

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110407. 1332. 006

乙酰葛根素对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响及机制研究

刘必旺¹, 王坤芳^{1*}, 梁志刚², 刘亚明¹, 侯栋宇¹

(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 山西中医学院第二中医院, 太原 030024)

[摘要] 目的:探讨脑缺血再灌注后乙酰葛根素的脑保护作用及其机制。方法:线栓法制作脑缺血再灌注模型,为假手术组、脑缺血再灌注组、胞磷胆碱组(0.6 mg·kg⁻¹)、乙酰葛根素低、中、高剂量(10, 50, 250 mg·kg⁻¹), ig 10 d 干预组。采用 TUNEL 法检测脑组织细胞凋亡情况,采用免疫组化方法观测各组大鼠脑内 PI3-K(磷脂酰肌醇-3-激酶)和 Akt(丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)的表达情况并进行神经功能缺损评分。结果:乙酰葛根素 3 个剂量组神经功能评分比模型组显著改善($P < 0.01$), 凋亡细胞数也显著下降($P < 0.01$), 脑组织 PI3-K 和 Akt 表达显著升高($P < 0.01$), 且呈量效关系,高剂量组较胞磷胆碱组疗效显著($P < 0.05$)。结论:激活 PI3-K/ Akt 信号通路可能是乙酰葛根素减少神经细胞凋亡、起到神经保护作用的机制之一。

[关键词] 乙酰葛根素;脑缺血再灌注;凋亡;PI3-K/ Akt

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0213-04

Effect of Acetylpuerarin on Apoptosis of Neuronal Cell and on Expression of PI3-K/Akt after Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats

LIU Bi-wang¹, WANG Kun-fang^{1*}, LIANG Zhi-gang², LIU Ya-ming¹, HOU Dong-yu¹

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2. The Second Hospital of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of acetylpuerarin on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism. **Method:** Wistar rat was used as a model of focal cerebral ischemia and reperfusion. The positive reacted cells of apoptosis were counted and immunohistochemical method was used to measure the number of PI3-K/ Akt positive cells in rat's cerebral cortex of sham-operated group, model group, citicoline group and acetylpuerarin groups (10, 50, 250 mg·kg⁻¹). **Result:** Acetylpuerarin could significantly increase the expression of the PI3-K and Akt, and reduce the number of cells of apoptosis ($P < 0.01$). The higher expression and the fewer cells of apoptosis in the medium dose acetylpuerarin group ($P < 0.05$) and the high dose acetylpuerarin group was better than the citicoline group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Acetylpuerarin has obviously protective function for ischemia-reperfusion in rat.

[Key words] acetylpuerarin; cerebral ischemia and reperfusion; apoptosis; PI3-K/ Akt

[收稿日期] 2010-12-20

[基金项目] 国家科技部“十二五”科技支撑项目(2011BAI07B05);山西省国际科技合作项目(2009081038)

[第一作者] 刘必旺, 硕士, 讲师, 从事方剂学教学与研究, E-mail: lbw3084@sina.com

[通讯作者] * 王坤芳, 硕士, 讲师, 从事神经内科教学与研究, Tel: 0351-2272214, E-mail: zhign@163.com

[网络出版时间] 2011-04-07 13:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110407.1332.006.html>

缺血性脑血管病是严重威胁人类健康的常见病和多发病。在脑缺血再灌注损伤中,神经元凋亡与坏死并存,且凋亡可能决定了最终梗死体积。因此,抗凋亡治疗将可能成为脑缺血治疗的主要内容^[1]。本小组成员以往的研究发现乙酰葛根素(acetylpuerarin)能对脑缺血再灌注损伤产生很好的保护作用,故本研究拟继续从脑缺血再灌注时凋亡的磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3-K)/(丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)(serine/threonine kinase, Akt)通路方面入手,进一步探讨其对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料

1.1 药品与试剂 乙酰葛根素,山西中医学院实验管理中心提供,纯度>96%,批号2009-08-03。胞磷胆碱注射液,哈药集团三精制药股份有限公司,批号06073163。TUNEL凋亡检测试剂盒(MK1020)、PI3-K兔多抗、Akt兔多抗、DAB显色试剂盒购于博士德公司;即用型非生物素免疫组化ELIVision™ plus检测试剂盒购于福建迈新生物技术开发有限公司。

