

黄芪甲苷与三七有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和内质网应激的影响

黄小平, 欧阳国, 丁煌, 邓常清*, 唐映红*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 中西医结合心脑血管病防治湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 从内质网应激角度探讨黄芪甲苷和三七主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响和作用机制。方法 将 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组、黄芪甲苷 (AST IV, 40 mg/kg) 组、人参皂苷 Rg₁ (Rg₁, 50 mg/kg) 组、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁, 40 mg/kg) 组、三七皂苷 R₁ (R₁, 10 mg/kg) 组、4 种有效成分配伍 (AST IV+Rg₁+Rb₁+R₁) 组、AST IV+Rg₁ 组、AST IV+Rb₁ 组、AST IV+R₁ 组及阳性对照依达拉奉组。各组小鼠预先给药 3 d 后, 夹闭双侧颈总动脉造成脑缺血再灌注模型, 再灌注 24 h 后, TUNEL 法检测海马 CA1 区神经细胞凋亡, 计算凋亡率; Western-blotting 法测定脑组织半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (Caspase-3)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、Caspase-12 和磷酸化的 c-jun 氨基末端激酶 1/2 (p-JNK1/2) 蛋白表达。结果 脑缺血 20 min 再灌注 24 h 后, 小鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达量增加。各给药组均能降低海马 CA1 区神经细胞凋亡率, 抑制 Caspase-3 蛋白的表达。且 AST IV+Rg₁ 与 AST IV+R₁ 降低凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达的效应分别强于各有效成分单用; 4 种有效成分配伍降低细胞凋亡率的效应强于各有效成分单用及 AST IV+Rb₁, 抑制 Caspase-3 蛋白表达的效应强于各有效成分单用及 AST IV+Rb₁、AST IV+R₁。脑缺血再灌注后, 小鼠脑组织 GRP78 和 Caspase-12、p-JNK1/2 蛋白表达增多, AST IV、Rg₁、R₁ 及各配伍组均能进一步上调脑组织 GRP78 蛋白表达, 且各有效成分配伍的效应分别强于各有效成分单用, 4 种有效成分配伍的效应强于 AST IV+Rb₁ 及 AST IV+R₁。R₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁、AST IV+R₁ 均能降低 Caspase-12 蛋白的表达, 4 种有效成分配伍的效应强于各有效成分单用及 AST IV+Rb₁。AST IV、Rg₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁、AST IV+Rb₁ 组脑组织 p-JNK1/2 蛋白表达显著减少, 4 种有效成分配伍下调 p-JNK1/2 的效应强于各有效成分单用及 AST IV+Rg₁、AST IV+R₁。结论 黄芪甲苷与三七的主要有效成分配伍能增强对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的抑制作用, 其机制与通过不同环节减轻内质网应激有关。AST IV+Rb₁ 可能主要作用于 JNK 通路, AST IV+R₁ 可能主要作用于 Caspase-12 通路, 而 4 种有效成分配伍和 AST IV+Rg₁ 均能作用于 Caspase-12 和 JNK 通路。

关键词: 黄芪甲苷; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁; 三七皂苷 R₁; 配伍; 脑缺血再灌注; 神经细胞凋亡; 内质网应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)15-2257-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.15.014

Effects of astragaloside IV combined with active components of *Panax notoginseng* on apoptosis and endoplasmic reticulum stress in brain tissues after cerebral ischemia-reperfusion in mice

HUANG Xiao-ping, OUYANG Guo, DING Huang, DENG Chang-qing, TANG Ying-hong

Molecular Pathology Laboratory, Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-Cerebral Diseases, Key Laboratory of Hunan Universities for Cell Biology and Molecular Techniques, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To probe the effects and mechanisms of astragaloside IV combined with the active components from *Panax notoginseng* on apoptosis of nerve cells through endoplasmic reticulum stress (ERS) after cerebral ischemia-reperfusion (I/R) in mice.

Methods C57BL/6 mice were randomly divided into Sham, model, astragaloside IV (AST IV), ginsenoside Rg₁ (Rg₁), ginsenoside Rb₁

收稿日期: 2015-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102557); 教育部 2010 年度高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20104323110001); 湖南省高校创新平台开放基金资助项目 (11K050, 14K068); 湖南省科技厅一般项目 (2014SK3001); 湖南省中医药管理局重点项目; 湖南省教育厅一般项目 (11C0963); “中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究” 湖南省高校科技创新团队; “中医药防治心脑血管疾病基础研究” 湖南省自然科学基金创新群体基金

作者简介: 黄小平 (1974—), 女, 副教授, 主要研究方向为心脑血管疾病的防治。Tel: (0731)88458258 E-mail: jialeliu@hotmail.com

***通信作者** 邓常清 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管疾病及中药组 (成) 分配伍研究。Tel: (0731)88458710 E-mail: dchangq@sohu.com
唐映红 (1962—), 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为心脑血管药理研究。Tel: (0731)88458258

(Rb₁), notoginsenoside R₁ (R₁), four active components combination, AST IV + Rg₁, AST IV + Rb₁, AST IV + R₁ and Edaravone group, pretreated for 3 d. After 1 h of the last administration, the model of cerebral I/R injury was established by bilateral common carotid artery (CCA) ligation followed by reperfusion, then TUNEL method was used to detect the apoptosis in hippocampal CA1 and apoptosis rate was calculated; The expression of cysteine aspartic acid specific protease (Caspase-3), glucose regulated protein 78 (GRP78), Caspase-12 and phosphorylated C-Jun amino terminal kinase (p-JNK1/2) proteins in brain tissues was tested by Western-blotting at 24 h after reperfusion.

