

· 基础研究 ·

三七皂甙单体 Rb₁ 对大鼠脑缺血再灌注时脑细胞凋亡及 cPLA₂ 蛋白表达的影响王东吉¹ 武 凡²

摘要 目的: 观察三七皂甙单体 Rb₁ 对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑细胞凋亡和胞浆型磷脂酶 A₂(cPLA₂) 及相关蛋白表达的影响。方法: 用线栓法制作大鼠中动脉缺血再灌注(MCA-IR)模型, 用原位末端标记(TUNEL)法检测脑细胞凋亡, 用免疫组织化学法检测 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 在脑细胞中的表达, 用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。结果: 在大鼠 MCA-IR 脑损伤时, 三七 Rb₁ 明显降低凋亡细胞数和血清中 TNF-α 水平及 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 在脑细胞中的表达, 与对照组比较, 差异有显著性意义(P<0.01)。结论: 三七 Rb₁ 通过抑制 cPLA₂ 及相关蛋白表达, 对大鼠中动脉缺血再灌注脑损伤有良好的保护作用。

关键词 脑缺血; 三七皂甙 Rb₁; 胞浆型磷脂酶 A₂

中图分类号: R743.3, R285 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-05-0414-04

Effects of panax Notoginseng saponins Rb₁ on cerebral apoptosis and expression of cPLA₂ protein after cerebral ischemia-reperfusion in rats/WANG Dongji, WU Fan//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(5): 414-417

Abstract Objective: To observe the mechanism of the effect of panax Notoginseng saponins Rb₁ on cerebral apoptosis and expression of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and related protein after cerebral ischemia-reperfusion injury. **Method:** Thread technique was used to make models of middle cerebral artery ischemic-reperfusion (MCA-IR). Apoptosis was measured by TUNEL staining method. The cPLA₂, c-fos and c-jun protein expression were measured by immuno-histochemistry. The level of TNF-α was measured by ELISA test. **Result:** Panax Notoginseng saponins Rb₁ remarkably inhibited the cerebral apoptosis, lowered the level of TNF-α and remarkably inhibited the expression of cPLA₂, c-fos and c-jun protein in rats with MCA-IR cerebral injury. Compared with the control group, there was significant statistical difference (P<0.01). **Conclusion:** Panax Notoginseng saponins Rb₁ has a good protective effect on MCA-IR injury of rats. It is considered the mechanism of this effect is to lower of TNF-α and to inhibit the expression of cPLA₂ c-fos c-jun protein.

Author's address Department of Physiology, Changzhi Medical College, Changzhi, 046000

Key words cerebral ischemia; panax Notoginseng saponins Rb₁; cytosolic phospholipase A₂

脑缺血再灌注时神经细胞凋亡的机制十分复杂。研究表明: 神经细胞凋亡是一种受基因调控的自主性、程序性细胞死亡过程, 是脑缺血再灌注损伤的主要环节^[1], 胞浆型磷脂酶 A₂ (cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂) 和即早基因表达在启动神经元凋亡中扮演着重要的角色^[2-3], 中药三七有活血化瘀、抗疲劳、耐缺氧等功效, 对脑缺血缺氧有一定保护作用, 其研究机制主要集中在抗自由基氧化损伤方面^[4]。但三七皂甙单体 Rb₁ 对胞浆型磷脂酶 A₂、c-fos 基因和 c-jun 基因的影响, 目前报道甚少。本实验拟通过制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注 (middle cerebral artery ischemia-reperfusion, MCA-IR) 损伤模型, 观察三七皂甙单体 Rb₁ 对脑细胞凋亡及 TNF-α、cPLA₂、c-fos 和 c-jun 的时相性变化, 探讨其抗脑缺血再灌注损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 54 只 (长治医学院动物实验中心), 体重 200±20g。随机分为 4 组: 模型组即 IR 组 30 只; 分 5 个亚组, 每个亚组 6 只, 即缺血 30min 再灌注 1h、12h、24h、48h、60h 组; Rb₁ 组 12 只: 分 2 个亚组, 每个亚组 6 只, 即缺血 30min 再灌注 12h、24h 组; 假手术组和正常对照组各 6 只。各组于设定时间点处死动物取标本。

