

刺芒柄花素对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其机制研究

邹小蓉¹, 徐露^{2*} (1.遂宁市中心医院药剂科, 遂宁 四川 629099; 2.重庆市医药高等专科学校药理教研室, 重庆 401331)

摘要: 目的 研究刺芒柄花素(formononetin, FOR)对脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, I/R)大鼠的保护作用, 并探讨其可能的机制。方法 SD 大鼠 50 只, ♂, 分为假手术组、I/R 组、FOR 高、中、低剂量组(100, 50, 20 mg·kg⁻¹)。连续灌胃给药 7 d 后, 除假手术组外均采用 MCAO 法造成大鼠脑缺血模型, 2 h 后拔出线栓, 再灌注 24 h 后进行神经功能评分; 跳台法检测大鼠学习记忆能力; HE 染色法观测脑组织病理形态; ELISA 法检测血清中 NO 表达及 NOS 活性水平; Western blot 法检测脑组织中 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。结果 与 I/R 组相比, FOR 高、中、低剂量组能显著降低大鼠神经功能评分($P<0.01$)、提高大鼠学习记忆能力($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、改善脑组织形态、降低血清中 NO 表达水平及 NOS 活性($P<0.01$)、降低 caspase-3 蛋白和 Bax 蛋白的表达水平并提高 Bcl-2 的表达水平($P<0.01$)。结论 刺芒柄花素对 I/R 大鼠具有一定的保护作用, 其机制可能与抗氧化应激和抗凋亡有关。

关键词: 刺芒柄花素; 脑缺血再灌注; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)06-0855-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.015

引用本文: 邹小蓉, 徐露. 刺芒柄花素对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 855-858.

Protective Effects and Mechanism Study of Formononetin on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

ZOU Xiaorong¹, XU Lu^{2*} (1.Department of Pharmacy, Suining Central Hospital, Suining 629099, China; 2.Teaching and Research Section of Pharmacology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effects of formononetin (FOR) on cerebral ischemia-reperfusion injury(I/R) in rats and explore its possible mechanism. **METHODS** Fifty male SD rats were divided into 5 groups: sham operation group, I/R group, FOR high, medium and low dose group (100, 50, 20 mg·kg⁻¹). Continuous intragastric administration for 7 d, MCAO model was used to make I/R rats. After 2 h, plug was pulled out and after 24 h blood were perfused to form the model of I/R, the neurological score was detected; the ability of learning and memory was detected by step-down test; pathological morphology was observed by HE; NO expression and NOS activity in serum was detected by ELISA; the expression of caspase-3, Bcl-2 and Bax protein in brain tissues was detected by Western blot method. **RESULTS** Compared with I/R group, FOR high, middle and low dosage groups could significantly reduce the rat nerve function score($P<0.01$), improve the ability of learning and memory of rats ($P<0.05$ or $P<0.01$), improve the morphology of brain tissue, decrease the NOS activity level and expression of NO in serum($P<0.01$), reduce caspase-3 and Bax protein expression level and improve the expression level of Bcl-2($P<0.01$). **CONCLUSION** It is possible that FOR can protect I/R rats, and its mechanism maybe related to anti-oxidative stress and anti-apoptosis.

KEY WORDS: formononetin; cerebral ischemia-reperfusion injury; apoptosis; oxidative

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, I/R)严重危害患者的身体健康, 有较高的致死致残率。其发病机制复杂, 与氧化损伤、炎症损伤、兴奋性氨基酸毒性、钙超载等多种机制相关^[1]。I/R 发生后, 神经元的损伤、凋亡严重影响患者愈后及未来的生存质量。神经元的凋亡与氧化应激关系密切, 抗氧化治疗可以降低氧化

应激带来的损伤, 从而降低神经元的凋亡^[2]。

刺芒柄花素(formononetin, FOR)是红车轴草的主要有效成分, 属于异黄酮类成分。FOR 具有多种药理活性, 如抑制肿瘤、抗氧化、抗高血压及雌激素样作用^[3]。有研究发现, FOR 对缺血再灌注损伤的肾脏具有保护作用, 其机制与抗氧化有关^[4]。FOR 在 I/R 中的作用还未曾有文献报道,

基金项目: 重庆市基础与前沿一般项目(cstc2016jcyjA0268); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1600235)

