

网络出版时间: 2019-7-15 18:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190715.0922.013.html>

## 二苯乙烯苷减轻小鼠急性脑缺血再灌注后的氧化应激损伤及其对自噬的影响

张奇龙<sup>1</sup>, 薛威<sup>1</sup>, 徐博涵<sup>2</sup>, 唐虹<sup>1</sup>, 江勤<sup>1</sup>, 董六一<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究小鼠急性脑缺血再灌注损伤(CIRI)后二苯乙烯苷(TSG)对自噬作用的影响及其神经保护作用。方法 雄性昆明种小鼠100只,随机分为假手术组、模型组和TSG低、中、高剂量组(3、6、12 mg/kg)。采用双侧颈总动脉结扎法建立急性脑缺血再灌注模型,缺血2 h再灌注24 h,于缺血和再灌注前尾静脉注射给药各1次。断头取脑检测脑组织含水量,采用试剂盒检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量,HE染色检测小鼠脑组织病理变化,蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白的表达。结果与模型组比较,TSG组脑皮层神经元的病理性损伤较轻,神经元数量增加,形态改善,核固缩减轻;TSG中、高剂量组显

著降低脑组织含水量及MDA的含量,并可显著升高血清中SOD活性( $P < 0.01$ ),TSG高剂量组亦可显著抑制自噬相关基因Atg6(Beclin1)和微管相关蛋白1轻链3(LC3-II/I)蛋白的表达( $P < 0.05$ )。结论 TSG对小鼠急性CIRI具有很好的神经保护作用,作用机制可能与抑制CIRI中自噬激活有关。

**关键词** 脑缺血再灌注; 二苯乙烯苷; 自噬; Beclin1; LC3-II/I  
**中图分类号** R 743.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)08-1232-05  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.013

2019-05-19 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1408085MH174)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第二临床医学院,合肥 230032

作者简介: 张奇龙,男,硕士研究生;

董六一,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: dongly@ahmu.edu.cn

脑卒中是一类复杂的高发病,发病后其病死率、致残率及复发率均高,目前已经成为威胁人类健康的三大疾病之一。其中缺血性卒中约占脑卒中疾病总数的70%,是由于大脑血供障碍而引发的缺血、缺氧,导致局限性脑缺血性坏死的一种疾病<sup>[1]</sup>。二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glycoside, TSG)是从

## siRNA-Nav1.5 interferes HSC-3 cells and changes in biological behavior *in vitro*

Dai Yongzheng, Qian Chengwei, Xu Xiaoli, et al

(Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the expression and biological effects of voltage-gated sodium channel 1.5 subtype (Nav1.5) on oral squamous cell carcinoma cell lines and tissues transfected with small interfering RNA (siRNA-Nav1.5), and analyze its possible regulatory mechanism. **Methods** Oral squamous cell carcinoma tissues and normal oral epithelium tissues were selected from clinical, immunohistochemistry was used to detect the expression of Nav1.5. Confocal microscope showed intracellular expression of Nav1.5. The expression levels of Nav1.5 in HSC-3 cells were transfected with siRNA-Nav1.5 liposome. Transwell and CCK8 were used to detect the invasion and proliferation of HSC-3 cells. Western blot and RT-PCR were used to validate the expression of related protein PCNA, MMP-2 and MMP-9. **Results** Immunohistochemical results showed that Nav1.5 was positively expressed in oral squamous cell carcinoma, but no significant expression was observed in normal tissues. Immunofluorescence results showed positive expression of Nav1.5 in HSC-3 cells. The invasion and proliferation of HSC-3 cells transfected with siRNA-Nav1.5 were significantly suppressed. The expression of PCNA, MMP-2 and MMP-9 protein was decreased in HSC-3 cells after transfected with siRNA-Nav1.5. **Conclusion** Nav1.5 can promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating the expression of PCNA, MMP-2 and MMP-9.

