文章编号:1000-5404(2006)07-0685-03

论著

脑缺血再灌对小鼠脑细胞色素C氧化酶亚基Ⅱ mRNA表达的影响及淫羊藿苷的作用

李 梨[1],周岐新[1],石京山[2] ([1]重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016;[2]遵义医学院药理学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 观察脑缺血再灌对小鼠大脑细胞色素C氧化酶亚基Ⅱ(cytochrome C oxidase subunit Ⅱ,CO Ⅱ)mRNA表达的影响及淫羊藿苷的作用。**方法** 采用双侧颈总动脉夹闭合并取血降压再灌注的方法建立小鼠脑缺血再灌损伤模型,随机分为正常对照组、模型组、淫羊藿苷防治组(100 mg/kg i.g.),在不同时间点用半定量RT-PCR法检测各组小鼠大脑CO Ⅱ的mRNA表达。**结果** 在脑缺血再灌后1、24 h时模型组CO Ⅱ mRNA的量与对照组相比无显著性意义。3 h模型组CO Ⅱ mRNA的量显著降低($P<0.01$),淫羊藿苷组对CO Ⅱ mRNA表达量的降低略有所阻遏,但无显著性意义。72 h模型组CO Ⅱ mRNA的量明显上升($P<0.01$),淫羊藿苷组可以明显阻止其表达量的升高($P<0.05$)。在脑缺血再灌后14 d CO Ⅱ mRNA的量又有所降低($P<0.05$),淫羊藿苷组可阻止CO Ⅱ mRNA表达量的降低。**结论** 脑缺血再灌可影响CO Ⅱ mRNA表达。灌胃给予淫羊藿苷对于维持CO Ⅱ的正常表达有一定的作用,提示可能是其发挥脑保护作用的机制之一。

关键词: 脑缺血再灌;细胞色素氧化酶;基因表达;淫羊藿苷
中图法分类号: R282.71; R394.3; R743.310.2 **文献标识码:** A

Effect of icariin on expression of cytochrome C oxidase subunit Ⅱ mRNA in mice of cerebral ischemia/reperfusion

LI Li[1], ZHOU Qi-xin[1], SHI Jing-shan[2] ([1]Research Center of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, [2]Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of cerebral ischemia/reperfusion or/and icariin on expression of cytochrome C oxidase subunit Ⅱ (CO Ⅱ) mRNA in mice. **Methods** The mouse model of transient cerebral ischemia/reperfusion was made by bilateral occlusion of common carotid arteries and ischemic hypotension/reperfusion. The mice were divided into several groups at random: normal control group, model group and icariin preventive treatment group (100 mg/kg). The changes in expression levels of CO Ⅱ mRNA in mice cerebral tissue were detected by RT-PCR at different time points. **Results** The levels of CO Ⅱ mRNA in model group had no significant changes at 1 h and 24 h after cerebral ischemia/reperfusion as compared with that in control group, but decreased remarkably at 3 h ($P<0.01$), and CO Ⅱ mRNA in the icariin preventive treatment group had no significant changes. At 72 h after cerebral ischemia/reperfusion CO Ⅱ mRNA in model group significantly increased ($P<0.01$), while pre-treatment with icariin blunted its increasing ($P<0.05$). CO Ⅱ mRNA in model group dropped at 14 d ($P<0.05$), and pre-treatment with icariin blunted its decreasing. **Conclusion** Cerebral ischemia/reperfusion can affect mRNA expression of CO Ⅱ. The pre-treatment with icariin can maintain the expression of CO Ⅱ mRNA, indicating the possible mechanism of the neuroprotective effects of icariin.

Key words: cerebral ischemia/reperfusion; cytochrome oxidase; gene expression; icariin

随着社会老年化趋势和人均寿命的延长,缺血性脑血管疾病的发病率明显上升,严重危害人类健康,给社会和家庭带来沉重负担。脑组织对缺血、缺氧非常敏感。如何保护缺血再灌时脑细胞的功能,长期以来一直是脑血管病研究的热点。细胞色素C氧化酶(cytochrome oxidase,CO)是呼吸链的关键酶。由于细胞色素C氧化酶在能量产生和调节中的重要地位,使之成为研究的理想靶标。目前国内外有关脑缺血再灌条件下细胞色素C氧化酶亚基基因表达变化的研究不多。CO Ⅱ亚基由线粒体DNA编码,是构成级联反应核心的最大亚基之一,位于线粒体细胞质面与细胞色素C进行反应,CO Ⅱ亚基对于维持细胞色素C氧化酶的活性和功能起着重要作用。

