

复方天麻蜜环菌糖肽片对大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响

刘振华, 冯建利, 杜怡峰

(山东省立医院神经内科, 山东济南市 250021)

我们于2005年1月至2006年12月通过建立局灶性脑缺血再灌注损伤动物模型, 观察复方天麻蜜环菌糖肽片对大鼠脑缺血周围区凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF)、caspase-3 (cysteine aspartate specific protease-3) 蛋白及神经细胞凋亡的影响, 旨在探讨其对实验性脑梗死脑保护作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组: SPF级健康雄性Wistar大鼠56只[由青岛市实验动物和动物实验中心提供, 许可证号: SCXK (鲁) 20030010], 体质量240~280 g, 随机分为假手术组8只、对照组(生理盐水干预组)24只和药物干预组24只, 后两组再分为缺血90 min再灌注6 h、24 h、72 h 3个亚组, 每个亚组均为8只大鼠。

1.1.2 主要试剂和仪器: AIF兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), caspase-3兔多克隆抗体、即用型SABC免疫组化染色试剂盒、原位末端标记 (TUNEL) 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 给药方法: 复方天麻蜜环菌糖肽片(山西康欣药业有限公司, 每片0.5g含天麻蜜环菌提取物0.3g, 黄芪当归提取物0.2g), 药物干预组大鼠按 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用生理盐水灌胃, 生理盐水干预组单纯灌注等量的生理盐水, 假手术组不灌注药物, 7d后建立动物模型。

1.2.2 大脑中动脉缺血再灌注模型的建立及神经功能的评价: 应用改良的Zea-Longa法^[1], 10%

颈部正中切口, 结扎左侧颈外动脉远端, 热凝其分支, 颈总动脉及颈内动脉置动脉夹, 断开颈外动脉后插入远端涂有硅胶直径约为0.24~0.26 mm的强力渔线, 深度为距颈总动脉分叉处 $(18.0 \pm 0.5) \text{ mm}$, 缝合皮肤。90 min后, 拉渔线至颈外动脉残端。大鼠麻醉清醒后, 参照Longa 5分法进行神经功能评价: 0分为无神经损伤体征; 1分为不能完全伸展对侧前爪; 2分为向对侧转圈; 3分为向对侧倾斜; 4分为不能白发行走, 意识丧失。

1.2.3 标本采集和组织切片的制备: 按照文献^[2]的方法, 各组在规定时间点取材, 在10%的水和氯醛麻醉下, 经左心室插管至升主动脉, 依次灌入生理盐水、4%的多聚甲醛各300ml, 断头取脑, 于前凶前2mm至前凶后3mm之间取材, 切片厚约5mm, 置入4%多聚甲醛后固定12h, 蒸馏水浸泡2h, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋, 与前凶前1mm至前凶后2mm之间连续取材, 制备厚约 $5 \mu\text{m}$ 的脑组织冠状切片。

1.2.4 caspase-3蛋白和AIF的检测: 采用免疫组织化学SABC法, 严格按照说明书操作, DAB显色, 显微镜下观察, 细胞核中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。取缺血后再灌注各组大鼠的大脑切片, 用 0.01 mol/L PBS代替一抗孵育时, 免疫反应阴性则表明一抗的特异性较强。

1.2.5 细胞凋亡检测: TUNEL严格按照试剂盒说明书操作, BCIP/NBT显色, 显微镜观察, 细胞核中出现紫蓝色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞。

1.3 统计学方法

高倍镜下(400 \times) 在额顶叶皮质缺血周围随机取6个不重叠视野计数阳性细胞数, 取其

基金项目: 山东省卫生厅科技发展项目 (2001CAICBBI)

均数, 每组结果以均数±标准差 ($\bar{x}\pm S$) 表示, 用SPSS13.0进行ANOVA分析处理, 两两之间经LSD进行显著性检验。

2 结果

2.1 大鼠神经功能评定结果

大鼠麻醉清醒后取神经功能评分1~3分的大鼠入组, 0分和4分的剔除, 后续补上以保证每组8只大鼠。肢体瘫痪症状以缺血90 min再灌注12~24 h大鼠最显著。

2.2 caspase-3 蛋白表达检测结果

假手术组脑组织偶见caspase-3阳性神经细胞, 对照组脑组织缺血灶周围区于再灌注6 h即有大量caspase-3阳性细胞表达, 再灌注24 h表达进一步增加, 再灌注72 h有所下降; 药物干预组caspase-3阳性细胞区域分布和变化规律与生理盐水干预组相似, 同一时间点比较, 再灌注6 h差异无统计学意义 ($P>0.05$), 再灌注24 h和72 h, 显著低于生理盐水干预组 ($P<0.01$), 见表1、图1~3。

