

碘塞罗宁对缺血性脑卒中模型小鼠的治疗作用及机制研究

李润军¹, 柴裕¹, 李伟龙¹, 王丽新¹, 张华丽^{2*}

1. 嘉峪关市中医医院 药剂科, 甘肃 嘉峪关 735100

2. 甘肃省中医药研究院 老年科, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 研究碘塞罗宁对缺血性脑卒中的治疗作用及机制。方法 线栓法制备小鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型, 假手术组不插入线栓, 对照组选用正常小鼠, 模型小鼠分为模型组和碘塞罗宁低、中和高剂量(20、40、60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 在造模开始前6 d及造模结束后1 d, 连续7 d每天1次尾iv给药。造模结束后48 h, 使用TTC法测定脑梗死体积; 激光多普勒血流仪检测局部脑血流(rCBF); ELISA法检测血清血栓素 B_2 (TXB_2)、6-酮前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平; Western blotting法检测脑组织脑源性神经营养因子(BDNF)、SRY-box转录因子2(Sox2)和神经巢蛋白(nestin)蛋白表达水平。结果 与模型组比较, 碘塞罗宁高、中、低剂量组脑梗死体积均显著减小($P < 0.05, 0.01$), rCBF均显著升高($P < 0.05, 0.01$); 碘塞罗宁高、中剂量组血清 TXB_2 水平显著降低($P < 0.01$), 高剂量组血清6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 水平显著升高($P < 0.05$); 碘塞罗宁各剂量组血清TNF- α 和IL-6水平均显著下降($P < 0.05, 0.01$); 碘塞罗宁高、中、低剂量组BDNF、nestin和Sox2的蛋白表达显著增加($P < 0.05, 0.01$)。结论 碘塞罗宁显著改善缺血性脑卒中大鼠脑梗死, 作用机制可能与抑制炎症反应、促进血管舒张、促进BDNF和神经再生标记物表达相关。

关键词: 碘塞罗宁; 缺血性脑卒中; 炎症; 血栓素 B_2 ; 6-酮前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$; 脑源性神经营养因子; SRY-box转录因子2; 神经巢蛋白
中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1078-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.009

Effect and mechanism of liothyronine on ischemic stroke model mice

LI Runjun¹, CAI Yu¹, LI Weilong¹, WANG Lixin¹, ZHANG Huali²

1. Department of Pharmacy, Jiayuguan Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiayuguan 735100, China

2. Department of Geriatrics, Gansu Institute of traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To study the therapeutic effect and mechanism of liothyronine on ischemic stroke. **Method** Line suppository preparation of middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was made in mice, the control group was not insert line switch, control group choose normal mice, model mice was divided into model group, liothyronine low, middle and high dose (20, 40 and 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, six days before model and one day after model, one times daily for 7 d tail iv drug delivery. Totally 48 h after modeling, infarct volume was determined by TTC method. Local cerebral blood flow (rCBF) was detected by laser Doppler flow analyzer. Serum levels of thromboxane B_2 (TXB_2), 6-keto-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$), tumor necrosis factor - α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were determined by ELISA. The expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), SCL-Box transcription factor 2 (Sox2) and nestin protein in brain tissues were detected by Western blotting. **Result** Compared with model group, the infarct volume was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$) and rCBF was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$) in liothyronine high, middle and low dose groups. The serum level of TXB_2 in liothyronine high and middle groups was significantly decreased ($P < 0.01$), and the serum level of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ in liothyronine high-dose group was significantly increased ($P < 0.05$). Serum TNF- α and IL-6 levels were significantly decreased in liothyronine groups ($P < 0.05, 0.01$). The protein expressions of BDNF, nestin and Sox2 were significantly increased in liothyronine groups ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Liothyronin significantly improved cerebral infarction in rats with ischemic stroke, and the mechanism may be related to inhibiting inflammatory response, promoting vasodilation, and promoting the expression of BDNF and nerve regeneration markers.

