

[文章编号] 1007-3949(2007)15-09-0691-04

• 实验研究 •

连翘木脂素对小鼠脑缺血再灌注海马 CA1 区内皮素 3 表达的影响

涂秋云^{1,3}, 汤建萍², 周春山³, 刘 军⁴, 陈 茹¹, 雷立芳¹

(1. 中南大学湘雅三医院神经内科, 湖南省长沙市 410013; 2. 江西师范大学化学化工学院, 江西省南昌市 330022;

3. 中南大学化学化工学院新技术研究所, 湖南省长沙市 410083; 4. 中南大学湘雅二医院放射科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 神经病学; 连翘木脂素; 脑缺血再灌注; 海马; 内皮素 3; 小鼠

[摘要] 目的 观察连翘木脂素对小鼠脑缺血再灌注海马 CA1 区内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白表达的影响, 研究连翘木脂素对脑缺血损伤的神经保护作用及可能机制。方法 建立脑缺血再灌注小鼠模型, 48 只小鼠随机分为: 缺血再灌注组(分再灌注后 1 天、3 天、5 天和 10 天 4 个时间点)、连翘木脂素组和假手术组, 用免疫组织化学方法观察海马 CA1 区内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白表达的变化。结果 假手术组海马 CA1 区可见少量散在分布的内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白免疫阳性细胞, 缺血再灌注组各时间点阳性细胞数明显增多 ($P < 0.01$), 在 5 天时间内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白阳性细胞数达高峰, 连翘木脂素组 CA1 区内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白阳性细胞数比缺血再灌注组则明显减少。结论 内皮素 3 是脑缺血再灌注神经损伤过程中的一个致病因子, 星形胶质细胞激活参与了脑缺血再灌注损伤的病理过程, 连翘木脂素可能通过清除脑缺血再灌注时产生的氧自由基, 减少海马内皮素 3 的表达和胶质细胞激活, 对脑缺血再灌注损伤发挥神经保护作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Effect of Ligan Compounds in Fructus Forsythiae on Expression of Endothelin-3 in Hippocampal CA1 of Mice with Cerebral Ischemia/ Reperfusion

TU Qiu Yun^{1,3}, TANG Jian Ping², ZHOU Chun Shan³, LIU Jun⁴, CHEN Ru¹, and LEI Li Fang¹

(1. Neurology Department of 3rd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083; 4. Radiology Department of 2nd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Ligan Compounds in Fructus Forsythiae; Ischemia/ Reperfusion; Hippocampus; Endothelin-3; Mice

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of Ligan compounds in Fructus Forsythiae on ischemia/ reperfusion (IR) rats models and the expression of endothelin-3 (ET-3) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the models' hippocampus CA1 area, and to study the neurons' protection of Ligan compounds in Fructus Forsythiae and its value of treatment on ischemia/ reperfusion impairment. **Methods** Forty-eight adult male mice were randomly divided into three groups: Ischemia/ reperfusion group ($n = 24$), the mice were subdivided into 1 day, 3 days, 5 days and 10 days (1 d, 3 d, 5 d and 10 d) subgroups according to reperfusion time after 7 minutes bilateral common carotid artery (BCCA) occlusion; ④Ligan compounds in Fructus Forsythiae treatment group, the mice were given Ligan compounds in Fructus Forsythiae pre-operation and post-operation ($n = 18$); ⑤Sham-operated group ($n = 6$) which was control group, only was exposed their BCCA, but not given 7 minutes BCCA occlusion. The expression of ET-3 immunoactivity were detected in the rats' hippocampus CA1 area by immuno-histochemistry. **Results** The number of ET-3 and GFAP immune positive cells in ischemia/ reperfusion models' hippocampus CA1 area was increased compared with sham group ($P < 0.01$), the peak time was the fifth day. While the number of ET-3 and GFAP immune positive cells in Ligan compounds in Fructus Forsythiae treatment group models' hippocampus CA1 area was decreased obviously compared with ischemia/ reperfusion group. **Conclusion** The expressions of ET-3 and GFAP were up-regulated after IR, ET-3 is perhaps a destroying factor during reperfusion, astrocytic activation participated in the pathological process, while Ligan compounds can inhibit the process by getting rid of free radicals and exert the brain protection.

