

基于 MCU 离子通道银杏内酯 K 对脑缺血再灌注损伤保护作用

马舒伟¹, 刘兴艳², 殷华峰³, 辛杨⁴, 王国康¹ (1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波职业技术学院, 浙江 宁波 315800; 3. 中国药科大学中药制药系, 南京 210009; 4. 齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 探讨银杏内酯 K(ginkgolide K, GK) 对 middle cerebral artery occlusion (MCAO) 损伤大鼠的脑损伤保护作用是否依赖于线粒体 Ca^{2+} 单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter, MCU) 的作用机制。**方法** 成年健康 SD 大鼠, 随机分成 5 大组: 假手术组、模型组、GK + 钌红 (ruthenium red, RR, MCU 拮抗剂) 组、GK 组和 GK + 精胺 (spermine, SM, MCU 兴奋剂) 组。采用栓线法制备脑中动脉缺血 2 h 再灌注 22 h 的大鼠脑损伤模型; 采用 Zea Longa 5 分制对各组大鼠进行行为学评分; 重量法测定脑含水量; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色测定脑梗死面积; 利用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性; 采用荧光法检测线粒体内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度; 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察损伤脑组织形态学的改变; 利用 Western blot 法检测 caspase-3/8/9 蛋白的表达水平。**结果** 与 GK 组相比, 联合 GK + RR 组中大鼠神经缺损评分、脑含水量、脑梗死面积比显著降低 ($P < 0.01$); 脑组织 MDA、NOS 和 NO 含量减少、SOD 活性升高、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著下降 ($P < 0.01$), caspase-3/8/9 蛋白表达显著降低, 然而, 联合 GK + SM 组与 GK + RR 组药理作用相反。**结论** RR 能够提高 GK 对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用, 而 SM 能够减弱 GK 对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用, 其 GK 作用机制可能与 RR 或者 SM 竞争性调节 MCU 转运能力来抑制线粒体 Ca^{2+} 内流有关。

关键词: 脑缺血再灌注; 银杏内酯 K; 线粒体 Ca^{2+} 单向转运体; caspase 蛋白

doi:10.11669/cpj.2019.18.008 中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2019)18-1497-07

Protective Effects of Ginkgolide K on Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats on the Basis of Amelioration of Mitochondrial Calcium Uniporter

MA Shu-wei¹, LIU Xing-yan², YIN Han-feng³, XIN Yang⁴, WANG Guo-kang¹ (1. Traditional Chinese Medicine Institute, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. Zhejiang Collaborative Innovation Center for High Value Utilization of Byproducts from Ethylene, Ningbo Polytechnic, Ningbo 315800, China; 3. School of Tradition Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 4. Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore whether the protective mechanism of ginkgolide K on cerebral focal ischemia reperfusion injury in rats induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) was associated with the amelioration of mitochondrial calcium uniporter (MCU) or not. **METHODS** Sprague Dawley (SD) rats were divided into 5 big groups randomly: sham operation group, MCAO group, GK added into RR group, GK group and GK added into SM group. The MCAO rat model were established after cerebral artery ischemia for 2 h and reperfusion for 22 h. Zea Longa 5 score system was used to evaluate neurological deficit score; Determination of brain water content and cerebral infarction areas were determined using gravimetric method and by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining method, respectively. In addition, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), nitric oxide synthase (NOS), nitric oxide (NO) were detected by Elisa. Additionally, mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration was estimated with the fluorescence spectrophotomete. The morphological change of the injured brains were observed by HE staining. The expression of caspase-3/8/9 protein were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with GK group, GK + RR group relieved obviously the neurological deficit score and reduced the cerebral infarction areas, brain water content, mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration and MDA, caspase-3/8/9 protein expression while enhance SOD activity. However, the effect of SM on the GK protective activity in MCAO rat injury was the opposite in comparison to GK + RR group. **CONCLUSION** The stimulative effect of RR and the inhibitory effect of SM on the GK protection in MCAO rat had proves that the protective mechanism of GK on MCAO rat injury is associate with its down-regulation of the

基金项目: 浙江省中医管理局项目资助 (2015ZB105); 浙江医药高等专科学校校级项目资助 (ZPCSR2015008); 国家自然科学基金项目资助 (81403067); 黑龙江省高校基本科研业务费资助 (UNPYSC2017160; 135209306)

作者简介: 马舒伟, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师 研究方向: 新药研究与开发 Tel: (0574) 88222790 E-mail: mashuwei_2004@163.com

transport capacity of MCU, leading the attenuation of mitochondrial $[Ca^{2+}]_i$ influx.

