

巴曲酶对晚期糖尿病大鼠脑缺血/再灌注损伤神经细胞形态学及脑组织胰岛素样生长因子-1 表达的影响

吴 波¹, 徐荣慧², 蒋晓宇², 韩会民²

(大庆市第四医院①神经内科, ②内分泌科, 黑龙江 大庆 163712)

【摘要】 目的 观察巴曲酶对糖尿病大鼠脑缺血/再灌注(I/R)损伤脑组织神经元形态学改变及胰岛素样生长因子-1(IGF-1)表达的影响。**方法** 40 只 Wistar 大鼠被随机分为 8 组, 每组 5 只。采用链脲佐菌素 55 g/kg 一次性腹腔注射制备糖尿病模型, 采用四动脉夹闭法制备全脑 I/R 损伤模型。巴曲酶组在四动脉闭塞前腹腔注射巴曲酶 5 Bu/kg, 正常对照组和糖尿病组不给药。分别于制模后 24 h 及 48 h 处死大鼠取脑, 部分脑组织进行苏木素-伊红(HE)染色, 计算神经元细胞坏死率; 部分脑组织用免疫组化染色, 观察 IGF-1 表达。**结果** 非糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组及糖尿病组神经细胞坏死率和 IGF-1 阳性细胞表达率均显著高于正常对照组; 非糖尿病脑 I/R 48 h 神经细胞坏死率和 IGF-1 阳性细胞表达率高于 24 h 组; 糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组神经细胞坏死率显著高于非糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组, IGF-1 阳性细胞表达率分别低于非糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组, 其中以 48 h 组作用显著; 糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 巴曲酶组神经细胞坏死率显著低于糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组, IGF-1 阳性细胞表达率分别高于糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组(P 均 <0.05)。**结论** 糖尿病中晚期脑组织存在一定程度的损伤, 且糖尿病脑梗死后细胞坏死增加, IGF-1 表达明显降低, 脑保护功能下降, 可能与糖尿病脑梗死代偿能力差、病情重、预后差有关, 而巴曲酶对糖尿病脑梗死组织具有显著的保护作用。

【关键词】 大鼠; 糖尿病; 缺血/再灌注损伤; 脑; 神经细胞坏死; 胰岛素样生长因子-1; 巴曲酶

中图分类号: R587.1; R965 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.011

Influence of batroxobin on nerve cell morphology and insulin-like growth factor-1 expression in late diabetic rats with cerebral ischemia/reperfusion injury WU Bo*, XU Rong-hui, JIANG Xiao-yu, HAN Hui-min.

*Neurology Department, NO. 4 Hospital of Daqing, Daqing 163712, Heilongjiang, China

Corresponding author: HAN Hui-min, Email: edwardhan001@126.com

【Abstract】 Objective To observe the cerebral nerve cell morphology and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression in diabetic rats with cerebral ischemia/reperfusion injury (I/R). **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into eight groups, and each group contained 5 rats. Diabetes model was induced by intra-abdominal administration of streptozotocin (STZ, 55 g/kg) once. The rat in total cerebral ischemia group was subjected to ligation of four cerebral arteries. Batroxobin 5 Bu/kg was administrated intra-abdominally before ligation of four cerebral arteries. No drug was administered in the rats in normal control and diabetes control groups. Brains were taken out 24 and 48 hours respectively after the model establishment. Hematoxylin and eosin (HE) staining was applied to observe the rate of brain nerve cell necrosis and immunohistochemical method was used to observe the IGF-1 expression positive nerve cells in each group. **Results** The rate of nerve cell necrosis and the rate of IGF-1 positive nerve cells in non-diabetic cerebral I/R 24- and 48-hour groups, and the diabetes control group were significantly higher than those in the normal control group. The rate of nerve cell necrosis and the rate of IGF-1 positive nerve cells in the non-diabetic cerebral I/R 48-hour group were higher than those in the same 24-hour group. The rates of nerve cell necrosis in diabetic cerebral I/R 24- and 48-hour groups were obviously higher than those in the non-diabetic cerebral I/R 24- and 48-hour groups, while the rates of IGF-1 positive cells in the former two groups were significantly lower than those in the latter two groups respectively. The rates of nerve cell necrosis in diabetic cerebral I/R 24- and 48-hour groups with batroxobin treatment were lower than those in diabetic cerebral I/R 24- and 48-hour groups without batroxobin treatment, while the rates of IGF-1 positive cells in the former two groups were markedly higher than those in the latter two groups respectively (all $P<0.05$). **Conclusion** There is a certain degree of damage in the brain tissues in mid and late stage of diabetes. After diabetic cerebral infarction, the expression of IGF-1 is significantly reduced, and the cerebral protective function declines, that is probably related to the low complementary ability of diabetic cerebral infarction, serious illness and poor prognosis, while batroxobin can obviously decrease the rate of nerve cell necrosis in diabetic cerebral

