

# 三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠 脑组织Nogo-A表达的影响

张利军, 白宇, 侯郁青

(上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062)

**[摘要]** 目的:了解局灶性脑缺血再灌注后Nogo-A的动态变化,以及三七三醇皂苷(PTS)对其表达的影响。方法:建立局灶性脑缺血再灌注模型,采用免疫组织化学技术结合Western免疫印迹技术、功能评分,检测72只缺血再灌注后不同时期(3 d, 7 d)脑内Nogo-A蛋白的表达并评价功能恢复。结果:Western免疫印迹和免疫组织化学均显示:Nogo-A表达在缺血再灌注损伤后3 d时下降,7 d时上升。PTS组在3 d时的Nogo-A表达比模型组低( $P>0.05$ )。PTS组7 d时Nogo-A表达较模型组低( $P<0.05$ )。结论:PTS可使缺血再灌注大鼠的Nogo-A表达下降,这可能是其发挥脑保护作用的机理之一。

**[关键词]** 三七三醇皂苷; Nogo-A; 脑缺血再灌注; 大鼠

[中图分类号]R285.5 [文献标识码]A [文章编号]1672-951X(2008)05-0011-04

## Effects of PTS on Expression of Nogo-A Following Focal Ischemia - Reperfusion in Rats

ZHANG Li-jun, BAI Yu, HOU Yu-qing

Putuo Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai, China, 200062

**[Abstract]** Objective: To investigate the expression of Nogo-A and the effect of PTS on it following focal ischemia - reperfusion in the rat brain. Methods: The model of 72 cases of acute middle cerebral ischemia-reperfusion injury in rats established. The expression of Nogo-A protein in different durations of reperfusion (3d/7d) was determined by Western blotting and immunohistochemical approach, and the functional scoring was also evaluated. Results: Western blotting showed Nogo-A protein expression was decreased on day 3 and increased significantly on day 7. Immunohistochemical approach showed the same results. The number of Nogo-A-immunoreactive cells at 3 d after reperfusion in PTS group decrease compared with the placebo group ( $P>0.05$ ). And the number at 7 d in PTS group decreased markedly and represent significant difference compared with the placebo group ( $P<0.05$ ). Conclusion: The study implies PTS could down-regulate the expression of Nogo-A, and it might be one of protective mechanisms of PTS against ischemia-reperfusion injury.

**[Key Words]** PTS; Nogo-A; Brain Ischemia-Reperfusion; Rat Nogo

蛋白是抑制成年动物中枢神经再生的髓鞘内活性分子<sup>[1]</sup>。其中Nogo-A广泛存在与中枢神经系统内,是哺乳动物中枢神经损伤后神经再生障碍的重要原因之一<sup>[2]</sup>。三七三醇皂苷(PTS)为三七类新药,其主要活性成分Rg1的含量达60%以上,Rg1、R1、Re三者的含量约达80%。神经生长抑制因子Nogo-A在大鼠缺血性脑梗塞的表达作过相关的研究<sup>[3]</sup>,但有关PTS对大鼠局灶性脑缺血再灌注后Nogo-A蛋白表达影响的研究未见报道。本试验观察PTS治疗大鼠局灶性脑缺血再灌注3、7 d后,其对Nogo-A蛋白表达的影响。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 PTS (成都华神集团股份有

限公司制药厂); Western免疫印迹化学发光试剂盒(自BoehringerMannheim公司); 图像分析仪(HMIAS-2000医学图文分析系统); BMJ-型包埋机(常州中威电子仪器厂); 生物显微镜(OLYMPUS CX31)等。

1.2 动物模型建立 健康雄性SD大鼠72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。60 min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,60 min后,将尼龙线拉回致颈外动脉处,为假手术组(Sham组)。Sham组,PTS组(PTS50 mg/kg·d<sup>-1</sup>),模型组(0.9%氯化钠1 ml/

kg·d<sup>-1</sup>), 每组各时点12只, 造模成功后各组每天灌胃两次, 连续7 d. 分别于术后3、7 d不同时间点从各组随机取出6只大鼠, 行Western免疫印迹检查. 另每组各时点的6只大鼠固定取材后, 行免疫组化检查.

1.3 蛋白抽提和Western免疫印迹 断头在冰上取脑缺血侧皮层约3 mm ×1 mm ×1 mm脑组织. 蛋白质抽提方法参见Jin 等<sup>[4]</sup>特异性抽提Nogo-A的方法. 蛋白质抽提后严格按试剂盒操作步骤进行. 用图像摄录输入仪扫描, HMIAS-2000医学图文分析系统进行图像分析, 测定条带的平均吸光度A值.

