

二苯乙烯苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响

赵玲¹, 李春阳¹, 张丽¹, 崔巍², 张兰¹, 李林^{1*}

(1. 首都医科大学宣武医院 药物研究室, 神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053;

2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

摘要: 目的 观察何首乌中提取的二苯乙烯苷对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型脑组织细胞凋亡及其凋亡调节因子的影响, 阐明二苯乙烯苷抗缺血性脑损伤的作用机制。方法 采用插线法阻断大脑中动脉, 制备局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型。用流式细胞术 PI 单染法检测脑组织细胞凋亡百分率, 用流式细胞术间接荧光法检测细胞凋亡调节因子 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。结果 二苯乙烯苷应用于缺血再灌注损伤大鼠可明显降低脑组织细胞凋亡百分率, 升高脑组织 Bcl-2 蛋白表达, 减少 Bax 蛋白表达, 提升 Bcl-2/Bax 比值。结论 二苯乙烯苷具有抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织细胞凋亡的作用, 其作用机制可能与升高抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白表达, 抑制诱导凋亡的 Bax 蛋白表达, 降低二者比值有关。

关键词: 何首乌; 二苯乙烯苷; 局灶性脑缺血; 细胞凋亡

中图分类号: R 286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0394-04

Effect of tetrahydroxy-stilbene glucoside on cell apoptosis in focal cerebral ischemia rats

ZHAO Ling¹, LI Chun-yang¹, ZHANG Li¹, CU I Wei², ZHANG Lan¹, LI Lin¹

(1. Department of Materia Medica, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Disease of Ministry of Education, Beijing 100053, China; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of tetrahydroxy-stilbene glucoside (TSG) in the extract of *Polygonum multiflorum* on cell apoptosis and its regulative factors under the condition of focal cerebral ischemia in rats and to explain its mechanism. **Methods** Rat model of transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used in the study. Fluorescent staining with flow cytometry was used to assay neuron survival and apoptosis rate; the expression of Bcl-2 and Bax proteins was examined by flow cytometry at the same time. **Results** Compared with sham group, the apoptotic rate of cerebral cells of model group increased, Bcl-2 protein decreased, and Bax protein increased significantly, the ratio of Bcl-2/Bax decreased. After given TSG for 7 d, the apoptotic rate of cerebral cells reduced significantly, Bcl-2 protein increased, and Bax protein decreased significantly, the ratio of Bcl-2/Bax increased. **Conclusion** TSG taken orally could inhibit the cell apoptosis caused by focal cerebral ischemia in rats, and its mechanism may be involved with increasing the expression of Bcl-2 protein which can inhibit cell apoptosis and decreasing the expression of Bax protein which can induce cell apoptosis and decrease the ratio of Bcl-2/Bax.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; tetrahydroxy-stilbene glucoside (TSG); focal cerebral ischemia; apoptosis

二苯乙烯苷 (2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG) 是从中药何首乌中提取的有效成分, 国内外研究表明, TSG 具有抗氧化、抗补体、扩张血管、抑制 Ca^{2+} -ATP 酶活性等神经保护作用^[1,2]。本室以往的研究表明, TSG 可明显拮抗连二亚硫酸钠诱导的大鼠原代培养海马神

经细胞拟缺血性损伤模型细胞存活率下降及乳酸脱氢酶漏出率增多^[3]; TSG 可明显改善双侧颈总动脉永久性结扎大鼠模型的学习记忆能力, 减轻海马神经元损伤程度, 降低过氧化产物的量^[4]。本实验 TSG 对脑缺血致细胞凋亡的影响入手, 分析 TSG 抗脑缺血损伤的作用机制, 为其应用于临床提供实

* 收稿日期: 2007-05-25

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (2003CB517104); 国家自然科学基金项目 (30500664); 北京市自然科学基金项目 (7050001, 7063079); 首都医学发展基金项目 (首发 03 III 21, 2002-3002); 北京市科技新星计划项目 (2005A 53, H 020821390190)

