短篇论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1912-02

葛根素对大鼠缺血侧皮质、纹状体区神经元凋亡及胶质细胞源性神经生长因子的影响

韩江全[1],李 均[1],李官成[2],胡泳涛[1],周晓兰[3],朱选平[1],梁 恒[1],李继中[1],林冬融[1],赖 敏[1] (遵义医学院第五附属医院:[1]神经内科,[3]检验科,广东 珠海 519100,[2]珠海校区中心实验室,广东 珠海 519041)

摘 要:目的 观察葛根素(Puerarin,Pue)对局灶性脑缺血大鼠海马区胶质源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)表达的影响,进一步探讨Pue的神经保护作用。**方法** 制作大鼠局灶性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,30只SD雄性大鼠被系统抽样随机分为假手术组、缺血组、Pue组。应用TTC染色观察梗死体积,TUNEL染色检测凋亡细胞数,免疫组化方法观察Pue组及缺血组GDNF阳性细胞数,并进行图像分析。**结果** 假手术组、缺血组及Pue组的神经凋亡细胞分别为(3.1±2.12)、(63.7±12.05)及(31.1±7.23);Pue组的凋亡细胞数较缺血组明显减少($P<0.01$)。假手术组、缺血组及Pue组的GDNF阳性细胞含量分别为(99.33±3.44)、(117.87±7.77)及(133.11±4.78)。与假手术组相比,缺血组及Pue组GDNF阳性细胞均显著增加;且Pue组阳性细胞数显著高于缺血组($P<0.01$)。**结论** Pue的神经保护作用可能与其能提高内源性GDNF的表达水平有关。

关键词: 葛根素;胶质源性神经营养因子;脑缺血;免疫组织化学;大鼠
中图法分类号: R394.6; R743.31; R695 **文献标识码:** A

胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor,GDNF)属于TGF-β超家族成员,最早由小鼠胶质细胞株B49细胞分离并命名。这种蛋白质具有很强的促多巴胺能神经元存活的作用。随着研究的深入,发现它具有广谱性神经营养作用。在脑缺血的研究中,发现GDNF参与神经修复过程,并发挥神经保护作用[1]。葛根素(Puerarin,Pue)是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(*Wild*) *Ohwi* 的干燥根中提纯分离得到的8-β-D葡萄吡喃糖-4′,7-二羟基异黄酮,具有扩血管、抗血小板聚集、降血压、抗氧自由基、改善微循环等多种药理作用,临床上广泛用于冠心病、心绞痛、心肌梗死、脑动脉硬化等心脑血管疾病的防治。但脑缺血后,Pue对GDNF表达的影响尚少见报道。本实验用大鼠局灶性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,应用免疫组化方法,观察Pue对局灶性脑缺血大鼠缺血侧皮质、纹状体区GDNF表达的影响,以期进一步揭示Pue的脑保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选择雄性健康SD大鼠30只,体质量250~300 g(由遵义医学院珠海校区实验动物中心提供)。大鼠被系统抽样随机分为3组(每组10只):假手术组、缺血组、Pue组。以上各组再分为2组,1组用于TTC染色,另1组用于凋亡细胞及GDNF测定。Pue组分别在缺血前30 min及模型成功后1 h,腹腔内注射Pue 150 mg/kg。本实验所用Pue是由海南斯达制药有限公司生产,批号:0612030。缺血组、Pue组均在模型成功后24 h内处死。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 采用Longa等[2]的颈内动脉线栓法稍作改良制作局灶性大脑中动脉脑缺血模型。Pue组及缺血组栓线进入深度为17~19 mm,遇阻即止。假手术组栓线进入10~15 mm(仅进入颈内动脉而未达大脑中动脉),其余步骤同上。Pue组及缺血组大鼠之局灶性脑缺血模型均栓塞右侧大脑中动脉,以动物清醒后爬行时向左转圈(追尾现象),严重时向左跌倒,提尾时左前肢内收屈曲为入选标准。

1.2.2 TTC染色及脑梗死体积的测定 各组大鼠在缺血后3 h麻醉后断头取前脑,将脑组织置于-20 ℃下冷冻20 min,从前向后作厚1 mm的切片,置于20 g/L氯化2,4,5-三苯四氮唑(TTC)溶液,37 ℃避光孵育30 min。之后用10%甲醛溶液固定,10 d内测定梗死体积。