Key words: liothyronine; ischemic stroke; inflammation; thromboxane B_2 ; 6-keto-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$; brain-derived neurotrophic factor; SRY-box transcription factor 2; nestin

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 嘉峪关市科技计划资助项目(19-35)

第一作者: 李润军, 主要从事医院药学研究工作。E-mail: 1312899576@qq.com

*通信作者: 张华丽 E-mail: 1831501264@qq.com

脑卒中是我国老年人三大死亡原因之一,也是最主要的致残原因之一^[1]。缺血性脑卒中通常是由血栓或栓塞阻塞主要的大脑动脉所致,导致特定大脑区域的血流损失,在短时间内导致不可逆的组织损伤,并伴有脑水肿的快速发展^[2]。目前已经进行了针对神经保护策略的大量研究,并且在临床前研究中多种神经保护剂的治疗观察到了较好的效果^[3],但是应用于临床的种类不多且效果一般。

碘塞罗宁是人工合成的三碘甲状腺原氨酸(T₃),其可避免左甲状腺素钠需在外周组织中转化为T₃的这一过程,临床作用与甲状腺素相似,常用于甲状腺疾病、肝血管瘤、抑郁症等的治疗^[4]。研究发现,甲状腺素浓度降低与卒中严重程度之间存在正相关关系^[5]。最近的研究证明甲状腺激素(THs)对神经系统具有广泛的神经保护作用^[6]。

大脑中动脉闭塞(MCAO)模型是模拟缺血性脑卒中诱发现象的最常见模型,其特征与人类受试者相似^[7]。炎症在缺血性卒中的病理生理中起关键作用,卒中可刺激促炎性细胞因子——肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)等的产生^[8]。SRY-box 转录因子2(Sox2)和神经巢蛋白(nestin)是涉及神经发生的神经干细胞标志物^[9]。本研究建立小鼠MCAO模型,探讨碘塞罗宁对缺血性脑卒中的改善作用,以及对炎症因子和神经再生标记物的影响。

1 材料

1.1 实验动物

60只SPF级雄性C57BL/6小鼠,9~10周龄,从长生生物(辽宁)购买,实验动物生产许可证号SCXK(辽)2020-0002,在标准温度条件下以12h/12h的明暗循环饲养在笼中。所有动物实验程序均经过机构动物护理和使用委员会(IACUC,中国)的批准,实验动物规程得到了嘉峪关市中医医院动物伦理委员会的批准,伦理批号201909。

1.2 药物及主要试剂

碘塞罗宁(美国MedChem Express公司,CAS号6893-02-3,质量分数99.82%);2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC,中国西唐生物公司);4%多聚甲醛(索莱宝,中国);血栓素B₂(TXB₂);6-酮前列腺素F_{1a}(6-keto-PGF_{1a});TNF- α 和IL-6 ELISA检测试剂盒(美国R&D Systems公司);RIPA裂解缓冲液(Solarbio,中国北京);抗BDNF、抗nestin和antiSox2(美国Abcam公司);山羊抗兔IgG二抗(美国Sigma-Aldrich公司);增强型化学发光(ECL)试剂盒(凯基

生物,中国)。

1.3 主要仪器

图像分析软件(Image-Pro Plus 5.1,美国);激光多普勒血流仪(LDF,PERIMED,中国北京);显微镜(Olympus,日本);PVDF膜(Sigma-Aldrich,美国)。

2 方法

2.1 动物模型的制备、分组及给药^[7]

使用5.0%异氟烷麻醉小鼠,暴露颈部血管,分离出右颈外动脉分支;将0.25 mm尼龙单丝插入右颈外动脉,闭塞2 h后,缓慢拔出插入的细丝,然后小心地闭合颈部切口,制备MCAO模型。用相似的外科手术程序对10只小鼠进行处理,不插入细丝,作为假手术组。

将MCAO小鼠随机分为4组:模型组和碘塞罗宁低、中、高剂量(20、40、60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,在造模开始前6 d及造模结束后1 d,连续7 d每天1次尾iv给药。假手术组和对照组包含10只小鼠,给予与碘塞罗宁低剂量组同体积生理盐水。

2.2 脑梗死体积检测

造模结束后48 h,使用TTC测定脑梗死体积。每组选取3只动物,实施安乐死并迅速收集大脑,将脑组织切成5个冠状切片(3 mm厚),在37 °C下用2%的TTC溶液染色20 min,用4%多聚甲醛进行固定,记录TTC染色的切片,并通过image J图像分析软件计算脑梗死体积。将病变体积计算为对侧半球体积的百分比,以补偿脑水肿的影响。