淫羊藿苷(icariin,Ica)是从小檗科淫羊藿属植物中提取的黄酮醇甙类化合物。以往研究表明淫羊藿苷具有免疫调节、影响内分泌、改善冠脉循环、增加脑血流量等作用[1,2]。我们以前的实验还证明淫羊藿苷对

基金项目: 重庆医科大学科技基金资助项目(XB200327)
Supported by the Sci & Tech Research Foundation of Chongqing University of Medical Sciences (XB200327)
作者简介: 李 梨(1975-),女,河南省开封市人,博士,讲师,主要从事生化药理与分子生物学方面的研究。电话:(023)68485073
收稿日期: 2005-01-21;**修回日期:** 2005-04-20

体外原代培养的皮层神经元缺氧缺糖损伤具有保护作用[3]，也已经证明淫羊藿苷(10、30、100 mg/kg)灌胃可剂量依赖性的抗小鼠脑缺血再灌损伤，但其具体的作用机制还不清楚。本研究旨在通过观察小鼠脑缺血再灌损伤对细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅱ表达的影响及淫羊藿苷的作用，以期为脑缺血再灌损伤的病因病理研究及其防治提供新的途径和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性昆明小鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供)，体质量 28～33 g，合格证书号 SCXK(渝)20020001。饲养和实验过程中遵守实验动物管理与保护的有关准则。

1.1.2 药品与试剂 淫羊藿苷为贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供，纯度大于 98%。临用时用 0.3% 羧甲基纤维素钠制成混悬液。组织细胞 RNA 抽提试剂盒购自华舜生物工程公司。一步法 RT-PCR 试剂盒、DNA 分子量标准购自 TaKaRa 生物工程公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备和分组 采用双侧颈总动脉夹闭合并缺血降压－再灌注法制备小鼠脑缺血再灌模型[4]。实验鼠术前 12 h 禁食，自由饮水。4% 水合氯醛(0.4 g/kg)腹腔注射麻醉后，仰卧固定于鼠解剖板，颈正中剃毛，以碘酒和 75% 酒精做皮肤常规消毒，沿前后方向正中线纵向剪开颈部皮肤约 0.5 cm，钝性分离组织和肌肉，暴露并分离出双侧颈总动脉，下穿丝线备用(注意不要损伤迷走神经)。于锁骨上方剪一 0.5 cm切口，分离颈总静脉。于颈总静脉处插管(预先肝素内浸泡)抽血降压(约为小鼠总血量的 30%)。无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 20 min。记时结束，松开动脉夹，并回输血液，拔出导管，缝合伤口。放回笼中室温(25 ± 0.5) ℃ 饲养。在全部造模过程中观察动物体温，保持动物肛温在(36 ± 0.5) ℃左右，以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。随机分组为：正常对照组(不分时间点)，模型组(分别设术后 1、3、24、72 h、14 d 5 个时间点)和淫羊藿苷防治组。防治组按淫羊藿苷 100 mg/kg 的剂量，于术前 30 min 和术后每天早晨空腹灌胃 1 次，直至进行检测。模型组予以 0.3% 羧甲基纤维素钠灌胃。

1.2.2 小鼠大脑组织总 RNA 的提取 按试剂盒说明进行操作。紫外分光光度计测量 $D(260)$ 和 $D(280)$，其 $D(260)/D(280)$ 值在 1.8～2.0 范围内。并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，可见清晰的 2～3 条带证明 RNA 未降解。所得 RNA 于 −70 ℃保存。

1.2.3 CO Ⅱ mRNA 的半定量 RT-PCR 分析 以 β-actin 为内对照，按试剂盒说明进行一步法 RT-PCR。在 25 μl 反应总体系中，加入 RNA 1 μg，β-actin 引物对(5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′和 5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′)各 10 pmol，目的基因 CO Ⅱ引物对(5′-GCCTACCCATTCCAACTTGGTC-3′和 5′-AATTATTGAAGCAGATCAGTTTTCG-3′)各 10 pmol。反应条件为：50 ℃ 30 min 逆转录，94 ℃ 2 min 预变性。94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 25 次循环。最后延伸温度为 72 ℃ 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳，结果显示有 300 bp(β-actin)和 683 bp(CO Ⅱ)的 2 条片段。用凝胶成像系统分析，以目的片段和内参照的扫描积分光密度值之比反映各目的片段 mRNA 量的相对高低。

