

人参皂苷 Rb1 对大鼠脑缺血再灌注损伤中 NAIP 表达的影响

孙德旭 萧洪文 袁琼兰 杨朝鲜 邓莉 高小青 龚林

基金项目:四川省教育厅资助项目(No. 2000 - A28)

作者单位:221002 江苏徐州,徐州医学院人体解剖学教研室(孙德旭);泸州医学院人体解剖学教研室(萧洪文、袁琼兰、杨朝鲜、邓莉、高小青、龚林)

作者简介:孙德旭(1979 -),男,助教,硕士研究生,研究方向:缺血性脑损伤的分子机制

通信作者:萧洪文,Email: Xiaohongwen4@sohu.com

【摘要】 目的:观察人参皂苷 Rb1 对神经元凋亡抑制蛋白(neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP)在脑缺血再灌注损伤中表达的影响,探讨人参皂苷 Rb1 对缺血性脑病的防治机制。**方法:**线栓法阻断大鼠大脑中动脉 2 h,再灌注 3 h~5 d 制备脑缺血再灌注模型,应用免疫组织化学方法标记 NAIP 阳性细胞,观察人参皂苷 Rb1 对 NAIP 阳性细胞数的影响。**结果:**缺血再灌注后,缺血半暗带内的 NAIP 阳性细胞表达增加,海马 CA1 区等部位的 NAIP 阳性细胞数量也明显增加,而缺血中心区无 NAIP 阳性细胞的表达。实验对照组中 NAIP 阳性细胞数量随再灌注时间延长逐渐升高,12 h 达到高峰,至 5 d 时 NAIP 阳性细胞数量表达低于正常水平。实验用药组中 NAIP 阳性细胞数量在 2 d 时达到高峰,且其高峰值明显高于实验对照组中的高峰值,后随再灌注时间的延长而逐渐下降,至 5 d 时仍处于较高水平。**结论:**脑缺血再灌注后,NAIP 表达增加是脑组织对损伤的一种保护性反应,其对缺血区周围的神经细胞的保护作用更为明显。NAIP 在脑组织中的表达具有一定的时间规律性,并且人参皂苷 Rb1 可能通过上调 NAIP 的表达发挥对受损脑组织的保护作用。

【关键词】 人参皂苷 Rb1;神经元凋亡抑制蛋白;缺血再灌注;脑损伤

【中图分类号】 R392 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7163(2007)04-0250-04

Effect of Ginsenoside Rb1 on Expression of Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein in Cerebral Tissue of Rats Subjected to cerebral ischemic - reperfusion Injury

Sun Dexu, Xiao Hongwen, Yuan Qionglan, Yang Chaoshan, Deng Li, Gao Xiaoqing, Gonglin. Department of Human Anatomy, Xuzhou Medical College, Jiangsu 221002, China. Corresponding author: Xiao Hongwen, Email: Xiaohongwen4@sohu.com

【Abstract】 Objective: To investigate the influence of ginsenoside Rb1 on expression of neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) in cerebral tissue of rats subjected to cerebral ischemia - reperfusion, and find out the mechanisms of ginsenoside Rb1 on cerebral tissue against cerebral ischemia - reperfusion injury. **Methods:** The models of cerebral ischemia - reperfusion were induced by blocking right middle cerebral artery occlusion (MCAO) with intraluminal nylon fiber for 2 h and reperfusion for 3 hours to 5 days. These rats were divided into two groups randomly: experiment control and ginsenoside Rb1 group. Sham - operated rats were regarded as a control group. The immunohistochemical staining was employed to observe the expression of NAIP in cerebral tissues. **Results:** After cerebral ischemia - reperfusion, the number of NAIP - positive cells in semidarkness zone of ischemia and hippocampus CA1 increased. The expression of NAIP became stronger during cerebral ischemia - reperfusion. However, no NAIP - positive cell was observed in the centre of ischemic zone. In experiment control group, the number of NAIP - positive cells peaked at 12 h of reperfusion, and then decreased gradually to the lower than normal level on 5th day of reperfusion. In ginsenoside Rb1 group, the number of NAIP positive cells peaked at 2 d of reperfusion, and then gradually decreased, but it was higher on 5th day of reperfusion. **Conclusions:** The increased expression of NAIP is protective reaction of brain tissue against injury during cerebral ischemia - reperfusion, especially the nerve cells around ischemic region. The expression of NAIP in brain tissues possesses some time regularity. Up - regulating expression of NAIP is one way of protection of ginsenoside Rb1 on nervous tissue against ischemia - reperfusion injury.

