基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0943-04

参附注射液预处理对新生大鼠缺氧缺血后脑保护作用

杨丽娟[1]，王 军[2]

（1. 南京医科大学附属医院江苏淮安市第一人民医院新生儿科，南京 100202；
2. 徐州医学院附属医院新生儿科，徐州 221000）

【摘 要】目的：研究参附注射液（Shenfu injection，SF）预处理对新生大鼠脑保护作用。方法：建立新生大鼠缺氧缺血性脑病（Hypoxic-ischemic encephalopathy，HIE）模型，并随机分为 3 组：假手术组（S），生理盐水对照组（C），参附预处理组（SF）。把实验分成 2 部分：①检测新生大鼠缺氧缺血后 24 h 热休克蛋白 HSP70 和 HSP90 表达；②免疫组化方法检测缺氧缺血后 24 h 新生大鼠海马 CA1 区神经元 Bax、Bcl-2 蛋白的表达。结果：缺氧缺血后 24 h，S 组 HSP70 表达较少（0.15±0.02），C 组可见到较多的 HSP70 免疫阳性细胞（0.84±0.14），明显高于 S 组（$P<0.01$）；SF 组 HSP70（1.56±0.16）免疫阳性细胞分布较 C 组广泛，数量明显增多（$P<0.05$）而 SF 组 HSP90 的表达与 C 组相仿；SF 组海马神经元 Bax 表达较生理盐水明显下调（16.5±2.3；23.2±3.4）（$P<0.05$），而 Bcl-2 表达显著增多（36.9±4.1；23.4±3.5）（$P<0.05$）。结论：SF 预处理可通过增加 HSP70 表达，增强新生大鼠对缺氧缺血的耐受能力，通过上调海马 CA1 区椎体细胞 Bcl-2 蛋白的表达，下调 Bax 的蛋白表达，减少神经元凋亡的发生，从而达到对新生大鼠缺氧缺血后脑保护作用。

【关键词】参附注射液；缺氧缺性脑病；凋亡；Bcl-2；Bax；热休克蛋白
【中国图书分类法分类号】R722.12 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-24

Effects of Shenfu injection pretreatment on neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy

YANG Li-Juan[1], *WANG Jun*[2]

(*1. Department of Neonatal, Huai'an First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University; 2. Department of Neonatal, the Affliated Hospital of Xuzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To study the protective effect of Shenfu injection pretreatment on neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE). *Methods*: HIE model rats were randomly divided into three groups: sham operation group(S), saline control group(C), and Shenfu injection pretreatment group (SF). The experiment included two parts: one was to detect the heat shock protein HSP70 and HSP90 expression 24 h after hypoxia-ischemia (HI); the second was to measure the expression of Bcl-2 and Bax of neurons in left hippocampal CAI region. *Results*: There was less expression of HSP70 and HSP90 in S group 24 h after HI; the increase of HSP70 positive cells in group C (0.84±0.14)was significantly higher than that of group S (0.15±0.02)($P<0.01$), and HSP70 immunoreactive neurons were much more widely distributed in

作者介绍：杨丽娟（1975-），女，主治医师，硕士，研究方向：新生儿缺氧缺血性脑病。

Cell Tissue Res, 1999, 298(3): 415-423.

[13] Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP[J]. Nature, 1999, 401(6749): 173-177.

[14] Park S, Yeung M L, Beach S, et al. RKIP down regulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells[J]. Oncogene, 2005, 24(21): 3535-3540.

[15] Minoo P, Zlobec I, Baker K, et al. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 127(5): 820-827.

[16] Lee H C, Tian B, Sedivy J M, et al. Loss of Raf Kinase Inhibitor Protein Promotes Cell Proliferation and Migration of Human Hepatoma Cells[J]. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1208-1217.

[17] Keller E T, Fu Z, Brennan M. The biology of a prostate cancer metastasis suppressor protein: Raf kinase inhibitor protein[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(2): 273-278.

[18] Corbit K C, Trakul N, Eves E M, et al. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein[J]. Biol Chem, 2003, 278(15): 13061-13068.

（责任编辑：张学颖）

SF group(1.56±0.16) than in C group (P<0.05)there was no obvious difference in the expression of HSP90 between these groups.(P>0.05).The expression of Bcl-2(36.9±4.1) or Bax(16.5±2.3) in group SF was markedly higher or lower than that of group C(23.4±3.5;23.2±3.4)(P<0.05). *Conclusion*:The pretreatment of SF could enhance the tolerance to hypoxia ischemia by increasing HSP70 expression in neonatal rats with HIE,and significantly prevent apoptosis of hippocampus neurons from HI insult by up-regulation of the anti-apoptotic gene Bcl-2 and down-regulation of the pro-apoptotic gene Bax.

