绞股蓝总皂苷对血管性痴呆大鼠海马一氧化氮合酶及核酸的保护作用

齐 刚,张 莉,吴光亮,熊 杰,李积胜*

(武警医学院 中心实验室,天津 300162)

摘要:目的 观察绞股蓝总皂苷(GP)对血管性痴呆(VD)大鼠海马神经元一氧化氮合酶(nNOS)及核酸的保护作用。方法 采用改良的 Pulsinelli 4血管阻断(4-VO)方法建立大鼠 VD模型,用免疫组化法研究 GP对大鼠海马 nNOS的表达的影响,并用吡啶橙染色法进行 GP对 VD大鼠海马的 DNA和 RNA保护作用的研究。结果与正常对照组比较,VD大鼠海马 CA₁区和 CA₃区 nNOS阳性神经元数目明显减少,而 DNA和 RNA吡啶橙染色后的荧光强度(反映 DNA和 RNA含量)明显减弱,GP 200 mg/kg ig 给药组海马各亚区的 nNOS阳性神经神经细胞数比 VD模型组明显增多, DNA和 RNA吡啶橙染色后的荧光强度强于 VD模型组,与正常对照组相似。结论 GP可明显增强 VD大鼠海马 nNOS阳性神经元的表达,并对 DNA和 RNA有保护作用。

关键词: 绞股蓝总皂苷; 血管性痴呆; 一氧化氮合酶; 核酸

中图分类号: R286.10

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)07-0630-03

Protective effect of gypenosides on expression of neuronal nitric oxide synthase and nucleic acid in hippocampus of vascular dementia rat

QI Gang, ZHANG Li, WU Guang-liang, XIONG Jie, LI Ji-sheng

(Central Laboratory of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract Object To observe the protective effect of gypenosides (GP) on the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and the nucleic acid of hippocampus in vascular dementia (VD) of rats.

Methods Modified Pulsinelli's 4-vessel occlusion (4-VO) method was used to establish the models of VD in rats. The immunohistochemical method and acridine orange (AO) staining method were used to investigate the expression of nNOS and the DNA and RNA contents in different hippocampus subfields in VD rats. **Results** The number of nNOS positive neurons decreased significantly and the fluorescent intensity (reflecting DNA and RNA contents) of the DNA and RNA abated markedly in the areas of hippocampus of VD group compared with the normal control group. In the group of ig GP (200 mg/kg), the number of nNOS positive neurons increased significantly and the fluorescent intensity of the DNA and RNA enhanced markedly compared with the model group and was the same as the control group. **Conclusion** It is shown that the expression of nNOS could be increased significantly and the injury of nucleic acid decreased in hippocampus of VD rats by GP.

Key words gypenosides; vascular dementia (VD); nitric oxide synthase (NOS); nucleic acid

老年痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 是一种慢性的大脑退行性病变,可分为 3种,即老年性痴呆 (AD)、血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 和二者并存的混合性痴呆^[1],伴随着人口老龄化,AD 的发病率逐渐增高。而 VD则是由于各种类型的脑血管病所致的认知功能选择性和可逆性损害的综合征,鉴于 VD由脑缺血引发,而脑缺血可导致 nNOS 神经元的变化,并诱发以神经元 DNA早期降解为特征的神经元凋亡,本实验进行了绞股蓝皂苷 (gypenosides, GP) 对 VD导致的海马 nNOS 阳性神经元和 DNA, RNA 损伤的保护作用的研究,旨

在进一步揭示 GP防治 VD的作用机制,以期治疗 VD药物的开发提供理论依据。

1 材料

1.1 动物: Wistar大鼠,雄性,体重 240~260 g,天津市医学实验动物中心提供 (天津市医动字第 006号,编号 2000-014)。

1.2 药品与试剂: 绞股蓝总皂苷 (含量 > 90%), 华光实业有限公司提供; nNOS 抗体, Santa Cruz 产品; ABC, Vector 公司; DAB和吡啶橙, Sigma 公司出品; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器: 恒冷箱冰冻切片机, 英国 Bright 公司出

* 收稿日期: 2002-10-30

作者简介: 齐 刚 (1962-), 男, 辽宁人, 教授, 硕士学位, 主要从事心脑血管药理学研究。E-mail: qgang@eyou.com

品; U1111荧光显微镜,日本 Nikon公司出品

2 方法

2.1 VD大鼠模型制备^[2]:取大鼠 30只随机分 3组。VD模型组 ip戊巴比妥钠 40 mg/kg麻醉固定,切开颈部皮肤,分离椎旁肌,暴露第一颈椎翼状孔,电灼烧凝固双侧翼小孔内的椎动脉,造成永久性闭塞,24 h后,乙醚浅麻醉,切开腹侧颈中皮肤,分离双侧颈总动脉,用动脉夹可逆性夹闭双侧颈总动脉 5 min,缺血共 3次,每次间隔 1h 术后饲养 4周进行灌注固定并取材切片。GP 200 mg/kg 给药组 ig 给药 1周后,按照 VD模型制备方法进行手术,术后饲养 4周并观察。伪手术对照组:行同样手术但不灼烧椎动脉,不夹闭颈总动脉,术后饲养 4周。