1.4 免疫组化 用7%水合氯醛麻醉, 经左心室向主动脉插管, 并灌注4 含10 U 肝素的生理盐水50 ml, 然后换用4 40 ml/L 多聚甲醛缓冲液, 断头取脑, 固定3 h 后立即冰冻切片, 厚度30 μm, 石蜡包埋. 使用SABC法染色, DAB 显色. 检测严格按照说明书操作步骤进行.

1.5 图像分析 切片在统一放大倍数(10×10)下, 随机选10个视野, 输入图像分析系统, 记取平均阳性细胞数. 所得数据用SPSS 软件进行统计学处理.

1.6 神经功能缺损评分 评分参照ZeaLonga 5制标准<sup>[9]</sup>: 即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; 4分: 不能自发行走, 意识丧失. 动物清醒2 h后进行型筛选, 第2次神经病学评分在取材前进行.

1.7 统计学处理 数据均采用SPSS for window 11.5 软件包进行统计分析, 方差分析和t检验, 行Kruskal-Wallis、Mann-Whitney非参数检验.

## 2 结果

2.1 Western免疫印迹 Nogo-A条带出现在250 kD 处, 在模型组3 d的Nogo-A的表达量低于Sham组3 d 表达量 (P>0.05), PTS组3 d表达量低于模型组3 d 表达量 (P<0.05). 模型组7 d表达量高于Sham组7 d 的表达 (P<0.01), PTS组7 d表达量低于模型组7 d 的表达 (P<0.01). 结果如图1所示.

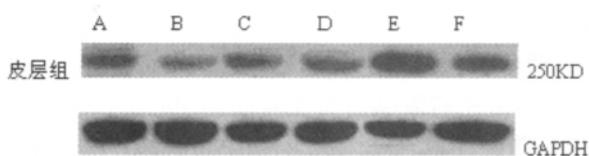


图1 Western blot检测Nogo-A蛋白的表达

A: Sham 3 d; B: 模型组3 d; C: PTS 3 d;  
D: Sham 7 d; E: 模型组7 d; F: PTS 7 d

2.2 免疫组化检测Nogo蛋白的表达 着色强度按切片中细胞着色有无及深浅记分. 分别用+++ (强), ++

(中等), + (弱), ± (偶见) 来表示. Nogo蛋白定位于神经元胞浆及突起内 (图2, 3), 多呈棕黄色颗粒状. 结果见表1及图2~图5.

表1 在不同时间点大脑组织免疫组化阳性细胞平均个数 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	n	3 d	7 d
Sham组	6	13.56 ± 4.21	13.78 ± 3.89
模型组	6	12.92 ± 4.15 <sup>a</sup>	17.62 ± 4.98 <sup>b</sup>
PTS组	6	11.04 ± 3.67 <sup>c</sup>	14.14 ± 3.21 <sup>d</sup>

注: 与Sham组(3 d)相比, <sup>a</sup>P>0.05; 与Sham组(7 d)相比, <sup>b</sup>P<0.05, 和模型组(3 d)相比, <sup>c</sup>P>0.05; 与和Sham组(3 d)相比, <sup>d</sup>P<0.01; 与Sham组(7 d)相比, <sup>e</sup>P<0.05, 与模型组(7 d)相比, <sup>f</sup>P<0.01.

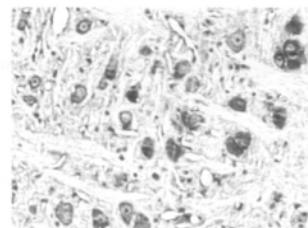


图4 模型组3 d, Nogo强阳性表达(+++)

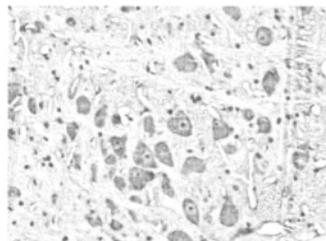


图5 PTS组3 d, Nogo强阳性表达(+++)

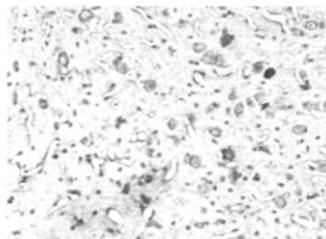


图6 模型组7 d, Nogo中等阳性表达(++)

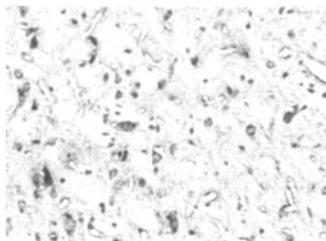


图7 PTS组7 d, Nogo中等阳性表达(±)

2.3 神经功能评定 Sham组无明显神经症状, 评分均为0分. 在第3 d时模型组的功能评分和PTS组相比, 分数较高 (P<0.05). PTS组7 d的神经功能评分均数比模型组7 d低 (P<0.05). 其结果如表2 所示.

