

丁苯酞对慢性缺血性脑白质损害的保护作用研究

林琅,黎红华,骆文静,吴非

摘要 目的:观察丁苯酞可否改善慢性低灌注所致脑白质损害并探讨其可能的机制。**方法:**72只大鼠随机分为对照组、低灌注组及丁苯酞组,每组24只。低灌注组及丁苯酞组通过阻断双侧颈总动脉血流建立慢性前循环低灌注模型,丁苯酞组于术后给予丁苯酞注射液腹腔注射。建模30d后,通过荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖静脉注射结合共聚焦激光扫描法检测脑微血管密度,通过伊文思蓝静脉注射后测定脑组织荧光强度检测血脑屏障完整性,通过Kluver-Barrera氏髓鞘染色检测白质纤维密度。**结果:**丁苯酞组大鼠脑白质微血管密度高于其他2组(均 $P<0.05$)。低灌注组大鼠伊文思蓝浓度较对照组大鼠显著增高($P<0.01$);丁苯酞组伊文思蓝浓度较对照组大鼠增高($P<0.05$),但较低灌注组降低($P<0.05$)。低灌注组大鼠脑白质纤维密度较对照组显著降低($P<0.01$);丁苯酞组大鼠脑白质纤维密度较对照组降低($P<0.05$),但较低灌注组增高($P<0.05$)。**结论:**丁苯酞可减轻慢性低灌注状态导致的脑白质损害,其机制可能与改善微循环、减轻血脑屏障破坏有关。

关键词 慢性低灌注;脑白质损害;血脑屏障;微循环;丁苯酞

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210038

Protective Effect of Butylphthalide on White Matter Damage in Chronic Cerebral Hypoperfusion LIN Lang, LI Hong-hua, LUO Wen-jing, WU Fei. Department of Neurology, General Hospital of Central Theater, PLA, Wuhan 430070, China

Abstract Objective: To estimate whether butylphthalide improves white matter damage and blood-brain barrier disruption by chronic cerebral hypoperfusion and explore its possible mechanism. **Methods:** 72 Wistar rats were randomly split into three groups with 24 in each: sham group, hypoperfusion group, and butylphthalide group. Permanent bilateral common carotid artery occlusion was used to induce hypoperfusion of the forebrain in hypoperfusion and butylphthalide group rats. Intraperitoneal injection of butylphthalide was administered to butylphthalide group rats after surgery. Microvessel density, Kluver-Barrera's myelin sheath staining, and quantitative measurement of pre-injected Evans Blue were performed 30 days after surgery. **Results:** Compared to the control and hypoperfusion group rats, the butylphthalide group rats had a higher microvessel density ($P<0.05$). Hypoperfusion group rats showed a higher leakage of Evans Blue dye compared to control group rats ($P<0.01$). Butylphthalide group rats showed a greater leakage of Evans Blue dye than control group rats ($P<0.05$) but a smaller leakage than hypoperfusion group rats ($P<0.05$). Hypoperfusion group rats had a lower white matter fiber density than control group rats ($P<0.01$). Butylphthalide group rats showed a lower white matter fiber density than the control group rats ($P<0.05$) but a higher density than hypoperfusion group rats ($P<0.05$). **Conclusion:** Butylphthalide reduced the white matter impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion, and its key mechanism may involve the improvement of microcirculation and the reduction of damage to the blood brain barrier.

Key words chronic cerebral hypoperfusion; white matter impairment; blood brain barrier; microcirculation; butylphthalide

作者单位

中部战区总医院

神经内科

武汉 430011

基金项目

湖北省卫生健康

科研联合项目

(No. WJ2019H1

18)

收稿日期

2021-09-02

通讯作者

林琅

plexor@163.com

缺血性脑白质损害是血管性痴呆的重要原因之一。慢性低灌注状态和与脑白质损害及血管性痴呆之间有密切联系^[1,2]。血脑屏障损害可能是慢性低灌注状态下脑小血管病^[3]及血管性痴呆^[4]发病机制中的重要环节。我们的既往研究表明,慢性低灌注状态可诱导脑白质内的血管生成,并进一步损害血脑屏障完整性^[5]。这种因血管生成所致的血脑屏障损害可能是脑白质缺血性损害的重要发病机制。丁苯酞有助于改善脑缺血组织微循环,并可提高线粒体活性,改善脑缺血区能量