Results After cerebral ischemia for 20 min followed by reperfusion 24 h, the apoptosis rate of nerve cell in hippocampal CA1 and the expression of Caspase-3 protein in brain tissues were increased. All drugs could decrease the apoptosis rate and inhibit Caspase-3 protein expression. Furthermore, the decreased effects of AST IV + Rg₁ and AST IV + R₁ on the apoptosis rate and Caspase-3 protein expression were better than those of the active components alone; In the four active components combination, the decrease of the apoptosis rate was stronger than that of the four active components alone and the inhibition of AST IV + Rb₁ on Caspase-3 was greater than that of the four active components alone as well as AST IV + Rb₁ and AST IV + R₁. After the cerebral I/R, the expression of GRP78 and Caspase-12, p-JNK1/2 proteins were up-regulated. AST IV, Rg₁, R₁, and the combinations could further increase GRP78 protein expression in brain tissues, and the effect of the combinations was better than that of the active components alone; The effect of the four active components combination was better than that of AST IV + Rb₁ and AST IV + R₁. R₁, the four active components combination, AST IV + Rg₁, and AST IV + R₁ could down-regulate Caspase-12 protein, and the effect of the four active components combination was more obvious than that of the four active components alone and AST IV + Rb₁. The expression of p-JNK1/2 in AST IV, Rg₁, the four active components combination, AST IV + Rg₁, and AST IV + Rb₁ was decreased, the decrease in the four active components combination was stronger than that in the four active components alone as well as AST IV + Rg₁ and AST IV + R₁. **Conclusion** AST IV combined with the effective components from *P. notoginseng* has the potentiation on the inhibition of apoptosis, and the mechanism underlying might be associated with relieving ERS via different links. AST IV + Rb₁ might affect JNK pathway and AST IV + R₁ might act on the Caspase-12 pathway; Moreover, the four active components combination and AST IV + Rg₁ could act on both Caspase-12 and JNK.

Key words: astragaloside IV; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁; notoginsenoside R₁; combination; cerebral ischemia-reperfusion; nerve cell apoptosis; endoplasmic reticulum stress

黄芪甲苷 (astragaloside IV, AST IV) 是黄芪中具有心脑血管效应的主要有效成分, 人参皂苷 Rg₁ (Rg₁)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁)、三七皂苷 R₁ (R₁) 是三七中具有心脑血管药理作用的主要有效成分。以往的体外实验表明, 黄芪和三七的主要有效成分能抑制 PC12 细胞缺氧性损伤后的细胞凋亡, 有效成分配伍后作用增强^[1]。脑缺血再灌注后, 炎症反应和细胞凋亡是导致神经细胞迟发型损伤的主要病理机制, 内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 途径是近年才发现的一条新的凋亡途径。内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 的重要功能是合成蛋白质, 并进行修饰、折叠, 将加工后的成熟蛋白转运出 ER。ER 内环境必须维持稳态以保证蛋白的最佳折叠, 一旦这种平衡遭到破坏, 如缺氧、低糖、感染、中毒以及 ER 腔内离子浓度改变、新生蛋白过多等, 均可引起 ER 内稳态失衡, 使未折叠蛋白或错误折叠蛋白在 ER 积聚, 统称为 ERS^[2]。应激发生后, 内质网通过多种信号转导途径来抑制新生蛋白的合成, 促进蛋白折叠、降解未折叠和错误折叠等方式来缓解 ERS, 内质网产生的这种针对应激的适应性反应, 被称作未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)^[3]。如果 ERS 严重或应激持续不缓解, UPR 继而转向诱

导细胞凋亡^[4], ERS 在缺血再灌注损伤的过程中, 处于中心地位^[5]。因此, 本实验进一步从 ERS 角度探讨 AST IV 和三七主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响, 为进一步阐明两药配伍增强抗缺血性损伤作用机制提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 18~22 g, 由湖南维通利华实验动物有限公司提供, 动物合格证号 SCXK (湘) 2009-0004。饲养于 SPF 级动物实验室内, 湿度 45%、室温 25 ℃ 环境。

1.2 受试药物

AST IV (批号 A0070)、Rg₁ (批号 A0237)、Rb₁ (批号 A0234)、R₁ (批号 A0273), 均购自成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 ≥98%, 用时以 5% 羧甲基纤维素钠配成混悬液备用。依达拉奉注射液 (3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮), 南京先声东元制药有限公司生产, 批号 80-090104, 规格每支 10 mg (5 mL), 以生理盐水配成 0.4 mg/mL 溶液。

