



紫檀芪对脑缺血/再灌注大鼠海马 CA1区ATP酶、COX活性影响

胡向阳¹, 舒晓春^{1*}, 孟晓军¹, 马义²

(1. 中山大学附属第五医院, 广东珠海519000; 2. 暨南大学生命科学院, 广东广州510632)

[摘要] 目的:观察紫檀芪对脑缺血/再灌注损伤大鼠海马CA1区ATP酶、细胞色素氧化酶活性的影响。方法:采用大鼠大脑中动脉线栓法制备脑缺血再灌注模型,将27只SD雄性大鼠随机分为3组:假手术组、缺血/再灌注组、紫檀芪组,检测各组大鼠海马CA1区ATP酶、COX活性的变化。结果:缺血/再灌注组海马CA1区ATP酶、COX活性均明显下降($P < 0.01$);紫檀芪组海马CA1区ATP酶、COX活性高于脑缺血/再灌注组($P < 0.05$)。结论:紫檀芪对脑缺血/再灌注大鼠海马CA1区能量代谢具有一定干预作用。

[关键词] 紫檀芪;脑缺血/再灌注损伤;细胞能量代谢;细胞色素氧化酶

海马组织尤其是CA1区锥体神经元对缺血性损伤十分敏感,而缺血/再灌注又会加重这一损伤^[1]。脑缺血/再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是一个系列的级联反应,包括能量障碍、炎症反应、细胞内钙失稳态、凋亡基因激活等^[2]。紫檀芪(pterostilbene)是西红柿、葡萄、草莓、桑椹等蔬菜和水果中含有的化学物质,研究显示紫檀芪具有预防氧化应激反应、抗衰老、抗细胞增殖等作用^[3,4]。紫檀芪对脑缺血/再灌注损伤ATP酶、细胞色素氧化酶活性的影响研究较少,本实验对其进行初步的探索。

1 材料与方法

1.1 动物 健康雄性SD大鼠27只,体重220~240g,由广东省实验动物中心提供,合格证号粤检证字2009A416。

1.2 试剂与仪器 紫檀芪(日本富士株式会社,98%),1%多聚甲醛和2%戊二醛磷酸缓冲液(广东化学试剂厂),ATP酶试剂盒(南京建成生物试剂公司),过氧化氢酶($20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)、细胞色素C(美国Sigma公司);PRIM-R台式高速低温离心机(德国贺

利氏仪器公司),BH-2型生物光学显微镜及照相系统(日本Olympus公司),MDF-330型立式超低温冰箱(日本Sanyo公司)。

1.3 动物模型制备 在Longa等^[5]方法上改进制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,大鼠以10%水合氯醛 $3.6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,麻醉后仰卧固定,颈正中切口,依次分离暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)、0~3号丝线分别结扎CCA远心端、ECA,微型血管夹夹闭ICA,在CCA处剪一小口,将头端烧制圆钝的鱼线沿CCA插入ICA,鱼线插入18.5~20mm处感觉有明显阻力后停止进线,结扎ICA,固定鱼线,缝合肌肉、皮肤,体外留2cm鱼线以备再灌注,缺血90min时,抽提线栓实现再灌注。手术完毕大鼠伤口滴加青霉素钠,腹腔注入少量青霉素钠,最后缝合皮肤,手术完毕回笼饲养。假手术组只分离出CCA,ECA和ICA并穿线,不结扎任何动脉及插线。

造模成功的标准:按照Longa等^[5]评分标准进行神经功能缺陷评分,各组分别在再灌注24h进行评分。0分:正常,无神经学征象;1分:动物不能完全伸展右前肢;2分:动物右侧肢体瘫痪,行走时向右侧转圈,出现追尾现象;3分:动物行走向右侧跌倒,或动物不能站立或动物打滚;4分:无自发活动,有意识障碍。神经功能缺陷评分在1~3分为模型成功。

1.4 动物分组、给药途径及药量 数字随机分组法分为3组,即假手术组、缺血/再灌注组、紫檀芪组。

[稿件编号] 20110113010

[基金项目] 广东省中医药管理局科研基金项目(A2010104)

[通信作者] *舒晓春,副主任医师,硕士生导师,主要从事骨代谢及内分泌系统疾病研究, Tel: (0756) 2528622, E-mail: zhshuxc@163.com

[作者简介] 胡向阳,博士,主治医师,主要从事脑血管及神经系统疾病研究, E-mail: aikongzhi@163.com



紫檀芪组分别于术前30 min、再灌注后、再灌注12 h舌静脉注射紫檀芪 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，缺血/再灌注组舌静脉注射同等剂量生理盐水，假手术组不给予处理。

