罗布麻提取物对大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡的影响

陈红艳,耿 淼,王建华 (解放军总医院老年医学研究所,北京 100853)

[摘 要] **目的** 探讨罗布麻提取物(AVE)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的防护机制。**方法** 50 只 Wistar 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、罗布麻提取物中剂量(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})组、罗布麻提取物高剂量(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})组、银杏叶胶囊对照组。给药组术前连续灌胃 5 d,于末次给药 30 min 后行手术,采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血模型,缺血 2 h 再灌注 24 h 后进行神经病学评分;氯化三苯四氮唑(TTC)染色检测脑组织梗死面积;免疫组织化学检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。**结果** 药物干预组与模型组比较评分及脑组织梗死面积均差异显著($P<0.05$);药物干预组 Bcl-2 蛋白的表达上调,Bax 蛋白的表达下调。**结论** 与模型组相比,2 个 AVE 剂量组可以减轻神经症状,缩小缺血面积;AVE 可增强 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,从而抑制脑缺血再灌注后神经细胞凋亡,这可能是 AVE 对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用机制之一。

[关键词] 罗布麻;脑缺血再灌注损伤;凋亡;大鼠

[中图分类号] R743.3;R285;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)01-0009-03

Effects of apocynum venetum L extract on neuron apoptosis after cerebral ischemia and reperfusion in rats

CHEN Hong-yan, GENG Miao, WANG Jian-hua (Institute of Geratology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of apocynum venetum L extract(AVE) on neuron apoptosis after cerebral ischemia and reperfusion in rats. **Methods** 50 Wistar male rats were randomly divided into sham operation group, untreated group, medium dose AVE treated group(25 mg·kg^{-1}·d^{-1}), high dose AVE treated group(50 mg·kg^{-1}·d^{-1}), and ginkgo leaf capsules treated group. The animals of medicine groups were intragastrically administered with drugs for 5 days. 30 minutes after the end administration, the operation was performed to induce the middle cerebral artery occlusion(MCAO) model in rats with the method of intraluminal thread. The middle cerebral artery blood flow was blocked for 2 hours and reperfused for 24 hours, then the rats' neurology score was observed. Brain triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and Immunohistochemical method were conducted to observe the effect of Bcl-2 and Bax expression. **Results** The indexes mentioned above in the infarct sizes of rat brain tissue in the AVE treated groups obviously decreased compared with those of the untreated group($P<0.05$). Drug groups could markedly upregulate the expression of anti-apoptosis gene Bcl-2 and restrain the expression of Bax. **Conclusion** AVE could inhibit neuron apoptosis by improving the expression of Bcl-2 protein and down-regulating the expression of Bax protein, which maybe one of the mechanisms of neuron protective effects of AVE on cerebral ischemia and reperfusion injury.

Keywords: apocynum venetum L; cerebral ischemia and reperfusion injury; apoptosis; rats

脑缺血后的病理生理过程复杂,脑缺血再灌注损伤级联反应其中一环是细胞凋亡,抑制神经细胞凋亡有利于缺血性脑血管病的治疗。中药活性成分的多样性常常与损伤级联的复杂性具有针对效应。罗布麻(apocynum venetum L)叶中主要含黄酮类、鞣质、脂肪酸醇酯、矿物质元素等化学成分[1]。其中,总黄酮中槲皮素、芸香苷、金丝桃苷等多种生物活性成分可抑制 Ca^{2+} 内流、抗自由基和抑制一氧化氮(NO)生成,具有抗脑缺血的作用[2-4]。本研究利用大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型来观察不同剂量罗布麻提取物(apocynum venetum L extract, AVE)对大鼠神经功能、细胞凋亡等方面的影响。

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201301005

[基金项目] 军队中医药科研专项基金资助项目(10ZYZ244)

[收稿日期] 2012-09-26 [修回日期] 2012-10-09

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂 AVE 黄色粉末,由解放军第 302 医院药学部提供(用前蒸馏水溶解超声振荡混溶);银杏叶胶囊,每粒 0.2 g,含总黄酮醇苷 9.6 mg,萜内酯 2.4 mg,批号 1252035,由上海信谊百路达药业有限公司提供;氯化三苯四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC),每瓶 10 g,批号 090816,由北京化学试剂公司提供。

