

胡黄连苷Ⅱ对大鼠脑缺血损伤后S100β蛋白表达的影响*

常翠翠¹ 纪晓军^{2,3} 逢芳芳² 赵 丽¹

摘要

目的:通过正交试验优化胡黄连苷Ⅱ治疗大鼠脑缺血损伤的最佳治疗时间窗和剂量。

方法:应用双侧颈总动脉结扎法建立前脑缺血模型,按照正交试验设计分组,经腹腔注射胡黄连苷Ⅱ干预治疗。应用Holzer胶质细胞染色法观察胶质细胞反应性增生,末端脱氧核苷酰基转移酶介导性dUTP缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡,免疫组化染色和Western blotting检测神经胶质细胞标志蛋白(S100β)表达,逆转录-PCR定量检测脑组织S100β mRNA表达水平。

结果:胡黄连苷Ⅱ可以明显抑制脑缺血损伤后胶质细胞反应性增生、神经细胞凋亡以及S100β表达。其最佳治疗时间窗和剂量,根据TUNEL染色结果分析为脑缺血2.0h腹腔注射5mg/kg体重,根据免疫组化、Western blotting和RT-PCR结果分析为脑缺血1.5h腹腔注射5mg/kg体重。

结论:胡黄连苷Ⅱ可能通过抑制S100β表达减轻缺血性脑损伤。从治疗时间窗最大化和用药剂量最小化的角度综合评价,其最佳治疗时间窗和剂量为脑缺血1.5—2.0h腹腔注射5mg/kg体重。

关键词 胡黄连苷Ⅱ;脑缺血;S100β;大鼠

中图分类号:R338, R364 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-10-0901-07

Effects of picroside II on the expression of S100β in cerebral ischemic injury rats/CHANG Cuicui, JI Xiaojun, PANG Fangfang, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(10): 901—907

Abstract

Objective: To optimize the therapeutic dose and time window of picroside II in cerebral ischemic injury in rats by orthogonal test.

Method: The forebrain ischemia models were established by bilateral common carotid artery occlusion (BC-CAO) methods. The successful models were randomly grouped according to orthogonal experimental design and treated by injecting picroside II intraperitoneally at different ischemic time with different doses. The reactive glial proliferation was evaluated by Holzer staining and the apoptotic cells counted by TUNEL detection kit. The expressions of neuroglial markers protein S100β were determined by immunohistochemistry assay and Western blotting and the S100β mRNA by RT-PCR.

Result: Picroside II could significantly suppressed the reactive glial proliferation, the expression of S100β and neuronal apoptosis. The optimized time window and therapeutic dose of picroside II in cerebral ischemic injury were ischemia 2.0h with 5mg/kg body weight intraperitoneally according to the apoptotic cells, 1.5h with 5mg/kg body weight intraperitoneally according to the expression of S100β.

Conclusion: Picroside II might reduce ischemic brain injury by inhibiting the expression of S100β. Combined evaluation from the principle of lowest therapeutic dose with longest time window, the optimized composition

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.10.001

*基金项目:国家自然科学基金项目(81274116;81041092)

1 青岛大学附属医院中西医结合中心,青岛,266003;2 青岛大学附属医院急诊神经内科;3 通讯作者
作者简介:常翠翠,女,硕士研究生;收稿日期:2013-11-24

of the time window and therapeutic dose of picroside II in cerebral ischemic injury were ischemia 1.5—2.0h with 5mg/kg body weight intraperitoneally.

Author's address Institute of Integrative Medicine, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266003

