·实验研究·

帕瑞昔布减轻大鼠全脑缺血所致海马 CA1 区神经元损伤

梅莉　方莹莹

【摘要】 **目的**　探讨 COX-2 抑制剂帕瑞昔布对大鼠全脑缺血模型海马 CA1 区损伤神经元的影响及潜在小胶质细胞激活和保护神经元的机制。**方法**　SPF 级健康大鼠 30 只，体重 200～250 g，采用随机数字表法分为三组：假手术组、缺血-再灌注组和帕瑞昔布组，每组 10 只。用四血管闭塞法制作大鼠全脑缺血模型。手术完成 30 min 后，帕瑞昔布组给予帕瑞昔布腹腔注射 10 mg/kg，其余两组给予等体积生理盐水 0.5 ml，连续给药 3 d，第 7 天进行水迷宫实验，结束后灌注固定取脑，石蜡切片后进行 Nissl 染色，观察海马 CA1 区存活神经元的数量，然后进行免疫荧光染色，观察海马区小胶质细胞形态学变化。**结果**　与假手术组比较，缺血-再灌注组海马 CA1 区神经元受损明显，大量神经元发生凋亡，大鼠的学习记忆能力明显降低（$P<0.05$），海马区小胶质细胞被激活；与缺血-再灌注组比较，帕瑞昔布组海马 CA1 区神经元状态明显好转，存活神经元数量明显增加，大鼠的学习记忆能力明显改善（$P<0.05$），海马区小胶质细胞形态上呈现激活状态，部分小胶质细胞胞体有阿米巴样变化。**结论**　帕瑞昔布对因缺血损伤导致的学习记忆能力下降有明显的改善作用，这种作用可能与小胶质细胞被激活或功能状态发生改变有关。

【关键词】　帕瑞昔布；神经元；学习记忆；小胶质细胞

Parecoxib protectives hippocampal CA1 neurons from global cerebral ischemic damage by activating microglia

MEI Li, *FANG Yingying*. *Department of Anesthesia*, *Guangdong General Hospital/Guangdong Academy of Medical Scienses*, *Guangzhou 510080*, *China*

Corresponding author: *FANG Yingying*, *Email*: *watson0920@126.com*

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of COX-2 inhibitor parecoxib on neurons in hippocampal CA1 of rats after global cerebral ischemia and explore roles of microglia activation. **Methods**　A total of 30 SPF healthy rats, weighing 200-250 g, were randomly divided into three groups: sham group, control group, and parecoxib group, 10 rats in each. 30 minutes after four vessel occlusion operations, parecoxib group received parecoxib 10 mg/kg treatment intraperitoneally, the other two groups were given saline, administered continuously for 3 days. On the 7th day, water maze tests were proceeded, then the rat brains were perfusion fixed. After paraffin sectioning and Nissl staining and immunofluorescence staining, the numbers of survival neurons in hippocampal CA1 region were quantified and the morphologic changes of microglia were observed. **Results**　Compared with sham group, the hippocampal CA1 neurons of control group were significantly damaged, large numbers of neurons were in apoptosis, the learning and memory ability of rats was significantly decreased ($P<0.05$), hippocampus microglial cells were activated. Compared with control group, neuron numbers in hippocampal CA1 area of parecoxib group were significantly increased, water maze test also showed significantly improved learning and memory ability ($P<0.05$), hippocampal microglial cells were activated to a much greater level. **Conclusion**　COX-2 inhibitor parecoxib significantly rescues hippocampal neurons from ischemic damage and improves the learning and memory ability after ischemic injury, which might be closely related to the activation of microglia.