【Key words】 Ginsenoside Rb1; Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP); ischemia - reperfusion; Brain injured

人参皂苷类药物被证实对缺血性脑血管疾病有明确的疗效。近年来的国内外研究证明,人参皂苷通过改善缺血脑组织的血流量^[1],减少 Ca^{2+} 内流,促进 ATP 的生成,清除自由基等途径对缺血脑损伤产生保护作用^[2],但其具体作用机制仍待阐明。在脑缺血再灌注过程中,神经元凋亡抑制蛋白(neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP)被认为参与了调控脑缺血后神经细胞的凋亡过程,通过抑制神经细胞的凋亡,减轻缺血再灌注脑损伤^[3]。本实验通过观察人参皂苷单体 Rb1 对脑缺血再灌注过程中 NAIP 表达水平的影响,探讨人参皂苷 Rb1 对缺血性脑损伤的保护作用机制,为实验室的进一步研究和临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人参皂苷 Rb1 购于中国药品生物制品鉴定所。成年健康雄性 Wistar 大鼠共 66 只,体重 250 ~ 300 g,由泸州医学院实验动物中心提供。羊源性 NAIP 多克隆抗体购于 Santa 公司, L-多聚赖氨酸和胰蛋白酶为 Sigma 公司产品, SP 试剂盒为北京中山生物公司产品,羊血清为武汉博士德生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 局灶性脑缺血再灌注模型的制备:按照袁琼兰等人^[4]的线栓法制备脑缺血再灌注模型。手术前大鼠自由饮水进食。按 30 mg/kg 体重腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠。取颈正中切口长约 2 cm,分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA);用 1# 丝线结扎 CCA 及 ECA,在 ICA 起始处打一松结。在 CCA 近分叉处剪一 V 形切口,将阻塞线(长度依动物体重不同约 1.8 ~ 1.9 cm)由切口插入并轻推入 ICA 颅内段后,扎紧 ICA,缝合皮肤。大鼠清醒后,观察其神经缺失症状,包括:动物不能伸左前肢,行走时向左侧转圈,爬板实验总是落向左侧,提尾时左前肢内收头弯向左上。满足以上神经缺失症状,则造模成功。缺血 2h 时,大鼠用乙醚麻醉,剪开切口,将阻塞线退出直至线头端在 ICA 的颈段以实现血液再灌注,缝合皮肤。

1.2.2 实验分组:正常对照组动物 3 只。假手术组(手术操作程序与实验组相同,但阻塞线长 1.5 cm 不能阻塞大脑中动脉)3 只。实验对照(IR)组共 30 只,3 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d 各时间点 5 只。人参皂苷(IR/Rb1)组在缺血 2 h 后,腹腔注射人参皂苷 Rb1 30 mg/kg,共 30 只,3 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d 各时间点 5 只。

1.2.3 取材:假手术组手术 2 h 后,实验对照(IR)组和人参皂苷(IR/Rb1)组大鼠在再灌注 3 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d 时间点,用 1% 戊巴比妥钠过量麻醉处死动物。置冰块于大鼠周围降温,夹闭胸主动脉,剪开右心耳,经心脏快速灌注 0.9% 生理盐水 200 mL 后,用 4 ℃、4% 多聚甲醛 200 mL 灌注固定。取出脑组织,将其切成三部分浸泡于相同的固定液 4 ℃ 过夜,石蜡包埋。切片厚度 5 ~ 7 μm 。

1.2.4 免疫组织化学染色程序:(1)切片脱蜡;(2)0.01 M PBS 漂洗 5 min \times 3 次;(3)3% H_2O_2 20 min 以消除内源性过氧化物酶活性;(4)0.01 M PBS 漂洗 5 min \times 3 次;(5)0.1% 胰酶 10 min 暴露被固定遮蔽的抗原;(6)0.01 M PBS 漂洗 5 min \times 3 次;(7)递加 10% 羊血清室温 30 min;(8)羊源性 NAIP 多克隆抗体(1:400 稀释),4 ℃ 过夜;(9)0.01 M PBS 漂洗 5 min \times 3 次;(10)兔抗羊生物素化二抗(1:100 稀释),室温 60 min;(11)0.01 M PBS 漂洗 5 min \times 3 次;(12)递加链霉素过氧化物酶复合物,室温 60 min;(13)0.01 M PBS 漂洗 5 min \times 3 次;(14)DAB 显色 5 ~ 10 min;(15)乙醇脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。

1.2.5 观察项目:每一例动物取前囟后方 1.8 ~ 2.3 mm 围内的三处的冠状切面,观察皮质、纹状体、海马部位 NAIP 阳性细胞的表达情况。镜下观察,NAIP 阳性细胞的胞浆和突起呈棕红色。在每个区域选 5 个视野,在 40 倍物镜下对视野的阳性细胞计数。