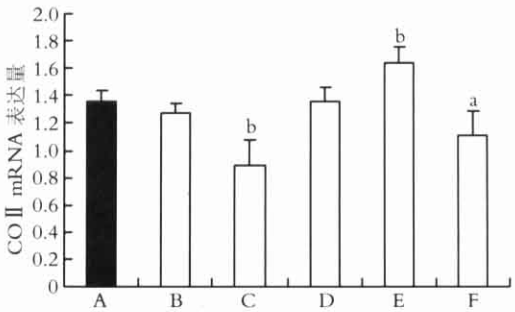
1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 脑缺血再灌损伤对小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA 表达量的影响

如图 1 所示，在脑缺血再灌后 1、3 h 小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA 的量呈降低趋势，并且 3 h 时 CO Ⅱ mRNA 的表达量与对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。24 h 时 CO Ⅱ mRNA 的量趋近于正常，与对照组无显著性差异($P>0.05$)。72 h 时 CO Ⅱ mRNA 的量明显上升，有显著性差异($P<0.01$)。在脑缺血再灌后 14 d 时 CO Ⅱ mRNA 的表达量又有所降低，与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。

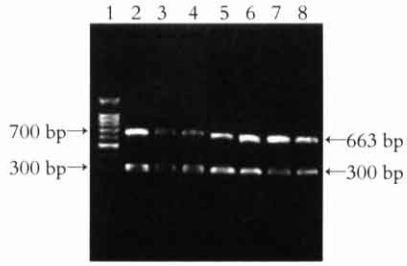


A：对照组；B：缺血/再灌注 1 h；C：缺血/再灌注 3 h；D：缺血/再灌注 24 h；E：缺血/再灌注 72 h；F：缺血/再灌注 14 d；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图 1 脑缺血再灌不同时间点小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA 表达量的变化($n=4$，$\bar{x} \pm s$)

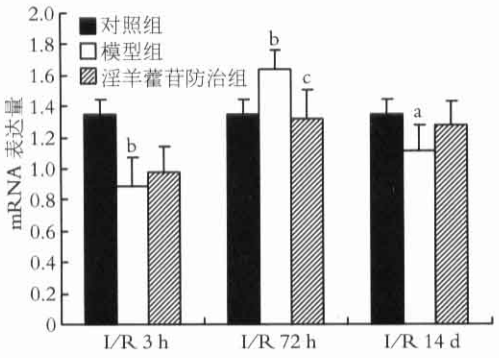
2.2 淫羊藿苷对脑缺血再灌小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA 表达量的影响

淫羊藿苷对小鼠脑缺血再灌后 3 h 时 CO Ⅱ mRNA 表达量的降低略有所阻遏，但与相应模型组比较无显著性差异(图 2、3)。在脑缺血再灌后 72 h 时 CO Ⅱ mRNA 表达量显著上升，而灌胃给予淫羊藿苷可以明显阻止 CO Ⅱ mRNA 表达量的升高，与相应模型组比较有显著性差异($P<0.05$)(图 2、3)。在脑缺血再灌后 14 d 时 CO Ⅱ mRNA 表达量又有所降低，而灌胃给予淫羊藿苷可阻止 CO Ⅱ mRNA 表达量的降低(图 2、3)。



1：分子质量标准；2：对照；3：缺血/再灌注 3 h；4：缺血/再灌注 3 h 淫羊藿苷治疗组；5：缺血/再灌注 14 d；6：缺血/再灌注 14 d 淫羊藿苷治疗组；7：缺血/再灌注 72 h；8：缺血/再灌注 72 h 淫羊藿苷治疗组

图 2 脑缺血再灌(3 h)及淫羊藿苷组小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA RT-PCR 扩增产物电泳结果



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，与模型组比较

图 3　淫羊藿苷对脑缺血再灌小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA 表达量的影响（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

3　讨论

急性脑缺血再灌可引起严重的神经功能障碍。已有的研究表明脑缺血再灌致脑损伤机制十分复杂，涉及能量代谢障碍、自由基生成增多、钙离子超载、兴奋性氨基酸增多等多种复杂因素。其中能量衰竭被认为是缺血性神经元损伤的始动因素。

