

竹节参总皂苷对脑缺血大鼠神经细胞凋亡和 即早基因表达的影响

贾占红¹, 赵晖^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察竹节参总皂苷(TSPJ)对脑缺血再灌大鼠神经细胞凋亡和早期快速反应基因 c-fos, c-jun 表达的影响。
方法: 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组、TSPJ 组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)。线栓法制备大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤模型; HE 染色检测脑组织病理变化; TUNEL 法检测神经细胞凋亡; 免疫组化方法检测 c-fos, c-jun 的表达。
结果: 脑缺血再灌注损伤后, 模型组大鼠脑组织病理损伤明显, TUNEL 细胞较假手术组显著增多($P < 0.01$), c-fos, c-jun 表达较假手术组明显增强($P < 0.01$); TSPJ 可明显改善模型大鼠脑组织病理形态, TSPJ(200, 100 mg·kg⁻¹)组与模型组相比, TUNEL 阳性细胞数明显减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), c-fos, c-jun 阳性表达减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。
结论: 对脑缺血损伤具有保护作用, 其作用可能是通过下调 c-fos, c-jun 蛋白表达, 从而干预脑缺血后的神经细胞凋亡。

[关键词] 竹节参总皂苷; 脑缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; c-fos; c-jun

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0168-05

Effects of TSPJ on Neuronal Apoptosis and Related Gene Expression in Rat Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

JIA Zhan-hong¹, ZHAO Hui^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

[收稿日期] 20110114(006)

[基金项目] 北京市优秀人材资助项目(20051D0501823); 首都中医药与护理专项基金(11zyh07)

[通讯作者] * 赵晖, 博士, 副教授, 从事心脑血管疾病的基础研究, Tel: 010-83911635, E-mail: zhaohui8957@ sina. com

- [2] 包素珍, 郑小伟, 宋红, 等. 十全大补汤对小鼠 Lewis 肺癌转移及肿瘤细胞周期的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2479.
- [3] Siegel R M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(4): 308.
- [4] Hail N Jr, Carter B Z, Konopleva M, et al. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys[J]. Apoptosis, 2006, 11(6): 889.
- [5] Tatsushi Igaki, Yasuyuki Suzuki, Naoko Tokushice, et al. Evolution of mitochondrial cell death pathway: proapoptotic role of HtrA2/Omi in drosophila [J]. Biochemi Biophys Res Commun, 2007, 356(4): 993.
- [6] Donna Amran, Yolanda Sanchez, Carlos Fernandez, et al. Arsenic trioxide sensitizes promonocytic leukemia cells to TNF α -induced apoptosis via p38-MAPK-regulated activation of both receptor-mediated and mitochondrial pathways[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007, 1773(11): 1653.
- [7] Tomomi K, Donald D Newmeyer. Bel-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2003, 15: 691.
- [8] Hans K, Lorenzo, Santos A Susin. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death [J]. FEBS Letters, 2004, 557: 14.
- [9] Althaus J, Siegelin, Dehghani F, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. Neurochemistry International, 2007, 5: 172.

[责任编辑 何伟]

2. College of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100013, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of total saponins of *Panax japonicus* (TSPJ) on neuronal apoptosis and expression of c-fos, c-jun proteins in rat cerebral injury induced by ischemia and reperfusion. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups: control group, model group, nimodipine group, TSPJ 200, 100, 50 mg·kg⁻¹ groups. The models of cerebral ischemia-reperfusion injury was reproduced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). HE staining was used to assay the pathological changes; TUNEL staining was used to detect apoptotic neurons; immuno-histochemistry was used to observe the protein expression of c-fos and c-jun. **Result:** Compared with the control group, the neuronal apoptosis was increased and the expression of c-fos, c-jun had remarkably enhanced after cerebral ischemia reperfusion ($P < 0.01$); TSPJ improved the pathological changes, TSPJ (200, 100 mg·kg⁻¹) group significantly inhibited the expression of positive neuronal cells of TUNEL and the expression of c-fos, c-jun decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** TSPJ can decrease the number of apoptotic cells after cerebral ischemia and reperfusion by down-regulating the expression of c-fos and c-jun, which may be one of mechanisms of neuroprotective effects.

