

帕瑞昔布钠对大鼠局灶脑缺血再灌注损伤的影响

曹德钧¹⁾, 谢先丰¹⁾, 刘少星¹⁾, 杨孟昌²⁾, 代月娥²⁾

(1) 成都市第二人民医院麻醉科, 四川 成都 610017; 2) 四川省人民医院麻醉科, 四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 探讨帕瑞昔布钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响并通过检测血浆中 TXA₂、PGI₂、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 含量来探讨其可能机制。 **方法** 雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分为 4 组 (n=12): 假手术组 (S 组), 模型组 (I/R 组), 帕瑞昔布钠 5 mg/kg 处理组 (L 组), 帕瑞昔布钠 10mg/kg 处理组 (H 组)。线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血 90 min 再灌注 24 h 模型, L 组、H 组在缺血 30 min 前经颈内静脉分别注入经生理盐水等容积稀释的 5 mg/kg 和 10 mg/kg 帕瑞昔布钠注射液, S 组及 I/R 组给予等容积生理盐水。在缺血 90 min 及再灌注 24 h 行神经功能缺失评分, HE 染色观察海马 CA1 区神经元病理改变, 放射免疫法检测血浆中 TXA₂、PGI₂、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 含量并计算 TXA₂/PGI₂ 比值。 **结果** 帕瑞昔布钠能显著降低血浆中 TXA₂、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 含量及减小 TXA₂/PGI₂ 比值, 减轻缺血侧海马 CA1 区损伤, 改善大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经功能。 **结论** 帕瑞昔布钠对局灶性脑缺血再灌注损伤具有较好的抗炎保护作用, 其机制可能与通过降低血浆 TXA₂、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 含量及减小 TXA₂/PGI₂ 比值有关。

[关键词] 帕瑞昔布; 脑缺血/再灌; 血栓素 A₂; 前列环素

[中图分类号] R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2013) 04-0023-05

Effect of Parecoxib Sodium Pretreatment on Focal Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

CAO De-jun¹⁾, XIE Xian-feng¹⁾, LIU Shao-xing¹⁾, YANG Meng-chang²⁾, DAI Yue-e²⁾

(1) Dept. of Anesthesiology, The 2nd Peoples' Hospital of Chengdu, Chengdu Sichuan 610017; 2) Dept. of Anesthesiology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu Sichuan 610072, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and the mechanism of parecoxib pretreatment on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by measuring the content of TXA₂, PGI₂, IL-1 β , TNF- α , PGE₂ and TXA₂/PGI₂ in plasma. **Methods** Fourty-eight male SD rats were randomly divided into 4 groups (n=12): sham operation group (S); model group (I/R); parecoxib 5/10 mg/kg group (L, H). Middle cerebral artery occlusion models were made by reforming Longa suture method in SD rats. Rats in L and H group were injected 5 mg/kg and 10 mg/kg parecoxib, respectively, through internal jugular vein 30 minutes before ischemia. Rats in S group and I/R group were given equal volume of normal saline. After ischemia for 90 mins and reperfusion for 24 hours, respectively, the neurologic deficit scores were measured, the pathological changes in CA1 region of hippocampus were detected by HE staining, radioimmunoassay technique was used to determine the content of TXA₂, PGE₂, TNF- α , IL-1 β and TXA₂/PGI₂ in plasma. **Results** Pretreatment with parecoxib significantly decreased the content of TXA₂, PGE₂, TNF- α , IL-1 β and TXA₂/PGI₂ in plasma, mitigated the injury in CA1 region of hippocampus and improved the nerve function of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury. **Conclusion** Parecoxib can protect the brain from focal cerebral I/R injury by reducing the content of TXA₂,

[基金项目] 四川省卫生厅基金资助项目 (100520)

[作者简介] 曹德钧 (1978~), 男, 云南个旧市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事麻醉临床及科研工作。

[通讯作者] 谢先丰. E-mail: caodj785@yahoo.com.cn

PGE2, TNF- α , IL-1 β and the ratio of TXA2/PGI2 in plasma of rats.

