

[文章编号] 1000-4718(2009)02-0264-04

大蒜新素对脑缺血再灌注大鼠海马的保护作用及对 P53 蛋白表达的影响

郭莉华², 李清君^{1Δ}, 胡玉燕¹, 褚赛纯¹, 李文斌¹, 张景坤¹

(¹ 河北医科大学病理生理学教研室,河北 石家庄 050017; ² 邢台医学高等专科学校,河北 邢台 054000)

[摘要] **目的:** 观察大蒜新素对脑缺血再灌注大鼠海马神经元的保护作用及对海马 P53 蛋白表达的影响。**方法:** 采用大鼠全脑缺血模型(4VO 法),大蒜新素 10、20 和 30 mg/kg 分两次于缺血前 30 min 和再灌注 10 min 时经尾静脉注入,每次注射总量的 1/2。再灌注 24 h 时取大鼠海马,甲苯胺蓝染色观察海马 CA1 区神经元的形态学改变,流式细胞技术检测海马神经元凋亡率,免疫组织化学方法检测海马 CA1 区 P53 蛋白的表达。**结果:** 与 sham 组比较,大鼠全脑缺血 10 min 再灌注 24 h 时,海马 CA1 区部分神经元死亡,存活神经元数目明显减少,海马神经元凋亡率明显增高,P53 蛋白表达增多。静脉给予大蒜新素可使缺血再灌注大鼠海马组织损伤程度减轻,存活神经元数目增加,神经元凋亡率降低,P53 蛋白表达减少。**结论:** 大蒜新素对脑缺血再灌注大鼠海马神经元具有保护作用,通过下调 P53 蛋白的表达而抑制神经元凋亡可能是其发挥保护作用的重要机制之一。

[关键词] 大蒜新素; 脑缺血; 海马; 蛋白质 P53; 神经元凋亡

[中图分类号] R363.2 **[文献标识码]** A

Protective effect of allitridi on hippocampus of rats with cerebral ischemia – reperfusion and P53 expression

GUO Li – hua², LI Qing – jun¹, HU Yu – yan¹, CHU Sai – chun¹, LI Wen – bin¹, ZHANG Jing – kun¹

(¹ Department of Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ² Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China. E – mail: qingjun666@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the protective effect of allitridi on hippocampal neuron of rats with cerebral ischemia – reperfusion (I/R) injury and to investigate its effects on P53 expression in hippocampus. **METHODS:** The global cerebral ischemia – reperfusion models were established by 4 – vessel occlusion. Allitridi at doses of 10, 20 or 30 mg/kg was injected through rat’s tail vein, half dose at 30 min before brain ischemia and another half dose at 10 min after reperfusion were injected, respectively. The hippocampus of rat was removed 24 h after reperfusion. Toluidine blue staining was applied to estimate morphologic changes. Flow cytometry was used to evaluate neuronal apoptosis rate of hippocampus. Immunohistochemistry was used to observe the expression of P53 protein. **RESULTS:** Compared with sham group, survival neuronal density in I/R group was significantly depressed. The rate of neuronal apoptosis and the expression of P53 protein were significantly increased. Allitridi significantly increased the number of survival neurons in hippocampus compared to I/R group. Meanwhile, allitridi remarkably inhibited the rate of neuronal apoptosis and the expression of P53 protein. **CONCLUSION:** Allitridi has protective role against brain ischemia reperfusion injury. The mechanism may be involved in blocking P53 protein expression in hippocampus of rats with ischemia – reperfusion.

