

三七三醇皂苷对 MCAO 大鼠 BDNF 和 TrkB 表达的影响^{*}

王席玲 邹忆怀 翟建英 崔方圆 朱陵群[#]

(北京中医药大学东直门医院 北京 100700)

摘要:目的 观察三七三醇皂苷 (PTS) 对脑缺血大鼠模型脑源性神经营养因子 (BDNF) 及其酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 表达的影响, 揭示 PTS 对脑缺血受损神经元的重塑作用机制。方法 选取成年雄性 SD 大鼠, 采用改良的 EZ Longa 方法建立大鼠中动脉缺血 (MCAO) 大鼠模型, 根据清醒后所得 Longa 评分随机分为模型组 (生理盐水)、三七三醇皂苷组 (三七舒通胶囊) 和阳性对照组 (尼莫地平), 分别于给药后 3、7、28 d 随机取大鼠 6 只, 通过免疫组织化学法观察 BDNF 和 TrkB 的表达, 并观察大鼠脑缺血后的神经功能变化。结果 与正常组比较, 术后各时间点脑组织 BDNF 和 TrkB 表达变化均有增高, 并随时间的迁延呈下降的趋势。与模型组比较, 三七三醇皂苷组能明显改善脑缺血的神经功能缺失症状, 并能上调皮质中 BDNF 和 TrkB 蛋白的表达水平。结论 三七三醇皂苷能上调脑缺血后 BDNF 和 TrkB 蛋白的表达, 可能通过上调 BDNF 和 TrkB 表达对脑缺血神经元损伤起保护作用, 促进神经元的重塑, 发挥其对脑缺血的治疗作用。

关键词:脑缺血; 三七三醇皂苷; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶受体 B; 大鼠

中图分类号: R285.5

Influence of PTS on expressions of BDNF and TrkB in MCAO rats

WANG Xi-ling, ZOU Yi-huai, ZHA I Jian-ying, CUI Fang-yuan, ZHU Ling-qun[#]

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

Abstract: Objective To observe the influence of panaxtriol saponins (PTS) on the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase receptor (TrkB) in rat model of cerebral ischemia, and to explore the mechanism of remodeling injured neurons by PTS during cerebral ischemia.

Methods An improved EZ Longa method was used to establish the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in adult male SD rats. Then the rats were randomly divided into the model group (treated with normal saline solution), the PTS group (treated with Sanqishutong Capsules) and the positive control group (treated with nimodipine) according to EZ Longa values after rat consciousness. The expressions of BDNF and TrkB were observed by immunohistochemical method respectively 3, 7 and 28 days after the administration of above medicines in random 6 rats. The rat nerve functions were observed too after the cerebral ischemia. **Results** Comparing with the normal rats the expressions of BDNF and TrkB in the rats with MCAO were increased at different time points, and then gradually descended with the time went on. Comparing with the model group the neurological dysfunction induced by cerebral ischemia were relieved obviously and the expressions of BDNF and TrkB were up-regulated in the PTS group. **Conclusion** PTS can up-regulate the expressions of BDNF and TrkB, through which to prevent the neurons from lesion induced by cerebral ischemia, promote the remodeling of neurons and play a role in the treatment of cerebral ischemia.

王席玲, 女, 在读硕士生

[#]通讯作者: 朱陵群, 男, 研究员, 主任医师, 主要从事中西医结合脑病学研究和临床

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (No. 30472214, No. 3077280)

Key words: cerebral ischemia; panaxtriol saponins; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase receptor B; rats

脑缺血后神经组织的可塑性与脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophin factor, BDNF) 等密切相关^[1-2]。BDNF 作为神经生长因子家族 (neurotrophins, NTs) 成员之一, 和其受体酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase B TrkB) 结合后, 激活受体触发一系列细胞内信号传递从而发挥生物学效应。近年来, 中药在脑缺血治疗中的优势越来越明显, 目前临床用三七有效成分治疗脑血管意外后遗症已取得较好疗效^[3]。本实验通过大脑中动脉阻塞 (MCAO) 模型观察三七三醇皂 (PTS) 苷对脑梗死皮质中 BDNF 和 TrkB 蛋白表达变化, 探讨 PTS 对脑缺血后神经元的重塑作用机制, 为 PTS 的临床应用提供实验依据及临床应用修复损伤神经的特异性治疗提供理论基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

动物: 健康雄性 SD 大鼠, 体重 (300 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK(京) 2002 - 2003。药物: 三七通舒胶囊, 成都华神集团股份有限公司制药厂生产 (国药准字 Z20030109; 批号: 061002XH021); 尼莫地平片: 天津市中央药业有限公司生产 (国药准字 H200439150; 批号: 060608)。给药方式: 腹腔灌胃。手术器材: 尼龙栓线 (型号 2534, 购自北京沙东生物技术有限公司)。