表2 神经行为学评分 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	3 d	7 d
Sham组	12	0	0
模型组	12	3.1 $\pm$ 1.25	2.9 $\pm$ 1.15
PTS组	12	2.5 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>

注:和模型组(3 d)相比, <sup>a</sup>P<0.05;和模型组(7 d)相比, <sup>b</sup>P<0.05。

### 3 讨 论

各种抑制因素的作用是导致脑梗死后神经纤维再生受限的重要原因,是造成中枢神经损伤后遗症的重要因素。目前多数学者认为,如不能有效解除抑制因素的作用,中枢神经再生难以达到有效的康复水平<sup>[6,7]</sup>。

神经突起生长抑制因子Nogo-A,是目前发现的最为强烈的神经纤维再生抑制剂。Chen等<sup>[2]</sup>于2000年报道了编码神经突起生长抑制因子的基因序列,分别命名为Nogo-A、B、C蛋白,认为其中Nogo-A显示出强烈的神经生长抑制作用。Schwab等<sup>[2,4,8,9]</sup>首先在少突胶质细胞表面分离出蛋白分子,获得相应单克隆抗体,其中抗体IN-1可明显促进神经生长的作用。有研究表明<sup>[4,10]</sup>,Nogo-A在轴突生长的过程中就有表达,细胞核上免疫金标记的Nogo-A主要存在于染色体的核小体上,表明它可能与转基因有关。Hauben等<sup>[11]</sup>还研究了Nogo的疫苗对CNS再生的影响,发现用包有Nogo-A在内的髓磷脂相关蛋白免疫动物后,可促进脊髓不完全损伤动物的恢复,这种恢复作用是通过减少损伤后的神经退行性变实现的,并由T淋巴细胞介导。最近的一项研究显示,大鼠大脑皮质、海马、脑干、小脑等部位都有Nogo-A阳性表达,说明Nogo-A在脑内神经元中广泛存在<sup>[12]</sup>。

另外有研究使用抗Nogo-A后所获得的神经纤维再生是有功能性的,并能形成具有功能的突触联系<sup>[9]</sup>。但也有动物实验显示<sup>[10]</sup>,脑创伤后,Nogo-A mRNA的表达及蛋白合成并不明显升高,这可能与动物种类、实验模型以及观察时间的不同有关。

本试验中,免疫组化和Western检测结果显示在大鼠局灶脑缺血再灌注后早期时,Nogo-A蛋白质表达没有上升,而在恢复后期(7 d) Nogo-A蛋白表达却明显增高。提示了,在脑缺血再灌注后随时间的推移,神经突起生长抑制因子Nogo-A逐渐增多。可能是脑组织经历缺血、变性、坏死伴水肿、神经元及神经纤维破裂、溶解,此时各种蛋白质及神经递质的合成均降低,Nogo-A的表达减少;在脑梗死后期,由于神经组织及结缔组织修复的加快,特别是少突胶质细胞的生,Nogo-A的表达量升高,对神经纤维生长的

抑制加强,这可能是脑梗死后神经功能恢复减慢的重要原因。本研究通过对PTS治疗大鼠短暂脑缺血再灌注损伤的观察,证实该药可有效减小Nogo-A蛋白表达并且改善了神经功能评分。PTS有可能产生了类似Nogo特异性抗体NI-1的作用,而抑制Nogo-A的表达,从而起到脑保护作用。

三七是传统中药之一,现代药理研究证实其有抗自由基作用,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<sup>[13]</sup>。有研究显示PTS具有增强预缺血诱导的脑缺血耐受作用,并上调GFAP、bFGF表达<sup>[14]</sup>。最近发现,PTS可使缺血再灌注大鼠的Nestin表达上调、减少caspase-3表达、抑制脑缺血再灌注后炎症因子分泌及细胞凋亡、减小脑梗死体积,从而起到脑保护作用<sup>[16,17,18]</sup>。因此推测,PTS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]Chen MS,Huber AB,van der Haar ME,et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 [J].Nature,2000,403(6768): 434-439
- [2]Huber AB,et al.Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J].J Neurosci, 2002, 22(9): 3353-3367
- [3]吴功雄,张海伟,徐杰,等.神经生长抑制因子Nogo-A在大鼠缺血性脑梗塞的表达研究及其意义[J].中国病理生理杂志, 2005,20(1): 143-147.
- [4]Jin WL, Liu YY, Ju G, et al. Intraneuronal localization of nogo-A in the rat [J]. J Comp Neurol, 2003, 458(1): 1-10
- [5]Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J].Stroke,1989,20: 84
- [6]Zeng JS, Li H, Hong H. The synaptic reconstruction and expression of inhibitory protein in the thalamus and striatum after experimental cerebral infarction in rats[J]. Zhongguo Linchuang kangfu (Chin J Clin Rehabil),2002,6(17): 2534-2535
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J].Stroke,1989,20(1): 84-91
- [8]Raineteau O, Fouad K, Noth P, et al. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat [J].Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(12): 6929-6934