[KEY WORDS] Allitridi; Brain ischemia; Hippocampus; Protein P53; Neuronal apoptosis

大蒜在遭受机械破坏时,立即释放出大蒜素,而大蒜素的化学性质很不稳定,很快转化为大蒜新素(allitridi, All)。大蒜新素的化学名称为三硫二丙烯,现已能人工合成,是临床应用的大蒜素注射液的有效成份。由于其能通过血脑屏障,因此在防治缺

血性脑血管病方面的作用倍受关注。研究资料显示,大蒜新素可改善脑梗塞病人的临床症状,表明其具有改善脑功能的作用^[1]。动物实验中发现,大蒜新素可扩张大鼠脑血管,改善微循环^[2]。已有大量的研究证实,P53 蛋白表达增多是脑缺血再灌注后神

[收稿日期] 2008-01-09 [修回日期] 2008-06-11

Δ通讯作者 Tel: 0311-86266487; E-mail: qingjun666@yahoo.com.cn

经元凋亡的重要机制之一^[3]。本实验旨在从组织形态学角度,观察大蒜新素对缺血再灌注脑组织的保护作用,并对其抗神经元凋亡机制进行初步研究,为临床应用大蒜新素防治脑缺血/再灌注损伤提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 动物与分组

健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 270 - 320 g,由河北省实验动物中心提供。动物随机分为 5 组:①假手术组(sham 组);②缺血/再灌注组(I/R 组);③缺血/再灌注 + 大蒜新素 10 mg/kg 组(I/R + All 10 mg 组);④缺血/再灌注 + 大蒜新素 20 mg/kg 组(I/R + All 20 mg 组);⑤缺血/再灌注 + 大蒜新素 30 mg/kg 组(I/R + All 30 mg 组)。每组 12 只动物。其中 6 只用于观察海马形态学改变、存活神经元密度和 P53 蛋白的表达;6 只用于检测海马神经元凋亡率。

2 药物、试剂及仪器

大蒜素注射液(有效成份为大蒜新素,其化学名称为三硫二丙烯,结构式为 $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$,国药准字 H32025639,产品批号 AT₂0006)为济南利民制药厂产品。形态学图像分析软件(JEDA801A)为江苏捷达公司生产。FACS420 型流式细胞仪为 Becton Dickinson 产品。P53 I 抗购于 NeoMarker, II 抗、III 抗、DAB 显色剂均购于北京中杉试剂公司。

3 动物模型的复制

采用 Pulsinelli 等^[4]创立的四血管闭塞(4 - vessel occlusion, 4VO)法制备大鼠全脑缺血模型。具体方法是:大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,腹位固定,从枕后正中做 1 个约 1.5 cm 切口,分离暴露第一颈椎横突,寻找翼状孔,插入电烙针凝闭双侧椎动脉,缝合切口,将动物放回笼内饲养。48 h 后,10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉下,背位固定,颈部正中切口,游离双侧颈总动脉,用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉,10 min 后移去动脉夹,恢复脑血流。Sham 组凝闭双侧椎动脉并分离暴露颈总动脉,而不夹闭颈总动脉。夹闭双侧颈总动脉后大鼠昏迷,双侧瞳孔变大,对光反射消失,能自主呼吸的为模型复制成功。在整个实验过程中出现死亡、癫痫、抽搐或对光反射不消失的大鼠均弃去不用。动物于再灌注 24 h 处死取脑。

4 给药方法

分 2 次(于缺血前 30 min 及再灌注后 10 min)经尾静脉给予大蒜素注射液,每次注射量为总量的 1/

2。Sham 组及 I/R 组给予等体积的 5% 葡萄糖注射液。

5 海马形态学改变及存活神经元密度观察

大鼠经主动脉插管,先后灌注温(37 °C)生理盐水及 4 °C 预冷的 4% 多聚甲醛溶液(pH 7.4),开颅取脑,视交叉后 1 - 4 mm 处取冠状切面,放入 4% 多聚甲醛溶液中后固定 7 d。石蜡包埋、切片。1% 甲苯胺蓝染色 20 min,光学显微镜下观片。

