

◇ 基础医学研究 ◇

葛根素预处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区神经元损伤的影响及其机制

尹雪莉¹ 桂 丽² 李 珍¹

摘要 目的 探讨葛根素预处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区神经元损伤的保护作用及其机制。方法 雄性 SD 大鼠 30 只,随机均等分为假手术组、模型组、葛根素预处理组。采用线栓法阻断大鼠大脑中动脉血供 60 min 后拔出栓线造成局部脑缺血再灌注损伤。葛根素预处理组在缺血前 1 h 腹腔注射葛根素(100 mg/kg)。脑缺血再灌注后第 5 天,HE 染色法观察海马 CA1 区神经元的组织形态学变化,免疫组化法检测海马 CA1 区半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) 的表达。结果 HE 染色结果显示,与模型组相比较,葛根素预处理明显减少脑缺血再灌注引起的海马 CA1 区神经元损伤 ($P < 0.05$);免疫组化结果显示,与模型组相比,葛根素预处理使海马 CA1 区 Caspase-3、Caspase-9 的表达明显降低 ($P < 0.05$)。结论 缺血前 1 h 葛根素预处理对局灶性脑缺血大鼠海马 CA1 区神经元损伤有保护作用,其主要机制可能与抑制凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 的表达有关。
关键词 葛根素;缺血再灌注损伤;神经保护;Caspase-3;Caspase-9

中图分类号 R 33-33; R 932

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0723-04

葛根素,一种异黄酮单体,是从中国传统中药葛根中提取出来的有效成分。研究^[1]显示葛根素有改善微循环、抗氧化、清除自由基等多种药理学作用,在临床心脑血管疾病的治疗中应用广泛,但其作用机制目前还没有完全清楚。脑缺血再灌注损伤是临床上常见的病理现象,严重危害患者的神经系统功能;在缺血前进行预处理可以改善缺血性脑损伤,减少细胞的凋亡及坏死^[2]。细胞凋亡是脑缺血再灌注损伤的重要机制,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶水解酶(Caspase)家族在介导细胞凋亡的过程中发挥着

非常重要的作用,其中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 为凋亡的最终执行分子,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) 是内源性凋亡途径的重要启动酶^[3-4]。该实验采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究葛根素预处理对海马 CA1 区神经元损伤及对促凋亡基因 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响;以期能够对葛根素的神经保护作用进行初步探讨,从而为临床上缺血性脑损伤方面疾病的治疗提供一定的理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 30 只,220 ~ 250 g,清洁级,购自安徽医科大学实验动物中心。大鼠在使用过程中严格遵循安徽省实验动物管理条例,并且尽可能减少大鼠的痛苦及使用数量。

1.1.2 主要试剂和仪器 葛根素注射液购自陕西安康正大制药厂;兔抗鼠 Caspase-3、Caspase-9 多克隆抗体均购自武汉博士德公司;德国徕卡石蜡切片机购自湖北徕克医疗仪器有限公司;光学显微镜及其拍照分析系统购自日本尼康公司;MCAO 栓线购自北京沙东生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与处理 雄性 SD 大鼠随机均等分为假手术组、模型组、葛根素预处理组。假手术组大鼠只分离血管,不插入栓线;采用线栓法将模型组大鼠制备成大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 的脑缺血动物模型,60 min 后拔出栓线从而实现再灌注;葛根素预处理组大鼠在缺血前 1 h 腹腔注射葛根素注射液(100 mg/kg)。

1.2.2 局灶性脑缺血模型的制备 大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射(300 mg/kg)麻醉后,取仰卧位固定于手术台上,颈部正中切口,仔细分离右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉,结扎颈外动脉。在颈总动脉上剪一 V 字形小口,插入直径为 0.26 mm 的 MCAO 栓线,从颈总动脉分叉处进入颈内动脉,轻柔地插入至有轻微阻力时停止(自分叉处约 20 mm),

2015-02-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30900420);安徽医科大学校科学研究基金(编号:2012xkj007)