[9]Wang KC,Koprivica V, Kim JA, et al.Oligodendrocyte myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth[J].Nature,2002,417(6892): 941- 944  
[10]刘雁,石尚金,董为伟.脑梗死后自发性高血压大鼠脑内Nogo-A mRNA 的表达[J].中国临床康复,2003,7(5): 760- 762  
[11]Hauben E , Ibarra A , Mizrahi T, et al. Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens[J].Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(26): 15173- 15178  
[12]程希平,刘惠玲,宋朝君,等.Nogo-A在成年大鼠脑内神经元的分布[J].解剖学报,2005,36(3): 465- 470  
[13]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

[14]周俊英,刘小利,罗祖明.三七三醇皂苷增进大鼠脑缺血耐受的作用及对GFAP和bFGF表达的影响[J].华西药理学杂志,2005,20(6): 489- 492  
[15]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  
[16]张利军,白宇,侯郁青,等.三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积及caspase-3表达的影响[J].中医药导报,2007,13(9): 68- 70  
[17]刘宗超,周官恩,赵克建,等.三七三醇皂苷对大鼠脑缺血再灌注脑损伤保护作用的实验研究[J].中风与神经疾病杂志,2007,24(2): 38- 40

( 收稿日期: 2008- 03- 20 编辑: 朱民)

( 上接第2页) 体膜的损伤, MPTP开放, 引起线粒体 Cyt- C释放, 导致细胞死亡; 钙还可激活钙依赖蛋白酶参与氧自由基的合成, 脑缺血后, 其损伤的发生、发展与线粒体内Ca<sup>2+</sup>稳态失调关系密切<sup>⑩</sup>。

本实验结果显示, 模型组脑线粒体中Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- ATP酶活性均较正常组低, 而线粒体钙含量比正常组增多, 表明脑缺血再灌注可降低线粒体的代谢能力, 而导致ATP的合成减少, 从而导致Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- ATP酶的活性下降。这些酶活性下降可导致细胞内Ca<sup>2+</sup>超载, Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>膜内外分布及电位的失衡, 一方面引起线粒体结构破坏, 导致线粒体本身的损伤, 另一方面其他细胞器也受到损伤, 最终引起细胞变形、肿胀, 而导致神经元细胞的死亡。模型组总体抗氧化能力较正常组显著下降, 表明脑缺血再灌注使得线粒体组织的抗氧化能力下降, 这说明脑缺血再灌注后清除氧自由基的能力下降。而过多的氧自由基在神经元细胞内积聚, 不仅氧化损伤细胞膜, 而且进一步损伤线粒体膜, 影响了细胞氧化呼吸代谢的过程, 使得ATP产生减少, 上述酶的活性下降, 最终导致细胞的死亡。电针组线粒体Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- ATP酶的活性较模型组高, 线粒体Ca<sup>2+</sup>值降低, 表明针刺可以提高缺血再灌注损伤大鼠脑内线粒体神经元细胞的抗氧化能力, 可以提高线粒体的能量代谢能力, 从而提高上述酶的活性, 减轻对线粒体的损伤, 从而减轻脑组织的损伤, 改善脑细胞的代偿功能, 从而对缺血脑组织起保

护作用。

本文研究结果提示, 电针可能提高缺血再灌注区域线粒体抗氧化损伤的能力, 提高线粒体神经元细胞的能量代谢能力, 从而发挥对缺血再灌注线粒体损伤的保护作用, 这可能是电针抗脑缺血再灌注损伤的机制之一。

#### 参考文献:

[1]孔立红,毛娟娟.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠upA、pAI-1的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(3):160- 262  
[2]Zea Longa EL.Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat[J].Stroke,1989,20(1):84- 95  
[3]华兴邦,李群蓉,大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991(1): 1- 5  
[4]Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, et al.Preparation and handling of brain mitochondria useful to study up2take and release of calcium [J]. Brain Res Brain Res Protoc,2001,7(3):248- 254  
[5]钟广伟,李炜,李臻琰,针刺治疗急性缺血性脑血管疾病临床疗效[J].中国医师杂志,2005,7(9): 1226- 1227  
[6]郭玉璞.缺血性脑损伤的病理生理基础和脑梗塞的治疗原则[J].基础医学与临床,1998,18(2):1- 5  
[7]牛文民,李忠仁.缺血性脑血管病自由基损伤病原学及抗氧化治疗进展[J].上海针灸杂志,2005,24(1):43- 45  
[8]苏会璇.糖尿病神经病变发病机制和临床的若干特点[J].医学综述,2003,9(3): 3- 4

( 收稿日期: 2007- 11- 12 编辑: 朱民)