1.3 统计学处理

对所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,借助 SPSS 11.5 统计软件完成。

2 结果

2.1 NAIP 阳性细胞的形态学特点及分布

NAIP 阳性细胞表达于胞浆和突起中,而在细胞核中没有表达。皮质内的阳性细胞表现为以锥体细胞为主,胞体肥大,轴突较长,伸向分子层(图 1)。皮质内缺血中心区内的阳性细胞表现为胞体收缩呈扇形、三角形,细胞周围间隙增大,轴突缩短或者消失(图 2)。海马区内锥体细胞层阳性表达表现为细胞排列紧密,轴突整齐,完整、较长(图 3)。缺血侧海马内阳性细胞表现为肿胀,细胞核呈椭圆形,淡染(图 4)。IR/Rb1 组在侧脑室下区与胼胝体交界处也观察到阳性细胞表现为核大淡染,胞质少,突起多(图 5)。

各组脉络丛上皮细胞、第三脑室及侧脑室室管膜上皮细胞有阳性表达(图 6)。大脑皮质各部均有阳性细胞分布,主要分布于大脑皮质的运动区,其中

以第 3、5 层的锥体细胞最为明显。海马的 CA 1 区、CA 3 区和 DG 区均观察到阳性细胞,以 CA 1 区阳性细胞数目最多。纹状体区有少量散在分布的 NAIP 阳性细胞,但 IR 组和 IR/Rb1 组纹状体中未观察到 NAIP 阳性细胞。另外苍白球、腹侧苍白球、杏仁核、屏状核等部位也有 NAIP 阳性细胞的分布。

2.2 各时间点 NAIP 阳性细胞表达量的差别

IR 组中上顶叶及额顶皮质部位的阳性细胞数目在 24 h 达到峰值,随后逐渐下降。皮质内的缺血

中心区细胞大量坏死,只有少量阳性细胞散在分布(图 7),至第 5 d 梗死灶内没有阳性细胞。而缺血半暗带区内阳性细胞数量增多,密集分布。海马区阳性细胞数目在 12 h 达到高峰,至 24 h 只有少量细胞分布在海马的 CA 1 区。IR/Rb1 组中缺血侧皮质中 NAIP 阳性细胞表达增加至 48 h 达到峰值,缺血中心区中有相当数量的阳性细胞分布(图 8)。海马 CA 1 区阳性细胞肿胀,少量锥体细胞分布其中(表 1)。

