

参附注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织磷酸果糖激酶表达的影响

江承平¹, 王柏强¹, 刘福¹, 李毅¹, 杨明¹, 周玥¹, 吴碧华^{2*}

1. 川北医学院附属医院药剂科, 四川南充 637007

2. 川北医学院神经病学研究所, 四川南充 637000

摘要: **目的** 观察参附注射液对大鼠脑缺血再灌注后磷酸果糖激酶(PFK)表达的影响, 探讨参附注射液对脑的保护机制。**方法** 清洁级雄性SD大鼠90只, 随机分为假手术(Sham)组、脑缺血再灌注(IR)组、参附注射液预处理(SFI)组, 每组30只。采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)后再灌注模型, TTC染色测脑梗死面积, 并检测PFK活性及PFK mRNA和蛋白的表达。**结果** 参附注射液能明显减少脑缺血再灌注大鼠脑梗死灶的面积。IR组与Sham组比较, PFK活性明显降低($P < 0.05$), PFK mRNA及蛋白的表达明显增加($P < 0.05$); SFI组PFK mRNA及蛋白的表达水平及活性明显高于IR组($P < 0.05$)。**结论** 参附注射液对脑缺血再灌注大鼠脑组织有保护作用, 其机制可能与上调PFK表达及活性有关。

关键词: 参附注射液; 脑缺血再灌注; 磷酸果糖激酶

中图分类号: R743.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)02-0100-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.005

Effect of Shenfu Injection on expression of phosphofructokinase in brain tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

JIANG Cheng-ping¹, WANG Bai-qiang¹, LIU Fu¹, LI Yi¹, YANG Ming¹, ZHOU Yue¹, WU Bi-hua²

1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China

2. Neurology Research Institute, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Shenfu Injection (SFI) on the expression of phosphofructokinase (PFK) in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury and to discuss its protective mechanism on brain. **Methods** Male SD rats were randomly divided into three groups, Sham, cerebral ischemic reperfusion (IR), and SFI-pretreated (SFI) groups, with 30 rats in each group. Reversible middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was produced by intraluminal suture technique. The infarct area of brain was measured by 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining method; The PFK activity and the expression of PFK mRNA and protein were detected, respectively. **Results** SFI could significantly decrease the infarct areas of brain with MCAO in rats. Compared with those in Sham group, the PFK activity decreased ($P < 0.05$) and the expression of PFK mRNA and protein increased in IR group ($P < 0.05$). The PFK activity and the expression of PFK mRNA and protein were significantly increased in SFI group compared with IR group ($P < 0.05$). **Conclusion** SFI has the protective effects on the brain injury induced by ischemia. Its mechanism may be correlated to up-regulating the expression and activity of PFK.

Key words: Shenfu Injection; cerebral ischemia reperfusion; phosphofructokinase

参附注射液(SFI)是根据古方“参附汤”提取的中药药物, 目前已在各种危重病中得到广泛应用, 其主要由中药人参、附片提取物组成, 有效成分分别是人参皂苷和乌头类生物碱^[1]。目前研究表明其在缺血再灌注中对细胞起到保护作用^[2], 但作用机制尚不明确。本实验通过观察参附注射液对局灶性

脑缺血-再灌注大鼠磷酸果糖激酶(PFK)的mRNA、蛋白及活性的影响, 探讨SFI对脑的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

参附注射液(深圳三九药业有限公司, 批号090305), Trizol试剂购自Gibco公司; RT-PCR试

收稿日期: 2012-11-29

基金项目: 四川省科技厅资助项目(2010JY0094)

作者简介: 江承平(1967—), 男, 汉, 四川广安人, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药物基础与临床。E-mail: chengpingjiang@sina.cn

*通信作者 吴碧华, 教授, 博士, 硕士生导师。研究方向为脑血管病的基础与临床

剂盒购自 Promega 公司, 内参照 β -actin 及 PFK 引物由上海生工生物技术公司合成; 兔抗大鼠 PFK 抗体 (一抗) 购自 Chemicon 公司; 羊抗兔抗体 (二抗) 购自北京中杉金桥公司; 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 购自 Amresco 公司。

