

# 天麻对大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡的影响

陈东丽<sup>1</sup>, 陈旭东<sup>2\*</sup>, 夏翠英<sup>1</sup>

(1. 北京市顺义区空港医院内科, 北京 101318; 2. 河南漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

[摘要] 目的: 研究天麻对大鼠脑缺血再灌注引起脑损伤的保护作用, 探讨其作用机制。方法: 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 144 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 即假手术组、模型组、天麻提取物高剂量组 (150 mg·kg<sup>-1</sup>)、天麻提取物中剂量组 (100 mg·kg<sup>-1</sup>)、天麻提取物低剂量组 (50 mg·kg<sup>-1</sup>)、尼莫地平组 (25 mg·kg<sup>-1</sup>), 各组再分为缺血再灌注 6, 12, 24 h 3 个亚组, 分别于再灌注 6, 12, 24 h 处死, 经海马 CA1 区连续冠状切片, 分别用 TUNEL 法观察神经细胞凋亡细胞数, 免疫组织化学法检测半胱氨酸蛋白酶 8 (caspase-8) 蛋白阳性细胞数。结果: 再灌注 6, 12, 24 h 模型组与假手术组相比, 神经元凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 再灌注 6, 12, 24 h 天麻提取物低、中、高剂量组、尼莫地平组细胞凋亡率与模型组的比较, 明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。再灌注 6, 12, 24 h 模型组与假手术组相比, caspase-8 阳性细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 再灌注 6, 12, 24 h 天麻提取物低、中、高剂量组、尼莫地平组 caspase-8 阳性细胞数与模型对照组比较, 明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 天麻能通过有效的抑制脑缺血再灌注后大鼠神经细胞的凋亡起到脑保护作用。

[关键词] 天麻; 脑缺血再灌注脑损伤; 神经细胞凋亡; 半胱氨酸蛋白酶 8

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0148-03

## Effects of *Gastrodia elata* on Neural Apoptosis Induced by Cerebral Ischemia-Reperfusion

CHEN Dong-li<sup>1</sup>, CHEN Xu-dong<sup>2\*</sup>, XIA Cui-Ying<sup>1</sup>

(1. Department of Internal Medicine of Beijing Airport Hospital, Beijing 101318, China;

2. Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protection effects of *Gastrodia elata* on cerebral ischemia-reperfusion. **Method:** The model of focal cerebral ischemia-reperfusion in rats was established by the suture-occlusion method. One hundred and forty four Wistar rats were randomized into sham group, model group, *G. elata* extraction low dose group (50 mg·kg<sup>-1</sup>), *G. elata* extraction medium dose group (100 mg·kg<sup>-1</sup>), *G. elata* extraction high dose group (150 mg·kg<sup>-1</sup>), Nimodipine group (25 mg·kg<sup>-1</sup>). Every group were randomized again into 3 sub-groups at 6 hours, 12 hours and 24 hours after ischemia-reperfusion, and rats of sub-groups were killed at different time points respectively. Consecutive coronal sections were done to Hippocampal CA1. Neuronal apoptosis were detected by immunohistochemical method and caspase-8 expression was detected by TUNEL method. **Result:** Compared with the sham group, at time points of 6 hours, 12 hours and 24 hours after reperfusion, neuronal apoptosis of model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ); Compared with the model group, neuronal apoptosis of *G. elata* extraction groups, Nimodipine group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ) after reperfusion. Compared with the sham group, the caspase-8 protein expression of model group was significantly increased after reperfusion ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ); Compared with the model group, the caspase-8 protein expression of *G. elata* extraction groups, Nimodipine group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ) after reperfusion. *G. elata* reduced the

[收稿日期] 20100804(001)

[第一作者] 陈东丽, 硕士, 研究方向: 神经内科

[通讯作者] \* 陈旭东, 硕士, 研究方向: 主要从事发育神经生物学的研究, E-mail: Lichenyue3@yahoo.com.cn

level of the caspase-8 protein expression, attenuating neural apoptosis. **Conclusion:** *G. elata* has a protective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis.

**[Key words]** *Gastrodia elata*; cerebral ischemia/reperfusion injury; neuronal apoptosis; caspase-8

脑缺血再灌注后以神经元为主的坏死与细胞凋亡是脑损伤中重要的病理生理过程,其中,细胞凋亡的重要作用日益受到重视。抑制细胞凋亡,可以减少脑梗死的体积,这已成为缺血性脑血管病的治疗靶点之一。天麻在防治脑缺血缺氧尤其是在保护海马区细胞、提高自由基清除剂活性、降低脑内脂质过氧化物产生和调节氨基酸含量等方面,具有良好的效果<sup>[1]</sup>,本文旨在通过观察天麻提取物对大鼠凋亡诱导因子 caspase-8 蛋白及神经细胞凋亡的影响,探讨其对大鼠脑缺血再灌注的神经保护作用及其作用机制。

