

蝙蝠葛酚性碱对小鼠脑缺血-再灌注脑组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

吕 青, 曲 玲, 王 芳, 郭莲军*

(华中科技大学同济医学院 药理系, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 研究蝙蝠葛酚性碱对小鼠脑缺血-再灌注后脑组织凋亡相关蛋白表达的影响。方法 采用免疫组织化学方法观察凋亡促进蛋白 Bax、凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达。结果 皮质缺血复灌 12 h、海马 CA₁ 区于缺血复灌 24 h Bax 表达明显增多, Bcl-2 表达明显减少, 蝙蝠葛酚性碱预防给药能抑制脑组织 Bax 的表达, 并促进 Bcl-2 表达, 减少脑细胞凋亡。结论 蝙蝠葛酚性碱能抑制缺血-再灌注后脑组织损伤, 使凋亡细胞减少, 对脑缺血有一定的保护作用。

关键词: 蝙蝠葛; 脑缺血-再灌注; 细胞凋亡; Bax 蛋白; Bcl-2 蛋白

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)02-0185-03

Effect of phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* on expression of protein Bax, Bcl-2 in brain of cerebral ischemia-reperfusion mice

LU Qing, QU Ling, WANG Fang, GUO Lian-jun

(Department of Pharmacology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Key words: *Menispermum dauricum* DC.; cerebral ischemia-reperfusion; cell apoptosis; Bax protein; Bcl-2 protein

蝙蝠葛酚性碱 (phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* DC., PAMD) 是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 根茎中提取的多种脂溶性生物碱的混合物, 其主要成分为蝙蝠葛碱 (dauricine, DAU) 和蝙蝠葛苏林碱 (dauriso-line, DS)。DAU 和 DS 均属双苄基四氢异喹啉类生物碱, 具钙拮抗作用^[1]。研究证明 PAMD 能延长小鼠缺血缺氧存活时间, 缩小大鼠大脑中动脉栓塞的脑梗死面积, 及抗脂质过氧化作用^[2]。本研究采用小鼠不完全性脑缺血-再灌注模型, 研究 PAMD 对凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 表达的影响, 进一步研究 PAMD 对脑缺血的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器: 蝙蝠葛酚性碱 (蝙蝠葛碱含量约 90%), 中国科学院昆明植物研究所潘锡平博士提供。Bax, Bcl-2 免疫组化试剂盒, 北京中山生物试剂有限公司产品, 抗体浓度为 1:50。HPIAS-1000 型彩色病理图文分析系统, 千屏影像工程公司。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 (22±2) g, 华中科技大学同济医学院动物学部提供。

1.3 动物分组及给药方法: 昆明种小鼠 80 只, 随机分为假手术组 (Sham)、单纯缺血组 (I)、缺血复灌不同时间组 (I-R): 又分为缺血 1 h 复灌 6, 12, 24 h 组, 缺血复灌不同时间 + PAMD 治疗组 (I-R + PAMD): 分为缺血 1 h 复灌 6, 12, 24 h 治疗组。PAMD 治疗组按 30 mg/kg 于缺血前 10 min ip 给药, 其他组以等量生理盐水代替。

1.4 小鼠不完全性脑缺血-再灌注模型制备^[3]: 小鼠称重, 戊巴比妥钠 30 mg/kg ip 麻醉, 仰卧位固定于恒温手术台上 (温度 37℃), 颈部正中切口, 分离双侧颈总动脉并用无损伤动脉夹夹闭, 同时眼眶后静脉丛放血每只鼠 0.3 mL, 缺血 1 h 即造成单纯不完全性脑缺血; 缺血 1 h 后, 松开动脉夹, 使血流再通, 即形成再灌注。假手术组仅分离双侧颈总动脉不结扎。达再灌时限时重新麻醉动物, 在麻醉状态下 (麻醉不宜过深), 以 4% 多聚甲醛行心脏灌流固定, 开颅取前脑, 置 4% 多聚甲醛液, 4℃冰箱中固定过夜。在额极后 3 mm 处沿冠状面取 1 mm 厚脑切片, 常规脱水, 石蜡包埋, 取连续 3 张切片, 中间 1 张做 HE 染色观察细胞形态改变, 相邻切片分别做免疫组化染色检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达情况。

