

山楂叶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡和 c-fos, c-jun 表达的影响

毛晓霞¹, 夏爱华¹, 吴晓光^{2*}, 苗光新¹

(1. 河北省中药研究与开发重点实验室 承德医学院, 河北 承德 067000;
2. 基础医学研究所 承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:**观察山楂叶总黄酮(TFHL)对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡及 c-fos, c-jun 基因表达的影响。**方法:**80只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、TFHL 70, 140 mg·kg⁻¹组和银杏叶片 3.5 mg·kg⁻¹组, 每组16只。四血管阻断法建立全脑缺血再灌注损伤模型, 穿梭箱实验检测学习记忆能力; 分光光度比色法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量; 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的含量; 免疫组化法检测 c-fos 及 c-jun 的表达。**结果:**与假手术组比较, 模型组大鼠学习记忆能力显著降低, 大鼠主动逃避反应率明显降低($P < 0.01$), 脑组织凋亡细胞显著增多($P < 0.01$); c-fos 与 c-jun 基因表达明显增强($P < 0.01$); 与模型组比较, TFHL 及银杏叶片组大鼠主动逃避反应率增高($P < 0.05$), SOD 活性明显升高($P < 0.05$), MDA 含量显著降低($P < 0.05$), 凋亡细胞明显减少($P < 0.05$), c-fos 与 c-jun 基因表达显著降低($P < 0.05$)。**结论:**TFHL 可通过降低脑缺血再灌注损伤脑组织 c-fos 与 c-jun 基因表达、抑制神经元凋亡、改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能, 提高大鼠的学习记忆能力。

[关键词] 山楂叶总黄酮; 缺血再灌注; 凋亡; c-fos; c-jun

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0174-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020174

Impact of Total Flavone of Hawthorn Leaf on Neuronal Apoptosis and c-fos and c-jun Expression in Rat Cerebral Ischemia-reperfusion Injury MAO Xiao-xia¹, XIA Ai-hua¹, WU Xiao-guang^{2*}, MIAO Guang-xin¹
(1. Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Materia Medica, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Institute of Basic Medical, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the total flavone of hawthorn leaf (TFHL) on apoptosis of cerebral ischemia reperfusion injury in rats and c-fos, c-jun the effects of gene expression. **Method:** Eighty SD rats were randomly divided into sham group, model group, TFHL 70 mg·kg⁻¹ group, 140 mg·kg⁻¹ group and Yinxingye tablet 3.5 mg·kg⁻¹ group, and each group of 16. Four blood vessel blocking method to establish the whole cerebral ischemia reperfusion injury model of shuttle box test to detect the ability of learning and memory; spectrophotometric assay superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect the content of caspase-3; immunohistochemical method to detect c-jun and the expression of c-fos. **Result:** Compared with sham group, model group rats learning and memory ability, active rats escape response rate significantly decreased ($P < 0.01$), Brain tissue apoptosis cells increased significantly ($P < 0.01$); c-fos and c-jun gene expression obviously increased ($P < 0.01$). Compared with model group, TFHL active escape response rate and Yinxingye tablet group rats increased ($P < 0.05$), SOD activity was significantly increased ($P < 0.05$), MDA content was significantly lower ($P < 0.05$), apoptotic cells

[收稿日期] 20140830(001)

[基金项目] 河北省卫生厅重点课题(20120160); 河北省高等学校科学研究计划项目(QN2014103); 河北省中医药抗痴呆重点研究室资助项目; 河北省重点学科资助项目

[第一作者] 毛晓霞, 硕士, 讲师, 从事中药研究与开发, Tel:13403249193, E-mail:mao0505@163.com

[通讯作者] * 吴晓光, 副研究员, 从事中药治疗脑血管病的基础研究, Tel:0314-2291217, E-mail:ewxg@qq.com

decreased significantly ($P < 0.05$), *c-fos* and *c-jun* gene expression decreased significantly ($P < 0.05$).
Conclusion: TFHL can reducing cerebral ischemia reperfusion injury of brain tissue *c-fos* and *c-jun* gene expression, inhibition of neural cell apoptosis, improving cerebral ischemia-reperfusion injury in rats of nerve function, improve the learning and memory ability of rats.