1.2 动物分组及模型建立

健康雄性成年 Wistar 大鼠 90 只, 体质量 250~280 g, 购自川北医学院实验动物中心, 许可证号 SCXK (川 2008-18), 均在实验前置于实验室适应环境 1 周。将大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、缺血再灌注组 (IR 组)、参附注射液治疗组 (SFI 组), 每组 30 只。大鼠术前 12 h 禁食不禁水。采用线栓法左侧颈外-颈内动脉插线建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型, ip 给予 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg), 麻醉后分离颈部各动脉, 为避免刺激迷走神经, 电凝切断颈外动脉分支, 将直径 0.25 mm 尼龙线栓, 自右颈外动脉插入颈内动脉, 至遇阻力为止, 深度约为 18 mm (自颈总动脉分叉处算起), 注意防止栓线滑出, 结扎固定栓线, 术中监测直肠温度, 保持在 36.5~37.5 °C。缺血 2 h 后, 在麻醉状态下, 将尼龙线栓退至颈外动脉残端即可恢复大脑中动脉血供再灌注。根据再灌注时间将各组分为 6、12、24 h 三个亚组。Sham 组只进行麻醉和血管分离术, 不进行缺血再灌注及静脉注射; SFI 组于再灌注时 iv 给予 SFI 8 mg/kg, IR 组于再灌注时 iv 给予等体积的生理盐水。

1.3 脑梗死面积测定

各组动物实验结束, 迅速断头取脑, 置于 -20 °C 冰箱中冷冻 20 min, 距额极后 2.5 mm, 冠状面切取脑片 5 张, 将切片迅速置于 2% TTC 溶液中, 避光, 37 °C 温孵 15~30 min, 不时翻动脑片, 使均匀接触染色剂, 正常脑组织呈玫瑰红色, 梗死组织呈白色。然后置 4% 多聚甲醛中固定, 将染色结果输入计算机, 利用图像处理软件 (AutoCAD) 分别计算出 5 个脑片缺血侧的总面积和梗死区域的面积, 求出梗死区域占大脑半球总面积的百分比作统计参数。

1.4 PFK 活性测定

参照杜传书等^[3]方法。

1.5 半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

缺血侧大脑半球矢状裂至外侧裂区域下 2/3 的皮质由于该区皮质仅由大脑中动脉供血, 缺血较重, 梗死出现早而完全, 代表缺血中心区; 上 1/3 区域

的皮质由于由大脑前动脉和大脑中动脉双重供血, 该区域缺血相对较轻, 代表缺血半影区。取缺血半影区皮层, Trizol 试剂提取总 RNA, 紫外分光光度计检测 A_{260} 、 A_{280} , 纯 RNA 样本 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 5S、18S、28S 清晰 RNA 荧光条带, 证明 RNA 完整无降解。PFK 引物序列为: 上游引物序列: 5'-ATTGAATATGCCGTCTCC-3', 下游引物序列: 5'-CACAAAGATACACACATGG-3', 预扩增片断为 272 bp, β -actin 引物序列为: 上游引物序列: 5'-TGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTG-3', 下游引物序列: 5'-GTGCCGCCAGACAGCACTGTGTTG-3', 预扩增片断为 212 bp。循环条件: 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后, 72 °C 再延伸 10 min, 产物琼脂糖凝胶电泳, 照像保存, Kodark 1D 电泳成像系统扫描分析。

1.6 Western blotting

取缺血半影区皮层少量组织置于 1.5 mL Ep 管中, 剪碎, 匀浆器匀浆, 加入裂解液, 离心吸取上清液, Bradford 法测定蛋白质浓度。各标本取等量蛋白质 50 μ g, 上样, SDS-PAGE 分离样品, 转膜, 封闭液室温封闭后加入一抗和二抗, 加入 ECL 试剂, 暗室曝光, 显影, 定影。以 β -actin 为内参照, Kodark 1D 电泳成像系统进行定量扫描分析, 结果采用 β -actin 校正。

1.7 统计学分析

实验数据均经 SPSS17.0 统计软件完成, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数的比较采用 *t* 检验, 两组以上均数的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 TTC 染色结果

