基础研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1047-04

氧化苦参碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤 BDNF 及其受体 TrkB 表达的影响

付燕燕[1]，段静雨[2]，段昌柱[3]

（徐州医学院 1. 生物学教研室；2. 中药学教研室，徐州 221004；3. 重庆医科大学基础医学院生物学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察氧化苦参碱（Oxymatrine，OMT）对大鼠局灶性脑缺血再灌注后皮质脑源性神经生长因子（Brain-derived neurotrophic factor，BDNF）及其受体酪氨酸激酶 B（Tyrosine kinase B，TrkB）表达的影响，探讨 OMT 神经保护作用的机制。方法：采用线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药尼莫地平组和 OMT 低、中、高剂量给药组 6 组，缺血 2 h 再灌注 24 h 后进行神经功能评分。免疫组化法检测 BDNF 阳性细胞，Western blot 检测 BDNF 和 TrkB 蛋白表达。结果：与模型组比，OMT 中、高剂量组神经学评分均减低，BDNF 阳性细胞数以及 BDNF 和其受体 TrkB 蛋白表达显著增加，差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。结论：OMT 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的恢复有一定促进作用，其机制可能与上调 BDNF 及受体 TrkB 的表达有关。

【关键词】氧化苦参碱；脑缺血再灌注；脑源性神经生长因子；酪氨酸激酶 B

【中国图书分类法分类号】R285.5；R743.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-20

Effect of oxymatrine on the expression of BDNF and its receptor TrkB after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats

FU Yan-yan[1], DUAN Jing-yu[2], DUAN Chang-zhu[3]

(1. Department of Biology; 2. Department of Traditional Chinese Drugs, Xuzhou Medical College; 3. Department of Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of oxymatrine (OMT) on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor tyrosine kinase (TrkB) in cerebral cortex after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats, and explore the neuroprotective mechanism of oxymatrine. *Methods*: The rat middle cerebral artery occlu-

作者介绍：付燕燕（1979-），女，讲师，硕士，
研究方向：中药对脑血管疾病的防治。

参 考 文 献

[1] Schirmer-Mikalsen K, Vik A, Gisvold S E, et al. Severe head injury: control of physiological variables, organ failure and complications in the intensive care unit[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2007, 51(9): 1194-1201.

[2] Fujishima S, Morisaki H, Ishizaka A, et al. Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients[J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62(5): 333-338.

[3] Ryugo M, Sawa Y, Takano H, et al. Effect of a polymorphonuclear elastase inhibitor (sivelestat sodium) on acute lung injury after cardiopulmonary bypass: findings of a double-blind randomized study[J]. Surg Today, 2006, 36 (4): 321-326.

[4] 宋 扬，韩一生. 创伤性脑损伤大鼠动物模型及其评价体系的建立[J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2009，8(6)：521-524.

[5] 史 菲，邱 晨. 大鼠支气管肺泡灌洗术标准化操作的探讨[J]. 中国现代医学杂志，2002，12(24)：67-69.

[6] Bone R C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (Systemic inflammatory response syndrome)[J]. JAMA, 1992, 268(24): 3452-3455.

[7] Kalsotra A, Zhao J, Anak K S, et al. Brain trauma leads to enhanced lung inflammation and injury: evidence for role of P4504Fs in resolution[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(5): 963-974.

[8] Ryugo M, Sawa Y, Takano H, et al. Effect of a polymorphonuclear elastase inhibitor (sivelestat sodium) on acute lung injury after cardiopulmonary bypass: findings of a double-blind randomized study[J]. Surg Today, 2006, 36 (4): 321-326.

[9] 高冬娜，张 或. 中性粒细胞弹性蛋白酶致急性肺损伤机制的研究进展[J]. 中国危重病急救医学，2006，18(8)：510-512.

[10] 沈世琴，朱京慈. 不同药物雾化吸入对重型颅脑损伤大鼠继发肺损伤的作用研究[J]. 中华护理杂志，2007，42(3)：233-236.

[11] 余艳丽，曹殿青. 急性肺损伤药物保护的研究进展[J]. 医学综述，2008，14(21)：3284-3288.

（责任编辑：冉明会）

sion models with filament of focal cerebral ischemia-reperfusion were established.SD male rats were divided randomly into sham group, cerebral ischemia-reperfusion model group, nimodipine(Nim) group and the oxymatrine group.the oxymatrine group was futher divided into three sub-groups which were dealt with the low, middle and high dose of oxymatrine.The neurological scores were used after 2 h ischemia followed by 24 h reperfusion.The expression of BDNF positive neurons, BDNF and TrkB proteins were respectively detected by immunohistochemistry and western blot. *Results*: Compared with the sham group, the neurological scores decreased, while the expression of BDNF positive neurons, BDNF and its receptor TrkB protein significantly increased in middle and high dose of oxymatrine groups($P<0.05$; $P<0.01$). *Conclusion*: OMT protects the rats from the ischemia injury following focal cerebral ischemia-reperfusion, the mechanism of which may partly be due to up-regulating the expression of BDNF and TrkB.