[**Key words**] total flavone of hawthorn leaf; ischemia reperfusion; apoptosis; *c-fos*; *c-jun*

脑缺血再灌注损伤不仅造成神经元的坏死,还诱发大量神经元凋亡。有研究表明,抑制神经元凋亡是减轻脑缺血再灌注损伤的有效手段。细胞凋亡(apoptosis)又称细胞程序性死亡,是细胞接受某种信号后或受到某种刺激后由相关基因作用的自杀行为^[1],与快速反应基因家族(immediate early genes, IEG)的 *c-fos* 与 *c-jun* 基因的异常表达密切相关。山楂叶总黄酮(total flavone of hawthorn leaf, TFHL)是从蔷薇科山楂树叶中提取分离的黄酮类化合物,具有抗氧化^[2],减轻炎症反应^[3],抑制胆碱酯酶活性^[4],增加谷氨酸及 *N*-甲基-*D* 天冬氨酸受体 NMDA 受体表达^[5],调控 PI3K/Akt 信号通路^[6] 等的的作用,但其对细胞凋亡的影响未见报道。本研究拟通过四血管阻断法建立脑缺血再灌注损伤模型,观察山楂叶总黄酮对大鼠的神经元凋亡以及 *c-fos*, *c-jun* 基因表达的干预作用。

1 材料

1.1 动物 清洁级成年雄性 Spague-Dawley 大鼠 80 只,体质量 250 ~ 300 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2006-2009。饲养于承德医学院二级实验动物中心,室温维持在 18 ~ 24 °C,相对湿度 40% ~ 60%,自然光照,自由进食进水。

1.2 药物 摘采承德本地山楂树叶 *Crataegus pinnatifida*,由河北省中药研究与开发重点实验室商亚珍研究员鉴定,采用水煎醇沉法提取,分光光度法测得每 1 g 山楂叶生药含总黄酮为 0.097 6 g,高效液相色谱法测得牡荆素鼠李糖苷含量为 1.18%,牡荆葡萄糖苷含量为 5.71%,牡荆素含量为 6.14%,芦丁含量为 5.21%,金丝桃苷含量为 5.68%。银杏叶片(烟台荣昌制药股份有限公司,批号 140404)。

1.3 试剂与仪器 *c-fos* 试剂盒(批号 28793),*c-jun* 试剂盒(批号 26349),均为武汉博士德生物有限公司,caspase-3 检测试剂盒(上海信然实业有限公司,批号 2013197),程控式穿梭箱(中国医学科学院药物研究所)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组给药 大鼠适应性喂养

1 周后,随机分为假手术组、模型组、TFHL 70 mg·kg⁻¹组、TFHL 140 mg·kg⁻¹组和银杏叶片 3.5 mg·kg⁻¹组,每组 16 只。30 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠 *ip* 麻醉,颈背部切口,在第 1 颈椎翼突孔处用电刀电凝并切断双侧椎动脉,然后颈部正中矢状切口,分离双侧颈总动脉,模型组、TFHL 组用动脉夹夹闭双侧颈总动脉 10 min,松开动脉夹 30 min,如此反复 3 次后,缝合皮肤。电刀从中间切断。假手术组除不结扎双侧颈总动脉外,其余操作同模型组。造模前 1 周开始 *ig* 给予相应剂量药物,每天 1 次,共给药 7 次,假手术组及模型组给予等量生理盐水。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 穿梭箱试验^[7]检测大鼠学习记忆能力 穿梭箱视频分析系统是由穿梭箱和视频监测器及电脑软件组成。以声音为条件刺激,电击为非条件刺激。试验时先将大鼠放入箱内适应 5 min,使其熟悉箱内环境。实验开始时,打开电源,蜂鸣器持续鸣叫 5 s,如果大鼠不逃至穿梭箱另一端,则给予电击(箱底部通电流 5 mA、频率 15 Hz 的电刺激),使大鼠逃至不通电的另一端,此时电击停止,否则持续受电击 5 s,间隔 2 min 后再次给予声音刺激,开始新一轮训练,每次实验进行 20 轮声、电刺激。如果大鼠在声音刺激后能完成穿梭动作称主动回避反应(active avoidance evoke potential, ESP);而经电刺激后才能完成穿梭动作成为被动回避反应(passive avoidance response, PAR);不能完成穿梭动作则称为失败(Fail)。大鼠学习记忆能力已完成主动回避次数与测试总次数的比值代表主动回避比率。

