

三七三醇皂苷、硫酸镁联用对大鼠局灶脑缺血后梗死体积、细胞凋亡及 caspase - 3 mRNA 表达的影响

汪公财 汪敏捷 汪婕芳

(浙江省淳安县第二人民医院·淳安 311719)

摘要 目的:研究三七三醇皂苷(PTS)、硫酸镁联用对局灶脑缺血大鼠的神经保护作用。方法:用大脑中动脉栓塞法制作局灶脑缺血模型,观察三七三醇皂苷、硫酸镁单用及联用 7 天后,大鼠神经功能缺损、脑梗死体积、凋亡细胞数及 caspase - 3 mRNA 的表达。结果:与模型组相比,三七三醇皂苷、硫酸镁单用及两药联用组脑梗死体积减小,caspase - 3 mRNA 表达、凋亡细胞数均减少,差异有显著性($P < 0.05$)。两药联用组脑梗死体积、caspase - 3 mRNA 表达、凋亡细胞数较两药单用组减少($P < 0.05$)。三七三醇皂苷组与硫酸镁组相比各项指标均无显著差异($P > 0.05$)。结论:三七三醇皂苷与硫酸镁联用对局灶脑缺血的神经保护有协同作用。

关键词 脑缺血/中医药疗法 三七三醇皂苷/治疗应用 硫酸镁/治疗应用 细胞凋亡 基因表达 大鼠

脑缺血所激发的一系列级联反应和多重病理机制介导了缺血半暗带从潜在可逆性缺血逐渐向不可逆性损伤的进展。缺血后的级联反应决定了神经元的命运,主要涉及氧自由基的产生、兴奋性氨基酸的毒性作用、细胞内钙超载、能量代谢障碍及炎症介质释放等。目前单一神经保护剂在动物模型上有效,而在临床效果不佳。由于缺血性脑损伤是一系列复杂、多因素过程,针对任何单一环节的神经保护治疗不可能完全、有效地阻断缺血性脑损伤的级联反应,因此研究联合应用于脑缺血不同损伤机制的药物能否达到协同作用,有效地抑制级联反应似在情理之中。近年来,中药在脑缺血治疗中的作用逐渐得到重视,已经证实三七三醇皂苷(PTS)和硫酸镁对局灶性脑缺血有神经保护作用,且作用于不同的级联反应环节。本研究观察 PTS、硫酸镁联用对脑梗死体积、凋亡细胞及 Caspase - 3 mRNA 的影响,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与药品 红四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC);中国医药集团上海化学试剂公司。细胞凋亡检测试剂盒:Booster 生物工程技术公司;caspase - 3 mRNA 原位杂交试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司。三七三醇皂苷:成都华神集团股份有限公司制药厂;硫酸镁:杭州民生药业有限公司。

1.2 动物模型建立与分组给药 雄性 SD 大鼠 90 只,体重(260 ± 10)g,浙江中医药大学实验动物中心提供。7%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,采用 Longa^[1]线栓法阻塞大鼠大脑中动脉,建立急性局部脑缺血模型,模型以麻醉清醒后评分 2 分或 2 分以上为制作成功。1.5 小时后,将尼龙线轻柔拉回至颈外动脉处,即为再灌注开始。将尼龙线仅留在颈内动脉而不入颅,1.5 小时后,将尼龙线拉回至颈外动脉处,为假手术组。假手术组 10 只,其余 80 只随机分 4 组,模型组

(0.9%氯化钠 1ml/kg · d⁻¹)、硫酸镁组(90mg/kg · d⁻¹)、PTS 组(50mg/kg · d⁻¹)、两药联用组(硫酸镁 90mg/kg · d⁻¹,PTS 50mg/kg · d⁻¹),每组 20 只,其中一半用于测定脑梗死体积。造模成功后硫酸镁组每天静脉注射 1 次,PTS 组 and 对照组每天两次灌胃,连续 7 天。