1.2 MCAO 模型的建立

大鼠称重后随机分为手术组和非手术组 (正常组)。手术组动物参考文献采用改良的 EZ Longa 方法制备大鼠 MCAO 模型。术前 12 h 禁食不禁水, 腹腔注射 3.5% 水合氯醛麻醉 (10 mL/kg), 仰卧位固定, 于颈正中纵行切开皮肤, 钝性分离肌群, 游离颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 与颈内动脉 (ICA), 结扎 ECA 近分叉处和 CCA 近心端, 用动脉夹暂时夹闭 CCA 远端, 在 CCA 结扎与夹闭两处之间用动脉剪剪一小口, 将浸于肝素生理盐水中的尼龙线栓沿 CCA 插入 ICA, 并顺 ICA 推进 18 ~ 22 mm, 稍遇阻力停止, 即可造成大脑中动脉的阻断, 然后结扎颈总动脉固定栓线, 缝合皮肤。

1.3 神经病学评分

评分参照 EZ Longa 5 分制标准^[4]。0 分: 无神经损伤表现; 1 分: 对侧前爪不能完全伸展; 2 分: 向对

侧转圈; 3 分: 行走时向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。动物清醒 2 h 后进行模型筛选, 1 至 3 分者为纳入标准, 0 分和 4 分者剔除。神经病学评分在术后 5 h 进行并持续观察到缺损症状基本恢复。

1.4 动物分组及给药方法

随机分组: 非手术组动物即作为正常组。手术组动物 Zea Longa 评分在 1 ~ 3 分为符合纳入实验者, 随机分为模型组、三七三醇皂苷组和阳性对照组 (尼莫地平)。分别于术后 3 d、7 d 和 28 d 3 个时间点随机进行取材。

给药方法及给药量: 尼莫地平片为 17.3 mg/(kg · d) 相当于 60 kg 成人的用量 8 倍, 三七通舒胶囊为 54 mg/(kg · d) 相当于 60 kg 成人用量 10 倍, 模型组, 生理盐水, 10 mL/(kg · d)。于术后清醒日开始每天 1 次腹腔灌胃给药; 正常组和模型组动物亦于术后清醒日开始灌胃给去离子水。按体重给药, 每 3 d 称体重 1 次, 直至取材。

1.5 脑组织 BDNF 和 TrkB 表达的测定

(1) 于 MCAO 模型后 3、7、28 d 各随机取每组大鼠 6 只。经 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 用恒流泵依次灌注生理盐水、4% 多聚甲醛, 取脑组织后浸于 4% 多聚甲醛中固定。

(2) 石蜡切片及免疫组织化学染色: 取视交叉前后 2 mm 脑组织常规脱水浸蜡包埋。行 5 μm 厚度切片。BDNF 染色方法 (SABC 法): 每个切片经常规脱蜡至水, 按 SABC 试剂盒说明书步骤染色 (BDNF 抗体、SABC 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司)。阴性对照采用 PBS 缓冲液代替一抗, 余皆相同。TrkB 染色方法 (SP 法): 每个切片经常规脱蜡至水, 按 SP 试剂盒说明书步骤染色 (TrkB 抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京博奥森公司)。阴性对照采用 PBS 缓冲液代替一抗, 余皆相同。

1.6 图像分析

免疫组化切片在 40 × 10 倍数下, 于脑梗死周围区随机选取 4 个视野, 用 SPOT- 数码成像系统和 Meta Morph 图像分析系统测定阳性信号光密度值。

1.7 统计方法

采用 SPSS 10.0 for windows 统计分析软件, 所有实验数据经正态分布检验后采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数间的比较经方差齐性检验后以单

因素方差分析统计结果。

2 结果

2.1 神经行为学改变

大鼠 MCAO 术后多于 1~3 h 内清醒。术后 5 h 神经功能缺损症状较重, EZ Longa 评分较高, 术后

24 h 所有成模大鼠均可自由饮水和摄食, 术后 48 h 缺损神经功能所有恢复, EZ Longa 评分呈下降趋势, 术后 72 h 三七三醇皂苷组和尼莫地平组 EZ Longa 评分显著低于模型组, 差异有显著统计学意义 $P < 0.01$ 。结果见表 1。

