

格列本脲改善小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后期的神经运动功能障碍

董银凤¹, 张 华¹, 孙志岭¹, 黄 旭^{2*}

(¹南京中医药大学护理学院内科护理教研室, 江苏 南京 210023; ²南京医科大学第一附属医院科技处伦理办公室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究格列本脲对脑缺血再灌注损伤小鼠后期神经运动功能障碍的影响。方法:应用 C57BL/6 小鼠,制备局灶性脑缺血再灌注损伤模型,经灌胃给予格列本脲(20 mg/kg)连续治疗 5 周,每周监测小鼠的空腹血糖与体重变化。通过角测试、圆柱体测试、转棒实验及踏空实验等观察小鼠的行为学改变,免疫组织化学染色法观察缺血脑区星形胶质细胞的变化。结果:格列本脲(20 mg/kg)连续治疗 5 周,不影响小鼠的空腹血糖;与对照组比较,从治疗第 2 周开始,能显著增加小鼠的体重($P < 0.01$);从治疗第 3 周开始,能减少踏空实验中小鼠的足失误率($P < 0.05$)及延长转棒实验中的棒上停留时间($P < 0.05$),并减少缺血脑区胶质瘢痕的形成范围($P < 0.05$)。结论:格列本脲连续治疗能够促进小鼠脑缺血再灌注损伤后期神经运动功能的恢复。

[关键词] 格列本脲;脑缺血;踏空实验;转棒实验;星形胶质细胞

[中图分类号] R322.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-917-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160804

Glibenclamide improves long-term neurological deficits of cerebral ischemia/reperfusion injury in mice

Dong Yin Feng¹, Zhang Hua¹, Sun Zhiling¹, Huang Xu^{2*}

(¹Department of Internal Medicine, Nursing School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023;

²Office of Ethics in Science and Technology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of glibenclamide on long-term neurological deficits of cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Methods:** C57BL/6 mice were performed to establish the cerebral ischemia/reperfusion injury models by occluding the right middle cerebral artery (MCAo). Then, we continuously treated them with glibenclamide (20 mg/kg) by intragastric administration for 5 weeks. We monitored the fasting blood sugar (FBS) and weight of mice per week. We observed the neurobehavioral changes by behavior tests including corner test, cylinder test, rotarod test and foot fault test. Moreover, we observed the changes of astrocytes by immunohistochemistry staining. **Results:** Continuous treatment with glibenclamide for 5 weeks had no effect on the FBS. Compared to the control group, it significantly increased the body weight at the 2nd week of treatment ($P < 0.01$), and at the 3rd week of treatment, it reduced the foot fault rate ($P < 0.05$) and prolonged the time of animals remained on the rotating rod ($P < 0.05$). In addition, it reduced the area of glial scar ($P < 0.05$). **Conclusion:** Continuous treatment with glibenclamide can advance long-term functional recovery of cerebral ischemia/reperfusion injury in mice.

[Key words] glibenclamide; cerebral ischemia; foot fault test; rotarod test; astrocyte

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 917-922]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81402906);江苏省自然科学基金(BK20151566);江苏省高校自然科学基金面上项目(14KJB310010);江苏省高校优势学科建设工程(JX10231802)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: huangxu0001@sina.com

脑卒中是目前威胁人类健康的重大疾病之一,是全球首要的致残性疾病^[1]。由脑卒中导致的神经运动功能障碍是影响卒中患者后期生活质量的重要因素,并且对社会及家庭造成巨大的负担^[2]。促进脑卒中患者后期的神经运动功能康复,是脑卒中临