1.1.2 实验动物与仪器设备 Wistar 雄性大鼠,体质量(300±20)g,由中国医学科学院实验动物研究所提供(许可证号:S08K 京 20080001)。KQ-250 型超声清洗器,昆山市淀山湖检测仪器厂生产;HZS-H 型水浴振荡器,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司生产;JA1003 型电子天平,上海天平仪器厂生产。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药 将 50 只大鼠随机分为 5 个组:①假手术组(Sham 组);②单纯性缺血模型组(M 组);③罗布麻中

剂量(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})组(AVE-M 组);④罗布麻高剂量(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})组(AVE-H 组);⑤银杏叶胶囊(200 mg·kg^{-1}·d^{-1})对照组(Gink 组)。每组 10 只,大鼠给药组连续灌胃 5 d,于末次给药 30 min 后行脑缺血手术,缺血 2 h 再灌注 24 h;假手术组和 M 组给予同体积生理盐水。

1.2.2 局灶性脑缺血模型的建立 大鼠大脑中动脉缺血模型参考改良 Nagasawa 法[5],手术前大鼠禁食 12 h。腹腔内注射水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠。颈部正中切口,剥离,暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。结扎并剪断 ECA;夹闭 CCA、ICA,将直径 0.28 mm 的栓线自 ECA 插入,将线导入 ICA,至其颅内段,结扎 2 h 后再灌注时将线抽出,结扎 ECA 残端。假手术组只暴露和分离出 CCA、ECA 和 ICA,不闭塞大脑中动脉。术中控制温度在 25 ~ 27 ℃。

1.2.3 神经功能障碍评分 局灶性脑缺血 2 h,再灌注 24 h 后进行单盲神经功能障碍评分,根据标准评分,满分为 11 分,分数越高,动物行为障碍越严重[6]。

1.2.4 脑组织梗死面积测定 MCAO 24 h 后,断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干后,置冰箱冰冻 15 min,冠状切 5 mm 厚,浸入含 3.4 mL 的 4% TTC 蒸馏水和 0.1 mL 的 1 mol/L K_2HPO_4 溶液中,37 ℃水浴 20 min。期间翻动 1 ~ 3 次,经染色后,红色为正常脑组织,而白色为梗死组织。将脑片拍照;挖取并称重未被染成红色的白色梗死组织,称重剩余脑组织,脑组织梗死范围按以下公式计算:梗死脑组织面积(%) = (梗死脑组织重量/全脑重量) ×100。

1.2.5 免疫组织化学检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 常规方法制备脑组织石蜡切片,厚度 5 μm,将石蜡切片置于 3% H_2O_2 室温孵育 5 ~ 10 min,阻断内源性过氧化物酶活性;0.01 mmol/L 枸橼酸缓冲液修复抗原,置 95 ~ 98 ℃,20 min;正常马血清封闭 20 min;分别加入 Bcl-2 和 Bax 蛋白单克隆抗体(1∶100 稀释),4 ℃过夜;依次加入生物素化二抗及三抗,室温下各孵育 30 min;DAB 显色;明矾苏木素复染;常规封片,镜检,胞浆有棕褐色颗粒为阳性细胞。

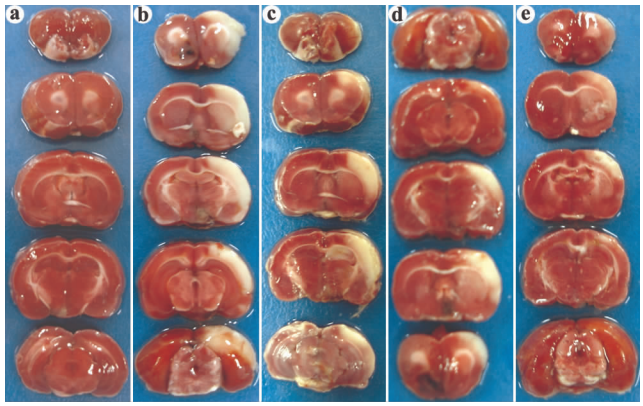
1.2.6 统计学处理 每张切片采集 8 个高倍视野,大脑皮质 4 个,基底核 4 个,每个视野细胞数不少于 100 个。以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠神经功能障碍和脑梗死面积

