

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

严永兴 梁丽贞 周智林 陈 涛 李 鹏 吴春丽 刘慧丽

(杭州市第三人民医院·杭州 310009)

**摘 要** 目的:探讨三七三醇皂苷(PTS)对局灶脑缺血大鼠的神经保护作用。方法:采用大脑中动脉栓塞法制作局灶脑缺血模型,观察三七三醇皂苷治疗 7 天后,大鼠神经功能缺损、脑梗死体积、凋亡细胞数(TUNEL 法)及 caspase-3mRNA(原位杂交)表达。结果:与模型组相比,PTS 组脑梗死体积较小,caspase-3mRNA 表达、凋亡细胞数均较少,差异有显著性( $P < 0.05$ )。结论:PTS 可抑制大鼠脑缺血再灌注后 caspase-3mRNA 表达及细胞凋亡,从而起到脑保护作用。

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

三七为五加科人参属植物三七的干燥根,具有散瘀止血、消肿镇痛的功效。已经报道其有效成份有抗血栓形成和抗神经细胞凋亡作用<sup>[1,2]</sup>;三七三醇皂苷(PTS)其主要活性成份 Rg1 的含量达 60% 以上,Rg1、R1、Re 三者的含量约达 80%。本研究欲通过动物实验,研究三七三醇皂苷对脑缺血的脑保护作用,并探讨其作用机理,为三七三醇皂苷在缺血性脑血管病中的临床应用奠定理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 三七三醇皂苷:成都华神集团股份有限公司制药厂。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-3mRNA 原位杂交试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司。动物:雄性 SD 大鼠 60 只,体重(260±10)g,由浙江中医药大学实验动物中心提供。

**1.2 动物模型建立及分组** 60 只大鼠 7% 水合氯醛腹腔注射麻醉,采用 Longa<sup>[3]</sup> 线栓法阻塞大鼠大脑中动脉,建立急性局灶脑缺血模型。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。造模后大鼠随机分为假手术组、模型对照组(0.9%氯化钠 1ml/kg·d<sup>-1</sup>)、PTS 组(PTS 50mg/kg·d<sup>-1</sup> 分两次灌胃),每组各 20 只,造模成功后 PTS 组和对照组每天灌胃两次,连续 7 天。

**1.3 神经功能缺损评分** 治疗 7 天后,处死前采用 Bederson<sup>[4]</sup> 神经功能评分法。大鼠无任何不对称活动为 0 分;提起尾巴时左前爪不能完全伸展为 1 分;在 1 分的基础上左前肢活动障碍为 2 分;左前肢紧贴胸壁为 3 分;大鼠自由活动向左侧转弯为 4 分;伴有明显的左前爪后推动作为 5 分;只能围绕原点旋转为 6 分;左侧肢体完全不能支撑身体,只能躺向左侧为 7 分。动物清醒 2 小时后进行筛选,0 分者剔除。

**1.4 脑梗死体积测定** 治疗 7 天后每组一半大鼠断头取

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梗死面积,算出每个大脑梗死体积百分比。

**1.5 caspase-3 mRNA 及细胞凋亡检测** 治疗 7 天后每组余下一半大鼠麻醉固定取材。原位杂交检测 caspase-3mRNA 及 TUNEL 法检测细胞凋亡。

**1.6 图象采集和图象分析** 每只大鼠均取 3 张切片,在每张脑切片的缺血梗死部边缘(假手术组大鼠脑切片在假手术侧部分)随机选取 5 个高倍镜(400 倍)不重叠视野,在图象分析仪下,计数阳性细胞数。

**1.7 统计方法** 所有数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示。用 SPSS 10.0 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, $P < 0.05$  为有显著差异。

## 2 结果 见表 1。

表 1 各组大鼠脑梗死体积、神经功能评分、caspase-3mRNA 阳性细胞、细胞凋亡数的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 脑梗死体积 (%)              | 神经功能评分 (分)            | caspase-3mRNA (%)       | 凋亡细胞数 (%)               |
|-------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组  | 0                      | 0                     | 6.9±1.01                | 0.85±0.35               |
| 模型组   | 35.98±4.6              | 5.5±1.08              | 82.68±7.3 <sup>▲▲</sup> | 4.02±1.03 <sup>▲▲</sup> |
| PTS 组 | 27.86±4.5 <sup>*</sup> | 3.8±0.86 <sup>*</sup> | 65.27±9.1 <sup>▲▲</sup> | 3.05±0.73 <sup>▲▲</sup> |

与模型组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与假手术组比较<sup>▲▲</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>▲▲▲</sup>  $P < 0.01$

**3 讨论** TTC 与完整的线粒体氧化酶系反应,诱发生成深红色、光酶脂溶性的 Formazan 而使正常组织染色,缺血组织的线粒体损伤,不能诱导染色反应而呈白色<sup>[5]</sup>。本实验采用目前已被国内外学者普遍采用的 TTC 作为梗死区域的检测标记<sup>[6]</sup>,观察的脑梗死灶呈苍白色,与 MCA 支配的脑区域一致,未缺血部分呈红色,证实模型制作成功。根据对梗死体积测定的结果发现,PTS 组较模型组梗死范围均有明显减小,差异有显著性( $P < 0.05$ ),表明三七三醇皂苷对大鼠局灶