1.3 主要试剂

原位细胞凋亡 TUNEL 法检测试剂盒 (批号 MK1023) 购自武汉博士德生物技术有限公司; 全

蛋白提取试剂盒(批号 KGP2100)购自南京凯基生物科技发展有限公司;磷酸酶抑制剂复合物 III(批号 PL019-1)、改良型 BCA 蛋白质定量检测试剂盒(批号 SK3051)购自上海生工生物工程股份有限公司;兔抗小鼠 β -actin 抗体(批号 sc-130656),兔抗小鼠葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 抗体(批号 SC-13968)、兔抗小鼠 Caspase-12 抗体(批号 SC-5627)、兔抗小鼠 Caspase-12 和磷酸化的 c-jun 氨基末端激酶 1/2 (p-JNK1/2) 抗体(批号 SC-135642)、兔抗小鼠半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体(批号 SC7148)购自 Santa Cruz Biotechnology;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉生物技术有限公司。

2 方法

2.1 动物分组和给药方法

根据前期实验结果^[6-7],将小鼠随机分为 11 组:假手术组、模型组、AST IV 组(40 mg/kg)、Rg₁ 组(50 mg/kg)、Rb₁ 组(40 mg/kg)、R₁ 组(10 mg/kg)、4 种有效成分配伍组(AST IV 40 mg/kg+Rg₁ 50 mg/kg+Rb₁ 40 mg/kg+R₁ 10 mg/kg)、AST IV (40 mg/kg)+Rg₁ (50 mg/kg) 组、AST IV (40 mg/kg)+Rb₁ (40 mg/kg) 组、AST IV (40 mg/kg)+R₁ (10 mg/kg) 组、依达拉奉组(4 mg/kg),每组 8 只小鼠。依达拉奉组 ip 给药,每天给药 2 次;其余各给药组按剂量 ig 给药,假手术组、模型组 ig 给予 0.5%羧甲基纤维素钠,给药体积均为 10 mL/kg,每天给药 1 次;连续 3 d,第 3 天末次给药 1 h 后造模。造模期间同前给药。

2.2 小鼠脑缺血再灌注模型制备

乙醚麻醉小鼠,仰卧位固定,在颈部正中做 1 cm 切口,暴露颈总动脉及伴行的迷走神经,分离并夹闭双侧颈总动脉造成脑缺血,20 min 后恢复血流^[8]再灌注 24 h。假手术组也同样进行手术,但不进行脑缺血和再灌注。再灌注 24 h 后,将小鼠迅速断头,取出脑组织置于冰上,去除小脑及脑干后进行相应指标检测。

2.3 指标检测

2.3.1 海马 CA1 区神经元凋亡检测 取视交叉后 1~4 mm 脑块,10%多聚甲醛固定,石蜡包埋,冠状切片,片厚 7 μ m,按 TUNEL 法测定神经细胞凋亡率。在高倍镜下(10 $\times$ 40)每张切片取 5 个非重叠视野,细胞核含棕黄色颗粒者为凋亡阳性细胞,阴性细胞核为蓝色。记数视野中凋亡细胞和神经细胞总数,计算凋亡率(凋亡细胞占细胞总数的百分

比)。阴性对照以 PBS 代替 TUNEL 试剂。

2.3.2 脑组织 GRP78、Caspase-12、p-JNK1/2、Caspase-3 蛋白表达测定 以 Western blotting 法测定。取视交叉前脑组织,加入 RIPA 裂解液匀浆、冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液。以改良型 BCA 蛋白质定量法检测蛋白质的量,确定蛋白质上样总量 110 μ g,取蛋白样品与 1/3 量的 4 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液混合使上样总体积为 20 μ L,煮沸变性 5~10 min。SDS-PAGE 电泳分离 2~3 h,300 mA 恒流 1 h 湿转至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBS 溶液封闭 3 h,TBST 溶液洗 3 次。再分别与兔抗小鼠 β -actin 抗体(1:1 000)、兔抗小鼠 GRP78 抗体(1:500)、兔抗小鼠 Caspase-12 抗体(1:500)、兔抗小鼠 p-JNK1/2 抗体(1:250)、兔抗小鼠 Caspase-3 抗体(1:500)溶液 3 mL 混合,4 $^{\circ}$ C 静置过夜,TBST 溶液洗 3 次。然后与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1 000) 5~8 mL 室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次。进行发光反应,X 胶片曝光、显影、定影、拍摄照片、扫描,Image Pro-Plug 6.0 图像分析软件测定目的条带的累积光密度值(integrated optical density, IOD),以 β -actin 为内参照,以目的条带的 IOD 值与 β -actin 条带的 IOD 值的比值作为该目的蛋白的相对表达量。