【Key words】shenfu injection;hypoxic-ischemic encephalopathy;apoptosis;Bcl-2;Bax;heat shock protein

缺氧缺血性脑病(Hypoxic-ischemic encephalopathy,HIE)在临床上,尤其围产期,是危及新生儿生命和导致婴儿和儿童期神经损伤的的主要原因，尽管有关防治的研究颇多,但目前仍未取得明显突破,缺氧缺血耐受现象的发现为缺氧缺血性脑损伤治疗开辟了新的途径,多种物理、化学或药物性预处理方法均可诱导产生脑缺氧缺血耐受[1],本课题组以往的研究发现参附注射液(Shenfu injection,SF)对脑缺血-再灌注损伤具有类似缺氧缺血预适应的脑保护效应[2],有报道缺氧缺血预适应所诱导的脑缺氧缺血耐受与热休克蛋白(Heat shock protein,HSP)表达增强有显著的关系[3],因此,本研究通过免疫组化方法,观察SF预处理对缺氧缺血后HSP70、HSP90和凋亡基因表达的影响,进一步探讨其脑保护效应及其部分机制。

1 材料与方法

1.1 材料

①动物:7 d 龄新生 SD 大鼠（徐州医学院院实验动物中心),雌雄不限,体重 12~16 g。②主要药品、免疫试剂以及仪器:8%O_2/92% N_2 混合气(上海特种气体厂);兔抗 Bcl-2 抗体、兔抗 Bax 抗体、PV 试剂盒和联苯二胺显色剂(北京中山公司);HSP70、HSP90(博士德生物有限公司,武汉)。SF(雅安三九药业有限公司,批号:991210);常压缺氧舱(上海市儿科研究所);LEICA Qwin 图像处理与分析系统(德国)。

1.2 方法

建立新生大鼠 HIE 模型,实验分成 2 大部分:①检测缺氧缺血后 24 h HSP70 和 HSP90 表达；②免疫组化方法测缺氧缺血后 24 h 新生大鼠海马 CA1 区神经元 Bax、Bcl-2 蛋白的表达。HIE 模型的制作:参照 Rice 法,乙醚吸入麻醉后,结扎鼠左侧颈总动脉,术毕 2 h 后置容器中持续吸入 8%O_2、92%N_2 混合气体,流速 2.0 L/min,以钠石灰吸收 CO_2,持续 2 h,S 组仅切开颈正中皮肤和分离左侧颈正中动脉,不结扎,不缺氧,SF 组在缺氧缺血前连续 4 d 腹腔注射 SF 10 ml/kg[1,2],C 组用法同SF组。HI后与母鼠同窝,母乳喂养,室温22~25.9℃,避免强光和噪音刺激,12 h 光照与黑暗交替。

1.3 免疫组化方法检测定及 HSP70、HSP90 半定量分析

各组新生大鼠海马 CA1 区锥体神经元 Bcl-2,Bax-蛋白表达:全部脑标本立即用 10%中性甲醛固定 5 d 后,取材、常规脱水、透明、浸蜡、包埋后,选取海马、齿状回互包平面行连续切片,片厚4 μm。Bcl-2和Bax免疫组化染色(PV法)。HSP70、HSP90 半定量分析由 1 名指定人员按照 McCarthy 等的方法对全部免疫组化染色结果进行半定量分析,即按照细胞着色的程度分成 0~3 四级（0 级无着色、1 级轻度着色、2 级明显着色、3 级深度着色)。每张切片计数 100 个相邻细胞,计算 4 种不同着色程度细胞的百分数,最终抗原表达程度的分值按公式 $\Sigma Pi \times i$ 计算,其中 i 为细胞着色程度,取值为 0、1、2、3,Pi 为细胞着色程度为 i 时的细胞百分数。

1.4 统计学处理

多组间的比较采多个样本比较的秩和检验（Kruskal-Wallis 法,H 检验),P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HSP70、HSP90 半定量分析

S 组 HSP70 和 HSP90 表达较少;C 组可见到较多的 HSP70 免疫阳性细胞,明显高于 S 组(P<0.01);SF 组 HSP70 分布较 C 组广泛,数量明显增多,胞浆及胞核都可见 HSP70 的表达,明显高于 C 组(P<0.05)。而 SF 组 HSP90 的表达与 S 组及 C 组比较差异无统计学意义(P>0.05)(表 1、图 1~3)。

2.2 SF 预处理对 HI 后 Bcl-2、Bax 的分布及灰度的影响

HI 后 24 h,与 S 组相比,C 组和 SF 组 Bcl-2、Bax 在海马 CAI 区表达明显增加,SF组Bcl-2表达明显高于C组(P<0.05),Bax表达明显低于 C 组(P<0.05)(见表 2、图 4~9)。