床治疗的重点。格列本脲是第二代磺酰脲类临床常用的口服降糖药,主要适用于对饮食控制和锻炼疗效不佳的轻、中度 2 型糖尿病患者的治疗,其作用机制主要通过阻断 ATP 敏感性钾通道,阻止钾外流而促进钙内流,从而促进胰岛素的释放^[3]。Simard 等^[4-8]分别从体内、外研究证明了格列本脲对脑缺血急性期损伤的保护作用,并提出此作用并不依赖于其降糖效应,可能是由于调节磺酰脲类受体(SUR1)而发挥对 Ca^{2+} 的调节。格列本脲对脑缺血急性期损伤的神经保护作用在人体药物临床实验中也逐步被证实^[9-12]。研究还发现在脑缺血后 24 h 连续给予格列本脲治疗可以提高小鼠脑缺血损伤后期的学习与记忆功能^[13]。那么,脑缺血后长期给予格列本脲治疗对脑缺血后期神经运动功能的影响如何?本研究通过观察脑缺血后长期连续给予格列本脲对缺血性脑损伤所致小鼠神经运动功能的影响,揭示格列本脲对缺血性脑卒中后期神经运动功能障碍的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6 雄性小鼠(合格证编号:201504498,江苏大学实验动物中心),饲养适应 7 d 后用于实验,实验时小鼠体重为 (21 ± 2) g。自由饮水和摄食,室温控制在 22~24℃,相对湿度为 50%~60%,每日光照与黑暗时间各 12 h。

格列本脲(g0639, Sigma 公司,美国)。兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP, 抗体稀释比 1:1 000, Abcam 公司,美国),兔源性二抗(稀释比为 1:2 000, SAB 公司,美国)。二氨基联苯(diaminobenzidin, DAB, 武汉博世德公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与给药

小鼠随机分为格列本脲组(20 mg/kg)和溶剂对照组(0.9%生理盐水注射液),每组 10 只。脑缺血后 1 d 开始给药,每天灌胃给药 1 次,连续给药 5 周。

1.2.2 局灶性脑缺血再灌注损伤模型

小鼠于手术前禁食 4~6 h,经腹腔注射给予水合氯醛(3.5 mg/kg)进行麻醉。参照 Longa 改良法,应用 6-0 硅胶包被的线栓(6023PK, Doccol Corp, 美国)栓塞小鼠右侧的大脑中动脉。缺血 1 h 后,取出线栓,并松开颈总动脉进行血流复灌。手术过程中小鼠的体温均维持在 36.5~37.2℃,术后自由摄食与饮水。

1.2.3 角测试和圆柱体测试

角测试和圆柱体测试实验一般用于评价小鼠前肢的感觉功能及非对称性旋转行为。小鼠通过胡须和前肢的触觉来感受外界的物体位置,从而做出相应的行为学反应,包括旋转、肢体收缩及接触圆柱体内壁等,通过比较小鼠头部的旋转频率及肢体接触圆柱体内壁的情况等来比较其感觉和前肢的非对称性旋转行为的反应。分别于脑缺血后第 3 天和 1、2、3、4、5 周进行角测试和圆柱体测试实验。角测试参考文献^[14],将小鼠置于自制的夹板(30 cm×20 cm×1 cm,夹角为 30°)之间,面朝夹角处,当小鼠进入夹角时,会向前上攀爬并转身。记录每只小鼠 10 次完整的转向过程,根据公式^[14]计算右侧转向的百分率。圆柱体测试参考文献^[15],小鼠置于直径 9 cm 高 15 cm 的透明玻璃烧杯内,连续观察 10 次完整的运动过程,按以下标准记录前肢的运动:①单独使用一侧前肢接触的次数;②同时使用左右前肢接触的次数记“B”;③先用一侧前肢碰壁后,另一前肢也碰壁,但右前肢未离开,记为右前肢独立运动+B。最后,根据公式^[15]计算分值。

1.2.4 足失误率和转棒实验

足失误率测试和转棒实验是常用于评价小鼠四肢的运动协调能力的行为学测试方法,主要通过分别记录其足失误的频次和棒上停留的时间来比较其四肢的运动协调性。分别于脑缺血后第 3 天和 1、2、3、4、5 周进行足失误率测试和转棒实验。足失误率测试参考文献^[15],将小鼠放置在升高的平行栏杆上,当通过栏杆时肢体滑落接触到下方的感应装置,记录为 1 次足失误(仪器及软件为美国 Clever Sys 公司产品)。记录小鼠在平台上爬行 3 min 的足失误次数,每只小鼠测试 3 次,取平均值,每次测试间隔 15 min。最后计算 3 min 内小鼠的平均足失误次数。转棒实验参考文献^[14],在测试前 3 d,将小鼠按 8 r/min 转速训练 3 次,每次 5 min,两次训练之间间隔 20 min 作为疲劳恢复时间。实验当天,所有小鼠均按转速 16 r/min 进行测试,记录小鼠在转棒仪上连续行走的时间。

