

- resistance and type 2 diabetes [J]. *Med Philo* (医学与哲学), 2004, 25(2): 4-5.
- [2] Mao C P, Gu Z L. Studies of puerarin on pharmacology and clinic [J]. *Chin J Hemorheol* (中国血液流变学杂志), 2004, 14(1): 138-142.
- [3] Mao C P, Gu Z L, Xu X H, et al. Effect of puerarin on morphology and function of aortic endothelium in diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 402-405.
- [4] Mao C P, Gu Z L, Cao L. Effects of puerarin on renal protein kinase C activity in diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1141-1144.
- [5] Mao C P, Gu Z L. Effects of puerarin on sICAM-1, OX-LDL levels in serum and TNF- α level in plasma of diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 86-88.
- [6] Zhang J T. *Modern Methodology in Pharmacological Experiment* (现代药理实验方法学) [M]. Beijing: Peking Medical College and Peking Union Medical College United Publishing House, 1998.
- [7] Li G W, Pan X R, Stephen L, et al. A new insulin-sensitivity index for the population-based study [J]. *Chin J Intern Med*, 1993, 32(10): 656-660.
- [8] Moller D E, Flier J S. Insulin resistance mechanism, syndromes, and implications [J]. *N Eng J Med*, 1991, 325(13): 928-948.
- [9] Liu Y L, Chen S H, Chen X B. Effects of puerarin on insulin-sensitivity in type 2 diabetic sufferer [J]. *Liaoning J Pract Diabetol* (辽宁实用糖尿病杂志), 2000, 8(1): 26.

蒺藜皂苷对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

关欣, 纪影实, 李红, 杨世杰*

(吉林大学基础医学院 药理学教研室, 吉林 长春 130021)

缺血性脑血管疾病是心脑血管疾病中的常见病、多发病, 是危害人类健康的三大疾病之一, 严重影响了人们的正常生活和身体健康。蒺藜皂苷(gross saponins from *Tribulus terrestris* L., GSTT) 是从蒺藜地上部分中提取, 临床主要用于心脑血管疾病的治疗。本课题组研究^[1,2]表明, GSTT 可减轻心肌缺血损伤, 抑制心肌细胞凋亡, 减轻脑缺血神经功能缺损, 改善生化指标。本实验在此基础上进一步研究 GSTT 对脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的保护作用并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 药品和试剂: GSTT, 质量分数>90%, 吉林敖东兆南药业股份有限公司提供, 批号 20030218; 尼莫地平, 天津市中央药业有限公司生产, 批号 050306; 红四氮唑 (TTC), 中国医药上海化学试剂总厂, 批号 20031103; TUNEL 试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司生产; DNA ladder 提取试剂盒, 北京鼎国生物技术有限公司产品; 免疫组化试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 动物: Wistar 大鼠, 由吉林大学实验动物中心提供。

1.3 仪器: 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 水平

电泳仪, 江苏海门市麒麟医用仪器厂; GIS-2008 天能凝胶成像分析仪, 上海天能科技有限公司。

2 方法

2.1 分组及给药: 60 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 300~350 g, 随机分为 6 组。假手术组、模型组(注射等体积生理盐水)、阳性对照药尼莫地平组(11 mg/kg)、GSTT 高、中、低剂量(30、10、3 mg/kg)组, 各组均 ip 给药, 连续给药 5 d, 每天 1 次。

2.2 大鼠脑缺血再灌注损伤模型制备: 于末次给药后 30 min, 动物 ip 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉。仰卧位固定, 行颈正中切口, 分离暴露右侧颈总动脉、右侧颈内动脉、右侧颈外动脉; 结扎颈总动脉近心端和颈外动脉, 用动脉夹夹闭颈总动脉, 并在颈总动脉剪开一小口, 将直径 0.175 mm 的尼龙线插入颈总动脉约 18.5 mm, 遇阻即止, 阻塞大脑中动脉起始部, 然后逐层缝合肌肉和皮肤, 单笼饲养。术后自由进食、饮水, 2 h 后拔出栓线使血流再灌注 22 h, 假手术组仅分离右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉, 其余同上。参照文献方法^[3,4]将大鼠于术后 24 h 进行行为学评分, 满分 4 分, 得分高者, 运动障碍明显, 选择神经功能评分 1 分及以上者进行下述实验。

2.3 脑梗死面积测定: 实验结束后, 将大鼠快速断

收稿日期: 2005-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472020); 高校博士点基金支持资助项目(20050183029)

作者简介: 关欣(1981-), 女, 吉林省吉林市人, 硕士, 主要从事心脑血管药理学研究。

Tel: (0431) 5619799 E-mail: guanxinyao@126.com

* 通讯作者 杨世杰 Tel: (0431) 5619483 E-mail: jcyao@sina.com

头取脑,分离去除嗅球、小脑和低位脑干后,保留大脑部位,行冠状切片,切成厚约 2 mm 的脑片。将切片置于 2% TTC 磷酸盐缓冲溶液中,37 ℃ 温孵 10 min。染色后,正常脑组织呈玫瑰红色,而梗死组织呈白色,用透明玻璃纸包裹后,以扫描仪描记标本的肉眼形态学变化,根据图像分析法,计算出梗死区域面积占大脑半球面积的百分比。