Key word picroside II; cerebral ischemia; S100β; rat

胡黄连苷 II 是一种环烯醚萜类的胡黄连提取物,细胞培养表明,胡黄连苷 I/II 可能对神经生长因子(nerve growth factor, NGF)诱导的PC12 细胞神经突生长有增强作用^[1]。Li 等^[2]研究发现在氧化应激状态下,胡黄连苷 II 可能通过降低由谷氨酸盐引起的细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平,增强 PC12 细胞的生存能力进而减少细胞凋亡,起到保护神经的作用。神经胶质细胞标志蛋白 S100β 是由 β 同源二聚体构成的,每个 β 亚单位的分子量为 10.5kD,主要存在于神经系统的星形胶质细胞和雪旺细胞中^[3];研究表明 S100β 在脑组织和外周循环中的浓度与脑缺血损伤的严重程度呈正相关^[4-5]。本课题组前期动物实验研究证实,胡黄连苷 II 可能通过抑制炎症因子的表达^[6-7],进而抑制炎症反应,从而减轻脑缺血损伤。本实验旨在通过正交试验设计分组,运用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blotting、免疫组化等多种实验方法,研究胡黄连苷 II 对脑缺血损伤后脑组织中 S100β 蛋白表达的影响,进一步探究胡黄连苷 II 的神经保护机制以及治疗缺血性脑损伤的最佳剂量和时间窗。

1 材料与方法

1.1 动物模型

成年健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,体重 230—250g,青岛市药物检验所实验动物中心提供,实验动物合格证号为 SCXK(鲁)20100010。动物置实验室适应环境 1 周,自由进食、饮水;室温(23±2)℃,自然光照。随机抽取(5×2)只作为对照组,其余 50 只分离并结扎双侧颈总动脉建立前脑缺血模型^[8]。术前动物禁食 12h,经 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3ml/kg),仰卧固定、无菌操作,对照组不结扎颈总动脉,其余操作同模型组。手术后 2h 仍未苏醒或死亡的 8 只动物剔除,将成功的动物模型 42 只纳入统计范围,再随机分为模型组(5×2)只和实验组(16×2)只。

1.2 设计分组

将实验组(16×2)只模型按照二因素四水平[L₁₆(4⁵)]正交试验设计原理分组。治疗时间窗为 A 因素,设缺血 1.0h、1.5h、2.0h、2.5h 时治疗四个水平;治疗剂量为 B 因素,设 5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg 体重四个水平。见表 1。

表 1 [L₁₆(4⁵)]正交试验设计分组

用药剂量	缺血 1.0h (A1)	缺血 1.5h (A2)	缺血 2.0h (A3)	缺血 2.5h (A4)
5mg/kg(B1)	1.0×5	1.5×5	2.0×5	2.5×5
10mg/kg(B2)	1.0×10	1.5×10	2.0×10	2.5×10
20mg/kg(B3)	1.0×20	1.5×20	2.0×20	2.5×20
40mg/kg(B4)	1.0×40	1.5×40	2.0×40	2.5×40

1.3 干预措施

胡黄连苷 II (CAS No: 39012-20-9, 纯度 > 98%, 分子量: 512.48)由天津奎青医药公司提供,将胡黄连苷 II 应用生理盐水分别稀释成 0.5%、1%、2%、4%的溶液,按照[L₁₆(4⁵)]正交表设计,在相应的缺血时间,腹腔注射相应剂量胡黄连苷 II。假手术组和模型组术后 2.0h 腹腔注射等量生理盐水。给药 24h 后处死动物,检测相应的指标。

1.4 标本采集

1.4.1 病理切片:给药 24h 后,对照组和模型组各取 5 只大鼠,实验组取 16 只大鼠,以 10%水合氯醛 0.3ml/kg 腹腔注射麻醉,开胸经心脏灌注生理盐水 200ml,快速开颅,完整取脑,切除嗅球和额叶前部脑组织置于 4%甲醛溶液中固定 12h。梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,自视交叉向后连续冠状位切片,贴于多聚赖氨酸处理的切片上,室温保存备用。

1.4.2 总蛋白提取:给药 24h 后,对照组和模型组各取 5 只大鼠,实验组取 16 只大鼠,以 10%水合氯醛腹腔注射 0.3ml/kg 麻醉,经心脏灌注生理盐水 200ml,快速开颅,完整取脑,切取缺血部位脑组织放入液氮保存。然后脑组织 200mg 置预冷的研钵中研磨至粉末状后按 1:4 比例加细胞裂解液(碧云天生物技术研究所),超声波匀浆,4℃冷冻离心机(Eppendorf 5801 型,德国)12000r/min 离心 10min,去沉淀组织