**Key words** oral squamous cell carcinoma; voltage-gated sodium ion channel; Nav1.5; invasion; proliferation

中药何首乌中提取的有效成分,国内外研究<sup>[2]</sup>表明TSG具有抗氧化、抗补体、扩张血管、抑制 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性等保护作用,但是TSG对脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)的作用机制尚不清楚。该实验拟通过建立小鼠急性脑缺血再灌注模型,研究TSG对小鼠急性CIRI引起的氧化应激及自噬的影响,初步探讨TSG对抗CIRI的可能机制,为其应用于临床提供理论与实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 5周龄SPF级雄性昆明小鼠,体质量22~24 g,购自安徽医科大学省级实验动物中心,动物生产合格证号:SCXK(皖)2011-002,饲养与实验均在安徽医科大学实验动物中心屏障环境中进行,温度范围( $22 \pm 3$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度范围:40%~70%,照明周期:12 h明/12 h暗,自由摄水进食。

**1.2 药品与试剂** TSG购自南京道斯夫生物科技有限公司;自噬相关基因Beclin1抗体、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体购自英国Abcam公司;BCA蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;辣根过氧化物酶标记兔、鼠二抗购自北京中杉金桥生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程有限公司;苏木精-伊红染料购自南京凯基生物科技发展有限公司;多聚甲醛溶液购自成都市科隆化学品有限公司;二甲苯购自四川绿森林化工有限公司;水合氯醛购自合肥国药集团化学试剂有限公司。

**1.3 主要仪器** ChemiDoc MP化学发光成像系统购自美国Bio-Rad公司;SpectraMax190酶标仪购自美国Molecular Devices公司;立式夹心电泳槽购自美国Bio-rad公司;DYY 8C型电泳仪购自北京六一仪器厂;PVDF膜购自美国Millipore公司;光学显微镜购自日本奥林巴斯公司;石蜡切片机购自德国LEICA公司。

## 1.4 实验方法

**1.4.1 实验分组** 小鼠适应性喂养5 d后,随机分成5组,分别为:假手术组、模型组、TSG低剂量组(3 mg/kg)、TSG中剂量组(6 mg/kg)、TSG高剂量组(12 mg/kg),每组20只,其中10只小鼠用于脑组织含水量检测,另外10只小鼠用于脑组织病理学检测和免疫印迹蛋白检测。

**1.4.2 小鼠急性CIRI模型建立** 所有小鼠术前禁

食不禁水12 h,进行手术造模。参照Wang et al<sup>[3]</sup>的方法略加改进,10%水合氯醛进行腹腔注射麻醉,备皮,颈部皮肤切开约1.0 cm,钝性分离皮下组织,暴露出双侧颈总动脉,下穿以6-0号手术缝合线,结扎2 h而后松开丝线进行再灌24 h。在缺血2 h和再灌注24 h内用电热毯维持小鼠肛温在( $36.5 \sim 37.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。假手术组仅做双侧颈总动脉分离,不做结扎处理。TSG于缺血和再灌注前尾静脉注射给药各1次,给药容积为0.1 ml/10 g,假手术组和模型组仅给予等量的生理盐水。

**1.4.3 脑组织含水量检测** 造模后小鼠快速断头取出大脑,去除小脑和脑干,用滤纸吸干表面液体。用电子天平称取标本的湿重,然后将脑组织置入电热恒温烘箱( $110 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 中烘24 h至恒重,称取干重。采用干、湿比重法,计算脑组织含水量。公式如下:脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

**1.4.4 病理组织学检查** 小鼠脑缺血再灌注后处死取脑,置于4%多聚甲醛中固定,经石蜡包埋制成切片,进行苏木精-伊红(HE)染色,正置显微镜下观察小鼠脑组织病理变化。

**1.4.5 血清SOD活性与MDA含量检测** 各组小鼠造模后摘除眼球采血,室温静置30 min后放入提前预冷好的4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机4 000 r/min离心10 min后取上清液,即为血清,迅速放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。参照试剂说明书检测血清SOD活性及MDA含量。

