

· 方药研究 ·

三七三醇皂苷对局灶脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积
及 caspase - 3 表达的影响Effects of PTS on Infarct Volume and the Expression of Caspase - 3 in Rat
with Focal Cerebral Ischemia - reperfusion

张利军, 白宇, 侯郁青, 陆蕴菊, 张曦华

(上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062)

[摘要] 目的:通过对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经行为学、脑梗死体积、caspase - 3 表达的观察,探讨三七三醇皂苷(PTS)对大鼠局灶性脑缺血再灌注后的保护作用。方法:采用改良的线栓法制备大鼠短暂性大脑中动脉栓塞再灌注模型,观察 PTS 治疗 7 d 后,大鼠脑梗死体积、caspase - 3 表达及凋亡细胞数。结果:和对照组相比,PTS 组脑梗死体积较小,caspase - 3 表达、凋亡细胞数均较少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:PTS 对试验性短暂性脑缺血再灌注模型可能具有神经保护作用。

[关键词] 三七三醇皂苷;脑缺血再灌注;脑梗死体积;caspase - 3

[Abstract] Objective: Through observing the targets of neuroethology, infarct volume, expression of caspase - 3, the preventive effect of PTS on rat after focal cerebral ischemia - reperfusion. Methods: The rat model of acute reperfusion injury after transient cerebral ischemia was made by middle cerebral artery occlusion. After PTS for 7 days, the infarct volume, expression of caspase - 3 and apoptotic cells in rat were examined. Results: Compared with control group, infarct volume of PTS group decreased smaller as well as the number of caspase - 3 positive cells and apoptotic cells with statistical significant ($P < 0.05$). Conclusion: There may be neuroprotective effect of PTS on transient focal cerebral ischemia - reperfusion in experimental model of rat.

[Key words] PTS; Cerebral ischemia - reperfusion; Infarct volume; Caspase - 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672 - 951X(2007)09 - 0068 - 03

缺血性脑损伤后出现多种病理生理改变,坏死可能是引起梗死中心神经细胞死亡的重要原因,而凋亡则可能是导致梗死半暗带神经细胞死亡的主要因素^[1]。凋亡细胞主要存在于半暗带,提示凋亡可能影响最后脑梗死的面积^[2]。caspase 家族在缺血性脑损伤中发挥重要作用,细胞凋亡过程中被激活,其中 caspase - 3 是 caspase 激活级联“瀑布”下游最关键的凋亡蛋白酶,在各种因素启动的凋亡程序中起最后的枢纽作用^[3]。动物研究已经证实,一些药物通过不同机制减少神经细胞损伤,拯救半暗带凋亡的神经细胞。近年来,中药在脑缺血治疗中的作用逐渐得到重视。三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根,具有散瘀止血、消肿定痛的功效。已经报道中药有效成分有抗血栓形成和抗神经细胞凋亡作用^[4,5];三七三醇皂苷(PTS)主要活性成分为人参三醇皂苷,其中 Rg₁ 的含量达 60% 以上,Rg₁、R₁、Re 三者的含量约达 80%。本试验观察三七三醇皂苷对脑梗死体积、caspase - 3 的影响,研究三七三醇皂苷有无神经保护作用。

1 材料和方法

68

1.1 试剂和仪器 红四氮唑(2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride TTC,中国医药集团上海化学试剂公司);三七三醇皂苷(由成都华神集团股份有限公司制药厂提供);细胞凋亡检测试剂盒(Boster 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);7%水合氯醛;4%中性多聚甲醛缓冲溶液(为常用化学试剂由实验室自行配制固定标本用);图像分析仪(HM AS - 2000 医学图文分析系统)。BMJ - 型包埋机(常州中威电子仪器厂),切片机(LEICA - RM2235),生物显微镜(OLYMPUS CX31),4/0 型尼龙手术缝线,手术器械,保温设施等。

1.2 动物模型建立 雄性 SD 大鼠 40 只,体重(260 ± 10)g(中科院啮齿类实验动物中心提供)。7%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,采用 Longa 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 h 后,将尼龙线轻柔拉回致颈外动脉处,即为再灌注开始。将尼龙线仅留在颈内动脉而不入颅,1.5 h 后,将尼龙线拉回致颈外动脉处,为假手术组(Sham 组)。假手术组(Sham 组)10 只,PTS 组(PTS 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹分两次