大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后均出现不同程度的局灶性神经功能障碍,表现为左下肢无力、肩内旋,肌张力、抵抗阻力下降;左侧前肢屈曲、内收,后肢伸直并向同侧转圈。M 组神经功能障碍评分与假手术组有显著性差异($P < 0.01$);AVE-H 组、AVE-M 组、Gink 组与 M 组比较,神经功能障碍评分差异显著($P < 0.01$),结果见表 1。

TTC 染色后 M 组脑梗死组织白色区域较大,AVE-H 组、AVE-M 组和 Gink 组较 M 组小(图 1)。M 组脑梗死面积与假手术组有显著性差异($P < 0.01$);AVE-H 组、AVE-M 组、Gink 组与 M 组比较,脑梗死面积差异显著($P < 0.05$),结果见表 1。



a:Sham 组;b:M 组;c:AVE-M 组;d:AVE-H 组;e:Gink 组

图 1 大鼠脑梗死组织 TTC 染色

表 1 各组神经功能障碍评分与梗死面积($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	神经功能障碍评分	梗死面积(%)
Sham 组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
M 组	9.06 ± 1.95 *	20.52 ± 5.71
AVE-M 组	7.23 ± 1.63 ▲	16.22 ± 5.35 #
AVE-H 组	7.06 ± 1.21 ▲	12.91 ± 4.33 ▲
Gink 组	6.57 ± 0.84 ▲	11.31 ± 5.49 ▲

*:与 Sham 组比较,$P < 0.01$;#:与 M 组比较,$P < 0.05$;▲:与 M 组比较,$P < 0.01$

2.2 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平

大鼠缺血侧前脑皮质、海马等神经细胞均有 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达,药物干预组 Bcl-2 蛋白的表达上调,Bax 蛋白的表达下调(表 2)。

表 2 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的阳性细胞数($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Sham 组	15.87 ± 3.26	19.69 ± 4.23
M 组	20.36 ± 2.12 *	47.55 ± 6.31 #
AVE-M 组	29.38 ± 4.54 ▲	30.14 ± 4.38 ▲
AVE-H 组	36.12 ± 5.63 △	22.96 ± 3.21 △
Gink 组	38.47 ± 4.11 △	21.78 ± 3.45 △

*:与 Sham 组比较,$P < 0.05$;#:与 Sham 组比较,$P < 0.01$;▲:与 M 组比较,$P < 0.05$;△:与 M 组比较,$P < 0.01$

3 讨论

Macmanus 等[7]在阻断大鼠双侧颈总动脉形成的不完全脑缺血模型上观察到,缺血 16 min 再灌注 48 h 后,大鼠脑海马、纹状体细胞发生了凋亡,并且发生的区域是对缺血最为敏感的部位。本研究中脑缺血再灌注后均可见明显神经细胞凋亡,与上述报道一致。细胞凋亡是脑缺血再灌注损伤的重要形式之一,也在发病机制中发挥着重要的作用[8]。Bcl-2 与 Bax 是缺血性脑损伤中重要的凋亡调控基因蛋白,前者抑制细胞

凋亡,后者促进细胞凋亡。Bcl-2 与 Bax 表达的比值能提示细胞是否发生凋亡,两者比例增高时促进细胞存活,否则细胞死亡[9]。

本实验为探讨罗布麻提取物抗凋亡机制,对抑凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 的表达进行了观察。在缺血再灌注损伤中抗细胞凋亡基因 Bcl-2 表现尤为突出。而 Bax 是促凋亡因子,能与抑制凋亡的蛋白 Bcl-2、Bcl-X1 形成异源二聚体,阻断它们抑制凋亡。本实验结果显示不同剂量罗布麻提取物可明显减小 MCAO 后大鼠的脑梗死面积,降低缺血周边区神经元损伤程度,改善脑缺血所致的行为障碍,可能与上调 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bax 蛋白的表达有关。

在大脑中动脉栓塞中 Bcl-2 过度表达虽可抑制自由基产生及神经生长因子缺乏等多种因素所致的神经细胞凋亡,但决定细胞在受到刺激后生存还是凋亡是 Bcl-2/Bax 的比值。目前认为,神经元凋亡的机制一方面与钙离子有关,另一方面与自由基和谷氨酸兴奋性毒性有关[10]。罗布麻叶在临床上对高血压、高血脂、冠心病、哮喘病等疾病有较好的预防和治疗效果[11-15]。罗布麻提取物可通过清除自由基来保护神经细胞免受过氧化损伤,对抗自由基诱导的神经细胞凋亡。Bcl-2 可通过抑制钙离子释放、阻止促凋亡基因信号传递、抑制自由基等而发挥保护神经元抵抗多种损伤、抑制细胞凋亡的作用。

