

大黄苷元联合尿激酶动脉溶栓对血栓栓塞性 脑缺血大鼠神经细胞凋亡的影响

刘敬霞¹, 李建生^{2*}, 王冬³, 刘轲², 梁生旺², 李宁², 苏静², 郭晓燕², 孙捷²

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 河南中医学院老年医学研究所, 郑州 450003;
3. 河南省洛阳市妇女儿童保健中心儿童医院, 河南 洛阳 471000)

[摘要] 目的: 探讨大黄苷元联合不同时间窗溶栓治疗对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的阻抑作用及其对相关调控基因蛋白表达的影响。方法: 大鼠随机分为假手术组、模型组、尿激酶溶栓组(简称溶栓组)、大黄苷元组和联合组(大黄苷元+尿激酶组)。大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备血栓栓塞性脑缺血动物模型。大鼠分别于缺血后 3, 6, 9 h 经导管由颈内动脉用尿激酶进行溶栓。动脉给尿激酶后 24 h, 观察大鼠脑组织病理改变; 免疫组织化学法检测神经细胞凋亡和凋亡相关基因蛋白 Bax, caspase-3 和 Bcl-2 表达。结果: 各模型组大鼠病理改变明显, TUNEL 细胞增多、Bax 和 caspase-3 表达增强、Bcl-2 表达下调; 各用药组较模型组 TUNEL 细胞减少, 6 h 和 9 h 组 Bax 和 caspase-3 表达减弱、6 h 组 Bcl-2 表达上调; 各组 9 h 分别较其 3 h 的 TUNEL 细胞数增加、Bax 增强、Bcl-2 减弱; 联合组分别较单一用药各时间组 TUNEL 细胞数减少、6 h 和 9 h 组 Bax 及 caspase-3 表达减弱、Bcl-2 表达上调。结论: 脑缺血可使促凋亡基因 Bax 表达上调和抑凋亡基因 Bcl-2 下调, 引起神经细胞凋亡, 且随缺血时间延长而明显。大黄苷元及尿激酶溶栓可下调 Bax, caspase-3, 上调 Bcl-2 表达, 对脑缺血神经细胞凋亡有阻抑作用, 以二者联合用药的效果尤为理想。

[关键词] 脑缺血; 大鼠; 溶栓; 大黄苷元; 联合; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0119-04

Influence of Rhubarb Aglycone Associated Thrombolysis on Neurocyte Apoptosis in Rats with Thrombus-occluded Cerebral Ischemia

LIU Jing-xia¹, LI Jian-sheng^{2*}, WANG Dong³, LIU Ke², LIANG Sheng-wang², LI Ning²,
SU Jing², GUO Xiao-yan², SUN Jie²

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Geriatrics Institute of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 3. China Children's Hospital of Femme and Child Care Centre of Luoyang City in Henan Province, Luoyang 471000, China)

[Abstract] **Objective:** To compare depression effects of rhubarb aglycone associated thrombolysis using at different time windows through artery on neurocyte apoptosis and its correlated controlling gene in rats with thrombus-occluded cerebral ischemia. **Method:** Rats were randomly divided into sham-operated, model, urokinase thrombolysis, rhubarb aglycone and associated groups. Rat model of thrombus-occluded cerebral ischemic was duplicated through the occlusion of middle cerebral artery by using the embolus of rat autologous blood blot and being inserted with nylon thread. At the time of 3, 6, 9 h after the operation of cerebral ischemia, rats were underwent

[收稿日期] 20100111(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(C03050311)

[第一作者] 刘敬霞, 博士, 副教授, 硕士生导师, 长期从事中医防治脑血管病的研究工作, Tel: 0951-6880501, E-mail: ljx199566@163.com.