参照 Kato 等^[5]分级方法,光学显微镜下对海马 CA1 区组织学改变进行分级(histological grades, HG),标准如下:0 级:海马神经元排列整齐规则,无神经元死亡;1 级:有散在的神经元死亡;2 级:成片神经元死亡;3 级:几乎全部的神经元死亡。高倍镜($\times 400$)下计数海马 CA1 区 1 mm 区段内细胞膜完整、胞核饱满、核仁清晰的锥体细胞数目,每只大鼠随机抽取 3 张切片,每张切片双侧海马各计数 3 个视野,取平均数为存活神经元密度值(neuronal density, ND)。

6 流式细胞仪检测海马神经元凋亡率

在冰盘上分离出海马后放在 70% 乙醇中固定,4 °C 保存。将固定好的组织放在 120 目不锈钢网上,下置一平皿,用眼科剪刀将组织剪碎,用眼科镊子轻轻揉搓组织块,边搓边用生理盐水冲洗,直至将组织搓完为止。将平皿中的混悬液用 300 目铜网过滤去除细胞团块,收集细胞悬液,离心 2 min(500 - 800 r/min)。取 1×10^5 cells(0.1 mL)加入溴化乙啶(ethidium bromide, EB)染液,在 4 °C 避光条件下进行 DNA 染色 30 min,流式细胞仪进行单参数检测。

7 免疫组织化学法测定 P53 蛋白的表达

采用过氧化物酶标记的链霉卵白素生物素(streptavidin/peroxidase, SP)试剂盒法。石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育,微波炉抗原修复,0.02% Triton 液室温孵育,血清封闭,滴加 1:100 的多克隆 P53 抗体,4 °C 过夜,PBS 冲洗,II 抗 37 °C 孵育 1 h,辣根酶标记链霉卵白素 37 °C 孵育 50 min, DAB 显色。

对切片中免疫组化显色阳性的神经元进行计数,采用显微计数法(10 目镜 \times 40 物镜),以每 1 mm^2 区段内阳性神经元数目表示;并采用形态学图像分析软件,对阳性细胞着色程度的积分吸光度(IA)进行测定和分析。

8 统计学处理

应用 SPSS 软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One way ANOVA)进行多组比较,*t* 检验进行组间处理;组织

学分级采用多样本等级资料的秩和检验进行比较。

结 果

1 海马组织学分级及神经元密度改变

由图 1 可以看出, sham 组大鼠海马 CA1 区锥体细胞排列整齐规整、可分为 2-3 层, 细胞结构完整、胞核饱满、核仁清晰, 偶见核质浓染、胞体形态不规则的神经元(图 1 A)。I/R 组海马 CA1 区锥体细胞

排列松散, 层次不清, 可见到胞体缩小, 形态不规则, 胞膜皱缩, 胞核固缩浓染的细胞, 细胞旁有空染区, 有散在或大片的神经元缺失现象(图 1 B), 与 sham 组比较, 海马组织学分级升高, 存活神经元密度明显降低。I/R + 大蒜新素各组大鼠海马 CA1 区锥体细胞排列和形态均较 I/R 组明显改善(图 1 C、D、E), 海马组织学分级均明显降低, 存活神经元密度值明显增加, 其中以大蒜新素 20 mg/kg 组最为显著。

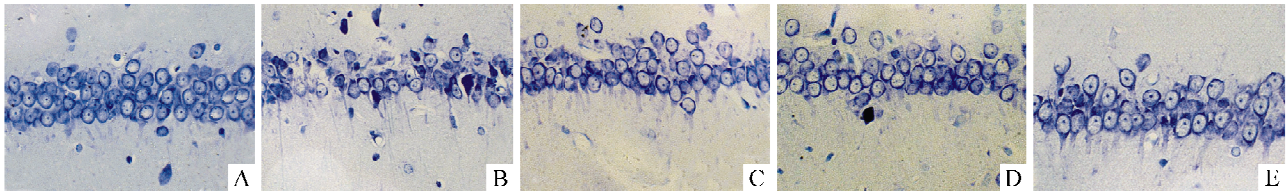


Fig 1 The effect of allitridi (All) on histological morphology in hippocampal CA1 of rats with cerebral ischemia - reperfusion ($\times 400$). A: sham; B: I/R; C: I/R + All 10 mg; D: I/R + All 20 mg; E: I/R + All 30 mg.