作者单位:安徽医科大学基础医学院¹ 生理学教研室、² 综合实验室,合肥 230032

作者简介:尹雪莉,女,博士研究生,实验师;

李 珍,女,副教授,责任作者, E-mail:lizhen50@sina.com

此时大脑中动脉的所有血供均被栓线阻断。60 min 后,将栓线拔出,实现缺血再灌注。在实验过程中通过使用取暖电毯使大鼠体温保持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。拔出栓线实现再灌注后 24 h,采用改良的 Bederson 方法^[5]对大鼠进行神经功能评分,只有评分 > 1 分且取脑时脑底无凝血块,动脉环无血栓形成,排除蛛网膜下隙出血和继发性血栓形成的大鼠才可入选后继的实验。

1.2.3 标本处理及 HE 染色 在脑缺血再灌注后第 5 天,用 10% 水合氯醛腹腔注射将大鼠麻醉,经心脏灌注 4% 多聚甲醛固定至大鼠四肢及头颈部僵硬,断头取脑后,将脑组织放入 4% 多聚甲醛中于冰箱中 4°C 过夜。用刀片截取视交叉至大脑横裂的部分,石蜡包埋后常规切片,片厚为 $4\ \mu\text{m}$ 。脱蜡至水后进行 HE 染色,显微镜下仔细观察海马 CA1 区神经元的形态学改变。每个标本取 5 张切片,每张切片选取 6 个高倍视野,取平均值。

1.2.4 免疫组织化学法检测凋亡调控因子 Caspase-3、Caspase-9 的表达 取上述石蜡标本,在切片机上连续冠状切片各 3 张,应用免疫组织化学 SP 法染色及 DAB 显色法显色,具体过程严格按照说明书进行操作。每张切片随机选取高倍镜下大鼠缺血侧海马 CA1 区 5 个不重叠的视野,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统对实验结果进行定量分析,测定平均光密度(mean optical density, MOD)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 葛根素预处理对大鼠神经功能评分的影响

模型组和葛根素预处理组共有 20 只大鼠,在造模过程中有 2 只栓线没有成功插入颈内动脉,1 只麻醉意外死亡,实际观察 17 只大鼠;有 16 只大鼠出现神经功能障碍的症状,模型成功率为 80%。与假手术组比较,模型组神经学评分明显升高($P < 0.05$),平均为 (2.8 ± 0.3) 分;而在缺血前 1 h 进行葛根素预处理可明显改善大鼠的神经行为学障碍,神经学评分明显降低($P < 0.05$),平均为 (1.6 ± 0.25) 分。见图 1。

2.2 葛根素预处理对大鼠海马 CA1 区神经元损伤的影响 HE 染色结果显示,假手术组大鼠海马 CA1 区神经元排列整齐,细胞形态完整,胞核大而圆,核仁清晰可见;模型组大鼠缺血侧海马 CA1 区锥体细胞出现胞体变小、细胞质浓缩、核固缩深染、

大片坏死灶等变化,存活的锥体细胞计数明显少于假手术组($P < 0.05$);葛根素预处理可改善缺血引起的神经元坏死,海马 CA1 区存活的锥体细胞计数明显多于模型组($P < 0.05$),见图 2。

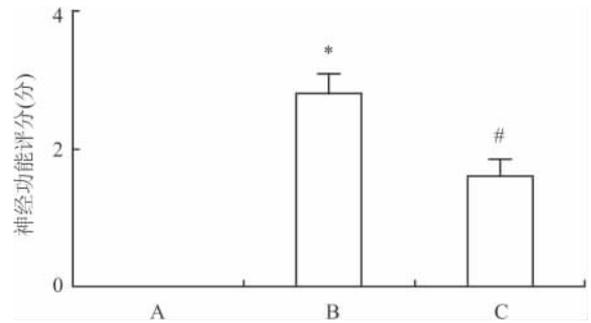


图1 葛根素预处理对 MCAO 大鼠神经功能评分的影响
A:假手术组;B:模型组;C:葛根素预处理组;与假手术组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

