

• 专题 •

# 还原型谷胱甘肽对大鼠局灶性脑梗死后丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶表达的影响

鲁雅琴<sup>1</sup>, 宋焱峰<sup>2</sup>, 侯一平<sup>2</sup>

[摘要] 目的 观察还原型谷胱甘肽对大鼠短暂性局灶性脑缺血时丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响。方法 采用大脑中动脉线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型,随机分为假手术组、缺血模型组和还原型谷胱甘肽治疗组(1200 mg/kg),缺血2 h再灌注6 h后观测各组的神经行为变化、脑梗死体积、脑组织病理学变化、脑组织MDA含量和SOD、GSH-PX活性。结果 还原型谷胱甘肽可以改善大鼠局灶性脑缺血引起的神经行为障碍,减少脑梗死体积( $P < 0.05$ );可以降低脑组织MDA含量,提高脑组织GSH-PX、SOD活力( $P < 0.05$ )。结论 外源性谷胱甘肽可通过提高GSH-PX、SOD活力,降低MDA含量,增强机体清除自由基的能力,及减少大鼠脑组织氧自由基的堆积而发挥对脑缺血再灌注时的保护作用。

[关键词] 还原型谷胱甘肽(GSH);丙二醛(MDA);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX);超氧化物歧化酶(SOD);局灶性脑梗死;大鼠

**Effect of Reduced Glutathione on Expression of Malondialdehyde, Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase after Focal Cerebral Infarction in Rats** LU Ya-qin, SONG Yan-feng, HOU Yi-ping. Department of Neurology, No.1 Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of reduced glutathione (GSH) on expression of malondialdehyde(MDA), glutathione peroxidase (GSH-PX) and superoxide dismutase (SOD) after focal cerebral infarction in rats. **Methods** Rat models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established with thread after 2-hour ischemia and 6-hour reperfusion. Rats were divided at random into three groups, i.e., sham-operated, control and treatment group (with GSH 1200 mg/kg) respectively. After the rats model was performed, neurology deficit score, the size of brain infarct region and the change of brain tissue pathologic were evaluated. Contents of MDA and activity of SOD and GSH-PX were detected with spectrophotometer. **Results** Compared with the control group, GSH can ameliorate neurological deficit score and decrease infarct volume induced by MCAO. GSH may reduce contents of MDA and improve activity of SOD and GSH-PX in brain tissue. **Conclusion** GSH may reduce contents of MDA and improve activity of SOD and GSH-PX so as to enhance capability of eliminating oxygen free radical, and play a neuroprotective effect after cerebral focal ischemia reperfusion.

**Key words:** reduced glutathione (GSH); malondialdehyde (MDA); glutathione peroxidase (GSH-PX); superoxide dismutase (SOD); focal cerebral infarction; rats

[中图分类号] R743 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)11-0923-03

[本文著录格式] 鲁雅琴,宋焱峰,侯一平.还原型谷胱甘肽对大鼠局灶性脑梗死后丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶表达的影响[J].中国康复理论与实践,2006,12(11):923-925.

脑缺血后,大量的自由基生成,使脑内脂质过氧化作用加强,导致细胞膜及血脑屏障损害,引起和加重脑组织水肿,因此自由基的毒性作用已成为脑缺血损害的关键性病理环节之一<sup>[1]</sup>。谷胱甘肽广泛存在于动植物组织中,是细胞质中自然合成的一种三肽,在细胞抗氧化系统中是关键成分,它可以非酶促反应的形式直接与氧自由基结合,达到清除氧自由基的目的;同时,它也可作为谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)催化的反应中的底物,起到清除氧自由基的作用<sup>[2]</sup>。还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,

GSH)作为良好的抗氧化剂已被广泛使用于临床急性肝脏损伤、肿瘤的放化疗等。国外研究证明,细胞内谷胱甘肽的水平与局灶性脑梗死关系密切<sup>[3]</sup>。本实验探讨还原型谷胱甘肽对局灶性脑缺血的保护作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley大鼠 80只,体重 250~300 g,购于青海省实验动物中心。

1.2 主要药品及试剂 注射用还原型谷胱甘肽粉剂:重庆药友制药有限责任公司;红四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium, TTC)粉剂:中国医药上海化学试剂公司,用蒸馏水配成浓度 2%备用;多聚赖氨酸原液:武汉博士德公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)试剂盒:南

作者单位:1.兰州大学第一医院神经内科,甘肃兰州市 730000;2.兰州大学基础医学院解剖学教研室,甘肃兰州市 730000。作者简介:鲁雅琴(1972-),女,甘肃兰州市人,主治医师,硕士研究生,主要研究方向:缺血性脑血管病基础与临床研究。

