

黄芩茎叶总黄酮预处理对脑缺血再灌注大鼠海马 Fas, FasL 的表达和抗氧化能力的影响

陈萌¹, 赵淑敏^{1*}, 李涵², 孔祥玉¹, 郑小影¹

(1. 承德医学院基础医学部脊髓损伤与修复研究室, 河北承德 067000;

2. 解放军二六六医院妇产科, 河北承德 067000)

[摘要] **目的:**探讨黄芩茎叶总黄酮(scutellaria baicalensis stem-leave total flavonoid, SSTF)预处理对局灶性脑缺血再灌注(I/R)大鼠海马的保护作用及其机制。**方法:**60只SD大鼠随机分为3组,假手术组、缺血再灌注组和SSTF预处理组。SSTF预处理组术前1周给予SSTF 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,其余两组给等量PBS。各组大鼠分别灌胃给药1周后,采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型,缺血2h再灌注24h后观察海马区病理形态学改变及神经元密度,检测海马Fas, FasL蛋白的表达和海马组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、丙二醛(MDA)含量及乳酸脱氢酶(LDH)活性的改变。**结果:**SSTF预处理可减轻损伤海马组织的病理学改变,使存活的神经元增加(180±13.2)。与I/R组比较,SSTF预处理组海马Fas, FasL阳性细胞明显减少(分别为13.26±3.18, 19.08±2.76)。SSTF预处理可降低缺血再灌注引起的海马组织MDA含量增加(P<0.05),提高GSH-Px, LDH酶活性(P<0.01)。**结论:**SSTF预处理对I/R损伤海马具有保护作用。其作用机制可能与下调Fas, FasL表达和提高I/R大鼠海马组织抗氧化能力有关。

[关键词] 缺血再灌注; 黄芩茎叶总黄酮; 海马; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛; 乳酸脱氢酶; Fas; FasL

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0228-05

Effect of *Scutellaria baicalensis* Stem-leave Total Flavonoid on Fas and FasL Expression and Anti-oxidation in Hippocampal Neurons of Rats Induced by Focal Ischemia Reperfusion

CHEN Meng¹, ZHAO Shu-min^{1*}, LI Han², KONG Xiang-yu¹, ZHENG Xiao-ying¹

(1. Laboratory of Spinal Injury and Rehabilitation Department of Preclinical Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, the People's Liberation Army 266 Hospital, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects and mechanisms of *Scutellaria baicalensis* stem-leave total flavonoid (SSTF) pre-treatment on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rat hippocampus. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into 3 groups as following: sham operation group, ischemia reperfusion group, and SSTF pretreated group. Rats of SSTF were perfused with SSTF, other two groups were given PBS solution instead of SSTF equally in a week before the operation. The model of focal cerebral ischemia reperfusion was reproduced by the suture embolic method after treated with SSTF 1 week. After 2 h of occlusion and 24 h reperfusion, morphological changes of hippocampus neurons were observed. The activity of (glutathione peroxidase, GSH-Px) and (lactate dehydrogenase, LDH), and the content of (malondialdehyde MDA) in hippocampus tissue were measured by colorimetric methods. Fas and FasL expression in the hippocampus were

[收稿日期] 20120816(003)

[基金项目] 河北省科技厅,河北省教育厅课题(07276101D-46,2005227)

[第一作者] 陈萌, 硕士, 实验师, 从事电镜技术及中枢神经解剖学方面的研究, Tel: 0314-2291347, E-mail: chenmeng05@126.com

[通讯作者] * 赵淑敏, 教授, 研究生导师, 从事心、脑血管疾病方面的研究, Tel: 0314-2291150, E-mail: zhaoshumin-2008@163.com

determined by immunohistochemical methods and analyzed by a microimage analysis system. **Result:** SSTF pretreatment can alleviate the pathological changes in hippocampus area. Compared with I/R group, the positive cell count of Fas and FasL was decreased significantly in SSTF preteratment group. SSTF decreased the content of MDA and increased the activity of GSH-Px and LDH in hippocampus tissue. **Conclusion:** SSTF pretreatment can ameliorate hippocampus damage induced by focal cerebral ischemia reperfusion in rats, which may be related to down-regulation of Fas and FasL protein expression and increase the anti-oxidant ability of cerebral ischemia reperfusion rats.

