

• 基础研究 •

三七三醇皂苷减轻氧化应激、影响认知相关基因改善慢性缺血性脑血管病大鼠认知功能

赵江民 肖俊杰 单圣道 顾勤 姜嘟嘟 王勤鹰 余敏 詹青

【摘要】目的 研究三七三醇皂苷对慢性缺血性脑血管病导致认知功能障碍的治疗作用及其相关机制。方法 30只 Wistar成年大鼠随机分为假手术组 (SH)、慢性缺血性脑血管病组 (2-VO)、慢性缺血性脑血管病+三七三醇皂苷治疗组 (2-VO_{treat})，6周后用 Y型迷宫测试认知功能，用黄嘌呤氧化法和硫代巴比妥酸显色测定 SOD超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA)，实时荧光 PCR检测 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NMDAR) 和 α -氨基丁酸 A受体的 mRNA表达。结果 SH组达到学会标准所需电击次数为 (68.3 ± 3.46) 次，2-VO组和 2-VO_{treat}组分别为 (90.2 ± 5.37) 和 (80.7 ± 2.35) 次。SH组 MDA含量和 SOD活性分别为 (3.82 ± 0.47) nmol/mg·prol和 (98.73 ± 5.49) U/mg·prol，2-VO组和 2-VO_{treat}组分别为 (8.79 ± 0.51) nmol/mg·prol (67.68 ± 4.93) U/mg·prol和 (6.71 ± 0.24) nmol/mg·prol和 (81.09 ± 6.75) U/mg·prol。2-VO组和 2-VO_{treat}组与 SH组相比，NMDAR和 α -氨基丁酸 A受体的 mRNA表达明显降低 ($P < 0.05$)。2-VO组与 2-VO_{treat}组相比 NMDAR和 α -氨基丁酸 A受体的 mRNA表达明显降低 ($P < 0.05$)。结论 慢性缺血性脑血管病可以导致认知功能障碍，三七三醇皂苷治疗可以改善慢性缺血性脑血管病导致认知功能障碍、减轻氧化应激损伤、改善认知相关基因 NMDAR和 α -氨基丁酸 A受体的 mRNA表达。

【关键词】 慢性缺血性脑血管病；认知功能；氧化应激；MDA、SOD；NMDAR； α -氨基丁酸 A受体

Effects of notoginsenoside on cognitive impairment, oxidative stress and cognition related genes in rats with chronic cerebral ischemia ZHAO Jiang-min, XIAO Jun-jie, SHAN Sheng-dao, GU Qin, JIANG Du-du, WANG Qin-ying, YU Min, ZHAN Qing. Department of Neurology, Tongji Hospital of Tongji University Shanghai 200065, China.

Corresponding author: ZHAN Qing, E-mail: yeqzh@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the effects and mechanisms of notoginsenoside on cognitive impairment in rats with chronic cerebral ischemia. **Methods** Thirty adult Wistar rats were randomly divided into sham operation group (SH group), ischemia group (2-VO group) and notoginsenoside treatment

基金项目：本课题受上海市卫生局青年基金 (2008Y051) 资助

作者单位：200120 上海，同济大学附属东方医院医学影像科 (赵江民)；同济大学附属同济医院神经内科 (肖俊杰、顾勤、姜嘟嘟、王勤鹰、余敏、詹青)，同济大学附属同济医院外科 (单圣道)

通讯作者：詹青，E-mail: yeqzh@yahoo.com.cn

group (2-VO treat group). After 6 weeks, cognitive capability, the concentrations of MDA and SOD, expressions of NMDAR and γ -aminobutyric acid receptor mRNA in brain tissue were measured. **Results** The times of electroshock in SH group was 68.3 ± 3.46 which was less than 90.2 ± 5.37 in 2-VO group ($P < 0.05$) and 80.7 ± 2.35 in 2-VO treat group ($P < 0.05$). The concentration of MDA in SH group was 3.82 ± 0.47 $\mu\text{mol/mg}$ prolower than 8.79 ± 0.51 $\mu\text{mol/mg}$ prolower in 2-VO group ($P < 0.05$) and 6.71 ± 0.24 $\mu\text{mol/mg}$ prolower ($P < 0.05$) in 2-VO treat group. The concentration of SOD in SH group was 98.73 ± 5.49 U/mg prohigher than 67.68 ± 4.93 U/mg prolower in 2-VO group ($P < 0.05$) and 81.09 ± 6.75 U/mg prolower in 2-VO treat group ($P < 0.05$). The expressions of NMDAR and γ -aminobutyric acid receptor mRNA were significantly decreased in 2-VO group and 2-VO treat group compared with SH group ($P < 0.05$). And the expressions of NMDAR and γ -aminobutyric acid receptor mRNA were obviously decreased in 2-VO group compared with 2-VO treat ($P < 0.05$). **Conclusions** Notoginsenoside treatment can improve cognitive impairment induced by chronic cerebral ischemia through decreasing oxidative stress damage and improving the expressions of cognition related genes as NMDAR and γ -aminobutyric acid receptor mRNA.