infarction, therefore it has marked protective effect on diabetic infarct tissues.

【Key words】 rat; diabetes; cerebral ischemia/reperfusion injury; nerve cell necrosis; insulin-like growth factor-1; batroxobin

脑梗死的主要病因是脑动脉硬化,而糖尿病是脑动脉硬化的主要危险因素,糖尿病患者发生脑梗死的几率成倍增加。降纤药物巴曲酶(东菱迪美)是广泛用于临床治疗脑梗死的有效药物,临床试验证实该药疗效突出^[1],副作用小,安全性高^[2]。本实验中通过建立糖尿病大鼠四动脉缺血/再灌注(I/R)损伤模型,观察巴曲酶对神经细胞形态学变化及脑梗死组织胰岛素样生长因子-1(IGF-1)表达的影响,探讨巴曲酶对糖尿病合并症的治疗作用及机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组:雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(210±15)g,按随机数字表法分为 8 组:正常对照组,脑 I/R 24 h 和 48 h 组,糖尿病组,糖尿病+脑 I/R 24 h 和 48 h 组,糖尿病+脑 I/R 24 h 和 48 h+巴曲酶组,每组 5 只,各组间鼠龄、体重差异无统计学意义,有可比性。

1.2 动物模型制备

1.2.1 糖尿病模型制备:用一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)55 mg/kg(0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液, pH 值 4.2)建立糖尿病模型,48 h 后两次血糖≥16.7 mmol/L 为制模成功。高脂饮食,采尾血检测微量血糖,过高者根据血糖给予 3~4 U 优泌林 70/30 皮下注射。饲养 8 个月。

1.2.2 四动脉 I/R 模型制备:采用改良 Pulsinelli 方法^[3],夹闭双侧颈总动脉并造成全脑缺血,以脑电图呈直线、眼球颜色变苍白、角膜反射消失确定缺血成功;10 min 后松夹进行再灌注。巴曲酶组在四动脉闭塞前腹腔注射巴曲酶 5 Bu/kg。正常对照组及糖尿病组不给药。

1.3 检测指标及方法:将大鼠断头取脑,以视交叉为界向后取 0.5 cm 组织块,中性甲醛水溶液固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续病理切片,二甲苯再脱蜡,梯度乙醇脱水,用于指标检测。

1.3.1 脑组织 IGF-1 表达检测:部分脑组织脱水后 H₂O₂ 孵育,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,高压抗原修复,PBS 再冲洗,滴加兔抗鼠多克隆 IGF-1 抗体(1:100),4℃过夜,室温平衡,PBS 浸泡,滴加辣根

过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG,室温孵育;PBS 冲洗,滴加新鲜配制的 3,3'-二氨基联苯胺(DAB),自来水冲洗,苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。光镜下(×200)每张切片尽量取相同部位连续观察 5 个视野,计数阳性细胞表达率。大脑皮层细胞内黄色颗粒细胞为 IGF-1 阳性表达细胞。

1.3.2 神经细胞形态学观察:部分脑组织脱水后用蒸馏水浸泡,苏木素-伊红(HE)染色,乙醇再脱水,二甲苯透明,树脂胶封片。光镜下(×200)连续观察 5 个视野,计算变性坏死细胞率。