留上清液,BCA法测定总蛋白浓度,调至同一浓度,-80℃保存备用。

1.4.3 总RNA提取:切取上述液氮冷冻的缺血部位脑组织50mg,按照RNA提取试剂盒(RNA-Solv Reagent, Cat. No:R6830, Omega)操作说明书提取缺血脑组织中的总RNA。测定每个样品中RNA的浓度,超纯水稀释为同一浓度,-80℃保存备用。

1.5 检测指标

1.5.1 Holzer胶质细胞染色:切片常规脱蜡入水,置磷钼酸-乙醇溶液中3min,直接入无水乙醇-氯仿溶液,使切片全部呈灰白色,至灰白质不能分辨为止,切片保持湿润直接滴加结晶紫氯仿溶液,反应30s,滴加10%溴化钾水溶液,至能呈现金色光度为止,滤纸吸干切片上的液体,滴加苯胺油分色液,显微镜下控制分色,二甲苯透明,中性树胶封固。光学显微镜下观察神经胶质纤维及其胞体显示蓝紫色。

1.5.2 TUNEL染色:切片脱蜡至水,按照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(MK1022,博士德)说明书操作,核固红复染,甘油封片。显微镜下,胞核有红褐色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片取4个不重复高倍视野(×400),计数阳性细胞占总细胞的比例,取平均值代表阳性细胞率。

1.5.3 免疫组化染色:切片脱蜡至水,按照SABC免疫组化试剂盒说明书操作,兔抗鼠S100β一抗(BA0120,博士德)孵育1h,37℃;二抗(NO.SA1022,博士德)孵育20min,37℃;DAB显色(ZLI-9017,中杉金桥)2min;苏木素复染30s;常规脱水、透明、封片。镜下观察,细胞浆出现棕褐色颗粒者为阳性细胞。计数方法同TUNEL染色。

1.5.4 Western blotting:以β-actin(42kD)作为内参,向蛋白样品中加入等体积的2×SDS蛋白裂解液,98℃煮样10min,12000r/min离心5min备用。一抗(S100β:Ab52642,Abcam;β-actin:BA2305,博士德)1:1000稀释,孵育4℃过夜;二抗(ZB-2301,中杉金桥)1:10 000稀释,室温孵育1h;HRP显色。Quantity One软件分析系统测定样品中S100β(10.5kD)与β-actin各自的灰度值,取其比值进行统计学分析。

1.5.5 RT-PCR:以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,每个逆转录体系中加入总RNA的量为0.5μg,按照逆转录试剂盒(RR014A, Takara)说明书

将mRNA逆转录为cDNA,-20℃保存备用。

PCR引物设计,S100β(527bp):

上游引物5'-ATA GCA CCT CCG TTG GAC AG-3',
下游引物5'-CAT CTC AGT GGC CCT TCA TT-3'^[9];

GAPDH(110bp):

上游引物5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA CCT C-3',
下游引物5'-TAG GAG CCA GGG CAG TAA TCT-3'。

样品98℃预变性5min;98℃变性10s;58℃退火15s;72℃延伸30s;30个循环,72℃延伸10min。将上述PCR产物2%琼脂糖电泳,凝胶图像分析系统扫描,Quantity One软件分析系统,测定每个样品中S100β与GAPDH的灰度值,取其比值进行统计学分析。

1.6 统计学分析

应用SPSS 17.0版本统计软件,通过方差分析和t检验对数据进行统计分析。根据统计结果,分析不同水平的缺血(给药)时间和剂量对试验检测指标是否有显著差异,以及缺血(给药)时间和剂量的交互作用对实验检测指标是否有显著影响,并得出最佳治疗时间窗和给药剂量组合。

2 结果

2.1 检测结果

胶质细胞染色、免疫组化染色(immunohistochemistry, IHC)、TUNEL染色、Western blotting(WB)和RT-PCR均显示模型组大鼠脑组织胶质增生、细胞凋亡、S100β表达水平均明显高于对照组大鼠(P<0.05),实验组各项指标均明显低于模型组(P<0.05),见表2。实验组大鼠IHC、TUNEL、WB和RT-PCR统计结果见表3。

2.2 结果分析

2.2.1 胶质细胞染色:光学显微镜下观察,各组胶质细胞均显示蓝紫色,模型组(B)与对照组(A)相比,胶质细胞增生明显,星形胶质细胞胞体肿胀,突起数

表2 脑组织中S100β检测结果 (x±s)