[Key words] focal cerebral ischemia reperfusion; *Scutellaria baicalensis* stem-leaf total flavonoid; hippocampus; GSH-Px; MDA; LDH; Fas; FasL

黄芩茎叶总黄酮(*scutellaria baicalensis* stem-leaf total flavonoid, SSTF)为中药黄芩茎叶的主要有效成分,有研究表明^[1-3],SSTF 可以减轻心、脑缺血引起的神经元凋亡和自由基损伤。近年来,脑缺血再灌注后细胞凋亡一直是关注的热点,Fas 是凋亡诱导家族的重要成员之一,与其配体 FasL 结合可向细胞传递死亡信号,引起细胞凋亡。缺血再灌注损伤主要与自由基和一氧化氮有关,黄酮类化合物能产生活性代谢物而影响自由基,对机体的氧化损伤有一定的保护作用。因此,选用药物 SSTF 预处理实验动物,研究其对局灶性脑缺血再灌注海马 Fas, FasL 表达和海马组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和乳酸脱氢酶(LDH)的变化。探讨 SSTF 对海马神经元保护作用的机制,旨在为临床缺血性脑卒中患者提供一种有效的防治药物。

1 材料

1.1 动物 60 只健康清洁级 SD 大鼠,体质量(180~220)g,雌、雄各半,由河北医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(冀)2003-1-003。

1.2 药物与试剂 SSTF 由河北省重点实验室承德医学院中药研究所赠与;兔抗大鼠 Fas 多克隆抗体、兔抗大鼠 FasL 多克隆抗体和 SP 免疫组化试剂盒(内含山羊血清封闭液,生物素标记羊抗兔 IgG,辣根酶标记链霉卵白素),北京中杉金桥生物技术有限公司提供;GSH-Px,MDA,LDH 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 Leica 石蜡切片机(德国);Mivnt 图像分析系统(山东);721W 可见分光光度计(上海)。

2 方法

2.1 动物模型制备 线栓制备:市售直径 0.22 mm 渔线,取 5 cm 长,于距起点(18.5±0.5)mm 处做标记,头端涂凡士林备用。参照 Longa 等^[4]的方法制备大鼠右侧大脑中动脉阻塞模型。从插入线栓开始计时至缺血 2 h 抽出栓线实行再灌注,恢复大脑中

动脉的血流。动物苏醒后出现右侧 Horner 征和左侧躯体运动障碍即为模型成功。假手术组除不插入渔线外,其他操作与手术组相同。

2.2 动物分组及给药 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为假手术组、缺血再灌注组(I/R)和 SSTF 预处理组,SSTF 预处理组用 SSTF(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,假手术组和缺血再灌注组给以等量的 PBS 缓冲液,连用 1 周分别至手术前 24 h。每组 20 只分两部分:10 只用于行为学评分、海马区病理形态学观察和免疫组织化学测定;10 只用于海马组织匀浆生化指标的测定。

2.3 指标检测

2.3.1 神经功能缺损评分 参照 Longa 等^[4]的评分标准,于脑缺血 2 h 再灌注 24 h 时对各组大鼠进行神经功能缺损评分。无神经功能缺损症状 0 分;不能完全伸展对侧前爪 1 分;向外侧转圈 2 分;向内侧倾倒 3 分;不能自发行走,意识丧失 4 分。评分为 1,2,3 分者留用,0,4 分者弃去,并及时补遗。