[**Key words**] Parecoxib; Cerebral I/R injury; TXA2; PGI2

研究表明, 环氧合酶-2 (COX-2) 在脑缺血再灌注损伤中具有重要作用, 它参与了脑缺血后脑损伤的发生、发展, 并与脑缺血的预后关系密切^[1]. COX-2 抑制剂能通过抑制神经细胞凋亡而发挥神经保护作用, 并在不同脑损伤动物模型中发现使用环氧合酶 COX-2 抑制剂能起到神经保护作用^[2-4]. 本研究拟通过建立大鼠大脑中动脉闭塞再灌注模型观察帕瑞昔布钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经功能缺失评分和海马 CA1 区病理变化、血浆中 TXA2、PGI2、PGE2、IL-1 β 、TNF- α 含量变化及 TXA2/PGI2 比值的影响, 探讨帕瑞昔布钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响及机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

成年健康雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 250 g 左右, 由四川大学动物实验中心提供, 随机分为 4 组 ($n=12$): 假手术组 (S 组), 模型组 (I/R 组), 帕瑞昔布钠 5 mg/kg 组 (L 组), 帕瑞昔布钠 10 mg/kg 组 (H 组).

1.2 药品、试剂及实验仪器

帕瑞昔布钠 (商品名: 特耐), 辉瑞制药有限公司; TXB2、6-keto-PGF1 α 、PGE2、TNF- α 、IL-1 β 放免试剂盒购于北京北方生物技术研究.

1.3 模型制备

采用线栓法建立大鼠右侧大脑中动脉栓塞模型, 大鼠术前常规禁食水 8 h, 自由活动. 10%水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 取颈正中切口, 分离出右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉. 血管夹于近心端夹闭颈总动脉, 在颈总动脉分叉处剪一小口, 置入线栓: 直径 0.32 mm、长 5 cm 的尼龙鱼线, 当置入后有轻微阻力, 置入深度约 18 mm 为止, 固定线栓. 缺血 90 min 后, 拔出线栓恢复灌注. 术中用烤灯维持体温在 37 $^{\circ}\text{C}$ ~ 38 $^{\circ}\text{C}$. 大鼠在缺血 90 min 后再次 10%水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔注射麻醉后拔线栓至颈外动脉残端行再灌注. S 组仅分离并结扎右侧颈总动脉、颈外动脉, 但不置入线栓. L 组和 H 组在置入线栓 30 min 前使用注射器经颈内静脉向心端分别注

入 5 mg/kg 和 10 mg/kg 帕瑞昔布钠注射液, 而 S 组及 I/R 组注入等容积生理盐水.

1.4 神经行为学检查

分别于大鼠缺血 90 min 和再灌注 24 h 2 个时间点参照 Longa⁵ 分制评分标准^[5]进行神经行为学检查评分. 评分标准如下: 0 分: 无神经功能障碍; 1 分: 不能完全伸展栓塞对侧前爪; 2 分: 向栓塞对侧转圈; 3 分: 行走时向栓塞对侧倾斜; 4 分: 不能自发行走, 并伴有意识障碍.

1.5 海马 CA1 区神经元病理学检查

各组随机取 6 只大鼠于再灌注 24 h 再次麻醉后迅速断头取脑, 取视交叉至漏斗柄的脑片, 10%多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 5 μm 冠状切片, HE 染色.

1.6 TXB2、6-keto-PGF1 α 、PGE2、TNF- α 、IL-1 β 含量检测

各组剩余 6 只于再灌注 24 h 再次麻醉后用带有 0.2 mL 消炎痛 EDTA-2Na 液的注射器于颈总动脉采血样 3 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3500 转离心 10 min, 取上层清液, 置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存. 采用放射免疫法测定血浆中 TXA2、6-keto-PGF1 α (PGI2 的稳定代谢产物)、IL-1 β 、TNF- α 、PGE2 含量并计算 TXA2/PGI2.

1.7 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS 进行统计分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间及组内比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

神经功能缺失评分变化: 缺血 90 min 时: 与 S 组比较, I/R 组, L 组, H 组神经功能缺失评分均增高, I/R 组, L 组, H 组之间无显著差异 ($P > 0.05$). 再灌注 24 h 时: 与 S 组比较, I/R 组, L 组, H 组 Longa 神经功能缺失评分均增高 ($P < 0.05$); H 组较 I/R 组大鼠神经功能缺失评分显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1.

缺血侧海马 CA1 区神经元病理变化: 右侧海马 CA1 区 HE 染色显示: S 组: 神经元形态正常, 大小均匀, 核仁清晰, 排列有序紧密; I/R 组: 可见较多神经元胞体缩小, 胞核固缩, 尼氏体消失, 胞质嗜酸性明显增强且排列散乱; L 组和 H 组:

神经元胞体增大, 排列散乱, 胞质嗜酸性明显增强的神经元较 I/R 组减少, 见图 1.