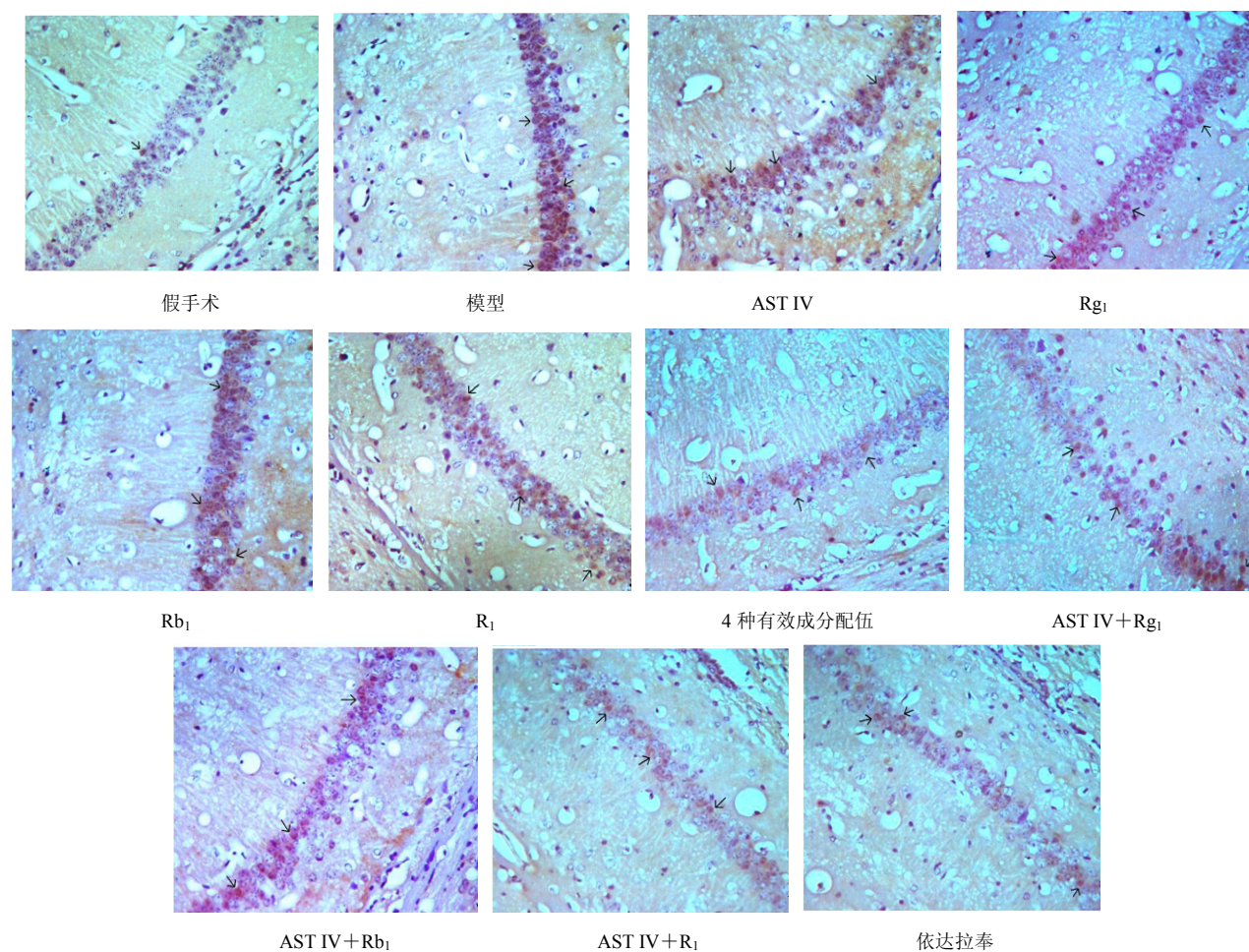
2.4 统计方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。先将各组数据进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者用 LSD 检验。方差不齐时先将数据转换后使之方差齐,再同上进行分析。

3 结果

3.1 各组小鼠海马 CA1 区神经元凋亡率的比较

假手术组小鼠海马 CA1 区偶有个别散在的凋亡细胞。模型组小鼠海马 CA1 区可见大量凋亡细胞,凋亡率显著高于假手术组($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠海马 CA1 区凋亡细胞减少,凋亡率显著降低($P<0.01$)。AST IV+Rg₁ 与 AST IV+R₁ 降低凋亡率的效应分别强于各药物单用($P<0.01$),AST IV+Rb₁ 组与 AST IV 和 Rb₁ 单用比较无统计学意义($P>0.05$)。4 种有效成分配伍的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV+Rb₁($P<0.01$),与 AST IV+Rg₁、AST IV+R₁ 及依达拉奉比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1 和 2。

