

- 2006, 23(3): 63-64
- [13] 任文海, 王新增, 王振华, 等. 缺铁对大鼠胃粘膜血流量的影响机制 [J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(10): 893
- [14] 任文海, 王新增, 王振华, 等. 缺铁性贫血大鼠小肠推进功能的改变及其相关机制的研究 [J]. 华人消化杂志, 1998, 6(12): 1030-1032
- [15] Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, *et al.* Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4596-4601
- [16] 左文丽, 刘玉峰, 张传新. 缺铁大鼠肠道黏膜细胞 IRP2 mRNA、TfR mRNA 和 Fn mRNA 表达水平的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(4): 230-231
- [17] Frazer D M, Anderson G J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 30(3): 288-297
- [18] Umbreit J N, Conrad M E, Moore E G, *et al.* Iron absorption and cellular transport; the mobilferrin/Paraferritin paradigm [J]. *Semin Hematol*, 1998, 35: 13-26

二苯乙烯苷对脑缺血再灌注大鼠神经生长因子表达及神经细胞凋亡的影响

杨杰, 周芝文, 杨期东, 曾进, 郑丽君*
(中南大学湘雅医院 神经内科, 湖南长沙 410008)

摘要:目的 探讨二苯乙烯苷(TSG)对缺血再灌注大鼠的神经保护作用及分子机制。方法 线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型,再灌注后6h、24h、48h、7d观察动物神经行为学变化并评分,采用原位末端脱氧核苷酸转移酶标记法(TUNEL)检测神经细胞凋亡;免疫组化法检测神经生长因子(NGF)蛋白表达。结果 神经功能评分显示模型组各时间点均有明显的神经功能缺损症状,除6h时间点外,两个剂量TSG治疗组其余各时间点神经功能评分明显低于模型组,差异显著($P < 0.05$);与模型组相比,除7d时间点外,两个剂量TSG组其余各时间点凋亡细胞数均减少,差异非常显著($P < 0.01$);与模型组相比,两个剂量TSG组各时间点NGF表达均升高,差异非常显著($P < 0.01$)。结论 TSG能够增加脑缺血再灌注大鼠缺血周边区NGF蛋白表达,拮抗神经细胞凋亡,改善神经功能。

关键词:二苯乙烯苷; 脑缺血再灌注; 神经生长因子; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1676-04

经典理论认为中枢神经系统损伤后不能再生,但目前研究证实当给损伤的中枢神经提供适当的条件后也可再生,从而认识到脑缺血的治疗和预防是可行的。研究发现在脑缺血损伤早期应用药物提高脑内神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的表达水平,对神经再生和功能的恢复具有积极意义^[1]。亦有研究明确NGF对细胞凋亡具有抑制作用。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是中药何首乌的活性成分^[2-3]。现代药理学研究证明,TSG具有抗氧化、抗衰老、增强免疫、调节血脂、抗动脉粥样硬化、提高学习记忆能力、抗炎、抗肿瘤、护肝、刺激黑色素合成以及诱导AD小鼠内源性NGF增加的作用^[4-9],而TSG对脑缺血后NGF表达及神经细胞凋亡影响的研究未见报道。本研究旨在观察TSG对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血周边区

NGF表达及神经细胞凋亡的影响,从而为临床脑保护剂的研制和开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与仪器: TSG由湖南中医研究所制剂室提供,经高效液相色谱法提取分离、纯化,测定其质量分数为70%,4℃冰箱保存,临时制备成12、24 mg/mL溶液备用。TUNEL试剂盒购自德国Roche公司。兔抗鼠NGF抗体购自Millipore公司;兔SABC浓缩型免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;DAB显色剂购自北京中杉金桥生物工程有限公司。恒低温组织切片机构购自美国AO公司;生物光学显微镜照相机购自日本Olympus;HPIAS-1000彩色病理图像分析系统购自武大影像工程公司。

1.2 实验动物分组与给药: 清洁级雄性SD大鼠96只,体质量200~300g(购自湖南农业大学实验

①收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(08JJ3083)