组别	鼠数	IHC	TUNEL	WB	RT-PCR
对照组	5	0.307±0.094	0.239±0.048	1.375±0.274	1.020±0.097
模型组	5	0.577±0.078 ^①	0.509±0.055 ^①	2.973±0.674 ^①	1.292±0.109 ^①
治疗组	16	0.438±0.102 ^②	0.393±0.094 ^②	2.007±0.735 ^②	1.166±0.087 ^②

与对照组比较:①t=4.18—8.32,P<0.05;与模型组比较:②t=2.36—2.85,P<0.05

表3 【L1₆(4⁵)】正交表及检测结果

试验号	列号					IHC	TUNEL	WB	RT-PCR
	A	B	C	D	E				
1	1	1	1	1	1	0.341	0.273	1.195	0.97
2	1	2	2	2	2	0.282	0.301	1.031	1.079
3	1	3	3	3	3	0.311	0.254	1.262	1.047
4	1	4	4	4	4	0.364	0.292	1.543	1.152
5	2	1	2	3	4	0.306	0.373	1.288	1.138
6	2	2	1	4	3	0.391	0.293	1.461	1.127
7	2	3	4	1	2	0.441	0.419	1.716	1.130
8	2	4	3	2	1	0.458	0.381	1.945	1.194
9	3	1	3	4	2	0.487	0.404	2.039	1.206
10	3	2	4	3	1	0.472	0.457	2.022	1.174
11	3	3	1	2	4	0.394	0.452	2.526	1.216
12	3	4	2	1	3	0.480	0.408	2.268	1.142
13	4	1	4	2	3	0.558	0.592	2.953	1.270
14	4	2	3	1	4	0.545	0.419	2.268	1.306
15	4	3	2	4	1	0.573	0.515	3.584	1.263
16	4	4	1	3	2	0.611	0.462	3.016	1.239
I	1.298	1.692	1.737	1.807	1.844	7.014	6.295	32.117	18.653
II	1.596	1.690	1.641	1.692	1.821				
III	1.833	1.719	1.801	1.700	1.740				
IV	2.287	1.913	1.835	1.815	1.609				
SS	0.131	0.009	0.005	0.003	0.008				

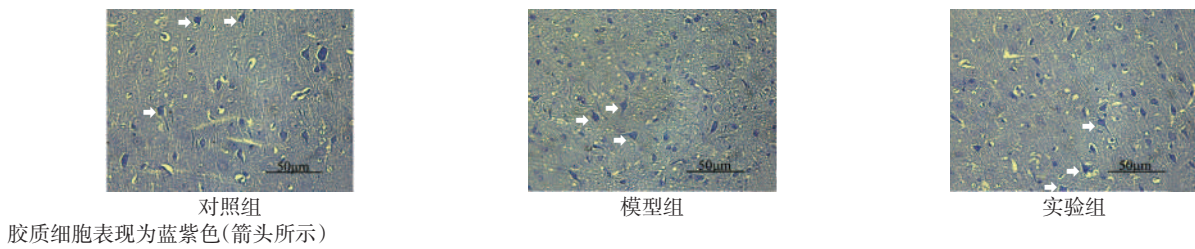
目减少。实验组(C)与模型组(B)相比,胶质细胞增生明显减少,且增生细胞的形态转变为与正常相似的形态,说明胡黄连苷 II 可以明显抑制大鼠脑缺血损伤后胶质细胞的增生,见图1。

2.2.2 TUNEL 细胞凋亡染色:各组大鼠脑组织均有不同程度的细胞凋亡(图2)。对照组可观察到少量散在分布的凋亡阳性细胞,模型组大鼠缺血脑组织的细胞凋亡比例较对照组相比显著增高($P < 0.05$),实验组与模型组相比显著下降($P < 0.05$),见表2。

实验组方差分析结果显示:因素A(时间)的不同水平对脑缺血后细胞凋亡数量的影响有显著性差异($P < 0.05$),而因素B(剂量)和因素C(时间-剂量交互作用)的影响未见显著性差异($P > 0.05$),见表4。说明不同水平的缺血时间即治疗时间窗对脑缺血后细胞凋亡的数量有显著性影响,而给药剂量和时间-剂量交互作用的影响无显著性差异。应用最小显著差数法(least significant difference, LSD)对