1.2.3 切片的制备 实验动物在缺血后3 h,给予1%戊巴比妥钠过量腹腔注射麻醉,暴露心脏,剪开右心耳,先用200 ml生理盐水灌注冲洗,然后用4%多聚甲醛(PBS 0.01 mol/L,pH 7.4)固定脑组织,立即断头取脑,将这些脑组织浸入相同固定液中48 h。常规脱水、透明、石蜡包埋、连续冠状切片,切片厚度6 μm。同一层面相邻切片分别作TUNEL染色及GDNF免疫组化染色。

1.2.4 细胞凋亡检测 采用TUNEL法原位标记DNA片段检测凋亡细胞,试剂盒购自武汉博士德公司,严格按照说明书进行具体操作。

1.2.5 GDNF测定 采用S-P法,以DAB为显色剂进行免疫组织化学染色。严格按照S-P试剂盒使用说明书进行操作。S-P试剂盒购自北京中山生物工程有限公司;BDNF兔多克隆抗体(1∶100)购自美国Santa Cruz公司。结果判定:细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性。阴性对照用0.01 mol/L PBS替代一抗,其余步骤同前。

每只动物取前囟后方1.8~2.2 mm的3处冠状切面,分别

基金项目:珠海市科学技术局基金(PC20041029);珠海市医学重点学科建设资助课题(2008)
Supported by the Foundation of Science and Technology Bureau of Zhuhai (PC20041029) and the Funds for Medical Key Subjects of Zhuhai (2008)
作者简介:韩江全,男,贵州省遵义市人,硕士,主任医师,教授,主要从事脑血管疾病等方面的研究,发表论文20余篇。电话:(0756)5538688,E-mail:gdshanjq@163.com
收稿日期:2008-02-23;修回日期:2009-03-16

对视前区、纹状体和皮质阳性细胞进行计数,每个区域选 5 个视野,在 400 倍光镜下对视野的阳性细胞计数。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　Pue 对局灶性脑缺血大鼠缺血侧梗死体积的影响

TTC 染色显示假手术组脑片染成均匀红色,无梗死灶。缺血组和 Pue 组均出现染成苍白色的梗死灶,位置恒定于大脑中动脉供血的额、顶叶皮质及基底节区。Pue 组梗死体积明显小于缺血组($P<0.01$,表 1)。

2.2　Pue 对局灶性脑缺血大鼠缺血侧皮质、纹状体区神经凋亡细胞的影响

假手术组未见或仅见少量凋亡细胞出现,缺血组可见缺血周边区内有大量凋亡细胞存在。Pue 组缺血周边区内凋亡细胞数较缺血组明显减少($P<0.01$,表 1)。

2.3　Pue 对局灶性脑缺血大鼠缺血侧皮质、纹状体区 GDNF 表达的影响

假手术组可见 GDNF 阳性细胞数目少,着色浅,细胞质着色,阳性细胞多为锥体形,核大,主要位于神经元的细胞质内。缺血组 GDNF 阳性细胞数目增多,着色深,阳性细胞既有锥体形细胞,又有具有纤细突起;主要位于缺血半暗带区。缺血组 GDNF 阳性细胞数与假手术组比较有显著性差异($P<0.01$),Pue 组 GDNF 阳性细胞数目多,着色深,多为锥体形细胞,亦主要位于缺血半暗带区。Pue 组 GDNF 阳性细胞数较缺血组及假手术组均有显著性升高($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 1。