1.2 大鼠 MCA-IR 模型的建立

MCA-IR 模型采用线栓法制作^[5]。大鼠用 10% 的

1 长治医学院生理学教研室, 山西长治, 046000

2 长治医学院生物化学教研室

作者简介: 王东吉, 女, 副教授

收稿日期: 2007-01-16

水合氯醛 3ml/kg 腹腔注射麻醉后仰位固定,取正中切口,分离左颈总动脉,颈内动脉和颈外动脉,结扎并剪断颈外动脉。在颈内、外动脉分叉处切口,插入涂布肝素的尼龙线栓(直径为 0.25mm),沿颈内动脉入颅至大脑前动脉起始处,阻断大脑中动脉所有血流来源。术后大鼠苏醒时出现右前肢屈曲和前进时右侧划圈状,证明左侧大脑中动脉阻塞成功。线栓子插入深度平均为 20 ± 0.5 mm。扎紧备线,缝合皮肤。缺血 30min 后轻提预留线头,使线栓头端退至切口,使大脑中动脉继续从 Willis 环获得血供即为再灌。假手术组仅插入栓子 15mm,其余步骤同上。Rb₁ 组于手术后立即腹腔注射 Rb₁ 5mg/kg(每 12h 给药 1 次)。

1.3 主要试剂

TNF- α ELISA 试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室;细胞凋亡原位检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim;cPLA₂ 抗血清由 Lisa.A. Marshall 教授(Smithking Beecham Co.U.S.A)惠赠;三七皂甙 Rb₁ 购自昆明植物研究所。

1.4 标本收集

1.4.1 血清标本收集: 各组大鼠分别于缺血再灌 1h、12h、24h、48h、60h 尾静脉取血、收集血液分离血清,置 -20℃ 储存待测 TNF- α 。

1.4.2 大脑标本收集: 于不同时间点将大鼠麻醉后,迅速开胸暴露心脏,作升主动脉插管。用 4℃ 肝素化生理盐水 150ml 灌流冲洗至无肉眼红色,再改灌 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 (0.1M 磷酸缓冲液 pH7.4 配制) 150ml 恒压灌流灌注 20min,灌注固定毕,即断头取出大脑置滴有 4% 多聚甲醛的玻璃板上。供 TUNEL 检测的标本,置于 4% 多聚甲醛液中做石蜡包埋;供 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 免疫组织化学检测标本,取下脑组织立即行冰冻切片。片厚均为 6 μ m。

1.5 血清 TNF- α 测定

参照试剂盒说明书。使用前将已包被好的酶标板取出打开,加入 TNF- α 标准品或样品 (100 μ l/孔) 双孔检测,对照孔加磷酸缓冲液 100 μ l,37℃ 下孵育 2h,去孔内液体,洗 3 次,加酶标兔抗 TNF- α 抗体 100 μ l,37℃ 避光反应 20min,用 200 μ l 的 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,在酶标仪上测定 OD₄₉₀ 值,根据标准曲线推算样品 TNF- α 含量。

1.6 TUNEL 法测定脑细胞凋亡

脑片常规脱蜡处理后,按以下步骤操作:①将切片放入 0.3% H₂O₂/甲醇溶液中以封闭内源性过氧化酶 (POD);②切片放入通透液 (0.1% Triton X-100/0.1% 柠檬酸) 中,冰浴中放 2min;③加入 50 μ l TUNEL 混合液 37℃ 孵育 1h;④加入 50 $\times$ 50 μ l 荧光