1.4 统计学分析:应用 SPSS 10.0 软件处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验, *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经细胞坏死率及 IGF-1 阳性细胞表达率比较(表 1):脑 I/R 24 h 和 48 h 组及糖尿病组神经细胞坏死率和 IGF-1 阳性细胞表达率均显著高于正常对照组,且脑 I/R 48 h 组较 24 h 组进一步升高;糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组神经细胞坏死率显著高于非糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组,IGF-1 阳性细胞表达率分别低于非糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组,且 48 h 组较 24 h 组作用更为显著;糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 巴曲酶组神经细胞坏死率显著低于糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组,IGF-1 阳性细胞表达率高于糖尿病脑 I/R 24 h 和 48 h 组(*P* 均 < 0.05)。

表 1 各组大鼠脑神经细胞坏死率及 IGF-1 阳性细胞表达率比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	神经细胞 坏死率(%)	IGF-1 阳性细胞 表达率(%)
正常对照组	4.66±2.50	1.82±1.68
脑 I/R 24 h 组	27.25±7.07 ^a	37.20±7.30 ^a
脑 I/R 48 h 组	30.24±7.61 ^{ab}	45.02±8.95 ^{ab}
糖尿病组	9.07±3.24 ^a	7.30±3.47 ^a
糖尿病脑 I/R 24 h 组	51.94±9.63 ^b	26.25±6.99 ^b
糖尿病脑 I/R 48 h 组	54.17±11.06 ^{cd}	22.53±6.51 ^{cd}
糖尿病脑 I/R 24 h 巴曲酶组	38.33±13.01 ^d	37.63±11.47 ^d
糖尿病脑 I/R 48 h 巴曲酶组	39.10±12.10 ^e	30.09±7.01 ^e

注:与正常对照组比较,^a*P* < 0.05;与脑 I/R 24 h 组比较,^b*P* < 0.05;与脑 I/R 48 h 组比较,^c*P* < 0.05;与糖尿病脑 I/R 24 h 组比较,^d*P* < 0.05;与糖尿病脑 I/R 48 h 组比较,^e*P* < 0.05

2.2 神经细胞形态学观察:正常对照组细胞膜完

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D200832)

通信作者:韩会民,Email:edWardHan001@126.com

作者简介:吴波(1971-),女(汉族),黑龙江省人,硕士研究生,副主任医师,Email:524261476@qq.com。

整,胞核饱满,核仁清晰。糖尿病组少量皮质细胞质深染,核皱缩。脑 I/R 组大量皮质神经元细胞体肿胀或固缩,胞质深染,核浓缩呈三角形,核仁不清或消失,细胞周围间隙增宽,间质疏松;再灌注后 48 h 组较 24 h 组细胞变性坏死更为明显。糖尿病脑 I/R 组细胞数减少,胞体严重固缩,胞核显示不清;再灌注后 48 h 组较 24 h 组更为明显。糖尿病脑 I/R+巴曲酶治疗组较脑 I/R 组细胞数增多,细胞变性坏死程度减轻,再灌注后 48 h 组与 24 h 组细胞变性坏死程度接近。

3 讨论

糖尿病是缺血性脑卒中的重要危险因素之一,在糖尿病动物及人类中可以发现脑血流紊乱、脑血管反应性损伤、颅内大小血管破损,综合因素导致糖尿病患者较高的中风发生率以及较差的预后,相关的病理生理变化尚处于研究之中^[4]。巴曲酶广泛用于临床治疗脑梗死,它通过降低纤维蛋白原及血黏度,并能够促进血管内皮细胞释放组织型纤溶酶原激活剂(t-PA),增强纤溶系统活性,抑制血栓形成,从而改善缺血半暗带区的供血^[1-2,5]。动物实验还发现巴曲酶具有减轻脑水肿、清除自由基、抗氧化等功效,对缺血脑组织有保护作用^[6]。

实验表明老龄大鼠较青年大鼠脑 I/R 后脑梗死面积加大,脑组织损伤严重,细胞凋亡出现早且持续时间长^[7]。本研究中观察了糖尿病脑梗死后神经细胞形态学改变,发现糖尿病组细胞坏死率高于正常对照组,糖尿病脑 I/R 组高于非糖尿病脑 I/R 组,而巴曲酶能显著降低糖尿病脑 I/R 后的细胞坏死率,说明巴曲酶对糖尿病脑梗死组织有保护作用。