2.2.2 检测血清 SOD 的活性及 MDA 含量 行为学实验结束后,各组大鼠内眦静脉取血 2.5 mL,3 000 r·min⁻¹离心 15 min 后,取上清液,-20 °C 冰箱备用。参照试剂说明书检测血清 SOD 活性及 MDA 含量。

2.2.3 检测 caspase-3 的含量 每组随机选取 8 只,冰台上断头,取脑组织,洗去血液,分析天平称重后,加入蛋白裂解液,玻璃研磨器冰盒内研磨,制备 10% 匀浆液,裂解 30 min 后,4 °C 低温离心机 3 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,BAC 法蛋白定

量。参照 ELISA 试剂盒说明,435 nm 波长下检测吸光度 *A*。Cruve Expert 1.0 软件通过对照品的标准曲线计算各组样品 caspase-3 含量。

2.2.4 免疫组化检测 c-fos, c-jun 蛋白表达 每组大鼠余下的 8 只,30 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠麻醉,4% 多聚甲醛灌注,取大脑裂与视交叉之间脑组织,常规石蜡包埋,5 μm 连续冠状切片,每隔 3 片选取 1 片行免疫组化染色。具体步骤按试剂盒说明书进行,c-fos 一抗稀释度为 1:150,c-jun 的抗体稀释度为 1:75,以蒸馏水替代一抗做阴性对照。光镜下观察 c-fos,c-jun 的表达,并利用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件计算 c-fos,c-jun 表达的 *A*。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠穿梭箱试验 与假手术组比较,模型组大鼠主动回避反应率明显降低 ($P < 0.01$);TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 给药干预后,可明显提高大鼠的主动回避反应率,与模型组比较,具有显著差异性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.2 各组大鼠血清 SOD 活性及 MDA 含量 与假手术组比较,模型组大鼠血清 SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$),MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$);TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 干预后,可明显提高血清 SOD 活性,降低血清 MDA 含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.3 各组大鼠海马 caspase-3 的表达 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 caspase-3 蛋白含量显著升高 ($P < 0.01$);TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 给药干预后,可明显降低脑组织 caspase-3 蛋白含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 1 TFHL 对脑缺血再灌注损伤大鼠穿梭箱测试主动回避反应率、血清 SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 1 Effect of TFHL on reaction rate in shuttle box test active avoidance and SOD activity and MDA content in cerebral ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	主动回避反应率 /%	SOD /U·L ⁻¹	MDA /mol·L ⁻¹
假手术	-	89.6 ± 7.7	215.3 ± 38.6	2.3 ± 0.2
模型	-	49.2 ± 5.5 ¹⁾	74.7 ± 19.5 ¹⁾	7.6 ± 0.7 ¹⁾
TFHL	70	56.6 ± 4.8 ²⁾	93.3 ± 27.2 ²⁾	4.5 ± 0.5 ²⁾
	140	67.8 ± 6.2 ³⁾	132.4 ± 36.4 ²⁾	3.2 ± 0.5 ²⁾
银杏叶片	3.5	70.1 ± 6.8 ³⁾	138.6 ± 38.5 ²⁾	2.9 ± 0.4 ²⁾