素抗体-POD 结合物 37℃ 孵育 30min,⑤加入 100 μ l 二氨基联苯胺 (DAB)-H₂O₂ 底物液显色 10min。上述各步骤均用 PBS 冲洗 3 次。苏木精复染,脱水、透明和封固,光镜下观察。

1.7 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 免疫组织化学法

步骤:①将切片放入 0.3% (w/v) H₂O₂ 的甲醇中 30min 以封闭内源性 POD;②分别滴加 1:100 的 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 抗血清于玻片上,37℃ 孵育 1h 放 4℃ 过夜;③分别滴加 1:1000 生物素标记的羊抗兔及兔抗小鼠 IgG-HRP,37℃ 孵育 1h;④DAB 显色液显色 15min,用流水冲洗终止反应,苏木精复染,脱水、透明和封固,光镜下观察。上述前三步均用 PBS 漂洗 2 次 $\times$ 5min。阳性反应胞浆呈棕黄色。阴性对照:省去一抗后操作。

1.8 结果分析及统计学分析

将原位杂交和免疫组化染色的切片用 CM-2000B 彩色医学图像分析系统进行分析,用目标总个数/mm² 表示。实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,统计学分析用 SPSS 10.0 软件进行单因素多组间方差分析及配对比较的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 三七 Rb₁ 对大鼠 MCA-IR 脑细胞凋亡的影响

正常组及假手术组偶见 TUNEL 阳性细胞。缺血 30min 再灌 1h 可见凋亡细胞出现在纹状体周围,再灌 12h 在皮质、海马阳性细胞开始增多,再灌 24—48h 凋亡细胞数达高峰,再灌 60h,凋亡细胞数量又明显下降(见图 1)。与假手术组比较,IR 组再灌 24h 后海马和皮质细胞凋亡数显著增多 (*P* < 0.01);与 IR 组比较,Rb₁ 组细胞凋亡数显著减少 (*P* < 0.01,见表 1)。

2.2 三七 Rb₁ 对大鼠血清 TNF- α 的影响

大鼠血清 TNF- α 水平在缺血 30min 再灌注 0.5h 就开始明显升高,再灌 12h 达高峰,24h 稍微下降于 48h 又开始上升。与假手术组比较,IR 组各相应时间点 TNF- α 水平均显著增高 (*P* < 0.05, *P* < 0.01,见图 2);从表 1 可见 Rb₁ 明显抑制血清 TNF- α 水平,与 IR 组比较有显著性差异 (*P* < 0.01)。

2.3 三七 Rb₁ 对大鼠 MCA-IR 脑组织 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 蛋白表达的影响

正常组及假手术组大脑切片可有少量 cPLA₂ 蛋白表达,缺血再灌 10min 就可见 cPLA₂ 明显表达,12h 表达达高峰,持续到 60h 仍不减低,IR 组各相应时间点与假手术组比较差异有显著性 (*P* < 0.01,图

3)。正常组及假手术组未见明显的 c-fos 和 c-jun 阳性细胞, 缺血再灌 0.5h 在皮质和海马可见少量 c-fos 和 c-jun 阳性细胞, 其中 c-fos 阳性细胞 3h 达高峰, 再灌 6h 则明显减少(见图 4,); c-jun 阳性细胞

24h 达高峰, 再灌 48h 则明显降低(见图 5)。由表 2 可见 Rb₁ 组 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 阳性细胞数与 IR 组比较均明显减少($P<0.01$), 提示三七 Rb₁ 能明显抑制缺血再灌后 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 的蛋白表达。

表 1 三七 Rb₁ 对大鼠 MCA-IR 后脑细胞凋亡及血清 TNF- α 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	再灌 24h 后凋亡细胞数(个/mm ²)		血清 TNF- α (pg/ml) (再灌后 12h)
	海马	皮质	
假手术组	0.8 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 1.1	11.7 $\pm$ 4.5
IR 组	14.1 $\pm$ 2.9 ^①	69.2 $\pm$ 10.3 ^①	138.3 $\pm$ 30.8 ^①
Rb ₁ 组	5.6 $\pm$ 2.1 ^②	28.9 $\pm$ 6.8 ^②	45.1 $\pm$ 12.7 ^②