1.2 仪器 电热恒温水浴箱 HW1 型(北京市医疗设备),Leica-PM-2145 石蜡切片机(德国),Olympus 光学显微镜(日本)。

1.3 动物 Wistar 大鼠,体重(200±20)g,雌雄各半,由山西省中医药研究院动物室提供,符合GB14922-94 II级标准,合格证号晋动(证)字第 A00-002 号。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠随机分组为 6 组:假手术组(蒸馏水 5 mL·kg⁻¹);模型(缺血再灌)组(蒸馏水 5 mL·kg⁻¹);胞磷胆碱组(0.6 mg·kg⁻¹);乙酰葛根素低、中、高剂量组(10, 50, 250 mg·kg⁻¹)。均于术前 10 d 开始 ig, 1 次/d。由于该模型大鼠的死亡率 30% 左右,所以除假手术组 10 只大鼠外,其余各组均为 15 只大鼠。

2.2 造模 给药 10 d 后,参考 Zea Longa 等^[2]的方法并进行改进,制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血(MCAO)再灌注损伤模型。10%水合氯醛麻醉动物,仰卧位固定,颈部正中切口,分离出右侧颈总、颈外和颈内动脉,结扎颈外动脉分支起始处,在颈总动脉分叉切口处剪一小口,高弹力鱼线向颈内动脉端插入 18 mm。2 h 后缓慢拔出鱼线即可实施再灌注。假手术组插入鱼线后马上抽出,余步骤同手术组。

缺血再灌注模型动物清醒后,右侧前肢屈曲内收者为合格模型动物。

2.3 观测指标

2.3.1 神经功能评分 按 Zea Longa 5 分制标准评分,0 分:无神经缺损症状;1 分:不能伸展对侧前爪;2 分:行走时向偏瘫侧转圈;3 分:向偏瘫侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。0 分和 4 分者剔除。

2.3.2 凋亡细胞检测 采用 TUNEL 法,各组大鼠在各自再灌注时间点后麻醉(假手术组大鼠于术后 24 h 麻醉),打开胸腔,固定,断头取脑,自视交叉处开始向后做冠状切片。切片常规脱蜡入水,标本片加新鲜稀释 Protainase K 37 °C 消化。按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μL,加入 18 μL 标记缓冲液中,混匀。加标记液。置样品于湿盒中,37 °C 标记。加封闭液 50 μL/片,室温 30 min。用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体,混匀后取 50 μL 加至标本片上。置样品于湿盒中,37 °C 反应 30 min。SABC 稀释混匀后取 50 μL 加至切片上。37 °C 反应 30 min。DAB 显色,脱水,透明,封片。显微镜观察。

2.3.3 PI3-K 和 Akt 表达的检测 采用免疫组织化学法(非生物素法)石蜡切片(取材与制片方法同

2.3.2)脱蜡水化。用柠檬酸 PBS 微波修复 20 min。滴加 50 μL 的 PI3-K 兔多抗(1:50)或 Akt 兔多抗(1:50),置湿盒中 4 °C 过夜;冲洗后滴加 50 μL 聚合物增强剂,室温下孵育 30 min;冲洗后滴加 50 μL 酶标抗兔聚合物,室温下孵育 30 min;冲洗后 DAB 镜下显色。阴性对照:用 PBS 代替鼠单抗,其余步骤同前。阳性对照:应用肠腺癌石蜡切片制作阳性对照片,其余步骤同前。结果判断以细胞浆呈棕黄色颗粒为阳性。200 倍下每张切片任选 6 个视野,用 Image-ProPlus 5.0 图像分析处理系统进行阳性细胞计数,计算出该切片的平均阳性细胞数。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 分析软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 乙酰葛根素对神经功能缺损评分的影响 模型组评分显著高于胞磷胆碱组及乙酰葛根素组(*P* < 0.05);乙酰葛根素组评分低于胞磷胆碱组,但两组差异无显著性。见表 1。