[Key words] total saponins of *Panax japonicus*; cerebral ischemia-reperfusion injury; apoptosis; c-fos; c-jun

脑缺血一再灌注损伤既可造成神经元坏死,又可诱导神经元凋亡。若采取某些措施,防止缺血一再灌注诱导的神经元凋亡的发生,对于减轻缺血一再灌注损伤、保护脑功能具有重要意义。细胞凋亡伴随着基因的转录和蛋白质的合成,快速反应基因又称即早基因(immediate early genes, IEG)是脑缺血后快速而短暂表达的一簇基因的统称。其主动表达在细胞凋亡的发生过程中起着重要的作用^[1-2]。

竹节参总皂苷(total saponins of *Panax japonicus*, TSPJ)是从五加科植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Meyer 根茎中提取的主要有效活性部位。前期研究表明 TSPJ 有抗脑缺血损伤的作用^[3-4]。本研究拟观察不同剂量 TSPJ 预处理对脑缺血-再灌注损伤大鼠神经元凋亡及 IEG 家族主要成员 c-jun 和 c-fos 表达的影响,探讨其可能机制,为临床应用 TSPJ 防治脑缺血-再灌注损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠,清洁级,体重(280 ~ 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)72000-0001。

1.2 药品及试剂 TSPJ 得率 9.58%,由首都医科大学中医药学院中药化学实验室提供,批号 20080707,临用前以生理盐水稀释至所需浓度;尼莫地平注射剂,山东益健药业有限公司,批号 20070106;抗 c-fos 抗体(兔多抗,SC-52)、抗 c-jun 抗

体(兔多抗,SC-1694)(Santa Cruz Biotech. Inc. USA),HRP 标记的山羊抗兔 IgG 及 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(ZK-8004)均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.3 仪器 Leica ASP300 全自动脱水机,德国; Leica RM2235 轮转式石蜡切片机,德国; Leica HI1210 摊片机,德国; Leica EG1150H 包埋机,德国; Nikon 生物显微镜,日本; NIS-Elements Basic Research 图像采集分析系统,日本。

2 方法

2.1 分组及给药 60 只 SD 雄性大鼠体重(280 ~ 300 g),用随机数字表方法将实验动物随机分为 6 组,即假手术组、模型组、阳性药组(尼莫地平 1.2 mg·kg⁻¹)、TSPJ 组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹),每组 10 只动物;阳性药组、TSPJ 组先 ip 给药 3 d,第 4 天给药后 20 min 施行手术,术后每 6 h 给药 1 次,共 3 次。假手术组、模型组 ip 等容量生理盐水。

2.2 脑缺血再灌注模型制备 参照 Nagasawa^[5]方法,略加改进制作大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠麻醉,仰卧位固定。分离右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉,穿线备用,结扎颈外动脉与颈总动脉,以动脉夹夹闭颈内动脉远心端后,于颈外动脉与颈内动脉分叉处作一切口,从切口处插入头端磨成球形的光滑尼龙线(直径 0.265 mm,距头端 18 mm 处作标记),有阻力感时

停止进线并记录缺血时间,插入深度 18 mm 左右,造成大脑中动脉阻塞。结扎切口处,缝合皮肤。2 h 后将尼龙线轻轻抽到近切口处,实现再灌注。假手术组大鼠麻醉后,仅暴露颈内外动脉分支,不闭塞大脑中动脉。

2.3 神经病学评分 对麻醉清醒后(术后约 120 min)的大鼠参考 Zea Longa 5 级评分法^[6]进行评分。评分标准:0 分,无明显神经功能缺损症状;1 分,轻微神经功能缺损,左侧前爪不能完全伸展;2 分,中度神经功能缺损,向左侧旋转;3 分,重度神经功能缺损,行走时身体倒向左侧;4 分,不能自发行走,意识丧失。分值在 0 分或 4 分动物淘汰。动物脑缺血再灌 24 h 后再次评分,其结果作为评价疗效的指标之一。

2.4 灌注固定及取材 脑缺血再灌大鼠术后 24 h 后取材。每组随机取 5 只大鼠,麻醉后剪开胸腔,充分暴露心脏,快速心内插管,以 37 ℃ 生理盐水冲洗 5 min 后,用 4% 多聚甲醛 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.4)心内灌注固定,待固定充分后,开颅取全脑,冠状位取视交叉向尾端 3~4 mm 组织块,投入相同固定液于 4 ℃ 固定 1 周后。