【**Key words**】　Parecoxib; Neurons; Learning and memory; Microglia

环氧化酶（COX）是催化花生四烯酸合成前列腺素和血栓素的限速酶，有两种不同的亚型表达方式：COX-1 和 COX-2。在正常情况下，COX-2 在小胶质细胞中低表达，然而当病原体、炎症调节介质和激素存在时，COX-2 表达上调。局灶脑缺血模型中，COX-2 主要存在于缺血半暗带，可通过产生氧自由基和毒性前列腺素损伤半暗带神经元。活化

DOI：10.12089/jca.2018.08.018

基金项目：广东省自然科学基金（2014A030313634）

作者单位：510080　广州市，广东省人民医院（广东省医学科学院）麻醉科（梅莉）；南方医科大学基础医学院神经生物教研室（方莹莹）

通信作者：方莹莹，Email：watson0920@126.com

的小胶质细胞中 COX-2 mRNA 和蛋白表达在缺血 12～24 h 后升高，参与了缺血后期神经元的损伤。在动物实验中，无论是基因工程还是药物抑制剂 COX-2 均有神经保护作用[1]。但是，帕瑞昔布作为 COX-2 的抑制药，对缺血损伤导致的海马 CA1 区神经元凋亡保护机制，目前尚无相关研究。本研究探讨帕瑞昔布在大鼠全脑缺血模型中对海马 CA1 区损伤神经元的保护作用及机制，从而为其在治疗神经损伤的临床应用中提供参考。

材料与方法

实验材料　25 W 黄花牌电烙铁，大鼠立体定位仪，水迷宫及相关分析软件，灌注瓶，石蜡切片机，系统显微镜，Nissl 染料，IBA-1 抗体，荧光二抗，共聚焦显微镜。

实验动物与分组　SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 30 只，体重 200～250 g，动物合格证号为 SCXK（粤）2016-0041。采用随机数字表法分为三组：假手术组、缺血-再灌注组和帕瑞昔布组，每组 10 只。四血管闭塞法制作大鼠全脑缺血模型。手术完成 30 min 后，帕瑞昔布组给予帕瑞昔布腹腔注射 10 mg/kg，其余两组给予生理盐水 0.5 ml，连续给药 3 d。

全脑缺血模型的制备　采用四血管闭塞法制作大鼠全脑缺血模型[2]。首先将动物麻醉，固定在立体定位仪上，枕骨下第一颈椎处垂直切口，仔细分离两侧第一颈椎横突，暴露横突上的翼孔，翼孔下有椎动脉通过，用 25W 电烙铁插入翼孔烫断双侧椎动脉。然后动物取背位，颈部正中切口，分离颈总动脉，用外科手术缝线套住两侧颈总动脉（不要结扎），将线头埋与皮下，缝合伤口。24 h 后大鼠完全清醒，扒开伤口，露出线头，缺血-再灌注组和帕瑞昔布组用动脉夹夹闭双侧颈总动脉 2～3 s，大鼠出现意识丧志和对光反射消失等症状，缺血 15 min 后松开动脉夹，大鼠很快恢复意识。假手术组只把线头抽出，不做夹闭处理。最后，缝合皮肤。

行为学测试　大鼠空间学习记忆能力测试参照水迷宫实验方法进行[3]。水迷宫为一直径 160 cm、高 50 cm 的圆形水池，水池被均分为四个象限，内壁被涂成黑色，池内水深 30 cm，水温保持在（23±1）℃，水池内放置一个平台，平台所在的象限为目标象限，房间内为弥散性灯光。定位航行实验（1～4 d）：将大鼠按照不同顺序分别从四个象限面壁放入水池，大鼠上台 5 s 后系统自动终止记录，让其在平台上待 30 s，然后面壁放入下一个象限。最长记录时间为 90 s，若大鼠在 90 s 内不能上台，则引导大鼠登上平台。每只大鼠做四个象限，连续做 4 d，记录其找到平台的时间。空间探索实验（5 d）：撤下平台，分别在原平台所在象限的旁边两个象限面壁放下大鼠，在水池中游 90 s，记录其在目标象限所待的时间占总时间的百分比。可见平台测试（5 d）：在目标象限的对侧放置平台，升高到水面以上 1.5 cm。首先选取放置平台的旁边两个象限，把大鼠从其中一个象限放入，寻找平台，在平台上待 30 s，然后从另一个象限放入大鼠，记录找到平台的时间。