作者简介: 邹小蓉, 女, 主管药师 Tel: 13550770063 E-mail: 2733855514@qq.com *通信作者: 徐露, 博士, 讲师 Tel: 13618233732 E-mail: 106334600@qq.com

因此本研究根据 FOR 对 I/R 的保护作用进行研究,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 动物

50 只健康成年 SD 大鼠,♂, 体质量(250±20)g, SPF 级, 购自重庆医科大学动物实验中心, 实验动物许可证号: SYXK(渝)2012-0001, 本批次大鼠合格证号: 0001813, SPF 级饲养条件。

1.2 药物和试剂

FOR(陕西慈缘生物技术有限公司, 批号: 20160423; 含量≥98%), 将 FOR 溶解于蒸馏水中, 配成 25 mg·mL⁻¹ 的溶液, 备用; NO 及 NOS 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20151112、20160105); caspase-3, Bcl-2、Bax 及 β-actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: 20160220、20160304、20160328)。

1.3 仪器

DB096 型大鼠跳台(安徽正华); ELx808 型酶标仪(美国 BioTek 公司); 170-1870 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); AL104 型电子天平(Mettler-Toledo 公司); DYCZ-24DN 型 Western blot 垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与干预

将大鼠随机分为假手术组、I/R 组、FOR 高、中、低剂量组(100, 50, 20 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。FOR 各组于造模前每日分别灌胃 100, 50 和 20 mg·kg⁻¹ 的 FOR 溶液, 连续灌胃 7 d, 每日 1 次, 同时假手术组和 I/R 组灌胃相应体积的蒸馏水。

2.2 大鼠 I/R 模型的制备

4%的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧固定于鼠板上, 颈部除毛, 参考文献^[5]的 MCAO 法, 将大鼠颈中剪 1 cm 长切口, 分离右侧颈总、颈外和颈内动脉。分离后用手术线将颈总动脉扎紧, 再将颈外动脉 Y 型分离处用手术线扎紧。在颈总动脉上开一 V 型小口, 将准备好的线栓从颈总动脉缓慢插入颈内动脉, 感到阻力后停止, 再将线栓捆绑固定颈内动脉内, 缝合伤口。大鼠脑缺血 2 h 后, 拔出线栓, 待恢复血供 24 h。假手术组除不插入线栓外, 其余方法同。

2.3 神经功能评分

再灌注 24 h 后, 经 Longa 5 分评分法对大鼠进行神经功能评分。无神经功能障碍, 活动正常

者记 0 分; 左前肢无法完全伸直者记 1 分; 爬行时向左转圈者记 2 分; 爬行时向左倾倒者记 3 分; 不能行走, 意识丧失者记 4 分。

2.4 跳台法检测学习记忆能力

将大鼠放入跳台箱中, 适应 2 min。通入 40 V 的交流电, 从大鼠跳入安全平台开始计时, 到大鼠从安全平台跳下为止, 这段时间记录为大鼠潜伏期。同时, 记录 300 s 内大鼠跳出安全平台后被电击的次数, 记为错误次数。所有大鼠于再灌注 24 h 后进行跳台实验。

2.5 病理组织形态

3.5%的水合氯醛以 10 mL·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉, 迅速断头取脑, 放入 10%甲醛的固定液中, 石蜡包埋标本, 切片厚度为 5 μm, 进行 HE 染色, 显微镜下观察大鼠海马区域神经细胞的病理组织形态。

2.6 NO 含量水平及 NOS 活性的检测

将行为学评分后的大鼠断头取血, 于 4 ℃静置 1 h 得血清。严格按照 NO 及 NOS 试剂盒说明书的步骤进行检测。

2.7 Western blot 法检测 caspase-3, Bcl-2、Bax 蛋白表达的情况

大鼠断头取脑后, 将大脑制成匀浆, 严格按照蛋白提取试剂盒的操作步骤, 提取脑组织全蛋白, 测定浓度。SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 经 PVDF 膜转膜, 再用脱脂牛奶进行 1 h 的封闭。分别加入鼠抗 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体(1:250), 孵育过夜, 温度为 4 ℃, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 洗涤后加入经 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:500), 孵育 2 h, 再由 TBST 液洗涤 3 次, 各 10 min。完毕后条带经 Bio-RAD 凝胶分析仪进行图像扫描分析, 灰度值用 Quantity One 进行测定。caspase-3、Bcl-2 和 Bax 与 β-actin 的灰度值各自的比值表示 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析

