

生姜对局灶性脑缺血大鼠海马神经细胞凋亡 及相关蛋白表达的影响

贾士奇^{1*}, 王军¹, 张红霞², 黄霞¹, 孙为¹, 傅蔓华¹

(1. 河南省中医药研究院药理实验室, 郑州 450004;

2. 信阳职业技术学院药理教研室, 河南 信阳 464001)

[摘要] 目的: 研究生姜对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡及相关凋亡蛋白表达的影响。方法: SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型对照组、尼莫地平组、生姜水提物高、中和低剂量组。采用线栓法造成大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型(MCAO), 分别于手术前 24 h、术前 1 h 和再灌注后 12 h ig 给药, 共 3 次, 大鼠于缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 快速冰冻取脑切片固定。末端脱氧核糖核酸介导生物素化脱氧尿 缺口末端标记(TUNEL)法测定海马凋亡神经元, 免疫组织化学方法研究海马神经元半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3), 抗凋亡基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和促凋亡基因(Bax)基因表达。结果: 与假手术组比较, MCAO 大鼠海马凋亡细胞明显增加, caspase-3 和 Bax 基因表达增强, Bcl-2/Bax 比值显著降低; 生姜能明显降低 MCAO 大鼠海马 TUNEL, caspase-3, Bax 和 Bcl-2 阳性细胞数, Bcl-2/Bax 比值显著升高。结论: 生姜水提物对脑缺血及缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与抑制神经细胞凋亡相关蛋白有关。

[关键词] 生姜; 脑缺血再灌注; 细胞凋亡; 凋亡相关蛋白

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0163-04

Effects of Zingiberis Rhizoma Recens on Neuronal Apoptosis and Related Prote in Expression in Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats

JIA Shi-qi^{1*}, WANG Jun¹, ZHANG Hong-xia², HUANG Xia¹, SUN Wei¹, FU Man-hua¹

(1. Laboratory of Pharmacology, Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;

2. Department of Pharmacology, Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang 4640001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Zingiberis Rhizoma Recens on neuron apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury of rats. **Method:** Male SD rats were randomly allocated into six groups: sham-operation group, model control group, nimodipine group, aqueous extract of Zingiberis Rhizoma Recens groups with high, medium or low dose groups. The model of focal cerebral ischemia-reperfusion (MCAO) in rat was produced by Zea Longa's thread method. The brains were taken out on the ice for paraffin processing at 24 hours after ischemia-reperfusion. Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL staining) was used to assay neuron apoptosis in cerebral cortex and hippocampus. The protein expressions of caspase-3 (cysteine-containing aspartate-specific protease), Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) and Bax (Bcl-2 associated X protein) in hippocampus were detected by immunohistochemistry method. **Result:** Compared with sham operation group, TUNEL staining positive cells and caspase-3, Bcl-2 and Bax immunoreactive neurons in cortex and hippocampal tissue increased significantly, the ratio of Bcl-2/Bax decreased in MCAO rat model control group. Aqueous extract of Zingiberis Rhizoma Recens decreased TUNEL positive cells and caspase-3, Bcl-2 and Bax immunoreactive neurons in hippocampal tissue significantly and increased the ratio of Bcl-2/Bax markedly, compared

[收稿日期] 20100730(006)

[通讯作者] * 贾士奇, 本科, 研究方向: 心脑血管病中药药理研究, Tel: 0371-66336554, E-mail: jsq999@yahoo.com.cn

with MCAO rat model control group. **Conclusion:** Aqueous extract of *Zingiberis Rhizoma Recens* has protective effects on cerebral ischemia-reperfusion. Apoptosis signal relative proteins may be involved in the protection.

[Key words] *Zingiberis Rhizoma Recens*; focal cerebral ischemia-reperfusion; apoptosis; apoptosis-related protein

生姜是姜科植物姜 *Zingiber officinales* Rosc 的新鲜根茎, 是临床广泛应用的传统中药, 对心脑血管系统、消化系统、免疫系统及神经系统等有广泛的药理活性^[1]。研究表明: 生姜水提物能明显延长小鼠缺氧耐受时间^[2]; 显著升高全脑缺血再灌注小鼠脑组织 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶和 SOD 活性, 显著降低 MDA 含量^[3]; 降低全脑缺血再灌注大鼠血液纤维蛋白原含量, 显著延长凝血酶时间, 改善血液凝血功能^[4]。本实验通过线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 检测脑缺血模型大鼠大脑海马凋亡神经细胞, 采用免疫组织化学方法测定凋亡相关基因 caspase-3, Bcl-2, Bax 的蛋白表达, 研究生姜水提物对缺血性脑损伤神经细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 生姜水提物干粉(河南省中医药研究院中药分析实验室提供), 每克干粉含生药量 65 g, 批号 060912; 尼莫地平片(山东新华制药股份有限公司, 批号 0512079); 细胞凋亡检测试剂盒: TUNEL (批号 0070415), 免疫组化染色试剂盒: caspase-3 (批号 20070227), Bcl-2 (批号 20070223), Bax (批号 20070223) 均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 250 ~ 300 g, 由中国医学科学院动物研究所维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号 SCXK(京) 2002-2003。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备 参照 Longa 等的线栓法^[5], 将大鼠用水合氯醛 ip 麻醉 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 颈腹侧正中切口, 分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA)、颈外动脉 (ECA) 等, 由 ECA 残端起始部剪一小口, 选用头端烫圆的 4-0 号尼龙外科线插入, 以 CCA 分叉处算起进线深度约为 20 mm, 至大脑中动脉 (MCA) 起始部, 2 h 后退出尼龙线。假手术组大鼠麻醉及手术过程与模型组相