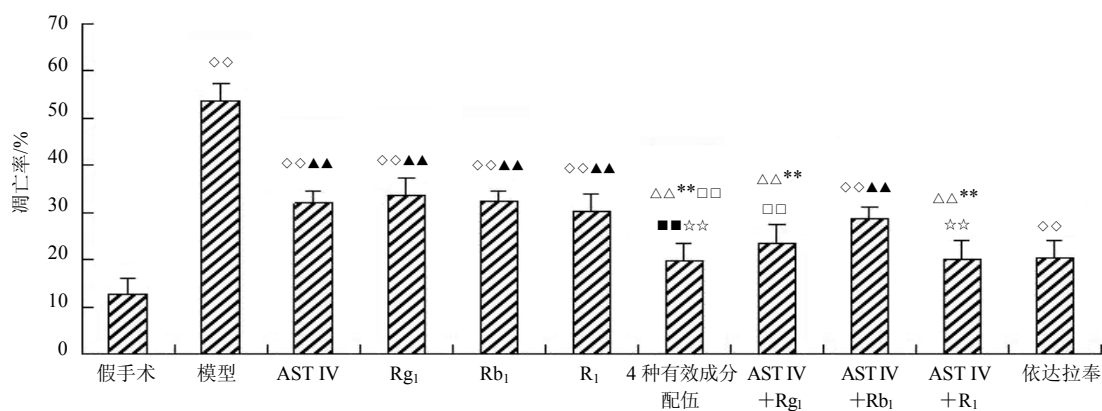


箭头所指细胞核含棕黄色颗粒者为凋亡阳性细胞，细胞核为蓝色的属正常细胞

Positive nuclei with brown granules that arrows indicated were considered as apoptotic cells, cells with blue nucleus were normal

图1 各组小鼠海马CA1区神经细胞凋亡情况 (TUNEL 检测)

Fig. 1 Detection of apoptotic cells in hippocampal CA1 of mice in each group at 24 h after reperfusion



与假手术组比较: ◇◇ $P < 0.01$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$; 与AST IV组比较: ** $P < 0.01$; 与Rg1组比较: □□ $P < 0.01$; 与Rb1组比较: ■■ $P < 0.01$; 与R1组比较: ☆☆ $P < 0.01$; 与4种有效成分配伍组比较: ▲▲ $P < 0.01$

◇◇ $P < 0.01$ vs Sham group; △△ $P < 0.01$ vs model group; ** $P < 0.01$ vs AST IV group; □□ $P < 0.01$ vs Rg1 group; ■■ $P < 0.01$ vs Rb1 group; ☆☆ $P < 0.01$ vs R1 group; ▲▲ $P < 0.01$ vs four active components combination group

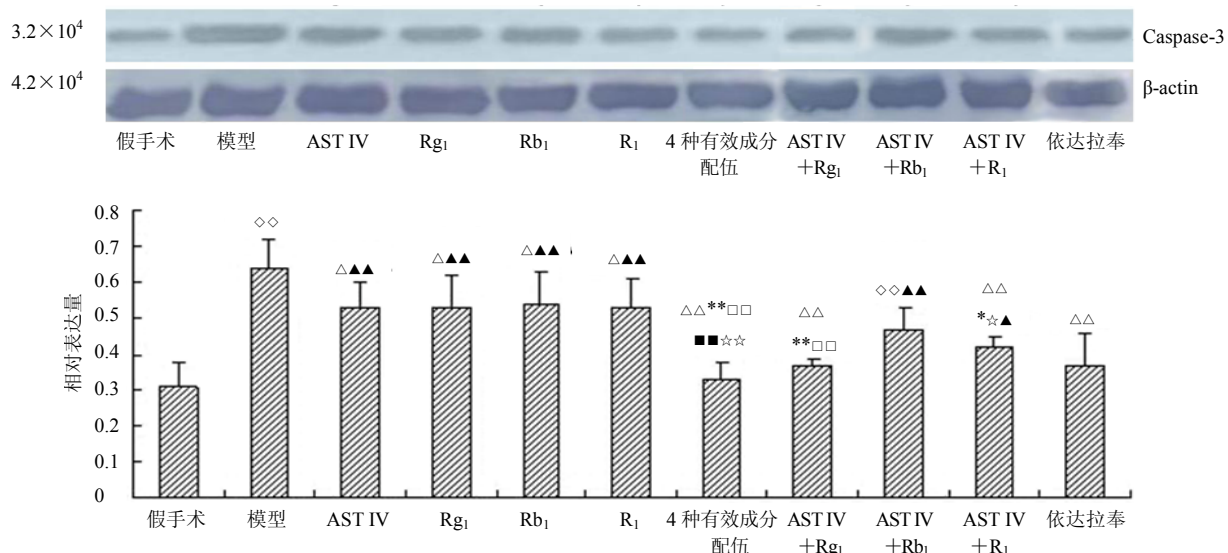
图2 各组小鼠海马CA1区神经细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Comparison on apoptotic rate in hippocampal CA1 of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 各组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达的比较

与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达量显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,各药物组 Caspase-3 蛋白表达量显著下降 ($P<0.01$)。AST IV+Rg₁ 与 AST IV+R₁ 降低 Caspase-3 蛋白表达的效应分别强于 Rg₁、R₁ 及 AST IV 单用

($P<0.05$ 、 0.01)。AST IV+Rb₁ 与 AST IV 和 Rb₁ 单用比较无显著性差异 ($P>0.05$)。4 种有效成分配伍的效应强于 4 种有效成分单用、AST IV+Rb₁ 及 AST IV+R₁ ($P<0.05$ 、 0.01)。与 AST IV+Rg₁ 及依达拉奉比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 3。