图 1 大蒜新素对全脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区形态学影响

表 1 大鼠海马 CA1 区存活神经元密度及组织学分级

Tab 1 Neuronal density(ND) and histological grades in hippocampal CA1 of rats with cerebral ischemia/reperfusion ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	ND (number/mm ²)	Histological grades(n)			
		0	1	2	3
Sham	184.00 ± 10.88	5	1		
I/R	108.70 ± 14.64*		4	2*	
I/R + All (10 mg)	134.20 ± 12.09**	2	4**		
I/R + All (20 mg)	159.60 ± 19.43**	3	3**		
I/R + All (30 mg)	131.30 ± 11.85**	2	4**		

* $P < 0.05$ vs sham; # $P < 0.05$ vs I/R.

2 海马神经元凋亡率变化

I/R 组海马神经元凋亡率比 sham 组显著增高; I/R + All 10 mg 组、I/R + All 20 mg 组及 I/R + All 30 mg 组海马神经元凋亡率比 I/R 组明显降低, 但仍高于 sham 组水平, 其中以 I/R + All 20 mg 组降低最为明显, 见表 2。

3 P53 蛋白表达改变

由表 2 和图 2 可以看出, I/R 组与 sham 组相比, 每 mm² 区段内 P53 蛋白阳性细胞数目明显增多; I/R + All 10 mg、I/R + All 20 mg 和 I/R + All

30 mg 组与 I/R 组相比, 阳性细胞数目显著减少, 但仍多于 sham 组水平, 其中以 I/R + All 20 mg 组阳性细胞数目减少最为明显。

采用图像分析系统测定各组大鼠海马 CA1 区 P53 阳性细胞的积分吸光度值, 结果显示, I/R 组与 sham 组相比, P53 阳性细胞的积分吸光度值显著增高; I/R + All 10 mg、I/R + All 20 mg 和 I/R + All 30 mg 组与 I/R 组相比, P53 阳性细胞积分吸光度值明显降低, 但仍高于 sham 组水平, 其中以 I/R + All 20 mg 组降低最为明显, 见表 2、图 2。

表 2 大鼠海马神经元凋亡率及 CA1 区 P53 阳性细胞数目、IA 值变化

Tab 2 Changes in neuron apoptotic rate, number and IA of P53 immunoreactive cells of hippocampal CA1 of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	Neuron apoptotic rate (%)	Number of P53 immunoreactive cell	
		Number of P53 immunoreactive cell	IA of P53 immunoreactive cell
Sham	2.43 ± 0.39	18.44 ± 5.53	9.38 ± 4.56
I/R	10.43 ± 0.42*	108.00 ± 20.15*	33.19 ± 6.13*
I/R + All(10 mg)	7.85 ± 0.53**	56.63 ± 17.65**	18.25 ± 5.01**
I/R + All(20 mg)	5.55 ± 0.70**	50.38 ± 16.67**	15.79 ± 4.23**
I/R + All(30 mg)	8.08 ± 0.74**	65.80 ± 20.32**	19.35 ± 4.12**

* $P < 0.05$ vs sham; # $P < 0.05$ vs I/R.

