

葛根素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区 NGF 表达的影响

侯永春^{1*}, 严孜²

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 江西省医药学校, 南昌 330200)

[摘要] 目的: 观察葛根素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区 NGF 表达的影响。方法: 将 84 只体重在 200~300 g 的健康雄性大鼠, 其中随机挑选 20 只, 分成 2 个亚组, 分别为 30 d(1 月组)空白组和 90 d(3 月组)空白组(正常对照), 其余 64 只大鼠使用永久性双侧颈总动脉结扎法制作慢性脑缺血模型并随机又分成 3 个组, 分别为模型组、雌二醇组和葛根素治疗组, 每组又分别分成 30 d(1 月组)和 90 d(3 月组)2 亚组。雌二醇组使用雌二醇 ip 治疗大鼠慢性脑缺血($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); 葛根素治疗组使用葛根素灌服治疗大鼠($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); 相同剂量的生理盐水用于模型组大鼠。各组分别在 30, 90 d 后处死。用免疫组化方法观察大鼠海马 CA1 区神经生长因子(NGF)的表达, 应用显微图像分析系统进行分析。结果: 30 d 模型组、雌二醇组、葛根素组与正常组比较, 海马 CA1 区可见 NGF 的表达明显升高($P < 0.05$); 雌二醇组、葛根素组与模型组比 NGF 的表达明显升高($P < 0.05$)。90 d(3 月组)模型组、雌二醇、葛根素组大鼠海马 CA1 区 NGF 的表达与正常组比较 NGF 的表达上调($P < 0.05$), 与 90 d 模型组比较, 雌二醇大鼠海马 CA1 区 NGF 的表达无显著性差异, 葛根素组大鼠海马 CA1 区的 NGF 表达明显上调($P < 0.05$)。结论: 葛根素可能通过上调 NGF 水平, 发挥对脑缺血神经元的保护作用。

[关键词] 葛根素; 慢性脑缺血; 神经生长因子; 雌激素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0184-03

脑血管疾病是指在脑血流障碍或血管壁病变基础上发生的局限性或弥漫性脑功能障碍, 其发病率、死亡率和致残率很高。近年来, 对急性脑缺血损伤机制和预防治疗的研究不断增多, 而对慢性脑缺血的研究相对较少。随着我国社会和经济的发展, 老龄化社会的到来, 慢性脑缺血逐渐开始引起人们的广泛关注。

外源性雌激素替代治疗脑缺血, 可使脑血管疾病的发病率和病死率明显下降, 中药中的黄酮类化合物(flavonoids)、香豆雌酚(cumestans)和木脂素(lignans)经体内代谢可以产生与雌二醇相似的化学结构。因此, 这些化合物有可能结合并激活哺乳类动物及人类的雌激素受体, 从而发挥类似雌激素对心脑血管等系统的保护作用, 同时又避免了使用雌激素的不良影响^[1]。这类从植物中提取出来的化合物人们称之为植物雌激素, 葛根素正是其中之一^[2]。葛根素主要有扩张血管, 降血脂、血压, 改善微循环, 抗氧化, 抗血栓形成, 修复内皮细胞损伤以及抑制脑细胞凋亡等药理作用^[3]。对葛根素的研究表明, 葛根素可通过扩张颅内动脉增加大鼠脑血流量^[4], 葛根素在机体缺血再灌注时抑制细胞内 Ca^{2+}

的聚集, 对大鼠脑缺血再灌注损伤可以起到保护作用^[5]。葛根素可以使永久性大脑中动脉阻断模型去势雌性大鼠的大脑皮层正常神经细胞密度显著增加, 缺血侧 c-fos 表达阳性细胞数明显减少, 凋亡细胞数显著减少, 脑梗死体积百分比也明显缩小^[6]; 葛根素可下调 caspase-3 蛋白, 上调(Bcl-2)蛋白^[7]; 降低脑缺血再灌注后脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)的含量, 减轻病灶处白细胞的聚集, 从而阻止局部的炎症级联反应^[8]; 减少突触体钙浓度^[9]。这说明葛根素既具有雌激素样作用, 又对脑缺血后神经元有保护作用。