作者简介: 杨杰(1965-),女,湖南省长沙市人,副教授,博士,主要研究方向为脑血管疾病。

Tel: 13755138437 E-mail: yangjie6523@163.com

动物中心)。随机分为假手术组、模型组、小剂量 TSG 组、大剂量 TSG 组, 每组各 24 只。各组大鼠按照再灌注后处死的时间分为 6 h、24 h、48 h、7 d 共 4 个亚组, 每个亚组各 6 只。假手术组: 进行各项手术操作, 但栓线仅进入 8~10 mm; 模型组: 造模手术前 7 d ig 生理盐水 5 mL/kg, 第 7 天 ig 1 h 后造模, 以后每天定时给药直至处死; TSG 组: 造模手术前 7 d 分别 ig TSG 60、120 mg/kg^[6,8,10], 第 7 天给药 1 h 后造模, 以后每天定时给药直到处死。

1.3 模型制作: 参考 Longa^[11] 的线栓法制备局灶性大脑中动脉栓塞模型。大鼠以 10% 水合氯醛 0.35 mL/100 g ip 麻醉, 颈部正中切口, 分离右侧颈动脉鞘, 游离右侧颈动脉及分支, 结扎颈总动脉、颈外动脉, 在颈内动脉近端夹动脉夹, 颈总动脉远端作血管切口, 插入远端钝化的 0.234 mm 单丝尼龙钓鱼线, 松开动脉夹, 直视下尼龙线自颈总动脉切口处插入约 (18±5) mm 栓塞大脑中动脉入口, 保留 2 h 后拔出, 形成再灌注。手术过程中予以照射灯保持体温在 (37±0.5) °C, 监测肛温、呼吸及心率。手术结束后将动物单独置于笼中, 直至苏醒后予以评分。假手术组插线深度为 8~10 mm, 其余操作同手术组。

1.4 神经功能评分: 根据 Longa^[11] 的 5 级标准评分法, 动物苏醒后开始首次评分, 直至动物死亡或被处死。0 分为正常, 未见任何神经功能缺损表现; 1 分为垂直提尾时对侧前爪不能伸直; 2 分为行走时身体向对侧旋转; 3 分为行走时身体向对侧跌倒; 4 分为不能自发行走或意识丧失。根据首次评分, 0 分、4 分、有呼吸困难、提前死亡及处死时发现蛛网膜下腔出血的动物均弃之不用。此外对于手术中出血过多的动物也弃去。

1.5 免疫组织化学: ip 10% 水合氯醛深度麻醉动物, 经心脏灌注 4% 多聚甲醛约 300 mL 至大鼠四肢强直僵硬, 断头取自额极 4~11 mm 的脑组织, 置于 4% 多聚甲醛室温下固定 24 h。4 °C 下 10%、20%、30% 蔗糖分别沉底, A.O 恒低温组织切片机连续冠状切片 (16~20 μm), 切片晾干后, 应用 SABC 法进行 NGF 的免疫组织化学染色。具体步骤: PBS (0.01 mmol/L, pH 7.2~7.4) 漂洗; 滴加新鲜配制的 3% H₂O₂, 室温下静置 10 min 以灭活内源性过氧化物酶; 0.03% Triton-100 PBS 溶液室温下 30 min; 滴加 10% 正常山羊血清 37 °C 孵育 20 min 封闭抗原, 0.01 PBS 稀释的兔抗大鼠 NGF 多克隆抗体 (1:1000) 4 °C 24 h。PBS 漂洗后滴

加生物素化山羊抗兔 IgG 抗体 (1:100), 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗后滴加 SABC 复合物 (1:100, 新鲜配制), 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗后滴加 DAB 显色 (暗室操作, 镜下控制反应时间, 蒸馏水终止反应); 常规乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗, 其余同上述操作, 结果为阴性。

1.6 TUNEL 染色: 冰冻切片按照 TUNEL 试剂盒说明书操作, 进行细胞凋亡染色。

1.7 结果观察: 光学显微镜下选择胞浆中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。采用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像分析系统对切片进行图像分析。每个时间点每只大鼠每个指标随机选取 4 张切片, 每张切片随机选取顶叶缺血半暗带 5 个不重复视野, 高倍镜下 (×400) 观察计数每个视野中阳性细胞数, 取均数作为各时间点该指标阳性细胞数。