【Key words】oxymatrine; ischemia-reperfusion; brain-derived neurotrophic factor(BDNF); TrkB

氧化苦参碱(Oxymatrine, OMT)是苦豆子、苦参、广豆根等植物中生物碱的主要成分。以往的临床研究发现，其具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎以及强心、降压、抗心律失常等多种药理作用[1-3]。近年的研究发现，在局灶性脑缺血/再灌注大鼠模型上，OMT 具有良好的缺血保护作用，能够明显改善大鼠的神经功能，减少脑梗死体积，其作用机制与抗氧自由基、抑制炎症反应[4,5]等有关。为了进一步探讨脑缺血/再灌注损伤后 OMT 神经保护的作用机制，本研究观察 OMT 对局灶性脑缺血/再灌注大鼠脑皮质脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和特异功能受体酪氨酸激酶 B (Tyrosine kinaseB, TrkB)表达的影响，旨在为临床上进一步应用 OMT 治疗缺血性脑血管疾病奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 药品

OMT(陕西昂盛生物医学科技有限公司，含量 98%，批号 2007011)，阳性药尼莫地平由天津中央制药厂生产，实验均以生理盐水配制成所需浓度使用。

1.2 动物分组

雄性 SD 大鼠 70 只，体重 250~280 g，清洁级，由徐州医学院实验动物中心提供。实验动物随机分为假手术组、脑缺血再灌注模型组、OMT 给药组、阳性药尼莫地平组(Nim 200 mg/kg)，OMT 给药组又分低(35 mg/kg)、中(70 mg/kg)、高剂量组(105 mg/kg)，共 6 组。Nim 组和 OMT 给药组分别按上述剂量腹腔给药，每日 1 次，连续给药 5 d，手术前 30 min 给药。假手术组、脑缺血再灌注模型组均腹腔注射等量的生理盐水。

1.3 局灶性脑缺血再灌注模型制备

采用改良的 Zea-Longa[6]法制备局灶性脑缺血模型(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)：将大鼠腹腔注射水合氯醛 300 mg/kg 麻醉后，在颈部做正中切口，暴露右颈总动脉(Common carotid artery, CCA)、颈内动脉(Internal carotid artery, ICA)、颈外动脉(External carotid artery, ECA)。结扎CCA 和 ECA 根部，由 CCA 近分叉处剪一小口插入尼龙线至 ICA 18~22 mm，扎紧并固定插线，缝合皮肤，阻断血流 2 h 后，通过拔线实现再灌注24 h后断头取脑。假手术组仅插入10 mm，其他步骤同手术组。大鼠麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪，站立不稳，提尾向一侧转圈为制模成功。70 只大鼠符合入选条件的有 60 只，每组随机取 5 只用于免疫组化，5 只用于蛋白免疫印迹检测。

1.4 神经学评分

处死大鼠前，参考文献[7]，进行神经功能缺陷评分。

1.5 BDNF 的表达(免疫组化法)

应用 SP 法(按试剂盒说明严格操作)，一抗为兔抗 BDNF 多克隆抗体。用 PBS 替代一抗作为阴性对照。光镜下观察，以细胞胞浆、胞膜出现棕黄色颗粒为 BDNF 阳性结果。每张切片均取自大鼠大脑皮层，选取 5 个相邻但不重叠视野，400 倍光镜下计数 BDNF 阳性细胞数，取平均值。

1.6 BDNF 及其 TrkB 表达(免疫印迹法)

参考文献[8]，一抗为兔抗 BDNF 或兔抗 TrkB，二抗为辣根过氧化物酶标记的抗小鼠二抗。HMIAS-2000 型全自动医学彩色图像系统分析图像灰度值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件分析。实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组数据间采用单因素方差分析，两两比较用 q 检验，方差不齐时用秩和检验，$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OMT 对大鼠神经功能影响

实验结果表明，模型制备后各组均出现不同程度的脑缺血损伤表现。Nim 组，OMT 中、高剂量给药组与模型组相比，神经学评分均减低，差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$)(见表 1)，表明 OMT 以及 Nim 可明显改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能。

种自我保护机制，可减轻损伤程度，促进后期神经功能的恢复，同时其特异的功能受体 TrkB 表达也增加，且分布时程与 BDNFmRNA相对应，从而扩大 BDNF 的功效[11]。向大鼠脑室内注射 BDNF，结果其脑缺血后的梗死灶面积明显缩小，并能促进感觉及运动功能恢复[12]。但 BDNF 属于大分子物质，很难通过血脑屏障，静脉注射对脑缺血无明显保护作用，因此影响其作为药物临床应用。为此，研究通过药物增加内源性 BDNF 及其受体成为临床治疗脑缺血途径之一。