连翘(Forsythia Suspense Thunb)是木犀科连翘属植物,有清热解毒和消肿散结之功效,连翘木脂素

是连翘叶的提取物,主要成分为连翘酯甙等,存在于连翘叶和连翘果实中,药理实验表明连翘叶有较好的抗氧化作用^[1]。氧自由基性质活泼,参与多种疾病的病理生理过程,与脑缺血损伤和衰老等均有密切关系,研究表明连翘叶提取物是一种较强的自由基清除剂和抗氧化剂^[2]。内皮素(endothelin, ET)是

[收稿日期] 2007-07-06 [修回日期] 2007-09-01

[作者简介] 涂秋云,博士研究生,副教授,研究方向为脑血管病及天然药物的提取分离, E-mail 为 qiuyuntu@126.com。汤建萍,博士研究生,副教授,研究方向为天然药物的提取分离。周春山,教授,博士研究生导师,研究方向为天然药物的提取分离。

缺血性脑损伤过程中的一个致病因子, 缺血导致内皮素增加并作用于星形胶质细胞受体, 诱导星形胶质细胞释放谷氨酸加重神经元损伤^[3]。大鼠脑缺血可引起海马 CA1 区神经元内皮素表达增高, 并导致神经元死亡^[4]。实验表明内皮素的升高与自由基的大量生成有密切相关性^[5]。为深入了解连翘酯甙的药理作用和价值, 我们观察连翘木脂素对小鼠脑缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, IR) 损伤的保护作用以及对海马内皮素 3 表达的影响, 探讨连翘木脂素清除自由基、抗氧化和可能的神经保护作用, 以便进一步开发其药物价值。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年雄性昆明小鼠 48 只, 体重 30 ± 5 g, 由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供。随机分为三组: 缺血再灌注组 (24 只), 双侧颈总动脉结扎 7 min, 并分再灌注后 1 天、3 天、5 天和 10 天组 (每个时间点 6 只); ④连翘木脂素组 (分高、中、低三个剂量组, 每个剂量组 6 只); ④假手术组 (6 只)。

1.2 主要试剂和仪器

AO 恒低温切片机 (美国产 976C 型); T-90 图象分析仪软件 (上海医科大学); 兔抗内皮素 3 多克隆抗体和兔抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 多克隆抗体 (日本德岛大学); 羊抗兔 IgG 和 ABC 试剂盒 (Vector 公司 Elite 试剂盒)。连翘木脂素为连翘叶提取物, 由中南大学化学化工学院新技术研究所制备提供。

1.3 动物模型制备及给药方法

1.3.1 脑缺血再灌注模型制备 参照文献[6], 将小鼠以 2% 戊巴比妥钠 (0.02 mL/g 体重) 腹腔注射麻醉后, 仰卧固定于手术台上, 颈前正中切口, 钝性分离双侧颈总动脉, 微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 7 min 后再灌注 (1 天、3 天、5 天和 10 天), 切口内洒青霉素粉预防性抗炎, 缝合切口, 保温至清醒。假手术组进行与上述缺血再灌注组同样手术步骤, 但不夹闭双侧颈总动脉, 术后第 2 天处死。

1.3.2 连翘木脂素治疗小鼠脑缺血再灌注损伤给药方法 参照其他文献, 连翘木脂素小鼠灌胃用量分别选用 150 mg/(kg·d)、100 mg/(kg·d) 和 50 mg/(kg·d) 为高、中、低剂量, 确定连翘木脂素的用量后用生理盐水溶解, 生理盐水用量按每 100 g 小鼠体重 1 mL 给予。连翘木脂素治疗组的小鼠, 在进行脑缺血再灌注手术前, 每天给小鼠灌胃药物, 连续 7