1.3 观察指标测定

1.3.1 脑梗死体积测定 治疗 7 天后断头取脑,冷冻后等分切成 2mm 厚脑片,浸入 37℃ TTC 生理盐水中染色 30 分钟。染色后将脑片浸入 4% 中性多聚甲醛固定保存,拍照后用 Ulead photo Express 2.0 图象分析软件进行脑梗死轮廓勾画,法医损伤测量软件测量脑缺血面积,计算脑梗死体积百分比。

1.3.2 神经功能缺损评分 治疗 7 天后,处死前采用 Bedersons^[2]神经功能评分法进行神经功能缺损评分。

1.3.3 caspase - 3 mRNA、细胞凋亡的检测 原位杂交及 TUNEL 法检测。治疗 7 天后,麻醉大鼠固定取材。原位杂交按试剂盒提供的步骤进行,DAB 显色,细胞浆着棕黄色者为 caspase - 3 mRNA 阳性细胞。TUNEL 法检测按试剂盒提供的步骤进行,苏木精轻度复染,细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞,即凋亡细胞。每只大鼠均取 3 张切片,在每张脑切片的缺血梗死部边缘随机选取 5 个高倍镜(400 倍)不重叠视野,在图像分析仪下,计数阳性细胞数。

1.4 统计方法 所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。用 SPSS10.0 统计软件进行统计处理,对所有结果进行正态性及方差齐性检验后,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠脑梗死体积与神经功能评分的比较 见表 1。

2.2 各组大鼠脑组织 caspase - 3 mRNA 表达及细胞凋亡数的比较 见表 2。

表 1 各组大鼠神经功能评分和脑梗死体积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经功能评分 (分)	脑梗死体积 (%)
模型组	10	5.4 ± 1.09	33.66 ± 3.8
PTS 组	10	4.1 ± 1.13*	28.76 ± 3.3*
硫酸镁组	10	3.7 ± 0.99*	29.86 ± 2.9*
两药联用组	10	2.9 ± 0.64 Δ	21.83 ± 3.89 Δ

与模型组比较 *P < 0.05; 与 PTS 组、硫酸镁组比较 Δ P < 0.05

表 2 各组大鼠脑组织 caspase-3 mRNA 表达及细胞凋亡数测定($\bar{x} \pm s$)

组别	n	caspase-3 mRNA	凋亡细胞(个/视野)
模型组	10	82.37 ± 9.11	4.89 ± 1.31
PTS 组	10	64.72 ± 11.23*	3.21 ± 0.71*
硫酸镁组	10	68.25 ± 11.65*	3.17 ± 0.86*
两药联用组	10	53.96 ± 6.52 Δ	2.13 ± 0.62 Δ

与模型组比较 *P < 0.05; 与 PTS 组、硫酸镁组比较 Δ P < 0.05

3 讨论

在缺血性脑损伤的保护治疗中,近年来主要是针对缺血后级联反应的单一环节干预治疗,其在动物模型中有效,而在临床中无效或效果不佳,联合应用于作用于脑缺血损伤级联反应不同环节的神经保护剂是否能有效地阻断级联反应,达到比任何单一神经保护剂更好的脑保护作用,许多学者进行了研究。Lyden^[3]等应用大鼠局灶性脑缺血模型,分别在缺血后 30、60、75、120、240、360 分钟给予 GABA 激动剂 muscimol、NMDA 受体拮抗剂 MK801 及二者联合应用,结果表明二者联合应用效果明显优于单独用药。Banh^[4]等利用大鼠海马切片培养,造成缺氧、缺糖环境,联合应用 bFGF 与 MK801,观察它们对神经元的保护作用,证实 bFGF 加强 MK801 的保护作用。Liniger^[5]等研究也证实无论是低浓度还是高浓度的 MK801 与其他类型的神经保护剂联合应用,保护作用均增强,具有协同作用。而小剂量应用可有效减轻毒副作用,避免因副作用而限制药物应用。因此认为联合用药将为脑缺血的治疗提供新途径。另外联合用药可减少单一药物的有效剂量,降低与药物剂量相关的毒副作用。