2.3.2 脑梗死体积测定 脑梗死体积采用红四氮唑(TTC)法。各组大鼠经神经功能缺损评分后,迅速断头取脑,剔除嗅脑、小脑及低位脑干后,在冰盘上沿脑冠状面切成厚度相同的 5 片,置于 2% TTC 溶液中 37℃ 避光孵育 30 min。正常脑组织呈玫瑰红色,缺血梗死组织呈苍白色。4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后数码相机拍照,应用图像分析系统进行分析,计算每张切片的脑梗死面积。根据切片的脑梗死面积及切片的厚度,计算脑梗死体积。

2.3.3 海马组织中 GSH-Px, LDH 活性及 MDA 含量的测定 各组大鼠缺血 2 h 再灌注 24 h 后,迅速断头取脑弃去嗅球、小脑和低位脑干后,于冰盘上分离脑组织,取缺血再灌注(右)侧海马并于低温环境下称重。用冷生理盐水按 1:9 的比例配成 10% 的海马组织匀浆液,用低温离心机(4℃,3 500 r·min⁻¹),离心 10 min,提取上清液,按试剂盒说明书

分别测定损伤侧海马组织中 MDA 含量和 GSH-Px, LDH 酶的活性。

2.3.4 海马区病理形态学观察和免疫组织化学测定 缺血 2 h 再灌注 24 h 后,用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,迅速开胸暴露心脏,经左心室插管入升主动脉,200 mL 生理盐水快速冲洗后,4% 多聚甲醛液 200 mL 灌注固定,取脑(在视交叉平面至乳头体后缘做两道平行冠状切面的脑块),入 4% 多聚甲醛液中后固定 24 h,常规石蜡包埋,连续冠状切片,片厚 5 μm,贴附于预处理的载玻片上,用前脱蜡至水。同一层面相邻切片分别作 HE 染色, Fas, FasL 免疫组织化学检测。HE 染色切片在高倍镜下计数海马 CA1 区 1 mm 长度区段内存活的神经元,计数 3 个区段,取其平均数为神经元密度(ND)。Fas, FasL 免疫组织化学检测,每张切片随机采集海马区互不重叠的 5 个视野,观察每个视野中 Fas, FasL 阳性细胞, Mivnt 图像分析系统计算其阳性细胞个数。

2.4 统计学处理 所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计处理,组间进行方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠神经功能缺损评分的比较 假手术组无神经功能缺损, I/R 组神经功能缺损评分为 (2.75 ± 0.98) 分($n = 10$),明显高于 SSTF 预处理组 (1.68 ± 0.85) 分($P < 0.05$),差异具有统计学意义。见表 1。

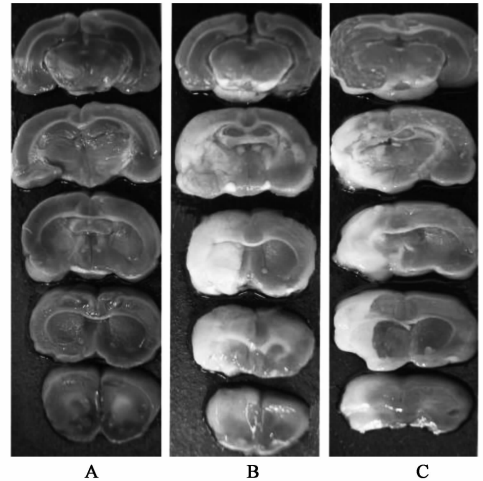
3.2 各组大鼠脑梗死体积的比较 假手术组大鼠脑组织未见明显异常, I/R 组和 SSTF 预处理组脑组织均有不同程度的损伤。与 I/R 比较, SSTF 预处理

组脑梗死体积明显减少($P < 0.01$),差异具有统计学意义。见表 1,图 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分、脑梗死体积的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	神经功能评分 /分	脑梗死体积 /mm ³
假手术	-	-	-
缺血再灌注	-	2.75 ± 0.98	172.98 ± 3.51
SSTF 预处理	100	1.68 ± 0.85 ¹⁾	116.51 ± 1.95 ¹⁾