与假手术组比较: $\diamond\diamond P<0.01$; 与模型组比较: $\triangle P<0.05$ $\triangle\triangle P<0.01$; 与 AST IV 组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$; 与 Rg₁ 组比较: $\square\square P<0.01$; 与 Rb₁ 组比较: $\blacksquare P<0.01$; 与 R₁ 组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$; 与 4 种有效成分配伍组比较: $\blacktriangle P<0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ $\diamond\diamond P<0.01$ vs Sham group; $\triangle P<0.05$ $\triangle\triangle P<0.01$ vs model group; $*P<0.05$ $**P<0.01$ vs AST IV group; $\square\square P<0.01$ vs Rg₁ group; $\blacksquare P<0.01$ vs Rb₁ group; $*P<0.05$ $**P<0.01$ vs R₁ group; $\blacktriangle P<0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ vs four active components combination group

图 3 各组脑组织 Caspase-3 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 Comparison on Caspase-3 protein expression in brain tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.3 各组小鼠脑组织 GRP78 和 Caspase-12、p-JNK1/2 蛋白表达的比较

与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 GRP78 蛋白表达量显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,AST IV、Rg₁、R₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁、AST IV+Rb₁、AST IV+R₁ 及依达拉奉组小鼠脑组织 GRP78 蛋白表达量进一步增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。Rb₁ 组与模型组比较差异无显著性差异 ($P>0.05$)。AST IV+Rg₁、AST IV+Rb₁、AST IV+R₁ 升高 GRP78 的效应均强于 Rg₁、Rb₁、R₁ 及 AST IV 单用 ($P<0.05$ 、 0.01)。4 种有效成分配伍升高 GRP78 的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV+Rb₁、AST IV+R₁ ($P<0.05$ 、 0.01)。与 AST IV+Rg₁ 及依达拉奉比较无显著性差异 ($P>0.05$)。见图 4 和表 1。

与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 Caspase-12 蛋白表达量显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,R₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁、AST IV+R₁ 及依达拉奉组小鼠脑组织 Caspase-12 蛋白表达量显著减

少 ($P<0.05$ 、 0.01)。且 AST IV+Rg₁ 的效应强于 AST IV 和 Rg₁ 单用 ($P<0.05$ 、 0.01)。AST IV+R₁ 的效应强于 AST IV ($P<0.01$)。4 种有效成分配伍的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV+Rb₁ ($P<0.05$ 、 0.01)。与 AST IV+Rg₁、AST IV+R₁ 及依达拉奉比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4 和表 1。

与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 p-JNK 蛋白表达量显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,AST IV、Rg₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁、AST IV+Rb₁ 及依达拉奉组小鼠脑组织 p-JNK 蛋白表达量显著减少 ($P<0.05$ 、 0.01)。且 AST IV+Rb₁ 降低 p-JNK 蛋白的效应显著强于 AST IV 与 Rb₁ 单用 ($P<0.05$ 、 0.01)。AST IV+Rg₁ 与 AST IV、Rg₁ 单用比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。4 种有效成分配伍降低 p-JNK 的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV+Rg₁、AST IV+R₁ ($P<0.05$ 、 0.01)。与 AST IV+Rb₁ 及依达拉奉比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4 和表 1。

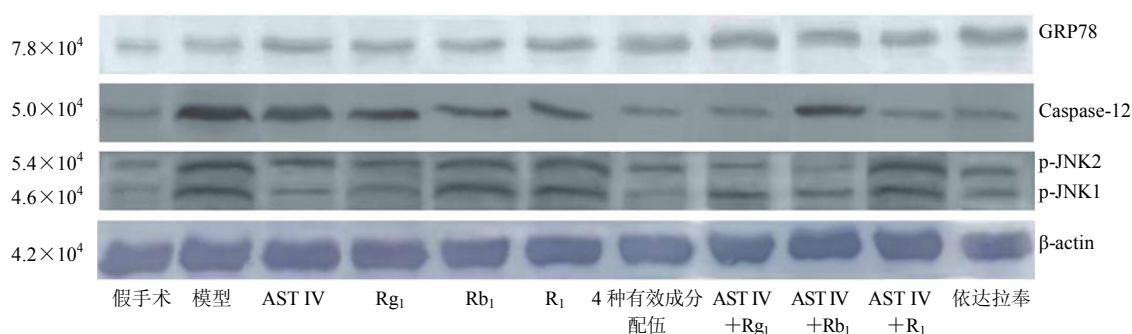


图4 各组小鼠脑组织 GRP78 和 Caspase-12、p-JNK1/2 蛋白表达的 Western-blotting 图谱

Fig. 4 Western-blotting patterns of GRP78 as well as Caspase-12 and p-JNK1/2 protein expressions of mice in each group