## 1 材料

**1.1 试剂与仪器** 兔多抗 caspase-8 (批号 081021)、原位末端标记 (Tunel) 检测试剂盒 (批号 080410): 武汉博士德生物工程有限公司; 奥林巴斯荧光显微镜: 奥林巴斯公司; 天麻采集于漯河医专院内,经漯河医专生药学教研室鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* B1. 的干燥块茎。

**1.2 动物** Wistar 大鼠,体重 (200 ± 20) g 由郑州大学动物实验中心提供,动物许可证号河动字 P00101003。大鼠自由进食、饮水,同等条件下饲养,手术前 12 h 禁食,不禁水。

**1.3 天麻的提取** 干燥粉碎的天麻加 10 倍量水,煎煮 1 h,煎煮 2 次,合并滤液,浓缩至每毫升相当于 1 g 原药材,用时稀释成所需要浓度。

## 2 方法

**2.1 分组及给药方法** 144 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组,即假手术组、模型组、天麻提取物高、中、低 3 个剂量组 (150, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>)、尼莫地平组 (25 mg·kg<sup>-1</sup>), 各组再分为缺血再灌注 6, 12, 24 h 3 个亚组,每亚组 8 只。术前 7 d 开始天麻低、中、高剂量组和尼莫西平组按大鼠体重 10 mL·kg<sup>-1</sup> 剂量 ig, 其他两组等量生理盐水 ig, 每天 1 次,连续 14 d, 最后 1 次 ig 后 30 min 除了假手术组,其余各组均行 MCAO 手术,术后继续给药,每天 1 次。假手术组不作造模处理,只做解剖、分离、挂线、缝合。

**2.2 大鼠脑缺血再灌注模型制备** 采用大鼠大脑中动脉线栓法制备不完全脑缺血模型,末次给药 30

min 后,20% 乌拉坦 (1 g·kg<sup>-1</sup>, ip) 麻醉,根据 Zea Longa 线栓法<sup>[2]</sup>,造成右侧大脑中动脉阻塞 (MCAO) 模型,记录此刻时间,作为大脑局灶性缺血开始的时间,缺血 2 h 后,然后松开,各亚组分别实行 MCA 再灌注 6, 12, 24 h。假手术组只暴露血管不结扎<sup>[3]</sup>。

**2.3 取材、固定、切片** 6 组大鼠按照各亚组分别于再灌注后 6, 12, 24 h 经 20% 乌拉坦 (1 g·kg<sup>-1</sup>, ip) 麻醉,快速开胸暴露心脏,经左心室插入灌流针,剪开右心耳,生理盐水快速灌流至清澈,继以 4% 多聚甲醛灌流固定,至四肢、尾僵硬,断头取脑,外固定液中 4 °C 冰箱中固定 24 h。常规梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、经海马 CA1 区连续冠状切片,每只大鼠取 2 张切片,分别进行免疫组化染色及 TUNEL 染色<sup>[4]</sup>。

**2.4 原位末端标记 (TUNEL)** 用 TUNEL 方法检测凋亡细胞的 DNA 片段,在荧光显微镜下计数凋亡细胞,观察缺血再灌注 6, 12, 24 h 脑组织凋亡细胞的变化。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞。

**2.5 Caspase-8 蛋白的检测** 采用免疫组化法。神经细胞质黄色或棕黄色为阳性细胞,在高倍镜下 (400 ×),取每张切片中梗死灶边缘区域相互不重叠 4 个视野,采用 Meta Morph 图像分析系统,记录 caspase-8 蛋白积分吸光度 (A)。

**2.6 统计学方法** 用 SPSS 13.0 统计软件进行数据的统计学处理,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, *P* < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 天麻提取物对细胞凋亡的影响** 细胞核中出现棕黄色颗粒为 TUNEL 染色阳性凋亡细胞,主要见于缺血灶周围区,于再灌注 6, 12, 24 h 模型组表达进一步增加。由表 1 可见,模型组与假手术组相比,具有明显差异 (*P* < 0.05),说明造模是成功的。经药物治疗后,药物治疗各组的大鼠细胞凋亡率与模型组的比较,均具有显著差异 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),说明各治疗药物对脑缺血均具有显著的治疗作用,能明显抑制细胞凋亡,高剂量的天麻提取物与

尼莫地平作用接近,说明天麻提取物对脑缺血具有一定的保护作用。

表 1 天麻提取物对缺血再灌注模型大鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡的影响(  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$  )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	细胞凋亡率 / %		
		6 h	12 h	24 h
假手术	-	4.3 ± 1.2 <sup>2)</sup>	4.7 ± 1.2 <sup>2)</sup>	5.1 ± 1.7 <sup>2)</sup>
模型	-	52.3 ± 2.6	60.2 ± 3.7	70.6 ± 5.6
天麻提取物	50	33.3 ± 3.2 <sup>2)</sup>	41.3 ± 2.9 <sup>1)</sup>	45.6 ± 2.7 <sup>1)</sup>
	100	26.3 ± 2.7 <sup>2)</sup>	31.7 ± 2.9 <sup>1)</sup>	38.2 ± 3.8 <sup>2)</sup>
	150	18.9 ± 3.6 <sup>2)</sup>	21.7 ± 2.6 <sup>1)</sup>	25.7 ± 2.5 <sup>2)</sup>
尼莫地平	25	17.6 ± 3.1 <sup>1)</sup>	20.4 ± 2.7 <sup>2)</sup>	25.1 ± 2.7 <sup>1)</sup>