作者简介: 赵玲 (1972—), 女, 辽宁沈阳人, 助理研究员, 博士, 主要从事神经药理学及中药药理学研究工作。

E-mail: zhaoling72@hotmail.com

* 通讯作者 李林 Tel: (010) 83198886 Fax: (010) 83154745 E-mail: linli97@hotmail.com

验依据。

1 材料与方法

1.1 动物: SD 雄性成年大鼠, 体重 260~300 g, SPF 级, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK[京]11-00-0008。手术前夜禁食不禁水。

1.2 试剂与仪器: TSG (质量分数为 70%, 其余主要成分有 7% 的大黄素) 由本室自行研制提取工艺, 委托中国医药研发中心加工。尼莫地平片, 由正大青春宝药业有限公司生产。碘化吡啶 (PI) 购自 Sigma 公司。小鼠 Bcl-2 抗体和小鼠 Bax 抗体 (一抗)、FITC 标记的抗小鼠 IgG (二抗), 由美国 Santa Cruz 公司提供。FACS Calibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司产品。

1.3 动物模型的建立及分组给药: SD 大鼠随机分为 6 组: 假手术组, 模型组, TSG 30、60、120 mg/kg 组, 尼莫地平组 (14 mg/kg)。给药组 ig 给药 7 d 后造模。全部模型制作在层流环境下进行, 室温保持在 23~25 °C, 相对湿度 60%。SD 大鼠用 10% 水合氯醛 ip 麻醉 (0.4 g/kg), 采用插线法阻断大脑中动脉的方法造成局灶性脑缺血模型。方法参照 Longa 介绍并略作修改^[5]。栓塞后 2 h 拔线实现再灌注, 再灌注 24 h 后断头取脑, 进行流式细胞术检测。假手术组大鼠除不插入尼龙线外, 其他操作与手术组相同。

1.4 脑组织单细胞悬液的制备: 各组大鼠水合氯醛 ip 麻醉后断头处死, 迅速取脑, 在冰上切割脑块 (在视交叉前 2 mm 和乳头体后缘做两道平行冠状切口, 然后将其从正中矢状切开), 取缺血侧脑块 (视交叉~乳头体) 200 mg, 用 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.4) 1.0~2.0 mL 冲洗, 吸出 PBS, 置入机械匀浆器中, 剪碎脑组织, 加入适量 PBS 液, 迅速制成 2×10^6 /mL 的单细胞悬液。收集细胞悬液, 过 200 目细胞筛, PBS 洗 2 次, 800 r/min 离心 5 min, 终体积分数 70% 预冷乙醇固定过夜。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 取单细胞悬液, 4 °C PBS 洗 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 调细胞浓度为 2×10^5 /mL, 取细胞悬液 0.5 mL, 加入 20 mg/L RNAase A, 37 °C 恒浴 30 min, 再加入 50 mg/L PI 和 0.3% Triton-X100 共同染色, 摇匀后 4 °C 避光放置 60 min, 经 300 目尼龙网滤过, 在 FACS Calibur 型流式细胞仪上检测 (激发光波长 488 nm), 应用 cell Quest 多功能软件获取细胞数 10 000 个, 再以 Modit LT 分析软件分析细胞周期, 并拟合计数细胞凋亡。

1.6 流式细胞仪检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达: 取 4 °C 保存的单细胞悬液 1.0 mL, 用 PBS 液冲洗细胞, 加入 Bcl-2 抗体 (1:500), Bax 抗体 (1:300), 反应 20 min, PBS 冲洗 2 次, 加二抗 (1:100), 避光反应 20 min, 再以 PBS 洗涤 2 次, 300 目尼龙网滤过后, 上流式细胞仪检测, 应用 cell Quest 多功能软件获取细胞数 10 000 个, 检测 FITC 标记的抗小鼠 IgG 的面积。流式细胞仪激发光源为 15 mW 氩离子激光, 波长 488 nm, 用 cell Quest 软件系统收集细胞并分析处理数据, 以同型对照确定阴性及阳性区域, 然后复制到所对应样品的测定图上, 分析其阳性细胞百分率, 减去非特异对照值。