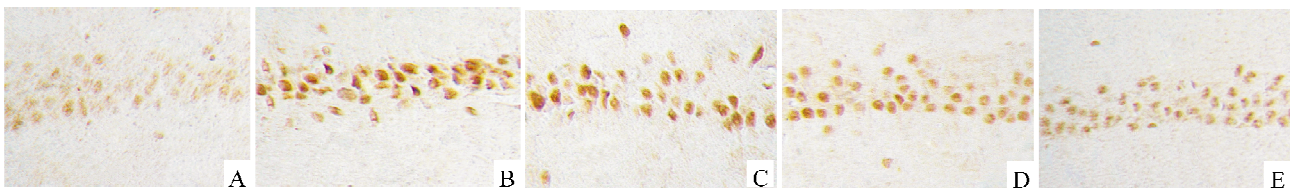


Fig 2 The effect of allitridi (All) on expression of P53 protein in hippocampal CA1 of rats with cerebral ischemia - reperfusion ($\times 400$). A: sham; B: I/R; C: I/R + All 10 mg; D: I/R + All 20 mg; E: I/R + All 30 mg.

图 2 大鼠海马 CA1 区 P53 蛋白表达改变

讨 论

脑缺血再灌注损伤既可引起神经元坏死,又可引起神经元凋亡,两者均可引起神经元缺失,是导致患者神经系统功能不能完全恢复,甚至于致残的重要原因,严重影响了患者的生活质量^[6]。

大蒜新素为大蒜的有效成份,脂溶性,易于通过血脑屏障,近些年来,大蒜新素在临床防治脑缺血及缺血再灌注损伤方面的作用已有一些报道^[1],但其对抗脑缺血再灌注损伤,保护神经元存活的确切证据尚不够充分,抑制脑缺血再灌注损伤诱导神经元凋亡的机制尚不十分明了,本研究在这些方面进行了观察。

已有研究表明,P53 蛋白表达改变是引起缺血再灌注后神经元凋亡的关键因素^[3,7]。因此,给予大蒜新素抑制了 P53 蛋白的表达,可能是其发挥抑制脑缺血再灌注后神经元凋亡的重要环节。但大蒜新素如何影响 P53 蛋白表达尚不清楚,也可能与其能够增加脑血流以及抗氧化功能有关^[2,8]。大蒜新素是否具有直接影响 P53 蛋白表达的功效,尚有待于进一步研究加以证实。

本实验中,3 个剂量的大蒜新素都可以起到抗脑缺血再灌注损伤和抑制神经元凋亡的作用,但以 20 mg/kg 剂量效果最为明显。而 30 mg/kg 大蒜新素的效果反而不如 20 mg/kg 效果更好,这可能是由于用药剂量过大,产生了毒副作用,影响了其治疗效果所致。这一结果提示,恰当的用药剂量至关重要。

本研究结果提示,大蒜新素对脑缺血再灌注大鼠海马神经元具有保护作用,通过下调 P53 蛋白的表达而抑制神经元凋亡可能是其发挥保护作用的机

制之一。大蒜新素具有良好的临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] 史载祥,张久亮,毛建生. 大蒜素注射液治疗急性脑梗死 101 例临床研究[J]. 中西医结合急救杂志,1999,6(9):390-394.
- [2] 马晓红,许逸,潘鑫鑫. 大蒜新素对大鼠软脑膜微循环的作用[J]. 中国药理学通报,2000,16(2):145-148.
- [3] Villunger A, Michalak EM, Coultas L, et al. p53 and drug induced apoptotic responses mediated by BH-3-only proteins puma and noxa[J]. Science, 2003, 302(5647):1036-1038.
- [4] Pulsinelli W, Brierley J. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10(3):267-269.
- [5] Kato H, Liu Y, Araki T. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects[J]. Brain Res, 1991, 553(2):238-242.
- [6] 郭建荣,岳云,崔健君,等. 异丙酚对缺血再灌注损伤大鼠海马氨基酸递质水平变化及神经元凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(8):1547-1550.
- [7] 方媛,魏桂英,梅方武,等. 脑缺血再灌注后 p53 表达与细胞凋亡的关系[J]. 同济医科大学学报,2001,30(2):158-162.
- [8] 任丽丽,李清君,李文斌,等. 大蒜素抑制脑缺血-再灌注诱导的海马神经元凋亡及其机制初探[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(10):2022-2026.