

阿托伐他汀对血管性痴呆大鼠脑组织 A β 和 COX-2 表达的影响

周文胜^{1,2}, 王 佳¹, 李庆华², 任 翔², 王森霞²

(1. 湖南省老年医院湖南省老年医学研究所神经疾病研究室, 湖南 长沙 410016;

2. 湖南省老年医院神经内科)

摘要: **目的** 观察血管性痴呆(VaD)大鼠行为学改变和脑组织 β -淀粉样蛋白(A β)、环氧合酶-2(COX-2)表达的变化,以及阿托伐他汀的干预效应,并探讨其作用机制。 **方法** 60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和阿托伐他汀组(低剂量组和高剂量组)。模型组及干预组通过双侧颈总动脉结扎法建立 VaD 大鼠模型,术后 8 周通过 Morris 水迷宫进行行为学检测,随后免疫组织化学检测脑组织 A β 及 COX-2 表达水平。 **结果** 与假手术组比较,模型组大鼠定位航行试验的逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),空间探索试验的跨越平台次数减少($P < 0.05$),脑组织 A β 、COX-2 表达上调($P < 0.05$);与模型组比较,阿托伐他汀组大鼠定位航行试验的逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),空间探索试验的跨越平台次数增加($P < 0.05$),脑组织 A β 、COX-2 表达显著下降($P < 0.05$);高剂量与低剂量组大鼠水迷宫成绩及脑组织 A β 、COX-2 表达差异有显著性($P < 0.05$)。 **结论** 阿托伐他汀可能通过降低脑组织 A β 、COX-2 的表达,显著改善 VaD 大鼠的行为学症状。

关键词: 血管性痴呆; 阿托伐他汀; β 淀粉样蛋白; 环氧合酶-2; 水迷宫实验; 炎症

中图分类号:R743

文献标识码:A

Effect of Atorvastatin on the Expression of A β And COX-2 in the Brain Tissue of Rats With Vascular Dementia

ZHOU Wensheng, WANG Jia, LI Qinghua, et al

(Department of Nervous Disease, Hunan Institute of Gerontology, Hunan Geriatric Hospital, Changsha, Hunan 410016, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of atorvastatin on the expression of A β and COX-2 in the brain tissue of rats with vascular dementia. **Methods** 60 healthy male SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group, atorvastatin group(low-dose group and high-dose group). Rat vascular dementia model was prepared by permanent bilateral common carotid arteries occlusion. After 8 weeks, all rats were tested with Morris water maze, and then immunohistochemistry was used to test the expression of A β and COX-2 in the brain. **Results** Compared with sham-operation group, rats in model group had significantly longer escape latency in orientation navigation experiment($P < 0.05$), and had obviously decreased the times of crossing the platform in spatial probe test ($P < 0.05$). The expression of A β and COX-2 were up-regulated($P < 0.05$); compared with model group, rats in atorvastatin group had significantly shortened escape latency in orientation navigation experiment($P < 0.05$), and had obviously increased the times of crossing the platform in spatial probe test ($P < 0.05$). The expression of A β and COX-2 were down-regulated($P < 0.05$); the results of Morris maze test and the expression of A β and COX-2 between the low-dose group and the high-dose group were significantly different($P < 0.05$). **Conclusion** Atorvastatin may improve the cognition state of rats with vascular dementia by inhibiting the expression of A β and COX-2 in the brain.

Key words: vascular dementia; atorvastatin; A β ; COX-2; morris water maze test; inflammation

慢性脑缺血是血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 的病理生理基础,有研究表明脑缺血后引发的炎症反应在其发病过程中起十分重要的作用^[1]。 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 作为神经炎症的诱导物在神经变性疾病过程中起着核心作用^[2-3]。另外,环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 也参与了脑缺血后的炎症反应^[4]。阿托伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂,是一类强效的降脂类药物,大规模临床研究表明,使用阿托伐他汀对预防血管性痴呆和改善认知功能有益^[5-6],其具体机制不详。本研究采用阿托伐他汀对血管性痴呆大鼠进行治疗干预,观察其对大鼠脑组织 A β 及 COX-2 表达及行为学变化的影响,探讨阿托伐他汀在改善认知功能中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