1.2.5 免疫组织化学染色法

给药 5 周后,经腹腔注射给予水合氯醛(3.5 mg/kg)进行小鼠麻醉,经左心室分别灌注生理盐水和 4%多聚甲醛,将脑组织取出后置于 4%多聚甲醛中固定。脑组织经常规梯度脱水,切片。0.01 mol/L PBS 洗涤脑片 3 次,3% H_2O_2 室温孵育 30 min。应用 5% BSA(含 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液)室温封闭 1 h,加入兔

抗 GFAP 抗体,4℃过夜。使用 0.01 mol/L PBS 将脑片洗涤 3 次,加二抗并室温孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,DAB 避光染色 5 min,光镜下观察脑内 GFAP 的染色情况。

1.2.6 胶质瘢痕面积的计算

参考文献[15],随机选取每只小鼠的 GFAP 免疫组化染色切片 6 张,并在显微镜下将每张切片随机选取 6 个视野,通过 Image Pro Plus 5.0 软件进行分析计算每个视野中 GFAP 深染呈胶质瘢痕区域的组织面积。

1.2.7 尼氏染色

将上述冰冻切片放入 0.01 mol/L PBS 中洗涤脑片 3 次,滴加尼氏染液(2%),37℃ 染色 5 min,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 1 min。经 95% 乙醇脱水 10 s,换用新鲜的 95%乙醇再脱水 10 s,二甲苯透明 5 min,中性树脂封片。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学分析软件,实验数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验进行分析比较。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 格列本脲促进缺血性脑损伤小鼠后期体重的恢复

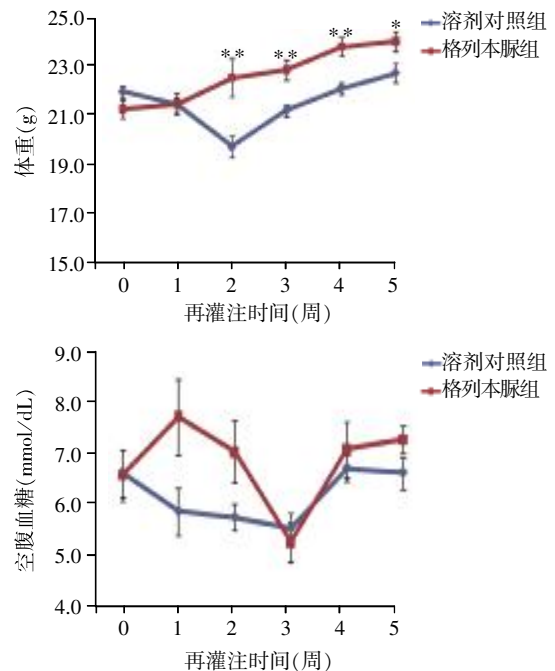
基础状态下,两组小鼠之间的体重无差异;经脑缺血再灌注损伤造模并给予格列本脲干预治疗之后,与溶剂对照组相比,格列本脲组从给药第 2 周后开始,体重均出现显著增加($P < 0.01$,图 1)。另外,通过监测脑缺血后不同时间点内小鼠的空腹血糖,发现两组小鼠的空腹血糖在治疗前后并未出现显著差异(图 1)。

2.2 格列本脲对缺血性脑损伤小鼠的非对称旋转行为无显著影响

角测试和圆柱体测试实验这两种行为学测试方法发现,格列本脲组与溶剂对照组均无显著差异(图 2)。结果提示格列本脲治疗并不能明显改善脑缺血再灌注损伤后期小鼠前肢的感觉功能和非对称性旋转行为。