同, 但不进行血管阻断与再灌注。

2.2 分组与给药 将大鼠分为假手术组、模型组、尼莫地平组、生姜水提物高、中、低剂量组, 每组 10 只。于手术前 24 h, 术前 1 h 和再灌注后 12 h ig 给药, 共 3 次。尼莫地平组和生姜水提物高、中、低剂量组分别按 30, 200, 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ig 给药, 假手术组和模型组 ig 等容积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

2.3 观察指标与方法

2.3.1 标本制备 大鼠于缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 深麻醉状态下打开胸腔, 暴露心脏。将导管由心尖部插入左心室, 剪开右心耳, 快速灌注温生理盐水 150 mL, 继之以 4% 多聚甲醛灌注 300 ~ 500 mL (至大鼠肢体、尾巴僵直)。断头取脑, 在冰盘上迅速去除嗅脑、小脑和脑干, 将大脑自额叶至枕叶作等距离的 5 个冠状切片, 4% 多聚甲醛固定 12 h。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。

2.3.2 TUNEL 凋亡细胞原位标记 (AP 法) 冠状连续切片, 片厚 5 μm , 切片常规二甲苯脱蜡, 梯度乙醇至 ddH₂O。新鲜配制 3% H₂O₂, 室温处理, 蒸馏水洗涤。标本片加 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液 (TBS) 1 200 新鲜稀释 Proteinase K 37 消化 5 min; 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBS 洗涤。标本片加标记缓冲液 20 μL /片, 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。甩去切片上多余液体后加标记液 20 μL /片, 于湿盒中 37 标记 2 h。0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBS 洗涤。加封闭液 50 μL /片, 室温 30 min, 甩掉封闭液。用抗体稀释液 1 100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 混匀后 50 μL /片加至标本片上, 置样品于湿盒中 37 反应 30 min。0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBS 洗涤。用抗体稀释液 1 100 稀释稀释 SABC, 混匀后 50 μL /片加至标本片上, 37 反应 30 min。0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBS 洗涤。取 1 mL 蒸馏水, 分别加入 DAB 试剂盒中 A, B, C 试剂各一滴, 混匀后至标本片上, 显色 10 ~ 20 min。水洗。苏木素轻度复染。0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBS 洗涤, 蒸馏水洗。脱水, 透明, 封片。

2.3.3 Bcl-2, Bax, caspase-3 免疫组织化学染色

(SABC法) 切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇至 ddH₂O;蒸馏水新鲜配制 3% H₂O₂,室温下放 5~10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。将切片浸入 0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 min 后,反复 1~2 次。冷却。滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体。分别滴加兔抗 Bcl-2, Bax, caspase-3 抗体,4 过液。TBS 洗涤。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37 放 20 min, TBS 洗涤。滴加试剂 SABC,20~37 下放 20 min, TBS 洗涤。取 1 mL 蒸馏水,分别加入 DAB 试剂盒中 A, B, C 试剂各 1 滴,混匀后至标本片上,显色 5~30 min。蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染。TBS 洗涤,蒸馏水洗。脱水、透明后封片。

2.3.4 光学显微镜观察 caspase-3 及 TUNEL 阳性物质位于细胞核内,细胞胞核呈棕黄色,胞浆呈紫蓝色;Bcl-2 及 Bax 阳性物质位于细胞质,阳性细胞胞浆呈棕黄色,胞核呈紫蓝色。在 400 倍光学显微镜下分别随机选取缺血侧海马各 5 个视野,计算阳性细胞数。并分别计算海马 Bcl-2/Bax 比值。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,选用 Student Newman-Keuls (S-N-K) 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 生姜对 MCAO 大鼠海马 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 表 1 显示, MCAO 模型对照组大鼠海马 Bcl-2, Bax 阳性细胞较假手术组显著增多, Bcl-2/Bax 显著降低;生姜水提物和尼莫地平与模型组比较能明显降低海马 Bcl-2, Bax 阳性细胞数,显著升高海马 Bcl-2/Bax 比值。