KEY WORDS: cerebral ischemia-reperfusion; ginkgolide K; mitochondrial calcium uniporter (MCU); caspase protein

缺血性脑血管疾病具有高致死率和高致残率的特点^[1]。银杏内酯为银杏叶提取物中特有的主要药效成分,为二萜内酯化合物,包括银杏内酯 A、B、C、J、K 和 M 等。其中银杏内酯 A、B 和 K 是临床上预防和治疗缺血性脑损伤有效药物之一^[2-5]。

线粒体 Ca^{2+} 单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter, MCU) 进入基质的过程是一个依赖于线粒体内膜电势、不需要额外能量、顺钙离子电化学梯度扩散的过程。MCU 只倾向于介导钙离子的吸收而不介导钙离子的释放,因此,研究者将 MCU 称为单向吸收体^[6]。前期研究表明,银杏内酯 K (ginkgolide K, GK) 修复谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤主要通过抑制线粒体内 Ca^{2+} 超载,提高细胞内抗氧化因子活性,增强线粒体内源性抗氧化系统的激活,降低线粒体电位^[2]。另外,体内研究表明, GK 对局灶性脑缺血再灌注 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠的脑缺血损伤具有保护作用,其中机制之一与抑制线粒体 Ca^{2+} 内流具有相关性^[3]。钨红和精胺常被用来作为 MCU 的抑制剂和兴奋剂的工具药^[7-8],在大鼠脑缺血模型中,抑制 MCU 活性,可降低脑梗死面积和自由氧的产生,减少线粒体肿胀损伤^[9]。为此,本实验探讨通过改变 MCU 的 Ca^{2+} 转运能力观察 GK 对大鼠 MCAO 脑损伤的保护作用是否与干预和调节 MCU 的 Ca^{2+} 转运能力相关。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

GK (纯度 $\geq 95\%$, 广东省中药研究所); 钨红 (ruthenium red, RR, 纯度 $\geq 95\%$), 精胺 (spermine, SM, 纯度 $\geq 97\%$), 水合氯醛溶液 ($100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色液 (2%, 上海源叶生物公司); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 和一氧化氮合酶 (NOS) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 苏木精伊红染色液 (上海舜百生物科技有限公司); DMEM 培养基、Fura3/AM、TritonX100、羊抗小鼠 IgGHRP 多抗、EGTA、TBS、HRP (Sigma 公司)。

1.2 设备

MP2001-1 型电子天平 (上海第二天平仪器厂); FA1004N 型电子天平 (由上海精密科学仪器公司); TDL-5 型台式低速大容量离心机 (江苏省金

坛市医疗仪器厂); ELX-800UV 酶标仪 (Bio-Tek 公司); Western 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠, (250 ± 20) g [湖南斯莱克实验动物中心, 合格证号: SCXK (湘) 2016-0002]。雌雄各半, 实验前适应性饲养 1 周。

2 方法

2.1 动物分组及给药

大鼠随机分成 5 大组, A 组: 假手术组; B 组: MCAO 组; C 组: GK + 钨红 [$GK(4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}) + RR(1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$] 组; D 组: $GK(4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$ ^[3]; E 组: GK + 精胺 [$GK(4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}) + SM(0.8\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$] 组。于尾静脉给药, 每日 1 次, 连续 5 d, 最后一次给药在手术前 30 min。每大组分为 3 小组, 第 1 小组 (每组 8 只) 用于大鼠神经行为测定、梗死面积测定、脑积水含量的测定, 第 2 小组 (每组 6 只) 用于 SOD、MDA、NOS、NO 和 $[Ca^{2+}]_i$ 测定及 HE 染色, 第 3 小组 (每组 3 只) 用于 Western blot 方法的蛋白表达测定。

2.2 模型制备方法

采用颈内动脉线栓法制备大鼠 MCAO 模型^[10], 末次给药 30 min 后, 用 10% 水合氯醛 ($300\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧固定, 常规消毒皮肤, 颈部正中切开, 钝性分离左侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA)。用动脉夹夹闭颈总动脉, 于颈内动脉上近颈总动脉分叉处剪一“V”字形切口, 将一线栓 (直径 0.30 mm) 沿颈内动脉缓慢插入至大脑中动脉 (MCA) 口, 略感阻力时停止 (插入过程中无阻力感), 插入长度约 (18.5 ± 0.5) mm, 结扎固定线栓。假手术组也同样插线, 但 1 min 后立即拔出, 除不阻断大脑中动脉外, 其余操作同手术组。在缺血即刻和 MCAO 后 30 min 给予不同药物, 假手术组和模型组在同一时间点仅给予等容积生理盐水; C 组给予相应剂量的 GK 和 RR (MCU 拮抗剂)^[7]; D 组给予相应剂量的 GK; E 组给予相应剂量的 GK 和 SM (MCU 兴奋剂)^[8], 术后回笼饲养 (每笼 3 只), 注意保暖, 自由饮水。地面行走出现向缺血半球对侧转小圈设定为模型成功判断标准; 大鼠 MCAO 在 24 h 内生存率为 80%。