2.2 组织取材:取上述各组大鼠,ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉固定后,于 30~40 min内,从左心室快速依次灌注生理盐水 100~150 mL,4% 多聚甲醛 500 mL(4℃)。迅速取脑,置 4℃ 同样的固定液中固定 7~9 h后,移入 20% 蔗糖溶液中浸泡 12 h以上,以恒冷箱冰冻切片机切片(片厚 50 μm)。

2.3 免疫组化染色^[3]:切片移入 Triton-H₂O₂中(37℃),30 min后取出用 PBS漂洗,再用 3% 正常血清封闭 30 min,然后加 nNOS 抗体(1:100)4℃ 孵育 72 h 漂洗后加二抗孵育 60 min,漂洗后 ABC(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex, 1:200)液孵育 60 min,用 0.05% DAB-0.01% H₂O₂显色,镜下控制反应强度,裱片,脱水,透明,封片。另取切片用 pH 7.4的 0.01 mol/L PBS接片,进行吖啶橙染色^[4],荧光显微镜下观察结果并拍照

2.4 nNOS阳性神经元计数:每组选取对应断面的海马脑片 15张,分别计数 CA₁, CA₃区内所有 nNOS阳性神经元

2.5 统计学分析:用 SAS 6.12软件包进行 *t* 检验

3 结果

3.1 对照组海马结构内 nNOS阳性神经元的形态和分布及 DNA和 RNA染色结果:对照组大鼠海马 CA₁区和 CA₃区均有 nNOS阳性神经元分布。染色较深,神经纤维较长。CA₁区 nNOS阳性神经元散在分布于锥体层,腔隙分子层和辐射层,细胞多为圆形、椭圆形的中小细胞,偶有梭形、锥形细胞(见封 3,图 1-a1)。CA₃区阳性细胞较多,为中小型细胞,均为深蓝色(见封 3,图 1-b1)。荧光显微镜下,对照组海马 CA₁区及 CA₃区 DNA和 RNA呈橙黄色,均匀分布于海马锥体细胞层(见封 3,图 2-c1, d1)。

3.2 VD组海马结构内 nNOS阳性神经元的形态

和分布及 DNA和 RNA染色结果:VD组海马结构内 nNOS阳性神经元亦可见于 CA₁区及 CA₃区,其细胞形态和分布模式与对照组无显著差别,但 nNOS阳性神经元数明显减少($P < 0.05$),见表 1,反应强度变弱,神经纤维变短(见封 3,图 1-a2, b2)。VD组海马 CA₁区及 CA₃区 DNA和 RNA荧光反应强度(反映 DNA和 RNA含量)明显减低(见封 3,图 2-c2, d2)。

3.3 GP组海马结构内 nNOS阳性神经元的形态和分布及 DNA和 RNA染色结果:GP组海马结构内 nNOS阳性神经元的形态、分布、反应强度和神经纤维长度与对照组基本相同(见封 3,图 1-a3, b3),而神经细胞数比 VD组明显增多($P < 0.001$),见表 1。GP(200 mg/kg)组海马 CA₁区, CA₃区的 DNA和 RNA荧光反应强度较 VD组明显增强(见封 3,图 2-c3, d3),与对照组反应强度和分布模式基本相同。

3.4 海马结构内 nNOS阳性神经元变化:对照组、VD组及 GP组海马各亚区 nNOS阳性神经元数量的变化,见表 1。

表 1 海马各亚区 nNOS阳性神经元数目的变化($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 Numeral changes of nNOS-positive neurons in hippocampus subfields ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	CA ₁	CA ₃
对照	-	24.73 ± 5.72	37.13 ± 5.10
模型	-	20.47 ± 4.22*	25.47 ± 3.52*
GP	200	30.00 ± 3.63 [△]	38.00 ± 5.00 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.001$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.001$ vs model group

4 讨论

一氧化氮(NO)在中枢神经系统中起信使和递质样作用,适量的 NO通过激活腺苷酸环化酶,使环磷酸腺苷增加,扩张血管并抑制血小板黏附聚集,调节脑血流,对神经元具有保护作用,NO阳性神经元能抵御某些神经毒素的毒害作用^[5,6]。但脑内 NO的过量释放对其周围神经元又有毒性作用^[7,8],NO引起的神经毒性主要通过产生大量·OH及 NO₂·,造成蛋白质、核酸、脂质膜损伤^[9]。观察生成 NO的专一合成酶 NOS可间接了解 NO在组织中的分布。缺血导致的海马区神经元的坏死发生于血供恢复的 2~3 d,即“迟发性神经元坏死(delayed neuronal death, DND)”^[10],NOS阳性神经元在缺血过程中有先升高后下降的变化过程,认为在早期海马内 NOS的大量表达及由此引起的 NO合成和