注:与缺血再灌注组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。



A. 假手术组; B. 缺血再灌注组;

C. SSTF 100 mg·kg⁻¹ 预处理组(图 2~4 同)

图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色结果比较

3.3 各组大鼠海马组织中 GSH-Px 活性、MDA 含量和 LDH 活性的比较 I/R 组大鼠海马组织 GSH-Px, LDH 活性明显低于假手术组($P < 0.01$), MDA 含量升高。SSTF 预处理组海马组织中 GSH-Px, LDH 活性较 I/R 组有明显提高, MDA 含量有所降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 SSTF 预处理对脑缺血再灌注大鼠海马组织中 GSH-Px 活性、MDA 含量和 LDH 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	LDH/U·mg ⁻¹
假手术	-	67.67 ± 5.83 ^{1,2)}	8.97 ± 1.06 ^{1,2)}	17.52 ± 2.35 ^{1,2)}
缺血再灌注	-	20.13 ± 3.14	14.69 ± 1.01	6.82 ± 1.92
SSTF 预处理	100	47.09 ± 4.66 ¹⁾	11.04 ± 0.96 ¹⁾	12.83 ± 2.05 ¹⁾

注:与缺血再灌注组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.4 各组大鼠缺血再灌注侧海马神经元病理形态学改变 假手术组海马神经元形态正常,锥体细胞分 3~5 层,排列整齐,形成完整的细胞带,神经元密度为 230 ± 10.5 ; I/R 组海马神经元形态明显异常,锥体细胞排列紊乱,无明显层次结构,胞体肿胀变形,神经元密度为 68 ± 13.2 ; SSTF 预处理组海马锥体细胞形态欠规则,层数有所减少,细胞间隙稍大,

多数细胞核正常,仅少量神经元发生核固缩,神经元密度 180 ± 13.2 ,较 I/R 组有明显增高($P < 0.01$)。见图 2。

3.5 各组大鼠缺血再灌注侧海马神经元 Fas, FasL 蛋白的表达 假手术组海马区几乎没有 Fas, FasL 阳性细胞。I/R 组 Fas, FasL 阳性细胞分布广泛,主要位于皮层及海马的神经细胞和神经胶质细胞,对

缺血较敏感的海马大锥体细胞也有表达。Fas 表达于胞浆及胞膜, FasL 表达于胞膜。SSTF 预处理组 Fas, FasL 阳性细胞数目显著减少, 与 I/R 组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 3 ~ 4。

表 3 各组大鼠海马 Fas, FasL 阳性细胞个数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Fas/个	FasL/个
假手术	-	1.05 ± 0.67 ^{1,2)}	2.15 ± 0.65 ^{1,2)}
缺血再灌注	-	35.68 ± 2.35	39.08 ± 1.62
SSTF 预处理	100	13.26 ± 3.18 ¹⁾	19.08 ± 2.76 ¹⁾

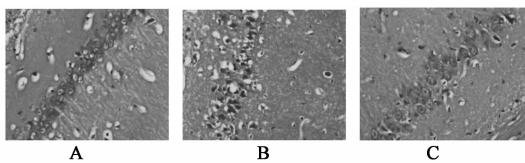


图 2 各组大鼠海马区神经元病理形态学改变 (HE 染色, ×400)

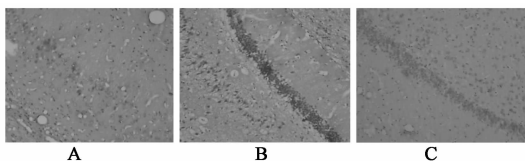


图 3 各组大鼠海马区神经元 Fas 表达 (SP 染色, ×200)

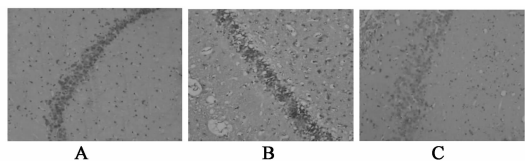


图 4 各组大鼠海马区神经元 FasL 表达 (SP 染色, ×200)