2.3 格列本脲显著改善缺血性脑损伤小鼠四肢的运动协调能力

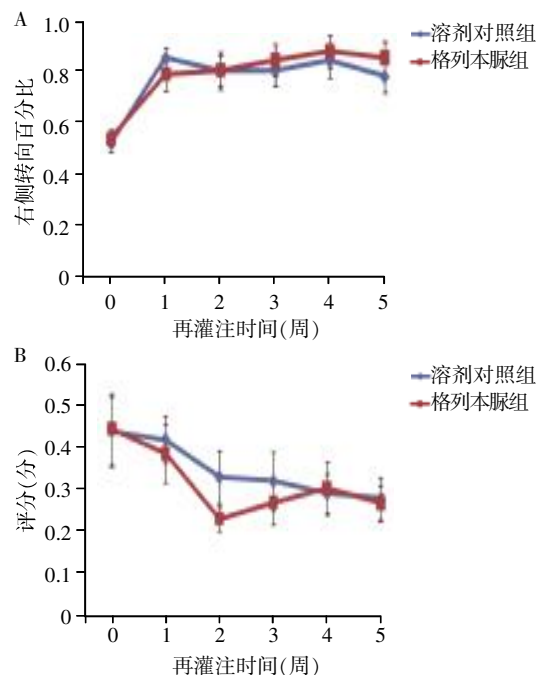
足失误率结果显示,与溶剂对照组相比,格列本脲组小鼠的足失误率从治疗第 3 周开始出现显著减少($P < 0.05$),至治疗第 5 周效果最佳($P < 0.01$,图 3);同时,自治疗第 3 周开始,格列本脲组小鼠的棒上



与相应时间点的溶剂对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 格列本脲连续治疗对缺血性脑损伤小鼠体重和血糖的影响

Figure 1 Effects of continuous glibenclamide therapy on the body weight and blood glucose after ischemic brain injury in mice

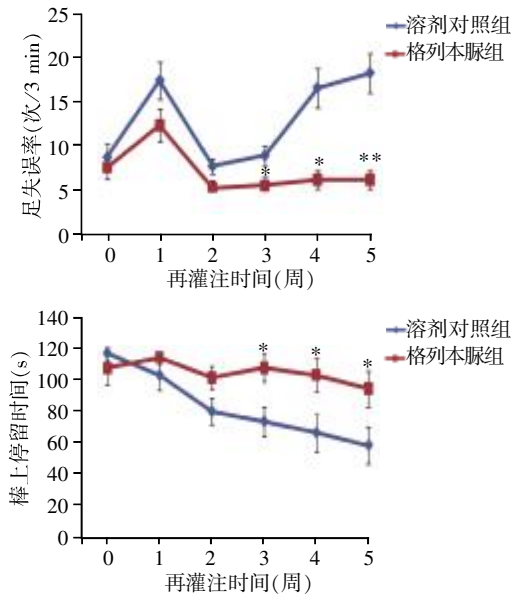


A:角测试结果;B:圆柱体测试结果。

图 2 格列本脲连续治疗不影响缺血性脑损伤小鼠的非对称性旋转行为

Figure 2 Continuous glibenclamide therapy had no effect on the rotation of asymmetric behavior after ischemic brain injury in mice

停留时间也较溶剂对照组小鼠显著延长 ($P < 0.05$, 图 3)。结果提示格列本脲治疗能明显改善脑缺血再灌注损伤小鼠后期四肢的运动协调能力。



与相应时间点的溶剂对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 3 格列本脲连续治疗明显改善缺血性脑损伤小鼠四肢的运动协调能力

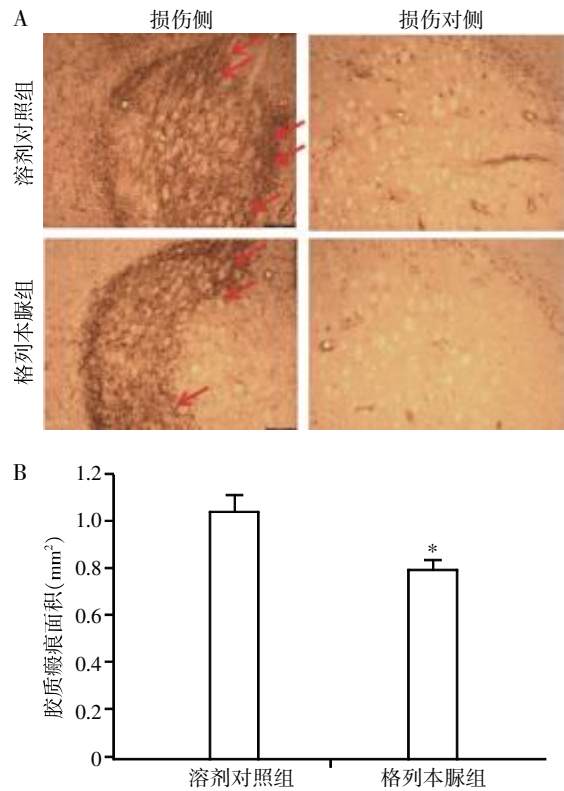
Figure 3 Continuous glibenclamide therapy significantly improved the limb motor coordination of mice after ischemic brain injury