脑梗死体积百分率=[总梗死体积-(完整的同侧半球体积-完整的对侧半球体积)]/对侧半球体积

2.3 局部脑血流(rCBF)检测

造模结束后48 h采用LDF检测rCBF。穿刺手术前大鼠俯卧固定,取颅顶正中切口,于冠状缝旁5 mm处电钻钻1个直径约3 mm的平底小孔,用立体定向仪的微操纵臂将LDF探头垂直置于硬脑膜上,LDF探头与LDF血流仪相连,通过微机屏幕连续记录rCBF。LDF探头经固定得到合适的rCBF信号,在整个实验过程中保持探头的位置和深度不变。

2.4 ELISA法检测血清TXB₂、6-keto-PGF_{1a}、TNF- α 和IL-6水平

造模结束后48 h,眼眶取血,1 000 $\times$ g离心15 min分离血清,根据试剂盒说明书,检测小鼠的血清TXB₂、6-keto-PGF_{1a}、TNF- α 和IL-6水平。

2.5 Western blotting法检测BDNF、nestin和Sox2的蛋白相对表达水平

造模结束后48 h,每组选取4只动物取脑,RIPA

裂解缓冲液用于提取总蛋白质。蛋白质转到12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上,然后转移至PVDF膜上。在含有0.05%聚山梨酯-20缓冲液的Tris缓冲盐溶液(TBS)中洗涤后,将PVDF膜与抗BDNF、抗nestin和antiSox2抗体在4℃下孵育过夜,在37℃进一步偶联过氧化物酶的山羊抗兔IgG二抗。使用增强型化学发光(ECL)试剂盒可视化蛋白质上的图像。最后,使用Image J分析软件(美国)对条带进行定量,内参蛋白选用 β -actin。

2.6 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,在Prism(GraphPad)软件中进行统计分析。单因素方差分析(ANOVA)和Bonferroni检验用于比较组之间的变量。

3 结果

3.1 碘塞罗宁对rCBF、脑梗死体积的影响

在对照组和假手术组中,未观察到梗死区域;在模型组中,可见明显的梗死区域;与模型组相比,碘塞罗宁明显减小了梗死区域。与模型组比较,碘塞罗宁高、中、低剂量组梗死体积均显著减小($P < 0.05, 0.01$)。使用LDF监测rCBF显示,与假手术组

比较,模型组血流量降低至基线的20%以下,差异显著($P < 0.01$);与模型组比较,碘塞罗宁高、中、低剂量组rCBF均显著升高($P < 0.05, 0.01$)。且作用均呈剂量相关性。结果见图1。