1.8 统计学分析: 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用 ANOVA 及 Newmann-Student 多重比较 *t* 检验分析, 所有数据均使用 SPSS 13.0 统计软件包进行处理。

2 结果

2.1 TSG 对大鼠脑缺血再灌注后神经功能缺损的影响: 大鼠大脑右侧中动脉阻塞 2 h 后再灌注, 各缺血组动物均出现神经功能缺损, 主要表现为提尾悬空时, 阻断对侧肩部内旋, 前肢屈曲、内收, 肌力下降。单纯缺血再灌注模型组尤为显著; 大、小剂量 TSG 组神经功能缺损都有改善, 肌力明显增强, 有些动物提尾悬空时两前肢近对称地伸向地面, 行为接近正常, 除 6 h 时间点体征不稳定外, 其余各时间点行为学评分均较模型组降低 ($P < 0.05$); 两个剂量 TSG 组间差异不明显 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 缺血各组大鼠神经功能评分的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison on neurological function scores of ischemic rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	再灌注不同时间神经功能评分			
		6 h	24 h	48 h	7 d
模型	-	2.00±0.89	2.67±0.52	2.33±0.52	1.50±0.55
TSG	60	2.00±0.63	1.67±0.52*	1.33±0.52*	0.83±0.43*
	120	1.67±0.82	1.33±0.52*	1.17±0.41*	0.67±0.52*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

2.2 TSG 对大鼠脑缺血再灌注后缺血周边区神经细胞凋亡的影响: 显微镜下, 假手术组可以观察到散在分布的凋亡细胞, 凋亡细胞核阳性, 细胞体积小, 且皱缩变形。模型组再灌注 6 h 缺血侧坏死灶周围

可以观察到凋亡细胞明显增多, 24 h 达到最高峰, 48 h 下降, 7 d 病灶区仅见少数凋亡细胞。凋亡阳性细胞特征: 圆形, 棕色浓染, 体积较小, 不显示正常的胞浆结构。与假手术组相比, 缺血各组凋亡细胞数明显增加 ($P < 0.01$), 与模型组相比, 6、24、48 h 时间点 TSG 治疗组凋亡细胞数量均明显减少 ($P < 0.05$), 两种剂量 TSG 治疗组间凋亡细胞数量无明显差异 ($P < 0.05$)。结果见图 1, 表 2。

2.3 TSG 对大鼠脑缺血再灌注后缺血周边区顶叶皮质 NGF 表达的影响: 缺血再灌注后 6 h 缺血周

边区顶叶皮质神经元 NGF 蛋白阳性表达增加, 24 h 表达达高峰 (阳性细胞计数明显增高), 48 h 表达有所下降, 7 d 仍见表达。形态学上多数阳性细胞体积较大, 典型神经元形态, 细胞轮廓清晰, 阳性细胞膜、浆、核内均有表达, 主要为胞浆着色, 呈棕黄色。与假手术组比较, 缺血各组表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, TSG 治疗组再灌注 6 h、24 h、48 h、7 d 阳性表达细胞数量均明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 两个剂量 TSG 治疗组间无明显差异 ($P > 0.05$), 结果见表 3, 图 2。

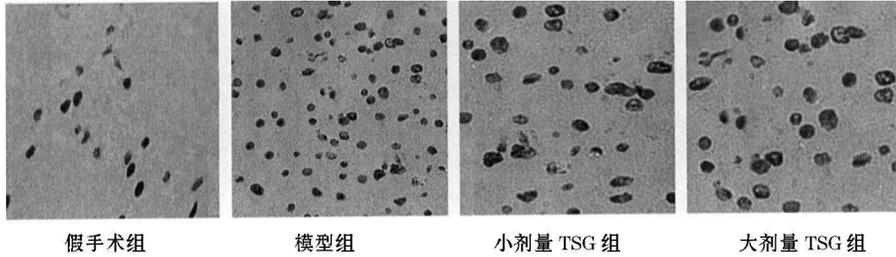


图 1 大鼠缺血再灌注 24 h 后缺血周边区顶叶皮质神经元细胞凋亡 TUNEL 检测

Fig. 1 TUNEL Labeling of neurons apoptosis in ischemic cortex of parietal lobe at 24 h after ischemia reperfusion