【Key Words】 Chronic Cerebral Ischemia; Cognitive Impairment; Oxidative Stress; MDA; SOD; NMDAR; γ -aminobutyric Acid Receptor

慢性缺血性脑血管病是血管性痴呆、阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 和宾斯旺格 (Binswanger disease, BD) 等多种疾病发展过程中的一个共同病因, 以持久或进展性认知与神经功能障碍为主要表现^[1]。三七三醇皂苷是从我国传统中药三七中提取出的有效成分, 具有抗氧化应激、改善微循环及抗炎等作用, 在急性脑缺血治疗中显示出其良好的应用前景。氧化应激是慢性缺血性脑血管病导致的认知功能障碍的重要机制, 但是三七三醇皂苷是否可以改善慢性缺血性脑血管病的认知功能障碍尚不明确, 故本研究对此进行了初步探索。

材料与方法

一、材料

11~12月龄的健康 Wistar 大鼠 30只, 体重 (350 ± 50) g, 雌雄各半, 由上海斯科特动物实验中心提供。三七三醇皂苷 (三七通舒胶囊), 由成都华神集团股份有限公司制药厂提供。抗氧化检测试剂 (SOD, MDA) 试剂盒, 由南京建成生物工程研究所提供。PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒, 由宝生物工程大连有限公司提供。

二、模型制作

30只大鼠随机分为三组: 假手术组 (SH)、慢性缺血性脑血管病组 (2-VO)、慢性缺血性脑血管病 + 三七三醇皂苷治疗组 (2-VO treat), 各组 10只。慢性缺血性脑血管病组的造模方法参照 Bennett等^[2]制作慢性缺血性脑血管病大鼠模型的方法, 具体为 10% 水合氯醛 (3.5mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 颈部备皮并消毒后, 颈正中切开皮肤, 钝性分离双侧颈总动脉, 每侧用 0号手术线分别结扎近、远心端后, 从中间剪断。

假手术组为 10% 水合氯醛 (3.5mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 颈部备皮并消毒后, 颈正中切开皮肤, 钝性分离双侧颈总动脉, 但是不结扎。

慢性缺血性脑血管病+三七三醇皂苷治疗组为首先实行建立慢性缺血性脑血管病模型的手术,然后在术后第3周开始灌胃,三七三醇皂苷按100mg的量灌胃,2次/d。慢性缺血性脑血管病组和假手术组分别灌以等量的生理盐水,6周后作各项指标的检测。

三、认知功能检测

术后第6周用Y型迷宫测试认知功能,以达到连续10次测试中至少有9次正确反应(正确反应率 \geq 90%)时所需的电击次数表示。术前预测试一次,剔除灵活性过差的大鼠。

四、氧化应激检测

脱臼法处死大鼠后立即断头取脑,分析天平称重,按1:10的比例加入冷生理盐水(4℃),在冰浴中用电动搅拌机制成10%的脑组织匀浆,混匀后以3500r/min离心10min,取上清液。分别采用黄嘌呤氧化法和硫代巴比妥酸显色法测定SOD和MDA,严格按照试剂盒操作说明进行。

五、实时荧光PCR检测

(一) 样本准备: 脱臼法处死大鼠后立即断头取出海马组织,用RNA later液浸泡在EP管中,保存在液氮中。

(二) 引物设计: 按照实时荧光定量技术对引物的要求,用Beacon Designer7.0进行引物设计筛选,NMDAR1上游引物序列5'-GTTTCGGTATCAGGAATGCC-3',下游引物序列5'-GGTGCTCGTGTCTTTGGA-3'; r-氨基丁酸受体上游引物序列5'-AGATTCACAAGATGGATTCCTG-3',下游引物序列5'-AGCAGCAGAAGAAGCTCTGGC-3'; 内参 β -actin上游引物序列5'-GTTGACATCCGTAAAGACC-3',下游引物序列5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3',由上海生物工程公司合成。

(三) RNA抽提: 从液氮中的EP管中取出海马组织,加入含有预冷的1mTRIzol提取液的2.0mEP管中,摇匀静置10min加200 μ l氯仿混匀、离心(12000g,4℃,15min)取上清,加入等体积异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤2~3次,20~50 μ lDEPC水溶解。RNA纯度和浓度用OD260/OD280来检测。