神经元存活率检测　切片脱蜡至水，然后在 0.1%焦油酸紫中染色 10 min，最后梯度递增的酒精中脱色，二甲苯透明，中性树脂封片。

小胶质细胞形态学检测　石蜡切片脱蜡至水，0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次，每次 5 min；封闭液室温封闭 1 h（用 PBS 配 0.3%的 tritonX-100，加 5% BSA）；加入一抗（1∶500）4 ℃过夜；次日回收一抗，用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min，然后加入荧光二抗（1∶1 000）室温孵育 1 h，然后用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min；贴片，用含 DAPI 的封片剂封片。

统计分析　采用 SPSS 18.0 软件行统计学处理。正态分布计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

海马 CA1 区神经元形态　假手术组大鼠海马 CA1 区神经元排列整齐，染色清晰，形态完整；缺血-再灌注组大鼠海马 CA1 区神经元受损明显，细胞核固缩，大多数神经元呈现月牙，锯齿等凋亡形态；帕瑞昔布组大鼠海马 CA1 区神经元排列较为整齐，固缩现象改善（图 1）。

海马 CA1 区存活神经元数量　假手术组未见凋亡神经元，假手术组和帕瑞昔布组存活神经元数量明显多于缺血-再灌注组（$P<0.05$）（图 2）。

行为学测试结果　与缺血-再灌注组比较，帕瑞昔布组大鼠第 3、4 天找到平台的潜伏期明显缩短（$P<0.05$）（图 3）。与缺血-再灌注组比较，帕瑞昔布组大鼠在目标象限所待的时间占总时间明显增多（$P<0.05$）（图 4）。三组大鼠找到平台的时间差异无统计学意义（图 5）。

小胶质细胞的变化　假手术组中的小胶质细

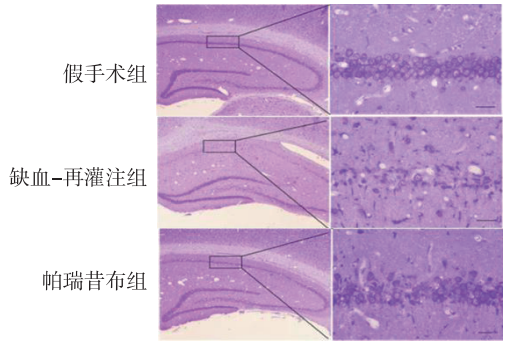
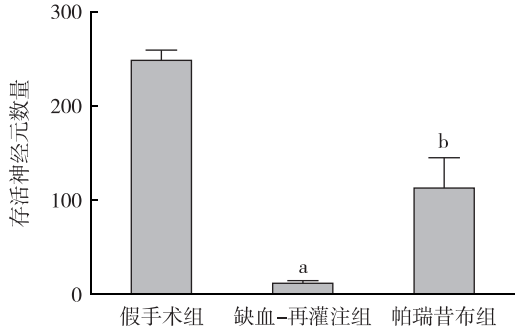
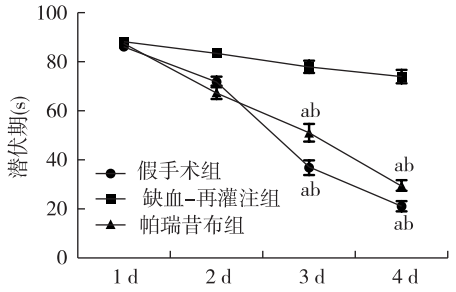


图 1　三组大鼠海马 CA1 区 Nissl 染色图



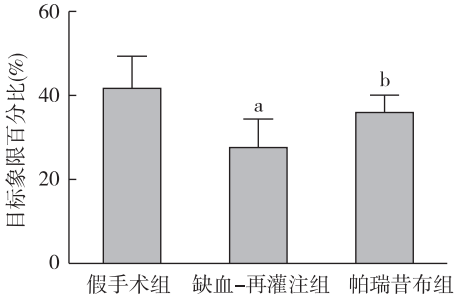
注：与假手术组比较，$^{a}P<0.05$；与缺血-再灌注组比较，$^{b}P<0.05$