**1.4.6 蛋白印迹法检测自噬蛋白表达水平** 将脑组织于冰上反复研磨制备脑组织匀浆;加入适量RIPA裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心后取上清液,BCA试剂盒测总蛋白浓度。以10~50  $\mu\text{g}$ 总蛋白上样,12%SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束后转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,经牛奶封闭、TBST漂洗后,分别加入Beclin1及LC3-抗(1:1 000),在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置过夜后再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000),TBST洗膜,发光显影,曝光拍照。采用Image J图像处理软件分析采集的图像,以Beclin1、LC3-II/I与 $\beta$ -actin蛋白条带灰度的比值来表示Beclin1、LC3-II/I蛋白相对表达水平。

**1.5 统计学处理** 采用SPSS 17.0进行统计分析,多组间均数比较采用单因素方差分析检验,检验水准取 $\alpha=0.05$ ,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TSG对CIRI小鼠脑含水量的影响** 与假手

术组相比,模型组小鼠脑组织含水量显著增加( $F = 2.55$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,TSG高、中剂量组可显著抑制小鼠脑组织含水量的增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ),有效改善脑组织水肿程度,见表1。

表1 TSG对CIRI小鼠脑含水量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	脑含水量(%)
假手术	$79.6 \pm 0.3$
模型	$80.5 \pm 0.7^{**}$
TSG高剂量	$79.6 \pm 0.8^{\#}$
TSG中剂量	$79.7 \pm 0.7^{\#}$
TSG低剂量	$79.9 \pm 0.8$

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

## 2.2 TSG对CIRI小鼠脑组织病理学变化的影响

HE染色结果显示,假手术组小鼠脑皮质神经元细胞和神经胶质正常,排列整齐,神经元细胞形态正常,毛细血管和小血管管腔较窄或呈实性条索,未见脑神经元损伤等病理性改变;模型组小鼠脑皮层神经元细胞呈现不同程度的变性、坏死,中性粒细胞炎性浸润,间质细胞水肿疏松呈网状,神经细胞、毛细血管和小血管周围的间隙增宽,神经胶质细胞肿胀,其胞质透亮区加大。TSG高、中剂量治疗组小鼠脑皮层神经元的病理性损伤较轻,神经元细胞数量增加,并可改善神经元细胞形态,减轻核固缩,见图1。

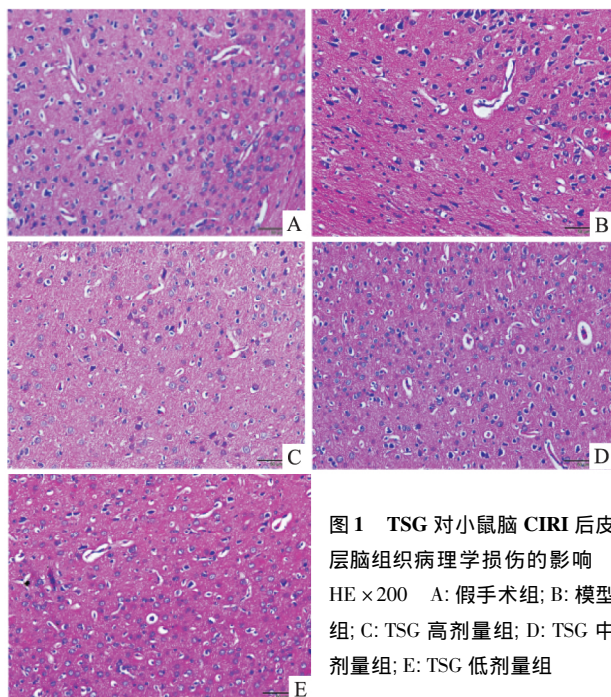


图1 TSG对小鼠脑CIRI后皮层脑组织病理学损伤的影响 HE  $\times 200$  A: 假手术组; B: 模型组; C: TSG高剂量组; D: TSG中剂量组; E: TSG低剂量组