表 1　Pue 对脑缺血后神经凋亡细胞、梗死体积及 GDNF 阳性细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	神经凋亡细胞	梗死体积(%)	GDNF
假手术组	3.10 ± 2.12	0	99.33 ± 3.44
缺血组	63.70 ± 12.05[a]	129.1 ± 18.96	117.87 ± 7.77[a]
Pue 组	31.10 ± 7.23[ab]	80.1 ± 12.76[b]	133.11 ± 4.78[ac]

a: $P<0.01$,与假手术组比较;b: $P<0.01$,c: $P<0.05$,与缺血组比较

3　讨论

GDNF 是一种多效能的神经营养因子,在神经元的功能维持和损伤修复方面有其他神经营养因子不能比拟的强效作用,受到众多学者的关注。研究表明[3,4],GDNF 不仅具有强大的促进多巴胺神经元和运动神经元存活的作用,而且对前脑胆碱能神经元、丘脑和海马神经元亦都具有营养作用。在脑缺血的研究中,发现脑缺血可诱导 GDNF mRNA 和蛋白的表达。大鼠 MCAO 30 min 再灌注 90 min 皮质和尾状核神经元有 GDNF 着色,且皮质强度大于尾状核。脑缺血时,缺血变性死亡的神经元不表达 GDNF,缺血周边区和非缺血区神经元 GDNF 表达明显增强,提示 GDNF 有促进神经元存活的作用。本实验结果与假手术组相比,缺血组 GDNF 阳性细胞数显著增加($P<0.01$),且 GDNF 阳性细胞主要分布于缺血半暗带区,与上述研究一致。

GDNF 对脑缺血的神经保护作用可能与下列机制有关[4]:①调节酪氨酸羟化酶(TH)的表达。成年脑缺血大鼠,海马内注入 GDNF 后,可降低缺血诱发的 TH mRNA 水平;海马局部用 GDNF 处理,也减少了 TH 样免疫阳性反应。②抗 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)的细胞毒作用。GDNF 可减少 NMDA 受体的活性,减少了 NMDA 引发的钙内流。③减少迟发性神经元死亡。短暂性前脑缺血模型用 GDNF 预处理后,将 GDNF 直接注入海马 CAI 区或脑室内,均能防止迟发性神经元死亡。④抗凋亡作用 GDNF 的抗凋亡作用可能与减少 DNA 断裂和凋亡信号有关,也可能是通过 caspases-1、caspases-3 级联反应实现的。

缺血性脑损伤的机制比较复杂,有多种因素参与,如缺血缺氧、能量代谢障碍,局部酸中毒,炎性介质释放、自由基损伤,细胞内 Ca^{2+} 超载,兴奋性氨基酸的毒性作用以及各种细胞因子等。如同时从多个环节采取多种安全有救的保护脑治疗有可能取得满意的疗效。

葛根素注射液是从豆科植物野藕干燥根的总黄酮提取物中经分离纯化而得到的单一成分注射液。由于其药理作用广泛,且药源丰富、价格便宜、不良反应小等优点,临床上已广泛用于防治心脑血管疾病。研究表明[5,6],作为具有雌激素样作用的 Pue,可通过益气活血、通经活络等,多层次、多靶点、多环节发挥其神经保护作用。新近研究发现,Pue 的脑保护作用与上调脑缺血后脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的表达有关[7]。本实验发现,与缺血组相比,Pue 组的神经细胞凋亡数、梗死面积明显减少而 GDNF 阳性细胞表达显著增加($P<0.01$),提示 Pue 有可能通过上调 GDNF 的表达,从而发挥脑保护作用。

参考文献:

[1] Wang Y, Chang C F, Morales M, *et al*. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002,962:423 - 437.

[2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84 - 91.

[3] Wei G, Wu G, Cao X. Dynamic expression of glial cell line-derived neurotrophic factor after cerebral ischemia[J]. Neuroreport, 2000, 11(6):1177 - 1183.

[4] 詹合琴,吴蓝鸥,王廷华. 神经生长因子家族与脑缺血[J]. 国外医学:脑血管疾病分册, 2004, 12(3): 208 - 211.

[5] 么晓轶,李　颖. 植物雌激素对去势雌性大鼠缺血性脑损伤的神经保护作用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2005, 12(3): 160 - 163.

[6] 唐　瑜. 葛根素对脑缺血再灌注损伤保护机制的研究现状[J]. 四川生理科学杂志, 2006, 28(4): 177 - 179.

[7] 韩江全,李官成,周晓兰,等. 葛根素对培养大鼠缺血损伤神经胶质细胞分泌神经生长因子的影响[J]. 中西医结合心脑血管疾病杂志,2008, 6(5): 552 - 553.

(编辑　张　维)