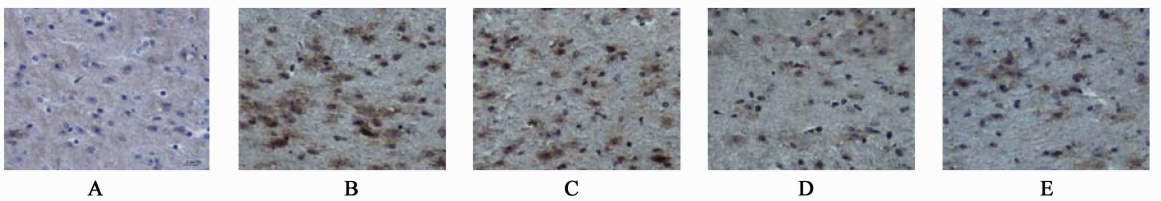
注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 TFHL 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 caspase-3 蛋白表达, c-fos, c-jun 平均吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of TFHL on caspase-3 protein expression and the average absorbance of c-fos and c-jun of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	caspase-3 /ng·L ⁻¹	c-fos /A	c-jun /A
假手术	-	32.8 ± 13.2	0.413 ± 0.079	0.135 ± 0.027
模型	-	76.9 ± 16.8 ¹⁾	0.634 ± 0.095 ¹⁾	0.476 ± 0.036 ¹⁾
TFHL	70	61.8 ± 15.3 ²⁾	0.613 ± 0.076 ²⁾	0.435 ± 0.033 ²⁾
	140	48.7 ± 10.7 ³⁾	0.532 ± 0.067 ²⁾	0.302 ± 0.024 ²⁾
银杏叶片	3.5	46.8 ± 9.5 ³⁾	0.526 ± 0.065 ²⁾	0.290 ± 0.031 ²⁾

3.4 各组大鼠海马 c-fos, c-jun 的表达 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 c-fos, c-jun 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 给药干预后,c-fos, c-jun 蛋白均有不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2,图 1,2。



A. Sham; B. Model; C. TFHL 70 mg·kg⁻¹; D. TFHL 140 mg·kg⁻¹; E. 银杏叶片 3.5 mg·kg⁻¹(图 2 同)

图 1 TFHL 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织神经元 c-fos 表达的影响(免疫组化染色, × 400)

Fig.1 Effect of TFHL on c-fos expression of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain nerve cells(immunohistochemical staining, × 400)

4 讨论

神经元凋亡是造成脑神经功能缺失的关键因素,抑制或减少损伤后神经元凋亡成为缺血性脑血管病治疗的关键^[8]。凋亡是多基因控制的程序性

细胞死亡过程,其中核转录因子 c-fos 和 c-jun 基因起着重要的作用。c-fos 基因是 mys 家族的一员,编码核内 DNA 结合蛋白,调节基因转录。正常生理情况下,c-fos 基因存在于中枢神经系统,处于低表达

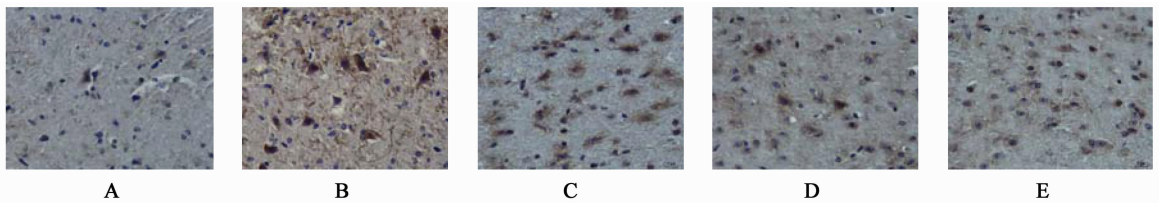


图2 TFHL对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织神经元c-jun表达的影响(免疫组化染色, ×400)

Fig.2 Effect of TFHL on c-jun expression of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain nerve cells (immunohistochemical staining, ×400)

