

葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Fas蛋白表达的影响

潘洪平, 杨嘉珍, 莫祥兰, 李吕力, 黄振录, 叶劲, 黄进 (广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Fas蛋白表达的影响。方法 采用闭夹大脑中动脉后再通造成局部脑缺血再灌注模型, 免疫组化 SP法测定 Fas表达情况, 光镜观察脑组织 Fas蛋白阳性细胞数和死亡细胞数。结果 正常对照组 Fas阳性细胞数及死亡细胞数明显少于再灌注组, 再灌注葛根素组死亡细胞数和 Fas阳性细胞数明显少于再灌注对照组 ($P < 0.01$)。结论 葛根素对大鼠急性脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

关键词: 葛根素; 脑缺血再灌注损伤; Fas; 大鼠

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)06-0433-03

Effect of puerarin on the expressions of fas in local cerebral ischemia and reperfusion injury in rat

PAN Hong-ping, YANG Jia-zhen, MO Xiang-lan, LI Lü-li, HUANG Zhen-lu, YE Jing, HUANG Jin (People's Hospital of Guangxi Autonomous Region, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of puerarin on the expression of Fas in local cerebral ischemia and reperfusion injury in rat. **METHODS** Rat model of cerebral ischemia and ischemia-reperfusion was established with ligated middle cerebral artery. The Fas expression was detected by SP immunohistochemical technique, the histopathological change was assessed with microscope in the rats with local cerebral ischemia and ischemia-reperfusion injury. **RESULTS** The Fas positive cells and the number of death cells were significantly less in the normal groups than those in the ischemia-reperfusion ones. Of the ischemia-reperfusion groups, the number of Fas positive cells and death cells were significantly less in puerarin groups than those in control groups. **CONCLUSION** Puerarin can attenuate the tissue injury caused by local cerebral ischemia and ischemia-reperfusion, its protected mechanism may be different according to the injury mechanism.

KEY WORDS: puerarin; local cerebral ischemia and ischemia-reperfusion injury; Fas; rat

脑血管栓塞进行溶栓治疗或行血管再通术后往往会引起再灌注损伤, 防治脑缺血再灌注损伤是近年来研究的热点之一。中药葛根中的主要活性成分葛根素 (8-β-D-葡萄糖吡喃糖-4', 7-二羟基异黄酮) 具有扩张脑血管, 增加脑血流量, 改善微循环, 调节血管内皮细胞功能, 抗动脉粥样硬化, 抗氧化, 清除自由基和抑制缺血再灌注损伤, 改善急性血瘀模型大鼠的血液流变性^[1]等作用, 对脑缺血缺氧具有保护作用。目前临床上广泛用于治疗各种心脑血管缺血性疾病、视网膜动静脉阻塞、突发性耳聋和糖尿病^[2]等症。笔者以往的研究发现, 葛根素对急性脑缺血模型大鼠脑细胞损伤具有保护作用, 其机制可能主要通过上调 HSP70 蛋白的表达而实现^[3-4]。笔者观察葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Fas 表达的影响, 探讨葛根素保护神经元和防治脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 药物试剂

葛根素注射液 (2 mL: 100 mg) 为广东燕塘生物化学药业

有限公司产品, 批号 0112111; 0.9% NaCl 由广西壮族自治区人民医院制剂室提供, 批号 03032601; 10% 水合氯醛溶液由广西壮族自治区人民医院制剂室提供, 批号 020827; Fas 试剂及免疫组化试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。

1.2 动物

Wistar 大鼠, SPF 级, 体重 150 ~ 200g, 雌雄各半, 购于广西壮族自治区药品检验所, 许可证号: SCXK 桂 2003-0001。

1.3 仪器

Olympus B × 50 显微镜, Leica 石蜡切片机。

1.4 方法

1.4.1 动物模型制备 18 只大鼠随机分成急性脑缺血再灌注对照组 (再灌注对照组)、急性脑缺血再灌注葛根素干预组 (再灌注葛根素组)、正常对照组, 每组 6 只。按文献^[5]方法制备急性脑缺血再灌注模型, 首先对大鼠行水合氯醛麻醉 (ip, 350 mg · kg⁻¹) 后, 以电钻等器械小心撬开颅骨, 暴露并闭夹大脑中动脉造成局部特定区域急性脑缺血模型, 每组大鼠以闭夹大脑中动脉侧为缺血侧, 另一侧不闭夹作为正常对

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅医药卫生科研课题 (Z2001072)

作者简介: 潘洪平 (1968 -), 男, 广西南宁市人, 硕士学位, 副主任药师, 主要从事医院药学、药理学研究。Tel: 0771 - 2928842 E-mail: php1968@126.com