3.2 碘塞罗宁对血清TXB₂和6-keto-PGF1 α 水平的影响

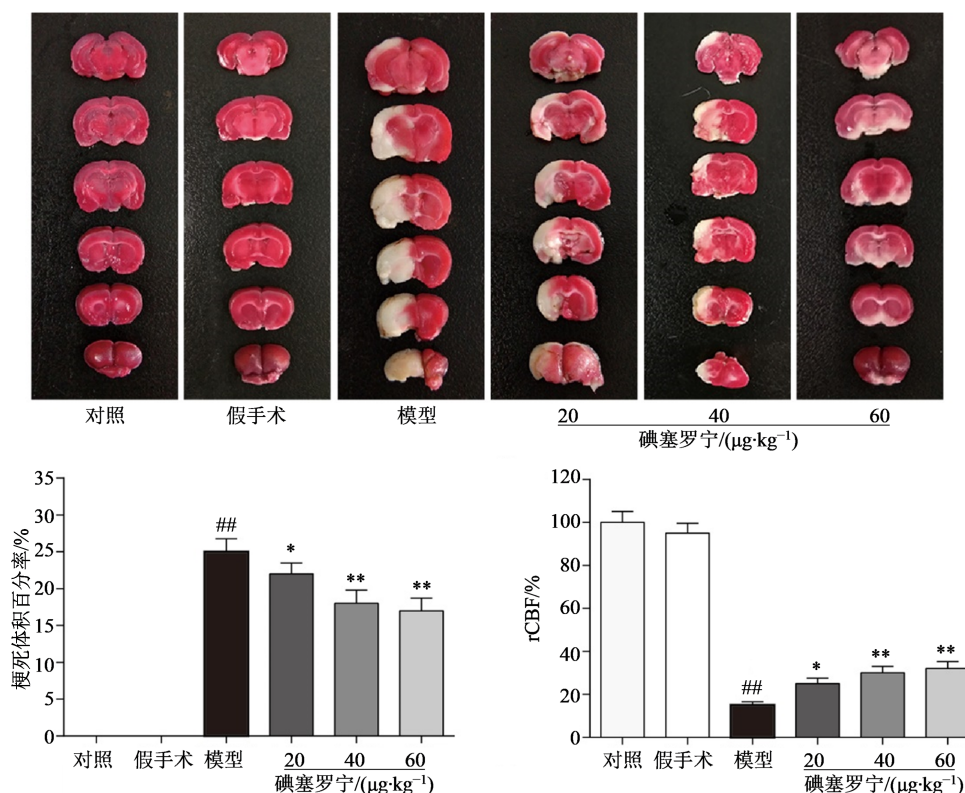
与假手术组比较,模型组TXB₂血清水平显著升高,6-keto-PGF1 α 血清水平显著降低($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,碘塞罗宁高、中剂量组TXB₂血清水平显著降低($P < 0.01$),高剂量组6-keto-PGF1 α 血清水平显著升高($P < 0.05$)。结果见图2。

3.3 碘塞罗宁对血清TNF- α 和IL-6水平的影响

与假手术组小鼠比较,模型组小鼠血清TNF- α 和IL-6水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,碘塞罗宁各剂量组血清TNF- α 和IL-6水平显著下降($P < 0.05, 0.01$),且作用均呈剂量相关性。结果见图3。

3.4 碘塞罗宁对BDNF、nestin和Sox2蛋白表达的影响

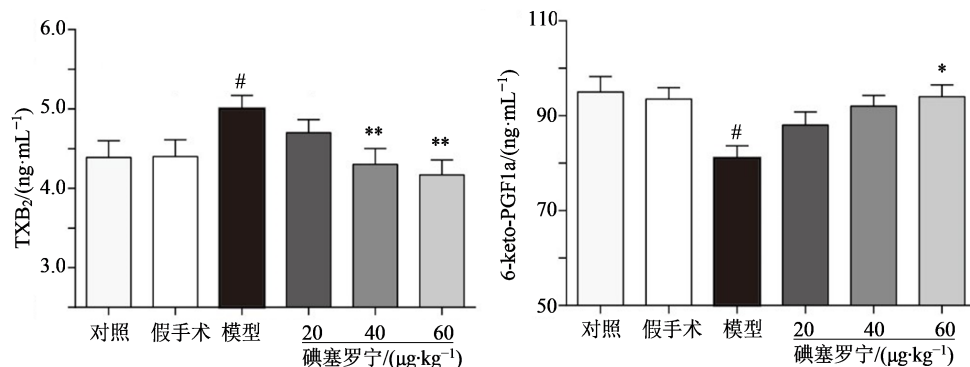
与模型组比较,碘塞罗宁高、中、低剂量组BDNF、nestin和Sox2的蛋白表达显著增加($P <$



与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图1 碘塞罗宁对脑梗死体积、rCBF的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of liothyronine on infarct size and rCBF ($\bar{x} \pm s, n=3$)