1.7 统计学分析: 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件的单因素方差分析 (One-way ANOVA), 进行多组间比较。

2 结果

2.1 TSG 对缺血侧脑组织细胞凋亡率的影响: 流式细胞术细胞周期定量分析表明, 凋亡细胞内的小分子 DNA 丢失, 因此在 DNA 含量分布直方图上出现一个“亚 G_1 峰”, 峰的大小即代表凋亡细胞的多少。假手术组细胞凋亡率低, 基本没有出现亚 G_1 凋亡峰, G_0/G_1 期细胞比例为 $(80.49 \pm 5.89)\%$; G_2/M 期为 $(1.25 \pm 1.08)\%$; S 期为 $(18.26 \pm 5.87)\%$; 模型组大鼠在 DNA 直方图的 G_0/G_1 期前出现明显的亚二倍体凋亡峰, 细胞凋亡率较假手术组明显增加, G_0/G_1 期细胞比例为 $(93.79 \pm 1.33)\%$, 较假手术组明显升高; G_2/M 期为 $(1.39 \pm 0.83)\%$, 与假手术组无明显区别; S 期为 $(4.83 \pm 1.82)\%$, 较假手术组明显降低, 提示模型组缺血侧脑组织大部分细胞处于静止期。与模型组相比, TSG 组亚二倍体凋亡峰所占比例明显减小, 细胞凋亡率明显降低, 细胞周期未见明显异常, 提示 TSG 对模型大鼠的细胞周期无明显影响。结果见表 1。

2.2 TSG 对缺血侧脑组织细胞凋亡调节因子的影响: 结果见表 2。大鼠缺血 2 h, 再灌注 24 h 后, 缺血侧脑组织表现为 Bcl-2 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达增多, Bcl-2/Bax 的值明显降低; TSG 各组同模型组相比较, 能升高脑组织 Bcl-2 蛋白表达, 减少 Bax 蛋白表达, 升高 Bcl-2/Bax 的值。

3 讨论

研究发现脑缺血时, 缺血中心区的细胞很快死亡, 而周围区尤其是半暗带的一些神经细胞呈现为凋亡的形态学变化, 如不能及时给予有效的治疗, 缺血周围区凋亡细胞亦趋于死亡。可见抑制细胞由凋

表1 TSG 对缺血侧脑组织细胞凋亡率的影响

Table 1 Effect of TSG on apoptotic rate in cerebral tissue of ischemic side

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	凋亡率/%
假手术	-	5	0.14±0.16
模型	-	5	20.26±11.07 ^{##}
TSG	30	4	7.83±5.55 ^{**}
	60	4	6.17±3.99 ^{**}
	120	6	5.56±4.91 ^{**}
尼莫地平	14	4	5.92±3.31 ^{**}

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

表2 TSG 对缺血侧脑组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Table 2 Effect of TSG on expression of Bcl-2 and Bax in cerebral tissue of ischemic side

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2/Bax
假手术	-	5	143.97±40.00	155.05±32.06	0.97±0.33
模型	-	5	48.06±17.67 ^{##}	367.58±102.12 ^{##}	0.13±0.05 ^{##}
TSG	30	4	75.06±26.50	218.56±83.82 ^{**}	0.37±0.18
	60	4	84.54±21.16	180.69±22.54 ^{**}	0.46±0.17
	120	6	118.15±43.17 ^{**}	189.81±73.48 ^{**}	0.72±0.42 ^{**}
尼莫地平	14	4	135.42±38.87 ^{**}	198.29±47.07 ^{**}	0.70±0.20 ^{**}

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

亡向坏死转变,缺血周围区向梗死中心区发展是治疗脑缺血的关键,其中,抑制细胞凋亡可能是脑缺血机制研究的重要环节。以此为靶点,进行抗脑缺血药物的研究,也将成为新的关注热点。