2.3 AIF 表达检测结果

假手术组脑组织仅见少量AIF阳性神经细胞, 对照组脑组织缺血灶周围区于再灌注6 h即有部分AIF阳性细胞表达, 再灌注24 h表达进一步增加, 再灌注72 h有所下降; 药物干预组AIF阳性细胞区域分布和变化规律与对照组相似, 同一时间点相比较, 再灌注24 h和72 h, 显著低于生理盐水干预组 ($P<0.01$), 再灌注6 h两组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表1、图4~6。

2.4 TUNEL 检测结果

TUNEL阳性染色为细胞核呈紫蓝色颗粒, 主要见于缺血灶周围区, 对照组于再灌注6h、24h和72 h表达进一步增加。与药物干预组相同时间点比较, 除再灌注6 h组两者差异无统计学意义 ($P>0.05$), 再灌注24 h和72 h, 每高倍镜下阳性细胞数较生理盐水干预组明显减少 ($P<0.01$), 见表1、图7~9。

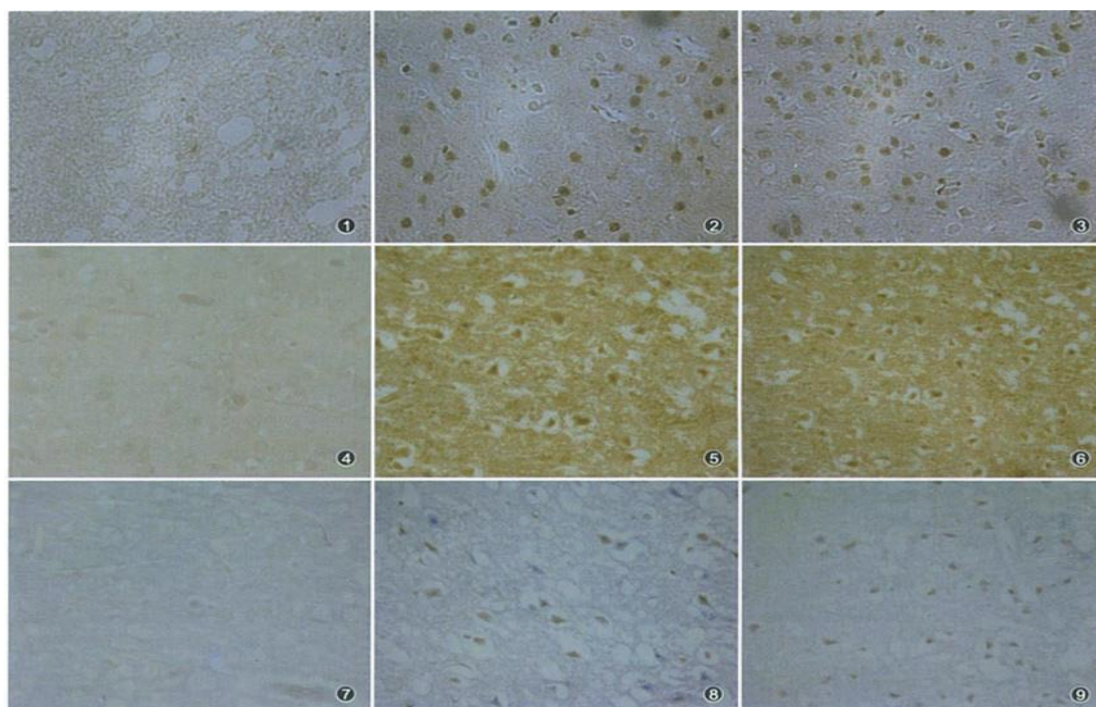


图1~3 为caspase-3阳性细胞的表达, 图1、2、3分别为假手术组、药物干预组和生理盐水干预组再灌注72 h脑组织染色免疫组化DAB染色×400 图4~6 为AIF阳性细胞的表达, 图4、5、6分别为假手术组、药物干预组和生理盐水干预组再灌注72 h脑组织染色免疫组化DAB染色×400 图7~9 为TUNEL阳性细胞的表达, 图7、8、9分别为假手术组、药物干预组和生理盐水干预组再灌注72 h脑组织染色BCIP / NBT染色×400