代谢。因此,丁苯酞可能具有用于改善缺血性白质损害的潜在价值。本研究旨在了解丁苯酞是否可改善慢性低灌注状态所致的白质损害和血脑屏障破坏及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物及分组 SPF级雄性Wistar大鼠72只,体质量250~300g,购自军事医学科学院。将大鼠随机分为低灌注组、丁苯酞组和对对照组,每组24只。根据检测目的,

每组进一步分为微循环检测、白质纤维密度检测及血脑屏障检测亚组,每亚组8只。

1.1.2 主要试剂与仪器 丁苯酞氯化钠注射液购于恩必普药业有限公司;荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖、焦油紫、罗克沙尔坚牢蓝购于美国Sigma公司;伊文思蓝、三氯醋酸、碳酸锂购于国药集团化学试剂有限公司。C1-SI型共聚焦激光扫描显微镜购于日本尼康公司;VT1000S型刀片振动式切片机购于德国徕卡公司;RF-540型荧光分光光度计购于日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 动物建模及干预 将大鼠麻醉(戊巴比妥40 mg/kg腹腔注射)后,固定于操作台上,沿长轴切开颈部腹侧正中皮肤,暴露双侧颈总动脉分叉,小心分离伴行的迷走神经;低灌注组和丁苯酞组大鼠于远心端以丝线结扎颈总动脉,对照组不行结扎;缝合皮肤。术后对丁苯酞组大鼠予丁苯酞注射液腹腔注射(0.8 mg/(kg·d)、q12h),对照组及低灌注组大鼠予生理盐水腹腔注射(1 mL、q12h)。根据不同检测目的,于术后第30天分别按下述方法对各亚组动物进行处理。

1.2.2 微循环检测 荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖50 mg静脉注射,1 h后断头处死并迅速取脑,置于4%多聚甲醛溶液中24 h;将脑组织行冠状位切片,片厚100 μm。共聚焦激光扫描显微镜对脑白质逐层扫描,扫描区域600 μm×600 μm,共50层,每层间隔1 μm。3D Doctor 3.5软件对脑微血管进行三维重建,微血管密度(%)=三维空间内血管容积/总容积×100%。

1.2.3 血脑屏障检测 2%伊文思蓝静脉注射(4 mL/kg),6 h后,经左心室以生理盐水快速灌注;取脑后经冠状位分离前囟后2~4 mm处组织,称重后置入1 mL 50%三氯醋酸溶液中,匀浆并离心,取上清液0.5 mL,以无水乙醇3 mL稀释,荧光分光光度计测定荧光强度,根据标准曲线测定脑组织伊文思蓝浓度。

1.2.4 白质纤维密度检测 经左心室以4%多聚甲醛溶液250 mL快速灌注,取脑后常规石蜡包埋。冠状位切片并行Kluver-Barrera氏髓鞘染色,具体步骤如下:二甲苯、乙醇常规脱蜡水化至95%乙醇,0.2%罗克沙尔坚牢蓝乙醇溶液60℃12 h,先后以95%乙醇及蒸馏水冲洗,0.05%碳酸锂30 s,70%乙醇洗,0.1%焦油紫1 min,70%乙醇洗,常规脱水、透明、封片。以Image pro plus 6.0图像分析软件测定脑白质纤维密度。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件处理数据。符合正态分布以

及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微循环检测

丁苯酞组大鼠脑白质微血管密度高于对照组和低灌注组(均 $P<0.05$),见表1,图1。

2.2 血脑屏障检测

低灌注组大鼠伊文思蓝浓度较对照组大鼠显著增高($P<0.01$);丁苯酞组伊文思蓝浓度较对照组大鼠增高($P<0.05$),但较低灌注组降低($P<0.05$),见表1。