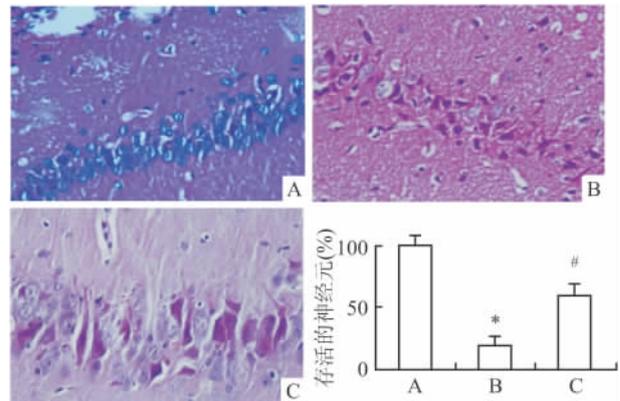


图2 葛根素预处理对 MCAO 大鼠海马 CA1 区神经元形态学变化的影响 HE $\times 400$
A:假手术组;B:模型组;C:葛根素预处理组;与假手术组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

2.3 葛根素预处理对大鼠海马 CA1 区 Caspase-3 表达的影响 免疫组织化学法结果显示, Caspase-3 蛋白的阳性细胞染色以细胞质有棕黄色颗粒沉积为主,并可清晰地显示细胞轮廓。假手术组大鼠海马 CA1 区仅见极少数呈点状分布的 Caspase-3 蛋白的阳性染色细胞质。与假手术组比较,模型组海马 CA1 区 Caspase-3 表达显著性增高($P < 0.05$),染色呈棕黄色或深褐色;而在缺血前 1 h 进行葛根素预处理的大鼠,海马 CA1 区 Caspase-3 表达明显减少($P < 0.05$),见图 3。

2.4 葛根素预处理对大鼠海马 CA1 区 Caspase-9 表达的影响 Caspase-9 阳性染色呈棕黄色的细颗粒沉积,在神经元细胞质和胞核内均可见阳性着色。

各组大鼠海马免疫组织化学结果显示,假手术组海马 CA1 区 Caspase-9 蛋白表达较少。脑缺血再灌注后第 5 天,与假手术组比较,模型组大鼠的海马 CA1 区 Caspase-9 阳性细胞数量明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,缺血前 1 h 进行葛根素预处理使大鼠海马 CA1 区 Caspase-9 的表达明显减少 ($P < 0.05$),见图 4。

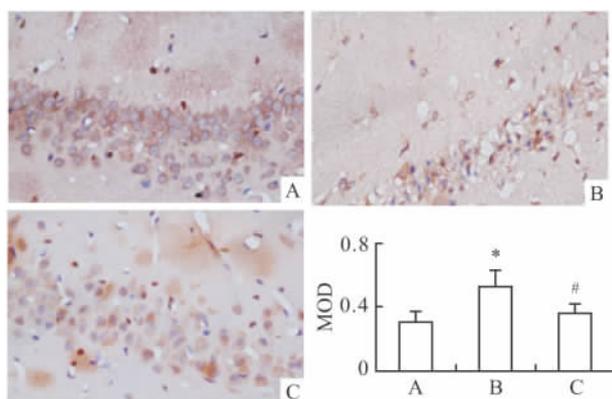


图3 葛根素预处理对 MCAO 大鼠海马 CA1 区 Caspase-3 表达的影响 免疫组化 $\times 400$

A:假手术组;B:模型组;C:葛根素预处理组;与假手术组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