京建成生物工程技术研究所。

### 1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 大鼠随机分为假手术组 ( $n=14$ ); 脑缺血组 ( $n=18$ ); 还原型谷胱甘肽治疗组 ( $n=18$ )。

1.3.2 栓线的制备 栓线选用进口碳素尼龙钓鱼丝线,直径  $0.22 \sim 0.26$  mm,根据动物体重灵活选用。尼龙丝线塑成直线形并剪成  $5$  cm 长的线段,在距头端  $20$  mm 处作一标记,将头端靠近火焰使之变钝成光滑圆球形,将近头端  $30$  mm 浸入  $1$  g/L 多聚赖氨酸溶液中  $1$  min<sup>[4]</sup>,取出置于  $60$  °C 干燥箱中  $1$  h,备用。

1.3.3 模型的制备 参照 Zea-Longa 线栓法<sup>[5]</sup>并予改良的大脑中动脉线栓法 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 制备大鼠短暂性局灶性脑缺血模型。具体操作方法如下:术前给予  $0.25\%$  阿托品  $0.1$  ml/100g 腹腔注射,以抑制呼吸道分泌物对大鼠术后呼吸的影响; $10\%$  水合氯醛  $0.35$  ml/100g 腹腔麻醉大鼠,常规消毒,取颈旁右侧切口,切开皮肤皮下组织,暴露切断二腹肌肌腹,钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌,分离右侧颈总动脉与迷走神经,0号丝线结扎颈总动脉近心端,向上分离右颈外动脉与颈内动脉,在近颈总动脉分叉处结扎颈外动脉,并电凝颈外动脉的分支。用小血管夹夹住颈总动脉远心端,在此处放置一打好结的丝线,勿收紧线结,在颈总动脉结扎处上方剪一小口,插入已制备好的栓线头端,收紧线结,松去血管夹,顺颈总动脉经颈内动脉将栓线送至颅内,遇阻力而止,栓线插入深度为  $18 \sim 20$  mm,使栓线头端位于 MCA 起始部。缝合切口,留置线头于体外。实现再灌注时,将动物再次麻醉,抽提栓线至颈总动脉内即可。假手术组栓线只插入  $10$  mm,其余步骤同模型组。治疗组步骤同模型组,但在插线成功后,立即给予还原型谷胱甘肽  $1200$  mg/kg 腹腔注射<sup>[6]</sup>;假手术组与模型组均给予等量生理盐水腹腔注射。实验动物在手术中均用白炽灯加热,以保持体温恒定 (肛温  $37$  °C 左右),苏醒后出现血管栓塞的同侧 Homor 征和对侧肢体运动障碍即为模型成功,反之则被剔除。造模成功缺血  $2$  h 再灌注  $6$  h 后处死动物。

1.3.4 神经行为学评分 参考 Zea-Longa<sup>[5]</sup>的 6 级评分法在术后  $3$  h 进行评分。

1.3.5 脑梗死灶测量 大鼠在缺血  $2$  h 再灌注  $6$  h 后, $10\%$ 水合氯醛深麻醉后处死,迅速断头取脑,放入冰箱冻至适当硬度,取其前脑,从视交叉处由额极到枕极切成  $2$  mm 厚的冠状面脑片,置入  $2\%$  TTC 溶液中  $37$  °C 孵育  $30$  min。然后用  $4\%$  甲醛缓冲液固定。 $24$  h 后拍照并输入计算机,用多媒体病理图像分析仪 (CMIAS 008 型,北京航空航天大学研制)及 AUTO-CAD 图像处理软件计算梗死面积前脑总面积和梗死

灶面积 (粉红色区为正常脑组织,白色区为梗死区),并根据梯形公式,算出相应的体积以及梗死灶体积百分比。

1.3.6 脑组织匀浆的制备 取缺血侧脑组织块约  $0.3$  g (电子天平称量),用冰冷生理盐水冲洗,除去血液,滤纸拭干,称重放入  $5 \sim 10$  ml 的小烧杯内。用移液管量取预冷的生理盐水,体积总量是组织块重量的  $9$  倍,用移液管或移液器取总量  $2/3$  的生理盐水于烧杯中,用眼科小剪尽快剪碎组织块 (天热时操作要在冰水浴中进行,将盛有组织的小烧杯放于冰水中)。将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中,再将剩余的  $1/3$  冷生理盐水冲洗残留在烧杯中的碎组织块,一起倒入匀浆管中进行匀浆。左手持匀浆管,将下端插入盛有冰水混合物的器皿中匀浆,用低温低速离心机将匀浆以  $3000 \sim 4000$  r/min 离心  $10 \sim 15$  min,取上清液分装,放  $-20$  °C 冰箱保存备用。