1.5 海马 CA1 区锥体细胞数计数 取视交叉到乳头体后部之间的脑组织，4% 多聚甲醛浸泡固定，然后进行常规脱水，浸蜡，透明，包埋，在海马齿状回互包平面作石蜡切片，切片厚度 $5 \mu\text{m}$ ，行 HE 染色，在有测微尺显微镜 ($\times 10$) 的光镜下，计数海马 CA1 区 2 mm 范围内核完整的锥体细胞数(自 CA1 区始点起)。

1.6 海马 CA1 区 ATP 酶活性检测 动物快速断头取脑，在超净台生理盐水冰面上沿中线分开 2 个大脑半球，剪去小脑及嗅球部分，置于解剖显微镜下取海马，用 2 把纤维镊分离脑干，分离皮层组织，曝露出弯月形的海马，去除齿状回部分，分离出 CA1 区所在的海马回。将海马回组织低温称重，加 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸制成 10% 匀浆，以 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，取上清液检测 ATP 酶。按照 ATP 酶试剂盒提供步骤进行，以每小时每毫克组织蛋白的 ATP 酶分解 ATP 产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

1.7 海马 CA1 区 COX 活性测定 采用 DAB 法测定 COX 活性，腹腔注射戊巴比妥钠麻醉动物，经升主动脉 1% 多聚甲醛和 2% 戊二醛磷酸缓冲液灌注固定。断头取出脑组织，去除脑干和小脑，正中矢状切开分离出缺血侧大脑半球，在海马回互包平面行冰冻切片。对海马 CA1 区同一批酶组织化学染色切片进行定量分析，根据染色的底色在相同光学条件下，以“目标灰度值”作为测量参数，取其平均值作为该切片的灰度值，灰度值是反映透光密度的定量指标，反映细胞和酶的活性，灰度值越大，其酶活性越低，灰度值越小，其酶活性越高。所测定的灰度分为 256 个等级，0 级为最暗，256 级则为最亮，采用 LEICA Qwin 图像分析系统进行酶活性的定量分析。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 14.0 统计软件对数据进行重复测量资料的方差分析，定量指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示，方差分析，组间两两比较采用 q 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组海马 CA1 区锥体细胞数计数 假手术组海马 CA1 区锥体细胞呈椭圆形，核仁清楚；缺血/再灌注组海马 CA1 区锥体细胞数量明显下降，变性细胞数增多，可见许多神经元出现明显形状上的改变，细胞形态不规则，细胞体积缩小，胞浆浓缩，染色质凝集，嗜酸性染色增强；紫檀芪组海马 CA1 区锥体细胞数量下降，可见变性细胞，细胞形态不规则，细胞体积缩小，胞浆浓缩，嗜酸性染色增强。与假手术组比较，缺血/再灌注组锥体细胞数明显下降 ($P < 0.01$)，紫檀芪组有下降 ($P < 0.05$)；紫檀芪组锥体细胞数与缺血/再灌注组比较有提高 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 各组大鼠海马 CA1 区 2 mm 正常锥体细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	锥体细胞数
假手术	26.31 ± 2.28
缺血/再灌注	$11.15 \pm 1.17^{1)}$
紫檀芪	$18.37 \pm 2.06^{2,4)}$

注：与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$ ，²⁾ $P < 0.05$ ；与缺血/再灌注组比较³⁾ $P < 0.01$ ，⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2, 3 同)。

2.2 各组大鼠海马 CA1 区 ATP 酶活性的变化 缺血/再灌注组 ATP 酶的活性与假手术组比较，均明显下降 ($P < 0.01$)。紫檀芪组 ATP 酶的活性与假手术组比较， Ca^{2+} -ATPase, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性降低 ($P < 0.05$)；与缺血/再灌注组比较， Na^{+} - K^{+} -ATPase, Mg^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 均有提高 ($P < 0.05$)， Ca^{2+} -ATPase 提高 ($P < 0.01$)，见表 2。

表 2 各组大鼠海马 CA1 区 ATP 酶活性变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	Na^{+} - K^{+} -ATPase	Mg^{2+} -ATPase	Ca^{2+} -ATPase	Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase
假手术	7.32 ± 0.68	6.22 ± 1.10	7.28 ± 0.36	6.41 ± 0.16
缺血/再灌注	$5.11 \pm 1.09^{1)}$	$4.17 \pm 0.23^{1)}$	$4.06 \pm 0.70^{1)}$	$3.75 \pm 0.33^{1)}$
紫檀芪	$6.75 \pm 1.44^{4)}$	$5.60 \pm 1.27^{4)}$	$6.15 \pm 0.22^{2,3)}$	$5.08 \pm 0.14^{2,4)}$

2.3 各组大鼠海马 CA1 区 COX 活性的变化 与假手术组比较，缺血/再灌注组 COX 活性明显下降

($P < 0.01$)，紫檀芪组有下降 ($P < 0.05$)。紫檀芪组 COX 活性与缺血/再灌注组比较有显著提高



($P < 0.01$)。见表3。

表3 各组大鼠海马CA1区COX的变化比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	COX(灰度)
假手术	153.17 ± 4.21
缺血/再灌注	106.25 ± 5.34 ¹⁾
紫檀芪	139.12 ± 3.28 ^{2,3)}