本研究通过对雄性大鼠使用永久性双侧颈总动脉结扎法制作慢性脑缺血模型, 用葛根素干预慢性脑缺血造成的损伤, 用免疫组化方法观察大鼠海马 CA1 区神经元变化, 观察葛根素对慢性脑缺血大鼠神经系统损伤的影响, 以进一步为葛根素防治脑血管病提供基础研究资料。

1 材料

1.1 动物 选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 84 只, 江西中医学院实验动物中心提供, 合格证号 2006-47, 体重(300 ± 20)g, 饲养温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 自然昼夜节律, 颗粒饲料饲养, 自由饮水。

1.2 药品与试剂 葛根素注射液, 山东东药方欣制药有限公司; 0.9% 氯化钠注射液, 江西科伦药业有限公司; APES(3-氨丙基-3-乙氧基甲硅烷), 抗兔 SP

[收稿日期] 20110905(006)

[通讯作者] * 侯永春, 硕士, 从事呀约配伍与运用研究, Tel: 0791-7118811, E-mail: 867560925@qq.com

试剂盒,PBS(中性磷酸盐缓冲溶液),DAB 显色剂,均为中杉金桥产品。

1.3 仪器 2135 型石蜡切片机(Leica,德国),DT10K 型电子天平(江苏常熟长青仪器仪表厂),恒温箱兼培养箱(上海医用恒温设备厂),BX-41 型显微照相机(Olympus,日本)。

2 方法

2.1 动物分组 84 只健康雄性大鼠中随机挑选 20 只,分成 2 个亚组,分别为 30 d 空白组和 90 d 空白组,其余 64 只大鼠随机分成为模型组、慢性脑缺血雌二醇治疗组(简称雌二醇组)、慢性脑缺血+葛根素给药组(简称给药组)3 个组,每组又分成 1 月组(30 d)和 3 月(90 d)组 2 亚组。其中 1 月(30 d)模型组 8 只,3 月(90 d)模型组 8 只,其余各个亚组均为 12 只。葛根素治疗组使用葛根素灌服($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);相同剂量的生理盐水用于模型组大鼠;1 月组在 30 d 和 3 月组在 90 d 后分别处死。

2.2 动物模型复制及给药 慢性脑缺血动物模型的制作采用永久性双侧颈总动脉结扎法。大鼠以 10% 水合氯醛 $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,仰卧固定于手术台上,剪除长毛,碘伏消毒,行颈前正中皮肤切口,钝性分离暴露左侧颈总动脉,用 1 号手术丝线分别永久性结扎颈总动脉远端和近端,并于两结扎点中间剪断颈总动脉,以同样方法结扎并剪断右侧颈总动脉,缝合皮肤切口。手术过程中持续监测肛温,通过白炽灯照射使其肛温保持在 $37 \sim 38 \text{ }^\circ\text{C}$,以避免低温对脑缺血的保护作用。术后青霉素 2 万单位 im 1 次。保温,至动物清醒后,归笼饲养,保持昼夜节律,自由摄食饮水。并对大鼠进行一般行为学观察。其中给药组术前 0.5 h 每只大鼠 ip 葛根素注射液 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (用生理盐稀释)。术后,1 月给药组大鼠每天 ip 葛根素注射液 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 共 30 d,3 月给药组共 90 d。

2.3 组织切片制备 大鼠以 10% 水合氯醛($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)ip 麻醉,打开腹腔,用止血钳夹住腹主动脉和下腔静脉;继之打开胸腔,用平头注射针经左心室插入升主动脉,然后剪开右心耳,进行灌注。每只大鼠先快速灌注含肝素($20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)的生理盐水冲洗,继而灌注 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 4% 多聚甲醛 $200 \sim 300 \text{ mL}$ ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 配制,pH 7.4),按照先快后慢的速度于 40 min 内灌注完毕^[4]。灌注结束后,迅速开颅取脑,置于 4% 的多聚甲醛中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定,4 h 后将大鼠脑组织移入 20% 蔗糖溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB 配