天, 脑缺血再灌注造模手术成功后, 再每天同样连续灌胃直至第 5 天处死 (预试验表明缺血再灌注组在第 5 天时海马的细胞改变最明显)。

1.4 动物神经症状观察^[7]

模型制备成功开始即观察小鼠的肢体活动、意识和呼吸等一般情况。0 级为小鼠肢体活动无明显障碍; iv 级为提起鼠尾使鼠头呈下垂位见一侧前肢下垂; ㊟级为小鼠行走出现追尾现象; ㊟级为小鼠肢体瘫痪不能行走或出现意识障碍。

1.5 灌注固定及取材方法

2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (按每 50 g 体重 0.2 mL), 开胸暴露心脏, 经左心室插管进入升主动脉, 快速灌注生理盐水, 无血液流出后, 灌注 4% 多聚甲醛 (100~150 mL, 先快后慢), 完毕后开颅取材, 所取标本置于 4℃ 的多聚甲醛中固定 2~4 h, 随后移入 15% 蔗糖溶液中, 于 4℃ 冰箱内存放至标本沉底, 再移入 30% 蔗糖溶液至沉底, 于 AO 恒低温切片机-18℃ 连续冠状冷冻切片, 选取海马与齿状回互包平面, 切片厚度为 30 μ m。

1.6 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学 ABC 法, 选取海马与齿状回互包平面切片, 采用漂浮法反应, 每只实验动物各取 4 张切片, 0.1 mol/L 的 PB 液接片, 洗 3×5 min, 0.3% Triton X 处理 30 min, PB 洗 3×5 min, 5% 小牛血清白蛋白 (5% BSA) 封闭 20 min 后, 加兔多克隆一抗内皮素 3 (1:150) 或 GFAP (1:1000), 4℃ 孵育 24 h, PB 洗 3×10 min, 5% BSA 10 min, 加生物素化二抗羊抗兔 IgG (1:200), 室温下孵育 3 h, PB 洗 3×5 min, 继之以 0.3% H₂O₂ 处理 15 min, PB 洗 10 min, 加入 HRP 标记的 ABC 液 (1:250), 孵育 1 h, PB 洗 3×5 min, 加 0.05% DAB (含 0.01% H₂O₂) 反应成色。各抗体均用 0.1 mol/L、pH7.4 的 PB 液稀释, 贴片, 常规脱水透明封片, 以 PB 代替一抗作空白对照, 结果均为阴性。此法显示神经元为橙黄色, 胞体、神经纤维及纤维终末均可染色。

1.7 数据收集处理

于 Polyvar 光学显微镜下观察细胞并照相。OlympusBH2 显微镜下细胞计数, 每一脑组织块取 3 张代表切片, 计数海马 CA1 区内皮素 3 阳性细胞数; GFAP 阳性细胞计数采取每张切片取海马 CA1 区 4 个部位, 每处 0.25 mm², 共 1 mm²。染色深度达到足以区分细胞周界者被计数。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。同组各存活时间点及同时间各组间的均数比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 作为判断差异显著性标准。

2 结果

2.1 动物神经症状观察

假手术组小鼠肢体功能评分均为 0 级; 缺血再灌注组小鼠肢体功能 iv~ ④级; 连翘木脂素组小鼠肢体功能 iv~ ③级。

2.2 各组内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白的表达

假手术组, 海马 CA1、CA2 和 CA3 区均有内皮素 3 和 GFAP 免疫阳性细胞分布, 以 CA1 区相对较多。镜下可见少量内皮素 3 阳性细胞散在分布于 CA1 区的锥体层和非锥体层细胞, 而 GFAP 阳性细胞较多, 主要分布在多形层和分子层, 免疫阳性产物均定位于胞质和突起(图 1)。

