

当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经元的保护作用

林国芳

宁海县力洋中心卫生院, 浙江 宁波 315602

摘要: **目的** 探讨当归多糖(APS)对脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经元的保护作用。**方法** 将50只大鼠随机分为假手术组、模型组和APS高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组, APS给药组于造模前3 d连续ig给予APS, 假手术组和模型组ig等量生理盐水; 采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注损伤(I/R)模型, 缺血2 h、再灌注24 h后, 跳台法检测大鼠学习记忆能力, TUNEL法检测大鼠海马神经元凋亡情况, ELISA法检测海马组织中cleaved caspase-3、bcl-2及bax的表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠跳台潜伏期明显缩短, 错误次数增加, 神经元凋亡率增加, cleaved caspase-3、bcl-2及bax的表达显著升高。与模型组相比, APS各剂量组大鼠跳台潜伏期明显延长, 错误次数减少, 并降低了神经元凋亡率, 减少cleaved caspase-3及bax的表达, 且增加bcl-2表达。**结论** APS对I/R大鼠具有明显的神经保护作用, 其机制可能与抑制神经元凋亡密切相关。

关键词: 当归多糖; 脑缺血再灌注损伤; 神经元; 凋亡; 跳台法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)04-0558-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.018

Protective effects of angelica polysaccharide on hippocampal neuron of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

LIN Guo-fang

Ninghai County Ocean Center Public Health Center, Ningbo 315602, China

Abstract: Objective To investigate the protection of angelica polysaccharide (APS) on hippocampal neuron in rats with cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** The model of cerebral I/R injury was established by suture method in rats. A total of 50 rats were randomly divided into five groups: Sham-operation, cerebral I/R injury, high-dose APS (200 mg/kg), mid-dose APS (100 mg/kg), and low-dose APS (50 mg/kg) groups. APS was ig administrated 3 d before operation. At 24 h after reperfusion, learning and memory function was detected by step down test, the apoptosis of hippocampal neuron was observed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL), and the expression of cleaved caspase-3, bcl-2, and bax in the hippocampus of rats was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with those in the Sham-operation group, the learning and memory function was notably impaired in the I/R injury group, the number of errors increased. The apoptosis of hippocampal neuron increased and the expression of cleaved caspase-3, bcl-2, and bax in the hippocampus remarkably increased in the I/R injury group. The APS could significantly improve the learning and memory function of rats with the cerebral I/R injury and remarkably delay the decrease of the number of errors and the decrease of the apoptosis rate in the hippocampus of rats with the cerebral I/R injury. And the APS could also cause a significant down-regulation of cleaved caspase-3 and bax expression, while up-regulation of bcl-2 expression in hippocampus of rats with the cerebral I/R injury. **Conclusion** APS has a neuroprotection on rats with the cerebral I/R injury. The neuroprotective mechanism of APS may involve in the inhibition of the neuronal apoptosis.

Key words: angelica polysaccharide; cerebral ischemia-reperfusion injury; neuron; apoptosis; step down test

脑缺血再灌注(cerebral ischemic-reperfusion, I/R)损伤是指脑组织在缺血一定时间的基础上恢复血流后脑组织损伤反而加重, 甚至发生不可逆性损

伤的现象^[1]。I/R后神经细胞会发生凋亡, 严重影响了I/R患者的康复和预后, 而凋亡的机制是一个复杂的多因素过程, 目前尚未完全明确^[2]。当归多糖

收稿日期: 2014-09-05

作者简介: 林国芳, 女, 主管中药师。Tel: (0574)65101525 E-mail: 1319147975@qq.com

(angelica polysaccharides, APS) 是当归的水溶性成分,也是当归发挥药理作用的主要成分。APS 药理作用广泛,具有抗肿瘤、调节免疫功能、促进造血等作用^[3-5]。近年文献报道其对 I/R 有保护作用,主要机制是 APS 的抗氧化应激作用^[6-7],而 APS 的抗凋亡作用却未见相关报道。本研究通过线栓法制备 I/R 大鼠模型,观察 APS 的抗神经元凋亡作用,为 APS 的进一步研究与应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 (250±50) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号浙 2003-000112。

1.2 仪器与试剂

大鼠跳台仪,购自中国医学科学院药物研究所;全自动酶标仪(购自美国 Spectra Max M2 公司);APS(质量分数为 70%)购自陕西慈缘生物技术有限公司,溶解在生理盐水中配成 100 mg/mL 的混悬液,现用现配;TUNEL 试剂盒购自凯基公司;cleaved caspase-3、bcl-2 及 bax ELISA 试剂盒购自 CST 公司。

2 方法

2.1 分组与给药

50 只大鼠随机分为 5 组:假手术组、模型组及 APS 高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组,每组 10 只。建模前 3 d,APS 各剂量组 ig 相应剂量的 APS,每日 1 次,假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水。