释放增多是造成 DND 现象的一个重要原因^[11]。随着缺血时间的延长,可能有诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的激活,从而产生大量具有神经毒性作用的 NO,在海马迟发性神经元凋亡及 VD 的形成中发挥了一定作用。

已有研究表明,GP 对大鼠全脑缺血再灌注损伤及家兔急性不完全性脑缺血具有保护作用,认为 GP 对缺血脑组织的保护作用不仅与其抑制自由基的产生和脂质过氧化有关,而且与其对缺血脑组织的神经细胞膜及微血管的稳定性的保护作用相关^[12]。本研究结果显示,VD 组大鼠在饲养 4 周后海马内 nNOS 神经元表达明显减少,这可能与缺血早期 NOS 大量表达产生大量具有神经毒性作用的 NO 有关。而 GP 组海马内 nNOS 神经元表达与正常对照组相似,表明 GP 可保护海马内 nNOS 阳性神经元免受大量的 NO 所导致的 DND。GP 的这一保护作用可能与其抑制由 NO 产生大量 $\cdot\text{OH}$ 及 $\text{NO}_2\cdot$ 自由基有关。

脑缺血再灌注损伤不完全是一种被动的神经元坏死的过程,尚伴有细胞凋亡。一般认为海马 CA₁区、CA₃区为脑缺血再灌注的易损区,脑缺血再灌注可导致细胞浆内钙离子增多,激活钙镁依赖的核酸内切酶,将 DNA 切割成大小不一的寡核苷酸片段,即形成 DNA 梯(DNA laddering),是神经元凋亡的重要特征之一。本研究结果显示脑缺血再灌注模型组海马 CA₁区、CA₃区 DNA 和 RNA 荧光反应强度明显减低,即 DNA 及 RNA 含量降低。GP 对全脑缺血再灌注大鼠海马具有保护作用,减少了缺血再灌注对海马 CA₁区、CA₃区 DNA 和 RNA 的影

响。DNA 和 RNA 与蛋白质的合成密切相关,此作用的机制及其与 GP 抗衰老、改善学习记忆及对 VD 保护作用的关系,有待于进一步研究。

References

- [1] Zhang J T. Pathogenesis and therapeutic strategies of senior dementia [J]. *Acta Pharma Sin* (药学报), 2000, 35: 635-640.
- [2] Xu D Y, You G X, Miao J T, et al. An experimental study of the nitric oxide mechanism in acute cerebral ischemia and during the process of vascular dementia formation [J]. *Chin J Geriatr* (中华老年医学杂志), 1999, 18: 240-243.
- [3] Kato H, Kogure K, Liu Y, et al. Induction NADPH-diaphorase activity in the hippocampus in rat model of cerebral ischemia and ischemia tolerance [J]. *Brain Res*, 1994, 652: 71-75.
- [4] Jiang B. *Apoptosis Basis and Clinic* (细胞凋亡基础与临床) [M]. Beijing: People Military Surgeon Publishing House, 1999.
- [5] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule [J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 175-178.
- [6] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: a novel neuronal messenger [J]. *Neuron*, 1992, 8: 3-5.
- [7] Vincent S R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central system [J]. *Prog Neurobiol*, 1994, 42: 129-131.
- [8] Benzing W C, Mufson E J. Increase number of NADPH-diaphorase positive neurons within the substantia innominata in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 1995, 670: 351-353.
- [9] Beckman JS, Beckman T W, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1620-1624.
- [10] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia [J]. *Brain Res*, 1982, 239: 57-69.
- [11] Xie M, Gu Y M, Yao Z B. Changes of NADPH-diaphorase activity in rat hippocampus following transient cerebral ischemia [J]. *Chin J Neuroanat* (神经解剖学杂志), 1998, 14: 8-12.
- [12] Wang Z Y, Qiu P L. Protective effect of gypenosides on acute incomplete cerebral ischemia in rabbits [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1992, 6: 204-206.

槲皮素对阿尔茨海默病大鼠学习记忆影响及与海马细胞凋亡关系的研究

李永金¹, 顾振纶², 陈月芳³, 周文轩⁴, 郭次仪^{4*}

(1. 江苏大学医学院 药理教研室, 江苏 镇江 212001; 2. 苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 3. 江苏大学医学院 机能实验室, 江苏 镇江 212001; 4. 香港保健协会, 香港)

摘要:目的 观察槲皮素 (Que) 对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型大鼠学习记忆影响并探讨其与海马细胞凋亡的关系。方法 用立体定位技术对海马 CA₁区微量注射喹啉酸 (QA) 造成 AD 模型; Y 形迷宫检测

* 收稿日期: 2002-09-27

作者简介: 李永金 (1968-), 男, 江苏仪征人, 药理学硕士, 讲师, 从事药理学教学科研工作, 中国药理学会会员, 江苏省药理学会常务理事, 主要研究方向为神经药理学。

Tel (0511) 5038157 E-mail lyj3600@163.com