各组血浆中 TXA2、PGI2、PGE2、TNF- α 、IL-1 β 含量及 TXA2/ PGI2 比值变化: 与 S 组比较, I/R 组, L 组, H 组 PGE2、TNF- α 、IL-1 β 、TXA2 含量及 TXA2/ PGI2 比值含量增高 ($P < 0.05$). 与 I/R 组比较, L 组、H 组 PGE2、TNF- α 、IL-1 β 、TXA2 含量及 TXA2/ PGI2 比值含量均降低 ($P < 0.01$), 且 H 组较 L 组下降显著 ($P < 0.01$), 见表 2、3.

表 1 各组大鼠神经功能缺失评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of nerve function scoring among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	缺血 90 min	再灌注 24 h
S 组	12	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
I/R 组	12	2.28 $\pm$ 0.48*	1.79 $\pm$ 0.43*
L 组	12	2.21 $\pm$ 0.46*	1.61 $\pm$ 0.47*
H 组	12	2.15 $\pm$ 0.45*	1.29 $\pm$ 0.41* Δ

与 S 组比较, * $P < 0.01$ 与 I/R 组比较, $\Delta P < 0.05$.

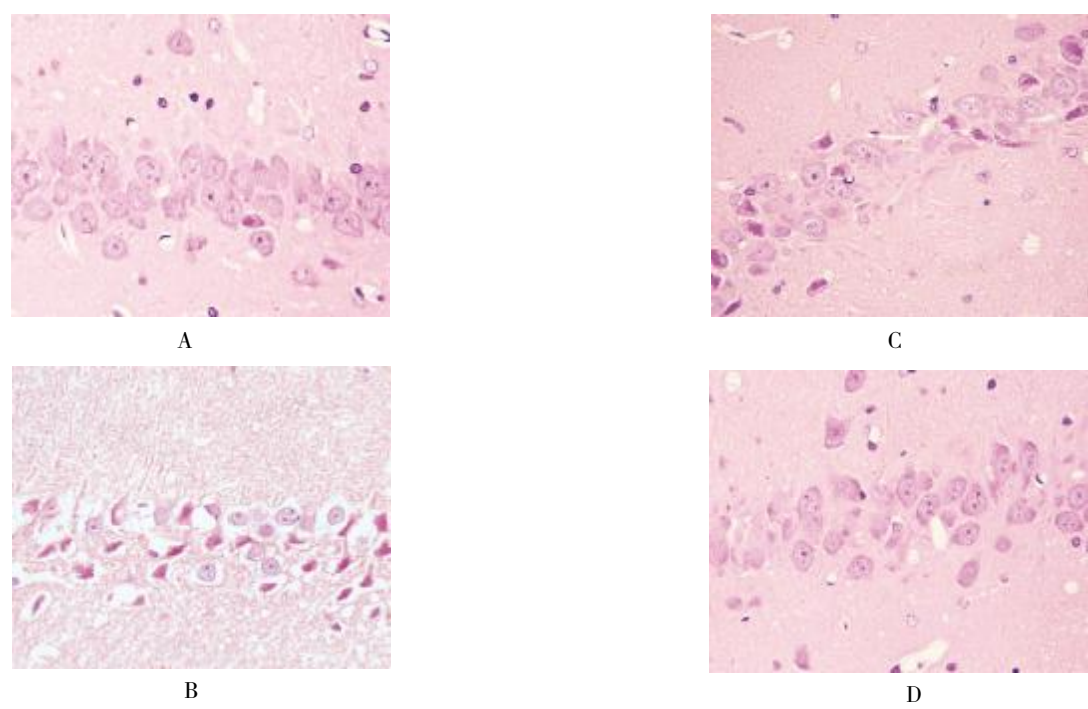


图 1 各组大鼠缺血侧海马 CA1 区 HE 染色结果

Fig. 1 The pathological change in hippocampus CA1 district in the ischemic side stained with HE

A: S 组; B: I/R 组; C: L 组; D: H 组

表 2 各组大鼠再灌注 24 h 血浆 TXA2 PGI2 含量 TXA2/ PGI2 比值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of serum levels of TXA2 and PGI2 and TXA2/ PGI2 after reperfusion for 24 h among four groups

组 别	n	TXA2(pg/mL)	PGI2(pg/mL)	TXA2/ PGI2
S 组	6	135.50 $\pm$ 4.66	1251.89 $\pm$ 6.61	0.10 $\pm$ 0.03
I/R 组	6	606.63 $\pm$ 6.78**	578.76 $\pm$ 5.02**	1.04 $\pm$ 0.04**
L 组	6	480.25 $\pm$ 5.54 $\Delta\Delta$	630.94 $\pm$ 5.70 $\Delta\Delta$	0.76 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
H 组	6	516.26 $\pm$ 5.63 $\Delta\Delta$	793.11 $\pm$ 2.16 $\Delta\Delta$	0.65 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta\blacktriangle$

与 S 组比较, ** $P < 0.01$; 与 I/R 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 L 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$.