①与假手术组比较 $P<0.01$; ②与 IR 组比较 $P<0.01$

表 2 三七 Rb₁ 对大鼠 MCA-IR 后脑组织 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	阳性细胞数(个/mm ²)		
	cPLA ₂ (12h)	c-fos(3h)	c-jun(24h)
假手术组	3.2 $\pm$ 1.4	0	1.2 $\pm$ 0.8
IR 组	41.2 $\pm$ 7.8 ^①	21.5 $\pm$ 4.3 ^①	19.8 $\pm$ 5.4 ^①
Rb ₁ 组	12.3 $\pm$ 4.1 ^②	6.4 $\pm$ 2.8 ^②	6.1 $\pm$ 3.7 ^②

①与假手术组比较 $P<0.01$; ②与 IR 组比较 $P<0.01$

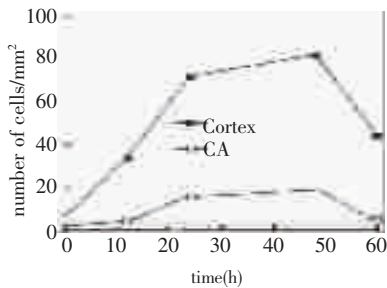


图 1 缺血再灌脑细胞凋亡的时相性变化

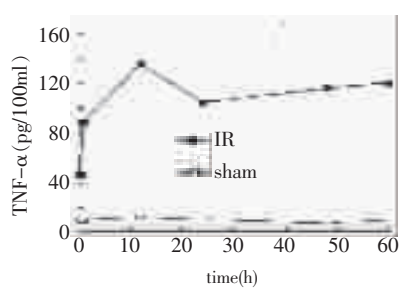


图 2 缺血再灌大鼠血清 TNF- α 水平的时相性变化

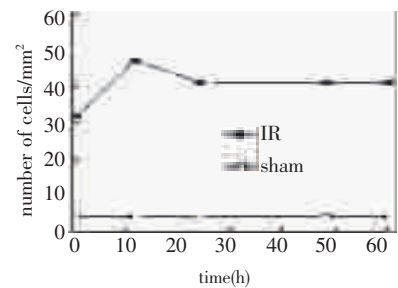


图 3 cPLA₂ 在脑缺血再灌表达的时相性变化

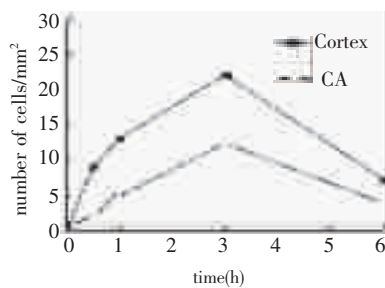


图 4 c-fos 在脑缺血再灌表达的时相性变化

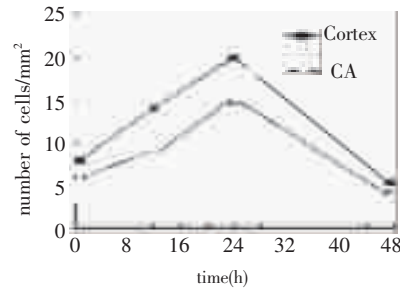


图 5 c-jun 在脑缺血再灌表达的时相性变化

3 讨论

本研究结果显示, 脑缺血 30min 再灌 1h 凋亡细胞在纹状体周围散在出现, 12h 扩散到皮质, 24—48h 后整个大脑中动脉供血区分布最多, 提示细胞凋亡参与了脑缺血的扩散。60h 过后, 凋亡细胞开始下降, 此时坏死细胞增多, 表明细胞凋亡是缺血性脑损伤中细胞死亡的一种方式^[6]。凋亡细胞产生经历细胞皱缩、胞核凝聚、DNA 链断裂等过程, 这又为治疗赢得了时间。我们在 IR 后即刻和每 12h 一次剂量给予三七 Rb₁, 使之快速通过血脑屏障进入中枢, 明显抑制大鼠缺血再灌脑细胞凋亡, 说明其具有抗细胞凋亡的药效。