2.3 神经症状评分

神经病学检查评分参照文献^[10]的 5 分制评

分标准,于造模 24 h 后进行评分。对动物的行为缺陷进行分级评分:0 分:未观察到神经症状;1 分:提尾悬空时,动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲,肩内旋,肘外展,紧贴胸壁;2 分:将动物置于光滑平面上,推手术侧肩向对侧移动时,阻力降低;3 分:动物自由行走时向手术对侧环转或转圈;4 分:软瘫,肢体无自发活动。

2.4 脑组织含水量及梗死百分比测定

于脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后,断头处死大鼠,取出全脑,称重。在视交叉及其前后各 2 mm 处,做冠状切 4 刀,切成 5 片后迅速将脑片置 5 mL 含有 2% TTC 的磷酸缓冲溶液中,避光温孵 30 min,在温孵过程中每隔 7~8 min 翻动 1 次,温孵 30 min 后取出脑片,用数码相机拍照,之后用眼科镊分离苍白区(梗死区)和非苍白区(正常区),其中:梗死百分比(%) = 苍白区质量 / (苍白区质量 + 非苍白区质量) × 100%;将染色后的脑组织置 110 °C 烘箱烘干,对照大脑湿重求出脑含水量,脑组织含水量(%) = (1 - 脑组织干重 / 脑组织湿重) × 100%。

2.5 缺血区脑组织 NO、NOS、SOD、MDA 测定及病理组织学观察^[11]

于脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后,大鼠断头处死,迅速取手术侧皮质和侧皮基底核 0.4 g 左右,称重,加冰冷生理盐水研磨成 10% 组织匀浆,匀浆液离心(2 000 r · min⁻¹) 10 min,取上清液 -20 °C 冷藏。采用硝酸还原酶法测定 NO、分光光度法测定 NOS、羟胺法测定 SOD、TBA 法测定 MDA。

于视交叉处行冠状切面取左侧缺血区脑一小片放入 2% 甲醛溶液中固定 48 h。乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,进行苏木精伊红染色,光镜下观察脑组织疏松、水肿程度及神经元变性坏死情况。

2.6 脑神经细胞线粒体内 [Ca²⁺]_i 的测定^[12]

将大脑置于冰冷 D-Hanks 液中,取出大脑皮层,用 D-Hanks 液冲洗干净,剪碎后加入 25 g · L⁻¹ 胰蛋白酶,于 37 °C 水浴中 30 min,以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基终止消化,过滤,滤液离心,再以 D-Hanks 液洗 2 遍,沉淀以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基悬浮计数后制成浓度细胞数为 1 × 10⁹ 个 · L⁻¹ 的细胞悬液,加入 400 μL 冷的试剂线粒体提取液,置冰上 10 min。用 Dounce 匀浆器匀浆 30~40 下,然后在 4 °C 下离心(500 × g) 5 min,快速将上清吸入另一预冷的干净离心管,在 4 °C 下离心(10 000 × g) 20 min,在沉淀中加入 400 μL 冷的线粒体提取液,然后于 37 °C 预热

5 min,加入 Fura3/AM(终浓度为 5 mol · L⁻¹),振荡 45 min,再以含 0.2% 牛血清白蛋白的 D-Hanks 液洗 2 遍,然后再调整细胞数为 1 × 10⁹ 个 · L⁻¹。用荧光分光光度计测定并根据以下公式计算 [Ca²⁺]_i 浓度:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

其中 K_d 为 Fura-3 与 Ca²⁺ 反应的解离常数,为 24 nmol · L⁻¹; F 为不同实验条件下的荧光强度,由加入终浓度为 1 mmol · L⁻¹ CaCl₂ 后测得; F_{max} 为最大荧光值,由加入 Triton-X100 后测得; F_{min} 为最小荧光值,由加入 3 倍于 Ca²⁺ 的 EGTA 后测得。

2.7 蛋白表达测定

取大鼠手术侧视交叉与脑垂体之间的脑组织,冰浴下匀浆(匀浆液配方:0.32 mol · L⁻¹ 蔗糖,0.3 mmol · L⁻¹ 苯甲基磺酰氟,20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4)。4 °C 下离心(800 r · min⁻¹) 25 min;取上清再离心(16 000 r · min⁻¹) 1.5 h,取上清液置于 -70 °C 备用。Bradford 蛋白定量法测定^[13],以牛血清白蛋白制备标准曲线。

