

· 基础研究 ·

天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的抑制作用*

聂 晶^{1,2}, 杜 亮², 陆远富^{1,2}, 石京山^{1,2}

(1. 遵义医学院药理学教研室, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省基础药理重点实验室, 贵州遵义 563000)

摘 要:目的 探讨天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用机制。方法 采用线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 缺血 2 h, 再灌注 24 h 后取大鼠大脑组织进行 HE 染色观察病理改变, TUNEL 法计数凋亡细胞, Real time RT-PCR 检测胱天蛋白酶 3(caspase-3)mRNA 的表达。结果 天麻素能明显改善中动脉闭塞所致局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理变化, 减少细胞凋亡($P < 0.01$), 降低 caspase-3 mRNA 的表达($P < 0.05$)。结论 天麻素可通过下调 caspase-3 mRNA 的表达减少大脑神经细胞凋亡, 对缺血再灌注损伤大鼠脑组织发挥保护作用。

关键词:天麻属; 脑缺血; 再灌注损伤; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)18-1841-02

Inhibitory action of gastrodine on the neuronal apoptosis after focal cerebral ischemia reperfusion*

Nie Jing^{1,2}, Du Liang², Lu Yuanfu^{1,2}, Shi Jingshan^{1,2}

(1. Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. the Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To investigate the potential mechanisms of gastrodine on the focal cerebral ischemic reperfusion damage in rats. **Methods** The SD rats were administered with gastrodine by gavage once a day for 7 days. The animals were then subjected to right-middle cerebral artery occlusion for 2 h and reperfusion for 24 h. Brain tissues were stained with hematoxylin-eosin. The number of neuronal apoptosis was assessed by terminal oxynucleotidyl transferase mediated dUTP biotin nick end labeling (TUNEL). The mRNA level of caspase-3 was detected by Real time RT-PCR. **Results** Compared with the model group, gastrodine significantly attenuated the apoptosis and the expression of caspase-3 of rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Gastrodine can improve the brain injury induced by focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. The mechanisms appear to be partly due to the inhibition of apoptosis through the suppression of caspase-3 expression.

Key words: gastrodia; brain ischemia; reperfusion injury; apoptosis; caspases

缺血性脑血管病是一种常见病和多发病, 是目前严重危害人类健康的主要疾病之一, 因具高发病率、高死亡率、高致残率和高复发率等特点而引起国内外医学界的广泛关注与高度重视。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, 可以减轻脑梗死的体积, 这已成为缺血性脑血管病的治疗靶点之一^[1]。既往研究发现天麻素可明显改善中动脉闭塞所致局灶性脑缺血大鼠的神经功能, 明显缩小梗死面积, 降低脑含水量, 对大鼠脑缺血再灌注损伤有显著的保护作用^[2], 因此, 本研究拟在此基础上观察天麻素对大鼠凋亡诱导因子——胱天蛋白酶 3(caspase-3) 及神经细胞凋亡的影响, 进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器 SD 大鼠 36 只, 雄性, 体重(250±10)g, 清洁级, 购自第三军医大学大坪医院动物中心[合格证号: SCXK(渝)2007-0005], 颗粒饲料饲养, 自由饮水, 适应性喂养 1 周后进行实验。天麻素购自西安冠宇生物技术有限公司(纯度: 99.12%, 批号: GY20080822); 尼莫地平片购自山西亚宝药业集团股份有限公司(20 毫克/片, 批号: 080510); RNA 纯化试剂盒、Real time RT-PCR 试剂盒, 以及 β -actin 和 caspase-3 引物均购自宝生物(大连)工程有限公司; 原位末端标记细胞凋亡试剂盒由德国 Boehringer Mannheim 公

司提供。iMark 通用酶标仪和 Icyler IQ 型 Real time RT-PCR 为美国 BIO- RAD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备及给药 将 36 只大鼠随机分为假手术组、模型组、天麻素低剂量组(15 mg/kg)、天麻素中剂量组(30 mg/kg)、天麻素高剂量组(60 mg/kg)及尼莫地平组(12 mg/kg), 每组 6 只大鼠。各组均于手术前 1 周每日上午 09:00 灌胃给药, 假手术组给予生理盐水。采用大鼠中动脉闭塞和再灌注的方法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型^[2]。

1.2.2 HE 染色观察脑组织病理形态 大鼠缺血 2 h, 再灌注 24 h 后麻醉断头取脑, 以视交叉前后两点冠状切片, 片厚约 4 mm, 将脑切片放入 40 g/L 甲醛溶液中固定。常规梯度脱水, 透明, 包埋, 浸蜡, 切片(厚 6 μ m), HE 染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察组织学变化。

1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡情况^[3] 切片常规脱蜡至水, 按试剂盒说明书操作, DAB 显色 2~5 min, 苏木素复染, 封片。于光镜下观察, TUNEL 染色阳性并伴有核染色质浓聚, 核染色质靠边凝集或凋亡小体形成者为凋亡细胞; TUNEL 染色阳性但呈弥漫着色为坏死细胞; TUNEL 染色阴性为正常细胞。光镜下随机选取每张切片梗死周边组织 5 个视野($\times 400$)计数凋亡细胞数。