表1 各组大鼠缺血90 min再灌注不同时间点缺血灶周围脑区caspase-3、AIF、TUNEL阳性细胞的表达 ($\bar{x}\pm$

s)

组别	鼠数 (只)	Caspase-3	AIF	TUNEL
假手术组	8	38.61±2.86	7.85±2.14	5.30±1.20
生理盐水干预组	6 h	10.50±5.86 ^a	45.85±6.24 ^a	22.31±4.25 ^a
	24 h	123.54±9.56 ^a	72.36±8.58 ^a	56.52±5.21 ^a
	72 h	110.53±6.35 ^a	65.19±5.25 ^a	58.15±2.56 ^a
药物干预组	6 h	34.56±2.52 ^{ac}	42.35±7.53 ^{ac}	25.52±5.26 ^{ac}
	24 h	103.65±7.35 ^{ab}	60.25±5.68 ^{ab}	45.32±3.69 ^{ab}
	72 h	90.32±10.56 ^{ab}	50.78±8.54 ^{ab}	40.48±5.50 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与生理盐水干预组同一时间点比较,^b $P<0.01$,^c $P>0.05$

3 讨论

目前一些学者认为,脑缺血后神经细胞的凋亡过程主要通过 caspase 依赖途径和 caspase 非依赖途径实现的。然而, caspase-3 蛋白和 AIF 分别是这两种途径中起关键作用的物质^[3,4]。Caspase-3 在细胞凋亡过程中居中心地位,是细胞凋亡的关键蛋白酶,凋亡的最后实施是通过 caspase-3 的激活而实现的,其表达表明细胞必定死亡。Davoli 等^[5]在大鼠局灶性脑缺血中研究显示,缺血神经元的 caspase-3 表达增加,活性增高。在 caspase-3 基因缺失小鼠缺血 2h 再灌注 48h 后,皮质梗死面积缩小 55%, TUNEL 阳性细胞数减少 36%^[6]。Caspase-3 抑制剂可有效地减少缺血神经元凋亡的数量并改善神经症状^[7],提示 caspase-3 的表达和激活参与了缺血性脑损伤,在缺血神经元凋亡中起重要作用。AIF 是近年来发现的一种凋亡效应分子, Ferrer 等^[4]采用 SD 大鼠脑缺血再灌注模型研究发现,缺血 1h 再灌注 4h 脑缺血侧半暗带区可见明显的 AIF 阳性细胞表达,而缺血对侧仅见少量量的 AIF 阳性细胞,这提示 AIF 参与了缺血后神经细胞损伤过程, AIF 是导致神经细胞凋亡的一个重要因素。

本研究结果表明,大鼠缺血 90min 再灌注后 caspase-3 蛋白和 AIF 的表达明显增加,且其时空分布规律与神经细胞凋亡的变化基本一致,表明缺血再灌注可以诱导 caspase-3 蛋白和 AIF 的表达增加,进而引起神经细胞的凋亡;给予复方天麻蜜环菌糖肽片干预后,治疗组脑缺血 90 min 再灌注 24 h、72 h 与生理盐水干预组

相同时间点比较,其表达均明显降低,提示复方天麻蜜环菌糖肽片可降低 caspase-3 蛋白和 AIF 的表达。有研究表明,脑缺血再灌注损伤可引起神经细胞过量的谷氨酸受体激活、细胞内钙超载、活性氧生成增加、线粒体和 DNA 损伤,从而激活 caspase 级联反应,促使 AIF 从线粒体释放,因而促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Canson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [2] 张红, 王粤, 龚微微, 等. 脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和细胞色素 c 基因表达及肌昔的干预作用. *中华老年医学杂志*, 2004, 23: 652-655.
- [3] Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, et al. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome C from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21: 529-540.
- [4] Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, et al. Caspase-dependent and caspase independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathology Appl Neurobiol*, 2003, 29: 472-481.
- [5] Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*, 2002, 115: 125-136.
- [6] Le DA, Wu YQ, Huang ZH, et al. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3 deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc*

Natl Acad Sci USA, 2002,99:15188- 15193.
[7] Chen Y, Deshmukh M, Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with

delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. J Clin Invest, 1998, 101:1992-1999.