2.4 格列本脲减少脑缺血再灌注损伤后期胶质瘢痕的形成

胶质瘢痕的形成是缺血性脑损伤后期组织修复的重要指标,本研究应用 GFAP 免疫组织化学染色标记胶质瘢痕组织情况。小鼠健侧脑组织 GFAP 染色浅、分布均匀;而损伤侧脑组织在缺血脑区(主要是纹状体)出现明显的 GFAP 深染且细胞增生明显,细胞呈交织错落的致密网状(胶质瘢痕,图 4A)。通过计算损伤侧缺血脑区(纹状体)的胶质瘢痕面积发现,与溶剂对照组 [$(1.04 \pm 0.14)\text{mm}^2$] 相比,格列本脲组小鼠损伤侧脑组织胶质瘢痕的面积 [$(0.79 \pm 0.09)\text{mm}^2$] 显著减少 ($P < 0.05$, 图 4B)。

2.5 格列本脲改善脑缺血再灌注损伤所致神经细胞数量的减少

为比较缺血及给药干预对小鼠神经损伤的影响,本研究在尼氏染色中补充了一个没有造模的小鼠的脑组织切片,作为正常对照组。结果显示,正常对照组小鼠右侧纹状体的神经细胞形态与数目正常,经尼氏染色后呈深染的紫色,胞核与胞浆清楚,尼氏小体染色清晰(图 5);溶剂对照组小鼠经缺血



A: 代表性的 GFAP 免疫组织化学染色图片($\times 200$), 箭头所示为具有代表性的细胞形态变化; B: 胶质瘢痕面积的统计结果, 与溶剂对照组比较, * $P < 0.05$ 。

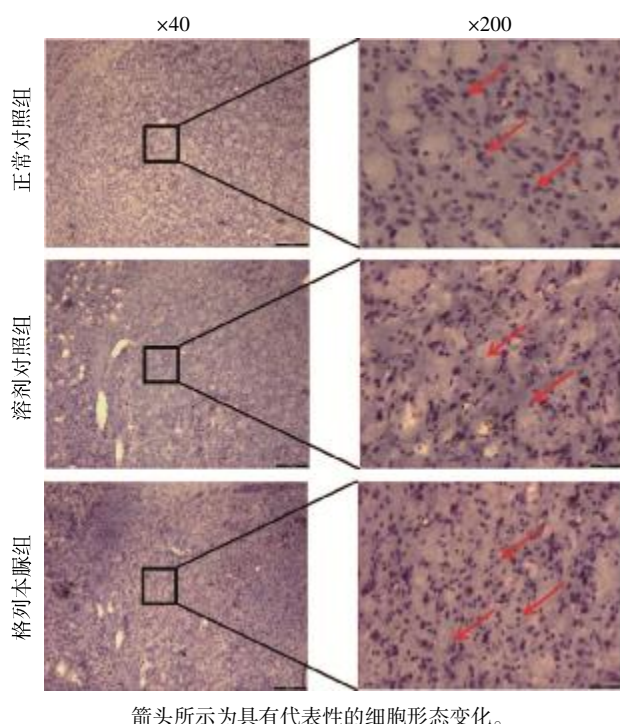
图 4 格列本脲连续治疗显著减小脑缺血小鼠后期缺血脑区形成的胶质瘢痕

Figure 4 Continuous glibenclamide therapy significantly decreased glial scar in the ischemic brain area after ischemic brain injury

1 h 再灌 6 周后, 右侧(损伤侧)纹状体的梗死中心区神经细胞数目明显减少, 细胞淡染, 细胞核固缩, 核仁消失, 周围有许多空泡形成(图 5); 格列本脲组小鼠经格列本脲连续治疗 5 周后, 右侧(损伤侧)纹状体的梗死中心区神经细胞胞核浓缩深染、固缩, 胞体畸形, 周围有少量空泡形成(图 5)。