表 1 生姜对 MCAO 大鼠海马 Bcl-2, Bax 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=25$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Bcl-2 /n	Bax /n	Bcl-2/Bax
假手术	-	43.45 ±19.94 ²⁾	22.69 ±6.40 ²⁾	3.01 ±1.00 ¹⁾
模型	-	67.6 ±17.83	39.8 ±7.12	1.88 ±1.15
尼莫地平	30	60.67 ±26.02	24.96 ±9.44 ²⁾	3.00 ±1.58 ²⁾
生姜水提物	200	58.53 ±15.06	21.43 ±9.94 ²⁾	3.13 ±1.80 ¹⁾
	100	50.20 ±15.63 ¹⁾	19.72 ±10.25 ²⁾	3.18 ±1.27 ²⁾
	50	52.10 ±11.95 ¹⁾	17.30 ±10.8 ²⁾	8.20 ±8.06 ²⁾

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

3.2 生姜对 MCAO 大鼠海马 caspase-3 表达和 TUNEL 凋亡细胞的影响 表 2 显示,模型组大鼠海马 caspase-3 较假手术组阳性细胞数显著增多,可见大量 TUNEL 染色强阳性的神经细胞;生姜水提物

高、中、低剂量和尼莫地平能显著降低 MCAO 大鼠海马 caspase-3 基因表达,减少 TUNEL 染色阳性细胞数,与模型组比较有非常显著性差异。

表 2 生姜对 MCAO 大鼠海马 caspase-3 表达和 TUNEL 凋亡细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=25$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	caspase-3 /n	凋亡细胞数 /n
假手术	-	24.28 ±10.50 ²⁾	8.76 ±11.05 ²⁾
模型	-	40.08 ±24.55	86.72 ±7.40
尼莫地平	30	22.25 ±13.47 ²⁾	63.60 ±5.89 ²⁾
生姜水提物	200	24.52 ±17.02 ¹⁾	55.40 ±6.28 ²⁾
	100	9.28 ±6.17 ²⁾	58.60 ±24.00 ²⁾
	50	11.52 ±5.026 ²⁾	61.40 ±13.2 ²⁾

4 讨论

细胞凋亡过程可以大致分为起始期、执行期和死亡期 3 个时期^[6]。起始期:细胞通过受体等途径,接受内外环境发出的凋亡信号,将其传递给执行器(如 caspase 等)的过程;执行期:启动子 caspase (caspase-8, caspase-9, caspase-10) 激活,通过蛋白酶组成的级联反应激活效应子 caspase (caspase-3, caspase-6, caspase-7),后者通过激活 DNA 酶等导致 DNA 的断裂;死亡期:DNA 破坏的不断增加,导致细胞进入不可逆的死亡。从理论上讲,凡能阻断细胞凋亡信号传递通路的每一个环节均有可能影响细胞凋亡的发展。

活化的 caspase-3 通过激活细胞核的 DNA 酶,切割核小体间的连接,产生 DNA 片断;切割细胞核中 lamins 蛋白,出现核皱缩;作用于维持细胞骨架的蛋白成分,使细胞失去正常形态;改变部分调控基因的平衡,提高促凋亡基因活性。

细胞凋亡的中心环节是激发了蛋白酶组成的级联反应,并受细胞内部多种基因的直接调控。其中,最重要的调控基因为 Bcl-2 基因家族。Bcl-2 基因家族可分为抑制凋亡的 Bcl-2 亚族(Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, CED9 等)和促进凋亡的 Bax 亚族(Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, Bik, Bid 等),各家族成员可自身形成同二聚体发挥作用,或相反作用成员之间形成异二聚体而起相互制约作用。因此, Bcl-2 家族中促凋亡和抑凋亡成员的比例通过影响二聚体的形成方式而决定细胞凋亡的发生,以 Bcl-2 和 Bax 最具代表性。Bcl-2 家族对细胞凋亡的作用,主要是通过对线粒体膜的调控,影响促凋亡因子(主要是细胞色素 C)向胞浆的释放。

TUNEL 法是目前最常用的组织样品凋亡细胞的检测方法。但由于该法对能否区分凋亡细胞和坏

死细胞尚存争议,即可能存在假阳性的缺点。因此,多数学者采用 TUNEL 法凋亡细胞检测与凋亡相关基因表达同步测定相结合的方法进行研究^[8]。

由于 caspase-3 被认为是 caspase 家族介导细胞凋亡的最终执行者, Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族参与细胞凋亡调控最具代表性的抗凋亡和促凋亡基因。因此,本研究在使用 TUNEL 法检测脑组织凋亡细胞的基础上,同步进行 caspase-3, Bcl-2 和 Bax 基因表达的免疫组织化学检测,一方面克服单纯 TUNEL 法可能出现假阳性的缺点,另一方面能更深入的研究受试药物影响细胞凋亡的作用机制。