图1 大鼠脑组织胶质增生情况

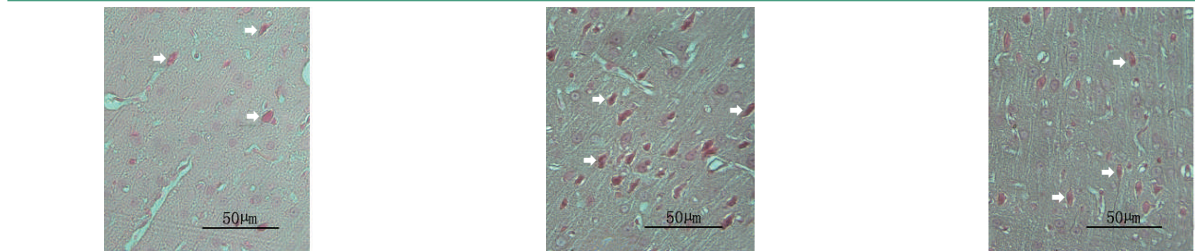
(Holzer染色,×400)



胶质细胞表现为蓝紫色(箭头所示)

图2 大鼠脑组织细胞凋亡

(Holzer染色,×400)



阳性细胞表现为红褐色细胞核(箭头所示)

表4 TUNEL 结果方差分析

变异来源	离均差平方和 (SS)	自由度 (df)	均方 (MS)	F 检验	P 值
缺血时间	0.103	3	0.034	22.305	0.001
给药剂量	0.005	3	0.002	1.127	0.410
时间×剂量	0.014	3	0.005	3.118	0.110
误差	0.009	6	0.002		

各组数据进行两两比较显示:凋亡细胞所占的比例在缺血(治疗)时间1.5h(A2)与2.0h(A3),2.0h(A3)与2.5h(A4)之间无显著性差异($P > 0.05$),其余缺血时间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。在不同给药剂量间两两比较均无显著性差异($P > 0.05$)。根据治疗时间窗最大化和给药剂量最小化原则,以

A3B1组合最好,即:最佳治疗时间窗为缺血2.0h,给药剂量为5mg/kg体重。

2.2.3 免疫组化染色:各组大鼠脑组织S100β蛋白呈不同程度表达。模型组大鼠脑组织S100β大量表达,细胞着色深(图3),阳性细胞比例明显高于对照组($P < 0.05$),实验组S100β表达下降,阳性细胞所占比例明显低于模型组($P < 0.05$),见表2。

实验组方差分析结果显示,因素A(时间)的不同水平对脑缺血后S100β蛋白表达量的影响有显著性差异($P < 0.05$),而因素B(剂量)和因素C(时间-剂量交互作用)的影响未见显著性差异($P > 0.05$),见表5。说明不同水平的缺血时间即治疗时间窗对S100β蛋白的表达有显著性影响,而给药剂量和时间-剂量交互作用对蛋白表达的影响无显著性差异。应用LSD对各组数据进行两两比较显示:S100β蛋白的表达在缺血(治疗)时间1.0h(A1)与1.5h(A2),1.5h(A2)与2.0h(A3),之间无显著性差异($P > 0.05$),其余缺血时间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。在不同给药剂量间两两比较差异均无显著性($P > 0.05$)。根据治疗时间窗最大化和给药剂量最小化原则,以A2B1组合最好,最佳治疗时间窗为缺血1.5h,剂量为腹腔给药5mg/kg体重。