1.2.4 Real time RT-PCR 检测 按照说明书提取总 RNA 并

* 基金项目: 遵义市红花岗区科技局科学技术项目[遵红科合社字(2007)13 号]。

纯化,用 Real-time RT-PCR 试剂盒检测脑组织中 caspase-3 mRNA 的表达。各基因引物序列, β -actin,上游:5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',下游:5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3';caspase-3,上游:5'-AGG TCC AAG TTG CGC GTT TC-3',下游:5'-CAG AAT GAG GAC TGG GTG AG -3';总反应体积为 15 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C, 10 min $\rightarrow$ (95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 1 min) $\times$ 40 个循环。目的基因的相对表达量以目的基因/内参基因表示。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间检验,两组间样本均数比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理改变的影响 假手术组脑组织形态结构基本正常,细胞密度大;模型组缺血侧脑组织结构较疏松,间质水肿,有散在空腔形成,且出现不同程度的神经元变性、坏死,细胞间隙增宽,神经元胞核形态不规则,细胞核固缩;天麻素低、中、高剂量组及尼莫地平组脑组织形态结构大致正常,病理改变轻微,坏死细胞和凋亡细胞减少,海马区可见锥体细胞,见插 II 图 1。

2.2 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织凋亡细胞的影响 模型组大鼠可见大量 TUNEL 染色阳性的神经细胞,天麻素高、中剂量组和尼莫地平组能明显减少脑缺血再灌注损伤大鼠 TUNEL 染色阳性细胞数($P<0.01$),见表 1。

表 1 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织凋亡细胞的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	凋亡细胞数(个)
假手术组	9.6 $\pm$ 3.8
模型组	48.2 $\pm$ 9.7 ^{##}
天麻素低剂量组	45.8 $\pm$ 5.3
天麻素低剂量组	28.4 $\pm$ 7.3 ^{**}
天麻素低剂量组	25.0 $\pm$ 7.6 ^{**}
尼莫地平组	24.0 $\pm$ 4.8 ^{**}

^{##}: $P<0.01$,与假手术组比较;^{*}: $P<0.01$,与模型组比较。

2.3 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 caspase-3 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 caspase-3 mRNA 表达增加($P<0.05$);与模型组比较,天麻素中、高剂量组和尼莫地平组 caspase-3 mRNA 表达降低($P<0.05$),见表 2。

表 2 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 caspase-3 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	caspase-3 mRNA
假手术组	42.4 $\pm$ 19.4
模型组	166.6 $\pm$ 44.7 [#]
天麻素低剂量组	118.5 $\pm$ 18.0
天麻素低剂量组	87.2 $\pm$ 6.0 [*]
天麻素低剂量组	44.7 $\pm$ 4.8 ^{**}
尼莫地平组	39.8 $\pm$ 10.7 ^{**}

[#]: $P<0.05$,与假手术组比较;^{*}: $P<0.05$,^{**}: $P<0.01$,与模型组比较。

3 讨 论

脑缺血再灌注损伤后缺氧、水肿和神经代谢产物释放等病

理改变引起的继发性损伤是影响缺血性脑血管病患者预后的关键因素。缺血半暗带内神经元和胶质细胞的凋亡是反映继发性损伤程度的重要标志,由于这些细胞仍然保留了部分蛋白合成能力并表达某些相关基因,如能及时给予保护治疗,该部位的能量代谢及神经组织则可能被挽救。否则就转为不可逆损伤,使梗死灶扩大。因此,治疗重点在于挽救缺血半暗带神经组织,即如何保护受损神经组织,减少细胞凋亡^[4]。

凋亡是细胞自然杀伤过程,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,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、钙离子超载、炎性反应及线粒体损伤都可以触发细胞凋亡^[1]。本研究中心 HE 染色及 TUNEL 结果均显示模型组凋亡细胞显著增多,而天麻素能够抑制细胞凋亡,凋亡可能决定梗死灶的体积,既往研究中发现天麻素可显著减少脑缺血再灌注损伤大鼠的脑梗死灶面积,提示其减少梗死灶面积可能与其抑制细胞凋亡有关。

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。(1)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,将其传递给执行器的过程;(2)执行期: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-3、caspase-6、caspase-7,后者通过激活 DNA 酶等导致 DNA 的断裂;(3)死亡期:DNA 破坏的不断增多,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^[5]。caspase 参与细胞凋亡的信号传导,其中 caspase-3 是凋亡过程中最重要的蛋白酶,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。脑缺血后,神经元 caspase-3 mRNA 表达增加、酶活性增强,本研究中模型组大鼠脑组织中 caspase-3 mRNA 表达明显增高,而天麻素可降低 caspase-3 mRNA 的表达,抑制神经细胞的凋亡。

综上所述,天麻素可能是通过下调 caspase-3 的表达减轻脑组织细胞凋亡,从而缩小脑梗死面积,对缺血再灌注大鼠脑组织发挥保护作用。

参考文献:

[1] 陈东丽,陈旭东,夏翠英.天麻对大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):148-150.

[2] 聂晶,杜亮,黄燮南,等.天麻素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].华西药学杂志,2010,25(4):423-425.

[3] 王伟,景桂霞,赵新京,等.瑞芬太尼预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2011,32(1):128-130.

[4] 吴中亮,任宁.天麻素注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的影响[J].解放军药学报,2008,24(3):204-207.

[5] 贾士奇,王军,张红霞,等.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[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):163-166.