2.3 白质纤维密度检测

对照组大鼠脑白质纤维整齐紧密,走行均匀,未见髓鞘脱失表现,见图2A;低灌注组可见脑白质纤维紊乱分散,并可见较多空泡,有明显髓鞘脱失表现,见图2B;丁苯酞组大鼠脑白质纤维排列稍分散,着色欠均匀,有轻度脱髓鞘表现,见图2C。经图像软件分析,低灌注组大鼠脑白质纤维密度较对照组显著降低($P<0.01$);丁苯酞组大鼠脑白质纤维密度较对照组降低($P<0.05$),但较低灌注组增高($P<0.05$),见表1。

表1 3组大鼠脑组织微循环、血脑屏障及白质纤维密度比较($\bar{x}\pm s$)

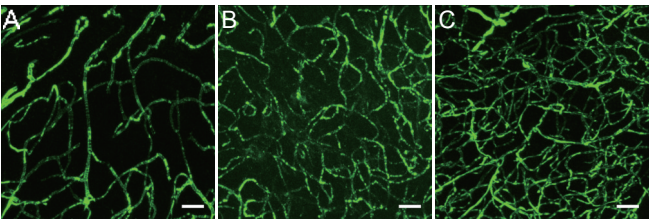
组别	只数	微血管密度/%	伊文思蓝浓度/(μg/mL)	白质纤维密度/%
对照组	8	6.62±0.93	3.18±1.33	78.57±8.66
低灌注组	8	8.88±1.24	7.66±2.83 ^①	56.09±6.45 ^①
丁苯酞组	8	11.49±3.73 ^{①③}	5.54±1.09 ^{②③}	68.71±11.9 ^{②③}
F值		8.71	10.98	11.80
P值		0.002	0.001	0.000

注:与对照组比较,^① $P<0.01$;与对照组比较,^② $P<0.05$;与低灌注组比较,^③ $P<0.05$

3 讨论

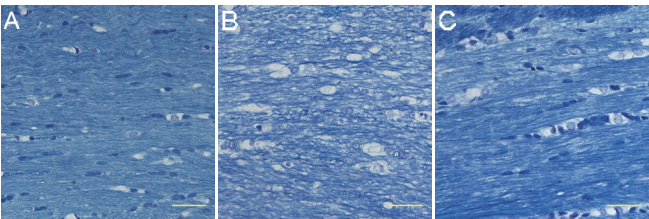
缺血性脑白质损害是血管性认知功能减退重要病理基础,白质损害的严重程度和认知功能恶化有密切关联^[6,7]。此外,缺血性白质损害患者还更易出现步态及平衡障碍、焦虑抑郁障碍及小便控制障碍等临床表现。脑白质损害尚可增加脑卒中患者的再发卒中风险及死亡率^[8]。SMART-MR研究发现,不仅脑白质损害的更高容积是患者长期死亡率增高的危险因素,白质损害的形态和类型也和患者长期死亡率有密切关联^[9]。

一般认为缺血性白质损害和长期慢性不完全性缺血(低灌注状态)有密切联系^[10]。较多研究显示,慢性低灌注和血脑屏障损害有密切联系,而且二者在缺血



注：(A)对照组，微血管密度正常；(B)低灌注组，微血管密度有所增多，局部可见荧光渗出；(C)丁苯酞组，微血管密度显著增高。(标尺=50 μm)

图1 各组大鼠微血管密度(荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖注射)



注：(A)对照组，白质纤维整齐紧密，走行均匀，未见髓鞘脱失；(B)低灌注组，白质纤维紊乱分散，并可见较多空泡，有明显髓鞘脱失表现；(C)丁苯酞组，白质纤维排列稍分散，着色欠均匀，有轻度脱髓鞘表现。(标尺=50 μm)

图2 各组大鼠脑白质纤维密度(Kluver-Barrera髓鞘染色)

性白质损害的发病中机制扮演重要角色^[3]。慢性低灌注引起的缺血缺氧和继发病理改变可导致血脑屏障完整性破坏， β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)等有害物质在白质等部位聚积^[11]。白质血管结构及功能改变可破坏血脑屏障完整性，使其通透性增加，而血脑屏障损害则可能导致血浆内有害物质渗出，从而引起过氧化等损伤。