2.2.4 Western blotting:各组大鼠缺血脑组织中S100β蛋白呈不同程度表达(图4),模型组大鼠缺血脑组织S100β蛋白表达量明显高于对照组($P < 0.05$),而实验组明显低于模型组($P < 0.05$),见表2。实验组方差分析结果显示,因素A(时间)的不同水平对脑缺血后S100β蛋白表达量的影响有显著性差异($P < 0.05$),而因素B(剂量)和因素C(时间-剂量交互作用)的影响未见显著性差异($P > 0.05$),见表6。说明不同水平的缺血时间即治疗时间窗对S100β蛋白的表达有显著性影响,而给药剂量和时间-剂量交互作用对蛋白表达的影响无显著性差异。应用LSD对各组数据进行两两比较显示:S100β蛋白的表达在缺血(治疗)时间1.0h(A1)与1.5h(A2)之间无显著性差异($P > 0.05$),其余缺血时间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。在不同给药剂量10mg(B2)与20mg(B3),10mg(B2)与40mg(B4)之间有显著性差异($P < 0.05$),其余给药剂量两两比较均无显著性差异($P > 0.05$)。根据治疗时

间窗最大化和给药剂量最小化原则,以A2B1组合最好,即:最佳治疗时间窗为缺血1.5h,给药剂量为5mg/kg体重。

2.2.5 RT-PCR:各组大鼠缺血脑组织S100β mRNA的量呈不同程度表达(图5),模型组大鼠缺血脑组织S100β mRNA表达明显高于对照组($P < 0.05$),实验组明显低于模型组($P < 0.05$),见表2。

实验组方差分析结果显示:因素A(时间)的不同水平对脑缺血后S100β mRNA量的影响有显著性差异($P < 0.05$),而因素B(剂量)和因素C(时间-剂量交互作用)的影响未见显著性差异($P > 0.05$),见表7。说明不同水平的缺血时间即治疗时间窗对脑缺血后细胞凋亡的数量有显著性影响,而给药剂量和时间-剂量交互作用的影响无显著性差异。应用LSD对各组数据进行两两比较显示:S100β mRNA的量在缺血(治疗)时间1.0h(A1)与1.5h(A2),1.5h(A2)与2.0h(A3),2.0h(A3)与2.5h(A4)之间无显著性差异($P > 0.05$),其余缺血时间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。在不同给药剂量间两两比较均无显著性差异($P > 0.05$)。根据治疗时间窗最大化和给药剂量最小化原则,以A2B1组合最好,即最佳治疗时间窗为缺血1.5h,给药剂量为5mg/kg体重。

表5 IHC结果方差分析

变异来源	离均差平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F检验	P值
缺血时间	0.131	3	0.044	22.219	0.001
给药剂量	0.009	3	0.003	1.463	0.316
时间×剂量	0.005	3	0.002	0.927	0.483
误差	0.012	6	0.002		

表6 WB结果方差分析

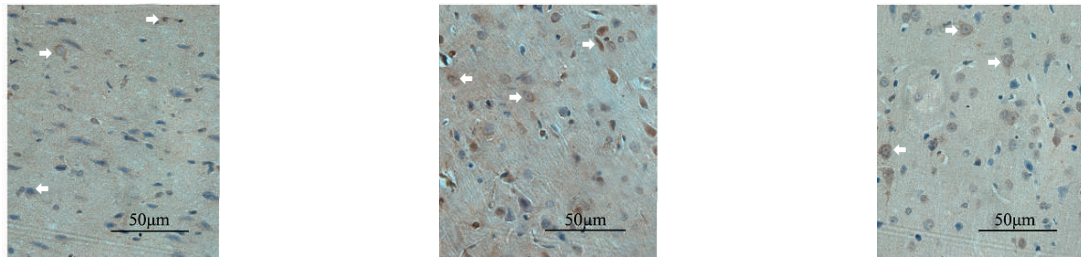
变异来源	离均差平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F检验	P值
缺血时间	6.668	3	2.223	29.497	0.001
给药剂量	0.884	3	0.295	3.910	0.073
时间×剂量	0.089	3	0.030	0.394	0.762
误差	0.452	6	0.075		

表7 RT-PCR结果方差分析

变异来源	离均差平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F检验	P值
时间	0.089	3	0.030	10.783	0.008
剂量	0.003	3	0.001	0.331	0.804
时间×剂量	0.007	3	0.002	0.791	0.542
误差	0.016	6	0.003		

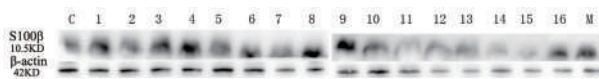
图3 大鼠脑组织S100β蛋白表达

(IHC染色, ×400)