2.5 大鼠脑组织病理形态学观察方法 固定的大鼠脑组织,取冠状位视交叉向尾端 3~4 mm 组织块,常规石蜡包埋,置于真空组织脱水仪中梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋;石蜡切片机连续冠状切片,切片厚度 5 μm。常规烤片 HE 染色,在 Olympus 光学显微镜下观察各组切片右侧皮质(缺血侧)病理改变。

2.6 凋亡细胞原位检测(TUNEL) 切片(厚度约 2 μm)常规脱蜡至水,按试剂盒说明书操作:切片经 3% 过氧化氢甲醇液、Proteinase K 消化液处理;加含末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)、地高辛标记的 dUTP(DIG-dUTP)反应液 37 ℃ 标记 3 h;室温下血清封闭 30 min 后,加入生物素化抗地高辛抗体(anti-DIG-biotin)37 ℃ 反应 1 h;加入链酶亲和素-过氧化物酶(SABC)37 ℃ 反应 30 min,DAB 显色 30 min,苏木素复染,中性树脂封片。

2.7 c-fos 和 c-jun 免疫组化染色 采用 SP 免疫组织化学染色法进行染色,切片常规脱蜡入水,0.1 mol·L⁻¹ 的 EDTA 缓冲液进行微波抗原修复;3% 过氧化氢室温处理 10 min 以灭活内源酶;每片滴加一抗 50 μL(c-fos 抗体稀释 1:200, c-jun 抗体稀释 1:

100),4 ℃ 过夜;每片滴加二抗 50 μL,37 ℃ 孵育 2 h;DAB 显色 3 min,蒸馏水洗涤终止显色,常规脱水,二甲苯透明后中性树脂封片。

2.8 图像处理及统计分析 Olympus 光学显微镜下观察,LEICA 数字显微照相机采集图像,在每张切片缺血侧(右侧)采集额顶皮质相互不重叠的 6 个视野,利用 NIS-Elements Basic Research 图像采集分析系统计数 TUNEL 阳性细胞,以每个视野平均阳性数作为每张切片凋亡数的量化指标;观察每张切片 c-fos 和 c-jun 阳性细胞免疫染色强度,统计每个视野下 c-fos 和 c-jun 阳性颗粒的积分吸光度(IA)以反映 c-fos 和 c-jun 的免疫染色强度。相关数据利用 SPSS 10.0 统计软件,进行单因素方差分析,并进行 LSD 组间比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

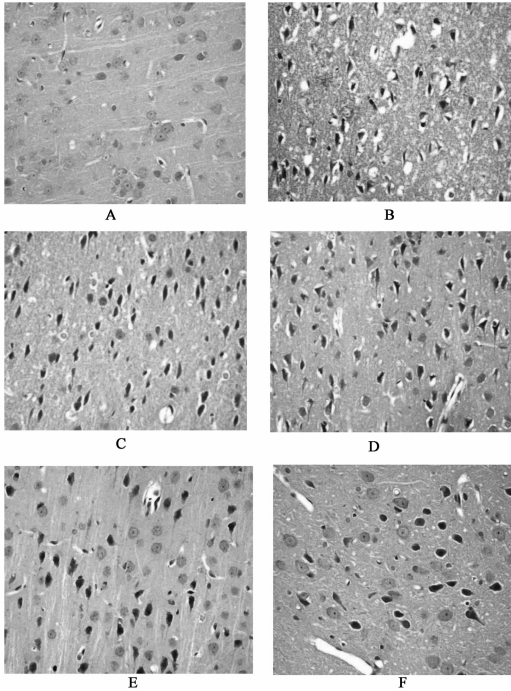
3 结果

3.1 TSPJ 对 MCAO 模型大鼠存活率的影响 脑缺血 2 h,再灌注 24 h 后,模型组大鼠存活率为 70%;TSPJ(200 mg·kg⁻¹)组大鼠存活率为 90%,TSPJ(50、100 mg·kg⁻¹)组大鼠存活率均为 80%;尼莫地平组大鼠存活率为 90%。