图 2　三组大鼠海马 CA1 区存活神经元数量的比较



注：与假手术组比较，$^{a}P<0.05$；与缺血-再灌注组比较，$^{b}P<0.05$

图 3　三组大鼠找到平台潜伏期的比较



注：与假手术组比较，$^{a}P<0.05$；与缺血-再灌注组比较，$^{b}P<0.05$

图 4　三组大鼠目标象限百分比的比较

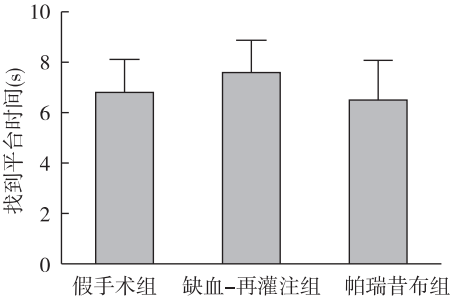


图 5　三组大鼠找到平台时间的比较

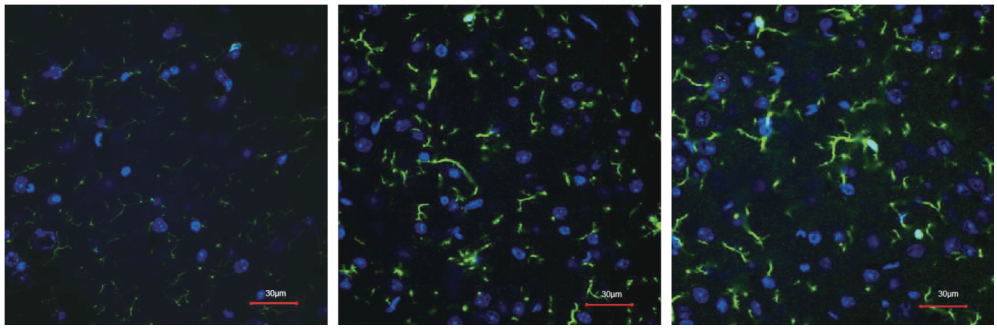
胞呈现分支状，胞体免疫染色信号不强，呈现未活化状态。而缺血-再灌注组中的小胶质细胞呈现较强的免疫染色信号，部分胞体呈现呈杆状或圆状。帕瑞昔布组中的小胶质细胞激活程度更高，部分细胞胞体呈阿米巴样变化，向巨噬细胞方向转化趋势比较明显（图 6）。

讨　论

大量研究表明 COX-2 在脑缺血损伤中起着非常重要的作用。有报道证实，模型制作后的 30 min 到 24 h，在缺血半暗带区，COX-2 表达持续增加[4]，而另一方面，缺血后脑梗死体积在 24 h 内持续增大，24 h 后完全梗死，体积不再增加[5]。COX-2 表达的增强与脑梗死体积的增大恰好完全吻合。帕瑞昔布是一种特异的 COX-2 抑制药，属于非甾体类抗炎药（NSAIDs），临床上广泛应用于中度或重度术后急性疼痛的治疗[6]。本研究发现，相较于缺血-再灌注组，帕瑞昔布治疗组大鼠海马 CA1 区神经元存活数量明显增多，神经元形态正常，排列整齐。证明给予帕瑞昔布治疗可有效阻止神经元发生凋亡，起到神经保护的作用。

小胶质细胞属于单核吞噬细胞，是中枢神经系统内重要的免疫效应器，对中枢神经系统的损伤反应灵敏，帕瑞昔布可能通过小胶质细胞起到神经保护作用。通过免疫荧光染色发现，相较于假手术组，缺血-再灌注组和帕瑞昔布治疗组大鼠脑内小胶质细胞均被激活；而相较于缺血-再灌注组，帕瑞昔布治疗组大鼠脑内小胶质细胞增多明显，形态变化明显，有部分小胶质细胞有向阿米巴样巨噬细胞转化的倾向。