## 2.3 TSG对CIRI小鼠血清中SOD、MDA含量的影响

与假手术组相比,模型组动物血清中SOD活

性明显降低( $F = 3.71$ ,  $P < 0.05$ ),与模型组比较,TSG高、中剂量组可显著升高小鼠血清中SOD活性( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );与假手术组比较,模型组动物血清中MDA含量明显增高( $F = 5.14$ ,  $P < 0.01$ ),与模型组比较,TSG高、中剂量组可显著降低小鼠血清中MDA的含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ),见表2。

表2 TSG对CIRI小鼠血清中SOD、MDA含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
假手术	$147.86 \pm 11.23$	$12.75 \pm 3.92$
模型	$134.84 \pm 9.51^*$	$18.04 \pm 1.43^{**}$
TSG高剂量	$150.88 \pm 8.36^{\#}$	$14.25 \pm 1.70^{\#}$
TSG中剂量	$148.88 \pm 10.20^{\#}$	$14.58 \pm 3.68^{\#}$
TSG低剂量	$144.07 \pm 12.38$	$16.28 \pm 2.50$

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

2.4 TSG对小鼠CIRI诱导的自噬蛋白Beclin1表达的影响 蛋白印迹法检测结果显示,模型组Beclin-1蛋白相对表达显著升高,与假手术组相比,差异有统计学意义( $F = 4.83$ ,  $P < 0.05$ )。TSG高剂量组可显著抑制缺血再灌注诱导的Beclin-1上调( $P < 0.05$ ),见图2。

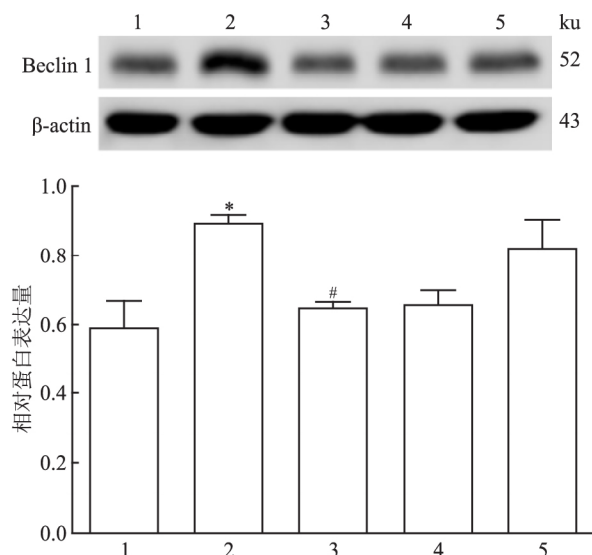


图2 TSG对CIRI后Beclin1蛋白表达的影响

1: 假手术组; 2: 模型组; 3: TSG高剂量组; 4: TSG中剂量组; 5: TSG低剂量组; 与假手术组比较:  $^*P < 0.05$ ; 与模型组比较:  $^{\#}P < 0.05$

## 2.5 TSG对小鼠CIRI诱导的自噬蛋白LC3-II/I表达的影响

蛋白印迹法检测结果显示,小鼠缺血再灌注24 h后,模型组中LC3-II/I蛋白相对表

达水平明显高于假手术组 ( $F = 12.17, P < 0.05$ )。与模型组比较, TSG 高剂量组可明显抑制 LC3-II / I 的相对表达 ( $P < 0.05$ ) ,见图 3。