4 讨论

Fas 又称死亡分子, 被命名为 CD95 分子, 是调控细胞凋亡的基因之一。Fas 受体与 FasL 分别属于肿瘤坏死因子受体及肿瘤坏死因子家族。有文献报道, 脑缺血再灌注后存在 Fas 介导的细胞凋亡, 经免疫组化法观察^[5], Fas 阳性细胞广泛分布于大脑皮层、海马神经元及神经胶质细胞, 对缺血较敏感的海马大锥体细胞也有阳性表达。本研究结果显示: 应用 SSTF 预处理后海马区 Fas, FasL 阳性细胞数目明显减少 ($P < 0.01$)。说明 SSTF 预处理可能通过激活 Fas, FasL 使其蛋白表达下降, 对脑缺血再灌注海马损伤起到一定的保护作用。

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种催化过氧化氢分解的酶。它特异的催化还原性谷胱甘肽 (GSH) 对过氧化氢的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。MDA 是脂质过氧化反

应的终产物之一, 能与细胞膜上酶和脂质交联形成变性高分子聚合物, 导致细胞膜上酶和脂质变性, 降低细胞膜的流动性。MDA 的含量可以反映机体脂质过氧化的速度和血管损伤程度以及氧自由基存在的水平。

LDH 广泛存在于各种组织中, 在组织中酶的活性比血清中高 1 000 倍。脑缺血再灌注时引起细胞损伤, 大量存在于神经元细胞胞浆和线粒体中的 LDH 释放到细胞间隙, 再扩散到脑脊液, 通过受损的血脑屏障进入血液^[6]。脑梗死面积越大, 细胞破坏越多, 脑组织中的 LDH 活性越低。因此 LDH 是脑组织损害最敏感的酶, 可准确的反映脑组织细胞受损的程度^[7]。Tagliari 等^[8]认为, LDH 从损伤的细胞内溢出, 可通过测量 LDH 的变化来定量分析脑细胞损伤的程度。Fernandez 等^[9]利用分光光度法测定 LDH 的值估计神经细胞的损伤程度, 也可作为验证药物效果的可靠指标之一。结果显示: SSTF 预处理组, 海马组织中 GSH-Px, LDH 活性较 I/R 组有明显提高, MDA 含量显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 SSTF 预处理可减轻海马组织的氧化损伤。

黄芩茎叶总黄酮的主要成分为黄酮类化合物, 具有多羟基结构使其通过本身被氧化而保护组织细胞膜系统, 间接降低自由基和醛类化合物对细胞的毒害, 保护细胞的结构和功能。赵淑敏等^[10]证实, SSTF 预处理使缺血再灌注损伤的心肌组织中 SOD 活性明显提高, LDH、CK 活性降低, MDA 含量减少, 说明 SSTF 预处理对缺血再灌注心肌有保护作用。以往研究发现, 100 mg·kg⁻¹ SSTF 预处理组的抗氧化作用较为明显, 可较好的减少缺血再灌注后脑组织梗死体积^[11]。因此, 我们把药物剂量定为 100 mg·kg⁻¹, 研究其对 I/R 海马组织的的作用机制。

[参考文献]

- [1] 赵淑敏, 刘胜, 杨宏光, 等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对缺血再灌注心肌脂质过氧化损伤的保护作用[J]. 解剖学杂志, 2006, 29(4): 450.
- [2] 龚明玉, 于晓敏, 周晓慧, 等. 黄芩茎叶总黄酮对缺血再灌注心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 153.
- [3] 于晓敏, 郝祥俊, 龚明玉. 黄芩茎叶总黄酮对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及双面神激酶 2 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 116.
- [4] 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.