健康雄性 SD 大鼠 60 只,鼠龄 3~4 个月,体重 270 ± 30 g,由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供 [SCXK(湘)-2006-0002],清洁级。购入后在实验室进行饲养,固体饲料(含蛋白 23%、脂肪 4.7% 和钠盐 0.24%) 和水自由摄取,保持环境温度 20~25℃。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

阿托伐他汀由辉瑞公司生产,规格为:20 mg/片(立普妥,生产批号:197009K)。免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物分组及模型制备

实验大鼠随机分为假手术组(15 只)、模型组(15 只)、阿托伐他汀低、高剂量组(各 15 只)。参照 Zhu 等^[7]方法,采用双侧颈总动脉永久结扎法制作血管性痴呆大鼠模型,术前禁食 12 h,自由饮水,将实验大鼠用 0.4% 戊巴比妥钠(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉成功后,仰卧位固定,常规消毒后行颈正中切口,钝性分离出双侧颈总动脉(切勿损伤与之同行的迷走神经和颈交感干),模型组大鼠用 5 号丝线结扎双侧颈总动脉,对照组大鼠仅分离双侧颈总动脉。如呼吸、心跳均规整即缝合皮肤,放回笼中正常饲养,术中维持肛温在 37℃ 左右。干预组于建模成功后给予阿托伐他汀灌胃,低剂量组给予阿托伐

他汀每天 10 mg/kg(1 mL),高剂量组给予阿托伐他汀每天 20 mg/kg(1 mL),连续 4 周。对照组与模型组予以等量生理盐水(1 mL)灌胃。假手术组只分离双侧颈总动脉,既不结扎也不剪断。

1.3 水迷宫实验

模型建立后 4 周进行 Morris 水迷宫实验^[8],检测大鼠学习记忆能力。实验包括:(1)定位航行实验:每天于上、下午各检测 4 次,总历时 5 天。随机在平台象限外选两个与平台距离相等的点作为入水点,将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠从入水到爬上平台所需的时间(即逃避潜伏期)。若大鼠在入水后 90 s 内仍未找到平台,则潜伏期记录为 90 s。每次训练间隔 60 s。(2)空间探索实验:定位航行实验结束 24 h 后撤除平台,任选一个相同入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 90 s 内大鼠跨越平台的次数,并将其作为评价大鼠学习记忆成绩的指标。

1.4 脑组织标本的采集和固定

各组大鼠在术后 8 周用 0.4% 戊巴比妥钠(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉,从左心室快速灌注温生理盐水,经剪开的右心耳流出,直至流出液清亮,接着灌入 4℃、4% 多聚甲醛,于 30~40 min 内灌毕,至大鼠躯干、四肢僵直,肝脏变硬,迅速取脑,置多聚甲醛中固定过夜,再移入 30% 蔗糖溶液中至沉底。随后取脑组织常规石蜡包埋,连续切片(厚约 4 μ m)贴附于 APES 处理过的载玻片上,60℃ 烤箱过夜干燥备用。

1.5 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡至水后,HE 染色进行大脑基本形态学观察;免疫组织化学法分析海马 CA1 区 A β 及 COX-2 的表达:石蜡切片经二甲苯和不同浓度乙醇脱蜡至水,3% 双氧水灭活内源性酶,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH6.0)于微波炉中加热至沸腾行抗原修复,滴加 5% BSA 封闭液室温 20 min,然后滴加稀释的一抗 1:200(A β 及 COX-2 抗体)4℃ 过夜,经 PBS 液冲洗后滴加生物素化羊抗鼠 IgG,室温 20 min,PBS 液冲洗后再滴加 ABC 复合物室温 20 min,DAB 显色,并在显微镜下控制反应,PBS 漂洗中止显色,漂洗、干燥、脱水、透明,中性树胶封片。显微镜下观察切片。取连续脑组织切片,在相同强度及放大倍数下进行观察。于 400 倍光镜下,随机选取 5 个不重叠的视野,对每个视野进行阳性细胞计数,取其平均值。

1.6 统计学分析

运用 SPSS16.0 统计软件进行分析。所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,组间比较采用单因素方差分析,对 $A\beta$ 与 COX-2 的表达进行 Pearson 相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