与假手术组比较, 缺血再灌注组各时间点, 海马

CA1 区锥体细胞层及非锥体细胞层内皮素 3 免疫阳性细胞数明显增加, 以第 5 天最高, 达高峰; GFAP 阳性细胞也明显增多, 细胞增生、肥大, 突起增多, 也于第 5 天达高峰(表 1 和图 1)。

与缺血再灌注组各时间点相比, 连翘木脂素组海马 CA1 区锥体细胞层及非锥体细胞层内皮素 3 免疫阳性细胞数有明显减少, GFAP 阳性细胞形态趋向正常, 增生、肥大现象消失。与假手术组比较, 连翘木脂素组海马 CA1 区锥体细胞层及非锥体细胞层内皮素 3 免疫阳性细胞数和 GFAP 阳性细胞无显著差异, 形态类似, 三个剂量组之间未显示明显差异(表 1 和图 1)。

表 1. 各组小鼠海马 CA1 区内皮素 3 和胶质纤维酸性蛋白免疫阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

参 数	假手术组	缺血再灌注组				连翘木脂素组		
		1 天	3 天	5 天	10 天	低剂量组	中剂量组	高剂量组
内皮素 3	28.06 ± 6.26	53.33 ± 11.04 ^a	75.64 ± 7.27 ^{ab}	82.55 ± 10.18 ^{ab}	68.29 ± 6.24 ^{ab}	38.63 ± 8.23 ^c	42.46 ± 10.21 ^c	38.48 ± 8.75 ^c
GFAP	176.24 ± 12.42	512.70 ± 11.31 ^a	648.17 ± 13.23 ^{ab}	705.82 ± 22.80 ^{ab}	520.06 ± 51.92 ^a	237.26 ± 10.12 ^c	230.21 ± 13.15 ^c	216.34 ± 10.82 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比; b 为 $P < 0.05$, 与同组第 1 天比; c 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组各时间点比。

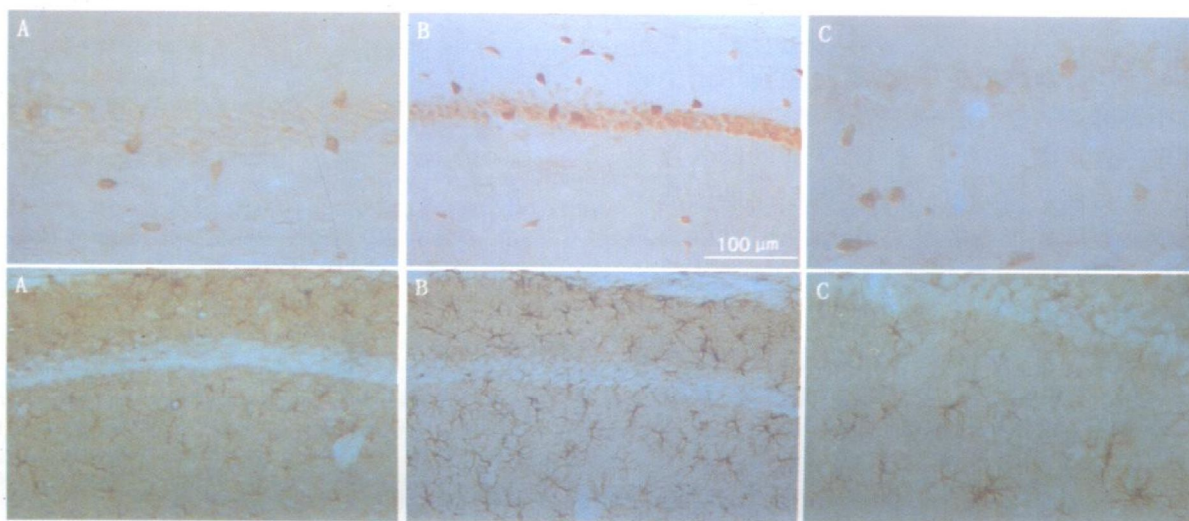


图 1. 海马 CA1 区内皮素 3(上)和胶质纤维酸性蛋白(下)免疫阳性神经元 ($\times 200$) A 为假手术组, B 为缺血再灌注组, C 为连翘木脂素组。