鹿茸-山药药对的补虚作用实验研究

牛晓晖, 张海莲, 孙佳明, 李娜, 张辉*

(长春中医药大学, 长春中医药大学研发中心, 长春 130117)

[摘要] **目的:**观察鹿茸-山药药对醇提物(CRP)的补虚作用。**方法:**取 48 只雄性小鼠 18~20 g, 随机分为 4 组, 空白、模型、阳性对照组、给药组, 每组 12 只, 空白组和模型组每只给予生理盐水 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 阳性组给予男宝胶囊 $1.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药组灌胃 CRP $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 除空白组外, 各组给药同时为每只小鼠皮下注射地塞米松 0.04 mg 。第 14 天给药 1 h 后, 在小鼠尾部负重铅块, 在水深 40 cm, 水温 $20 \sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下测试负重游泳时间, 肾脏、肾上腺、睾丸、附睾、胸腺、脾脏及前列腺脏器指数。通过 DPPH 自由基清除实验观察 CRP 的抗氧化能力。通过脾细胞增殖实验观察 CRP 的增强免疫作用。用 ELISA 法检测睾丸间质细胞上清液中睾酮含量。**结果:**CRP 具有明显的抗疲劳作用, 小鼠负重游泳时间为 443.6 s, 与模型组(266.8 s)比较有极显著性意义($P < 0.01$); 给药组附睾指数为 34.77, 与空白组(16.11)比较有极显著性意义($P < 0.05$)。CRP IC_{50} 为 $114 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CRP 浓度在 1 600, 800, 400, 200, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其脾细胞增殖率分别为 74.13%, 51.49%, 41.90%, 30.41%, 21.31%。但无直接的促进睾丸间质细胞分泌睾酮的作用。**结论:**CRP 有较好的补虚作用。

[关键词] 鹿茸; 山药; 肾阳虚; 抗氧化; 免疫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0232-04

Effect of Cervi Cornu Pantotrichum and Dioscoreae Rhizoma Pair in Reinforcing Deficiency

NIU Xiao-hui, ZHANG Hai-lian, SUN Jia-ming, LI Na, ZHANG Hui*

(Changchun University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Research and Development Center of Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** The Cervi Cornu Pantotrichum and Dioscoreae Rhizoma pair (CRP) has been

[收稿日期] 20120826(003)

[基金项目] 鹿茸种质种苗研究 国家科技部重大药物创制(2009ZX09308-002)

[第一作者] 牛晓晖, 在读博士, 讲师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 13351540501

[通讯作者] * 张辉, Tel: 13578688080; Fax: 0431-86172080; E-mail: zhanghui_8080@163.com

[5] 郭翠平, 董秀兰, 闵连秋. 缺血预处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠乳酸脱氢酶和肌酸激酶的影响[J]. 中国脑血管病杂志, 2007, 4(8): 374.

[6] 王键, 胡建鹏, 李净, 等. 脑络欣通对脑缺血再灌注大鼠 Fas、Fas-L 蛋白表达、脑水肿及神经体征的影响[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(2): 87.

[7] 张洪, 童萼塘, 梅元武, 等. 大鼠脑缺血再灌注时检测血中脑细胞胞浆酶的意义[J]. 卒中与神经疾病, 2000, 7(1): 17.

[8] Tagliari B, Zamin L L, Salbego C G, et al. Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation [J]. Metab Brain Dis, 2006, 21(4): 273.

[9] Fernandez L D, Martinez Orgado J, Nunez E, et al. Characterization of the neuro-protective effect of the cannabinoid agonist WIN 55212 in an *in vitro* model of hypoxic ischemic brain damage in newborn rats [J]. Pediatr Res, 2006, 60(2): 169.

[10] 赵淑敏, 孔祥玉, 周健, 等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对缺血再灌注大鼠心肌细胞超微结构的影响[J]. 承德医学院学报, 2005, 22(3): 185.

[11] 陈萌, 赵淑敏, 李涵, 等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对缺血再灌注脑梗死体积和脂质过氧化损伤的影响[J]. 解剖学杂志, 2010, 33(4): 495.

[责任编辑 聂淑琴]