阳性细胞表现为棕褐色, (箭头所示)(与对照组比较*: $P < 0.05$; 与模型组比较:** $P < 0.05$)

图4 大鼠脑组织S100β表达(Western blotting)



C: 对照组; 1—16: 实验组; M: 模型组

图5 大鼠脑组织S100β mRNA表达(RT-PCR)



C: 对照组; 1—16: 实验组; M: 模型组

3 讨论

S100β作为一种Ca²⁺结合蛋白,在细胞内参与了细胞增殖、细胞骨架的调节等生物活动,S100β不仅在细胞内起作用,同时还会以自分泌和旁分泌的方式释放到细胞间质,从而与神经元、小胶质细胞相互作用。研究表明,S100β的生物学效应具有浓度依赖性,微量S100β可以促进神经元轴突的延伸以及提高神经元的存活率;而当细胞间存在大量S100β时,则促进炎症反应因子表达并引起神经元凋亡^[10]。细胞培养表明,在代谢应激状态下,星形胶质细胞的第一应激反应是分泌大量的S100β^[11]。组织培养表明,大鼠脑片在缺血缺氧应激状态的第1小时,就会大量表达S100β^[12]。Tanaka等^[13]通过对脑缺血动物模型的研究,发现大鼠脑局部缺血后48h时,血清中S100β与脑缺血的严重程度(包括梗死面积)相关性最好。临床研究发现,缺血性脑卒中的患者血清中S100β的浓度显著升高,并且S100β的浓度与缺血性脑卒中的分型、严重程度、梗死面积以及死亡率密切相关^[14-16]。急性缺血性脑卒中患者脑脊液中S100β的浓度与脑卒中的严重程度以及预后也高度相关,浓度越高预后越差^[17-18]。脑卒中患者血清和脑脊液中S100β浓度显著增高可能是由于胶质细胞大量破坏,S100β由细胞内流到细胞外,通过损伤的血脑屏障进入到脑脊液和血液中。

大鼠急性脑缺血损伤,可导致神经胶质细胞活

化并出现反应性增生,而增生的胶质细胞会释放多种细胞因子,加重神经元损伤,从而阻碍神经元的修复^[19]。研究表明,代谢应激时胶质细胞会产生大量S100β蛋白,并释放到细胞外,同时,Reali等^[20]通过体外培养胶质细胞研究发现,在培养液中加入高浓度的S100β,能够活化星形胶质细胞和小胶质细胞,抑制星形胶质细胞源性的生长因子的表达,降低星形胶质细胞的神经保护作用,同时可以促进炎症因子的释放,这提示脑缺血损伤后,存在于脑组织细胞间隙中的高浓度S100β,有可能加剧了脑损伤。Tanaka等^[21]研究表明,脑卒中后短期内血清中S100β浓度的急剧上升,还可以提示脑出血的出现,这可能与脑损伤加重有关。Mori等^[22]研究表明,过表达人S100β蛋白的转基因小鼠会加剧脑缺血损伤,并且同时活化了胶质细胞,引起星形胶质细胞和少突胶质细胞大量增殖。本实验建立大鼠前脑缺血模型,通过Holzer胶质细胞染色和免疫组化染色发现,脑缺血损伤后胶质细胞明显增生,S100β蛋白大量表达,同时TUNEL染色显示细胞凋亡比例较对照组明显增高,这与已有的研究结果相符。

胡黄连是玄参科植物胡黄连或西藏胡黄连的根茎,其味苦性寒,具有清热燥湿,凉血利胆的作用。本实验中,胡黄连苷Ⅱ腹腔治疗的大鼠(实验组)与模型组相比,胶质细胞增生显著下降,并且S100β蛋白呈少量表达,这表明胡黄连苷Ⅱ可能通过作用于

