	—	82.80±0.58 [*]
NTE 高剂量组	6	3	75.02±0.55 [#]
NTE 中剂量组	6	9	78.84±0.30 ^{#*}
NTE 低剂量组	6	27	82.59±0.58 [*]

注:与模型组比较:[#]*P*<0.05;与假手术组比较:^{*}*P*<0.05

3.2 RT-PCR 检测各实验组 MMP-9-mRNA 表达

与模型组比较,NTE 高剂量组与假手术组 MMP-9-mRNA 表达明显降低(*P*<0.05)。结果见图 1,图 2。

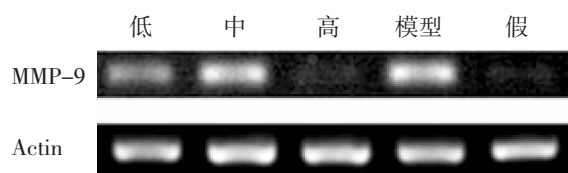


图 1 各实验组 MMP-9-mRNA 检测 RT-PCR 电泳

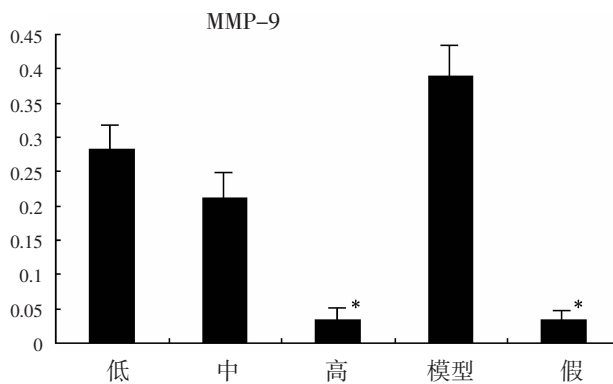


图 2 MMP-9/Actin-mRNA 灰度比值

通过 MMP-9/Actin-mRNA 灰度比值,观察脑缺血后不同治疗组第 24 小时 MMP-9-mRNA 的表达。与模型组比较,NTE 高剂量组和假手术组 MMP-9-mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。

3.3 RT-PCR 检测各实验组 PA-mRNA 表达

与模型组比较,NTE 高剂量组与假手术组 PA-mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。结果见图 3,图 4。

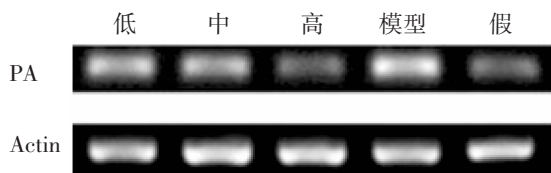


图 3 各实验组 PA-mRNA 检测 RT-PCR 电泳

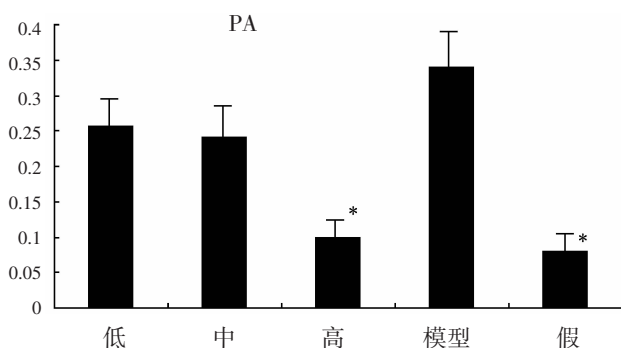


图 4 PA/Actin-mRNA 灰度比值

通过 PA/Actin-mRNA 灰度比值,观察脑缺血后不同治疗组第 24h PA-mRNA 的表达。与模型组比较,NTE 高剂量组和假手术组 PA-mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。

4 讨论

MMP-9 是体内重要细胞外基质降解酶,神经系统内星型胶质细胞、小胶质细胞和神经细胞能合成和分泌 MMP-9,参与炎症和组织损伤等。急性脑缺血时通过降解细胞外基质(extracellularmatrix, ECM),破坏内皮细胞间的紧密连接而增加微血管的通透性,导致脑水肿的发生。生理情况下,MMP-9 主要以无活性的酶原形式存在并分泌到细胞外,属于分泌型,只有被活化才能降解基底膜。MMP-9 的活化过程是将其前区劈开,使半胱氨酸与锌离子分离,从而暴露出锌离子活性中心。其活化方法是通过 PA 启动瀑布式酶联激活反应,PA 活化为 MMP-9 前体。目前研究表明,通过 P38MAPK 途径激活星形胶质细胞分泌,是急性脑缺血 MMP-9 产生的重

要原因^[6]。Cojocarui IM^[7]等发现脑缺血后炎症因子可以刺激 MMP-9 的表达。Ludewig P^[8]等认为血脑屏障及脑水肿损伤与脑缺血后炎症反应有关,而细胞粘附分子相关抗原能抑制 MMP-9 的分泌,保护神经元。因此有学者将 MMP-9 作为脑中风严重程度的判断标准^[9]。如能降低脑缺血后 MMP-9 的表达,减少连接蛋白的损伤,降低 BBB 的通透性,则可起到脑组织保护作用^[10]。