照(正常侧)。再灌注葛根素组在缺血前 30 min 按 30 mg·kg⁻¹腹腔注射葛根素注射液,对照组则按同样方法注射相同体积的生理盐水。急性脑缺血模型大鼠于缺血侧闭夹大脑中动脉 30 min,脑缺血再灌注模型大鼠于缺血侧均闭夹大脑中动脉 30 min 后开放血管再通 30 min。再灌注对照组,再灌注葛根素组均取材于缺血再灌注区,正常对照组取材于单纯行急性脑缺血 30 min 后的非缺血侧(正常侧)。然后各组迅速取材,并迅速经 4% 中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,HE 染色及用免疫组化 SP 法测定 Fas 表达情况。

1.4.2 结果判断 HE 染色细胞出现核固缩或核碎裂或核溶解者判为死亡细胞,每张切片取 5 个高倍镜视野(400 倍光镜,40×10),不足 5 个高倍镜视野者统计全部细胞数,计算死亡细胞数占总细胞数的百分率,取其平均值。免疫组化染色结果:Fas 阳性定位于细胞质和细胞膜,阴性不着色,阳性呈棕黄色,每张切片取 4 个高倍镜视野(400 倍光镜,40×10),不足 4 个高倍镜视野者统计全部细胞数,计算阳性细胞数占总细胞数的百分率,取平均值。

1.5 统计方法

实验数据输入计算机处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件对多组间进行方差分析和两两比较 *t* 检验及相关分析。

2 结果

Fas 在各组中均有不同程度的表达,见图 1~3,再灌注对照组阳性细胞数明显多于再灌注葛根素组和正常对照组(*P* 均 < 0.01),见表 1。HE 切片各组均可见死亡细胞,以再灌注对照组最明显,再灌注对照组可见灶性坏死及出血。各组 Fas 阳性细胞数与死亡细胞数间均无明显相关性(*P* > 0.05);与正常对照组比较,再灌注对照组及再灌注葛根素组的 Fas 阳性细胞数与死亡细胞数均明显增多(*P* < 0.01)。见表 1,2。

表 1 脑缺血再灌注各组 Fas 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The comparison of the expressions of Fas in rats of four groups($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / mg·kg ⁻¹	<i>n</i>	Fas 阳性细胞百分数
正常对照组	0	6	5.85 ± 1.25
再灌注对照组	0	6	75.33 ± 4.16*
再灌注葛根素组	30	6	34.68 ± 2.56* [△]

注:与正常对照组比较,**P* < 0.01,与再灌注对照组比较,[△]*P* < 0.01

Note:**P* < 0.01, vs group of normal control;[△]*P* < 0.01, vs control group of local cerebral ischemia and reperfusion injury

表 2 各组急性脑缺血损伤程度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The comparison of local cerebral ischemia and reperfusion injury in rats of three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / mg·kg ⁻¹	<i>n</i>	死亡细胞百分数
正常对照组	0	6	14.12 ± 3.38
再灌注对照组	0	6	42.56 ± 8.90*
再灌注葛根素组	30	6	27.37 ± 4.17* [△]

注:与正常对照组比较,**P* < 0.01,与再灌注对照组比较,[△]*P* < 0.01

Note:**P* < 0.01, vs group of normal control;[△]*P* < 0.01, vs control group of local cerebral ischemia and reperfusion injury

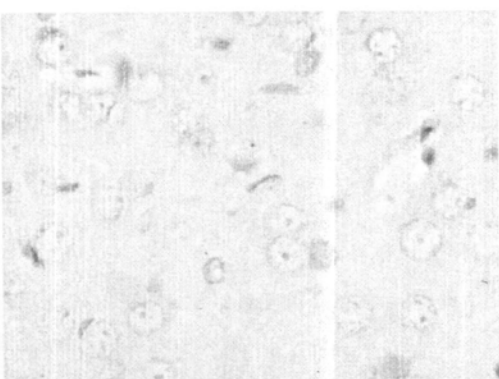


图 1 正常对照组 Fas 染色,部分神经细胞阳性 SP × 400

Fig 1 Fas stain of normal control group, SP × 400

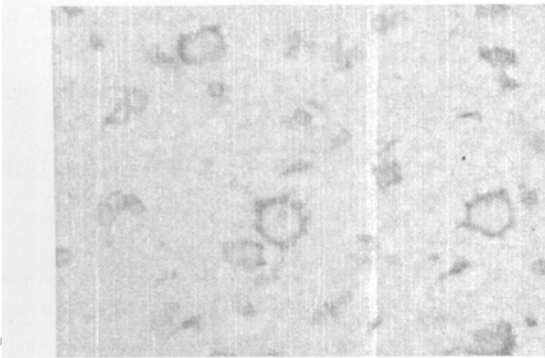


图 2 再灌注对照组 Fas 染色,部分神经细胞阳性 SP × 400

Fig 2 Fas stain of control group of local cerebral ischemia and reperfusion, SP × 400