* 收稿日期: 2003-07-25

作者简介: 吕 青 (1975—), 女, 湖北武穴人, 华中科技大学同济医学院药理系助教, 医学硕士, 主要研究方向为心脑血管药理。

Tel: (027) 83691762 E-mail: lvq21e@yahoo.com.cn

1.5 免疫组织化学检测: 采用链霉亲合素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 法, 各步操作严格按照 SABC 试剂盒说明进行。阳性判断标准: 神经元胞浆或胞核有棕色颗粒者为阳性细胞。每张切片在皮质和海马 CA₁ 区各采集 10 个高倍镜视野, 输入病理图文分析系统进行测定, 可分别计算 Bax、Bcl-2 的吸光度值, 由此可对相关抗原表达进行定量分析。

1.6 统计学处理: 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 PAM D 对小鼠不完全性脑缺血-再灌注脑组织病理形态改变的影响: 光镜下假手术组小鼠脑皮质、海马区锥体细胞排列整齐, 核膜、核仁清晰, 大小规整, 细胞外间隙较窄。单纯缺血组小鼠神经细胞胞核着色过深, 部分出现变形固缩。缺血再灌注组小鼠脑组织发生不同程度的病理改变, 细胞除变形固缩外, 还出现胞核碎裂, 胞体膨胀裂解, 细胞间隙增大, 细胞数量减少。药物治疗组脑组织病变较模型组均明显减轻, 表现为细胞数目增加, 形态完整规则。

2.2 对小鼠不完全性脑缺血-再灌注皮质部 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响: 见表 1。假手术组、单纯缺血组小鼠皮质区 Bcl-2 蛋白表达吸光度值较高, 两组结果比较无统计学差异; 缺血后再灌注 6、12 和 24 h 各组 Bcl-2 蛋白表达吸光度值均明显降低, 与假手术组、单纯缺血组比较, 结果差异显著 ($P < 0.001$)。单纯缺血组小鼠皮质区 Bax 蛋白表达吸光

表 1 小鼠缺血-再灌注后皮质部 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Expression of Bcl-2 and Bax protein in cortex in ischemia-reperfusion mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	再灌注 时间/h	Bcl-2 吸光度	Bax 吸光度	Bcl-2 /Bax
Sham	-	0.129 0±0.004 6	0.126 9±0.003 9	1.02
I	-	0.129 5±0.006 6	0.133 6±0.010 4	0.97
I-R	6	0.089 6±0.003 2 ^{***}	0.218 8±0.016 7 ^{***}	0.41
	12	0.078 1±0.016 9 ^{***}	0.214 6±0.009 1 ^{***}	0.36
	24	0.092 2±0.005 3 ^{***}	0.156 5±0.027 5 ^{***}	0.59
I-R+ PAM D	6	0.130 8±0.021 8 ^{###}	0.125 8±0.002 7 ^{###}	1.04
	12	0.121 1±0.013 8 ^{###}	0.137 8±0.005 9 ^{###}	0.88
	24	0.114 6±0.008 0 ^{###}	0.123 2±0.008 2 ^{###}	0.93