制,pH 7.4),置冰箱($4 \text{ }^\circ\text{C}$)待脑组织块沉底后,再转入 30% 蔗糖溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 配制,pH 7.4),待再次沉底后置冰箱($4 \text{ }^\circ\text{C}$)保存。切取包含海马部位的脑组织块,行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,行冠状位连续切片,片厚 $5 \text{ } \mu\text{m}$ 。每只大鼠切 10 张,取 2 张不连续切片,裱片后进行免疫组化。

2.4 免疫组化

2.4.1 脱蜡和水化 脱蜡前应将包埋的组织芯片在室温中放置 60 min 或 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中烘烤 20 min。①组织芯片置于二甲苯 I 中浸泡 5~7 min;②更换二甲苯 II 后在浸泡 5~7 min;③无水乙醇 I 中浸泡 6~7 min;④更换无水乙醇 II 后在浸泡 5~7 min;⑤自来水冲洗 3~4 min;⑥PBS 浸泡 1 min。

2.4.2 抗原热修复 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)置电炉或水浴锅加热至 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右,放入组织芯片加热。

2.4.3 免疫组化染色 ①切片冷却后 PBS 洗 1 次;②3% H_2O_2 (80% 甲醇)滴加在组织切片上,室温静置;③PBS 洗 2~3 次各 5 min;④倾去液体,PBS 浸泡 3 次,每次 2 min;⑤加辣根酶标记链霉素卵白素工作液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育;⑥倾去液体,用 PBS 洗次,每次 2 min;⑦DAB 染色,避光,随时显微镜观察;⑧倾去液体,自来水冲洗,蒸馏水冲 1 次;⑨脱水;⑩中性树脂胶封片。

2.5 切片观察 在海马 CA1 区随机选择 3 个视野,用目镜带方格的 400 倍显微镜计数。只计数带胞核的细胞。

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 10.0 软件对数据先做正态分布检验,再做方差齐性检验,各组间进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

NGF 于神经元内表达部位的分布比较广泛,在神经元的胞膜、胞浆、核膜、核质和轴突上均可见到。其免疫阳性颗粒主要分布在神经元胞浆内,胞浆染色呈深棕色而且均匀,而主干树突染色较浅。脑缺血时 NGF 表达显著增加,模型组 30 d 和 90 d 时 NGF 阳性细胞计数无明显差异。葛根素给药组和雌二醇给药组在 30 d NGF 阳性神经元细胞计数增多,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),葛根素给药组 90 d NGF 阳性细胞计数仍有较高表达,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

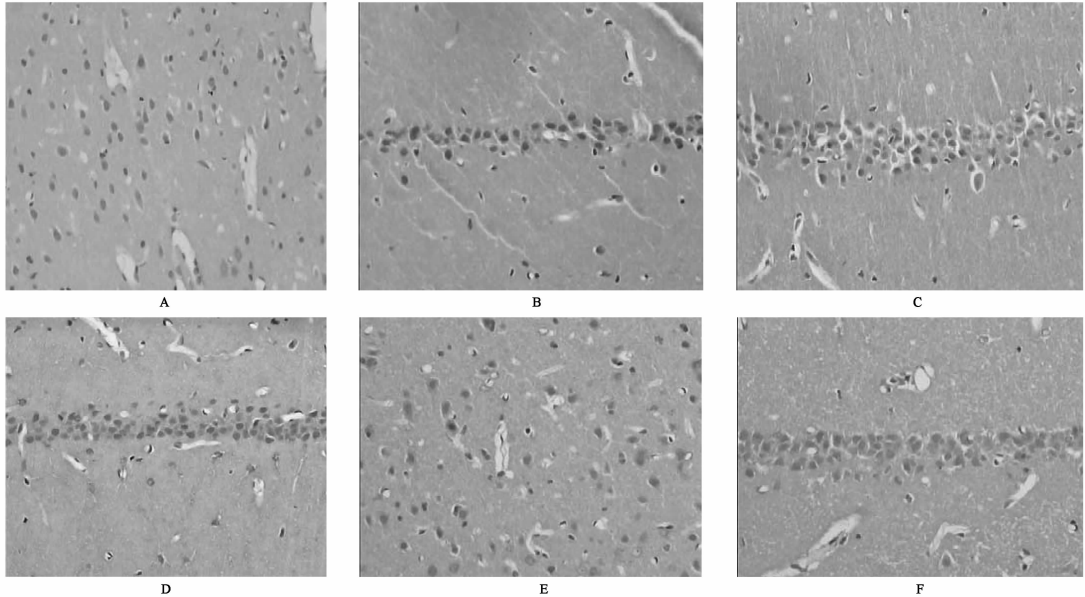
表 1 葛根素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区 NGF 免疫阳性神经元计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$) 个