SDSPAGE 电泳分离蛋白质,恒压 150 V,55 min,电转移至硝酸纤维素膜,恒流 150 mA,2 h。将膜置于适量封闭液中(5% 脱脂奶粉 TBS:0.9% NaCl,0.1 mol · L⁻¹ Tris-HC, pH 7.5)在平缓摇动的水平摇床上室温孵育 1 h,封闭结束后,将膜放入杂交袋中,根据滤膜面积 0.1 mL · cm⁻² 的量分别加入(caspase 3/8/9,1:400)抗体(孵育液配方:25% 脱脂奶粉 TBS),排除气泡,封闭袋口,室温下孵育过夜。剪开杂交袋,废弃抗体,0.05% Tween 20 TBS 洗膜 3 次,每次 10 min,将膜与 HRP 结合的二抗(辣根过氧化物酶标记抗体,二抗用封闭液稀释 1:5 000)室温下摇荡孵育 2 h,然后用 PBST 充分洗膜,漂洗 4 次,每次 10 min,按 0.1 mL · cm⁻² 显影液计算用量,将显影液加于 PVDF 膜上,室温放置 1 min。用保鲜膜将膜包好(尽量避免气泡)。暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直至出现最佳条带。

2.8 统计分析

计量资料以表示,采用 SPSS13.0 对各治疗组与对照组进行比较。病理观察中的等级资料采用 DAS1.0 软件中的 Ridit 法检验处理。

3 实验结果

3.1 大鼠神经行为学评分

假手术组大鼠麻醉清醒后无神经功能缺损症

状。MCAO 组大鼠均出现明显的神经行为缺陷症状。而 GK 组可明显改善大鼠神经症状 ($P < 0.05$), GK + SM 组与模型组比较具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。GK + RR 组对神经功能缺损保护无统计学差异。与 GK 组比较, GK + RR 明显减低神经行为评分, 而 GK + SM 组增加神经行为评分, 且二者具有显著性差异。

3.2 脑组织含水率及梗死百分比的影响

与假手术组相比, MCAO 组脑组织含水率及梗死面积显著升高。与 MCAO 组相比, GK + RR 组和 GK 组脑组织含水率及梗死面积显著性降低 ($P < 0.05$); 与 GK 组比较, GK + RR 组减少脑组织含水率及梗死面积 ($P < 0.05$), GK + SM 组增加脑组织含水率及梗死面积 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.3 脑 SOD 活性、MDA 含量测定

与假手术组比较, MCAO 组中缺血区脑组织 SOD 明显降低, MDA 明显升高; 与 MCAO 组比较, GK 组缺血区脑组织 MDA 含量显著降低; 缺血区脑组织中 SOD 活性明显升高; 与 GK 组比较, GK + RR 组缺血区脑组织中 MDA 含量显著降低, SOD 活性明显升高。与 GK 组比较, GK + SM 组缺血区脑组织中 MDA 含量显著升高, SOD 活性明显降低。结果见表 1。

3.4 缺血脑组织 NO 含量、NOS 活性测定

与假手术组比较, MCAO 组中缺血区脑组织 NO 含量、NOS 活性明显升高; 与 MCAO 组比较, GK 组缺血区脑组织 NO 含量、NOS 活性明显降低; 与 GK 组比较, GK + RR 组缺血区脑组织中 NO 含量、NOS 活性明显升高; 与 GK 组比较, GK + SM 组缺血区脑组织中 NO 含量、NOS 活性降低。结果见表 1。