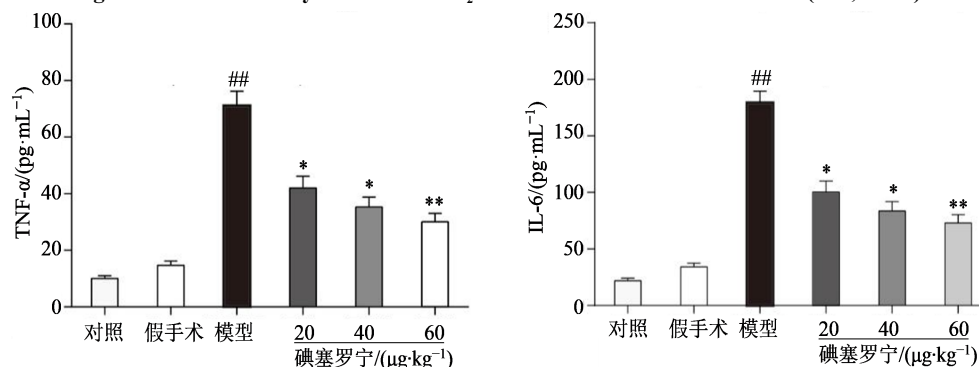


与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图2 碘塞罗宁对血清TXB₂和6-keto-PGF1a水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of liothyronine on TXB₂ and 6-keto-PGF1a serum levels ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图3 碘塞罗宁对血清TNF-α和IL-6水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effects of liothyronine on TNF-α and IL-6 serum levels ($\bar{x} \pm s, n=10$)

0.05、0.01)。结果见图4。

4 讨论

研究显示甲状腺激素——三碘甲状腺原氨酸(T₃)和四碘甲状腺原氨酸(T₄)对发育、生长、代谢和细胞能量具有深远的影响^[10]。Lemkine等^[11]研究发现,甲状腺激素在中枢神经系统中起着至关重要的作用,T₃在大脑发育的早期阶段在新神经元的成熟和产生中特别必要。在大脑发育的特定时间窗口中缺乏甲状腺激素会导致不可逆的脑损伤^[1]。Mdzinarishvili等^[1]报道指出,在MCAO模型中,施用T₃溶液后,脑水肿减少59%,组织梗死减少34%,而未涂层的T₃纳米颗粒的相应结果为68%、51%^[1]。本研究结果提示,给予碘塞罗宁治疗后,缺血性脑卒中大鼠脑梗死体积显著减小,rCBF显著增加。

Sox2和nestin是神经干细胞标记,Ferri等^[9]认为其与神经发生有关。Sabbaghziarani等^[12]的数据表明,T₃治疗后大鼠缺血性脑损伤脑室下区中Sox2和nestin的表达显著增加,维甲酸预处理的沃顿氏

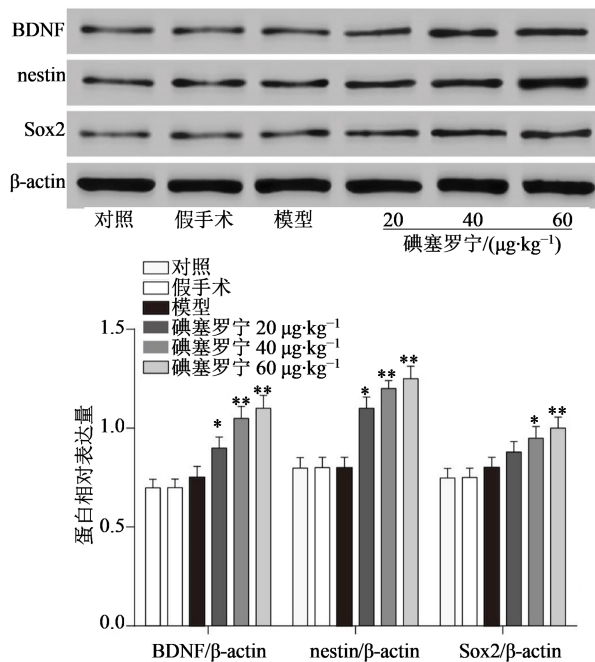


图4 碘塞罗宁对BDNF、nestin和Sox2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 4 Effects of liothyronine on protein expression of BDNF, nestin and Sox2 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

胶质间充质干细胞+T3组中观察到更明显的结果。大脑的各种细胞中存在核T3结合位点,T3在某些区域(小脑等)诱导BDNF分泌,外源性T3的应用上调海马中BDNF表达。BDNF是已知可增强神经发生的生长因子,BDNF对缺血导致的神经元损伤具有保护作用。缺血性脑卒中中促炎细胞因子TNF- α 和IL-6表达升高被认为是神经元损伤的反应,并且通过调节这些促炎细胞因子可以有效改善脑损伤状况。已有研究显示T3治疗后缺血性脑卒中模型大鼠2种细胞因子的血清水平均下降^[3]。本研究结果表明,在碘塞罗宁处理后显著升高缺血性脑卒中大鼠脑组织nestin、Sox2、BDNF水平,降低血清TNF- α 和IL-6水平。