或静止状态,不易检测^[9]。但在机体受到外界强烈刺激后,如缺血,致使细胞核内的c-fos和c-jun基因被激活,转录形成mRNA,c-fos mRNA通过核膜出核,在胞浆内翻译形成Fos蛋白,Fos蛋白磷酸化后进入细胞核与c-jun基因编码的Jun蛋白结合,在亮氨酸拉链(leucine zipper)的介导下形成异源二聚体AP-1复合物,AP-1上有TPA反应元件,可通过其碱性氨基酸区域与目的DNA结合,调控目的基因的转录,诱导其他多种含TPA反的表达,并作为基因调节蛋白调节靶基因或晚发基因的转录,进而诱导细胞发生凋亡^[10],导致大量神经元凋亡、脱落,最终诱发脑神经功能障碍。caspase-3是caspase级联“瀑布”下游最关键的凋亡执行蛋白酶,在神经发育乃至脑缺血等神经系统疾病的病理生理过程中发挥着重要的作用^[11]。脑缺血损伤可激活caspase-3蛋白,从而启动细胞凋亡^[12],药物干预可以抑制细胞凋亡,改善动物的神经功能^[13]。本实验结果显示,脑缺血再灌注损伤模型组大鼠脑组织caspase-3含量较高,而TFHL组脑组织caspase-3含量显著降低,提示TFHL可能通过降低caspase-3活化,减轻细胞凋亡途径,达到保护缺血再灌注损伤脑组织的作用。

近代药理学研究表明,山楂叶提取物TFHL,具有降血压、降血脂、抗氧化及对抗垂体后叶素诱发的家兔急性心肌缺血,缩小其心肌梗死范围等作用,本课题组前期研究还证实TFHL具有抑制兴奋性氨基酸毒性,减轻炎症反应等作用。本实验结果证实,与模型组相比,给予TFHL药物干预后,大鼠脑组织c-fos和c-jun基因表达均有不同程度下降,且学习记忆能力显著提高,说明TFHL对缺血再灌注损伤脑组织有确切的保护作用,其作用机制可能与其抑制c-fos和c-jun基因表达,减轻神经元凋亡有关。山楂树分布广泛,资源丰富,TFHL提炼技术简便,其成本低廉,深入研究其抗脑缺血机制,挖掘其药用价值,对于减轻患者经济负担,提高疗效具有重要的意义。

[参考文献]

[1] 贾占红,赵晖.竹节参皂苷对脑缺血大鼠神经元凋亡和及早基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):168-172.

[2] 吴晓光,郭园园,董荣芳.山楂叶总黄酮预处理对脑缺血再灌注小鼠脑组织抗氧化酶的影响[J].承德医学院学报,2007,24(2):119-121.

[3] 李宝华,吴晓光,檀荣方,等.山楂叶总黄酮对慢性脑缺血大鼠学习记忆及TNF- α 、IL-1含量的影响[J].临床和实验医学杂志,2013,12(11):822-823.

[4] 苗光新,毛晓霞,吴晓光,等.山楂叶总黄酮对血管性痴呆大鼠脑内胆碱能活性及学习记忆的影响[J].解剖学杂志,2014,37(2):192-195.

[5] 赵蕾,吴晓光,杜变英,等.山楂叶总黄酮对血管性痴呆大鼠海马谷氨酸和NMDA受体达的影响[J].广东医学,2014,35(3):353-356.

[6] 赵蕾,张晓红,吴相成,等.山楂叶总黄酮对脑缺血大鼠脑组织PI3K/Akt信号通路的干预[J].广东医学,2014,35(7):982-984.

[7] 张忠霞.骨髓基质细胞侧脑室移植对帕金森病模型大鼠行为和认知功能的影响[D].石家庄:河北医科大学,2009.

[8] 赵雅宁,李建,张姗姗,等.参芎化瘀胶囊通过PI3-K/Akt信号通路改善大鼠缺血性脑损伤[J].西安交通大学学报:医学版,2011,32(5):636-639.

[9] 赵雪花,曾垦.葛根素对大鼠脑缺血再灌注后CasPase-3和c-fos表达的影响[J].数理医药学杂志,2012,25(5):511-512.

[10] 郭志刚.S-腺苷蛋氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤线粒体的保护作用[D].广州:中山大学,2006.

[11] Qing Chang, Xiao Liang Wang. Effects of chiral 3-n-butylphthalide on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003 Aug; 24(8): 796-804.

[12] 刘广义.脑缺血后Caspase-3蛋白Bcl-2和Bax基因表达在神经损伤中的作用[J].医学康复,2010,25(3):163-166.

[13] 李琴,郭云良,李震.胡黄连苷II对大鼠脑缺血/再灌注损伤Caspase-3和PARP表达的影响[J].中国药理学通报,2010,26(3):342-345.

[责任编辑 聂淑琴]