灌胃)、生理盐水(NS)组(0.9% 氯化钠 $1\text{ ml} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$),每组各 20 只。其中每组一半测定脑梗死体积,另一半用于 caspase-3 mRNA 原位杂交及 TUNEL 法检测细胞凋亡。造模成功后 PTS 组和 NS 组每天灌胃两次,连续 7 d。

1.3 神经功能缺损评分 评分参照 ZeaLonga5 制标准^[6]。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全展至对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒分,不能自发行走,意识丧失。动物清醒 2 h 后进行型筛选,0 分者剔除,神经病学评分在取材前进行。

1.4 脑梗死体积测定 治疗 7 d 后断头取脑,冷冻后等分切成 2 mm 厚脑片,浸入 37°C TTC 生理盐水溶液中染色 30 min。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 Express2.0 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,算出每个大脑梗死体积百分比。

1.5 caspase-3 mRNA 原位杂交及 TUNEL 法检测细胞凋亡 治疗 7 d 后,麻醉大鼠固定取材。按试剂盒提供的步骤进行,DAB 显色,细胞浆着棕黄色者为阳性细胞。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。

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, $P < 0.05$ 为有差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑梗死体积 Sham 组没有梗死组织 PTS 治疗组与 NS 组相比梗死体积较小,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。

2.2 神经功能评分 PTS 组较 NS 组分数低,经统计学分析,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。神经功能评分与脑梗死体积的变化无相关性 ($P > 0.05$)。

2.3 caspase-3 表达及细胞凋亡数 镜下 caspase-3 阳性标记物为圆形、卵圆形或椭圆形、呈深棕黄色、境界清晰,细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞。Sham 组 caspase-3 表达很少,而 PTS 治疗组和 NS 组 caspase-3 表达较多,PTS 治疗组 caspase-3 表达比 NS 组少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Sham 组凋亡细胞数很少,PTS 治疗组与 NS 组凋亡细胞数较多,但 PTS 治疗组比 NS 组少 ($P < 0.05$)。脑梗死体积的变化与 caspase-3 表达呈正相关 ($P < 0.05$),与凋亡细胞数无相关性 ($P > 0.05$)。图 1~3 为 caspase-3 表达,图 4~5 为细胞凋亡表达。(见表 1)

表 1 脑缺血再灌注后各组 Caspase-3 阳性细胞、细胞凋亡数、脑梗死体积及神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑梗死体积 (%)	caspase-3 (阳性细胞数)	凋亡细胞数	神经功能评分
Sham 组	07.1 $\pm$ 1.03	0.86 $\pm$ 0.31	0	
NS 组	36.75 $\pm$ 4.7	83.07 $\pm$ 7.2	4.03 $\pm$ 1.02	4.0 $\pm$ 1.05
PTS 组	27.75 $\pm$ 4.4	65.69 $\pm$ 9.2	3.02 $\pm$ 0.79	3.6 $\pm$ 0.97

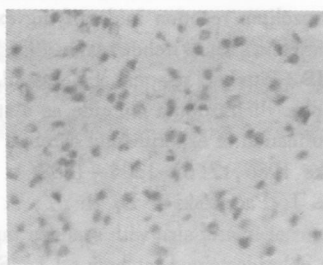


图 1 模型组 ($\times 400$)

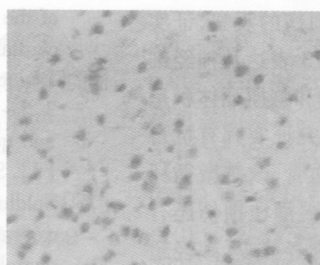


图 2 PTS 组 ($\times 400$)

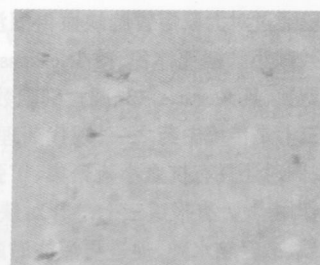


图 3 sham 组 ($\times 400$)



图 4 模型组 ($\times 400$)

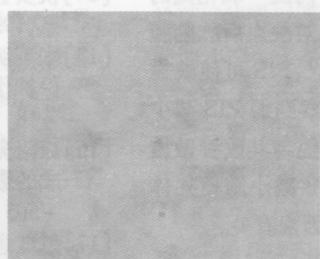


图 5 PTS 组 ($\times 400$)