表 3 各组大鼠再灌注 24h 血浆 PGE2、TNF-α、IL-1β 含量的比较 (x̄±s)

Tab. 3 Comparison of serum levels of PGE2, TNF-α and IL-1β after reperfusion for 24 h among four groups (x̄±s)

组 别	n	PGE2(pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
S 组	6	17.45 ± 1.31	517.25 ± 38.68	243.83 ± 16.21
I/R 组	6	25.54 ± 2.04**	967.39 ± 87.05**	366.79 ± 21.96**
L 组	6	22.71 ± 1.68△△	739.79 ± 62.18△△	313.04 ± 19.62△△
H 组	6	19.22 ± 1.09△△▲▲	638.42 ± 44.18△△▲▲	286.62 ± 21.03△△▲

与 S 组比较, **P<0.01; 与 I/R 组比较, △△P<0.01; 与 L 组比较, ▲P<0.05, ▲▲P<0.01.

3 讨论

大鼠脑缺血再灌注后, 脑组织中 COX-2 蛋白含量显著增加, 通过药物抑制 COX-2 激活和过度表达被认为是治疗多种炎症的有效手段之一^[6]. 帕瑞昔布钠通过抑制前列腺素类的合成而发挥镇痛和抗炎作用, 是目前供临床使用的唯一注射用高选择性环氧合酶 COX-2 抑制剂.

PGI2 和 TXA2 是花生四烯酸代谢途径中的一对重要产物. PGI2 由血管内皮细胞合成释放一种具有抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质. TXA2 是由血小板微粒体合成释放的一种促血管收缩, 血小板聚集的生物活性物质. 血小板及血管内皮细胞功能依靠 PGI2 和 TXA2 的动态平衡维持. PGI2 和 TXA2 的动态平衡一旦被破坏, 会引起血小板活性增强、动脉痉挛等, 导致血小板、白细胞及纤维蛋白沉积物等嵌顿、堵塞毛细血管, 使缺血区域的血流减缓乃至停滞, 即所谓的再灌注后的“无复流”现象, 引起脑组织微循环障碍, 加重脑损伤^[7]. PGE2 为花生四烯酸代谢途径中 COX-2 活性标志物之一. PGE2 具有神经毒性作用, 与增加星形胶质细胞释放谷氨酸有关^[8]. 脑缺血再灌注损伤的免疫炎症反应的基础是多种炎症介质失控释放而形成的炎症级联放大效应, 通过检测损伤性炎症介质对于衡量脑缺血再灌注损伤有重要意义. TNF-α、IL-1β 过度表达可以激活血管内皮细胞及细胞间黏附分子, 使白细胞与血管内皮的黏附性增强, 引起微血管发生迟发型低灌注. TNF-α、IL-1β 过度表达可诱导其它炎性细胞因子的产生, 促进兴奋性氨基酸, 氧自由基等神经毒性物质的生成和释放, 造成脑水肿, 加重炎性损伤^[9]. 研究发现, 在成年大鼠脑缺血再灌注后脑组织中 TNF-α 含量较再灌注之前增加 10~100 倍^[10]. 本研究结果显示, 在 I/R 组中再灌注 24 h 后, 血浆中 TXA2、PGE2、TNF-α、IL-1β 含量及 TXA2/PGI2 比值均较 S 组显著上升. 帕瑞昔布钠 5 mg/kg 和 10 mg/kg 均能降低血浆中 TXA2、PGE2、TNF-α、

IL-1β 含量, 且 TXA2 下降幅度较 PGI2 下降幅度更大, 从而 TXA2/PGI2 比值减小. 神经功能缺失评分是判断大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型建立是否成功及恢复程度的常用评分指标. 大鼠海马 CA1 区对缺氧缺血最为敏感, 本研究选择海马 CA1 区观察梗死灶周围神经元受损情况. 本研究结果显示: 缺血 90 min 时: I/R 组, L 组, H 组神经功能缺失评分较 S 组均增高, 提示各组大脑中动脉脑缺血再灌注损伤模型建立成功. H 组再灌注 24 h 后神经功能缺失评分明显低于 I/R 组, 且 HE 染色显示缺血侧 CA1 区神经元损伤较模型组明显减轻, 而 L 组改善不明显, 以上研究结果提示帕瑞昔布钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经功能缺失及海马 CA1 区神经元损伤具有改善作用且帕瑞昔布钠 10 mg/kg 剂量组优于 5 mg/kg 剂量组.