表 2 各组大鼠缺血侧顶叶皮质 TUNEL 细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of TUNEL cell numbers in ischemic cortex of parietal lobe of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	再灌注不同时间神经细胞凋亡数量/个			
		6 h	24 h	48 h	7 d
假手术	-	4.02 ± 1.10	4.53 ± 1.20	4.23 ± 1.04	3.94 ± 1.10
模型	-	18.36 ± 1.27 ^{△△}	47.07 ± 1.61 ^{△△}	19.57 ± 2.23 ^{△△}	6.26 ± 1.96
TSG	60	16.01 ± 2.03 ^{△△*}	35.72 ± 2.09 ^{△△*}	15.38 ± 2.25 ^{△△*}	4.41 ± 1.09
	120	15.91 ± 1.71 ^{△△*}	34.39 ± 1.92 ^{△△*}	16.31 ± 2.02 ^{△△*}	5.29 ± 1.07

与假手术组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$
^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

表 3 各组大鼠缺血侧顶叶皮质 NGF 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison on NGF protein expression in ischemic cortex of parietal lobe among every group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	再灌注不同时间 NGF 阳性表达细胞数/个			
		6 h	24 h	48 h	7 d
假手术	-	0.68 ± 0.17	0.76 ± 0.24	0.71 ± 0.20	0.65 ± 0.19
模型	-	16.47 ± 1.54 ^{△△}	27.02 ± 3.58 ^{△△}	20.72 ± 1.58 ^{△△}	13.53 ± 0.89 ^{△△}
TSG	60	27.12 ± 1.13 ^{△△**}	44.57 ± 3.25 ^{△△**}	31.33 ± 1.21 ^{△△**}	22.12 ± 0.75 ^{△△**}
	120	26.60 ± 1.75 ^{△△**}	42.85 ± 3.41 ^{△△**}	30.37 ± 1.28 ^{△△**}	21.23 ± 0.64 ^{△△**}

与假手术组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$
^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group; ** $P < 0.01$ vs model group

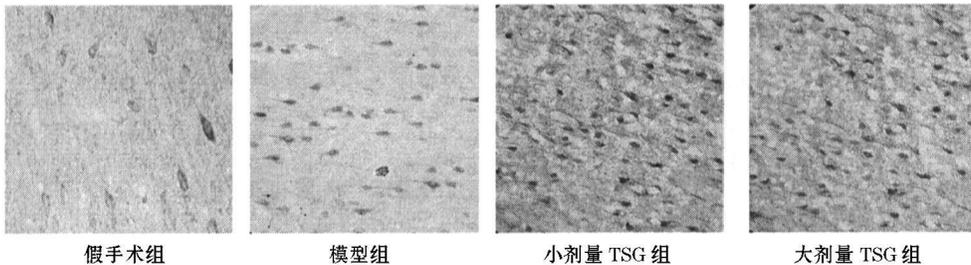


图 2 免疫组织化学检测大鼠缺血再灌注 24 h 后缺血周边区顶叶皮质神经元 NGF 蛋白的表达
 Fig. 2 Immunohistochemical labeling of NGF protein expression in ischemic cortex of parietal lobe at 24 h after ischemia reperfusion

3 讨论

脑缺血再灌注损伤机制十分复杂, 主要涉及自由基损伤、兴奋性氨基酸毒性、钙离子超载、能量代谢障碍、炎症反应、细胞凋亡等多个方面。胡伟

等^[12]研究发现缺血缺氧性脑损伤早期应用 NGF, 可减轻神经功能损伤程度。赵晖等^[1]报道侯氏黑散可上调脑缺血再灌注损伤后缺血脑组织内源性 NGF 的表达, 起到脑保护作用。近年来大量研究表