[通讯作者] * 李建生, 博士, 教授, 博士生导师, 长期从事中医防治脑血管病的研究工作, Tel: 0371-65676568, E-mail: Li_js8@163.com.

treatment of thrombolysis by using urokinase through the pipe in internal carotid artery. At 24 h after urokinase thrombolysis, rats brain were taken, and then brain pathological changes were observed. Immunohistochemical method was used to detect the brain neurocyte apoptosis (TUNEL cell number), and then the expression of Bax, caspase-3 and Bcl-2 were measured in the study. **Result:** Compared with sham-operated group, pathological changes were obvious, TUNEL cell numbers and expression of Bax, Caspase-3 increased in model group, while expression of Bcl-2 decreased. TUNEL cell numbers in each administration group decreased and expression of Bax, caspase-3 in 6, 9 h groups of administration attenuated, while expression of Bcl-2 up regulated in 6 h groups, these changes appeared more significant in 3 h group than that in 9 h group. In comparison with each simple administration group, TUNEL cell numbers in association group reduced, and expression of Bax, caspase-3 in 6, 9 h group attenuated, and expression of Bcl-2 up regulated. **Conclusion:** Up regulation of expression in promoting apoptosis and down regulation of expression in inhibiting apoptosis could be caused by injury of cerebral ischemia and the changes became more obvious following the prolonging of ischemia time. Rhubarb aglycone and thrombolysis could inhibit apoptosis, but effects of their association appeared more significant. Association of rhubarb aglycone and thrombolysis could inhibit apoptosis by up regulating expression of Bax and caspase-3, as well as down regulating expression of Bcl-2.

[Key words] cerebral ischemia; rats; thrombolysis; rhubarb aglycone; association; apoptosis

针对脑缺血半暗带的时间窗进行溶栓是决定治疗成败的关键因素,抑制缺血半暗带神经细胞凋亡可减缓梗死灶的扩大、延长脑梗死的时间窗,为进一步的溶栓治疗赢得机会^[1-2]。此外,溶栓可引起神经细胞凋亡,造成脑组织的再灌注损伤。因此,阻抑神经细胞凋亡在延长溶栓时间窗和减轻溶栓后再灌注损伤方面具有重要意义。大黄是脑缺血治疗常用中药,其乙醚提取物大黄苷元可抑制脑缺血后神经细胞凋亡,具有抗脑缺血损伤作用^[3-4]。该研究从大黄苷元联合尿激酶溶栓对脑缺血大鼠神经细胞凋亡及其凋亡相关基因蛋白表达的影响方面探讨其对脑缺血损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 SD 大鼠,清洁级,3~4 月龄,260 只,雌雄各半,体重(300±50)g,由河南省实验动物中心提供(合格证号 410117 号);聚乙烯导管(武进市政平乳胶制品厂,型号 F2×70,外径 0.7 mm);尼龙线(日本大东阳公司,型号 2.5,内径 0.285 mm);凝血酶(济南军区生物制品药物研究所,批号 H41023661);尿激酶(山东新华制药股份有限公司,批号 05401236);大黄苷元(河南中医学院药物分析学科提供)。

1.2 分组与处理 大鼠随机分为假手术组、模型组、用药组;用药组又分为尿激酶溶栓组(简称溶栓组)、大黄苷元组和联合组(大黄苷元+尿激酶组)。模型组和用药组大鼠根据脑缺血后干预时间点的不同分为 3,6,9 h 3 组,各组 20 只动物。大鼠均于造

模前 4 d, ig 1 次/d, 大黄苷元组和联合组用大黄苷元 ig(用量为 12.96 mg·kg⁻¹),其余均 ig 等体积的生理盐水。脑缺血后不同时间点经导管进行区域动脉给药,模型组用生理盐水,溶栓组与联合组用尿激酶,尿激酶用量 5 000 U·kg⁻¹。

1.3 造模及取材 参考改良的 Zhang 法制备自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备血栓栓塞性脑缺血动物模型^[5],留置导管。区域动脉给药后 24 h 冰盘上取脑,制备标本,待行指标测定。

1.4 观察指标

1.4.1 脑组织病理观察 切取的脑组织用 4% 的多聚甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色,光镜下观察脑组织病理形态改变,根据受损程度由轻到重进行分级^[6],观察大鼠例数;病理损伤程度由轻到重分级(镜下见出血者均为 级): 级 0~25%, 级 26~50%, 级 51~75%, 级 75%。