三七是传统中药之一,PTS 是三七中提取的主要活性成份,其中人参皂苷 Rg1 的含量达 60% 以上,Rg1、R1、Rc 三者的含量约达 80%。研究表明三七皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用^[7]。现代药理研究证实具有抗自由基作用,同时还具有抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环及抗炎等作用^[8]。有报道三七皂苷对缺血再灌注损伤还有减轻钙超载,减轻脑水肿、促进再灌注时的神经修复、减轻超微结构损伤和降低缺血再灌注期间死亡率等作用^[9]。镁离子的神经保护是通过其生理钙阻滞作用而起效的,镁离子还可能通过抗兴奋性作用、血管舒张、降低半暗带谷氨酸和乳酸浓度保护细胞的能量代谢而起神经保护作用^[10]。PTS 与硫酸镁两药作用于级联反应的不同环节。

caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶,正常情况下 caspase-3 以无活性的酶原形式存在,只有当细胞凋亡时才被激活。caspase 参与了缺血性脑损伤过程,使用

caspase 抑制剂可缩小大鼠的脑梗死体积,改善神经功能缺损,有利于脑组织的恢复^[11]。既往研究显示,脑动脉梗死后不久便在梗死区神经细胞的胞浆与胞核中发现激活的 caspase-3,可能与脑梗死后细胞内钙超载所介导的细胞毒性和死亡有一定的关系^[12]。

本研究结果显示,大鼠局灶脑缺血再灌注 7 天后,单用 PTS、硫酸镁均使大鼠局灶脑缺血后脑梗死体积明显缩小,神经功能缺损评分、caspase-3 mRNA 表达、神经细胞凋亡减少,但两组相比无统计学意义(P > 0.05)。这一结果与国内外研究相似^[6,10]。两药联用组分别与单药组相比脑梗死体积减小,神经功能恢复较好,caspase-3 mRNA 表达、细胞凋亡数均较少,差异有显著性(P < 0.05)。表明 PTS 与硫酸镁联用对神经的保护作用可能有协同作用。本研究提示多种不同类型脑保护剂联合治疗,可能通过不同途径相互增强神经保护作用,从而更好地阻止脑缺血损害的发展。

参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84.
- [2] Bederson, Pitts, Tsuji, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17: 472.
- [3] Lyden PD, Jackson FC, Shin C, et al. Synergistic combinatorial stroke therapy: A quantal bioassay of a GABA agonist and a glutamate antagonist. *Exp Neurol*, 2000, 163(2): 477.
- [4] Barth A, Barth L, Morrison RS, et al. bFGF enhances the protective effect of MK-801 against ischemic neuronal injury in vitro. *Neuro Report*, 1996, 7(9): 1461.
- [5] Liniger R, Popovic R, Sullivan B, et al. Effect of neuroprotective cocktails on hippocampal neuron death in an in vitro model of cerebral ischemia. *Neurosurg Anesthesiol*, 2001, 13(1): 19.
- [6] 胡晓松, 周东, 周德明. 三七皂苷对脑缺血再灌注大鼠的保护作用. *中风与神经疾病杂志*, 2004, 21(4): 354.
- [7] 严永兴, 梁丽贞, 周智林, 等. 三七皂苷对大鼠局灶脑缺血后梗死体积、细胞凋亡及 caspase-3 mRNA 表达的影响. *中国中医药科技*, 2010, 17(3): 211.
- [8] 侯安会. 三七的临床运用和实验研究概要. *中医药信息*, 1999, 6(1): 21.
- [9] 张英鸽, 刘天培. 人参皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 1994, 8(1): 12.
- [10] Westermaier T, Hungerhuber E, Zausinger S, et al. Neuroprotective efficacy of intra-arterial and intravenous magnesium sulfate in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir (Wien)*, 2003, 145: 393.
- [11] Endres M, Namura S, Shimizu - Sasamata M, et al. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(3): 238.
- [12] Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*, 2002, 115(1): 125.

(修回: 2010-07-10)