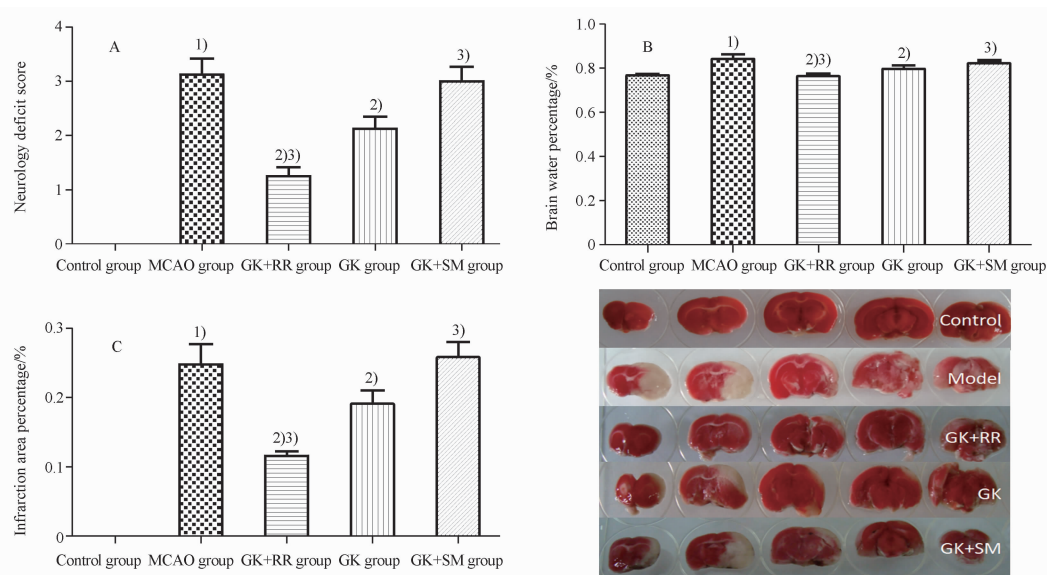


图 1 不同组别对脑缺血再灌注损伤大鼠神经行为学(A)、脑含水量(B)和脑梗死面积(C)的影响。 $n = 8, \bar{x} \pm s$ 与假手术组比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与缺血再灌注组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与 GK 组比较, ³⁾ $P < 0.05$

Fig. 1 Effect of the different groups on neurological deficit score (A), brain water percentage (B) and infarction area percentage (C) in MCAO rat. $n = 8, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, vs sham group; ²⁾ $P < 0.05$, vs MCAO group; ³⁾ $P < 0.05$, vs GK

表 1 不同组别对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血组织中 SOD 活性、MDA 含量、NO 含量和 NOS 活性的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Effects of the different groups on SOD activity, MDA content, NO content and NOS activity in MCAO rat. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Group	Dose/mg · kg ⁻¹	SOD/U · mL ⁻¹	MDA/nmol · mL ⁻¹	NO/μmol · g ⁻¹	NOS/U · mg ⁻¹
Sham	-	172.5 ± 6.2	7.39 ± 0.69	0.31 ± 0.02	2.73 ± 0.78
MCAO	-	149.0 ± 7.2 ¹⁾	10.64 ± 1.44 ¹⁾	0.47 ± 0.04 ¹⁾	9.55 ± 2.42 ¹⁾
GK + RR	4 mg + 1 mg	172.3 ± 5.0 ²⁾³⁾	7.34 ± 0.57 ²⁾³⁾	0.30 ± 0.01 ²⁾³⁾	4.60 ± 0.71 ²⁾³⁾
GK	4 mg	161.7 ± 4.8 ²⁾	8.65 ± 0.37 ²⁾	0.35 ± 0.03 ²⁾	6.88 ± 0.91 ²⁾
GK + SM	4 mg + 0.8 mg	151.4 ± 6.2 ²⁾³⁾	10.02 ± 0.62 ²⁾³⁾	0.41 ± 0.03 ²⁾³⁾	8.90 ± 1.09 ²⁾³⁾

注:与假手术组比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与缺血再灌注组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与 GK 组比较, ³⁾ $P < 0.05$

Note, ¹⁾ $P < 0.01$, vs sham group; ²⁾ $P < 0.05$, vs MCAO group; ³⁾ $P < 0.05$, vs GK

3.5 脑皮层神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

与假手术组比较, MCAO 组中缺血区脑组织细胞线粒体内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度明显升高; 与 MCAO 组比较, GK + RR 组、GK 组和 GK + SM 组缺血区脑组织 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度明显降低; 与 GK 组比较, GK + RR 组缺血区脑组织中 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度明显降低; 与 GK 组比较, GK + SM 组缺血区脑组织中 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度升高。结果见图 2。

3.6 病理组织观察

与假手术组比较, 与 MCAO 组脑组织疏松、水肿明显, 与 MCAO 组比较, GK 组、GK + RR、GK + SM 组均能明显改善脑组织神经元的水肿和坏死, 与 GK 组比较, GK + RR 组改善效果优于 GK 组, 而 GK + SM 组改善效果明显低于 GK 组, 见表 2 和图 3。

3.7 脑神经元细胞中蛋白的影响

与假手术组比较, MCAO 组中缺血区脑组织 caspase-3/8/9 蛋白表达明显升高; 与 MCAO 组比较, GK + RR 组、GK 组和 GK + SM 组缺血区脑组织 caspase-3/8/9 蛋白表达明显降低; 与 GK 组比较, GK + RR 组缺血区脑组织中 caspase-3/8/9 蛋白表达明显降低; 与 GK 组比较, GK + SM 组缺血区脑组织中 caspase-3/8/9 蛋白表达升高。结果见图 4。