(四) cDNA合成: 严格按照逆转录试剂盒说明书进行,RT反应液: 5 \times PrimerScriptM Buffer 2 μ l PrimerScriptM RT Enzyme Mix I 0.5 μ l Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ l Random 6mers (100 μ M) 0.5 μ l TotalRNA 100-200ng 补RNase Free dH₂O至10 μ l 反应液配制均在冰上进行。逆转录反应条件: 37℃ 15min, 85℃ 5sec。(五) 实时荧光PCR检测严格按照SYBR Premix Ex TaqTM (PerfectRealTime)试剂盒说明操作,进行相对定量研究。PCR反应液: SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 12.5 μ l PCR Primer Mix (10mM) 0.5 μ l cDNA溶液 5 μ l(总量在10ng左右); dH₂O 7 μ l 反应液配制均在冰上进行。实时荧光PCR反应条件为: 先95℃变性10min,然后95℃30s,55℃1min,72℃30s共45个循环,扩增完成后进行融解曲线分析(55~95℃,80个循环,每个循环增加0.5℃),得到扩增曲线、融解曲线和样本的相对定量Ct值。分别计算所测基因与内参基因Ct值的比值。

六、统计学处理: 数据用SPSS13.0软件进行分析,各组数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较和组间两两比较分别采用单因素方差分析和LSD法, $P < 0.05$ 有统计学差异。

结 果

1. 认知功能检测结果: (见表1) 2-VO组和2-VO_{treat}组学会主动逃避所需的电击次数较SH组明显增多

表1 术后6周大鼠认知功能检测结果($\bar{x} \pm s$)($n=10$)

组别	达到学会标准所需电击次数
SH (10例)	68.3 ± 3.46
2-VO (10例)	90.2 ± 5.37 ^a
2-VO _{treat} (10例)	80.7 ± 2.35 ^{a b}

注: 与SH组相比, ^a $P < 0.05$; 与2-VO组相比, ^b $P < 0.05$

($P < 0.05$), 2-VO_{treat}组学会主动逃避所需的电击次数与 2-VO组相比明显减少 ($P < 0.05$)。

2. 氧化应激测定结果: (见表 2) 2-VO 组和 2-VO_{treat}组与 SH 组相比, SOD值明显降低 ($P < 0.05$), 而MDA值明显升高 ($P < 0.05$)。2-VO组与 2-VO_{treat}

表2 术后6周大鼠脑内MDA含量和SOD活性($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/mg.prol)	SOD(U/mg.prol)
SH (10例)	3.82 ± 0.47	98.73 ± 5.49
2-VO (10例)	8.79 ± 0.51 ^a	67.68 ± 4.93 ^a
2-VO _{treat} (10例)	6.71 ± 0.24 ^{a b}	81.09 ± 6.75 ^{a b}

注: 与SH组相比, ^a $P < 0.05$; 与2-VO组相比, ^b $P < 0.05$

组相比 SOD值明显减少 ($P < 0.05$), MDA 值明显升高 ($P < 0.05$)。

3 认知相关基因 mRNA 表达: 所有检测基因均可以看到明显的平台期, 融解曲线均只具有一个特异性峰。2-VO组和 2-VO_{treat}组与 SH 组相比, NMDAR和 α -氨基丁酸 A 受体的 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。2-VO组与 2-VO_{treat}组相比 NMDAR和 α -氨基丁酸 A 受体的 mRNA 表达明显降低 $P < 0.05$ (图 1)。

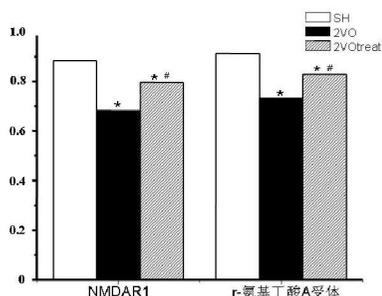


图1: 认知相关基因mRNA表达

讨论

本研究主要发现慢性缺血性脑血管病可以导致认知功能障碍, 三七三醇皂苷治疗可以改善慢性缺血性脑血管病导致认知功能障碍、减轻氧化应激损伤、改善认知相关基因 NMDAR和 α -氨基丁酸 A 受体的 mRNA 表达。