3 讨 论

SF 是由著名古验方参附汤加工提炼而成,为红参、黑附片的提取物,是采用现代技术提取制备的中药复方制剂,主要成分为人参皂甙(>0.8 mg/ml)和乌头碱(<0.1 mg/ml)。人参皂甙具有清除自由基、抗氧化损伤,抑制细胞内 Ca^{2+}超载的作用,对脑缺血-再灌注损伤有明显的保护作用[4],SF 同样具有

表 1 缺氧缺血 24 h 后 HSP70 和 HSP90 的表达（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数（Ni）	HSP70（秩和 Ri）	HSP90（秩和 Ri）
C组	20	0.84 ± 0.14（520.50）$^{\triangle}$	0.006 ± 0.003（627.65）
SF组	20	1.56 ± 0.16（1002.50）$^{**\triangle\triangle}$	0.008 ± 0.002（583.35）
S组	20	0.15 ± 0.02（267.00）*	0.005 ± 0.001（602.00）
H		27.34	1.34
P		<0.01	>0.05

注：与 C 组比较 *，P <0.05，**，P <0.01；与 S 组比较△，P < 0.05，△△，P<0.01

表 2 HI 24 h 后各组大鼠左侧海马 Bcl-2、Bax 灰度的比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	只数	Bcl-2	Bax
C组	20	23.4 ± 3.5（612.50）$^{\triangle\triangle}$	23.2 ± 3.4（934.00）$^{\triangle\triangle}$
SF组	20	36.9 ± 4.1（988.50）$^{*\triangle\triangle}$	16.5 ± 2.3（678.50）$^{*\triangle}$
S组	20	6.2 ± 0.7（260.00）**	7.0 ± 1.2（213.50）**
H		16.78	12.43
P		<0.01	<0.05