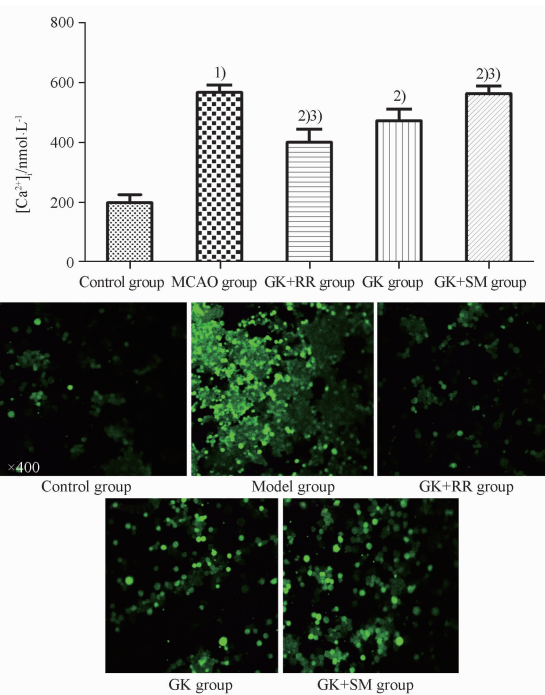


图 2 GK 对脑缺血损伤大鼠脑缺血组织中线粒体内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的影响. $n = 6, \bar{x} \pm s$

与空白组比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与 GK 组比较, ³⁾ $P < 0.05$

Fig. 2 Effect of GK on mitochondria $[Ca^{2+}]_i$ in cerebral cortex after MCAO in rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, vs sham group; ²⁾ $P < 0.05$, vs MCAO group; ³⁾ $P < 0.05$, vs GK

表 2 不同组别对大鼠急性脑缺血损伤后脑组织病理显微照片中中间质水肿和神经元凋亡和坏死的影响. % , $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Effects of the different groups on pathological photomicrographs including interstitial edema and neuronal degeneration and necrosis, stained by H&E method, of coronal sections of brain at 24 h after MCAO in rat. % , $n = 3, \bar{x} \pm s$

Groups	Interstitial edema					Neuronal degeneration and necrosis				
	-	+	++	+++	Cumulative incidence	-	+	++	+++	Cumulative incidence
Control	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
MCAO	20	30	10	40	80	40	10	50	0	60
GK + RR	30	60	10	0	70	90	10	0	0	10
GK group	30	30	30	10	70	60	30	10	0	40
GK + SM	30	40	10	20	70	70	10	20	0	30

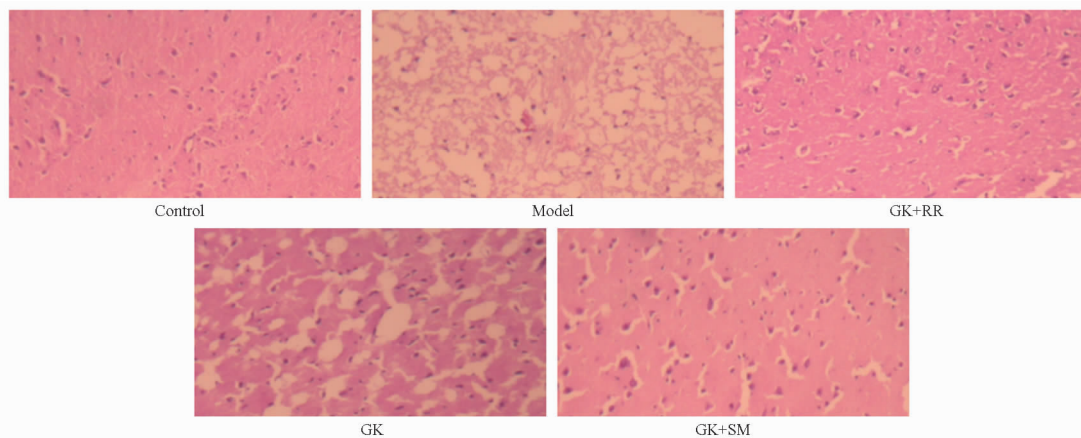


图 3 HE 染色病理显微照片 ($\times 200$)

Fig. 3 Representative photomicrographs (H&E staining) of coronal sections of brain at 24 h after MCAO in rat ($\times 200$)