慢性缺血性脑血管病是以导致进行性或持久性的认知功能障碍为主要特点, 伴发于多种临床疾病, 严重影响患者生活质量。迄今为止, 尽管针对慢性缺血性脑血管病的不同病理机制出现了许多治疗的药物, 但近 200 个大规模临床试验结果显示, 单一的药物治疗很难获得疗效, 根据疾病的不同阶段采取多种药物的复合治疗成为当前新的趋势^[3]。中药由于其可以通过多层性、多途径、多靶点综合作用于慢性缺血性脑血管病多个病理环节, 有望从整体上有效保护慢性缺血性脑血管病导致认知功能障碍, 具有其独特的魅力。本实验通过 Y 型迷宫实验检测大鼠的认知功能, 证实慢性缺血性脑血管病确实能够损害大鼠的认知功能。1992年 de la Torre^[4]首次永久性结扎大鼠双侧颈总动脉制作出慢性缺血性脑血管病动物模型, 界定术后第 3 周是慢性缺血性脑血管病介导的进行性脑损伤开始的转折点, 所以我们在术后 3 周开始给予药物治疗。治疗 3 周后, 运用 Y 型迷宫实验检测大鼠的认知功能, 发现三七三醇皂苷确实可以改善慢性缺血性脑血管病导致认知功能障碍。

神经元对自由基引起的损伤非常敏感, 自由基连锁反应主要损害灰质的神经元等富含脂质的脑组织, 使神经元死亡, 尤其是它可使初始缺血损伤不严重的神经元发生坏死。由于人体内存在超氧化物歧化酶等自由基清除酶, 正常状态下自由基的产生与清除间保持动态平衡。慢性缺血性脑血管病打破了氧化还原的平衡, 自由基大量生成, 超过机体的清除能力并造成脑组织损伤, 导致认知功能障碍。本研究发现慢性缺血性脑血管病可以导致 SOD 值减少和 MDA 值升高, 这与 Tanaka 等^[5]和 Yanpallewar 等^[6]的发现基本一致。本研究在此基础上发现三七三醇皂苷可以降低慢性缺血性脑血管病所致 SOD 值减少和 MDA 值升高的程度, 减轻氧化应激的程度。

慢性缺血性脑血管病时脑组织处于隐性能量代谢障碍状况中, 神经元功能受损, 海马细胞中粗面内质网结合的核糖体的解聚使其对基因的转录功能下降, 从而影响它们的合成。NMDAR 是突触可塑性、皮质和海马神经元长时程增强效应的主要调控者, 构成了中枢神经系统的重要功能如学习和记忆的基础。 γ -氨基丁酸是中枢神经系统中最主要的抑制性神经递质, 通过与 γ -氨基丁酸 A 受体的结合, 产生抑制性突触后电位。它们是目前比较公认的认知相关基因。本研究发现慢性缺血性脑血管病可以导致 NMDAR 和 γ -氨基丁酸 A 受体 mRNA 表达相对减少, 这与 Liu 等^[7]和 Neill^[8]等的研究结论基本一致。本研究在此基础上发现三七三醇皂苷可以降低慢性缺血性脑血管病所致 MDAR 和 γ -氨基丁酸 A 受体 mRNA 表达减少的程度。

总之, 本研究发现三七三醇皂苷可以通过减轻氧化应激损伤、改善认知相关基因 NMDAR 和 γ -氨基丁酸 A 受体的 mRNA 表达, 最终改善慢性缺血性脑血管病导致认知功能障碍。

(本文图 1 见光盘)

参 考 文 献

- [1] Horvath S. The pathological and clinical consequences of chronic cerebral hypoperfusion. *Orv Hetil* 2001, 142: 383-389.
- [2] Bennett SA, Pappas BA, Stevens WD, et al Cleavage of amyloid precursor protein elicited by chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Aging* 2000, 21: 207-214.
- [3] De la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. *Brain Res* 1992, 582: 186-195.
- [4] Goldstone DJ, Black SE, Hakim AM. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 2002, 33: 2123-2136.
- [5] Tanaka K, Tanaka NW, Miyazaki I, et al Chronic cerebral hypoperfusion induces striatal alterations due to the transient increase of NO production and the depression of glutathione content. *Neurochemical Res* 2002, 27: 331-336.
- [6] Yanpallewar SU, Rai S, Kumar M, et al Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of ocimum sanctum on transient cerebral ischemia and long-term cerebral hypoperfusion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2004, 79: 155-164.
- [7] Liu HX, Zhang JJ, Zheng P, et al Altered expression of MAP-2, GAP-43 and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Molecular Brain Res* 2005, 139: 169-177.
- [8] MJO Neill, CA Hicks, MA Ward, et al LY393615, a novel neuronal Ca^{2+} and Na^{+} channel blocker with neuroprotective effects in models of in vitro and in vivo cerebral ischemia. *Brain Res* 2001, 888: 138-149.

(收稿日期: 2009-08-20)

(本文编辑: 杨蓓)

赵江民, 肖俊杰, 单圣道等. 三七三醇皂苷减轻氧化应激、影响认知相关基因改善慢性缺血性脑血管病大鼠认知功能 [J/CD]. *中华脑血管病杂志: 电子版*, 2009, 3 (6): 283-287.