3 讨论

本研究结果显示, 脑缺血后 24 h 开始灌胃给予格列本脲 (20 mg/kg), 每天给药 1 次, 连续给药 5 周, 对小鼠血糖并没有产生显著影响, 但能显著促进缺血性脑损伤后小鼠体重的恢复。此外, 通过转棒实验和足失误率观察发现, 其能够显著提高缺血性脑损伤小鼠四肢的运动协调能力, 而对其感觉功能和非对称性旋转行为没有显著影响。本研究揭示了长期给予格列本脲对改善缺血性脑损伤小鼠后期神经运动功能障碍的治疗效应。



箭头所示为具有代表性的细胞形态变化。

图 5 格列本脲连续治疗改善脑缺血再灌注损伤所致神经细胞数量的减少

Figure 5 Continuous glibenclamide therapy significantly attenuated brain ischemic injury-induced decrease of neurocytes

格列本脲作为临床一线的口降糖药,人的最大剂量是 15 mg/d,此作用仅限于其降糖作用。Simard 等^[4]研究发现皮下微泵注射低剂量格列本脲(50 nmol/L,75 ng/h)能够减小脑缺血 2 d 和 7 d 后的脑梗死体积;进一步验证皮下微泵注射低剂量格列本脲(10~33 μ g/kg)对栓子阻塞和线栓阻塞所致的短暂性和永久性脑缺血大鼠均有神经保护作用^[5];并且将给药方式调整为腹腔注射(10 μ g/kg)加皮下微泵注射(75 ng/h)时,能将对脑缺血的神经保护作用的时间窗延长至 10 h^[7]。而在脑缺血后 6 h 给予尾静脉注射格列本脲(0.2 μ g/次),24 h 内连续给药 3 次,虽对大鼠脑缺血后脑梗死体积没有影响,但能明显促进神经细胞的增殖与迁移,从而提高脑缺血大鼠的学习与记忆功能^[13]。因此,格列本脲对缺血性脑损伤的神经保护作用与其给药方式和时间密切相关。本研究结合 Simard 等^[6]的研究成果,结合格列本脲的临床用药剂量并通过预实验摸索后,确定经口灌胃给药、将给药时间延长至缺血后 24 h 并连续给药 5 周,观察格列本脲对小鼠脑缺血损伤长期的治疗效应。结果显示,格列本脲长期连续给药在不影响血糖的情况下,能显著增加小鼠体重,改

善小鼠的运动协调能力,减少小鼠的足失误差,并延长其棒上停留时间。研究证明了经口灌胃给予格列本脲[20 mg/(kg·d)]连续治疗 5 周能改善脑缺血模型小鼠后期的运动协调能力。因此,本研究进一步拓宽了格列本脲对缺血性脑损伤的神经保护作用研究。

为揭示格列本脲对脑缺血损伤神经保护作用的相关作用机制,本研究应用 GFAP 免疫组织化学染色和尼氏染色观察了格列本脲连续治疗 5 周对脑缺血后期胶质细胞与神经细胞功能与形态的影响。目前研究已阐明与脑缺血损伤有关的病理机制主要包括兴奋性毒性、氧化应激损伤、离子稳态的失衡、自噬、凋亡、炎症免疫等^[2]。星形胶质细胞介导脑缺血损伤的多种机制的调节,在脑缺血中的作用近年受到重视^[16-17]。由于星形胶质细胞在缺血性脑损伤过程中呈动态变化过程,在脑缺血早期被激活后发生增殖与活化,介导炎症反应,影响神经元的存活;而在脑缺血后期形成胶质瘢痕,对脑缺血后期的神经功能恢复至关重要^[5]。胶质瘢痕形成后,一方面可以限制缺血脑区神经再生与血管新生,另一方面对缺血脑区细胞的炎症免疫功能也有调节作用,从而改善脑缺血后期的神经运动功能障碍^[18-19]。靶向胶质瘢痕的调节,是脑缺血研究的重要方向^[20]。本研究通过 GFAP 免疫组织化学染色法和尼氏染色法比较胶质瘢痕形成的面积及神经细胞数目与形态发现,格列本脲连续治疗 5 周能显著减少脑缺血后期胶质瘢痕的形成面积,减少缺血性脑损伤所致神经细胞数目的减少及改善细胞形态的变化,与其改善小鼠后期的神经运动功能的作用一致。因此,本研究提示长期给予格列本脲治疗,对小鼠脑缺血后期的胶质瘢痕形成有影响。