目前研究表明中药复方小续命汤^[11]、华佗再造提取物^[12]均可抑制脑缺血后 MMP-9 的表达,单味中药提取物黄芪甲苷 IV^[13]也能通过抑制 MMP-9 表达,抑制脑水肿的发生。缺血性中风后的气虚血瘀证,表现为肢体不遂,软弱无力,形体肥胖,气短身低,面色萎黄,舌质淡暗或有瘀斑,苔薄厚,脉细弱或沉弱。前期研究表明益气活血,祛风化痰通络中药脑泰方提取物具有良好的脑缺血气虚血瘀证的临床治疗效果^[14]。本实验采用右侧大鼠大脑中动脉栓塞法(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)造模,造模后采用 NTE 干预,实验表明高、中 NTE 组与模型组比较,脑含水量均有明显降低($P<0.05$),推断脑泰方能抑制脑水肿的发生。进一步实验表明 NTE 高剂量组脑缺血区 MMP-9-mRNA、PA-mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。由此,我们推断益气活血中药脑泰方提取物可能是通过降低脑缺血急性期 MMP-9-mRNA、PA-mRNA 的表达,减少 MMP-9、PA 的生成,达到保护 BBB,减轻脑缺血后脑水肿发生的治疗效果。

参考文献

- [1] Candelario-Jalil E, Thompson J, Taheri S. Matrix Metalloproteinases Are Associated With Increased Blood-Brain Barrier Opening in Vascular Cognitive Impairment [J]. Stroke. 2011 May;42(5):1345-50.
- [2] Mira E, Lacalle RA, Buesa JM, et al. Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface [J]. J Cell Sci, 2004, 117: 1847-1857.
- [3] 陈敏, 朱惠斌, 葛金文, 等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠血管新生作用的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(1): 12-15.
- [4] 陈懿, 陈敏, 谭琥, 等. 脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠血浆 TXB2 及 6-Keto-PGF1 α 含量的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(3): 316-317.
- [5] Rupadevi M, Parasuraman S, Raveendran R. Protocol for

- middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method[J]. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011 Jan;2(1):36-9.
- [6] Ralay Ranaivo H, Hodge JN, Choi N, et al. Albumin induces upregulation of matrix metalloproteinase-9 in astrocytes via MAPK and reactive oxygen species-dependent pathways[J]. *J Neuroinflammation*. 2012 Apr;16(9):68.
- [7] Cojocarui IM, Cojocarui M, Sapira V, et al. Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke [J]. *Rom J Intern Med*. 2012 Apr-Jun;50(2):155-8.
- [8] Ludewig P, Sedlacik J, Gelderblom M, et al. CEACAM1 Inhibits MMP-9-Mediated Blood-Brain-Barrier Breakdown in a Mouse Model for Ischemic Stroke [J]. *Circ Res*. 2013 Jun 18.
- [9] Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2011 Jan-Feb;20(1):47-54.
- [10] Zhang Y, Zhang P, Shen X, et al. Early Exercise Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemic Brain Injury via the Regulation of MMP-9 and Occludin in Rats [J]. *Int J Mol Sci*. 2013 May 24;14(6):11096-112.
- [11] Lan R, Xiang J, Wang GH, et al. Xiao-Xu-Ming Decoction Protects against Blood-Brain Barrier Disruption and Neurological Injury Induced by Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:629782.
- [12] Zheng YQ, Yao MJ, Liu JX, et al. Effect and mechanism of huatuo zaizao extractum on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced blood-brain barrier injury in rats[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013 Feb;38(4):585-90.
- [13] Li M, Ma RN, Li LH, et al. post-ischemia/reperfusion correlating the suppression of MMP-9 and AQP4[J]. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jun 5.
- [14] 贺运河, 郝晓元, 葛金文. 脑泰方治疗气虚血瘀证脑梗塞临床研究. *中国中医急症*[J]. 2001, 10(6):319-321.

(编辑:迟越)

The Expression of MMP-9-mRNA and PA-mRNA in Cerebral Ischemia Treated with NTE

LIAO Jun¹, CHEN Yi¹, XIA Xing¹, SHI Yong-mei¹, YI Ya-qiao¹, ZHANG Wei², CHEN An¹, GE Jin-wen¹
 (1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China;
 2. Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou Chongqing 404120, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the expression of MMP-9-mRNA and PA-mRNA when it's intervened by traditional herbal medicines NTE (extract of NaoTaiFang, contain HuangQi, Chuan Xiong, Di Long, Jiang Can) in cerebral ischemia and observe effects of cerebral water content in brain. **Methods** The rats were randomly allotted 5 groups as following: sham operation group, model group, low dose group of NTE (3 g/kg), medial dose group of NTE (9g/kg), large dose group of NTE (27 g/kg). Three days before operation, the corresponding therapy was treated by intragastric administration once every day, After operation, the rats were treated with previous method. To give materials 24 hours after operation, the water content of brain was detected. MMP-9-mRNA and PA-mRNA in necrotic region were measured by RT-PCR with marketable kit. **Results** Compared with Model group, the different dose groups of NTE display a lower water content ($P < 0.05$); Big dose group of NTE show lower level of MMP-9-mRNA and PA-mRNA compared with Model group ($P < 0.05$). **Conclusion** NTE can reduce the expression of MMP-9-mRNA and PA-mRNA in cerebral ischemia, then reduce the MMP-9 and PA to protect the BBB, and alleviate cerebral edema.

KEY WORDS: cerebral ischemia ; NTE; MMP-9(matrix metalloproteinase-9); PA(plasminogen activator); BBB(Blood-brain barrier)