3 讨论

内皮素是一种含 21 个氨基酸的多肽, 有三种同分异构体即内皮素 1、内皮素 2 和内皮素 3, 内皮素具有强烈血管收缩效应, 在体内起神经调节因子或局部激素作用^[4], 中枢神经系统中广泛表达内皮素及其受体, 其中神经元主要表达内皮素 3, 星形胶质细胞主要表达内皮素受体, 星形胶质细胞是内皮素

的靶细胞, 内皮素升高可激活星形胶质细胞, 后者在病理条件下可促进神经元的溃变^[8], 因此内皮素参与脑损伤的病理过程, 阻断内皮素的作用可能有效减轻神经元的病理损伤。研究表明脑缺血损伤过程中内皮素 3 是一个致病因子, 缺血可导致内皮素增加并作用于内皮素受体, 诱导星形胶质细胞释放谷氨酸加重神经元退行性病变^[3], 大鼠脑缺血可引起

海马 CA1 区神经元内皮素表达增高, 并导致神经元死亡^[4]。

本文研究表明, 脑缺血再灌注组小鼠海马 CA1 区神经细胞内皮素 3 表达明显上调, GFAP 免疫阳性细胞显著增多, 在第 5 天时内皮素 3 和 GFAP 阳性细胞数达高峰, 而连翘木脂素治疗组 CA1 区内皮素 3 和 GFAP 阳性细胞数比脑缺血再灌注组明显减少, 表明内皮素 3 和星形胶质细胞激活参与了脑缺血再灌注损伤的病理过程。目前认为内皮素通过作用于星形胶质细胞上的受体, 调节星形胶质细胞的活性, 引起星形胶质细胞释放谷氨酸增多, 导致神经元溃变死亡^[3]。

关于脑缺血损伤过程中内皮素 3 表达的上调是如何启动发生的, 有研究表明, 在缺血再灌注的初期 (1 h) 自由基即明显升高, 而内皮素则在初期升高不明显, 6 h 后才开始升高^[5], 提示内皮素的升高继发于自由基的大量生成。氧自由基可通过促进内皮素的 mRNA 或内皮素基因表达, 使内皮素的合成或释放增加^[9], 而内皮素的升高又可引起氧自由基显著增加。淀粉样蛋白通过诱导氧自由基生成释放, 引起内皮细胞损害, 导致内皮素的释放^[10]。

氧自由基性质活泼, 可损伤蛋白质、脂质和核酸等, 尤以 $\cdot\text{OH}$ 对细胞危害最大, 可直接作用于生物膜上的不饱和脂肪酸, 损伤生物膜, 与多种疾病的发生和病理生理现象, 如衰老、肿瘤、炎症和脑缺血有密切关系。目前认为, 氧自由基及其引起的脂质过氧化是缺血再灌注损伤的重要机制之一, 在缺血再灌注损伤时, 体内氧化系统被激活, 氧自由基大量生成, 引发脂质过氧化反应, 自由基可广泛攻击富含不饱和脂肪酸的神经膜与血管, 引发脂质过氧化瀑布效应, 蛋白质变性失活, 膜屏障功能严重受损, 从而导致细胞死亡。因此, 自由基在激发缺血性损伤所致的迟发性神经元死亡中起关键作用。