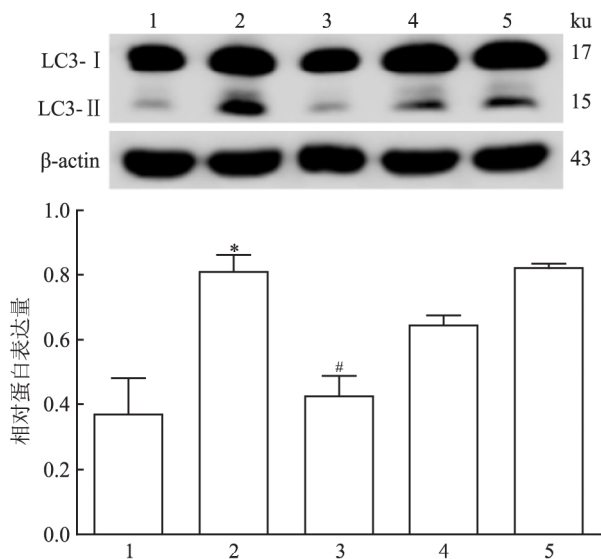


图3 TSG 对 CIRI 后 LC3-II / I 蛋白表达的影响

1: 假手术组; 2: 模型组; 3: TSG 高剂量组; 4: TSG 中剂量组; 5: TSG 低剂量组; 与假手术组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

TSG 是传统中药何首乌的主要有效成分之一, 具有抗机体氧化、提高免疫力、抗动脉粥样硬化、抗炎抗肿瘤等作用, 有“益血气、益精髓、黑鬓发、延年不老”的功效<sup>[4]</sup>。既往研究<sup>[5]</sup>显示, 何首乌及其活性成分可以减轻脑缺血引起的神经细胞损伤, 促进脑缺血后神经功能的恢复, 但对缺血性脑损伤的药理活性及机制尚未有效阐明。

细胞内活性氧代谢的平衡被破坏而有利于活性氧的积累, 活性氧积累的危害之一是引发或加剧脂质过氧化作用, 造成细胞膜系统的损伤<sup>[6]</sup>。SOD、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 等都是防御系统中的重要抗氧化剂。在脑缺血再灌注时过氧化物大量产生, 抗氧化系统的过度消耗又不能得到及时的补充, 导致体内 SOD、GSH 活性降低, 同时因脂质过氧化使 MDA 的生成量升高, 造成严重的迟发性神经功能损害。本研究结果显示, 小鼠急性 CIRI 后血清中 SOD 活性明显降低, MDA 含量明显增加, TSG 高、中剂量组 (12、6 mg/kg) 均能显著升高小鼠血清中 SOD 活性, 降低 MDA 的含量, 提示 TSG 能够抑制脂质过氧化反应, 对减轻继发性脑损伤具有重要作

用, 与其他学者的发现一致<sup>[7]</sup>。

CIRI 的病理生理机制极其复杂, 包括细胞内钙超载、氧自由基异常增多、兴奋性氨基酸类神经递质的毒性作用、微循环障碍和多种炎性细胞因子释放等<sup>[8-9]</sup>。当缺血再灌注损伤发生后, 可以出现坏死性细胞死亡和凋亡性细胞死亡, 但近年来自噬逐渐被认为是除细胞坏死和凋亡外的第 3 种死亡方式<sup>[10]</sup>。越来越多的实验证据表明<sup>[11]</sup>, 氧化应激能诱导自噬的发生并且应用抗氧化剂能抑制自噬并减少细胞死亡。神经元损伤的严重程度直接关系到自噬在脑缺血性损伤中的作用。在轻度饥饿、缺氧等情况下, 自噬不仅通过降解蛋白提供能量, 而且能够通过降解损伤的蛋白后合成新的蛋白, 从而保护着机体的细胞。若重度缺血、缺氧或延长细胞损伤的时间激活相关调控蛋白后, 自噬也过度激活, 过度激活的自噬又进一步促进细胞损伤的发生, 从而对机体产生损伤作用<sup>[12-13]</sup>。脑缺血时脑组织血流不足, 脑细胞代谢障碍, 最终导致脑细胞严重不可逆性损伤和死亡。本研究显示 CIRI 后脑皮层神经元细胞呈现不同程度的变性坏死且排列紊乱无层次感, 模型组的自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-II / I 表达水平较假手术组明显增加, 提示缺血再灌注损伤后神经元损伤明显增加, 自噬水平明显提高, 而用 TSG 干预后脑皮层的病理损伤得以减轻, 且与模型组相比自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-II / I 表达显著降低, 提示 TSG 能够抑制缺血后的过度自噬, 保护缺血神经元损伤, 但 TSG 对通过何种途径抑制自噬相关基因的表达还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Shi L, Rocha M, Leak R K, et al. A new era for stroke therapy: integrating neurovascular protection with optimal reperfusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38 (12): 2073-91.
- [2] Ling S, Xu J W. Biological activities of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside in antiaging and antiaging-related disease treatments [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4973239.
- [3] Wang Y, Ren Q, Zhang X, et al. Neuroprotective mechanisms of calycosin against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(2): 537-46.
- [4] Wu J, Hu W, Gong Y, et al. Current pharmacological developments in 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 811: 21-9.
- [5] Jiao C, Gao F, Ou L, et al. Tetrahydroxy stilbene glycoside antagonizes Aβ-induced hippocampal neuron injury by suppressing mitochondrial dysfunction via Nrf2-dependent HO-1 pathway [J].