TNF- α 是一种重要的细胞因子, 直接参与脑缺血损伤过程。本实验观察到大鼠缺血再灌 0.5h 血清 TNF- α 水平明显升高, 12h 达高峰 24h 稍降 48h 又继升至 60h 峰值。TNF- α 产生早于凋亡细胞产生, TNF- α 产生的时间峰期与细胞凋亡几乎相近且峰值较细胞凋亡早 12h, 提示 TNF- α 产生促进了细胞

凋亡。Rb₁ 组能明显抑制血清 TNF- α 水平, 说明其可能是抗细胞凋亡的机制之一。

cPLA₂ 是 Ca²⁺ 离子依赖性 PLA₂ 的一种亚型, 分子量为 85KDa, 与 II 型 PLA₂ 不同, cPLA₂ 不能分泌至胞外, 在细胞内完成信号转导。当 cPLA₂ 被小于 pM 浓度的 Ca²⁺ 激活后, 从胞浆中迁移到胞膜上, 特异性水解膜磷脂分子 sn-2 位酰酯键使结构和功能发生改变, 导致细胞损伤; 同时释放出花生四烯酸 (arachidonic acid, AA), 而 AA 的级联反应生成的炎症介质 (PGE₂、LT、TxA₂ 等), 广泛参与缺血再灌脑损伤炎症反应信号转导, 进而诱导细胞凋亡^[7]。程清洲等^[8]在脑 IR 实验中观察到 cPLA₂ 活性抑制后, TNF- α 诱导的凋亡被抑制, 提出 cPLA₂ 在 TNF- α 诱导凋亡中起“死亡介质”的作用。本实验结果显示, cPLA₂ 蛋白表达的时相性变化与 TNF- α 水平的时相性变化几乎同步, 均于缺血再灌 12h 达高峰持续至 60h 仍不减低。不同之处是 cPLA₂ 蛋白表达在缺血再灌 10min 明显升高, 较早于血清 TNF- α 水

平, 这与报道相一致, 提示 TNF- α 和 cPLA₂ 共同参与缺血性脑损伤, 并与缺血后海马、皮质延迟性神经细胞死亡有密切关系。cPLA₂ 的免疫组化检测阳性结果进一步说明脑细胞中含有 cPLA₂ 分布。因对 cPLA₂ 表达的抑制也是抗脑细胞损伤的关键环节, Rb₁ 能明显抑制 cPLA₂ 蛋白表达, 其机制是减少 cPLA₂ 对脑细胞的损害作用。

细胞凋亡还是多基因参与的细胞主动死亡。即早基因中 c-fos 和 c-jun 基因是两种转录调节因子。细胞凋亡通路上有 c-fos 和 c-jun 表达, 不仅与 DNA 损伤及修复有关, 且参与细胞周期的调控, 具有保护作用。但过度表达可干预细胞核的修复功能导致细胞凋亡。研究发现脑缺血后 c-jun 出现在小鼠的脑缺血区内并与凋亡相伴随^[9], c-fos 在大脑中动脉阻断 30min 即在皮质、海马诱导^[10]。Takemoto 等^[3]认为 c-fos 和 c-jun 参与了神经兴奋到基因表达的耦联过程, 诱导脑细胞凋亡。本实验观察到大鼠缺血再灌 0.5h 在皮质、海马即出现 c-fos 和 c-jun 阳性细胞, 3h c-fos 表达达高峰; c-jun 表达一直处在较高水平, 24h 达高峰, 且随灌注时间延长 c-fos 和 c-jun 表达逐渐减少, 表明 c-fos 和 c-jun 的早期诱发和在皮质、海马缺血区的表达与激活凋亡相关基因诱导细胞凋亡密切相关。本研究结果显示 Rb₁ 能明显抑制 c-fos 和 c-jun 蛋白表达, 提示 Rb₁ 抗细胞凋亡作用可能是通过影响转录调节因子的表达来实现, 通过对转录调节因子的抑制, 阻断刺激信息的传递, 可防止或减少脑缺血再灌注时细胞凋亡的发生。