小胶质细胞作为脑内重要的免疫细胞，已经被广泛研究。根据激活后的小胶质细胞在炎症损伤中的脑保护和神经毒性双相作用，把激活状态下的小胶质细胞分为 M1 期和 M2 期。M1 期的小胶质



假手术组　　缺血-再灌注组　　帕瑞昔布组

图 6　三组大鼠海马区小胶质细胞免疫荧光图

细胞可促进炎症发生，分泌炎性因子如 IL-1β、TNF-α[7]，M2 期的小胶质细胞具有摄取谷氨酸，吞噬死亡细胞碎片及其分泌神经保护因子如 IGF-1、GDNF 和 BDNF 的作用[8]。Hu 等[9]提出，在缺血-再灌注后第 0-5 天，M1 期的小胶质细胞与 M2 期的小胶质细胞同时增加，但到了第 5 天，M2 期小胶质细胞数量达到最大值，然后细胞数量开始下降，M1 期小胶质细胞数量却一直在增加。据报道，另一种 COX-2 抑制剂 Celecoxib 可以通过调节小胶质细胞的免疫功能来保护原朊粒蛋白感染造成的神经毒性损伤[10]。而 Celecoxib 的模拟分子可以显著降低小胶质细胞释放的诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）和活性氧（reactive oxygen species，ROS），从而在神经变性疾病中起到保护神经原的作用[11]。由此推测，帕瑞昔布可能通过转化小胶质细胞的活性状态，例如增加 M2 期小胶质细胞的持续时间或者将 M1 期小胶质细胞转变为 M2 期小胶质细胞，或者通过调解小胶质细胞分泌的炎性因子来发挥作用。小胶质细胞的形态学变化可能提示了上述功能性改变。

综上所述，帕瑞昔布治疗后，可能通过活化小胶质细胞，保护因缺血造成的海马 CA1 区神经元损伤，从而部分恢复大鼠的学习记忆能力。

参　考　文　献

[1] Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. Pathophysiological roles of cyclooxygenases and prostaglandins in the central nervous system. Mol Neurobiol, 2016, 53(7): 4754-4771.

[2] Ancer-Rodríguez J, Villarreal-Silva EE, Salazar-Ybarra RA, et al. Four-vessel occlusion model using aged male Wistar rats: a reliable model to resolve the discrepancy related to age in cerebral ischemia research. Anat Sci Int, 2016, 91(3): 226-237.

[3] Tucker LB, Velosky AG, McCabe JT. Applications of the Morris water maze in translational traumatic brain injury research. Neurosci Biobehav Rev, 2018, 88: 187-200.

[4] Ahmad M, Saleem S, Zhuang H, et al. 1-hydroxyPGE reduces infarction volume in mouse transient cerebral ischemia. Eur J Neurosci, 2006, 23(1): 35-42.

[5] Liu F, Schafer DP, McCullough LD. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. J Neurosci Methods, 2009, 179(1): 1-8.

[6] Takaku M, da Silva AC, Iritsu NI, et al. Effects of a single dose of parecoxib on inflammatory response and ischemic tubular injury caused by hemorrhagic shock in rats. Pain Res Treat, 2018, 2018: 8375746.

[7] Song GJ, Suk K. Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. Front Aging Neurosci, 2017, 9: 139.

[8] Wang J, Xing H, Wan L, et al. Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 518-525.

[9] Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. Stroke, 2012, 43(11): 3063-3070.

[10] Villa V, Thellung S, Corsaro A, et al. Celecoxib inhibits prion protein 90-231-mediated pro-inflammatory responses in microglial cells. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 57-72.

[11] Villa V, Thellung S, Bajetto A, et al. Novel celecoxib analogues inhibit glial production of prostaglandin E2, nitric oxide, and oxygen radicals reverting the neuroinflammatory responses induced by misfolded prion protein fragment 90-231 or lipopolysaccharide. Pharmacol Res, 2016, 113(Pt A): 500-514.

（收稿日期：2017－11－20）