表1 各组小鼠脑组织 GRP78 和 Caspase-12、p-JNK1/2 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Comparison on GRP78 as well as Caspase-12 and p-JNK1/2 protein expression of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	GRP78	Caspase-12	p-JNK
假手术	0.11 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.48 ± 0.07
模型	0.27 ± 0.04 ^{◇◇}	0.08 ± 0.01 ^{◇◇}	0.72 ± 0.06 ^{◇◇}
AST IV	0.31 ± 0.03 ^{△△△}	0.07 ± 0.02 ^{△△}	0.63 ± 0.08 ^{△△△}
Rg ₁	0.30 ± 0.03 ^{△△△}	0.06 ± 0.02 ^{△△}	0.64 ± 0.06 ^{△△△}
Rb ₁	0.30 ± 0.02 ^{△△}	0.06 ± 0.02 ^{△△}	0.71 ± 0.08 ^{△△}
R ₁	0.31 ± 0.02 ^{△△△}	0.05 ± 0.01 ^{△△}	0.65 ± 0.09 ^{△△}
4种有效成分配伍	0.42 ± 0.04 ^{△△□□■☆☆}	0.03 ± 0.01 ^{△△□□■☆☆}	0.53 ± 0.05 ^{△△□□■☆☆}
AST IV + Rg ₁	0.42 ± 0.03 ^{△△□□}	0.04 ± 0.01 ^{△△□□}	0.62 ± 0.08 ^{△△△}
AST IV + Rb ₁	0.38 ± 0.03 ^{△△□□■}	0.07 ± 0.02 ^{△△}	0.53 ± 0.06 ^{△△□■}
AST IV + R ₁	0.35 ± 0.03 ^{△△□■}	0.04 ± 0.01 ^{△△□}	0.65 ± 0.07 ^{△△}
依达拉奉	0.42 ± 0.04 ^{△△}	0.04 ± 0.01 ^{△△}	0.54 ± 0.10 ^{△△}

与假手术组比较: ^{◇◇} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P < 0.05$ ^{△△△} $P < 0.01$; 与 AST IV 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 Rg₁ 组比较: [□] $P < 0.05$ ^{□□} $P < 0.01$; 与 Rb₁ 组比较: [■] $P < 0.01$; 与 R₁ 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 4 种有效成分配伍组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$
^{◇◇} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{△△} $P < 0.05$ ^{△△△} $P < 0.01$ vs model group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs AST IV group; [□] $P < 0.05$ ^{□□} $P < 0.01$ vs Rg₁ group; [■] $P < 0.01$ vs Rb₁ group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs R₁ group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs four active components combination group

4 讨论

脑缺血再灌注损伤是在脑缺血基础上再灌注导致的脑组织进一步损伤, 其发病机制非常复杂。细胞凋亡是脑缺血后迟发性神经元死亡的主要形式。细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下, 受内在遗传机制的控制自动结束生命的过程, 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (Caspase) 家族是细胞凋亡程序中的关键元件和细胞凋亡的参与者。迄今为止, 已发现 14 个 Caspase 家族成员, 其中 Caspase-3 又称为死亡蛋白酶, 是介导多种凋亡途径的共同下游效应部分, 是细胞凋亡的必经之路^[9-10]。

本研究结果显示, 脑缺血再灌注后, 神经细胞出现凋亡, Caspase-3 蛋白表达增加。黄芪与三七的有效成分均可以减轻缺血再灌注后神经细胞的凋

亡, 降低凋亡率, 减少 Caspase-3 蛋白的表达。且 AST IV + Rg₁ 与 AST IV + R₁ 降低凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达的效应分别强于各药物单用; 4 种有效成分配伍降低凋亡率的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV + Rb₁, 减少 Caspase-3 蛋白表达的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV + Rb₁ 和 AST IV + R₁。提示 AST IV 与三七的有效成分可以抑制脑缺血再灌注后神经细胞的凋亡, 主要有效成分配伍后对凋亡的抑制作用增强。

细胞凋亡按 Caspase 激活方式分为线粒体途径、死亡受体途径及内质网途径。严重或持续不缓解的 ERS 可诱导细胞凋亡。葡萄糖调节蛋白 (GRPs) 是一类高度保守的应激蛋白, 许多应激条件都可以诱导其表达上调, 促进蛋白质的正确折叠, 减少错

误折叠蛋白质的数量,最终减轻 ERS 反应。GRP78 和免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip)是 GRP 家族的主要成员,主要分布在内质网腔中。研究表明 GRP78 表达的上调是 ERS 的标志,在应激条件下对细胞起保护作用^[11]。当未折叠蛋白质积累时,未折叠或错叠蛋白与 Bip/GRP78 的结合使得 Bip 与肌醇需求酶(IRE1)、蛋白激酶 R 样 ER 激酶(PERK)、活化转录因子 6(ATF6)解离并使这 3 个分子激活,降低未折叠或错误折叠蛋白在内质网内的积累,恢复内质网的正常功能^[12]。

然而严重或长时间的 ERS 损伤 ER 的功能时,则激活内质网凋亡信号通路诱导细胞凋亡^[13]。ERS 诱导的细胞凋亡与以下机制有关:(1)Caspase-12 的活化,Caspase-12 属于 Caspase 亚家族成员,在肌肉、肾、肝组织中高水平表达,在脑组织中也有中等水平的表达。Caspase-12 定位于内质网膜上,在 ERS 时可被特异性激活诱导凋亡^[14-15]。(2)诱导 CHOP 表达,C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)属于 C/EBP 转录因子家族,主要存在于细胞质中,量很低,在 ERS 时被活化转位至细胞核,激活 GADD34、ERO1 和死亡受体 DR5 等凋亡反应蛋白表达,促进凋亡^[16]。(3)激活 JNK,ERS 时激活 JNK,JNK 进一步磷酸化肿瘤坏死因子受体相关因子(TrAF2)等,诱导细胞凋亡^[17]。研究发现,依达拉奉无论是对脑缺血再灌注的动物模型还是对脑卒中病人都能减少脑梗死面积和脑水肿,其神经保护作用与其减少 CHOP 和 Caspase-12 的表达有关^[18]。