表 1 各组大鼠平均逃避潜伏期的比较($n = 15$)

Table 1 Comparison of escape latency in place navigation test among all groups($n = 15$)

组别	阿托伐他汀	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术组	—	41.87 $\pm$ 4.31	39.33 $\pm$ 4.50	30.47 $\pm$ 3.91	19.07 $\pm$ 4.08	9.47 $\pm$ 2.13
模型组	—	54.00 $\pm$ 4.34 ^a	51.20 $\pm$ 4.30 ^a	39.87 $\pm$ 5.78 ^a	27.93 $\pm$ 4.45 ^a	24.80 $\pm$ 3.45 ^a
高剂量组	10 mg/kg	49.27 $\pm$ 4.37 ^b	45.47 $\pm$ 4.03 ^b	34.60 $\pm$ 3.42 ^b	23.93 $\pm$ 2.94 ^b	15.80 $\pm$ 3.21 ^b
低剂量组	20 mg/kg	43.33 $\pm$ 4.19 ^{bc}	40.47 $\pm$ 4.10 ^{bc}	31.07 $\pm$ 3.08 ^{bc}	20.20 $\pm$ 3.63 ^{bc}	11.20 $\pm$ 2.86 ^{bc}

a:与假手术组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与高剂量组比较, $P < 0.05$

与假手术组比较,模型组大鼠穿越平台次数显著减少($P < 0.05$);与模型组比较,高剂量组大鼠穿越平台次数显著增加($P < 0.05$),而低剂量组大鼠穿越平台次数差异无显著性($P > 0.05$)(见表 2)。

表 2 各组大鼠穿越平台次数的比较($n = 15$)

Table 2 Comparison of frequency of platform crossing in spatial probe test among all groups($n = 15$)

组别	穿越平台次数
假手术组	6.20 $\pm$ 2.54
模型组	3.20 $\pm$ 1.21 ^a
低剂量组	4.80 $\pm$ 2.27
高剂量组	5.60 $\pm$ 1.96 ^b

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

2.2 VaD 大鼠海马 CA1 区的病理变化

光镜下,可见模型组大鼠神经元细胞丢失,排列紊乱、稀疏,数量减少。神经胶质细胞增殖,部分细胞体积缩小,核溶解固缩,核浓染(见图 1)。

2.3 阿托伐他汀对 $A\beta$ 表达水平的影响

光镜下, $A\beta$ 免疫反应物呈棕褐色,主要位于神经元细胞的胞膜及胞浆内。假手术组大鼠脑组织中仅少量 $A\beta$ 表达;与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 $A\beta$ 表达显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,阿托伐他汀组 $A\beta$ 表达显著下降($P < 0.05$),且高剂量

2.1 各组大鼠学习记忆能力的比较

随训练时间延长,各组大鼠的平均逃避潜伏期均逐渐缩短;模型组大鼠逃避潜伏期与假手术组比较均显著延长($P < 0.05$);与模型组比较,低、高剂量组大鼠逃避潜伏期均显著缩短($P < 0.05$);与低剂量组比较,高剂量组逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$);与假手术组比较,高剂量组平均潜伏期差异无显著性($P > 0.05$)(见表 1)。

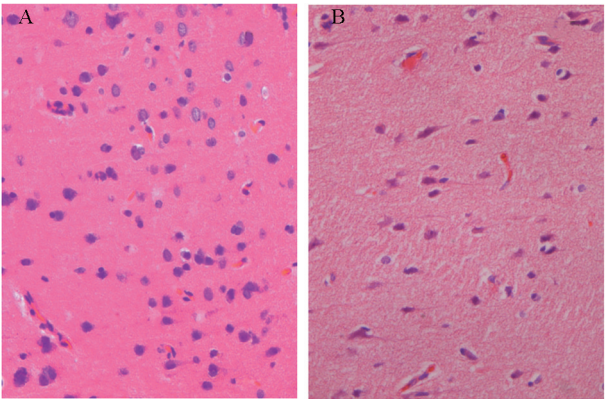


图 1 VaD 大鼠海马 CA1 的 HE 染色($\times 400$) A:假手术组;B:模型组

Fig 1 HE staining of CA1 region of hippocampus($\times 400$) A;Sham operation group;B;Model