3 讨论

目前,在天然植物中探寻防治脑缺血/再灌注损伤的研究是较热点领域,紫檀芪在西红柿、葡萄、草莓、桑椹等蔬菜和水果中含量丰富,James等^[6]研究发现紫檀芪能逆转高龄实验小鼠的衰老效应,高龄小鼠的认知能力、记忆力的改善程度,与大脑海马区的紫檀芪浓度呈正比关系。脑缺血/再灌注损伤机制是一个复杂的多因素的过程,当损伤作用强于保护作用,就会出现脑缺血损伤的一系列病理变化,脑缺血/再灌注损伤是影响脑组织缺血性疾病患者预后的重要原因。

ATP酶是存在于组织细胞及细胞器生物膜的一种蛋白酶,脑组织ATP酶对缺血缺氧非常敏感,其活性已成为评价神经元质膜功能的标志之一^[7]。脑缺血/再灌注后细胞能量代谢障碍、兴奋性氨基酸大量释放均可使ATP酶活性降低,是再灌注早期脑细胞内水肿和神经细胞坏死的重要原因^[8]。本研究结果显示,脑缺血/再灌注组大鼠海马CA1区ATP酶活性均明显低于假手术组($P < 0.01$),紫檀芪组可提高海马CA1区ATP酶活性,提示紫檀芪可能是通过抑制 Na^+/H^+ 交换,提高 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性。紫檀芪通过对脑缺血/再灌注期ATP酶活性降低的抑制,减轻ATP酶活性降低所引起的一系列病理生理反应。

细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COX)是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,其活性下降可直接干扰呼吸链的电子传递,进而影响神经细胞的能量代谢,造成神经细胞氧化磷酸化功能障碍和ATP合成减少^[9]。Domorakov等^[10]研究还发现COX与细胞凋亡密切相关,全脑缺血5 min复灌7 d后,沙鼠海马CA1区细胞色素氧化酶mRNA的表达下降,减少神经元凋亡。本实验结果发现,紫檀芪组COX活性与缺血/再灌注组比较有显著提高($P <$

0.01),提示紫檀芪主要是通过提高呼吸链关键酶——COX活性,提高线粒体内膜呼吸链的电子传递速率,增强线粒体利用氧的能力,改善大鼠能量代谢障碍,使神经元内环境趋于稳定,进而保护线粒体膜功能,稳定神经元内容酶体膜通透性,进而减轻脑缺血/再灌注损伤。

综上,紫檀芪通过提高脑缺血/再灌注大鼠海马CA1区ATP酶、COX活性,以改善脑缺血/再灌注损伤所致的系列能量代谢障碍,显示出紫檀芪在防治脑缺血/再灌注损伤中有一定的效应,但其具体作用机制或调控途径尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hashimoto M, Zhao L, Nowak T S. Temporal thresholds for infarction and hypothermic protection in Long-Evans rats: factors affecting apparent reperfusion injury after transient focal ischemia [J]. *Stroke*, 2008, 39(2): 421.
- [2] Taoufik E, Probert L. Ischemic neuronal damage [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(33): 3565.
- [3] 王晓琴, 王振华, 刘梅, 等. 氧化还原调控在紫檀芪诱导 HeLa 细胞内质网凋亡途径中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(9): 1184.
- [4] Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(9): 1205.
- [5] 孔卫国, 吴晓牧, 张昆南, 等. 大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的制作及经验体会 [J]. *实用临床医学*, 2010, 11(3): 1.
- [6] Joseph J A, Fisher D R, Cheng V, et al. Cellular and behavioral effects of stilbene resveratrol analogues: implications for reducing the deleterious effects of aging [J]. *Agric Food Chem*, 2008, 56(22): 10544.
- [7] Stoller D, Kakkur R, Smelley M, et al. Mice lacking sulfony-lurea receptor2 (SUR2) ATP sensitive potassium channels are resistant to acute cardiovascular stress [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(4): 445.
- [8] 张三妹, 李光来. 阿米洛利对大鼠脑缺血再灌注损伤后 ATP 酶的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2008, 6(2): 186.
- [9] Rodrigues T, Franca L P, Faria P A, et al. Protective role of mitochondrial unsaturated lipids on the preservation of the apoptotic-ability of cytochrome C exposed to singlet oxygen [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(35): 2557.
- [10] Domorakov I, Burda J, Mechrov E, et al. Mapping of rat hippocampal neurons with Neu N after ischemia/reperfusion and Ginkgo biloba extract (EGb761) pretreatment [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2006, 26(78): 1193.

[责任编辑 张宁宁]