本研究显示在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型中, 帕瑞昔布钠可通过降低血浆中 TXA2、PGE2、IL-1β、TNF-α 含量, 减小 TXA2/PGI2 的比值, 减轻海马 CA1 区神经元损伤, 从而发挥脑保护作用. 且以 10 mg/kg 保护作用更显著.

[参考文献]

[1] IADECOLA C, NIWA K, NOGAWA S, et al. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98 (3): 1 294.

[2] CANDELARIO-JALIL E, ALVAREZ D, CASTA EDA J M, et al. The highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor DFU is neuroprotective when given several hours after transient cerebral ischemia in gerbils[J]. Brain research, 2002, 927 (2):212-215.

[3] CANDELARIO-JALIL E, GONZALEZ-FALCON A, GARCIA-CABRERA M, et al. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat [J]. Brain research, 2004, 1

- 007(1-2):98-108.
- [4] CANDELARIO-JALIL E, MHADU N H, GONZALEZ - FALCON A, et al. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on cerebral infarction and neurological deficits induced by permanent middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2005, 2(1):3.
- [5] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84.
- [6] MINGHETTI L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases [J]. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2004, 63(9): 901.
- [7] DEMBO G, PARK S B, KHARASCH E D. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans[J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(2):409-415.
- [8] DIENEL G A, HERTZ L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia [J]. *Glia*, 2005, 50(4): 362-388.
- [9] ZAWADZKA M, KAMINSKA B. A novel mechanism of F-K506-mediated neuroprotection: downregulation of cytokine expression in glial cells[J]. *Glia*, 2005, 49(1):36-51.
- [10] GABRYEL B, ABUZEK K, MA ECKI A, et al. Immunophilin ligands decrease release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-2) in rat astrocyte cultures exposed to simulated ischemia in vitro [J]. *Polish journal of pharmacology*, 2004, 56(1):129-136.
- (2013-01-14 收稿)

(上接第15页)

药, 虽研究证实该药具有较好的体外抗阴道毛滴虫作用, 要将其广泛用于临床治疗阴道毛滴虫感染, 仍需进一步对其临床药效、剂型等展开研究. 作为防治阴道毛滴虫的感染或治疗耐甲硝唑虫株的替代药物, 植物药黄连素比人工合成的化学药物毒副作用小, 必将受到人们的青睐, 具有很好的开发利用前景.

[参考文献]

- [1] 周本江, 郑葵阳. 医学寄生虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2007:37-38.
- [2] SCHWEBKE J R, BARRIENTES F J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2006, 50(12): 4 209-4 210.
- [3] 许静波, 高兴政. 双氢青蒿素对阴道毛滴虫微丝作用的观察 [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2004, 17(1): 12-14.
- [4] 谭苹, 张国华, 肖少玉. 蒿甲醚体外抗阴道毛滴虫的作用[J]. *实用寄生虫病杂志*, 2000, 8(1):17-18.
- [5] 耿志辉, 韩淑梅, 侯芳玉. 葡萄糖酸- δ -内酯体外抗阴道毛滴虫作用的研究 [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2001, 14(4):272-273.
- [6] 殷峻, 胡仁明, 唐金凤, 等. 小檗碱的体外降糖作用 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2001, 21(5): 425-427.
- [7] 宋菊敏, 毛良, 施建玲, 等. 小檗碱对非胰岛依赖性糖尿病大鼠的抗氧化作用 [J]. *中草药*, 1992, 23:590-591.
- [8] 陈佩惠. 人体寄生虫学实验技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998:44-45.
- [9] 杨健, 周本江. 溴甲酚紫法体外测试药物抗阴道毛滴虫活性的实验研究[J]. *昆明医学院学报*, 2005, 26(1): 84.
- [10] 张凤霞, 温瑞娥. 黄连治疗滴虫性阴道炎106例[J]. *中国民间疗法*, 2004, 12(2):26.
- [11] 杨婧, 傅颖媛. 黄芩苷、黄连素体外杀灭阴道毛滴虫的实验研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(4): 37-38.
- [12] KANEDA Y. In vitro effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Reichomonas vaginalis*[J]. *Ann Trop Med Parasit*, 1991, 85(4):417-425.
- (2013-02-14 收稿)