在脑缺血再灌损伤中线粒体起着关键性作用，是脑缺血缺氧损伤的亚细胞目标[5]。细胞色素 C 氧化酶（CO）即呼吸链复合体酶Ⅳ，是线粒体氧化呼吸的限速酶，直接参与线粒体氧的利用和能量产生。CO 在缺氧、缺血/再灌等病理状态下脑线粒体呼吸链氧化磷酸化功能改变中起重要作用[6-8]。哺乳动物 CO 由 13 个亚单位组成。其中构成级联反应核心的最大 3 个亚单位（CO Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）由线粒体 DNA 编码，其余 10 个亚基由核 DNA 编码。CO Ⅰ亚基与血红素 a、血红素 a3、CuB 结合。CO Ⅱ亚基与 CuA 结合，位于线粒体细胞质面与细胞色素 C 进行反应。CO Ⅲ亚基参与氧化还原连接的质子易位过程，起调节作用。由于 CO 的复杂性和重要性，针对 CO 特定基因的表达与级联反应机制等方面的研究仍处于探索阶段，许多问题还有待进一步研究。因而有必要对 CO Ⅱ在脑缺血再灌中的表达变化做深入研究，以期为探讨脑缺血再灌损伤的分子病理机制和寻找有效药物作用机制打下基础。

本实验显示在脑缺血再灌后 1、3 h 小鼠大脑 CO Ⅱ mRNA 的量呈降低趋势，并且 3 h 时 CO Ⅱ mRNA 的量与对照组比较差异有显著性差异（$P<0.01$）。脑缺血再灌的急性期 CO Ⅱ表达的下降说明 CO Ⅱ是脑缺血再灌损伤的敏感靶标之一。脑缺血再灌可能通过降低 CO Ⅱ mRNA 的表达来达到抑制呼吸链复合体酶Ⅳ活性，从而抑制线粒体的呼吸功能、降低脑能量代谢。淫羊藿苷对脑缺血再灌后 3 h 时 CO Ⅱ mRNA 表达量的降低略有所阻遏，但无显著性差异。24 h时模型组 CO Ⅱ mRNA 的量趋近于正常，72 h 时 CO Ⅱ mRNA 的量明显上升（$P<0.01$）。这可能是组织发生短暂性脑缺血后的代偿作用。缺血再灌损伤后机体 ATP 水平降低，能量需求增加，则激活线粒体的转录，通过调节组织 CO Ⅱ表达，促进呼吸链复合体酶的合成，部分改善能量供给。而灌胃给予淫羊藿苷可以明显阻止 CO Ⅱ mRNA 表达量的升高（$P<0.05$）。在脑缺血再灌后 14 d 时 CO Ⅱ mRNA 的量又有所降低（$P<0.05$）。具体原因尚不清楚，可能是代偿作用减弱，或继发性损伤加重，使脑能量代谢障碍，线粒体呼吸功能受阻。灌胃给予淫羊藿苷可阻止 CO Ⅱ mRNA 表达量的降低。以上结果说明灌胃给予淫羊藿苷可减轻在脑缺血再灌损伤中 CO Ⅱ mRNA 表达量的变化程度，这对于维持 CO Ⅱ的正常表达和细胞色素 C 氧化酶的活性具有积极意义，提示这可能是其发挥脑保护作用的机制之一。同时本实验结果也表明 CO Ⅱ参与了脑缺血再灌损伤的病理过程，有可能是药物作用的靶点之一。

参考文献：

[1] 叶丽卡，陈济民. 淫羊藿的药理研究进展[J]. 中国中药杂志，2001，26(5)：293－295.

[2] 蒋亚生，吴　浩. 淫羊藿药理研究进展[J]. 时珍国药研究，1998，9(3)：281－282.

[3] 李　梨，吴　芹，蒋青松，等. 淫羊藿甙对原代培养神经元缺氧缺糖损伤的保护作用[J]. 中国脑血管病杂志，2004，1(8)：359－361.

[4] 李　梨，郭建增，周岐新，等. 脑缺血再灌致小鼠学习记忆障碍模型的建立[J]. 重庆医科大学学报，2005，30(3)：412－415，455.

[5] 谭小玲，柳君泽，曹利飞，等. 缺氧对大鼠大脑皮质细胞色素氧化酶亚基Ⅰ、Ⅳ表达协同性的影响[J]. 生理学报，2002，54(6)：519－524.

[6] JAN P S，ESSER K，PRATJE E，*et al*. Som1，a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2[J]. Mol Gen Genet，2000，263(3)：483－491.

[7] SOUZA R L，GREEN-WILLMS N S，FOX T D，*et al*. Cloning and characterization of COX18，a Saccharomyces cerevisiae PET gene required for the assembly of cytochrome oxidase[J]. J Biol Chem，2000，275(20)：14898－14902.

[8] HEATON D N，GEORGE G N，GARRISON G，*et al*. The mitochondrial copper metallochaperone COX17 exists as an oligomeric，polycopper complex[J]. Biochemistry，2001，40(3)：743－751.

（编辑　汪勤俭）