注：与 C 组比较 *，P <0.05，**，P <0.01；与 S 组比较△，P < 0.05，△△，P<0.01

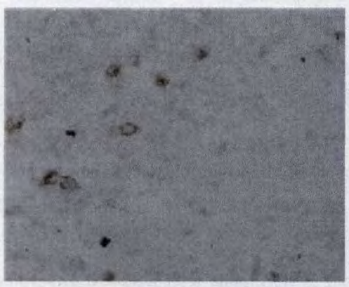


图 1 缺氧缺血 24 h 后 SF 组大鼠左侧海马 HSP70



图 2 缺氧缺血 24 h 后 C 组大鼠左侧海马 HSP70



图 3 缺氧缺血 24 h 后 S 组大鼠左侧海马 HSP70



图 4 HI 24 h 后 SF 组大鼠左侧海马 Bcl-2 蛋白表达（PV 染色 × 200）

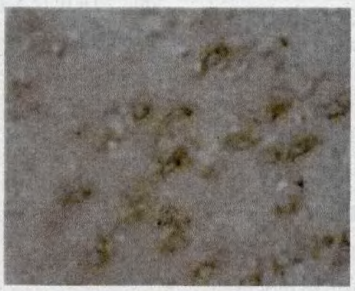


图 5 HI 24 h 后 C 组大鼠左侧海马 Bcl-2 蛋白表达（PV 染色 × 200）

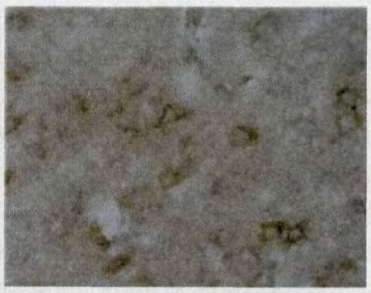


图 6 HI 24 h 后 S 组大鼠左侧海马 Bcl-2 蛋白表达（PV 染色 × 200）



图 7 HI 24 h 后 SF 组大鼠左侧海马 Bax 蛋白表达（PV 染色 × 200）



图 8 HI 24 h 后 C 组大鼠左侧海马 Bax 蛋白表达（PV 染色 × 200）

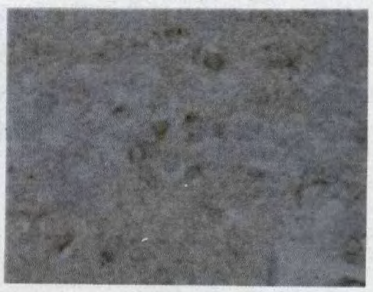


图 9 HI 24 h 后 S 组大鼠左侧海马 Bax 蛋白表达（PV 染色 × 200）

脑保护效应，在大鼠大脑中动脉栓塞模型中，缺氧缺血前给予 SF 预处理可明显减小缺血-再灌注损伤后的脑梗死容积并改善大鼠的神经行为学评分[5]。本研究采用经典的大鼠缺氧缺血模型，根据以往对 SF 预处理剂量效应关系及治疗时间窗的研究结果，所以选择了 10 ml/kg 的剂量[2]。HSP 家族如 HSP70 参与了延长耐受缺氧的时间，增强抗应激能力[5]以及缺血预适应的保护机制[6]，其保护机制是通过伴侣蛋白对应激状态下蛋白质降解的抑制作用而实现，HSP70 在神经元早期的有效聚集是其能耐受缺氧缺血性损伤而得以生存的一个重要标志[7]。Currie 等[3]在大鼠大脑中动脉栓塞模型中应用缺血预适应诱导产生缺血耐受的试验中，出现早期HSP70表达增强及较晚出现的 HSP27 表达增强。本研究结果显示，脑缺氧缺血前给予SF预处理后可使HSP70的表达进一步增多，提示缺氧缺血前给予 SF 具有类似预缺血促进HSP70 表达的效应。在缺氧缺血预适应的保护机制中，HSP70 表达可减少氧自由基生成对抗脑组织的氧化性损伤[8]，同时 SF 具有抗氧化损伤、抑制钙超载、增加心肌缺血-再灌注损伤后HSP70 表达、升高心肌组织 SOD 活性并降低 NMDA 含量等作用[9]，故我们推测 SF 的预处理效应可能通过上述抗氧化损伤、抑制钙超载等多种途径进一步引起 HSP70 表达增多而产生保护效应。在短暂全脑缺血模型中，HSP90 在海马 CA1 区细胞中表达，而在局灶性脑缺血模型中无变化，我们的结果也未发现缺氧缺血 24 h 后 HSP90 表达出现明显变化。有研究报道[10]，HSP90 可与热休克因子 1(HSF1)形成多蛋白复合物并抑制其转录活性，而 HSP70 的转录活性直接与 HSF1 关联，活化的 HSF1 与 HSP70 基因的启动基因结合并刺激其转录活性，同时，HSP70 与 HSP90 等相互的作用对细胞凋亡过程有重要影响[11]，因此，我们在检测 HSP70 表达的同时检测了细胞凋亡相关基因 Bax 和与 Bcl-2 表达情况，观察给予 SF 预处理后，HSP70 表达增加是否会伴随 Bax 和与 Bcl-2 表达变化，研究结果发现，使用 SF 干预后，海马神经元Bcl-2 和 Bax 蛋白表达均有显著的的变化，表现为 SF 组Bcl-2 蛋白表达明显高于生理盐水对照组，而 Bax 蛋白则明显低于生理盐水组的表达，提示 SF 具有抗 HI 后的神经细胞凋亡作用。

综上所述，缺氧缺血前预先给予 SF 具有预处理效应，损伤后神经元 HSP70 表达增强，提示 SF 脑保护效应的可能机制为诱导 HSP70 表达增多，通过上调海马 CA1 区椎体细胞 Bcl-2 蛋白的表达，下调 Bax 的蛋白表达，减少神经元凋亡的发生，从而达到对新生大鼠缺氧缺血后脑保护作用。

参 考 文 献

[1] Alkan T.Neuroproctective effects of ischemic tolerance (precon-ditioning) and post-onditioning[J].Turk Neurosurg,2009,19(4):406-412.

[2] 王 军，杨丽娟，周长美，等.参附注射液对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤干预作用的实验研究[J].中华医学杂志，2006，86(42)：2994-2997.

[3] Currie R W,Ellison J A,White R F,et al Benign focal isehemic preconditioning induces neuronal HSP70 and prolonged astrogliosis with expression of HSP27[J].Brain Res,2000,863:169-181.

[4] Hwang Y P,Jeong H G.Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor related PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells[J].Toxicol Appl Pharmacol,2010,242(1):18-28.

[5] 朱正华，熊利泽，董海龙，等.参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志，2001，8(2)：79-81.

[6] Saleh M C,Connell B J.Ischemic tolerance following low dose NMDA involves modulation of cellular stress protein s[J].Brain Res,2009,1247:(9):212-220.

[7] Matsumori Y,Hong S M,Aoyama K,et al.Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury[J].Cereb Blood Flow Metab,2005,25(7):899-910.

[8] Lu N,Li X J,Li C,et al.Effect of hypoxic preconditioning on the learning and memory ability and expressions of survivin and HSP-70 proteins in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury[J].Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2007,27(12):1856-1859.

[9] Lee S H,Jung B H,Kim S Y,et al.The antistress effect of ginseng total saponin and ginsenoside Rg3 and Rb1 evaluated by brain polyamine level under immobilization stress[J].Pharmacol Res,2006,54(1):46-49.

[10] Ohtsuka K,Suzuki T.Roles of molecular chaperones in the nervous system[J].Brain Res Bull,2000,53:141-146.

[11] Massey A J,Williamson D S,Browne H,et al.A novel,small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells[J].Cancer Chemother Pharmacol,2010,6(3):535-545.

（责任编辑：张学颖）