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
与单纯缺血组比较: $P < 0.05$ $P < 0.001$
与缺血复灌相应时间组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$
^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs Sham group
 $P < 0.05$ $P < 0.001$ vs group I
^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs group I-R at corresponding

time

度值与假手术组比较有升高趋势, 但结果无统计学差异; 缺血后再灌注 6、12 h 组, Bax 蛋白表达吸光度值进一步升高, 与假手术组、单纯缺血组比较, 结果均有显著差异 ($P < 0.001$), 缺血后再灌注 24 h 组 Bax 蛋白表达吸光度值较 6、12 h 有所降低, 但与假手术组、单纯缺血组比较差异显著。PAM D 30 mg/kg 于缺血前 10 min ip 给药后, 使缺血复灌 6、12 和 24 h 各组的 Bcl-2 蛋白表达吸光度值明显升高; 并使 Bax 蛋白表达吸光度值明显降低, 与相应缺血复灌组比较结果差异均显著。

2.3 对小鼠不完全性脑缺血-再灌注海马部 CA₁ 区 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响: 见表 2。单纯缺血组小鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2 蛋白表达吸光度值与假手术组比较差异无统计学意义; 缺血后随再灌注时间延长 Bcl-2 蛋白表达进行性降低, 至再灌注 24 h 达到最低。假手术组小鼠海马 CA₁ 区有较弱 Bax 蛋白表达, 缺血 1 h 后, Bax 蛋白表达吸光度值开始升高, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.001$)。缺血后随再灌注时间延长, Bax 蛋白表达持续升高, 至再灌注 24 h 达到最高峰, 与假手术组、单纯缺血组比较, 结果均有显著性差异。PAM D 30 mg/kg 于缺血前 10 min ip 给药后, 使缺血复灌 12、24 h 组的 Bcl-2 蛋白表达增加, 并使缺血复灌 12、24 h 组 Bax 蛋白表达吸光度值降低, 与相应缺血再灌注组比较结果差异均有显著性。

表 2 小鼠脑缺血-再灌注后海马 CA₁ 区 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Expression of Bcl-2 and Bax protein in hippocampi CA₁ area in ischemia-reperfusion mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	再灌注 时间/h	Bcl-2 吸光度	Bax 吸光度	Bcl-2 /Bax
Sham	-	0.127 2±0.003 3	0.092 6±0.005 3	1.37
I	-	0.124 1±0.009 2	0.128 6±0.010 5 ^{**}	1.04
I-R	6	0.110 4±0.018 7 [*]	0.133 1±0.000 9 ^{***}	0.83
	12	0.088 8±0.003 5 ^{***}	0.159 1±0.007 5 ^{***}	0.56
	24	0.085 1±0.012 4 ^{***}	0.174 7±0.015 6 ^{**}	0.49
I-R+ PAM D	6	0.112 2±0.010 5	0.136 2±0.016 7	0.82
	12	0.114 4±0.001 5 ^{###}	0.130 7±0.006 0 ^{###}	0.88
	24	0.129 0±0.006 6 ^{###}	0.123 6±0.002 4 ^{###}	1.04

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
与单纯缺血组比较: $P < 0.05$ $P < 0.001$
与缺血复灌相应时间组比较: ^{###} $P < 0.001$
^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs Sham group
 $P < 0.05$ $P < 0.001$ vs group I
^{###} $P < 0.001$ vs group I-R at corresponding time

3 讨论

缺血可导致脑损伤, 再灌注可加重脑组织原有

的缺血性损伤,引起能量衰竭和酸中毒,产生大量自由基、兴奋性氨基酸,一氧化氮积聚,并引起离子稳机制破坏,导致细胞内钙超载,最终引起某些原癌基因的表达,诱导凋亡发生,细胞凋亡^[4,5]。细胞凋亡是受基因调控的,如凋亡抑制基因 Bcl-2、p53,凋亡促进基因 Bax、c-myc、fas 等。Bax 是一种由 192 个氨基酸残基组成的,相对分子质量为 21 000 的蛋白质,与 Bcl-2 的同源性为 21%,但 Bax 与 Bcl-2 的作用完全相反。在体内, Bax 单体或 Bcl-2 形成的异二聚体促进凋亡的发生。因此, Bcl-2 与 Bax 表达的比率决定着细胞在受到凋亡刺激信号后是生存还是凋亡^[6,7]。