图 6 sham 组 ($\times 400$)

3 讨 论

众所周知,脑缺血后的再灌注是神经功能恢复的基本条

件,也是脑组织损伤加重的重要因素。脑缺血再灌注损伤的病理生理是一个多环节、多因素、多途径损伤的酶促级联反

应。caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶,在正常情况下 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 抑制剂可缩小大鼠脑梗死体积,改善神经功能缺损,有利于脑组织的恢复^[7,8]。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^[1,9]。Chen J 等^[10]发现,大鼠短暂性脑缺血后 8~72 h 时,在海马和尾状核处检测到 caspase-3 样蛋白酶活性物质, caspase-3 mRNA 和蛋白质在海马 CA1 区锥体神经元内明显增加;脑室内注入 caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 可降低海马 caspase-3 活性,显著减少 CA1 区细胞死亡和 DNA 片段形成,上述作用一直持续到缺血后第 7 d。本实验发现 PTS 治疗组 caspase-3 表达比 NS 组少 ($P < 0.05$)。PTS 治疗组凋亡细胞数比 NS 组少,结果经统计学分析差异有统计学意义。

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,容易鉴别^[11]。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^[12,13],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 NS 组梗死范围均有明显减小,经统计学分析差异有统计学意义,表明即使神经行为学上无明显改善,但脑梗死体积却有明显的缩小,也提示神经行为学表现与脑梗死体积之间无明显相关关系。

本实验通过对大鼠短暂脑缺血再灌注损伤的观察,证实该药可有效减小脑梗死体积,减少 caspase-3 表达及神经细胞凋亡细胞数,且 Caspase-3 凋亡细胞数均和脑梗死体积呈正相关。三七是传统中药之一,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^[14]。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^[15]。另据研究, Rg1 还能增强纤溶系统活性,促进血管内皮一氧化氮的释放而发挥抗血栓作用^[16],因而有助于 Rg1 对缺血后软脑膜微循环的改善,保护血脑屏障。最近发现^[17], PTS 可使缺血再灌注大鼠的 Nestin 表达上调。本实验观察到的 PTS 减少 caspase-3 表达及神经细胞凋亡细胞数,可能与其改善微循环、减轻钙超载等作用有关。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上述众多因素有关。

参考文献:

[1] Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, et al Specific caspase pathways are activated in two stages of cerebral infarction

[J]. J Neurosci, 2001, 21(18): 7127 - 7134

[2] Guegan C, Boutin H, Boudry C, et al Apoptotic death in cortical neurons of mice subjected to focal ischemia [J]. C R Acad Sci, 1996, 319(10): 879 - 885

[3] Eaunshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68: 383 - 424

[4] 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 [J]. 药学报, 1997, 32 (6): 406 - 410

[5] 徐皓亮, 刘宛斌, 饶曼人. 参三七皂苷 Rg1 对实验性血栓形成的影响及其机制探讨 [J]. 药学报, 1997, 32 (7): 502 - 505

[6] Longa E Z, Weinstein P R, Calson S, et al Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84

[7] 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]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(3): 238 - 247

[8] Krupinski J, Lopez E, Marti E, et al Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2000, 7(4): 332 - 342

[9] 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 [J]. Neuroscience, 2002, 115(1): 125 - 36

[10] Chen J, Nagayama T, Jin K, et al Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia [J]. J Neurosci, 1998, 18(13): 4914 - 4928

[11] Formazan K, Puschmann S, Schaper J, et al The mechanism of the Tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction [J]. Virchows Arch, 1981, 393: 287 - 297

[12] 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 [J]. Stroke, 1986, 17(6): 1304 - 1308 (11)

[13] Goldlust E J, Paczynski R P, HeYY, et al Automated measurement of infarct size with scanned image of triphenyltetrazolium chloride stained rat brains [J]. Stroke, 1996, 27: 1657 - 1662

[14] 侯安会. 三七的临床运用和实验研究概要 [J]. 中医药信息, 1999, 6(1): 21 - 24

[15] 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 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(1): 12 - 18

[16] 徐皓亮, 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 [J]. 药学报, 1997, 32 (7): 502 - 505

[17] 赵红念, 胡晓松, 周东, 等. 三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 Nestin 表达的影响 [J]. 华西医学, 2005, 20(2): 297 - 299

(收稿日期: 2007-07-23 编辑: 朱民)