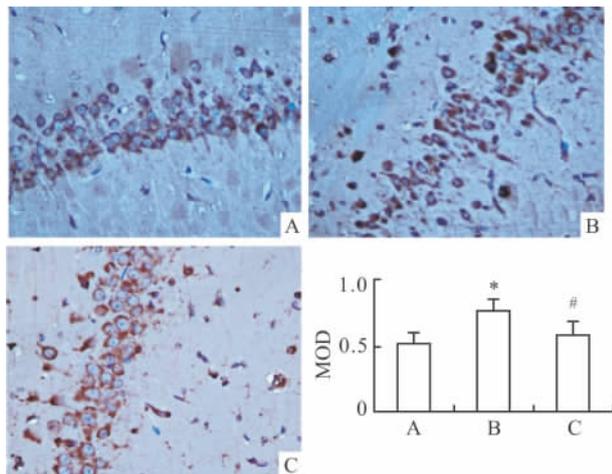


图4 葛根素预处理对 MCAO 大鼠海马 CA1 区 Caspase-9 表达的影响 免疫组化 $\times 400$

A:假手术组;B:模型组;C:葛根素预处理组;与假手术组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

海马是人类与学习记忆关系比较紧密的脑区,接受来自于大脑中动脉的血供。研究^[6-7]表明,海马 CA1 区对脑缺血更加敏感。本研究通过制备局灶性脑缺血再灌注大鼠模型模拟临床上局部短暂性

脑缺血,表明在缺血前 1 h 进行葛根素预处理,不仅可以使大鼠的神经功能评分显著降低,还可以损伤脑缺血再灌注导致的海马 CA1 区神经元,说明葛根素预处理对缺血性脑损伤有神经保护作用。

脑缺血再灌注损伤时细胞内 Ca^{2+} 超载、兴奋性氨基酸释放增多等^[8],从而启动凋亡相关蛋白的表达,诱导凋亡信号转导通路,进一步导致神经元的凋亡。张茹等^[9]发现,葛根素可以减轻脑缺血大鼠神经元 Ca^{2+} 超载,减少脑梗死体积,发挥神经保护作用。Caspases 成员是细胞凋亡的启动子,在细胞凋亡过程中发挥重要的作用^[10],凋亡的最终实施是通过激活 Caspases 实现的。近年来的研究^[11]表明,Caspase-9 及 Caspase-3 均参与了脑缺血后神经元损伤的病理生理过程,Caspase-9 活化后导致下游 Caspase-3 活化,进而破坏细胞的基本结构和重要蛋白,导致凋亡小体的产生。Caspase-3 的激活是缺血性神经元凋亡的关键因素,是神经细胞凋亡的最终执行者^[12]。活化后的 Caspase-3 再进一步切割蛋白质底物,裂解 DNA 依赖性的蛋白激酶,使细胞丧失其修复功能,从而导致细胞凋亡^[13]。研究^[14]表明,脑缺血时海马 CA1 区 Caspase-3、Caspase-9 的表达均上调。本实验结果表明,局灶性脑缺血所导致对缺血特别敏感的海马 CA1 区 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达增加显著,提示促凋亡蛋白 Caspase-3 及 Caspase-9 与缺血性神经元凋亡密切相关。实验显示,在缺血前 1 h 葛根素预处理从而使缺血大鼠海马 CA1 区 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达显著降低,与研究^[15]结果一致。

综上所述,本研究表明葛根素预处理对局灶性脑缺血再灌注导致的大鼠海马 CA1 区神经元损伤的神经有保护作用,可能是通过抑制神经细胞内 Ca^{2+} 超载,对缺血引起的海马 CA1 区 Caspase-3 及 Caspase-9 过度的表达起抑制作用,从而改善脑缺血状态,减轻神经元损伤。

参考文献

- [1] 于继强,高尔.葛根素对心脑血管系统药理作用研究进展[J].现代中西医结合杂志,2008,17(24):3880-2.
- [2] Gross G J, Fryer R M. Mitochondrial $K(ATP)$ channels: triggers or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? [J]. Circ Res 2000, 87(6):431-3.
- [3] Vaibhav K, Shrivastava P, Khan A, et al. Azadirachta indica mitigates behavioral impairments, oxidative damage, histological alterations and apoptosis in focal cerebral ischemia-reperfusion model of rats [J]. Neurol Sci 2013, 34(8):1321-30.