2.2 I/R 模型的制备

参考文献方法^[8],采用大脑中动脉线栓法制备局灶性脑缺血模型。麻醉大鼠,切开颈中皮肤,分离左侧颈总动脉及颈内、颈外动脉,结扎翼腭及颈外动脉。将 26 号鱼线从颈总动脉远端切口处插入颈内动脉 1.8~2.2 cm,阻塞大脑中动脉近端血流,假手术组鱼线只进入到颈动脉分叉处,缺血 2 h;2 h 后拔去线栓,再灌注 24 h。大鼠清醒后,参考文献方法^[9]进行神经功能缺损评分,1~3 分的动物选为实验动物。

2.3 跳台法检测大鼠学习记忆能力

造模当天进行跳台训练,大鼠先于跳台内适应 3 min,然后通以 36 V 电流,大鼠电击后会跳上跳台躲避,训练 5 min。再灌注后 24 h,重新进行测试,记录大鼠第 1 次跳下跳台的时间(潜伏期)和

5 min 内电击次数(错误次数)。

2.4 TUNEL 法检测神经元凋亡

跳台实验后,各组取 5 只大鼠,麻醉后以 4% 多聚甲醛进行心脏灌流,取出脑组织,于 4 °C 在 4% 多聚甲醛中固定 24 h。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。取海马齿状回互包段进行连续冠状 5 μm 切片。严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作。400 倍视野下随机选取 5 个视野,计数 CA1 区凋亡阳性细胞均数,TUNEL 染色阳性表达是细胞核棕染。

2.5 脑组织 cleaved caspase-3、bcl-2 及 bax 的检测

取各组剩余的 5 只大鼠,断头取脑,分离出海马组织。将海马组织制成 10 g/L 的匀浆液,于 4 °C 下,以 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行 cleaved caspase-3、bcl-2 及 bax 检测。

2.6 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 APS 对 I/R 大鼠学习记忆能力的影响

与假手术组相比,模型组大鼠跳台实验的潜伏期明显缩短,错误次数明显增多,说明模型组大鼠出现学习记忆障碍。与模型组相比,APS 高、中、低剂量组均能显著延长大鼠的跳台潜伏期 ($P < 0.01$),减少错误次数 ($P < 0.05$ 、 0.01),见表 1。

表 1 APS 对 I/R 大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of APS on learning and memory ability of rats with I/R injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	潜伏期/s	错误次数
假手术	—	238.3±96.7	1.0±1.4
模型	—	112.4±120.5**	3.2±2.0**
APS	200	218.0±83.1*##	1.2±1.5*##
	100	211.9±82.6***	1.2±1.3***
	50	204.7±86.5****	1.6±1.4**#

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$

$P < 0.01$,下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

3.2 APS 对神经元凋亡的影响

TUNEL 染色阳性细胞为细胞核棕染,呈小圆形、环形或颗粒状。假手术组大鼠海马 CA1 区阳性细胞数极少见,与假手术组相比,模型组海马 CA1

区阳性细胞数明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, APS 各组阳性细胞数显著降低 ($P < 0.01$), 见表 2 和图 1。

表 2 APS 对 I/R 大鼠海马神经元凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Effect of APS on apoptosis of hippocampal neuron of rats with I/R injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	阳性细胞数/个
假手术	—	0.30 ± 0.22
模型	—	24.50 ± 6.23**
APS	200	10.80 ± 2.71***
	100	11.30 ± 2.89***
	50	13.50 ± 3.03***

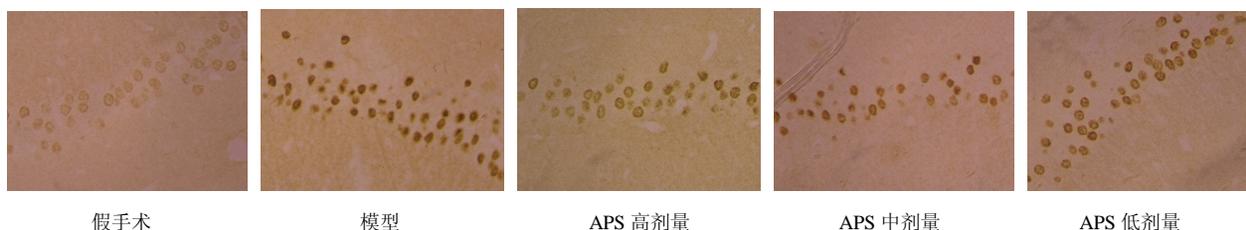


图 1 各组大鼠海马神经元凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of hippocampal neuron of rats in each group

表 3 APS 对 I/R 大鼠海马组织 cleaved caspase-3、bcl-2 及 bax 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of APS on levels of cleaved caspase-3, bcl-2, and bax in hippocampus of rats with I/R injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	cleaved caspase-3/(μg·L ⁻¹)	bcl-2/(μg·L ⁻¹)	bax/(μg·L ⁻¹)
假手术	—	3.75 ± 0.33	2.03 ± 0.25	4.58 ± 0.40
模型	—	8.42 ± 1.28**	3.75 ± 0.34**	7.27 ± 1.05**
APS	200	4.18 ± 0.46***	5.66 ± 0.57***	4.83 ± 0.45***
	100	4.44 ± 0.57***	5.01 ± 0.43***	5.05 ± 0.47***
	50	5.29 ± 0.60***	4.79 ± 0.39***	5.14 ± 0.51***