3.2 乙酰葛根素对神经细胞 PI3-K 和 Akt 阳性细

表1 乙酰葛根素对神经功能障碍评分及神经细胞 PI3-K, Akt, 阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	神经功能障碍/分	PI3-K/个	Akt/个	凋亡细胞/个
假手术模型	-	0.49 ± 0.03 ¹⁾	1.25 ± 1.02 ¹⁾	0 ¹⁾	1.21 ± 1.03 ¹⁾
	-	3.01 ± 0.31	21.05 ± 3.25	16.99 ± 3.01	43.01 ± 5.31
胞磷胆碱	0.6	1.26 ± 0.24 ¹⁾	26.01 ± 4.15 ¹⁾	19.77 ± 3.52 ¹⁾	27.01 ± 4.21 ¹⁾
乙酰葛根素	10	1.25 ± 0.31 ¹⁾	26.98 ± 3.89 ¹⁾	20.11 ± 3.44 ¹⁾	29.34 ± 3.67 ¹⁾
	50	1.19 ± 0.32 ¹⁾	29.01 ± 3.24 ¹⁾	22.13 ± 3.51 ¹⁾	23.64 ± 4.51 ¹⁾
	250	1.18 ± 0.24 ¹⁾	33.32 ± 3.11 ^{1,2,3)}	25.11 ± 3.23 ^{1,2,3)}	15.55 ± 3.36 ^{1,2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与胞磷胆碱组比较²⁾ $P < 0.05$;与乙酰葛根素低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

胞数的影响 阳性细胞主要是神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞,可见其胞浆呈棕黄色,在缺血侧脑皮层、纹状体缺血半暗带区表达明显增强。模型组、乙酰葛根素组、胞磷胆碱组平均阳性细胞数均显著高于假手术组($P < 0.01$);乙酰葛根素各组及胞磷胆碱组平均阳性细胞数均高于模型组($P < 0.01$)。乙酰葛根素组高剂量组高于胞磷胆碱组($P < 0.05$)。乙酰葛根素高低剂量组之间差异显著($P < 0.05$)。见表1。

3.3 乙酰葛根素对神经细胞凋亡的影响 阳性细胞核染色呈棕黄色,凋亡细胞主要出现于缺血侧鼠脑组织中,非缺血侧几乎无凋亡细胞出现,假手术组中仅有零星分布,模型组与胞磷胆碱组、乙酰葛根素组阳性细胞主要分布在皮层和纹状体坏死灶周边。模型组阳性细胞数显著高于假手术组($P < 0.01$),乙酰葛根素高剂量组与胞磷胆碱组均少于模型组($P < 0.01$);乙酰葛根素高剂量组明显低于胞磷胆碱组($P < 0.05$)。乙酰葛根素高低剂量组之间差异显著($P < 0.05$)呈一定量效关系。见表1。

4 讨论

细胞凋亡的发生需要把细胞外刺激信号经过细胞膜转换并传导到细胞核,这一过程尤其依赖于肌醇脂质信号分子。PI3-K 是磷脂激酶家族中的一个重要成员,具有脂类激酶活性和蛋白激酶活性。Akt/PKB 是 PI3-K 信号转导途径中一个重要的下游靶激酶,近年来研究表明,Akt 活化后能经多种途径促进细胞存活^[3]。PI3-K/Akt 信号通路是细胞凋亡过程中的一条重要存活通路。1999 年 Kitagawa 等^[4]首次发现了 Akt 在脑缺血时被激活。大鼠中动脉闭塞后 3 h 和 8 h,在缺血灶周边区的神经元内可测到磷酸化的 Akt,缺血灶中心区仅有轻微表达,提示 PI3-K/Akt 信号通路参与了脑缺血的病理过程,且与脑缺血损伤程度有关。Nakajima 等^[5]使用免疫印迹和免疫组化方法,发现在缺血后 1 h,缺血预适

应组和对照组中 Akt 均被活化,但预适应组中活化持续的时间延长,提示缺血预适应使 Akt 持续活化在脑缺血耐受中起重要的作用。

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根。葛根的主要活性成分为异黄酮类化合物,如葛根素、大豆素、大豆苷等。乙酰葛根素是在葛根素的基础上经结构修饰后得到的新型异黄酮类化合物,脂溶性增加。有研究证明,乙酰葛根素可降低大鼠脑缺血再灌注损伤的脑组织及血清中 NO 和 NOS,减少内皮素生成^[6-7]。