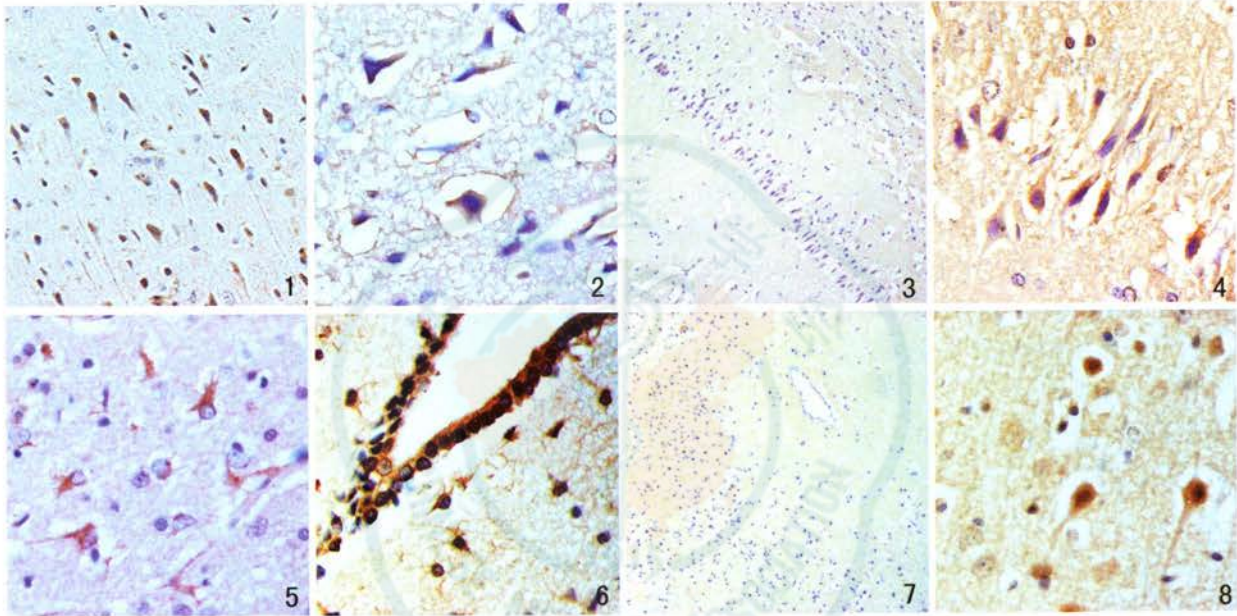


图 1 IR/Rb1 组再灌注 2 天皮质区 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 200$) 图 2 IR 组再灌注 12 小时缺血区内 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 400$) 图 3 IR 组再灌注 3 小时海马 CA 1 区 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 100$) 图 4 IR 组再灌注 12 小时海马部位 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 200$) 图 5 IR/Rb1 组再灌注 5 天后 SVZ 区 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 400$) 图 6 正常对照组第三脑室室管膜 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 200$) 图 7 IR 组再灌注 5 天梗死灶周边区 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 100$) 图 8 IR/Rb1 组再灌注 2 天皮质缺血区内 NAIP 阳性细胞(免疫组织化学染色 $\times 400$)

Fig. 1 The NAIP positive cells in cortex on 2nd day during reperfusion in IR/Rb1 group (immunohistochemistry staining $\times 200$) Fig. 2 The NAIP positive cells in ischemia region at 12th hour in IR group (immunohistochemistry staining $\times 400$) Fig. 3 The NAIP positive cells in hippocampus CA1 region at 3rd hour in IR group (immunohistochemistry staining $\times 100$) Fig. 4 The NAIP positive cells in hippocampus region at 12th hour in IR group (immunohistochemistry staining $\times 200$) Fig. 5 The NAIP positive cells in SVZ region on 5th day in IR/Rb1 group (immunohistochemistry staining $\times 400$) Fig. 6 The NAIP positive cells in ependyma of third ventricle in normal control (immunohistochemistry staining $\times 400$) Fig. 7 The NAIP positive cells around Infarction areas on 5th day in IR group (immunohistochemistry staining $\times 100$) Fig. 8 The NAIP positive cells in ischemic zone of cortex on 2nd day in IR/Rb1 group (immunohistochemistry staining $\times 400$)

表 1 各组 NAIP 阳性细胞计数($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The numbers of NAIP positive cells in various groups($\bar{x} \pm s$)

组别(Group)	NAIP 阳性细胞数(The number of NAIP positive cells)		
	对照组(Control)	IR	IR/Rb1
正常对照组(Normal control)	26.37 \pm 1.71		
假手术组(Sham operation group)	28.03 \pm 2.54		
3h		38.10 \pm 2.41 *	41.58 \pm 2.68 *
12h		55.20 \pm 1.51 * Δ	63.62 \pm 2.38 * \blacklozenge
1d		38.28 \pm 1.91 *	77.52 \pm 3.26 * \blacklozenge
2d		38.08 \pm 3.84 *	90.82 \pm 2.81 * \blacklozenge \star
3d		32.18 \pm 2.02 *	64.76 \pm 2.49 *
5d		20.18 \pm 2.40 *	43.26 \pm 3.32 *

* 正常对照组、假手术组比较 (vs normal control an sham operation group), $F=0.735, P<0.05$; Δ 与 3h、1d、2d、3d、5d 组比较 (vs groups of 3 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d), $F=17.284, P<0.05$; \star 与 3 h、12 h、1 d、3 d、5 d 组比较 (vs groups of 3 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d), $F=52.590, P<0.05$; \blacklozenge 与 IR 中 12 h、1 d、2 d 组比较 (vs groups of 12 h, 1 d, 2 d in IR), $F=56.569, P<0.05$

3 讨论

缺血再灌注脑损伤后脑组织内既出现坏死改变,又有凋亡的发生,这表明缺血性脑损伤的作用机制相当复杂。这种损伤不仅发生在脑组织缺血缺氧的当时,更主要的是发生在缺血后再灌注时,即迟发性神经元死亡。证据表明继发性神经细胞的死亡以凋亡为主,凋亡主要位于半暗带区,而坏死主要发生在缺血中心区。减少凋亡细胞的数量,抑制半暗带区向缺血中心区的发展是治疗缺血性脑血管病的关键。