通过实验, 三七皂甙单体 Rb₁ 明显降低细胞凋

亡数和血清中 TNF- α 水平及 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 蛋白在脑细胞中的表达, 与 IR 组比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。提示三七皂甙 Rb₁ 对脑保护作用可能是通过减少细胞凋亡及下调其相关蛋白 cPLA₂、c-fos 和 c-jun 表达而实现的。

参考文献

- [1] Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62: 329—339.
- [2] 张家平, 黄跃生, 杨宗城. 严重烫伤大鼠胞浆型磷脂酶 A₂ 表达变化及与心肌损害的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10): 588—590.
- [3] Takemoto C, Toyoth N, Turkaya D, et al. Induction of c-fos and c-jun gene products and heat shock protein after brain and prolonged cerebral ischemia in gerbils [J]. Stroke, 1995, 26, 1639—1643.
- [4] 任小巧, 李建生, 田金州. 中药抗脑缺血再灌注损伤的实验研究概况[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24 (5): 41—44.
- [5] Laing RT, Jakubowski J, Laining RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats; method works best [J]? Stroke, 1993, 24: 294—298.
- [6] 李琳, 张志强. 脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27, 60—62.
- [7] Dessen A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A₂[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1488: 40.
- [8] 程清洲, 戴冀斌, 谭政. 大鼠缺血再灌注后海马区 cPLA₂、Caspase-3 的分布[J]. 卒中与神经疾病杂志, 2002, 9(5): 281—284.
- [9] 王艺东, 黄如训, 李玲, 等. 局灶脑缺血后胰岛素对 c-fos、c-jun 基因表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 17(3): 144—146.
- [10] 角建瓴, 赖新生, 张家维, 等. 电针对局脑缺血再灌注大鼠脑组织 C-fos 蛋白表达的影响[J]. 中华中西医杂志, 2004, 13(5): 35—37.

(上接 405 页)

Pharmacotherapy, 2006, 26: 1247.

- [2] Kokkinos P, Chrysoshoou C, Panagiotakos D, et al. Beta-blockade mitigates exercise blood pressure in hypertensive male patients [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47: 794.
- [3] Raizada MK, Der Sarkissian S. Potential of gene therapy strategy for the treatment of hypertension [J]. Hypertension, 2006, 47: 6.
- [4] 梁远红, 王晋明, 周燕, 等. β_1 受体反义基因治疗对 Goldblatt 高血压大鼠血压及血流动力学的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2004, 20(10): 596.
- [5] 周燕, 王晋明, 梁远红, 等. β_1 受体基因治疗对肾性高血压大鼠心室重构的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(3): 289.
- [6] Zhang YC, Kimura B, Shen L, et al. New beta-blocker: prolonged reduction in high blood pressure with b1 antisense

oligodeoxynucleotides [J]. Hypertension, 2000, 35: 219.

- [7] Zhang YC, Bui JD, Shen L, et al. Antisense inhibition of β_1 -adrenergic receptor mRNA in a single dose produces a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. Circulation, 2000, 101: 682.
- [8] 吴学敏, 谢欲晓, 孙启良, 等. 运动训练及依那普利对自发性高血压慢性肾功能衰竭大鼠模型肾功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(4): 255.
- [9] Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, et al. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression [J]. Nat Biotechnol, 2002, 15: 647.
- [10] Choi WJ, Kim JK, Choi SH, et al. Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer [J]. Biomaterials, 2004, 25: 5893.