3.2 TSPJ 对 MCAO 模型大鼠神经症状评分的影响 假手术组大鼠没有神经功能缺损表现,模型组大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后,神经功能评分(2.78 ± 0.44),表现为左侧前爪不能完全伸展,行走时向左侧旋转或倾倒,甚至不能自行行走;各给药组可不同程度改善模型大鼠神经缺损症状,TSPJ 200 mg·kg⁻¹组神经功能评分(1.8 ± 0.63)、尼莫地平组神经功能评分(1.67 ± 0.71),和模型组相比均有显著性降低($P < 0.01$);TSPJ 100 mg·kg⁻¹组大鼠神经功能评分(2.2 ± 0.42),神经缺损症状也较模型大鼠明显减轻($P < 0.05$);TSPJ 50 mg·kg⁻¹组大鼠神经功能评分(2.4 ± 0.52),神经缺损症状与模型组相比无显著性差异。

3.3 TSPJ 对 MCAO 大鼠病理形态学改变的影响 HE 染色结果显示:假手术组大鼠脑组织结构完整,神经元密集,形态正常,胞浆均匀淡染,间质无水肿。模型组大鼠脑组织出现坏死灶,神经细胞大量变性坏死,胞核不清,固缩深染,胞体皱缩,胞膜与周围分界明显,间质疏松呈筛状,神经元脱失;TSPJ 治疗组缺血侧脑组织病变性质与模型组相同,病理变化的程度减轻。TSPJ 组(200 mg·kg⁻¹)有少量锥体细胞出现核固缩,多数细胞核仁清晰,胞浆均质淡染;

TSPJ(100 mg·kg⁻¹)组神经细胞及间质仅有轻微水肿,核固缩少见,神经元变性程度较轻;TSPJ(50 mg·kg⁻¹)组神经细胞及间质水肿明显减轻,神经元核固缩较多见,神经元变性程度中等(图1)。



A. 假手术组;B. 模型组;C. TSPJ 50 mg·kg⁻¹组;
D. TSPJ 100 mg·kg⁻¹组;E. TSPJ 200 mg·kg⁻¹组;
F. 尼莫地平 1.2 mg·kg⁻¹组

图1 TSPJ对MCAO大鼠病理形态学改变的影响(HE, ×400)

3.4 TSPJ对MCAO大鼠神经细胞凋亡的影响

TUNEL阳性细胞多为圆形或椭圆形,胞浆及核内染色呈棕褐色。假手术组未见TUNEL阳性细胞。模型组大鼠大脑中动脉(MCA)供血区的皮质、尾壳核TUNEL阳性细胞数目增多。TSPJ(200, 100 mg·kg⁻¹)组与模型组相比,TUNEL阳性细胞数明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),提示TSPJ可减少脑组织神经细胞的凋亡。见表1。

3.5 TSPJ对MCAO大鼠皮质脑区c-fos,c-jun表达的影响

c-fos,c-jun阳性细胞的胞核呈棕黄或棕褐色。假手术组c-fos,c-jun表达呈弱阳性。缺血2h再灌注24h后c-fos,c-jun被大量诱导表达,特别是在缺血脑区皮质部表达强烈,与模型组相比,TSPJ(200,100 mg·kg⁻¹)组缺血侧皮质神经元c-fos,c-jun阳性表达的积分吸光度(IA)显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),提示TSPJ可下调c-fos,c-jun的表达。见表2。

表1 TSPJ对MCAO大鼠皮质神经细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	凋亡细胞/个/mm ²
模型	-	36.17 ± 6.82
TSPJ	200	28.33 ± 7.09 ²⁾
	100	30.00 ± 4.63 ¹⁾
	50	32.83 ± 7.09
尼莫地平	1.2	25.75 ± 6.41 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

表2 TSPJ对MCAO大鼠皮质c-fos,c-jun阳性细胞积分吸光度的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	c-fos	c-jun
假手术		10.92 ± 6.53 ²⁾	21.60 ± 11.75 ²⁾
模型		43.03 ± 16.89	70.39 ± 31.27
TSPJ	200	22.47 ± 11.64 ²⁾	41.99 ± 16.46 ²⁾
	100	26.70 ± 23.91 ¹⁾	51.36 ± 22.89 ²⁾
	50	25.69 ± 11.68 ¹⁾	64.96 ± 9.89
尼莫地平	1.2	26.55 ± 15.91 ¹⁾	45.99 ± 28.71 ²⁾