胶质细胞,降低S100 β 蛋白的表达及其释放,从而减少脑缺血损伤,起到神经保护作用。RT-PCR和Western blotting结果显示,胡黄连苷II可以在基因水平下调S100 β mRNA水平,从而下调S100 β 蛋白水平的表达。随着缺血时间的延长,大鼠脑缺血损伤的严重程度不断加深,胡黄连苷II的神经保护作用也有所不同,本实验通过正交试验设计分组,研究发现胡黄连苷II治疗脑缺血损伤的最佳治疗时间窗和剂量为:脑缺血1.5—2.0h,腹腔注射5mg/kg体重,这可能与脑组织长时间缺血发生了不可逆的损伤有关。在应激状态下,胶质细胞会分泌和释放具有神经毒性的谷氨酸盐和活性氧,加重神经元的凋亡,已有研究表明胡黄连苷II在氧化应激状态下可能通过降低由谷氨酸盐引起的ROS的水平,增强神经细胞的生存能力^[2],那么胡黄连苷II可能也能够降低胶质细胞的活性氧的水平,起到保护胶质细胞的作用,从而保护神经元,这需要进一步的实验探究。虽已有报道胡黄连苷II具有神经保护作用,但其对神经元及神经胶质细胞的保护机制需要进一步研究。

参考文献

- [1] Li P, Matsunaga K, Yamakuni T, et al. Potentiation of nerve growth factor-action by picrosides I and II, natural iridoids, in PC12D cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 406(2): 203—208.
- [2] Li T, Liu JW, Zhang XD, et al. The neuroprotective effect of picroside II from hu-huang-lian against oxidative stress [J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35(4):681—691.
- [3] Murabayashi M, Minato M, Okuhata Y, et al. Kinetics of serum S100B in newborns with intracranial lesions[J]. *Pediatr Int*, 2008, 50(1):17—22.
- [4] Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, et al. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study[J]. *Stroke*, 2009, 40(1):77—85.
- [5] Gonçalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury[J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(10—11): 755—763.
- [6] Guo Y, Xu X, Li Q, et al. Anti-inflammation effects of picroside 2 in cerebral ischemic injury rats[J]. *Behav Brain Funct*, 2010, (6):43—53.
- [7] Li Q, Li Z, Xu XY, et al. Neuroprotective properties of picroside II in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(11):4580—4590.
- [8] Márquez-Martín A, Jiménez-Altayó F, Dantas AP, et al. Middle cerebral artery alterations in a rat chronic hypoperfusion model[J]. *J Appl Physiol*, 2012, 112(3):511—518.
- [9] Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, et al. Living-cell imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells[J]. *J Endocrinol*, 2010, 204(2):115—123.
- [10] Yardan T, Erenler AK, Baydin A, et al. Usefulness of S100B protein in neurological disorders[J]. *J Pak Med Assoc*, 2011, 61(3):276—281.
- [11] Gerlach R, Demel G, König HG, et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress[J]. *Neuroscience*, 2006, 141(4):1697—1701.
- [12] Büyükuysal RL. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage[J]. *Neurochem Int*, 2005, 47(8):580—588.
- [13] Tanaka Y, Marumo T, Omura T, et al. Relationship between cerebrospinal and peripheral S100B levels after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 436(1): 40—43.
- [14] Brea D, Sobrino T, Blanco M, et al. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(12):1513—1518.
- [15] Üstündağ M, Orak M, Güloğlu C, et al. The role of serum osteoprotegerin and S-100 protein levels in patients with acute ischaemic stroke: determination of stroke subtype, severity and mortality[J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(3): 780—789.
- [16] Ishibashi H, Funakoshi Y. Serum S-100B protein levels in left- and right- hemisphere strokes[J]. *J Clin Neurosci*, 2008, 15(5):520—525.
- [17] Brouns R, De Vil B, Cras P, et al. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(3):451—458.
- [18] Petzold A, Michel P, Stock M, et al. Glial and axonal body fluid biomarkers are related to infarct volume, severity, and outcome[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2008, 17(4): 196—203.
- [19] Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure [J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(2):294—301.
- [20] Reali C, Pillai R, Saba F, et al. S100B modulates growth factors and costimulatory molecules expression in cultured human astrocytes[J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 243(1—2):95—99.
- [21] Tanaka Y, Marumo T, Omura T, et al. Early increases in serum S100B are associated with cerebral hemorrhage in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2008, (1227):248—254.
- [22] Mori T, Tan J, Arendash GW, et al. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia[J]. *Stroke*, 2008, 39(7): 2114—2121.