IGF-1 为一种非选择性神经营养因子,作用于中枢神经发育和成熟的全过程,参与神经系统的增生、分化和神经功能的维持与调节,促进神经纤维的修复、再生^[8]。在缺血性脑损伤后,内源性 IGF-1 系统表达上调。有研究表明,脑缺血早期海马、齿状回神经元和胶质细胞内源性 IGF-1 表达增加,且与抑制迟发性神经细胞死亡有关^[9]。缺血性脑损伤后 IGF-1 作为一种内源性保护因子,可以限制迟发性细胞死亡区域的扩大,并促进功能恢复。临床试验也发现,在恢复较好的患者中可以发现较高的 IGF-1 水平,说明 IGF-1 对神经系统有保护作用^[10]。

本研究结果显示,糖尿病组脑组织 IGF-1 阳性细胞表达率显著高于正常对照组,非糖尿病脑 I/R 48 h 阳性细胞表达率高于相应 24 h 组,糖尿病脑

I/R 组阳性细胞表达率分别低于非糖尿病脑 I/R 组,经巴曲酶治疗后阳性细胞表达率分别高于糖尿病脑 I/R 组。在大鼠和羊的动物模型中已被证实 IGF-1 通常在脑缺血后 2 h 表达开始升高,24~48 h 表达达高峰^[11-12],本实验结论认为脑缺血后 48 h IGF-1 表达高于 24 h,高峰期可能在 48 h。

综上所述,糖尿病中晚期脑组织存在一定程度的损伤,且糖尿病脑梗死后细胞坏死率增加,IGF-1 表达明显降低,脑保护功能下降,可能与糖尿病脑梗死代偿能力差、病情重、预后差有关;而巴曲酶能减轻脑细胞坏死,增加 IGF-1 表达,对糖尿病脑梗死组织具有显著的保护作用。

参考文献

- [1] 李飞,谷德祥,李燕君,等. 血管注射液联合降纤酶治疗急性脑梗死 31 例疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,1999,6(10):470-472.
- [2] 谭玉田,杨业勋. 东菱精纯克栓酶治疗急性脑梗死的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,1997,4(11):484-486.
- [3] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3):267-272.
- [4] Mankovsky BN, Metzger BE, Molitch ME, et al. Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus[J]. J Diabetes Complications, 1996, 10(4):228-242.
- [5] 史承耀,周盛年,方英立,等. 巴曲抗栓酶对高黏血症患者的血液流变学影响[J]. 新药与临床,1997,16(2):92.
- [6] 匡培根,李振洲,张凤英,等. 东菱克栓酶对沙土鼠缺血性脑血管病引起的脑水肿的影响[J]. 中国新药杂志,1995,4(1):56-59.
- [7] 李建生,任小巧,刘珂,等. 老龄大鼠脑缺血/再灌注神经细胞凋亡变化规律研究[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(3):151-154.
- [8] 邬英全,邵延坤,高凤桐,等. 急性脑梗死患者血清中胰岛素样生长因子 1 水平的研究[J]. 中国危重病急救医学,1999,11(6):372-373.
- [9] Hwang IK, Yoo KY, Park SK, et al. Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-1 in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult[J]. Neurochem Int, 2004, 45(1):149-156.
- [10] Bondanelli M, Ambrosio MR, Onofri A, et al. Predictive value of circulating insulin-like growth factor 1 levels in ischemic stroke outcome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(10):3928-3934.
- [11] Yang MX, Yu WT, Su FZ. Effect of Zhongfengkang on the content of insulin-like growth factor-1 in brain of the rats with focal cerebral ischemia[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2005, 30(19):1546-1548.
- [12] 徐忠信,何金婷,莽靖,等. 局灶性脑缺血及再灌注损伤 IGF-1 表达的动态变化[J]. 吉林大学学报(医学版),2005,31(3):401-403.

(收稿日期:2008-11-19 修回日期:2008-12-21)

(本文编辑:李银平)