组 $A\beta$ 表达显著低于低剂量组($P < 0.05$)(见图 2 和表 3)。

2.4 阿托伐他汀对 COX-2 表达水平的影响

光镜下,COX-2 免疫产物呈棕褐色,主要位于大脑皮层 II/III、V、VI 层神经元细胞的胞膜及胞浆中。假手术组 COX-2 表达量极少,染色浅;与假手术组比较,模型组 COX-2 染色深,COX-2 阳性细胞计数显著增高($P < 0.05$);与模型组比较,阿托伐他汀组 COX-2 阳性细胞计数显著减少($P < 0.05$);而高剂量组 COX-2 阳性细胞计数显著低于低剂量组($P < 0.05$)(见图 3 和表 3)。

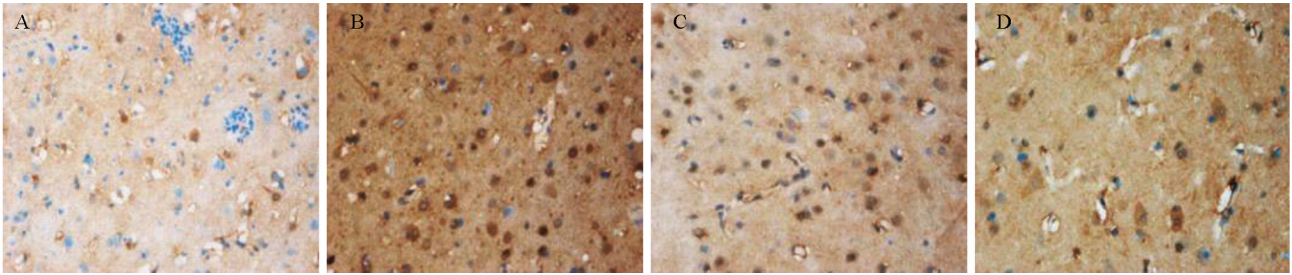


图2 Aβ在脑组织中的表达(SP, ×400) A:假手术组;B:模型组;C:低剂量组;D:高剂量组

Fig 2 The expression of Aβ in brain tissues(SP, ×400) A:Sham operation group; B: Model group; C: Low-dose group; D: High-dose group

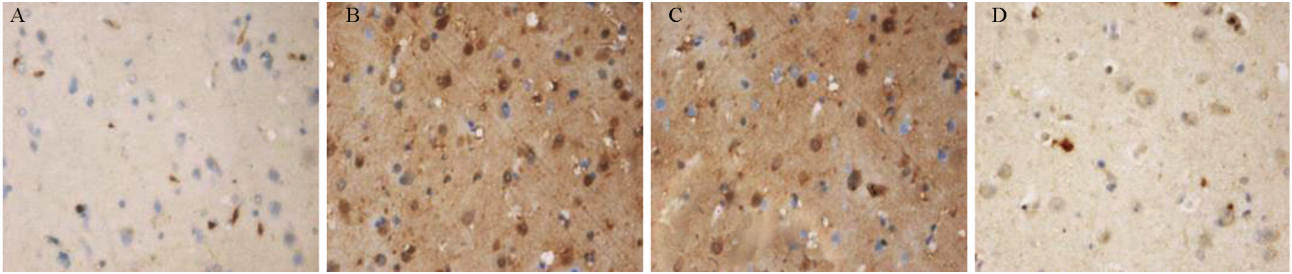


图3 COX-2在脑组织中的表达(SP, ×400) A:假手术组;B:模型组;C:低剂量组;D:高剂量组

Fig 3 The expression of COX-2 in brain tissues(SP, ×400) A:Sham operation group; B: Model group; C: Low-dose group; D: High-dose group

表3 各组大鼠脑组织 Aβ 和 COX-2 表达的比较 (n = 15)

Tabel 3 Comparison of the Aβ and COX-2 expression in the brain tissue among all groups (n = 15)