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳:取缺血部位脑组织(假手术组取相同质量的手术侧大脑中动脉供血区组织),液氮研磨,按 DNA 提取试剂盒要求提取 DNA。每个泳道的上样量为 10 μ L,用 16 g/L 琼脂糖凝胶电泳,电压为 4 V/cm,EB 染色,紫外灯下观察拍照。

2.5 TUNEL 法检测神经细胞凋亡:脑组织切片常规脱蜡至水,按试剂盒操作说明进行 TUNEL 染色,成色反应后,常规脱水,二甲苯透明,封片,光学显微镜下观察胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。在 400 $\times$ 显微镜下,于缺血侧大脑皮质随机采集 5 个非重叠视野检测 TUNEL 阳性细胞数。

2.6 免疫组化染色检测 Bax 蛋白的表达:脑组织切片常规脱蜡至水,按免疫组化 SABC 试剂盒要求操作,成色反应后,常规脱水,二甲苯透明,封片,光学显微镜下观察在胞浆中有棕色颗粒者为阳性细胞。在 400 $\times$ 显微镜下,于缺血侧大脑皮质随机采集 5 个非重叠视野检测阳性细胞数。

2.7 统计学处理:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 t 检验。

3 结果

3.1 GSTT 对脑缺血再灌注损伤大鼠梗死面积的影响:假手术组脑组织 TTC 染色呈均匀的玫瑰红色。模型组脑组织可见局灶性的白色拒染区域即梗死灶 ($P < 0.001$),说明模型成功。GSTT 高、中剂量组及尼莫地平阳性药组梗死面积与模型组比较明显缩小 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),且量效关系明显。低剂量组亦有一定作用,但无统计学意义 ($P > 0.05$),结果见表 1。

3.2 琼脂糖凝胶电泳结果:DNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示,假手术组呈现正常基因组条带。模型组和 GSTT 低剂量组可见典型的 DNA ladder 图谱,断裂的 DNA 片段约为 180 bp 或其整数倍。阳性药及 GSTT 高、中剂量组未见明显凋亡特征性条带,结果见图 1。

3.3 GSTT 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的影响:TUNEL 染色结果显示,假手术组凋亡细

表 1 莪藤皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of GSTT on infarction area in cerebral ischemia reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

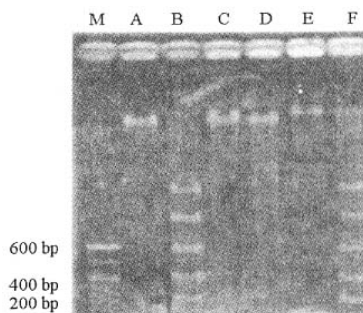
组 别	剂量/(g $\cdot$ kg ⁻¹)	梗死面积/%
假手术	—	0
模型	—	43.90 $\pm$ 2.70 $\Delta\Delta\Delta$
尼莫地平	—	37.90 $\pm$ 3.50 **
GSTT	30	27.60 $\pm$ 3.70 ***
	10	32.90 $\pm$ 3.30 **
	3	39.40 $\pm$ 5.20

与假手术组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

与模型组比较: $^{**} P < 0.01$ $^{***} P < 0.001$

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs Sham group

$^{**} P < 0.01$ $^{***} P < 0.001$ vs model group



M-Marker A-假手术组 B-模型组 C-尼莫地平组

D~F-莪藤皂苷 30, 10, 3 mg/kg 组

M-Marker A-Sham group B-model group C-Nemodipine group D-F-GSTT 30, 10, 3 mg/kg group

图 1 GSTT 对脑缺血再灌注大鼠梗死区脑组织 DNA Ladder 的影响

Fig. 1 Effect of GSTT on DNA Ladder of brain tissue in cerebral ischemia reperfusion rats

胞数为 3.33 ± 1.21 ,说明正常神经细胞也存在凋亡。模型组凋亡细胞数与假手术组比较明显增加 ($P < 0.001$)。阳性药及 GSTT 高、中、低剂量组凋亡细胞数与模型组比较明显减少 ($P < 0.01, 0.001$),结果见表 2。

3.4 GSTT 对脑缺血再灌注损伤大鼠梗死区 Bax 蛋白表达的影响:假手术组偶见 Bax 蛋白的表达。模型组 Bax 蛋白的表达与假手术组比较明显增加 ($P < 0.001$)。阳性药及 GSTT 高、中、低剂量组 Bax 蛋白的表达与模型组比较明显降低 ($P < 0.05, 0.01$),结果见表 2。