表 1 大鼠 MCAO 后神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 术后 5 h | 术后 24 h | 术后 48 h | 术后 72 h |
|---------|----|-------------|-------------|-------------|---------------|
| 假手术组 | 15 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 模型组 | 30 | 2.67 ± 0.61 | 2.43 ± 0.73 | 2.20 ± 0.71 | 1.73 ± 0.64 |
| 三七三醇皂苷组 | 30 | 2.63 ± 0.61 | 2.37 ± 0.72 | 2.07 ± 0.69 | 1.33 ± 0.48** |
| 尼莫地平组 | 30 | 2.60 ± 0.67 | 2.33 ± 0.80 | 1.93 ± 0.69 | 1.27 ± 0.45** |

注:与同时时间点的模型组比较 ** $P < 0.01$

2.2 BDNF 表达

BDNF 广泛存在于大脑皮质, 正常组偶见 BDNF 表达, 脑缺血后 BDNF 表达明显升高。术后 3 d BDNF 表达, 与正常组比较, 各组均显著增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 三七三醇皂苷组显著升高 ($P < 0.01$), 尼莫地平组虽也较模型组升高, 但差异无统计学意义。术后 7 d 时, 各组 BDNF 表达均呈下降趋势, 与自身术后 3 d 比较差异有统计学 ($P < 0.$

01), 但仍然显著高于正常组水平 ($P < 0.01$); 与模型组比较三七三醇皂苷组仍处于较高水平 ($P < 0.05$), 尼莫地平组有相同趋势, 但差异无统计学意义。术后 28 d, 各组 BDNF 表达依旧呈下降趋势, 模型组和尼莫地平组高于正常组水平, 但无统计学意义, 三七三醇皂苷组 BDNF 表达水平仍显著高于模型组 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 术后不同恢复时点 BDNF 表达的变化 (光密度; $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 术后 3 d | 术后 7 d | 术后 28 d |
|---------|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| 正常组 | 5 | 0.079 ± 0.002 | 0.080 ± 0.004 | 0.088 ± 0.001 |
| 模型组 | 7 | 0.141 ± 0.003** | 0.101 ± 0.009** | 0.095 ± 0.004 |
| 三七三醇皂苷组 | 7 | 0.172 ± 0.008***## | 0.122 ± 0.015***## | 0.103 ± 0.005***## |
| 尼莫地平组 | 7 | 0.148 ± 0.008** | 0.111 ± 0.007***## | 0.097 ± 0.004 |

注:与同时时间点正常组比较 ** $P < 0.01$; 与同时时间点模型组比较 ## $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 与同组 3d 比较 $P < 0.01$

2.3 TrkB 阳性表达

TrkB 在皮层内分布广泛, 正常大鼠分布较少, 脑缺血后表达增高, 给药组高于模型组, 随着时间迁移而呈逐渐下降的趋势。术后 3 d TrkB 表达, 与正常组比较, 模型组显著升高 ($P < 0.05$), 三七三醇皂苷组和尼莫地平组亦显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 三七三醇皂苷组显著升高 ($P < 0.01$), 尼莫地平组亦显著升高 ($P < 0.05$)。术后 7d 时, 各组均

呈下降趋势, 与正常组比较, 三七三醇皂苷组和尼莫地平组均呈高表达, 模型组仍高于正常组, 但无统计学差异。术后 28 d 时, TrkB 表达继续下降, 与正常组比较三七和尼莫地平组依然呈高表达 ($P < 0.01$), 模型组基本降至正常水平, 与自身术后 3d 比较呈显著性低表达; 与模型组比较, 三七和尼莫地平组均为高表达 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 术后不同恢复时点 TrkB 表达的变化 (光密度; $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 术后 3 d | 术后 7 d | 术后 28 d |
|---------|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| 正常组 | 5 | 0.046 ± 0.005 | 0.052 ± 0.009 | 0.054 ± 0.001 |
| 模型组 | 7 | 0.089 ± 0.019* | 0.088 ± 0.001* | 0.055 ± 0.005 |
| 三七三醇皂苷组 | 7 | 0.129 ± 0.029***## | 0.112 ± 0.007***## | 0.108 ± 0.005***## |
| 尼莫地平组 | 7 | 0.117 ± 0.018***## | 0.108 ± 0.007*# | 0.100 ± 0.006***## |

注:与同时时间点正常组比较 * $P < 0.01$; 与同时时间点模型组比较 ## $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 与同组 3 d 比较 $P < 0.05$

$P < 0.01$



3 讨论

自 1982 年德国生物学家 Brade 及其同事成功地从猪脑中提取出 BDNF 以来,有关脑缺血性神经元损伤研究热点逐渐转移到 BDNF 及其 TrkB 上。在发生缺血性脑损伤后,BDNF 及 TrkB 表达水平明显上升,提示 BDNF 和 TrkB 参与了脑缺血损伤的保护过程^[5-7]。