性脑缺血有显著的保护作用。

缺血后神经元死亡主要表现为坏死和凋亡两种形式,在脑缺血急性期神经元坏死与凋亡并存。细胞坏死位于缺血中心区,细胞凋亡主要出现在缺血半暗带,而在脑缺血的迟发性神经元死亡期,则以细胞凋亡为主,凋亡决定了最终梗死体积<sup>[7]</sup>。目前凋亡相关基因和蛋白的研究也日趋深入。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-3 参与了缺血性脑损伤过程,使用 caspase-3 抑制剂可缩小大鼠脑梗死体积,改善神经功能缺损,有利于脑组织的恢复<sup>[8]</sup>。有研究显示,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<sup>[9]</sup>。本实验发现与模型组相比,PTS 治疗组 caspase-3 mRNA 表达、细胞凋亡数减少,差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

动物实验表明,脑缺血治疗窗可分为再灌注窗和脑细胞保护窗,在细胞保护窗期间脑保护剂的应用可防止损伤和已发生损伤的神经元的体积扩大,一般认为细胞保护窗约为 1.5~3 小时,本文选择再灌注后 1.5 小时给药,研究结果显示,大鼠局灶脑缺血再灌注后三七三醇皂苷治疗 7 天,可有效减小脑梗死体积,减少 caspase-3 mRNA 表达及神经细胞凋亡数目,且 caspase-3 mRNA、凋亡细胞数均和脑梗死体积呈正相关。因此推测,PTS 减小脑梗死体积、发挥脑保护作用的机制可能与减少 caspase-3 mRNA 表达及减少细胞凋亡,促使神经功能恢复等因素有关。

## 参考文献

- 李君庆,张香阁,张均田.人参皂苷 Rg1 抗神经细胞凋亡作用机制的研究.药理学,1997,32(6):406.
- 徐陪亮,刘宛斌,饶曼人.三七皂苷 Rg1 对实验性血栓形成的影响及其机制探讨.药理学,1997,32(7):502.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20:84.
- Bederson, Pitts, Taji, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, 1986, 17:472.
- Formazan K, Puschmann S, Schaper J, et al. The mechanism of the Tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. Virchows Arch, 1981, 393:287.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke, 1986, 17(6): 1304.
- Hsu CY, An G, Liu JS, et al. Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat. Stroke, 1993, 24(Suppl 1):78.
- Endres M, Namura S, Shimizu S, 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.
- 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.

(收稿:2009-05-04)

## 维尔迈冲剂对静脉血栓形成大鼠 P-选择素的影响

郭伟光 回雪颖 孙木华 王景王 奥 (黑龙江中医药大学第二附属医院·哈尔滨 150001)

**1 实验材料** 动物:Wistar 大鼠 48 只,12 周龄,雌雄各半,体重 200~250g,清洁级,购自哈尔滨医科大学实验动物中心。药物:维尔迈冲剂,黑龙江中医药大学附属医院制剂室生产,药物组成:黄芪、黄柏、苍术、猪苓、牛膝、党参、土茯苓、王不留行、大黄、水蛭等。通塞脉片,江苏南星药业有限公司生产。主要试剂及仪器:PV-6001 兔二步法检测试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司。BH-2 型显微镜,OLYMPUS,日本。病理彩色图像分析仪,Media Cybernetics USA。

## 2 实验方法

将 48 只大鼠随机分为 6 组(见表 1),每组 8 只,均在造模前给灌胃给药每日 1 次。10 天(剂量见表 1)。最后 1 次灌胃后 2 小时,采用下腔静脉结扎法<sup>[1]</sup>造模。

采用免疫组织化学方法检测血管内皮 P-选择素蛋白表达。

## 3 结果 见表 1。

**4 讨论** 血小板膜表面的 P-选择素可作为判断血小板活化的直接标志,因为 P-选择素只存在于活化血小板的表面。血小板活化在血栓形成过程中起重要作用。研究发现,深静脉血栓时 P-选择素增高,后者可能反应了体内存在高凝状态,认为 P-选择素是静脉血栓形成的重要标志<sup>[2]</sup>。维尔迈冲剂是导师多年临床经验的总结,由黄芪、黄柏、苍术、猪苓、牛膝、党参、土茯苓、王不留行、大黄、水蛭等药物组成,具有祛瘀生新、扶正利湿、活血通络的作用。本实验结果表明,

表 1 各组大鼠血管内皮 P-选择素蛋白表达情况( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n | 剂量<br>(g/100g) | P-选择素             |
|---------|---|----------------|-------------------|
| 正常组     | 8 | —              | 0.2458 ± 0.051    |
| 模型组     | 8 | —              | 0.6183 ± 0.148★   |
| 通塞脉片组   | 8 | 0.057          | 0.4129 ± 0.111★▲  |
| 维尔迈高剂量组 | 8 | 2.16           | 0.3424 ± 0.134★▲▲ |
| 维尔迈中剂量组 | 8 | 1.08           | 0.3685 ± 0.114★▲▲ |
| 维尔迈低剂量组 | 8 | 0.54           | 0.3811 ± 0.139★▲▲ |

与正常组比较★ $P < 0.05$ ;与模型组比较▲ $P < 0.05$ ;与通塞脉片组比较△ $P < 0.05$

维尔迈冲剂能够抑制 P-选择素的表达,作于优于通塞脉片,提示维尔迈冲剂有很好的抗血栓作用,为临床用药提供了理论依据。

## 参考文献

- 赛力克·马高维亚,王护国,罗军,等.一种适合动态研究的大鼠深静脉血栓动物模型.中国普外基础与临床杂志,2008,15(5): 408.
- Myers DD, Hawley AE, Farris DM, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. J Vasc Surg, 2003, 38(5):1075.

(修回:2009-12-05)