4 讨论

脑缺血再灌注损伤是指脑组织经历一定时间的缺血后恢复血流供应,而出现缺血性损伤进一步加重的现象。病理检查动脉供血区出现梗死灶,神经细

表 2 GSTT 对 TUNEL 阳性细胞数和 Bax 阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of GSTT on number of TUNEL and Bax positive cells in cerebral ischemia reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TUNEL 阳性细胞数	Bax 阳性细胞数
假手术	—	3.33±1.21	0.67±0.52
模型	—	22.33±1.51 $\Delta\Delta\Delta$	9.17±3.43 $\Delta\Delta\Delta$
尼莫地平	—	7.50±1.52***	5.33±1.03*
GSTT	30	6.67±1.51***	4.00±1.67**
	10	8.83±1.47**	5.67±1.21*
	3	9.83±0.75**	5.83±1.67*

与假手术组比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.001$

与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

$\Delta\Delta\Delta P<0.001$ vs Sham group

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

胞变性、坏死,动物则表现为不同程度的神经功能缺损,本实验结果显示,高、中剂量组梗死面积均明显缩小,说明其可减轻神经细胞损伤程度,改善脑功能^[5]。

脑缺血再灌注后产生大量氧自由基,超过组织清除能力,导致自由基的堆积。由于自由基的直接损伤或与细胞内钙超载、兴奋性氨基酸释放、NO 毒性等因素的综合作用致使细胞发生坏死或诱发凋亡。研究证实^[6],脑缺血再灌注后所发生的细胞迟发性死亡主要表现为凋亡。细胞凋亡时,染色质浓缩并在核小体之间断裂,形成 180~200 bp 整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形图谱,同时由于 DNA 断裂形成黏性 3'-OH,应用 TUNEL 染色可以检测细胞凋亡,而且细胞凋亡的数量随时间的变化呈曲线波动,研究表明^[7],缺血再灌注 2 h 即有细胞凋亡出现,24 h 达到高峰。本实验结果显示 GSTT 高、中剂量组凋亡细胞数明显减少,未见 DNA ladder 图谱,说明 GSTT 可抑制细胞凋亡,降低凋亡比率。

细胞凋亡是一种生理性调节,不仅存在于正常生理发育中,也发生在某些病理状态下。凋亡的发生是细胞接受各种凋亡信号,在基因的调控下发生的主动死亡过程^[8]。与凋亡有关的基因有多种,如: Bcl-2、p53、Bax、c-fos、c-myc 等。Bax 是一种由 192

个氨基酸残基组成,相对分子质量为 2.1×10^4 的促凋亡因子,正常情况下以单体形式存在于胞质中,受到凋亡刺激时,构象发生变化,导致寡聚体形成并整合到线粒体外膜,触发通透性转换孔道开放,使线粒体释放凋亡因子,从而触发凋亡。任何可以抑制 Bax 表达的因素都可以不同程度地减轻细胞凋亡^[9]。本实验结果显示 GSTT 各剂量组 Bax 蛋白的表达均明显降低,提示其抗凋亡作用可能是通过下调促凋亡蛋白 Bax 的表达实现的。

综上所述,GSTT 对脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡具有保护作用,其机制可能与抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达有关。

References:

- [1] Wang X H, Li H, Wen K, et al. Effect of anti-cerebral ischemia of gross saponin from *Tribulus terrestris* [J]. *Medical J Jilin Univ; Med Sci* (吉林大学学报:医学版), 2004, 30(1): 60-62.
- [2] Wang X Y, Li H, Yang S J, et al. Protective effect of total saponins of tribulus on cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2005, 21(1): 111-114.
- [3] Wang B G, Yuan Y Y, Wang S B, et al. An improvement of the model of focal cerebral ischemia and reperfusion with Line occlusion in rats [J]. *Acta Acad Med Qingdao Univ* (青岛大学医学院学报), 2005, 41(1): 73-74.
- [4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat [J]. *Stroke*, 1998, 20(1): 84-91.
- [5] Jiang Z W, Lu W W, Zhang Z Q. Protective effect of total saponins from fruit of *Tribulus terrestris* on experimental cerebral ischemia in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(11): 1020-1022.
- [6] Cohen G M. The executioners of apoptosis [J]. *Biochem J*, 1997, 326(1): 1-16.
- [7] Mei H S, Dong L F, Zhang G H, et al. Effect of dipfluzine on cell apoptosis after cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2005, 21(6): 701-703.
- [8] Diao Y, Li Y M, Chen C M, et al. Expression and significance of Bcl-2 and Bax protein in preconditioning cerebral ischemia tissue of rats [J]. *J Chin Med Univ* (中国医科大学学报), 2005, 34(3): 227-228.
- [9] Zamzami N, Susin S A. Mitochondrial control of nuclear apoptosis [J]. *Exp Med*, 1996, 183(4): 1533-1544.