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

### 3.2 天麻提取物对 MCAO 大鼠 caspase-8 的影响

由表 2 可见,各治疗组阳性细胞表达与模型对照组比较,均具有显著差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),说明各治疗药物对脑缺血均具有显著的治疗作用,能明显抑制 caspase-8 表达,且 24 h 治疗组的疗效优于 6 h 疗效,说明天麻提取物对脑缺血的保护作用存在着一定的量效关系和时效关系。高剂量天麻提取物的疗效与尼莫地平疗效接近,说明天麻提取物对脑缺血的保护作用明显。

表 2 天麻提取物对缺血再灌注模型大鼠各时间点海马 CA1 区 caspase-8 阳性细胞数的影响(  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$  )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	caspase-8 阳性细胞数 / %		
		6 h	12 h	24 h
假手术	-	1.3 ± 0.2 <sup>2)</sup>	1.5 ± 0.6 <sup>1)</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>2)</sup>
模型	-	32.1 ± 13	30.2 ± 1.6	25.6 ± 1.9
天麻提取物	50	28.3 ± 2.1 <sup>2)</sup>	26.9 ± 1.9 <sup>1)</sup>	23.1 ± 2.3 <sup>2)</sup>
	100	22.6 ± 1.7 <sup>1)</sup>	18.9 ± 2.7 <sup>2)</sup>	16.3 ± 2.4 <sup>1)</sup>
	150	18.3 ± 2.3 <sup>1)</sup>	17.9 ± 2.1 <sup>1)</sup>	14.2 ± 2.3 <sup>1)</sup>
尼莫地平	25	15.9 ± 2.6 <sup>2)</sup>	15.3 ± 1.7 <sup>1)</sup>	13.6 ± 1.6 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

凋亡是细胞自杀过程,是保证细胞正常生长和维持稳态的重要条件,其目的是去除各种异常、受损和癌变的细胞,是对各种应激如生长因子缺乏、细胞因子释放、DNA 损伤、细胞周期功能异常、癌基因激活等的正常反应。在脑缺血/再灌注损伤后,神经元

凋亡显著增加。在脑缺血过程中,缺血半暗带区的多种病理生理过程,包括自由基、钙超载、炎症反应及线粒体损伤都可以触发细胞凋亡。本研究中,假手术中有少量的凋亡细胞,治疗组的凋亡阳性细胞数较假手术组增多,但较模型组减少,且高剂量组减少最为明显,提示天麻提取物均能够抑制细胞凋亡,达到保护神经细胞的作用。

脑缺血后细胞凋亡的发生是一个主动过程,它依赖于大分子物质合成,说明细胞凋亡是由基因调控的<sup>[5]</sup>。其中研究最多的是 Caspase 蛋白酶在细胞凋亡中的作用。caspase 家族被认为是细胞凋亡不可逆的进入最后实施阶段的关键酶,而分布广泛的 caspase-8 是研究较多的 caspase 蛋白酶,属上游起始 caspase,在死亡受体介导的细胞凋亡过程中扮演着重要角色,本研究表明,缺血缺氧首先直接诱导 caspase-8 持续大量的表达,药物治疗结果显示,治疗组 caspase-8 阳性细胞数在各个时间点均明显减少,表明药物对大鼠脑缺血再灌注损伤后促凋亡基因表达在某些时间点产生了积极的抑制作用,对脑缺血再灌注损伤产生保护作用。

综上所述,脑缺血/再灌注损伤后,天麻提取物能减少神经细胞凋亡和保护大脑,这可能与抑制 caspase-8 蛋白的表达有关。

## [参考文献]

- [ 1 ] 张艳琼,王晓丹,专利鸣.天麻对中枢神经系统影响的基础研究进展[J].时珍国医国药,2006,4(17):541.
- [ 2 ] Zea Longa E, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84.
- [ 3 ] 李卉,苏云明,孟妍.脑心康片对大鼠脑缺血保护机制的研究[J].时珍国医国药,2009,12(20):2996.
- [ 4 ] 高红华.神经生长因子对大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡及 Fas 蛋白表达的影响[D].沈阳:中国医科大学,2008.
- [ 5 ] 杨群华,唐省三.灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注后脑内 Fas 表达的抑制作用[J].广东药学院学报,2009,25(5):516.

[责任编辑 聂淑琴]