Sham 组大鼠脑片红染, 无白色梗死灶; IR 组可见有明显的梗死灶, 并且随着时间的增加, 梗死灶面积明显增加 ($P < 0.05$); 在各个时点, SFI 组脑梗死比均低于 IR 组 ($P < 0.05$), 但在各个时点 SFI 组脑梗死比仍高于 Sham 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 大鼠脑组织 PFK 活性

大鼠脑缺血再灌注后缺血半影区脑组织 PFK 活性随着时间的增加呈下降趋势 ($P < 0.05$), 到 24 h 仍未恢复; Sham 组 PFK 活性无明显变化, 并且均高于 IR 组 ($P < 0.05$); 在各个时点 SFI 组 PFK 活性均明显高于 IR 组 ($P < 0.05$), 但仍低于 Sham 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 大鼠脑组织 PFK mRNA 及蛋白表达

大鼠脑缺血再灌注后缺血半影区脑组织 PFK mRNA 及蛋白的表达均随着时间增加呈上升趋势 ($P < 0.05$); IR 组 PFK mRNA 及蛋白的表达明显高于 Sham 组 ($P < 0.05$); 在各个时点 SFI 组 PFK mRNA 及蛋白的表达明显高于 IR 组 ($P < 0.05$)。见表 3、4, 图 1、2。

表 1 各组大鼠脑梗死率的比较 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 1 Comparison on infarct size in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury in each group ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分组	脑梗死率/%		
	6 h	12 h	24 h
Sham	0	0	0
IR	9.16 ± 0.21*	14.22 ± 0.34*	20.34 ± 0.57*
SFI	6.11 ± 0.09* [△]	10.16 ± 0.21* [△]	14.11 ± 0.22* [△]

与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 IR 组比较: [△] $P < 0.05$; 下表同
* $P < 0.05$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ vs IR group; same as below

表 2 各组大鼠脑组织 PFK 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 2 Comparison on activity of PKF in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分组	PFK 活性/(U·mg ⁻¹)		
	6 h	12 h	24 h
Sham	5.11 ± 0.08	5.10 ± 0.10	5.12 ± 0.07
IR	3.54 ± 0.04*	2.89 ± 0.14*	1.99 ± 0.11*
SFI	4.31 ± 0.10* [△]	3.47 ± 0.07* [△]	2.59 ± 0.03* [△]

表 3 各组大鼠脑组织的 PFK mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 3 Expression of PFK mRNA in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分组	PFK mRNA		
	6 h	12 h	24 h
Sham	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.03
IR	0.21 ± 0.05*	0.38 ± 0.09*	0.52 ± 0.11*
SFI	0.41 ± 0.10* [△]	0.62 ± 0.07* [△]	0.90 ± 0.11* [△]

表 4 各组大鼠脑组织 PFK 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 4 Expression of PFK protein in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分组	PFK 蛋白		
	6 h	12 h	24 h
Sham	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.03
IR	0.18 ± 0.04*	0.31 ± 0.09*	0.48 ± 0.11*
SFI	0.39 ± 0.05* [△]	0.52 ± 0.07* [△]	0.94 ± 0.10* [△]

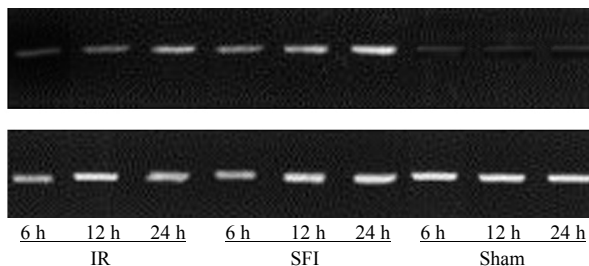


图 1 各组大鼠脑组织 PFK mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of PFK mRNA in brain tissue of rats in each group

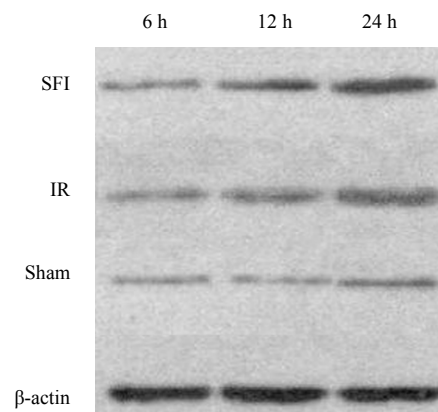


图 2 各组大鼠脑组织 PFK 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of PFK protein in brain tissue of rats in each group