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	30 d	90 d
正常	-	2.45 ± 1.14	2.41 ± 1.04
模型	-	7.08 ± 1.42 ¹⁾	8.56 ± 1.09 ¹⁾
雌二醇	1	20.00 ± 0.97 ^{1,2)}	7.45 ± 0.64 ¹⁾
葛根素	50	33.22 ± 0.98 ^{1,2)}	25.07 ± 1.55 ^{1,2)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与同期模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

脑缺血损伤后 NGF 阳性神经元的表达在 30 d 时较正常组明显增多, 90 d 与 30 d 时 NGF 阳性神经元的表达量无显著差别。本研究结果显示, 给药 30 d 雌二醇 1 mg·kg⁻¹ 组、葛根素 50 mg·kg⁻¹ 组大鼠 NGF 的表达水平比模型组明显提高 ($P < 0.05$); 给药 90 d 葛根素组仍有较高表达, 与雌二醇组 30 d 水平相当。提示应用葛根素可促进脑缺血后 NGF 的阳性神经元表达数量增加, 使表达时程延长, 因此



A. 30 d 模型组; B. 30 d 雌二醇 1 mg·kg⁻¹ 组; C. 30 d 葛根素 50 mg·kg⁻¹ 组;

D. 30 d 空白组; E. 90 d 模型组; F. 90 d 雌二醇 1 mg·kg⁻¹ 组

图 1 各组大鼠海马区 CA1 区 NGF 表达情况比较 (免疫组化染色, ×400)

葛根素很可能通过促进 NGF 的表达从而发挥神经保护作用, 为临床治疗缺血性脑血管疾病提供了理论依据。但 NGF 发挥保护作用的具体机制仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] 孙海燕, 刘舒, 吕树铮, 等. 植物雌激素对心血管保护作用的研究进展[J]. 临床荟萃, 2005, 20(7): 414.
[2] Xu X, Hu Y, Ruan Q. Effects of puerarin on learning-memory and amino acid transmitters of brain in ovariectomized mice [J]. Planta Med, 2004, 70(7): 627.
[3] 田代华. 实用中药辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1900.
[4] 陈连壁. 葛根素对犬脑血流的影响[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(9): 560.

[5] 陈红斌. 葛根素对再灌注损伤心肌细胞内 K⁺/Na⁺ 及 Ca²⁺ 浓度的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(1): 48
[6] 么晓轶, 李颖. 植物雌激素对去势雌性大鼠缺血性脑损伤的神经保护作用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2005, 12(3): 160.
[7] 高唱, 王景周, 王琳, 等. 葛根素对局灶性脑缺血/再灌注大鼠神经细胞凋亡的作用[J]. 中国急救医学, 2003, 23(1): 14.
[8] 朱蕾, 何丽娅. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注后凋亡相关蛋白的影响[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 1120.
[9] 杨黎, 何世银. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注后炎症细胞因子变化的影响[J]. 中国老年医学杂志, 2003, 3(23): 173.

[责任编辑 聂淑琴]