组别	Aβ 阳性细胞数	COX-2 阳性细胞数
假手术组	3.07 ± 1.70	0.47 ± 0.64
模型组	34.60 ± 3.08 ^a	27.67 ± 5.79 ^a
低剂量组	29.73 ± 2.49 ^b	21.40 ± 5.27 ^b
高剂量组	24.67 ± 2.63 ^{bc}	15.93 ± 3.90 ^{bc}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与低剂量组比较, $P < 0.05$

2.5 Aβ 与 COX-2 表达相关性

Pearson 相关性分析发现, Aβ 与 COX-2 蛋白阳性细胞计数呈正相关 $r = 0.886, P < 0.05$ 。

3 讨 论

慢性全脑血流灌注不足可促进痴呆发展, 永久性的双侧颈总动脉结扎是目前应用于模拟痴呆研究的经典模型, 本实验采用的双侧颈总动脉永久性阻断方法造模, 造模后大鼠仅由双侧椎基底动脉系统供应全脑, 脑血流低于正常脑组织需要的每 100 g 脑细胞 50 ~ 55 mL/min, 从而导致持续性的脑低灌注, 但尚未达到致细胞坏死的程度。通过 Morris 水迷宫行为学检测, 本研究观察到 VaD 大鼠出现了学习记忆能力的下降, 类似于 VaD 临床表现, 这与之

前文献[9]报道相一致。

越来越多的研究表明, Aβ 肽作为神经炎症的诱导物在神经变性疾病过程中起了十分重要的作用[3,10-11]。Aβ 是 39 ~ 43 个氨基酸残基的多肽, 由 APP 经 β 分泌酶和 γ 分泌酶复合体的蛋白水解作用产生。本研究发现, VaD 大鼠脑组织中 Aβ 表达上调, 这与之前文献[12]报道的结果相一致, 进一步表明慢性脑缺血可促进脑组织 Aβ 表达。

同样, 有关于神经炎症在 VaD 中的作用也受到越来越多的关注[3,13]。COX-2 作为调节神经炎症的一个重要物质, 是炎症反应介导的神经细胞毒性的决定性因素之一[11], 其在神经细胞过表达能通过一些机制直接损害神经细胞, 比如诱导细胞周期蛋白、增加前列腺素的产生以及产生活性氧。生理状态下, COX-2 在大多数组织中表达量均极少, 而在肿瘤坏死因子、IL-8、兴奋性毒素和氧化机制如炎症介质(脑外伤、脑缺血和一些发展中的神经变性条件下)能诱使 COX-2 的表达量急剧增加[4,14-15]。这与本实验观察到的假手术组脑组织 COX-2 表达量极少, 而模型组 COX-2 表达量显著增加的结果相一致。这些结果提示 COX-2 可能参与了脑缺血后认知障碍的发生。

因此推测长期低灌注使神经细胞的线粒体功能下降, 活性氧等自由基大量产生, 可触发 Caspase 3

介导的 β 肽分泌, 加快淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 的形成, 从而加快了 $A\beta$ 生成及在血管、神经细胞的沉积, 而 $A\beta$ 作为神经炎症的诱导物, 进一步诱导神经细胞中 COX-2 的表达, 与此同时, 脑缺血也能诱导神经细胞中 COX-2 的表达^[4], 这两个过程同时损伤神经细胞, 加快神经细胞的死亡, 神经细胞的损伤通常被认为是 VaD 进程中学习记忆能力障碍的病理基础^[16]。

阿托伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 大量的临床观察和实验研究表明, 他汀类药物除降脂作用外, 还具有保护内皮功能、抗血栓、抗氧化、抗炎症等作用^[5-6, 17]。近年来, 越来越多的研究认为他汀类药物可能通过阻止 β -淀粉样蛋白的形成及神经抗炎作用, 从而改善大脑认知功能^[17-18]。2008 年 Kurinami 等^[19] 运用注射淀粉样肽 ($A\beta$) 的小鼠模型评估他汀对于 $A\beta$ 介导的认知功能损害的作用, 认为他汀类药物可以减少 $A\beta$ 的形成, 这也可能是其预防痴呆的机制之一。Piermartiri 等^[17] 同样用注射淀粉样肽 ($A\beta$) 的小鼠模型, 发现用阿托伐他汀治疗的模型大鼠 COX-2 的表达显著减少, 并能改善其炎症反应和减轻神经细胞的损伤。本研究发现, 经阿托伐他汀干预后, VaD 鼠脑组织 $A\beta$ 、COX-2 的表达均较模型组明显下降 ($P < 0.05$), 且学习和记忆潜伏期亦均较模型组明显缩短 ($P < 0.05$); 同时这种改善效应与阿托伐他汀剂量呈正相关。因此推测阿托伐他汀对 VaD 大鼠认知功能的改善效应是通过减少 β -淀粉样蛋白的形成及通过抗炎症作用减少神经细胞中 COX-2 的过表达而实现的。