多因素组成的过程。参与凋亡过程的基因主要分为促凋亡基因 (cleaved caspase-3、caspase-3、bax、p53 等) 及抗凋亡基因 (bcl-2、bcl-x 等) [11]。正常情况下, 促凋亡基因与抗凋亡基因保持着动态平衡 [12]。Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者, caspase-3 活化时首先被剪切产生活性片段 cleaved caspase-3, 继而发挥蛋白水解酶的作用, 促使细胞发生凋亡 [13]。因此检测 cleaved caspase-3 的量可直接反映出神经元的凋亡情况。bcl-2 和 bax 在神经元凋亡的发生发展中发挥着重要作用, bcl-2 与 bax 的表达决定着细胞凋亡的发展方向, bcl-2 表达增加时, 凋亡被抑制, bax 表达增加时, 细胞凋亡发生 [14]。

目前已有许多篇文章报道, I/R 后 24 h, 海马受

3.3 APS 对 cleaved caspase-3、bcl-2 及 bax 水平的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠海马组织中 cleaved caspase-3、bcl-2 及 bax 水平显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, APS 各剂量组海马组织中的 cleaved caspase-3 及 bax 水平显著降低, 而 bcl-2 水平显著增加 ($P < 0.01$), 见表 3。

4 讨论

如何减轻 I/R 后神经元的凋亡, 是当前神经保护药物的重要研究方向。如果能减轻或阻止神经元凋亡的发生, 就能减轻脑损伤的程度, 减小 I/R 损伤的梗死灶 [9-10]。细胞凋亡是一个主动的、复杂的、

损最为严重, 特别是在 CA1 区最为明显 [15]。因此本实验将检测时间安排在再灌注后 24 h, 更能明显反映出 APS 抗神经元凋亡的作用。通过本实验发现, APS 能显著提高 I/R 大鼠学习记忆能力, 猜测 APS 组海马神经元凋亡情况较模型组轻。通过 TUNEL 实验证实, APS 能减轻海马 CA1 区神经元的凋亡情况; 同时, 检测凋亡相关因子, 证明 APS 能显著降低 cleaved caspase-3 及 bax 的量, 增加 bcl-2 的量; 说明 APS 具有抑制 I/R 大鼠神经元凋亡的作用, 且高剂量组作用更为显著。由于细胞凋亡是一系列复杂的过程, 在后面的研究中, 还需要进一步研究 APS 对神经元凋亡信号转导途径的影响, 以更深入探讨 APS 神经保护作用的机制。

参考文献

- [1] Zhang P, Li W, Li L, *et al.* Treatment with edaravone attenuates ischemic brain injury and adult rats after focal inhibits neurogenesis in the subventricular zoo of adult rats after focal cerebral ischemia and reperfusion injury [J]. *Neuro Sci*, 2012, 201: 297-306.
- [2] Love S. Apoptosis and brain ischaemia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(2): 267-282.
- [3] Ma S W, Zhao M, Liu H X, *et al.* Pharmacokinetic effects of baicalin on cerebral ischemia-ischemia-reperfusion after iv administration in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(1): 53-57.
- [4] 李成鹏, 刘俊, 贾道勇, 等. 当归多糖诱导人白血病干细胞衰老与调控端粒系统机制的研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(16): 2364-2369.
- [5] 韦玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(2): 130-134.
- [6] 李云峰. 当归多糖对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(17): 1842-1843.
- [7] 胡晓琴, 廖维靖, 杨万同. 当归多糖对大鼠缺血性脑损伤后血管生成素表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 3(11): 204-206.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 黄浏姣, 洪亚群, 陈邦国, 等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *中国康复*, 2011, 26(2): 83-85.
- [10] 邓江, 王义为, 张洁, 等. 杜仲提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(6): 498-501.
- [11] 张臻年, 李继英, 赵扬, 等. 通脑活络针刺疗法对大鼠急性脑梗死 Bcl-2 及 Caspase-3 的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(5): 646-648.
- [12] Tanny S P, Busija L, Liew D, *et al.* Cost-effectiveness of thrombolysis within 4.5 hours of acute ischemic stroke: experience from Australiam Stroke Center [J]. *Stroke*, 2013, doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001295.
- [13] Zhang G C, Fu W B, Xu N G, *et al.* Meta analysis of the curative effect of acupuncture on post-stroke depression [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(1): 6-11.
- [14] Wang W, Xu J, Li L, *et al.* Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rat [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 83(5): 196-201.
- [15] 王晔, 刘乃红, 王锐, 等. 大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区神经元凋亡机制的研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2011, 9(7): 845-850.