实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 20.0 软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠神经功能评分及学习记忆检测结果

假手术组大鼠无神经功能缺损, 行为正常; 模型组大鼠表现出明显的神经功能损伤症状。与模型组比较, FOR 高、中、低剂量组神经功能损

伤明显降低。模型组和 FOR 高、中、低剂量组潜伏期较假手术组明显缩短, 错误次数较假手术组明显增多($P<0.01$)。与模型组相比, FOR 高、中、低剂量组潜伏期明显延长, 错误次数显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠神经功评分及学习记忆的检测结果($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Results of nerve work score and step-down test of rats in each group($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	神经功能 评分	潜伏期/s	错误 次数/次
假手术组	—	0	$134.4 \pm 22.3^{(3)}$	$1.0 \pm 0.2^{(3)}$
模型组	—	$3.4 \pm 0.8^{(1)}$	$100.8 \pm 19.9^{(1)}$	$4.4 \pm 0.5^{(1)}$
FOR 高剂量组	100	$2.1 \pm 0.5^{(1)(3)}$	$123.3 \pm 22.4^{(1)(3)}$	$1.6 \pm 0.4^{(1)(3)}$
FOR 中剂量组	50	$2.2 \pm 0.5^{(1)(3)}$	$116.9 \pm 20.2^{(1)(3)}$	$1.8 \pm 0.7^{(1)(3)}$
FOR 低剂量组	25	$2.4 \pm 0.7^{(1)(3)}$	$118.2 \pm 20.6^{(1)(3)}$	$2.9 \pm 0.5^{(1)(2)}$

注: 与假手术组比, $^{(1)}P<0.01$; 与模型组比较, $^{(2)}P<0.05$, $^{(3)}P<0.01$ 。
Note: Compared with the sham group, $^{(1)}P<0.01$; compared with the model group, $^{(2)}P<0.05$, $^{(3)}P<0.01$.

3.2 NO 水平及 NOS 活性的检测结果

与假手术组相比, 其他各组 NO 水平显著升高, NOS 活性显著增加($P<0.01$); 与模型组相比, FOR 高、中、低剂量组 NO 水平显著降低, NOS 活性显著降低($P<0.01$), 结果见表 2。

表 2 各组大鼠 NO 含量水平及 NOS 活性的检测结果($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The content of NO and the detection of NOS activity in rats of each group($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	NO	NOS
假手术组	—	$0.0317 \pm 0.0032^{(2)}$	$0.2330 \pm 0.0439^{(2)}$
模型组	—	$0.0935 \pm 0.0125^{(1)}$	$0.6026 \pm 0.0470^{(1)}$
FOR 高剂量组	100	$0.0468 \pm 0.0074^{(1)(2)}$	$0.4894 \pm 0.0502^{(1)(2)}$
FOR 中剂量组	50	$0.0511 \pm 0.0061^{(1)(2)}$	$0.4973 \pm 0.0431^{(1)(2)}$
FOR 低剂量组	25	$0.0523 \pm 0.0066^{(1)(2)}$	$0.5012 \pm 0.0447^{(1)(2)}$

注: 与假手术组比, $^{(1)}P<0.01$; 与模型组比较, $^{(2)}P<0.01$ 。
Note: Compared with the sham group, $^{(1)}P<0.01$; compared with the model group, $^{(2)}P<0.01$.

3.3 病理组织形态结果

模型组细胞的结构和形态异常居多, 可观察到细胞肿胀, 核固缩。与模型组相比, FOR 高、中、低剂量组的脑组织形态显著改善, 见图 1。

3.4 caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达情况

与假手术组相比, 各组 caspase-3 和 Bax 蛋白表达显著升高($P<0.01$), Bcl-2 表达显著降低($P<0.01$); 与模型组相比, FOR 高、中、低剂量组