- Biomed Pharmacother, 2017, 96: 222–8.
- [6] Al-Amin M M, Choudhury M F R, Chowdhury A S, et al. Pre-treatment with risperidone ameliorates systemic LPS-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 384.
- [7] 王 栋, 陈晓宇, 刘晓利, 等. 二苯乙烯苷对沙鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及部分机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(4): 379–82.
- [8] Xie W, Zhou P, Sun Y, et al. Protective effects and target network analysis of ginsenoside Rg1 in cerebral ischemia and reperfusion injury: a comprehensive overview of experimental studies[J]. *Cells*, 2018, 7(12): pii: E270.
- [9] 李传文, 张 嵘, 侯 亮, 等. SIRT1/NF- $\kappa$ B 通路参与白藜芦醇改善大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 6–9.
- [10] Yang X, Hei C, Liu P, et al. Inhibition of mTOR pathway by rapamycin reduces brain damage in rats subjected to transient forebrain ischemia[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(12): 1424–35.
- [11] Shah S Z A, Zhao D, Hussain T, et al. P62-Keap1-NRF2-ARE pathway: a contentious player for selective targeting of autophagy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in prion diseases [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 310.
- [12] 杨红星, 李绍旦, 杨明会. microRNA 调控自噬在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(9): 1485–8.
- [13] Zhao Y, Huang G, Chen S, et al. Folic acid deficiency increases brain cell injury via autophagy enhancement after focal cerebral ischemia[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 38: 41–9.

## Tetrahydroxystilbene glycoside alleviates oxidative stress injury after acute cerebral ischemia-reperfusion in mice and its effect on autophagy

Zhang Qilong<sup>1</sup>, Xue Wei<sup>1</sup>, Xu Bohan<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Pharmacology Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>The Second Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effect of tetrahydroxystilbene glycoside (TSG) on autophagy and its neuro-protective effect after acute cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in mice. **Methods** 100 male swiss mice were randomly divided into sham group, model group and TSG (3 mg/kg) group, TSG (6 mg/kg) group, TSG (12 mg/kg) group. The model of acute cerebral ischemia-reperfusion was established by bilateral common carotid artery ligation. The mice were given ischemia for 2 hours and reperfusion for 24 hours and TSG was injected into the tail vein once before ischemia and reperfusion. The brain water content of brain tissue was detected by decapitation. The activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in serum were detected by kit. The pathological changes of brain tissue were detected by HE staining. The expression levels of autophagy-related proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the pathological damages of the cortical neurons in the TSG group were lighter, the number of neurons increased, the morphology improved, and the nuclear pyknosis was relieved. The water content of brain tissue and the content of MDA were reduced by 6 mg/kg and 12 mg/kg dose groups of TSG significantly and the serum SOD activity was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expression levels of autophagy-related gene Atg6 (Beclin1) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II/I) proteins were also significantly inhibited by 12 mg/kg dose groups of TSG ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TSG has a good neuroprotective effect on acute cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. Its mechanism may be related to the inhibition of autophagy activation in cerebral ischemia-reperfusion injury.

**Key words** cerebral ischemia-reperfusion; tetrahydroxystilbene glycoside; autophagy; Beclin1; LC3-II/I