目前对缺血性脑白质损害尚无特效治疗方法。已有研究表明，丁苯酞有助于改善脑缺血区域的微循环状态，促使侧枝循环开放，并具有保护线粒体的作用。但丁苯酞是否可以用于改善慢性缺血状态，保护慢性缺血性脑白质损害尚缺少充分研究。

我们此前的研究表明，慢性低灌注状态可诱导大鼠血管发生，由于新生血管的结构不完整，血脑屏障通透性发生损害，进一步引起白质损害，导致白质纤维密度下降^[5]。我们认为血脑屏障通透性增高与新生的毛细血管血脑屏障结构不完整、功能不完善相关，而有害物质渗出则可能是导致白质损害的重要原因。在本研究中，丁苯酞组较低灌注组大鼠微血管密度进一步上升，同时白质纤维密度较低灌注组大鼠也有显著上升，提示丁苯酞可通过提高缺血区域血管密度改善脑组织血供，减轻白质缺血损害。

此外，相对低灌注组大鼠，丁苯酞组大鼠的血脑屏障通透性并没有随其微血管密度进一步上升，而是得到了一定程度改善，说明丁苯酞有利于血脑屏障的修复。这种改善作用可能和侧枝循环和微血管床开放后，局部缺血缺氧状态改善有利于血脑屏障结构修复相关；同时丁苯酞对线粒体的保护作用也可能有助于减轻血脑屏障结构的缺血性损伤。此外，在丁苯酞作用下，血管密度的增加可能部分来自于开放的微循环床，而非血脑屏障结构不完整的新生微血管。丁苯酞干预大鼠缺血区域血脑屏障通透性相较缺血灶大鼠下降，提示丁苯酞可减轻血脑屏障损害，这种保护作用可能参与了丁苯酞减轻白质损害的作用机制。

脑白质损害在血管性认知功能障碍的发病机制中扮演重要角色，控制其发生发展具有积极意义。本研究的结果进一步阐明了慢性低灌注和血脑屏障破坏以及缺血性白质损害之间的联系，并为减轻脑缺血性白质损害提供了新的线索，对于探索缺血性白质损害的防治方法具有积极意义。

参考文献

- [1] Thomas T, Miners S, Love S. Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Brain, 2015, 138: 1059-1069.
- [2] Kandiah N, Goh O, Mak E, et al. Carotid stenosis: a risk factor for cerebral white-matter disease[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23: 136-139.
- [3] Wong SM, Jansen JFA, Zhang CE, et al. Blood-brain barrier impairment and hypoperfusion are linked in cerebral small vessel disease[J]. Neurology, 2019, 92: e1669-e1677.
- [4] Ueno M, Chiba Y, Matsumoto K, et al. Blood-brain barrier damage in vascular dementia[J]. Neuropathology, 2016, 36: 115-124.
- [5] 林琅, 黎红华, 武强, 等. 慢性低灌注对大鼠脑白质血管生成与血脑屏障的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 9-11.
- [6] Filley CM, Fields RD. White matter and cognition: making the connection[J]. J Neurophysiol, 2016, 116: 2093-2104.
- [7] Wolters FJ, Zonneveld HI, Hofman A, et al. Cerebral Perfusion and the Risk of Dementia: A Population-Based Study[J]. Circulation, 2017, 136: 719-728.
- [8] Ryu WS, Schellingerhout D, Hong KS, et al. White matter hyperintensity load on stroke recurrence and mortality at 1 year after ischemic stroke[J]. Neurology, 2019, 93: e578-e589.
- [9] Ghaznawi R, Geerlings MI, Jaarsma-Coes M, et al. Association of White Matter Hyperintensity Markers on MRI and Long-term Risk of Mortality and Ischemic Stroke: The SMART-MR Study[J]. Neurology, 2021, 96: e2172-e2183.
- [10] Arba F, Mair G, Carpenter T, et al. Cerebral White Matter Hypoperfusion Increases with Small-Vessel Disease Burden. Data From the Third International Stroke Trial[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26: 1506-1513.
- [11] Miners JS, Schulz I, Love S. Differing associations between Abeta accumulation, hypoperfusion, blood-brain barrier dysfunction and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer's disease[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38: 103-115.

(本文编辑:唐颖馨)