1.4.2 TUNEL 阳性细胞 免疫组织化学检测;操作按试剂盒说明进行;梗死灶半暗带区及梗死区分别取互不重叠的 3 个(20×10)视野,计 TUNEL 染色阳性细胞个数,取其均数,进行统计。

1.4.3 Bax 表达 免疫组织化学检测;操作按实际和说明进行;显微镜计算机彩色图像处理系统观测 Bax 蛋白阳性反应产物面积;免疫组织化学定量计算公式得出阳性单位(PU)值。

1.4.4 caspase-3 表达 免疫组化法检测;操作按试剂盒说明书进行;显微镜计算机彩色图像处理系统

观测 Bax 蛋白阳性反应产物面积;免疫组织化学定量计算公式得出阳性单位(PU)值。

1.4.5 Bcl-2 表达 免疫组化法检测;操作按试剂盒说明书进行;显微镜计算机彩色图像处理系统观测 Bax 蛋白阳性反应产物面积;免疫组织化学定量计算公式得出阳性单位(PU)值。

1.5 统计学处理 SPSS 11.0 统计软件处理。等级资料用秩和检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析统计。显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 光镜下病理损伤程度及电镜下变化 模型组各时间点大鼠脑组织病理损伤均较假手术组明显($P < 0.01$);各用药组均较模型组减轻($P < 0.01$);各组 9 h 均较 3 h 损伤明显($P < 0.05$);联合 3 h 和 9 h 组较溶栓组和大黄苷元组损伤减轻($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织病理损伤分级比较($n=8$)

组别	t/h	各级病理变化例数/只				秩和
		0	1	2	3	
假手术	6	1	1	0	0	176
模型	3	1	2	5	0	403.5 ¹⁾
	6	1	1	5	1	453.5 ¹⁾
	9	0	2	4	2	504.0 ^{1,4)}
溶栓	3	2	4	2	0	303.0 ²⁾
	6	1	4	2	1	378.5 ^{2,3)}
	9	1	3	3	1	403.5 ^{2,3,4)}
大黄苷元	3	2	3	3	0	328.0 ^{2,3)}
	6	1	3	3	1	400.5 ^{2,3)}
	9	1	2	4	1	428.5 ^{2,3,4)}
联合	3	3	3	2	0	277.5 ²⁾
	6	2	4	2	0	303.0 ²⁾
	9	1	5	1	1	353.5 ^{2,3,4)}

注:T 代表时间点;与假手术组比较;¹⁾ $P < 0.01$,与相应时间点模型组比较²⁾ $P < 0.01$,溶栓组和大黄苷元组与相应时间点联合组比较³⁾ $P < 0.05$,与同组别 3 h 组比较⁴⁾ $P < 0.01$,与同组别 6 h 组比较⁵⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~3 同)。

2.2 TUNEL 阳性细胞 模型组各时间点均较假手术组增多($P < 0.01$);各用药组均较模型组减少($P < 0.01$);各组 9 h 分别较 6 h 和 3 h 组增多($P < 0.01$, $P < 0.05$);各联合组分别较两单一用药组减少明显($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 Bax 表达变化 各模型组均较假手术组增强($P < 0.01$);溶栓组和联合组 3 h 较模型组表达减弱