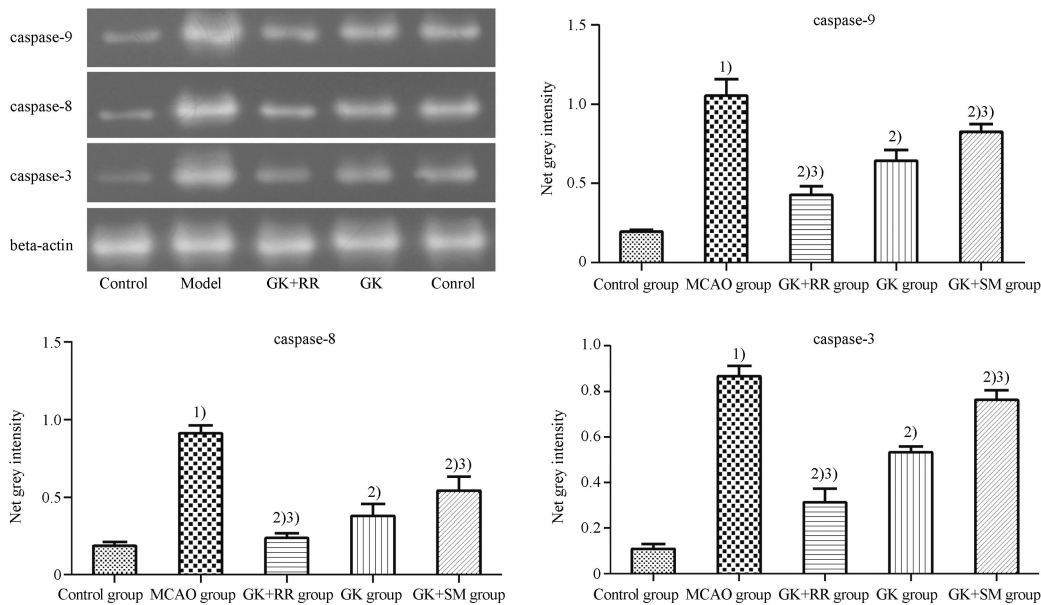


图4 不同组别对脑缺血损伤大鼠脑组织中 caspase-3/8/9 蛋白表达的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

与空白组比,¹⁾ $P < 0.01$;与缺血再灌注组比较,²⁾ $P < 0.05$;与 GK 组比较,³⁾ $P < 0.05$

Fig. 4 Effects of the different groups on caspase-3/8/9 protein expression in MCAO rats, the caspase protein was expressed net grey intensity. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, vs sham group; ²⁾ $P < 0.05$, vs MCAO group; ³⁾ $P < 0.05$, vs GK

4 讨论

线粒体内 Ca^{2+} 超载引起线粒体通道的开放,导致线粒体去极化,氧化因子的解磷酸化,大量线粒体溶解和线粒体外膜破坏^[14-15]。线粒体内 Ca^{2+} 的调节主要通过线粒体 MCU 调节,在静息状态下,胞浆内 Ca^{2+} 浓度和线粒体外膜的浓度一致,当兴奋状态下,胞浆内 Ca^{2+} 浓度大于 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能够激活 MCU 通道,使得线粒体内 Ca^{2+} 浓度迅速提高到几十倍或者上百倍,从而引起线粒体去极化,凋亡因子释放,氧化应激等^[16]。我们研究结果发现,MCU 兴奋剂 SM 能够降低 GK 对 MCAO 大鼠脑损伤的保护作用,表明研究结果与文献一致。

脑缺血再灌注后引起的“氧化应激”反应,导致氧自由基、MDA 等氧化产物增多,神经细胞胞质内 Ca^{2+} 内流,引起神经细胞破坏加重脑损伤^[17]。线粒体通透性的改变,引起释放相应的凋亡因子,如细胞色素 C, AIF 因子等,促进细胞下游凋亡因子 caspase 3 蛋白的过多表达,最终,破坏 DNA 的完整性,引起细胞凋亡^[18],我们前期研究表明,GK 对脑缺血损伤的保护作用与抑制线粒体 Ca^{2+} 内流和抑制氧化应激相关^[12],为了阐明 Ca^{2+} 内流控制路径,我们选择 MCU 作为研究对象,通过联合 GK 与 MCU 拮抗剂或兴奋剂同时给药,发现 MCU 抑制剂能够协同 GK

而减少 Ca^{2+} 内流,而 MCU 兴奋剂能够协同 GK 增加 Ca^{2+} 内流,说明 GK 通过 MCU 路径抑制线粒体 Ca^{2+} 内流。

为了阐明 GK 抑制 Ca^{2+} 内流的上游因素,我们研究联合 GK 和 MCU 拮抗剂或兴奋剂对 NOS 和 NO 的影响。NOS 催化左旋精氨酸生成 NO,NO 与超氧阴离子反应生成超氧亚硝酸根离子,其降解为 OH—和 ONOO—自由基,使细胞膜发生脂质过氧化反应,诱导 Ca^{2+} 内流,线粒体去极化,产生强烈的神经毒性,导致神经元死亡;大量 NO 可导致大量多巴胺释放,引起神经细胞损伤^[19-20]。前期研究 GK 对脑缺血损伤的保护作用与抑制 NOS 和 NO 有关^[2],说明 GK 具有抑制 NOS 活性和减少 NO 产生来抑制 Ca^{2+} 内流,通过联合 GK 与 MCU 拮抗剂或兴奋剂发现,MCU 拮抗剂能协助 GK 抑制 NOS 活性和 NO 含量的升高,可能 MCU 拮抗剂能够减少 Ca^{2+} 内流,反作用于氧化应激而抑制 NOS 活性和 NO 含量的升高。相反 MCU 兴奋剂其作用与之相反。