本实验观察到与单纯缺血组比较,小鼠不完全性脑缺血后复灌 6、12 h 组的皮质 Bax 表达显著增多, Bcl-2 表达持续减少,缺血后复灌 12 h 组 Bcl-2/Bax 比值较低;而缺血后复灌 24 h 组的 Bax 表达较 6、12 h 有所降低,伴随着 Bcl-2 的表达增加, Bcl-2/Bax 比值升高。结果提示皮质缺血后复灌损伤引起的细胞凋亡在复灌 12 h 时达高峰,随着复灌时间的延长,缺血区血供有所恢复,细胞损害有所减轻。本实验亦观察了缺血及复灌后海马 CA₁区的动态变化,单纯缺血 1 h 后,海马 CA₁区 Bax 表达增多, Bcl-2 表达无明显改变;脑缺血复灌后 6、12 至 24 h,海马 CA₁区 Bax 表达持续增多,同时 Bcl-2 表达持续减少,缺血后复灌 24 h 组 Bcl-2/Bax 比值最低,提示此时细胞凋亡达一个高峰,这种缺血后的迟发性神经元坏死现象与文献报道基本一致^[8]。本实验观察到单纯缺血组 Bcl-2 表达并不减少,推测可能与神经细胞自我保护机制有关,可防止或减少缺血所致凋亡的发生。PAMD 预防给药后,能抑制凋亡促进因子 Bax、促进凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达,

提高 Bcl-2/Bax 比值,对缺血复灌后皮质细胞的凋亡及海马 CA₁区迟发性神经元坏死均有抑制作用。

PAMD 对凋亡基因表达的影响可能与其钙拮抗作用有关。初步实验证明 PAMD 能抑制 Ca²⁺ 的释放,其对高钾去极化引起的离体兔外周血管、脑血管收缩有扩张作用;能抑制脑缺血-再灌过程中超氧化物的产生,减轻缺血-再灌损伤^[2]。因此, PAMD 可能是通过其钙拮抗作用,引起原癌基因表达发生改变而起到脑保护作用的。

References:

- [1] Zhang Y A, Li Z Q, Hu Z Y, *et al.* Antagonistic effects of several dauricine derivatives on Ca²⁺ [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1994, 25(5): 303-305.
- [2] Wang F, Qu L, Lü Q, *et al.* Effect of phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* on myocardial-cerebral ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2001, 22(12): 1130-1134.
- [3] Wang W T, Guo L J, Qu L, *et al.* Protective effects of 1-(2,6-dimethylphenoxy)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethylamino) propane hydrochloride on brain ischemia and reperfusion injury in mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15(2): 137-140.
- [4] Mackenzie E T, McCulloch J, Harper A M. Influence of endogenous norepinephrine on cerebral blood flow and metabolism [J]. *Am J Physiol*, 1976, 231(2): 483-488.
- [5] Savitz S I, Rosenbaum D M. Apoptosis in neurological disease [J]. *Neurosurgery*, 1998, 42: 555-572.
- [6] Krajewski S, Krajewska M. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2 [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145: 1323-1336.
- [7] Miyashita T, Reed J C. Bcl-2 oncoprotein block chemotherapy induced apoptosis in a human leukemia cell line [J]. *Blood*, 1993, 81: 151.
- [8] Liu S R, Meng L, Liu H Q, *et al.* Cell apoptosis in hippocampus after cerebral ischemia-reperfusion and detection of Bcl-2 and Bax [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1999, 2(7): 435-437.

美国 ALPHA 实验室认可

美中国际合作中国企业

葡萄籽提取物

(原花青素≥95%)

专业生产厂家

电话: 0086-022-26721040; 26723305; 26737125

传真: 0086-022-26721041

网址: <http://www.jf-natural.com>

Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd

天津尖峰天然产物公司

天津北辰科技园科园路