4 讨论

缺血再灌注损伤是缺血性脑血管病常见的临床病理生理过程,既往人们认为缺血再灌注损伤的最终结局均为细胞的坏死,但研究表明,在缺血再灌注损伤时除坏死外,还存在另一种细胞死亡形式细胞凋亡。本研究观察到脑缺血2h再灌注24h后,脑组织出现坏死灶,神经细胞大量变性坏死,皮层脑区出现大量神经细胞凋亡,结果表明神经细胞坏死和凋亡在缺血再灌注损伤的病理过程中均起着重要的作用。

近年来有学者提出在卒中治疗机会上存在“多个治疗机会窗”的概念,包括“初级”与“次级”预防窗、脑缺血超早期干预窗、缺血损害发生后的恢复期可能存在的治疗机会窗。细胞凋亡作为脑缺血过程中神经元死亡的一种形式,受基因调控,而且其发生过程中需要生物大分子的合成,这就提示我们,通过控制凋亡相关基因,或者控制其相关大分子的合成,便有可能达到减少细胞凋亡的目的。早期快速反应基因(immediate-early genes, IEGs)是在接受了外界信息后最先被活化的基因,激活后可继而转录激活另外一些后效基因。IEGs表达的改变在迟发性神经元坏死、梗死灶远隔部位神经元损害、神经元的缺

血耐受性等方面都有重要意义。c-fos, c-jun 基因为编码核蛋白的基因,是 IEG 家族主要成员,Drugunow 和 Preston 研究发现,中度缺血缺氧产生的细胞凋亡与缺血侧神经元 c-fos, c-jun 蛋白的快速诱导及 c-jun 在缺血后 24 ~ 48 h 的延迟大量表达有关^[7]。其促凋亡的机制可能为:c-fos, c-jun 的产物 Fos, Jun 经亮氨酸拉链,联合为杂合二聚体,即转录因子 AP-1, 特异性与 DNA 上 AP-1 结合位点结合而启动晚期效应基因的转录,从而促进凋亡^[8-9]。

竹节参是五加科植物竹节参 *Panax japonicus* C. A Meyer 根茎,为国家珍稀名贵药材。早在清代《纲目拾遗》中有载,称其为“血症良药”。竹节参与人参和三七是同科同属的植物,具有益气补虚、舒筋活血等类似人参和三七的功用。本实验的结果初步证实在 MCAO 术前 3 d 给予 TSPJ,大鼠脑组织的 c-fos, c-jun 的表达与模型组比较呈不同程度的下降,且神经病学症状明显减轻,说明应用 TSPJ 干预对脑缺血确有保护作用,可能是通过下调 c-fos, c-jun 的表达从而抑制神经细胞的凋亡而发挥作用。

竹节参虽为药典所载品种,由于野生植物资源有限,研究甚少。随着竹节参在鄂西北部地区家种成功,植物资源的丰富,对其进行系统研究,挖掘其药用价值具有重要和长远的意义。

[参考文献]

[1] Has C A, Frotscher M, Deller T. Differential induction of c-fos, c-jun and Jun B in the rat central nervous system following unilateral entorhinal cortex lesion [J].

Neuroscience, 1999, 90 (1) :41.

[2] Lindwall C, Kanje M. The Janus role of c-Jun; cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons [J]. Exp Neurol, 2005, 196(1) :184.

[3] 赵晖,张秋霞,穆阳. 竹节参总皂苷对局灶性脑缺血大鼠模型的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12 (3) :43.

[4] 赵晖,李佳,穆阳. 竹节参总皂苷对中动脉栓塞模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(11) :33.

[5] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 1989, 20 (8) :1037.

[6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1) : 84.

[7] Drugunow M, Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptosis nerve cell death [J]. Brain Res Rev, 1995, 21 :1228.

[8] Estus S, Zaks W J, Freeman R S, et al. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis [J]. J Cell Biol, 1994, 127:1717.

[9] Whitfield J, Neame S J, Paquet L, et al. Dominant-negative c-jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome release [J]. Neuron, 2001, 29(3) :629.

[责任编辑 聂淑琴]

简 讯

本刊近日接到美国化学文摘社中国文献处理中心通知,《中国实验方剂学杂志》自 2012 年 18 卷第 1 期起继续作为美国化学文摘收录期刊。