研究已经证明,在发生缺血性脑卒中时造成神经元死亡的方式主要为坏死与凋亡两种,而在整个病程中梗死组织的病理生理变化是由两种方式混合而成的^[6]。动物实验已发现缺血性脑损害的早期就出现凋亡细胞,以皮质、海马、纹状体等部位为主,24 h 最明显,并持续几天或几周^[7]。Li 等^[8]用大脑中动脉闭塞模型研究发现闭塞 10~20 min,纹状体及视前区的凋亡细胞数为 10~20 个,闭塞 30~80 min 凋亡细胞数量增加 30~60 个,并扩展到大脑皮质,选择性神经元闭塞 90~120 min 时凋亡细胞达 70~200 个,形成凋亡细胞群。

本实验表明,大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后,缺血侧脑组织出现明显的亚二倍体凋亡峰,细胞凋亡率明显增加,TSG 能明显降低缺血侧脑组织细胞凋亡率,表明 TSG 有一定的抑制脑缺血损伤诱导的神经细胞凋亡的作用。

脑缺血是诱导基因表达的最强烈刺激之一,脑缺血后大约有 80 余种基因被诱导表达,参与细胞凋亡的调控。Bcl-2 家族蛋白是凋亡的重要调控因子,

在脑缺血后细胞凋亡中发挥重要作用,其中,Bcl-2 可抑制细胞凋亡,研究表明,Bcl-2 mRNA 的表达与脑缺血的严重程度有关^[9]。短暂性阻断大鼠大脑中动脉(MCAO) 20 min 后,豆状核区 Bcl-2 的表达明显升高,3 d 后达峰值,持续至 7 d,并且能诱导脑组织对随后 60 min 的缺血性脑损伤产生耐受;全脑缺血后,Bcl-2 蛋白在 CA₃区表达升高,而在 CA₁区无表达,这也是 CA₁区神经元易受损的原因之一。另有研究表明,Bcl-2 在 MCAO 大鼠脑内的过度表达可以促进神经发生和新生神经元的存活、分化成 GABA 能神经元和胆碱能神经元,并抑制新生神经元的凋亡,与缺血后脑组织的修复密切相关^[10]。目前认为,Bcl-2 的这种变化可能是神经细胞自我保护机制之一,以防止或减少脑缺血再灌注后细胞凋亡的发生。Bax 是一种促进细胞凋亡的蛋白。研究表明,Bax mRNA 的诱导表达在短暂性脑缺血后 6 h 开始逐渐增加,在 24 h 达峰值,7 d 下降到基础水平。另有研究证实^[11],大脑中动脉短暂性缺血 2 h,再灌注 24 h 后梗死周围区 Bax 蛋白免疫活性增高。全脑缺血后 Bax mRNA 与蛋白质主要表达于 CA₁区且发生在迟发性细胞凋亡前,而在 CA₃区无表达。CA₁区 Bax 的选择性表达表明:Bax 可通过独立机制或与 Bcl-2 基因家族其他成员形成杂二聚体机制,参与调控脑缺血时 CA₁区神经元的凋亡。本实验表明,大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后,缺血侧脑组织 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多,Bcl-2/Bax 的比值明显降低,TSG 能明显升高缺血侧脑组织 Bcl-2 蛋白表达,减少 Bax 蛋白表达,提升 Bcl-2/Bax 的值。本研究结果提示,何首乌中提取的 TSG 可以通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,抑制缺血因素诱导的神经细胞凋亡,从而具有治疗脑缺血性损伤的前景。

参考文献

- [1] Ryu G, Ju J H, Park Y J, et al. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25: 636-639.
- [2] Oh S R, Ryu S Y, Park S H, et al. Anticomplementary activity of stilbenes from medicinal plants [J]. *Arch Pharm Res*, 1998, 21: 703-706.
- [3] 李雅莉,赵玲,李林. 二苯乙烯苷对海马神经元细胞缺血性损伤模型大鼠的保护作用研究 [J]. *中国药房*, 2006, 17(1): 12-14.
- [4] 刘丽,赵玲,李雅莉,等. 四羟基二苯乙烯苷对慢性脑缺血致痴呆模型大鼠的保护作用 [J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(5): 354-357.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats

- [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [6] Kuschinsky W, Gillardon F. Apoptosis and cerebral ischemia [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2000, 10(3): 165-169.
- [7] Cheng Y, Deshmukh M D, Costa A, *et al* Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia brain injury [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1992-1999.
- [8] Li Y, Chopp M, Jiang N, *et al* Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 min of focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26: 1252-1258.
- [9] Cao Y J, Shibata T, Rainov N G. Liposome mediated transfer of the bcl-2 gene results in neuroprotection after *in vivo* transient focal cerebral ischemia in an animal model [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(6): 415-419.
- [10] Zhang R, Xue Y Y, Lu S D, *et al* Bcl-2 enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of newborn neurons in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 24(2): 345-356.
- [11] Amemiya S, Kamiya T, Nito C, *et al* Antiapoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 516(2): 125-130.

白芨超微粉对大鼠实验性胃溃疡的影响

刘莹¹, 崔炯莫¹, 李洪斌², 王艳萍², 汤真², 于海瑶², 吴艳云^{2*}

(1. 延边大学, 吉林 延吉 133000; 2. 中国人民解放军第208医院, 吉林 长春 130062)

摘要:目的 通过大鼠胃溃疡实验比较白芨普通粉(80、200目)和超微粉的药效学区别及白芨经超微粉碎后可降低的用药剂量。方法 采用大鼠无水乙醇和醋酸致胃黏膜损伤型胃溃疡模型, 测定溃疡面积, 计算溃疡抑制率, 取溃疡部组织切片, 做HE染色, 从病理学角度进一步观察病理情况。结果 白芨粉可明显降低大鼠的溃疡面积, 且超微粉疗效优于普通粉。结论 超微粉粉碎后有助于提高白芨的药效, 减少用药剂量, 有利于剂型现代化。

关键词: 超微粉; 白芨; 胃溃疡模型

中图分类号: R 286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0397-04

Effect of ultra-fine powder of *Bletilla striata* on experimental gastric ulcer in rats

LIU Ying¹, CUI Jiongmo¹, LI Hong-bin², WANG Yan-ping²,
TANG Zhen², YU Hai-yao², WU Yan-yun²

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China;

2 No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: **Objective** To compare the pharmacodynamics of common *Bletilla striata* powder (80 and 200 meshes) with ultra-fine powder of *B. striata* on experimental gastric ulcer in rats and to clarify how much the dose of *B. striata* was decreased after superfine comminution. **Methods** The models of gastric ulcer were set up by anhydrous alcohol and acetic acid to measure the gastric ulcer area and count out the inhibitory rate; The tissue slice of gastric ulcer cicatrix was got far HE staining. Based on the viewpoint of pathology the morbid state was observed. **Results** *B. striata* powder could decrease the gastric ulcer area significantly, and the groups of ultra-fine powder were advantaged to the others. **Conclusion** After superfine comminution, the potency of *B. striata* can be improved with its dose reducing. It is good for modernization of making dosage forms.

Key words: ultra-fine powder; *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; gastric ulcer model

白芨为兰科植物白芨 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎。传统医学认为白芨具有收敛止血、消痞生肌的功能。用于咳血吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂、肺结核咳血、溃疡病出血的治疗。现代研究表明白芨治疗消化性溃疡及

出血具有较好的疗效。中药经超微粉碎后可提高其生物利用度, 增加有效成分的溶出度等, 并且在达到相同药效的情况下可减小药物的用药剂量。本实验研究白芨经超微粉碎后对大鼠无水乙醇和醋酸致胃黏膜损伤型胃溃疡模型的疗效及白芨经超微粉碎后

* 收稿日期: 2007-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672672)

作者简介: 刘莹(1982—), 女, 吉林省九台市人, 延边大学药学院在读硕士, 从事缓释制剂的研究。

Tel: (0431) 86988187 E-mail: liuying_0916@163.com