1.3.7 MDA、GSH-PX、SOD 的测定 采用 721 分光光度计测定。

1.3.8 病理学观察 各组动物到达预定时间后再给予水合氯醛腹腔注射深度麻醉,手术充分暴露心脏,9号注射针头通过左心室心尖部穿刺插管至主动脉口,切开右心耳,经升主动脉快速灌注生理盐水,直到肝脏变白,然后用  $4\%$  多聚甲醛灌注约  $150 \sim 200$  ml,断头取脑,置  $4\%$  多聚甲醛中后固定,常规脱水包埋,切片  $5$   $\mu$ m,HE 染色,在光镜下观察病理改变。

1.4 统计学方法 结果用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 SPSS 11.0 统计软件采用单因素方差分析方法 (Oneway-ANOVA) 进行显著性检验。 $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

实验中假手术组未见有动物死亡,模型组  $3$  只动物死亡,治疗组  $2$  只动物死亡。术后解剖动物发现均为蛛网膜下腔出血致死亡,可能为操作过程中线栓刺破脑血管所致。

2.1 神经行为学及脑梗死体积 经 TTC 染色后,模型组 ( $n=5$ ) 及 GSH 治疗组 ( $n=5$ ) 大鼠皮质及纹状体梗死区呈苍白色,未缺血区呈红色,与 MCA 支配的脑区一致,说明造模成功。假手术组 ( $n=4$ ) 动物无明显神经功能缺损 (评分为  $0$ ),治疗组及对照组动物均有不同程度的神经功能缺损,评分分别为 ( $1.80 \pm 0.69$ ) 分和 ( $2.75 \pm 0.44$ ) 分,治疗组动物神经功能优于模型组 ( $P < 0.05$ );治疗组梗死体积 ( $18.55 \pm 5.61$ )  $\text{mm}^3$ ,小于模型组 ( $28.71 \pm 4.68$ )  $\text{mm}^3$  ( $P < 0.05$ ),假手术组未见梗死灶。

2.2 MDA、GSH-PX、SOD 测定 与假手术组比较,模型组脑组织 MDA 含量升高, SOD、GSH-PX 活力下降。

治疗组缺血再灌注后的 SOD、GSH-PX活力提高,MDA含量降低。见表 1。

2.3 病理学观察 假手术组 (n=3):细胞形态正常,核仁清楚,神经细胞胞体有突起伸出,神经细胞及毛细血管周围间隙正常,间质内未见出血、坏死及水肿(封三彩图 1.1);模型组 (n=3):右侧大脑缺血范围内皮质水肿明显,神经细胞外周隙扩大,血管周隙增宽,在皮层和纹状体可见大量死亡神经元,可见筛状坏死灶,间质水肿明显(封三彩图 1.2);治疗组 (n=4):大脑皮层神经细胞层次尚清晰,锥体细胞形态略欠规则,体积稍大,胞浆及核轻度深染,部分细胞突起消失,未见明显坏死灶,神经细胞及毛细血管周围间隙稍大,但明显小于缺血模型组,皮质及间质水肿也轻于缺血模型组(封三彩图 1.3)。

表 1 各组 MDA、GSH-PX、SOD测定比较

组别	n	MDA( nmol / prot)	SOD( U / mgprot)	GSH-Px( U)
假手术组	7	6.55 ±2.44	224.16 ±69.65	26.29 ±5.07
模型组	7	18.48 ±5.73 <sup>a</sup>	118.24 ±40.73 <sup>a</sup>	9.41 ±3.56 <sup>a</sup>
治疗组	7	12.64 ±4.21 <sup>a, b</sup>	394.37 ±51.45 <sup>a, b</sup>	15.09 ±3.52 <sup>a, b</sup>