本实验使用造模技术成熟的 MCAO 模型,并对该模型采用 EZ Longa 5 分制标准评价。本试验于术后清醒时进行评分及分组并持续观察大鼠神经缺损症状至恢复。术后 5 h 评分,与正常组比较,各组均有显著的统计学意义 ($P < 0.01$),模型组、三七三醇皂苷组和尼莫地平组两两比较均无统计学意义 ($P > 0.05$),说明造模成功和分组均匀。本研究结果发现缺血早期大鼠神经功能缺损症状较重,48 h 后症状有所减轻,72 h 后大部分大鼠神经功能缺失表现不明显,这可能与大鼠大脑侧支循环丰富,使得缺血区周边的血供有所恢复有关。与同时间点模型组比较三七三醇皂苷组和尼莫地平组 EZ Longa 评分下降明显,差异有显著统计学意义,提示三七三醇皂苷对脑梗死大鼠早期神经功能恢复有一定的改善和促进作用,但其作用机制还有待进一步的研究。

本实验通过免疫组织化学染色法发现脑缺血早期 BDNF 和 TrkB 的表达增多,随缺血时间的迁延 BDNF 和 TrkB 的表达均呈下降趋势。各时间点与正常组比较各组均有显著统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较,用药组有显著统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。本次研究采用了术后当日给药的方法,BDNF 表达变化于术后 3 d,给药组较模型组高水平表达,提示在脑缺血早期给予三七三醇皂苷对治疗脑缺血是有益的。随时间延长,BDNF 表达减少,而三七三醇皂苷能够使其表达继续维持在一个较高水平且持续时间较长,提示三七三醇皂苷在脑缺血神经元损伤后促进神经重塑的机制之一是通过上调 BDNF 的表达,同时证明在发生脑缺血损失后尽可能早期、持续服用三七三醇皂苷是有益的。TrkB 表达变化,与正常组比较,三七三醇皂苷组和尼莫地平组均有显著统计学意义 ($P < 0.01$),模型组在术后 3 d 和 7 d 有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),至 28 d 逐渐降至正常水平无统计学意义;与模型组比较三七三醇皂苷组和尼莫地平组均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。这说明脑缺血损伤本身在早期就可以应激性提高

TrkB 的表达,保护缺血的神经元,而三七三醇皂苷和尼莫地平能够进一步提高 TrkB 的表达。随时间延长,TrkB 表达减少,提示病理状态下 TrkB 的应激性表达难以维持较长时间,这可能是 CNS 轴突再生困难的机制之一,随模型组 TrkB 表达逐渐降至正常而三七三醇皂苷和尼莫地平能够使 TrkB 表达持续维持在一个较高水平,这可能是三七三醇皂苷在脑梗死恢复期促进大脑重塑机制之二。

脑缺血损伤后机体功能随时间延长可以部分恢复,其结构基础为突触再生,因此在缺血早期对神经元的保护是影响再生的因素之一。本结果提示:三七三醇皂苷作为一种脑保护剂在缺血性脑损伤治疗中早期使用和后期持续使用能够上调内源性神经保护因子,从而使受损的神经功能得到恢复,为三七三醇皂苷有效治疗脑缺血提供了实验依据,为临床使用脑保护剂治疗脑缺血性神经损伤提供了重要的理论依据和新的治疗思路。

参考文献:

- [1] SCHÄBITZ WR, STEIGLEDER T, COPPER-KUHN CM, et al. Intravenous Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances Poststroke Sensorimotor Recovery and Stimulates Neurogenesis[J]. *Stroke*, 2007, 38(7): 2165 - 2172
- [2] YI W, XU NG, WANG GB. Experimental study on effects of electro-acupuncture in improving synaptic plasticity in focal cerebral ischemia rats[J]. *ZHONGGUO ZHONG XI YI JIE He Za Zhi*, 2006, 26(8): 710 - 714
- [3] 赵湛,余剑,熊丽,等.三七三醇皂苷配合抗高血压治疗预防高血压性脑卒中[J]. *高血压杂志*, 2006, 14(7): 527 - 530
- [4] EZ LONGA, WENSTEN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91
- [5] ARA IS, KNOUCHIH, AKABANE A, et al. Induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the receptor trkB mRNA following middle cerebral artery occlusion in rat[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 211(1): 57 - 60
- [6] 詹合琴,尹志奎,翟成凯,等.三七皂苷 Rg1 对脑缺血后大脑皮质和海马 BDNF 蛋白的影响[J]. *山东医药*, 2006, 46(5): 9 - 10
- [7] 徐冰,田国萍. 脑源性神经营养因子在脑缺血损伤修复反应中的作用[J]. *中国医药导报*, 2007, 4(3): 23 - 25

(收稿日期: 2007-11-17)