($P < 0.01$);各组 9 h 较其 6 h 和 3 h 组增强($P < 0.01$, $P < 0.05$);联合组较溶栓 9 h 和 6 h 组、大黄苷元各时间组减弱($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠脑组织 TUNEL 阳性细胞和 bax 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	t/h	n	TUNEL 阳性细胞	Bax 表达 /PU
假手术		8	1.23 ± 0.14	15.68 ± 2.67
模型	3	8	13.69 ± 1.37 ¹⁾	25.34 ± 2.26 ¹⁾
	6	7	20.85 ± 2.06 ^{1,4)}	28.94 ± 1.47 ^{1,4)}
	9	7	26.94 ± 1.97 ^{1,4,5)}	34.69 ± 3.68 ^{1,4,5)}
溶栓	3	7	7.36 ± 0.52 ^{2,3)}	18.01 ± 1.14 ²⁾
	6	8	16.49 ± 1.28 ^{2,3,4)}	23.87 ± 1.42 ^{2,3,4)}
	9	7	20.03 ± 2.04 ^{2,3,4,5)}	27.71 ± 1.54 ^{2,3,4,5)}
大黄苷元	3	8	8.72 ± 0.40 ^{2,3)}	23.56 ± 1.54 ³⁾
	6	8	16.29 ± 1.08 ^{2,3,4)}	30.12 ± 2.16 ^{3,4)}
	9	7	21.55 ± 1.03 ^{2,3,4,5)}	32.59 ± 1.87 ^{2,3,4)}
联合	3	7	4.95 ± 0.68 ²⁾	17.13 ± 1.72 ²⁾
	6	8	10.57 ± 0.68 ^{2,4)}	21.69 ± 1.67 ^{2,4)}
	9	8	17.10 ± 0.77 ^{2,4,5)}	24.13 ± 1.56 ^{2,4,5)}

2.4 Caspase-3 表达变化 各模型组均较假手术组增强($P < 0.01$);各用药 6 h 和 9 h 组均较模型组减弱($P < 0.01$);溶栓和大黄苷元 9 h 组分别较其 6 h 和 3 h 组增强($P < 0.01$, $P < 0.05$);联合组各时间点分别较两单一用药组减弱。见表 3。

表 3 各组大鼠脑组织 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	t/h	n	caspase-3 /PU	Bcl-2 表达 /PU
假手术		8	5.34 ± 0.59	18.64 ± 2.85
模型	3	8	12.38 ± 1.24 ¹⁾	12.27 ± 1.67 ¹⁾
	6	7	20.76 ± 1.36 ^{1,4)}	8.34 ± 1.03 ^{1,4)}
	9	7	25.92 ± 2.68 ^{1,4,5)}	4.69 ± 1.66 ^{1,4,5)}
溶栓	3	7	9.25 ± 1.33 ²⁾	15.01 ± 0.63 ²⁾
	6	8	15.64 ± 1.34 ^{2,4)}	11.29 ± 1.27 ^{2,3,4)}
	9	7	20.03 ± 2.04 ^{2,3,4,5)}	8.54 ± 1.26 ^{2,3,4,5)}
大黄苷元	3	8	11.27 ± 1.29	11.06 ± 1.23 ³⁾
	6	8	17.58 ± 1.34 ^{3,4)}	7.56 ± 0.86 ^{3,4)}
	9	7	21.37 ± 1.65 ^{2,3,4)}	6.12 ± 1.04 ^{2,3,4)}
联合	3	7	11.16 ± 2.13 ²⁾	17.12 ± 1.54 ²⁾
	6	8	12.75 ± 2.45 ²⁾	14.03 ± 1.14 ^{2,4)}
	9	8	14.97 ± 1.34 ^{2,4)}	11.67 ± 1.13 ^{2,4,5)}

2.5 Bcl-2 表达变化 各模型组均较假手术组表达减弱($P < 0.01$);各溶栓组和联合组均较模型组表达增强($P < 0.01$);溶栓组和联合组 9 h 分别较其 6 h 和 3 h 组增强($P < 0.01$);联合组分别较溶栓组和大黄苷元各时间组表达增强($P < 0.01$)。见表 3。