前列腺素I₂(PGI₂)是血管壁内皮细胞合成和释放的有舒张血管和抗血小板聚集作用的生物活性物质,其具有半衰期短的特性,能够迅速转化为稳定的无生物活性的6-keto-PGF1 α 。而血栓素A₂(TXA₂)是血小板微粒体合成释放的具有促进血小板聚集和促进血管收缩的生物活性物质,半衰期也很短,很快转为稳定无生物活性的TXB₂。在正常的生理环境下,PGI₂和TXA₂保持平衡,控制血管的正常张力,防止血栓的形成^[13]。本研究结果表明在碘塞罗宁作用下,缺血性脑卒中大鼠血清TXB₂水平显著降低,6-keto-PGF1 α 水平显著升高。

本研究结果表明,碘塞罗宁显著改善缺血性脑卒中大鼠脑梗死,作用机制可能与抑制炎症反应、促进血管舒张、促进BDNF和神经再生标记物表达相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mdzinarishvili A, Sutariya V, Talasila P K, et al. Engineering triiodothyronine (T3) nanoparticle for use in ischemic brain stroke [J]. Drug Deliv Transl Res, 2013, 3 (4): 309-317.
- [2] Heros R C. Stroke: Early pathophysiology and treatment. summary of the fifth annual decade of the brain symposium [J]. Stroke, 1994, 25(9): 1877-1881.
- [3] Sabbaghziarani F, Mortezaee K, Akbari M, et al. Stimulation of neurotrophic factors and inhibition of proinflammatory cytokines by exogenous application of triiodothyronine in the rat model of ischemic stroke [J]. Cell Biochem Funct, 2017, 35(1): 50-55.
- [4] Sui L, Ren W W, Li B M. Administration of thyroid hormone increases reelin and brain-derived neurotrophic factor expression in rat *Hippocampus in vivo* [J]. Brain Res, 2010, 1313: 9-24.
- [5] Bunevicius A, Kazlauskas H, Raskauskiene N, et al. Ischemic stroke functional outcomes are independently associated with C-reactive protein concentrations and cognitive outcomes with triiodothyronine concentrations: A pilot study [J]. Endocrine, 2014, 45(2): 213-220.
- [6] Lin H Y, Davis F B, Luidens M K, et al. Molecular basis for certain neuroprotective effects of thyroid hormone [J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4: 29.
- [7] Casals J B, Pieri N C G, Feitosa M L T, et al. The use of animal models for stroke research: A review [J]. Comp Med, 2011, 61(4): 305-313.
- [8] Ma L L, Zhu D L, Jiang Y, et al. Low triiodothyronine: A new facet of inflammation in acute ischemic stroke [J]. Clin Chim Acta, 2016, 458: 63-67.
- [9] Ferri A L M, Cavallaro M, Braida D, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain [J]. Development, 2004, 131(15): 3805-3819.
- [10] Yen P M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action [J]. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1097-1142.
- [11] Lemkine G F, Raj A, Alfama G, et al. Adult neural stem cell cycling *in vivo* requires thyroid hormone and its alpha receptor [J]. FASEB J, 2005, 19(7): 863-865.
- [12] Sabbaghziarani F, Mortezaee K, Akbari M, et al. Retinoic acid-pretreated Wharton's jelly mesenchymal stem cells in combination with triiodothyronine improve expression of neurotrophic factors in the subventricular zone of the rat ischemic brain injury [J]. Metab Brain Dis, 2017, 32 (1): 185-193.
- [13] 汪小利, 徐凯. 奥扎格雷钠联合消栓肠溶胶囊对缺血性脑卒中患者血液流变学及血管内皮功能的影响 [J]. 沈阳医学院学报, 2019, 21(1): 19-22.

Wang X L, Xu K. Effect of Ozagrel sodium combined with Xiaoshuan enteric-coated capsule on hemorheology and vascular endothelial function in patients with ischemic stroke [J]. J Shenyang Med Coll, 2019, 21(1): 19-22.

[责任编辑 兰新新]