为了进一步阐明基于 MCU 通路 GK 对 Ca^{2+} 内流所引起下游凋亡蛋白的影响,有必要对下游凋亡蛋白跟踪评价。 Ca^{2+} 的升高诱导产生凋亡信号,传递到 caspase-8 使其活化,被激活后形成诱导死亡信号复合体作用于级联反应的效应酶 caspase-3,也就

是最后的执行者,由此激活核酸内切酶,使 DAN 降解,导致凋亡^[21]。同时 Ca²⁺ 内流引起线粒体膜的去极化和电位下降,使细胞色素 C 从线粒体中被释放,激活线粒体依赖的 caspase-9,并剪切活化为 cleaved-caspase-9,继而活化下游 caspase-3 直接引起脑缺血区细胞的凋亡^[22]。实验结果表明,GK 联合 MCU 拮抗剂或兴奋剂能够有效调整 Ca²⁺ 内流,而间接影响 caspase-8、caspase-9 上游凋亡蛋白,导致下游蛋白 caspase-3 表达改变,说明 GK 是通过影响 MCU 关键路径,间接影响下游凋亡蛋白表达来保护脑缺血损伤。

REFERENCES

- [1] ARONOWSKI J, STRONG R, GROTTA J C. Reperfusion injury; demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 1997, 17(10):1048-1056.
- [2] MA S W, LIU X H, XUN Q R, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by ameliorating mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(2):217-225.
- [3] MA S W, ZHANG X T, HE S J, *et al.* Protective effects of ginkgolide K on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2011, 46(13):993-997.
- [4] GU J H, GE J B, LI M, *et al.* Inhibition of NF- κ B activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(4):652-660.
- [5] ZENG L H, XU L H, HE X H, *et al.* Synergistic inhibition of growth of prostate cancer DU145 cells by combined piperine and gossypol treatment [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2012, 28(8):1105-1110.
- [6] KIRICHOK Y, KRAPIVINSKY G, CLAPHAM D E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel [J]. *Nature*, 2004, 427(6972):360-364.
- [7] WANG S L, LIU Z L. Role of mitochondrial calcium transporters in the remote preconditioning on cerebral ischemia reperfusion injury and its mechanism [J]. *Shandong Med J* (山东医药), 2011, 51(39):9-11.
- [8] DONG H, WANG S, ZHANG Z, *et al.* The effect of mitochondrial calcium uniporter opener spermine on diazoxide against focal cerebral ischemia--reperfusion injury in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(2):303-309.
- [9] ZHAO Q, WANG S, LI Y, *et al.* The role of the mitochondrial calcium uniporter in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats involves regulation of mitochondrial energy metabolism [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4):1073-1080.
- [10] LONGA E, WEINSTEIN P, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [11] MA S W, YIN H F, CHEN L Y, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(1):25-31.
- [12] MA S W, LIU H X, JIAO H Y, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca²⁺ influx [J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33(1):59-69.
- [13] ZHAO L, HE T, DING W H, *et al.* Determination of protein from camel milk by bradford [J]. *Appl Chem Ind* (应用化工), 2016, 45(12):2366-2368, 2372.
- [14] DI LISA F, CARPI A, GIORGIO V, *et al.* The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin dincardio protection [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(7):1316-1322.
- [15] LEMASTERS J J, THERUVAT T P, ZHONG Z, *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787(11):1395-1401.
- [16] ZHANG S Z, GAO Q, CAO C M, *et al.* Involvement of the mitochondrial calcium uniporter in cardio protection by ischemic preconditioning [J]. *Life Sci*, 2006, 78:738-745.
- [17] XU X H, ZHENG X X. Effects of puerarin on the levels of calcium and nitric oxide in cultured hippocampal neurons during oxygen-glucose deprivation [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43(17):1308-1312.
- [18] CHEN J, HUANG R B. Protective effect of Yulangsan polysaccharide on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and its underlying mechanism [J]. *Neurosciences (Riyadh)*, 2009, 14(4):343-348.
- [19] MALINSKI T, BAILEY F, ZHANG Z G, *et al.* Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion [J]. *J Cerebr Blood Flow Met*, 1993, 13(3):355-358.
- [20] TOMINAGE T, SATO S, OHNISHI T, *et al.* Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in therat; *in vivo* detection of the nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping [J]. *Brain Res*, 1993, 614(12):342-346.
- [21] SANG Q, LIU X, WANG L, *et al.* Curcumin protects an SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease against toxic injury by regulating HSP90 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2):681-691.
- [22] NIU F, DONG J, XU X, *et al.* Mdivi1 prevents early-stage induction of mitophagy and accelerated cell death in a rat model of moderate controlled cortical impact brain injury [J]. *World Neurosurg*, 2018, pii:S1878-8750(18):32543-32549.

(收稿日期:2018-12-10)