本研究揭示了长期给予格列本脲治疗能改善脑缺血损伤小鼠的神经运动功能障碍,并减少脑缺血后期胶质瘢痕的形成。本研究确证了格列本脲长期给药对缺血性脑损伤的神经保护作用,拓宽了其治疗的有效时间窗和给药途径。因此,后期应加强其对脑缺血长期治疗神经保护效应的机制研究。

[参考文献]

- [1] Broderick JP,William M. Feinberg lecture:stroke therapy in the year 2025:burden,breakthroughs,and barriers to progress[J]. Stroke,2014,35(1):205-211
- [2] Kaur H,Prakash A,Medhi B. Drug therapy in stroke:from preclinical to clinical studies[J]. Pharmacology,2013,92(5/6):324-334

- [3] Riddle MC. Editorial:sulfonylureas differ in effects on ischemic preconditioning--is it time to retire glyburide? [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2003,88(2):528-530
- [4] Simard JM,Chen M,Tarasov KV,et al. Newly expressed SUR1-regulated NC (Ca-ATP)channel mediates cerebral edema after ischemic stroke[J]. *Nat Med*,2006,12(4):433-440
- [5] Simard JM,Yurovsky V,Tsymbalyuk N,et al. Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke[J]. *Stroke*,2009,40(2):604-609
- [6] Simard JM,Tsymbalyuk N,Tsymbalyuk O,et al. Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke[J]. *Stroke*,2010,41(3):531-537
- [7] Simard JM,Woo SK,Tsymbalyuk N,et al. Glibenclamide-10-h treatment window in a clinically relevant model of stroke[J]. *Transl Stroke Res*,2012,3(2):286-295
- [8] Nistico R,Piccirilli S,Sebastianelli L,et al. The blockade of K (+)-ATP channels has neuroprotective effects in an in vitro model of brain ischemia[J]. *Int Rev Neurobiol*,2007,82:383-395
- [9] Khanna A,Walcott BP,Kahle KT,et al. Effect of glibenclamide on the prevention of secondary brain injury following ischemic stroke in humans[J]. *Neurosurg Focus*,2014,36(1):E11
- [10] Sheth KN,Kimberly WT,Elm JJ,et al. Exploratory analysis of glyburide as a novel therapy for preventing brain swelling[J]. *Neurocrit Care*,2014,21(1):43-51
- [11] Sheth KN,Elm JJ,Beslow LA,et al. Glyburide advantage in malignant edema and stroke (GAMES-RP)trial:rational and design [J]. *Neurocrit Care*,2016,24(1):132-139
- [12] Sheth KN,Simard JM,Elm J,et al. Human data supporting glyburide in ischemic stroke [J]. *Acta Neurochir*,2016,121:13-18
- [13] Ortega FJ,Jolkkonen J,Mahy N,et al. Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,2013,33(3):356-364
- [14] Doeppner TR,Kaltwasser B,Bahr M,et al. Effects of neural progenitor cells on post-stroke neurological impairment-a detailed and comprehensive analysis of behavioral tests [J]. *Front Cell Neurosci*,2014,8:338
- [15] Lopez-Valdes HE,Clarkson AN,Ao Y,et al. Memantine enhances recovery from stroke[J]. *Stroke*,2014,45(7):2093-2100
- [16] Allen NJ,Barres BA. Neuroscience:Glia - more than just brain glue[J]. *Nature*,2009,457(7230):675-677
- [17] Li Y,Liu Z,Xin H,et al. The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke [J]. *Glia*,2014,62(1):1-16
- [18] Hayakawa K,Nakano T,Irie K,et al. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,2010,30(4):871-882
- [19] Liu Z,Li Y,Cui Y,et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke[J]. *Glia*,2014,62(12):2022-2033
- [20] Choudhury GR,Ding S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke[J]. *Neurobiol Dis*,2015,85(1):234-244

[收稿日期] 2016-01-13



欢迎投稿 欢迎订阅