- [4] Yaguchi T ,Fujikawa H ,Nishizaki T. Linoleic acid derivative DCP-LA protects neurons from oxidative stress-induced apoptosis by inhibiting caspase-3/9 activation [J]. *Neurochem Res* ,2010 ,35 (5) :712 -7.
- [5] Bederson J B ,Pitts L H ,Tsuji M ,et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke* ,1986 ,17(3) :472 -6.
- [6] Li Z ,Pang L ,Fang F ,et al. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia *via* up-regulation of hippocampal Bcl-2 [J]. *Brain Res* 2012 ,1450:116 -24.
- [7] 邱季,方芳,李珍,等. ERK-CREB 信号通路在白藜芦醇预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤神经保护中的作用 [J]. *安徽医科大学学报* ,2013 ,48(10) :1152 -5.
- [8] Turley K R ,Toledo-Pereyra L H ,Kothari R U. Molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke [J]. *J Invest Surg* ,2005 ,18(4) :207 -18.
- [9] 张茹,郭荷娜,吴海琴,等. 葛根素对大鼠局灶性脑缺血后钙超载的保护作用 [J]. *南方医科大学学报* ,2010 ,30(6) :1268 -71.
- [10] Stepień A ,Izdebska M ,Grzanka A. The types of cell death [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* ,2007 ,61:420 -8.
- [11] 赵玉祥,刘家浩. 胱冬酶抑制剂与脑缺血 [J]. *国外医学脑血管病分册* ,2004 ,12(7) :544 -7.
- [12] 李琴,郭云良,李震,等. 胡黄连苷 II 对大鼠脑缺血/再灌注损伤 Caspase-3 和 PARP 表达的影响 [J]. *中国药理学通报* ,2010 ,26(3) :342 -5.
- [13] Wellington C L ,Hayden M R. Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches [J]. *Clin Genet* ,2000 ,57(1) :1 -10.
- [14] Ding Z M ,Wu B ,Zhang W Q ,et al. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis [J]. *Int J Mol Sci* ,2012 ,13 (5) :6089 -101.
- [15] Wang N ,Zhang Y ,Wu L ,et al. Puerarin protected the brain from cerebral ischemia injury *via* astrocyte apoptosis inhibition [J]. *Neuropharmacology* 2014 ,79:282 -9.

Effects and related mechanisms of preconditioning with puerarin on hippocampus CA1 region neuronal injury after focal cerebral ischemia-reperfusion

Yin Xueli¹ , Gui Li² , Li Zhen¹

(¹Dept of Physiology ,²Dept of Integrated Laboratory , School of Basic Medical Science , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the effect of puerarin preconditioning on hippocampal CA1 region neuronal injury and further explore its mechanisms. **Methods** 30 male Sprague-Dawley rats were randomly assigned into sham , model , and puerarin preconditioning ischemia-reperfusion groups. The middle cerebral artery was occluded for 60 min by an intraluminal filament before reperfusion to induce transient focal cerebral ischemia reperfusion rats. Puerarin preconditioning groups rats received puerarin (100 mg/kg , i. p) 1 h before ischemia. The histological changes of hippocampal CA1 region neurons were measured by HE staining on the 5th day after reperfusion. The expressions of Caspase-3 and Caspase-9 proteins in the CA1 region were examined by immunohistochemistry staining. **Results** The results of HE staining showed that , compared with the model group , puerarin preconditioning significantly reduced the number of cerebral ischemia induced injury of hippocampal CA1 region neurons ($P < 0.05$). Immunohistochemistry data showed that the expressions of Caspase-3 and Caspase-9 in the hippocampal CA1 region of puerarin preconditioning group were significantly lower than that of model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The results indicate that puerarin preconditioning 1 h before ischemia exerts neuroprotective effects on focal cerebral ischemia-reperfusion induced neuronal injury. The neuroprotective mechanisms of puerarin may attribute to inhibiting the expressions of Caspase-3 and Caspase-9 protein.

Key words puerarin; ischemia-reperfusion injury; neuroprotection; Caspase-3; Caspase-9