NAIP 属于凋亡抑制蛋白因子家族中的一员,是第一个被发现的具有抗凋亡作用的蛋白质^[5]。应用 RT-PCR 技术在脑组织内只能检测到少量的 NAIP mRNA,而在原代培养的小脑颗粒细胞则检测不到 NAIP mRNA 的表达,这表明正常状态下 NAIP 的转录活动并不活跃,内源性 NAIP 不是中枢神经系统维持正常活动所必需的^[6]。从表 1 可以看出,各实验组与正常对照组、假手术组比较其差异均有统计学意义 ($P<0.05$),显示缺血再灌注导致脑组织内表达 NAIP 的细胞数量增加,证明 NAIP 表达的上调是脑组织对缺血再灌注损伤的一种保护性反应。实验对照组 (IR) 中 12 h 组与 3 h、1 d、2 d、3 d、5 d 组比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),显示该组中 NAIP 的阳性表达在 12h 达到高峰,随后逐渐下降,表明 NAIP 在受损脑组织中的表达具有一定的时间规律性。实验证实脑组织缺血半暗带区内有较多的 NAIP 阳性细胞,而梗死灶内只有少数 NAIP 阳性细胞散在分布,因此缺血半暗带区内 NAIP 表达的增加可以抑制受损神经细胞的凋亡,减轻脑损伤。NAIP 抑制神经细胞凋亡的机制可能与其降低 Caspase 酶的活性有关,但 NAIP 的结构与家族内的其他成员有很大的差别,其具体的调节机制尚需深入的研究^[7]。

人参皂苷单体的鉴定、分离和提取,为深入研究人参的疗效提供了有利的条件。人参皂苷 Rb1 是人参中主要的活性化合物。研究发现人参皂苷 Rb1 能有效地清除自由基,这被认为与人参皂苷 Rb1 可以显著减少 LDH 的释放量有关^[8]。尽管人参皂苷 Rb1 不是钙离子的拮抗剂,但是它可选择性地抑制由于高浓度谷氨酸和钾离子引起的钙超载,从而显著延长培养海马神经细胞的存活时间,降低其死亡率^[9]。人参皂苷 Rb1 可以增加小鼠海马 CA 3 区

细胞突触数目,促进神经系统的发育,提高神经系统的功能^[10]。还有研究表明,Rb1 由静脉内注入永久性大脑中动脉闭塞大鼠后,能减少脑梗塞体积,改善动物的位置导航残疾,其作用机理是抗凋亡和可能存在的促进血管再生的作用^[11]。众多证据表明人参皂苷 Rb1 对神经细胞存在确切的保护作用。表 1 中 IR/Rb1 组 12 h、1 d、2 d 时间点 NAIP 阳性细胞数比 IR 组多 ($P<0.05$),证实使用人参皂苷 Rb1 可以促进 NAIP 的表达。因此推测人参皂苷 Rb1 可能通过上调 NAIP 的表达来抑制受损神经细胞凋亡的发生,从而发挥其药效,但是目前无法确认人参皂苷 Rb1 调控 NAIP 表达的具体途径,其机制仍需进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 Li Z, Chen X, Niwa Y, et al. Involvement of Ca^{2+} activated K^{+} channels in ginsenosides - induced aortic relaxation in rats. *J Cardio-vasc Pharmacol*, 2001, 37(1): 41 ~ 47
- 2 王迪, 李晓东, 王化洲, 等. 绞股兰总皂苷对小鼠脑缺血的保护作用及对自由基生成的抑制作用. *中国现代应用药学*, 2002, 19(2): 101 ~ 102
- 3 Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, et al. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med*, 1997, 3(9): 997 ~ 1004
- 4 袁琼兰, 李瑞祥, 羊惠君, 等. 改良的短暂局灶性大鼠脑缺血模型. *四川解剖学杂志*, 1998, 6(2): 65 ~ 67
- 5 Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 1995, 80(1): 167 ~ 178
- 6 Simons M, Beinroth S, Gleichmann M, et al. Adenovirus - mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 1999, 72(1): 292 ~ 301
- 7 Chamailard M, Girardin SE, Viala J, et al. Nods, Nalps and Naip; intracellular regulators of bacterial - induced inflammation. *Cell Microbiol*, 2003, 5(9): 581 ~ 592
- 8 朱陵群, 范吉平, 黄敬福, 等. 人参皂苷 Rb1 对大鼠胎鼠海马神经细胞凋亡的影响. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(12): 1229 ~ 1231
- 9 刘民, 张均田. 人参皂甙 Rb1 和 Rg1 对原代培养大鼠海马神经细胞的保护作用. *药理学报*, 1995, 30(9): 674 ~ 678
- 10 杨迎, 张均田, 石成璋, 等. 人参皂甙 Rb1 和 Rg1 促智作用机制的探讨——对小鼠脑神经发育的影响. *药理学报*, 1994, 29(4): 241 ~ 245
- 11 Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, et al. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. *Br J Pharmacol*, 2006, 148(6): 860 ~ 8670

(收稿日期: 2007-03-21)