3 讨论

脑是人体的重要组成部分,也是整个机体中能量代谢最旺盛的器官,但是脑组织不仅能量合成的原料物质存储量很少,并且可以被直接利用的能量物质也极少。脑能量代谢是一个非常复杂的生物化学反应过程,在此过程中任何环节出现问题,均可以影响脑组织的功能,甚至导致其死亡。

机体细胞葡萄糖的代谢有两条途径:在氧充足的情况下进行有氧氧化;在缺氧的情况下进行糖酵解。尽管正常情况下细胞通过氧化磷酸化产生的 ATP 数量远大于糖酵解途径产生的 ATP 数量,但在缺氧的情况下,糖酵解途径在维持神经细胞的基本生存中的作用显得尤为重要。目前认为糖酵解途径中最重要限速酶就是磷酸果糖激酶,在神经系统中,磷酸果糖激酶的活性在保证神经细胞正常生理功能中起到重要的作用。本课题组在研究中发现脑缺血再灌注后磷酸果糖激酶下降,并且随着时间的增加活性出现下降趋势,由于其活性的下降致使糖酵解途径进行受阻,影响神经细胞能量的代谢,但

是通过 RT-PCR 和 Western blotting 观察到 PFK mRNA 和蛋白的表达在脑缺血再灌注后升高, 并且随着时间的增加而表达增高, 这可能是机体的一种自我保护机制, 由于 PFK 酶活性降低, 反馈性刺激了 PFK 的合成增加 PFK 的表达, 从而代偿了一部分由于活性的降低对脑组织能量代谢的影响, 起到代偿的作用。但是随着时间的增加, 脑梗死面积比不断增加, 说明机体虽然有着自我保护机制, 但 PFK 表达增高仍不能完全代偿 PFK 活性的降低对脑组织产生的损害。

1994 年 Hossmann 首先提出缺血半暗区的定义, 缺血半暗区的组织, 具有双向改变的可能, 有可能功能恢复, 也可能进一步发展为坏死, 因此, 脑缺血的治疗重点是可逆恢复缺血的脑组织^[4]。缺血再灌注后脑组织的保护是目前医学研究的热点^[5-8]。但参附注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织保护作用的研究尚未见报道, 研究发现能参附注射液的早期干预能明显减轻脑缺血再灌注后脑梗死比, 并且发现参附治疗组大鼠组织 PFK 活性及表达量明显增高, 证实了参附注射液可能通过改善脑缺血再灌注后脑组织的能量代谢起到对脑组织的保护作用。

参考文献

[1] 王伟, 王军, 徐艳, 等. 缺血缺氧性新生大鼠皮层神经元胞浆 Smac/Diablo、caspase-9 的表达及参附注

射液的干预作用 [J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10(3): 228-231.

- [2] Zhang X J, Song L, Zhou Z G, *et al.* Effect of shenfu injection on gastrointestinal microcirculation in rabbits after myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(27): 4389-4391.
- [3] 杜传书. 红细胞磷酸果糖激酶测定法及中国人正常值 [J]. 中华血液学杂志, 1985, 6(4): 237-239.
- [4] 王锐, 李焕英, 王卫. 白细胞介素 1 受体拮抗剂对大鼠局灶性脑缺血再灌注神经细胞凋亡的影响 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(19): 3316-3317.
- [5] Zhang YF, Fan XJ, Li X, *et al.* Ginsenoside Rg₁ protects neurons from hypoxic-ischemic injury possibly by inhibiting Ca²⁺ influx through NMDA receptors and L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586(1/3): 90-99.
- [6] 刘式威, 刘政华, 吕霞, 等. 重组人促红细胞生成素对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障内皮屏障抗原及通透性的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(7): 802-804.
- [7] 董文鹏, 章翔, 高大宽, 等. 白藜芦醇对小鼠局灶性缺血/再灌注后急性期的影响 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(8): 1032-1034.
- [8] Jadhav V D, Jabre A, Lee T J. Effect of phospholipase C blockade on cerebral vasospasm [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 25(4): 362-365.