连翘是木犀科连翘属植物, 别名为连壳、黄花条和黄链条花, 主要分布于我国华北、东北及西北地区, 是传统的中草药, 有清热解毒和消肿散结之功效, 主治温热、丹毒、斑疹和痈肿等症, 常见的以连翘为原料的中成药制剂有银翘解毒片、双黄连注射液和抗病毒口服液等等。连翘木脂素是连翘叶的提取物, 其有效活性成分连翘酯甙等, 在连翘叶和连翘果实中含量丰富, 以连翘叶里的含量尤其高, 可以达到 5%, 它与公认的天然抗氧化剂绿原酸同属咖

啡酸衍生物, 活性部位相同, 与大量使用的天然抗氧化剂迷迭香酸在结构上非常相似^[11]。

最近的药理研究表明连翘叶有较好的抗氧化作用^[1], 体内实验表明连翘酯甙能降低营养性高脂血症小鼠的血浆总胆固醇、总甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇等, 降低高脂血症动物的动脉粥样硬化指数, 具有较好的降血脂作用和抗氧化作用^[12], 连翘叶提取物对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^- \cdot$) 和羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 有明显的清除作用, 是一种较强的自由基清除剂和抗氧化剂^[2]。本文研究发现, 连翘木脂素治疗组小鼠海马 CA1 区内皮素 3 和 GFAP 阳性细胞数比缺血再灌注组明显减少, 说明连翘木脂素能降低脑缺血再灌注海马区内皮素的表达, 减轻脑缺血再灌注所致的神经损伤。我们推测, 连翘木脂素的主要成分连翘酯甙作为一种较强的自由基清除剂和抗氧化剂, 可能通过清除脑缺血再灌注时所产生的大量氧自由基, 而减少内皮素 3 的表达、星形胶质细胞的激活和谷氨酸的释放以及迟发性神经元死亡, 减轻脑缺血再灌注的神经损伤。因此, 作为一种植物提取物, 连翘木脂素在减轻缺血再灌注损伤和治疗脑缺血方面, 具有较好的应用前景和开发价值。

[参考文献]

- [1] 朱淑云, 杨建雄, 李发荣. 连翘叶提取物对小鼠氧化损伤的作用[J]. 中药药理与临床, 2004, 20 (1): 18-20.
- [2] 耿慧君, 王文科, 毕润成. 连翘叶的体外抗氧化活性研究[J]. 山西师范大学学报(自然科学版), 2005, 19 (4): 71-73.
- [3] Sasaki Y, Takimoto M, Oda K. Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes [J]. J Neurochem, 1997, 68 (5): 2 194-200.
- [4] Gajkowska B. Endothelin-like immunoreactivity in hippocampus following transient global cerebral ischemia: neuronal and glial cells (I) [J]. Folia Neuropathol, 1997, 35 (1): 36-48.
- [5] 蔡英敏, 薛荣亮, 李伟, 宋金鑫. 全脑缺血再灌注对大鼠氧自由基和内皮素的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8 (4): 656-657.
- [6] 张志君, 马志健, 刘正清, 蔡维君, 文晓丹. 卵巢切除后脑缺血再灌注海马 CA1 区 ET3 和 GFAP 的表达[J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19 (2): 156-160.
- [7] 周成业, 黄如训. 葡萄糖及胰岛素对高血压大鼠脑梗塞的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1997, 23 (1): 4-6.
- [8] Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Endothelin converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species and these messenger RNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury [J]. Neuroscience, 2000, 101 (2): 441-449.
- [9] 陈元方. 胃肠肽类激素基础与临床[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997; 422.
- [10] 薛寿儒, Zeinab Khalil. β -淀粉样蛋白(A β 32-35)的血管活性及其机制探讨[J]. 中风与神经疾病杂志, 2001, 18 (6): 335-337.
- [11] 李发荣, 段飞, 杨建雄. 中药连翘及连翘叶中连翘苷含量的比较研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24 (4): 725-727.
- [12] 赵咏梅, 李发荣, 杨建雄, 梁俊, 张利顺. 连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (2): 157-159.

(此文编辑 胡必利, 许雪梅)