在本实验中我们发现，OMT 中（70 mg/kg）、高剂量（105 mg/kg）给药组较模型组比有统计学意义，这说明其可明显降低大鼠缺血再灌注损伤后神经学行为评分，改善神经功能障碍，与文献报道一致[13]。而且本实验选用的阳性药尼莫地平，临床上已用于脑缺血保护用药，在以往研究也证实对大鼠局灶性脑缺血再灌注后损伤治疗作用有效[14,15]。实验中我们发现 OMT 中、高剂量给药组与阳性药尼莫地平组比较无统计学意义，进一步证实了 OMT 对局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用。至于其机制的研究，有的学者认为，OMT 通过抑制 MPO 活性以减少 COX-2 表达，从而抑制脑缺血再灌注所致的炎症反应[16]。还有的学者认为，通过下调核因子 κB 表达达到脑缺血损伤保护作用[17]。我们之前的研究发现 OMT 可能通过下调 caspase-12 表达，干扰内质网应激通路，减少神经元凋亡，降低脑缺血再灌注损伤[18]。在本实验中，我们发现与模型组相比，OMT 不仅提高了 BDNF 阳性细胞的数目，还增加了 BDNF 蛋白的表达，同时，OMT 处理组 BDNF 受体 TrkB 蛋白也相应提高，提示脑缺血后 OMT 影响 BDNF 及其受体 TrkB 的表达，BDNF 与 TrkB 相结合，产生相应的效应分子而对缺血神经元起保护作用。

综上，OMT 发挥脑缺血保护作用的机制，可能与其能够上调 BDNF 及受体 TrkB 有关。但 OMT 上调 BDNF 及其受体 TrkB 的表达机制尚不清楚，可能通过激活一些信号通路途径，与其在脑缺血再灌注损伤保护中降低 nNO 活性作用有一定关联，尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 马凌娣，张 彦，文世宏，等.苦参碱对荷瘤小鼠抑瘤作用的实验研究[J].中华肿瘤杂志，2005，27(6)：339-341.

[2] 刘 芬，刘 洁，陈 霞，等.氧化苦参碱的抗炎作用及其机制[J].吉林大学学报·医学版，2005，31(5)：728-730.

[3] 陈 霞，李英骥，葛敬岩，等.氧化苦参碱对正常及乌头碱诱发心律失常大鼠动作电位的影响[J].吉林大学学报·医学版，2004，30(5)：704-706.

[4] 李俐涛，张祥建，尹 静，等.氧化苦参碱对局灶性脑缺血大鼠脑组织炎症信号 TLR4 表达的影响[J].中成药，2009，31(2)：194-198.

[5] 李 娜，李付彪，刘 洁，等.氧化苦参碱对局灶性脑缺血损伤的保护作用[J].吉林大学学报·医学版，2008，34(3)：439-441.

[6] 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.

[7] Bederson J B，Pitts L H，T suji M，et al.Rat middle cerebral artery Occlusion:Evaluation of the model and development of an neurologic examination[J].Stroke，1986，17(3)：472-476.

[8] Yao R Q，Zhang L，Wang W，et al.Comel iridoid glycoside promotes neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function after focal cerebral ischemia in rats[J].Brain Res Bull，2009，79(1)：69-76.

[9] 许 静，齐素华，张光毅.脑源性神经营养因子在预缺血模型神经保护中的作用[J].徐州医学院学报，2010，30(4)：227-229.

[10] 徐晓晓，周江堡.BDNF 对新生鼠缺血缺氧性脑损伤的保护作用的研究[J].重庆医科大学学报，2010，35(11)：1642-1645.

[11] Islam O，Loo T X，Heese K.Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor，MAP kinase，AKT，and STAT-3 signaling pathways[J].Curr Neurovasc Res，2009，6(1)：42-53.

[12] Schabitz W R，Steigleder T，Cooper-Kuhn C M，et al.Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis[J].Stroke，2007，38(7)：2165-2172.

[13] 李 娜，李付彪，刘 洁，等.氧化苦参碱对局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的中枢机制[J].吉林大学学报(医学版)，2008，34(2)：214-216.

[14] 徐忠信，杨 红，刘仲梅，等.尼莫地平对急性脑缺血再灌注损伤保护作用实验研究[J].中国老年学杂志，1998，18(4)：244-245.

[15] 郑红梅.尼莫地平对大鼠脑缺血再灌注损伤疗效分析[J].中国医药指南，2011，9(3)：57.

[16] 吕文伟，张晓璐，刘 芬，等.氧化苦参碱对局灶性脑缺血损伤保护作用及机制研究[J].中草药，2008，39(4)：579-582.

[17] Liu Y，Zhang X J，Yang C H，et al.Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-κB expression [J].Brain Res，2009，1268(1)：174-180.

[18] 付燕燕，段静雨，宋远见.氧化苦参碱对局灶性脑缺血再灌注 caspase-12 表达的影响[J].山东医药，2009，49(47)：40-41.

（责任编辑：冉明会）