注: a:与假手术组比较, P<0.05; b:与模型组比较, P<0.05。

3 讨论

GSH-PX作为机体内最重要的抗氧化系统之一,是机体分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 最重要的酶。GSH则是 GSH-PX不可缺少的底物。谷胱甘肽为一种广泛存在于动植物组织中,是细胞质中自然合成的一种三肽,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸残基组成。以还原型 (GSH)和氧化型 (GSSG)两种形式存在,在体内 90%以上以还原形式存在,在细胞抗氧化系统中是关键成分。它可以非酶促反应的形式直接与氧自由基结合,达到清除氧自由基的目的,同时,它也可作为 GSH-PX催化反应中的底物,起到清除氧自由基的作用<sup>[2]</sup>。在脑缺血时,因缺血、缺氧、细胞内酸中毒,使细胞所处的微环境发生巨大的变化,脑内谷胱甘肽的代谢也随之发生变化。有研究表明,在缺血 2 h,再灌注 1~3 h之间,细胞内线粒体谷胱甘肽水平持续下降,同时脑内总的组织谷胱甘肽水平也可见明显下降<sup>[7]</sup>。显然,脑缺血时脑内线粒体谷胱甘肽水平的耗竭明显增加了脑组织对氧自由基损害的易感性。有实验证实:外源性 GSH能完整通过血脑屏障进入脑细胞,起到降低氧自由基,提高氧化酶活性并抑制脂质过氧化物形成的作用<sup>[8]</sup>。谷胱甘肽及其制剂自问世以后,经过近多年来的临床应用,其应用领域也不断扩大,被广泛用于急慢性肝脏损伤、肿瘤的放化疗、肾脏疾病、急性心肌梗塞、病毒性心肌炎、应激性溃疡等许多方面。但对谷胱甘肽在局灶性脑缺

血时的应用并无相应的文献支持,也未曾见到对其具体脑保护作用的研究。

脑缺血再灌注损伤的机制十分复杂,随着研究的深入,人们逐渐证实,自由基连锁反应及炎症反应均在其中发挥极其重要的作用。脑缺血特别是再灌注时自由基大量生成,同时机体内的自由基防御系统如 SOD、GSH-PX等酶活力下降不足以清除过量的自由基,大量的氧自由基广泛攻击富含不饱和脂肪酸的神经元膜和微血管,引起脂质过氧化“瀑布状”的连锁反应和微循环障碍,致使大量的神经元受损<sup>[9]</sup>。MDA可作为体内自由基水平的间接反映指标,代表损伤涉及脂质过氧化反应的程度。本研究结果显示,模型组大鼠脑缺血再灌注后,脑内 GSH-PX、SOD活力明显下降,而 MDA含量则显著增加;与模型组比较, GSH可提高脑内 GSH-PX、SOD活力,降低 MDA含量。

本研究结果提示,外源性谷胱甘肽可通过血脑屏障进入脑内提高 GSH-PX、SOD活力,降低 MDA含量,增强机体清除自由基的能力,减少大鼠脑组织氧自由基的堆积而发挥对脑缺血再灌注时的保护作用。

[参考文献]

[1] Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury[ J]. Neurotrauma, 2000, 17(10): 871 - 890.

[2] Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain[ J]. Pro Neurobiol, 2000, 62: 649 - 671.

[3] Cassarino DS, Bennet Jr JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration [ J]. Brain Res Rev, 1999, 29: 1 - 25.

[4] Belayev L, Ofelia F, Alonso BS. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: neurological and pathological evaluation of an improved model[ J]. Stroke, 1996, 27: 1616 - 1623.

[5] Zea Longa EL, Weinstein PR, Canson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[ J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[6] 石京山,江文德. 外源性谷胱甘肽在大鼠的药代动力学和器官组织分布[ J]. 上海医科大学学报, 1996, 23(2): 122 - 124.

[7] Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry - glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation[ J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 242: 1 - 9.

[8] Ennis SR, Kawai N, Ren XD, et al. Glutamine uptake at the blood-brain barrier is mediated by N-system transport[ J]. Neurochem, 1998, 71: 2565 - 2573.

[9] Yoshiha S, Abe K, Basto R, et al. Influence of transient ischemia on lipidsoluble antioxidants, free fatty acid and energy metabolites in rat brain[ J]. Brain Res, 1982, (2): 245 - 307.

(收稿日期: 2006-01-09 修回日期: 2006-09-20)

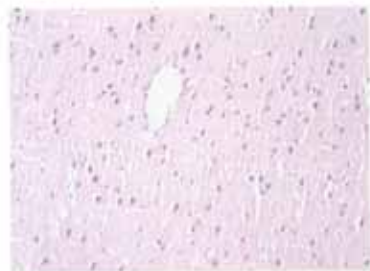


图 1.1 假手术组脑组织(H&E 染色, 100 ×)



图 1.2 缺血模型组脑组织(H&E 染色, 200 ×)

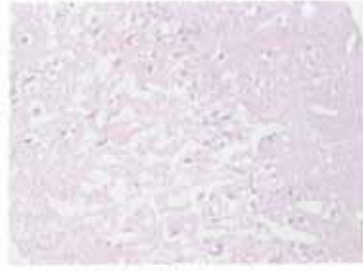


图 1.3 GSH 治疗组脑组织(H&E 染色, 200 ×)