3 讨论

脑缺血损伤引起的细胞凋亡 (apoptosis) 受多种相关基因的调控, 是级联式 (cascade) 基因表达的结果^[7]。Bcl-2 是重要的抑凋亡基因, 而 bax 则促进细胞凋亡, 二者在功能上互相对立。研究表明, Bcl-2 可通过减轻细胞内钙超载、减少自由基生成、抑制脂质过氧化反应、阻止 cyt-c 释放等机制抑制细胞凋亡; bax 主要通过改变线粒体膜的通透性, 增加 cyt-c 释放而诱导细胞凋亡的发生^[8]; caspase 是细胞凋亡机制中特异性细胞内信号传导的关键成分, 活化的 caspase-3 可通过水解特异性蛋白底物促进凋亡发生, 被 caspase 裂解的蛋白质产物(同源半胱氨酸蛋白酶)参与细胞凋亡信号的启动, 故凋亡的最后实施是通过 caspase 的激活来实现^[9,10]。本研究显示, 脑缺血损伤可引起神经细胞凋亡发生, 且随缺血时间延长而明显, 大黄苷元和尿激酶溶栓对脑缺血神经细胞凋亡具有抑制作用, 以二者联合的效果尤为显著; 大黄苷元联合溶栓可下调促凋亡基因 bax 和 caspases 表达, 上调抑凋亡基因 Bcl-2, 进而通过抑制细胞凋亡来发挥脑保护作用。

[参考文献]

[1] 方凯. 急性大脑中动脉闭塞的动脉内接触性溶栓治疗[J]. 脑与神经疾病杂志, 2006, 14(2): 146.
[2] 赵瑞波, 张玉华, 李宗敏, 等. 亚低温延长脑梗死治疗时间窗及其机制[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(6): 377.
[3] 李建生, 刘敬霞, 梁生旺, 等. 大黄有效部位保护大

鼠脑缺血损伤作用的筛选研究[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(11): 1032.

[4] 李建生, 刘敬霞, 梁生旺, 等. 大黄苷元对脑缺血大鼠神经细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(3): 155.
[5] 李建生, 刘敬霞, 于海滨, 等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(5): 272.
[6] 李建生, 赵晶, 高爱社, 等. 补肾活血和泻下及开窍活血方药对脑缺血再灌注肺损伤老龄大鼠 ATP 酶和自由基代谢的影响[J]. 中国中医急症, 2001, 10(6): 345.
[7] Muramatsu H, Igarashi H, Okubo S, Katayama Y. Montepase reduces infarct volume and hemorrhagic transformation in rat model of embolic stroke[J]. Neurol Res, 2002, 24(3): 311.
[8] 张桂莲, 吴海琴, 常明则, 等. GM1 对大鼠脑缺血再灌注后 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 脑与神经疾病杂志, 2003, 11(6): 335.
[9] Li P A, Kristian T, He Q P, et al. Cyclosporin A enhances survival, ameliorates brain damage, and prevents secondary mitochondrial dysfunction after a 30-minute period of transient cerebral ischemia[J]. Exp Neurol, 2000, 165(1): 153.
[10] Bossy-Wetze W E, Talantova M V, Lee W D, et al. Cross talk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels [J]. Neuron, 2004, 41(3): 351.

[责任编辑 聂淑琴]

(上接第 118 页)

[3] 倪穗, 李纪元, 朱平. 3 年生南方红豆杉生物量和紫杉醇含量的积累分配研究[J]. 浙江林业科技, 2009, 29(2): 46.
[4] Guo D P, Li X Y, Sun P, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction improves the low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(2): 470.
[5] Wani M C, Talyor H L, Monroe E W, et al. Plant antitumor agents. Isolation and structure of tsxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia[J]. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325.
[6] Ganansia Leymarie V, Bischoff P, Bergerat J P, et al. Signal transduction pathways of taxanes-induced apoptosis

[J]. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003, 3: 291.
[7] Tan G, Heqing L, Jiangbo C, et al. Apoptosis induced by low-dose paclitaxel is associated with p53 upregulation in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2002, 97: 168.
[8] Chatterjee S K, Barron D M, Vos S, et al. Baccatin III induces assembly of purified tubulin into long microtubules [J]. Biochemistry, 2001, 40: 6964.
[9] Miller M C, Johnson K R, Wilingham M C, et al. Apoptotic cell death induced by baccatin, a precursor of paclitaxel, may occur without G₂/M arrest[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 44: 444.

[责任编辑 聂淑琴]