综上所述, $A\beta$ 、COX-2 表达上调参与了慢性脑缺血所致的大鼠认知功能下降, 而阿托伐他汀可通过抑制 $A\beta$ 、COX-2 对神经元细胞的损害, 改善认知功能。阿托伐他汀在痴呆中的这一作用效应, 可能为今后痴呆的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Wang J, Zhang HY, Tang XC. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia: possible mechanism and strategy of treatment[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(7): 879-888.
- [2] Roth AD, Ramirez G, Alarcon R, et al. Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: beta amyloid toxicity and inflammation[J]. Biol Res, 2005, 38(4): 381-387.
- [3] Pluta R, Jolkkonen J, Cuzzocrea S, et al. Cognitive impairment with vascular impairment and degeneration[J]. Curr Neurovasc Res, 2011, 8(4): 342-350.
- [4] Strauss KI. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain[J]. Brain Behav Immun, 2008, 22(3): 285-298.
- [5] Koladiya RU, Jaggi AS, Singh N, et al. Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats[J]. BMC Pharmacol, 2008, 8(1): 1-12.
- [6] Cramer C, Haan MN, Galea S, et al. Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study[J]. Neurology, 2008, 71(5): 344-350.
- [7] Zhu Y, Zeng Y. Electroacupuncture protected pyramidal cells in hippocampal CA1 region of vascular dementia rats by inhibiting the expression of P53 and Noxa[J]. CNS Neurosci Ther, 2011, 17(6): 599-604.
- [8] Schenk F, Morris RG. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions[J]. Exp Brain Res, 1985, 58(1): 11-28.
- [9] Ohtani R, Tomimoto H, Kondo T, et al. Upregulation of ceramide and its regulating mechanism in a rat model of chronic cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2004, 1023(1): 31-40.
- [10] Wang C, Yang XM, Zhuo YY, et al. The phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram reverses Abeta-induced cognitive impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses in rats[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2011, 9(9): 1-18.
- [11] Dargahi L, Nasiraei-Moghadam S, Abdi A, et al. Cyclooxygenase (COX)-1 activity precedes the COX-2 induction in Abeta-induced neuroinflammation[J]. J Mol Neurosci, 2011, 45(1): 10-21.
- [12] 王健华, 赵连东, 晋光荣. 依达拉奉对大鼠血管性痴呆脑组织中 $A\beta$ 、Tau 和 GFAP 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(2): 203-208.
- [13] Yagami T. Cerebral arachidonate cascade in dementia: Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Curr Neuroparmacol, 2006, 4(1): 87-100.
- [14] Franciosi S, Choi HB, Kim SU, et al. IL-8 enhancement of amyloid-beta (Abeta 1-42)-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia[J]. J Neuroimmunol, 2005, 159(1-2): 66-74.

- [15] Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(9): 901-910.
- [16] Lorrio S, Negredo P, Roda JM, et al. Effects of memantine and galantamine given separately or in association, on memory and hippocampal neuronal loss after transient global cerebral ischemia in gerbils [J]. *Brain Res*, 2009, 1254(7): 128-137.
- [17] Piermartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta (1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage [J]. *Exp Neurol*, 2010, 226(2): 274-284.
- [18] Clarke RM, O'Connell F, Lyons A, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of amyloid-beta1-42 in the rat hippocampus in vivo [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(1): 136-145.
- [19] Kurinami H, Sato N, Shinohara M, et al. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(5): 531-537.