研究表明^[9],大鼠脑缺血 2 h 再灌注后,凋亡阳性细胞于再灌注 24 h ~48 h 达高峰,72 h 开始下降; Bcl-2 阳性细胞于再灌注 3 h 达高峰,6 h 开始下降; Bax 阳性细胞于再灌注 24 h 达高峰,48 h 开始下降; caspase-3 阳性细胞与凋亡阳性细胞高峰时间基本一致。因此,本实验选择脑缺血 2 h 再灌注后 24 h 进行凋亡细胞, caspase-3, Bcl-2 和 Bax 基因表达的检测。

结果表明缺血 2 h 再灌注 24 h,海马神经细胞凋亡明显增多,同时该区域 caspase-3, Bcl-2 和 Bax 基因表达显著增强, Bcl-2/Bax 比率显著降低。说明缺血及缺血再灌注所产生的凋亡刺激信号激活依赖于 caspase 家族的细胞凋亡机制而诱导神经细胞凋亡, Bcl-2 基因家族参与了细胞凋亡的调控。假手术组大鼠脑组织亦可见少量凋亡细胞和 caspase-3, Bcl-2 和 Bax 阳性神经细胞,可能由于麻醉和手术创伤等应激性刺激激活细胞凋亡的信号转导系统和调控系统而诱导细胞凋亡。与其他的相关报道基本一致^[10]。因此,在以后的研究中,同时设立正常对照组(非手术组)可能更为合理。

本研究显示:生姜水提物能显著降低大脑海马组织神经细胞凋亡,明显抑制 caspase-3 和 Bax 基因表达。说明生姜对依赖于 caspase 细胞凋亡的抑制作用参与了生姜抗脑缺血再灌注损伤的神经保护机制。生姜具有 Ca^{2+} 拮抗、抗氧化和 AA 毒性等作用,从而减少氧自由基, ONOO⁻ 和炎性细胞因子等多种“死亡信号”通过死亡受体信号转导通路(凋亡外通路)诱导的细胞凋亡;生姜通过降低神经细胞内氧自由基和 Ca^{2+} 含量,使 Bcl-2 基因家族中促凋亡成员(如 Bax)表达减弱,而抗凋亡成员(Bcl-2)表达相对增强,由 Bax-Bax 结合的同二聚体减少, Bax-Bcl-2 结合的异二聚体相对增多,通过线粒体-细胞

色素 C 信号转导通路(凋亡内通路)诱导的细胞凋亡相应降低。生姜是否具有通过非 caspase 的细胞凋亡机制和 Bcl-2 基因家族外的调控机制抑制细胞凋亡,有待进一步深入研究。

实验还发现:生姜治疗组与模型对照组比较,海马 Bax 阳性神经细胞显著减少,而 Bcl-2 阳性神经细胞亦有不同程度的降低。该结果可能与以下因素有关: 生姜降低脑组织 Ca^{2+} , 氧自由基, ONOO⁻ 和炎性细胞因子等凋亡激活物含量,使两种作用相反的基因表达均有不同程度的减弱; 生姜可促进 Bax 与 Bcl-2 结合形成异二聚体,细胞内 Bax, Bcl-2 蛋白单体均减少,使免疫组织化学方法测定的阳性细胞数降低;

Bcl-2 家族对凋亡促进和抑制调控的决定因素主要在于两组家族成员的相对数量而非绝对数量,即二者的比值决定凋亡的调控方向。在本实验中,虽然生姜组的 Bax 和 Bcl-2 阳性细胞数均减少,但 Bcl-2/Bax 比率则显著升高,从而决定其对凋亡的抑制效应。

[参考文献]

- [1] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,2004: 473.
- [2] 宋学英,白进发,王桥,等. 生姜对小鼠缺氧时间的影响[J]. 中国医药学报,1998,13(13): 70.
- [3] 王军,张薇,王玉升,等. 生姜水提物对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中医药临床杂志,2007,19(1): 23.
- [4] 张关亭,王军,张磊,等. 生姜水提物对全脑缺血再灌注大鼠凝血功能的影响[J]. 中医研究,2007,20(4): 9.
- [5] 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.
- [6] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000,407(6805): 770.
- [7] Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the T(14,18) chromosome translocation[J]. Science, 1984,226(4678): 1097.
- [8] 傅桂莲. 分子生物学检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2003: 201.
- [9] 李建生,任小巧,刘珂,等. 老龄大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡, Bcl-2, Bax 表达和 caspase-3 活性变化[J]. 中国病理生理学杂志,2005,21(10): 2009.
- [10] 韩英,刘楠,陈荣华,等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡与 Bcl-2, Bax 的表达[J]. 中国临床神经科学,2006,14(1): 15.

[责任编辑 聂淑琴]