本实验中,乙酰葛根素 3 个剂量组神经功能评分比模型组明显改善,阳性细胞数也显著下降,表明乙酰葛根素能明显减少脑缺血再灌注后出现的凋亡。与假手术组比较,模型组脑组织 PI3-K 和 Akt 表达显著升高,表明 PI3-K 和 Akt 参与脑缺血再灌注的发生。与模型组比较,乙酰葛根素各组脑组织 PI3-K 和 Akt 表达显著升高,且高低剂量组之间有显著量效关系,表明激活 PI3-K/Akt 信号通路是乙酰葛根素缓解凋亡起到神经保护的机制之一。胞磷胆碱是一种中枢神经系统兴奋剂,除兴奋作用外,近年发现其有神经元保护功能,并逐渐受到临床工作者的认同。本实验中,胞磷胆碱能明显减少缺血后凋亡细胞数,与以往实验相符,亦能明显激活 PI3-K/Akt 信号通路。乙酰葛根素组与胞磷胆碱组比较,两者的统计学差异出现在高剂量组,为临床选择最佳乙酰葛根素剂量提供初步依据。我们在本研究中初步了解到乙酰葛根素对脑缺血的神经保护作用及机制,为进一步临床实践提供了依据。

[参考文献]

- [1] Fredduzzi S, Mariucci G, Tantucci M, et al. Nitro-aspirin (NCX4016) reduces brain damage induced by focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 302(2/3):121.

精元康胶囊对化疗致骨髓抑制小鼠骨髓细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平的影响

蒋立峰¹, 蒋士卿^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 通过观察精元康胶囊对骨髓细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平的影响, 以深入探讨该药的作用机制。方法: 实时荧光定量 PCR 检测骨髓抑制模型小鼠骨髓细胞表达 Bcl-2, Bax mRNA 的情况。结果: Bcl-2 mRNA 的表达水平精元康胶囊组最高, Bax mRNA 的表达水平精元康胶囊组最低, 与模型组比较有显著差异, 与空白组比较无明显差异。结论: 精元康胶囊能升高抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 同时降低促凋亡基因 Bax 的表达, 对骨髓细胞凋亡相关通路产生影响, 可能是精元康胶囊对化疗致骨髓抑制影响的重要机制。

[关键词] 精元康胶囊; 骨髓抑制; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0216-04

Effect of Jingyuankang Capsule on Expression of Bcl-2, Bax mRNA in Bone Marrow Cells of Model Mice of Chemotherapy-induced Myelosuppression

JIANG Li-feng¹, JIANG Shi-qing^{2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Henan University of Tradition Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jingyuankang capsule on the expression of Bcl-2, Bax mRNA

[收稿日期] 2011-03-04

[基金项目] 国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA719A09-0203); 河南省自然科学基金项目(2010A360007)

[第一作者] 蒋立峰, 医学硕士, 中医师, 在读博士研究生, 从事肿瘤的临床及研究工作, Tel: 13951720716, E-mail: Jlf_@126.com

[通讯作者] * 蒋士卿, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 从事肿瘤的临床、教学及科学研究工作, Tel: 13607640006, E-mail: jiangshiqing66@126.com

- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 8491.
- [3] Li-Weber M, Laur O, Hekele A, et al. A regulatory element in the CD95 (APO-Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation [J]. Eur J Immunol, 1998, 28(8): 2373.
- [4] Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain [J]. Neurosci Lett, 1999, 274(1): 45.
- [5] Nakajima T, Iwabuchi S, Miyazaki H, et al. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the Penumbra region of the rat brain [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(5): 521.
- [6] 李雪梅, 魏欣冰, 张岫美, 等. 乙酰葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的脑组织及血清 NO 和 NOS 的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(11): 829.
- [7] 李雪梅, 魏欣冰, 张岫美, 等. 乙酰葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后一氧化氮和内皮素生成的影响 [J]. 山东大学学报·医学版, 2005, 43(12): 1173.

[责任编辑 何伟]