明,脑缺血再灌注损伤后缺血半暗区神经细胞凋亡是造成迟发性神经元死亡的重要原因。且有研究证实,NGF 对神经细胞凋亡有明显的抑制作用。

TSG 是中药何首乌的活性成分,是一种多羟基酚类化合物。神经科学大量研究证明,何首乌及其活性成分 TSG 具有抗衰老、抗氧化、减轻脑缺血引起的脑水肿及脑组织损害,改善神经功能缺损等脑保护作用。在 AD 小鼠模型研究中发现 TSG 能够诱导内源性神经生长因子上调,明显提高小鼠的学习记忆能力^[8]。另外亦有研究^[13]发现 TSG 能抑制啮齿动物脑缺血再灌注所导致的脑组织 NMDA 受体结合力升高,降低神经细胞内钙离子浓度,减轻钙超载所致的脑细胞损伤与凋亡。

本研究采用 TUNEL 法检测大脑中动脉栓塞大鼠模型大脑皮层神经细胞凋亡,免疫组化法检测缺血周边区 NGF 表达产物。结果显示,与假手术组相比,脑缺血再灌注后缺血周边区 NGF 表达增加,这与以往研究结果一致;与模型组相比,两个剂量 TSG 组可明显上调 NGF 的表达,减少神经细胞凋亡。提示 TSG 能够通过诱导脑缺血再灌注损伤大鼠 NGF 表达上调,减少神经细胞凋亡,从而减轻神经功能缺损,起到神经保护作用,这对缺血性中风后的脑功能恢复具有积极意义。本实验研究为 TSG 作为临床脑保护剂的研究与开发提供了实验依据,但 TSG 在体内对脑缺血再灌注神经系统损伤的保护机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵 晖,张秋霞,穆 阳. 侯氏黑散对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(11): 43-46
- [2] 王开金,张颖君,杨崇仁. 蓼属植物的化学成分与生物活性

- 研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 151-164
- [3] 廖海民,王玲丽,谭玲玲,等. 不同产地何首乌中二苯乙炔苷的测定[J]. 中草药, 2006, 37(4): 603-604
- [4] Zhang W, Xu X L, Wang Y Q, et al. Effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic diet rats[J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1209-1214
- [5] Zhang Y Z, Shen J F, Xu J Y, et al. Inhibitory effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(3-5): 355-363
- [6] Wang X, Zhao L, Han T, et al. Protective effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb., on experimental colitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578(2-3): 339-348
- [7] Guan S, Su W, Wang N, et al. A potent tyrosinase activator from *Radix Polygoni Multiflori* and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(5): 660-663
- [8] 楚 晋,叶崔飞,李 林,等. 二苯乙炔苷对 D-半乳糖致脑老化小鼠学习记忆及神经营养因子的影响[J]. 中国药房, 2005, 16(1): 13-15.
- [9] 赵 玲,李春阳,张 丽,等. 二苯乙炔苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响[J]. 中草药, 2008, 39(3): 394-397.
- [10] Yang P Y, Almofti M R, Lu L, et al. Reduction of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule 1 and vascular endothelial growth factor in form cells by a water soluble fraction of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99(3): 294-300
- [11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84
- [12] 胡 伟,巩守平,兰 怡,等. 神经生长因子对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用及远期影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2007, 15(1): 54-56
- [13] 张媛英,翟 静,孙凌云,等. 何首乌提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(33): 86-87.

六味地黄汤对糖尿病肾病大鼠肾功能及细胞凋亡的影响

邓 红¹,王 新²,徐 芳³,唐 方^{1*}

(1 天津医科大学总医院 中医科,天津 300072; 2 山西省大同市中医医院,山西 大同 037004;

3. 天津中新药业公司,天津 300031)

摘 要:目的 探讨六味地黄汤对糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏功能保护作用的量效关系及对细胞凋亡的影响。方法 采用单侧肾脏结扎术+腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法建立 DN 模型,2 周实验结束时测定大鼠血糖、肌酐清除率、尿蛋白定量;2、4、8 周实验结束时分析大鼠肾皮质细胞 DNA 降解的琼脂糖凝胶电泳, TUNEL 法观察

①收稿日期: 2010-03-19

作者简介: 邓 红(1973—),女,天津市人,主治医师,硕士,博士在读,研究方向为老年病及眼科疾病治疗。

Tel: (022) 26769221 E-mail: hdeng5588@163.com

* 通讯作者 唐 方 Tel: (022) 60362762 E-mail: zhongyi3599@126.com