本研究结果显示,药物干预各组细胞凋亡数目均少于脑缺血再灌注组,说明 AVE 可有效减少脑缺血再灌注后的脑损伤,与以往报道结果相符。各药物干预组 Bcl-2 蛋白表达高于对照组,提示 AVE 可上调脑缺血再灌注损伤中 Bcl-2 基因的表达,加速对缺血再灌注损伤引起 DNA 损伤的修复,从而起到脑保护作用。

[参考文献]

[1] 薛华茂,钱学射,张卫明,等. 罗布麻的化学成分研究进展[J]. 中国野生植物资源,2005,24(4):6 - 9.

[2] 陈志武,马传庚,赵维忠. 金丝桃甙对脑缺血再灌损伤保护作用的实验研究[J]. 药学学报,1998,33(1):14 - 17.

[3] 陈志武,马传庚. 金丝桃甙、槲皮素对小鼠脑缺血损伤的保护作用[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(2):21 - 23.

[4] 陈志武,赵维中,宋必卫,等. 芸香甙对脑缺血再灌损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,1998,14(1):81 - 83.

[5] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 1989, 20(8): 1037 - 1043.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈 修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1066 - 1067.

[7] Macmanus JP, Buchan AM, Hill IE, et a1. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain [J]. Neurosci Lett, 1993, 164(1 - 2): 89 - 92.

[8] 韩 英,刘 楠,陈荣华,等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 的表达[J]. 中国临床神经科学,2006,14(1):15 - 19.

[9] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609 - 619.

[10] Zhao H, Yenari M A, Cheng D, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity [J]. J Neurochem, 2003, 85(4): 1026 - 1036.

[11] 黄湘兰,曾 凡. 罗布麻叶化学成分测定[J]. 时珍国医国药,1998,9(6):539 - 540.

[12] Kwan CY, Zhang WB, Nishibe S, et al. A novel in vitro endothelium-dependent vascular relaxant effect of Apocynum venetum leaf extract[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32(9): 789 - 795.

[13] Chen HY, Wang JH, Geng M, et al. Protective effect of extract of Apocynum venetum on kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Yao Xue Xue Bao, 2010, 45(1): 26 - 30.

[14] Zheng M, Liu C, Pan F, et al. Protective effects of flavonoid extract from Apocynum venetum leaves against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(3): 421 - 428.

[15] Kim D, Yokozawa T, Hattori M, et al. Effects of aqueous extracts of Apocynum venetum leaves on spontaneously hypertensive, renal hypertensive and NaCl-fed-hypertensive rats [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72(1 - 2): 53 - 59.

(编辑:余汇洋)

(上接第 8 页)

术的体会[J]. 广西医学,2009,31(11):1614 - 1616.

[4] 楼淑华. 陆雄琴. 76 例舌系带过短矫正术[J]. 上海第二医科大学学报,1998,18(1):18.

[5] 曹桂珍. 143 例儿童舌系带过短矫形术的疗效分析[J]. 贵州医药,2006,30(6): 552 - 553.

[6] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社,2007:88.

[7] 曹 燕. 新生儿舌系带过短矫形术的临床观察[J]. 中国妇幼保健,2004,(8):81.

[8] 陶震江,万林忠,吴煜农,等. 婴儿期行舌系带过短切开术的并发症[J]. 口腔医学,2001,21(3):144 - 145.

[9] 张庆华,白天玺. 湖北荆州、沙市地区 3 215 人中舌系带过短畸形的调查分析[J]. 口腔医学纵横,1990,6(1):46 - 48.

[10] 孙少宣,潘可风. 医学美学中的重要参数 — 黄金律[J]. 上海铁道大学学报(医学版),1997,11(增):72 - 73.

[11] Danikas D, Panagopoulos G. The golden ratio and proportions of beauty [J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 114(4): 1009.

[12] Ferring V, Pancherz H. Divine proportions in the growing face[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2008, 134(4): 472 - 479.

(编辑:郭光金)