caspase-3 和 Bax 蛋白表达显著降低($P<0.01$), Bcl-2 表达显著增加($P<0.01$)。结果见表 3 和图 2。

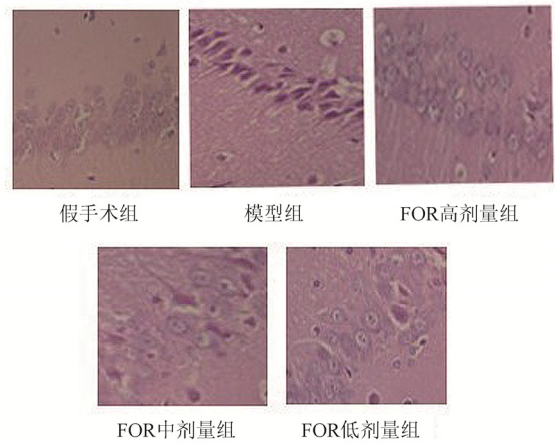


图 1 各组大鼠的脑组织 HE 染色结果($400 \times$)

Fig. 1 HE staining results of brain tissue in each group ($400 \times$)

表 3 各组大鼠 caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平的检测结果($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Expression of caspase-3, Bcl-2 and Bax protein in rats of each group($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	caspase-3	Bcl-2	Bax
假手术组	—	$0.075 \pm 0.003^{(2)}$	$0.148 \pm 0.004^{(2)}$	$0.038 \pm 0.002^{(2)}$
模型组	—	$0.189 \pm 0.005^{(1)}$	$0.083 \pm 0.005^{(1)}$	$0.214 \pm 0.006^{(1)}$
FOR 高剂量组	100	$0.112 \pm 0.004^{(1)(2)}$	$0.124 \pm 0.003^{(1)(2)}$	$0.167 \pm 0.005^{(1)(2)}$
FOR 中剂量组	50	$0.136 \pm 0.003^{(1)(2)}$	$0.118 \pm 0.004^{(1)(2)}$	$0.170 \pm 0.004^{(1)(2)}$
FOR 低剂量组	25	$0.144 \pm 0.005^{(1)(2)}$	$0.121 \pm 0.003^{(1)(2)}$	$0.173 \pm 0.005^{(1)(2)}$

注: 与假手术组比, $^{(1)}P<0.01$; 与模型组比较, $^{(2)}P<0.01$ 。
Note: Compared with the sham group, $^{(1)}P<0.01$; compared with the model group, $^{(2)}P<0.01$.

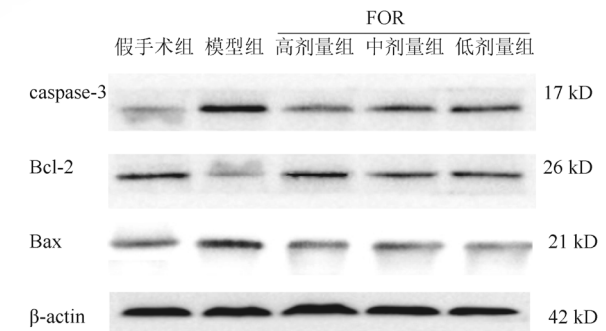


图 2 FOR 各组大鼠 caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的 Western blot 图

Fig. 2 Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein expression of FOR rats in each group by Western blot

4 讨论

脑血管疾病日益威胁着人类的健康, 已成为人类三大致死病因之一, 其中 I/R 在脑血管疾病中

约占 75%。脑缺血损伤的致死、致残率都很高，临床上却没有特效药物，因此，开发 I/R 的保护药物具有重要意义。线栓法是复制缺血性脑血管疾病的经典方法，该方法具有多种优点：不开颅、创伤小、缺血及再灌时间可控、死亡率低等。在本实验中，运用该方法造模死亡率只有 4%，本课题组均在第一时间重新造模进行了实验对象的补充。本研究的目的更侧重于 FOR 作用机制方面的研究，设置假手术组、模型组及不同剂量的 FOR 组已经能完成本研究的目的，因此没有设置阳性对照，但若研究重点更关注药物疗效，则应加设阳性对照组。I/R 后，大鼠表现主要为学习记忆力减退、肢体障碍、昏迷、死亡等，可通过神经功能评分来判断造模是否成功，也可以评估药物对神经元的保护作用。由于 I/R 后大鼠的学习记忆能力会减退，因此可以用跳台法检测大鼠的学习记忆能力。本实验结果表明，FOR 可以显著降低 I/R 大鼠的神经行为学评分，延长大鼠跳台的潜伏期，减少错误次数，表明 FOR 显著提升 I/R 大鼠的学习记忆能力。