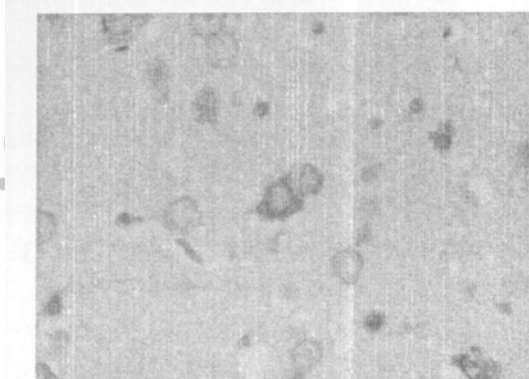


图 3 再灌注葛根素组 Fas 染色,部分神经细胞阳性 SP × 400

Fig 3 Fas stain of puerarin group, SP × 400

3 讨论

脑缺血可致脑组织损伤,缺血再灌注往往使损伤进一步加重,其后续损伤与细胞凋亡有关。Gursoy-Ozdemir 等^[6]报道,脑缺血再灌注可致脑组织损伤,包括神经细胞和血管损伤,其损伤与组织释放氧自由基、NO 等物质有关。氧自由基及 NO 既可致细胞坏死,也可致细胞凋亡。有报道:蛋白激酶 Cδ(PKCδ)可诱导脑组织再灌注损伤^[7]。PKCδ 可促进各种细胞的凋亡,包括神经细胞^[8-9]。细胞凋亡是指有核细胞在一定条件下通过启动内部死亡机制,按特定的基因程序自行结束生命的过程。介导细胞凋亡的通路有多条,其中 Fas 与 FasL 系统是细胞凋亡中最主要的途径之一。Fas 是一种

细胞表面蛋白分子,其胞内区含有一段长约 60~70 个氨基酸序列的死亡结构域,与死亡相关蛋白结合后,激活 Caspase-8,从而引起一系列 Caspase 酶联反应,引起 DNA 降解,细胞凋亡。研究表明:大鼠脑缺血再灌注后 Fas 表达增强,表明 Fas 蛋白介导了脑缺血后细胞凋亡的发生^[9]。

本研究表明:缺血再灌注对照组、再灌注葛根素组的 Fas 阳性细胞数及死亡细胞数均明显多于正常对照组,再灌注对照组则明显多于再灌注葛根素组。表明葛根素对急性脑缺血再灌注所致的脑细胞损伤具有保护作用,其保护作用机制在急性缺血性损伤及再灌注损伤可能有所不同。对缺血性损伤的保护作用可能主要通过上调 HSP70 蛋白的表达而实现的^[4],而对脑缺血再灌注损伤的保护作用除上调 HSP70 表达外,还可能与下调 Fas 蛋白的表达、减少细胞凋亡有关。

急性脑缺血性损伤主要由于缺血使脑细胞代谢障碍,导致细胞变性坏死所致,而与 Fas 蛋白介导的细胞凋亡相关不大,在再灌注损伤机制中,除了缺血导致脑细胞代谢障碍和变性坏死途径外,本研究进一步证实其损伤机理可能有 Fas 蛋白的参与。

本实验结果显示:实验各组 Fas 阳性细胞数与死亡细胞数间均无显著相关性,说明了脑缺血再灌注所致的细胞死亡途径不仅仅是由 Fas 介导,还有其他途径介导细胞死亡,进一步说明了损伤机制的复杂性。

实验结果表明:葛根素对急性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,提示通过这一药物干预作用对缺血再灌注后脑神经细胞损伤的预防、保护及治疗可能存在一定的应用价值和前景。

参考文献

[1] PAN H P, YANG J ZH, LI L L, *et al.* Experimental Study of Puer-

arin Injection on the Hemorheology in Acute Blood stasis Model Rats[J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2003, 28(12): 1178-1180.

[2] PAN H P. Study progresses of Radix pueraria, Taurine and their compound preparation in decrease of Blood glucose[J]. Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2002, 24(3): 221-224.

[3] PAN H P, YANG J ZH, MO X L, *et al.* Protection of puerarin on the cerebral in jury in the rats with acute local ischemia[J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2005, 30(6): 457-459.

[4] PAN H P, MO X L, YANG J ZH, *et al.* Effect of puerarin on the expression of Hsp70 in the rats with cerebral in jury induced by acute local ischemia[J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2005, 30(7): 538-540.

[5] ZHANG J T. Experimental method of modern pharmacology(现代药理实验方法学)[M]. Beijing: Beijing Medical University and China XieHe Medical University Press, 1998: 1241.

[6] GURSOY-OZDEMIR Y, CAN A, DALKARA T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2004, 35(6): 1449-1455.

[7] BRIGHT R, RAVAL A P, DEMBNER J M, *et al.* Protein kinase C mediates cerebral reperfusion injury in vivo[J]. J Neurosci, 2004, 24(31): 6880-6886.

[8] BRODIE C, BLUMBERG P M. Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta[J]. Apoptosis, 2003, 8(1): 19-24.

[9] ANANTHARAM V, KITAZAWA M, WAGNER J, *et al.* Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase C delta is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl[J]. J Neurosci, 2002, 22(5): 1738-1742.

收稿日期: 2005-05-31