本研究表明,脑缺血再灌注后,脑组织 GRP78 蛋白表达显著增加,这是内质网对应激产生的一种保护机制,以降低未折叠或错误折叠蛋白在内质网内的积累,恢复内质网的正常功能。除了 Rb₁,各药物组均能进一步促进 GRP78 蛋白的表达,且各配伍组的效应均强于药物单用,4 种有效成分配伍的效应强于 AST IV+Rb₁ 和 AST IV+R₁。提示 AST IV 与三七的有效成分配伍抑制神经细胞凋亡的作用与上调脑组织 GRP78 蛋白的表达,减轻脑缺血再灌注后 ERS,从而发挥对神经细胞的保护作用有关,且 4 种有效成分配伍与 AST IV+Rg₁ 的作用相近。机制研究结果显示,脑缺血再灌注 24 h 后,脑组织 Caspase-12、p-JNK1/2 蛋白表达均显著增加,说明可能过强或持久的 ESR 通过上调 Caspase-12 蛋白表达和促进 JNK1/2 蛋白的磷酸化启动了细胞

凋亡途径。R₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁ 与 AST IV+R₁ 能显著抑制脑组织 Caspase-12 蛋白的上调,且 AST IV+Rg₁ 的效应强于 AST IV 与 Rg₁ 单用,AST IV+R₁ 的效应强于 AST IV 单用,4 种有效成分配伍的效应优于 4 种有效成分单用及 AST IV+Rb₁。AST IV、Rg₁、4 种有效成分配伍、AST IV+Rg₁ 及 AST IV+Rb₁ 亦能减少 JNK1/2 的磷酸化水平,且 4 种有效成分配伍的效应强于 4 种有效成分单用及 AST IV+Rg₁、AST IV+R₁。这些结果提示,AST IV 与三七的主要有效成分配伍能通过 ESR 的不同环节增强对 ERS 损伤的抑制作用。其中 AST IV+Rb₁ 可能主要作用于 JNK 通路;AST IV+R₁ 可能主要作用于 Caspase-12 通路;4 种有效成分配伍和 AST IV+Rg₁ 均能作用于 Caspase-12 和 JNK 通路。

参考文献

- [1] 黄小平,刘晓丹,邓常清. 黄芪和三七的主要有效成分配伍对 PC12 细胞氧化损伤致的细胞凋亡和活性氧、线粒体膜电位的影响 [J]. 中西医结合学报, 2012, 10(10): 1127-1134.
- [2] Lee E J, Shin S H, Hyun S, *et al.* Endoplasmic reticulum (ER) stress enhances Tip60 (a histone acetyltransferase) binding to the concanavalin A [J]. *Open Biochem J*, 2012, 6: 1-10.
- [3] Brewer J W, Jackowski S. UPR-mediated membrane biogenesis in B cells [J]. *Biochem Res Int*, 2012, 2012: 738471. doi: 10.1155/2012/738471.
- [4] Kuga A, Ohsawa Y, Okada T, *et al.* Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(15): 2975-2983.
- [5] Nakka V P, Gusain A, Raghubir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Neurotox Res*, 2010, 17(2): 189-202.
- [6] 黄小平,王 蓓,邱咏园,等. 黄芪甲苷、人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 抗小鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤和促进能量代谢的配伍研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(7): 5-11.
- [7] 黄小平,王 蓓,邱咏园,等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 220-226.
- [8] Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, *et al.* A model of global cerebral ischemia in C57BL/6 mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(2): 151-158.
- [9] Zhang H, Song L C, Liu Y Y, *et al.* Prinacilil reduces neuronal apoptosis following cerebral ischemia-reperfusion in rats

- through both mitochondrial and death-receptor signal pathways [J]. *Neurosci Bull*, 2007, 23(3): 145-150.
- [10] Oida Y, Shimazawa M, Imaizumi K, *et al*. Involvement of endoplasmic reticulum stress in the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil [J]. *Neuroscience*, 2008, 151(1): 111-119.
- [11] Reddy R K, Mao C, Baumeister P, *et al*. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation [J]. *J Biol Chem*, 2009, 278(3): 20915-20924.
- [12] Ma Y, Hendershot I M. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 13792-13799.
- [13] Kuga A, Ohsawa Y, Okada T, *et al*. Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(15): 2975-2983.
- [14] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, *et al*. Caspase-12 mediates ER-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloidbeta [J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 98-103.
- [15] Martinez J A, Zhang Z, Svetlov S I, *et al*. Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(12): 1480-1493.
- [16] Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response [J]. *J Biochem*, 2012, 151(3): 217-219.
- [17] Arshad M, Ye Z, Gu X, *et al*. RNF13, a RING finger protein, mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through the inositol-requiring enzyme (IRE1 α)/c-Jun NH2-terminal kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(12): 8726-8736.
- [18] Srinivasan K, Sharma S S. Edaravone offers neuroprotection in a diabetic stroke model via inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00763.x.