在 I/R 的发生和发展中，NO 发挥着毒性和保护的双重作用，低浓度时 NO 具有扩张血管的作用，可抑制血小板的聚集，从而改善组织的缺血状况，减轻缺血损伤；在高浓度时，NO 具有诱导神经细胞凋亡的作用^[6]。NO 很不稳定，存在时间很短，由于 NO 是由 NOS 催化产生，因此对 NOS 活性进行检测具有重要的参考意义^[7]。I/R 后，NOS 会过度激活产生大量 NO，引起神经毒性，从而导致神经元凋亡^[8]。通过本实验发现，FOR 能显著降低 I/R 大鼠的 NO 含量和 NOS 活性，这可能是 FOR 发挥神经保护作用的机制之一。

caspase 是特异性凋亡信号转导分子，当 caspase 被激活后可对细胞执行凋亡程序。caspase-3 是 caspase 家族中最关键的凋亡蛋白酶，对凋亡程序的启动起着重要作用^[9]。在神经元的凋亡过程中，Bcl-2 也发挥着重要作用，Bcl-2 作用于 caspase-3 的上游，且是 caspase-3 的底物，因此 caspase-3 和 Bcl-2 共同调节着细胞的凋亡过程^[10]。当 Bcl-2 高表达的时候，能抑制细胞的凋亡，而 Bax 过度表达时，则促进细胞的凋亡^[11]。通过本

实验研究发现，FOR 能显著抑制 caspase-3 和 Bax 蛋白的表达，促进 Bcl-2 蛋白的表达，说明 FOR 具有显著抑制神经元凋亡的作用。

综上所述，FOR 能显著降低 I/R 大鼠的神经功能评分、提高大鼠的学习记忆能力，改善脑组织的病理形态，发挥一定的神经保护作用，其机制可能与降低 NO 水平并抑制 NOS 活性，抑制 caspase-3 和 Bax 蛋白的表达，促进 Bcl-2 蛋白的表达有关。

REFERENCES

- [1] WU C X, LIU R, DU G H, et al. Relationship between endoplasmic reticulum stress and cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2013, 29(5): 601-605.
- [2] ZHONG F F, WU C L, SUN X F, et al. Effects of Buyang Huanwu decoction combined with edaravone on the apoptosis of neuron and expression of Bcl-2 and Bax following cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2016, 33(11): 1392-1396.
- [3] JIE F Y, XUE C K, SHEN K, et al. Effect of formononetin on the expression of estrogen receptor β in aortic arch of castrated rat [J]. *China Pharm*(中国药师), 2011, 14(9): 1250-1252.
- [4] 田心、常盼、周亚光, 等. 刺芒柄花素对高糖诱导的小鼠系膜细胞炎症因子调控及增殖的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(5): 1052-1056.
- [5] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] GAO Z J, MIN J, WU X C, et al. Repression of neuronal nitric oxide (nNOS) synthesis by MTA1 is involved in oxidative stress-induced neuronal damage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(1): 40-47.
- [7] ATANASOVA D Y, DIMITROV N D, LAZAROV N E. Expression of nitric oxide- containing structures in the rat carotid body [J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(8): 770-775.
- [8] JIANG Z J, WANG C Y, XIE X, et al. Schizandrin ameliorates ovariectomy-induced memory impairment, potentiates neurotransmission and exhibits antioxidant properties [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(10): 2479-2492.
- [9] D'AMELIO M, SHENG M, CECCONI F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(11): 700-709.
- [10] CHEN X, SUN J X, JIANG C W, et al. Research progress on Bcl-2, caspase-3 and Alzheimer's disease [J]. *Clin Med Eng*(临床医学工程), 2013, 20(9): 1177-1179.
- [11] HUANG Y R, JIN Y L, LI N, et al. Effects of acupoint, electroacupuncture or round-sharp acupuncture needle interventions on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein of rectus femoris in rabbits with knee osteoarthritis [J]. *Acupuncture Res*(针刺研究), 2014, 39(2): 100-123.

收稿日期: 2017-06-06

(本文责编: 李艳芳)