

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-04-0278-03

海风藤提取物对脑缺血再灌注模型大鼠神经细胞凋亡和线粒体膜电位变化的干预作用

姚 博, 冯建利, 阎 鹏, 滕继军, 杜怡峰

(山东大学附属省立医院神经内科, 山东省济南市 250001)

[关键词] 神经病学; 线粒体膜电位; 海风藤提取物; 脑缺血; 细胞凋亡; 流式细胞术

[摘要] 目的 观察脑缺血再灌注 2 h 后大鼠神经细胞凋亡和线粒体膜电位的变化及海风藤提取物的干预作用。方法 应用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型, 流式细胞术分别观察假手术组、模型组、二甲基亚砜组和海风藤组缺血灶周神经细胞凋亡和线粒体膜电位的变化。结果 与模型组神经细胞凋亡率(72.7% ± 6.5%)和线粒体膜电位(0.117 ± 0.011)比较, 海风藤组神经细胞凋亡率(47.0% ± 3.8%)明显下降($P < 0.01$), 线粒体膜电位(0.182 ± 0.023)明显升高($P < 0.01$); 而假手术组神经细胞凋亡率(5.8% ± 1.8%)和线粒体膜电位(0.331 ± 0.016)与模型组比较差异均有显著性($P < 0.01$)。结论 海风藤可以减轻脑缺血再灌注后早期神经细胞凋亡, 并对线粒体膜电位有稳定作用, 可以保护缺血脑组织。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Detection of the Apoptosis and Mitochondrial Membrane Potential of Nerve Cell After Cerebral Ischemia-Reperfusion and Intervention of Extraction from Piper Kadsura Ohwi

YAO Bo, FENG JianLi, YAN Peng, TENG JiJun, and DU YiFeng

(Department of Neurology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China)

[KEY WORDS] Mitochondrial Membrane Potential; Extraction from Piper Kadsura Ohwi; Cerebral Ischemia; Cell Apoptosis; Flow Cytometry

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the apoptosis and mitochondrial membrane potential (MMP) of nerve cell after cerebral ischemia-reperfusion for 2 hours and intervention of extraction from Piper Kadsura Ohwi. **Methods** The models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion were set up. The apoptosis and MMP of nerve cell were detected among sham operated group, ischemic group, DMSO-treated (dimethyl sulfoxide) group and extraction from Piper Kadsura Ohwi-treated group in the cerebral tissue around infarction 2 hours after ischemia-reperfusion separately through flow cytometry. **Results** 2 hours after ischemia-reperfusion, the apoptosis rate of nerve cell of Piper Kadsura Ohwi-treated group (47.0% ± 3.8%) decreased obviously accompanied with obvious increase of MMP (0.182 ± 0.023) compared with ischemic group ($P < 0.01$). The apoptosis rate of nerve cell (5.8% ± 1.8%) and MMP (0.331 ± 0.016) of sham operated group were different from those of ischemic group. **Conclusion** Extraction from Piper Kadsura Ohwi plays a significant role in protecting cerebral tissue through decreasing the apoptosis and stopping decrease of MMP of nerve cell caused by ischemia-reperfusion.

现代生物学技术对海风藤成分分析发现, 其提取物中所含海风藤酮能明显抑制缺血再灌注期脑组织磷脂酶 A2 和自由基的生成, 减少大鼠脑缺血半暗带区神经细胞 DNA 的损伤^[1,2]。而缺血再灌注可能是诱导凋亡的重要因素之一^[3]。凋亡过程中发生一系列生物学和形态学的变化, 有多种方法可以检测凋亡变化, 如 DNA 片断电泳分析、TUNEL 标记 DNA 断裂和流式细胞仪分析等。本实验应用 Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 双标记流

式细胞术检测早期细胞凋亡^[4,7]; 并应用线粒体膜电位检测技术检测缺血再灌注后神经细胞的线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 的变化及海风藤提取物对两者的干预作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自晶美生物有限公司, JC-1 试剂盒购自南京凯基生物抗美科技发展有限公司, 流式细胞仪(Beckman Coulter Epics XL-4)。

1.2 海风藤注射液的制备

将海风藤干燥藤茎(购自济南市建联药店, 批号

[收稿日期] 2007-11-19 [修回日期] 2008-03-28

[基金项目] 山东省卫生厅科技发展项目(2001CA1CBB1)

[作者简介] 姚博, 硕士研究生, E-mail 为 yaobo2008happy@163.com。

通讯作者杜怡峰, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 联系电话为 13583118172。

20051205,产地福建)加工成粗粉重 2 100 g,加 95% 的乙醇浸泡过夜(粗粉与乙醇之比为 1:10),超声提取 40 min 后过滤,药渣再加乙醇浸泡(1:7)过夜,再继续超声提取 40 min,过滤,重复上述步骤两次,合并三次乙醇提取液置 BUCHI 旋转蒸发器(瑞士)中减压浓缩成棕色膏状物,带有明显的胡椒属芳香味,总回收率约为 30:1,最后将浸膏与二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)混合,溶解,制成浓度为 10% 的海风藤注射液^[2]。

1.3 实验动物分组

普通级健康雄性 Wistar 大鼠 20 只(体重 240~280 g),购于山东中医药大学。随机分为假手术组、模型组、二甲基亚砜组和海风藤组。其中海风藤组于缺血前后 12 h 各注射海风藤注射液一次,每次每 100 g 体重注射 1 mL,二甲基亚砜组注射剂量及方法同上^[2]。每组为 5 只大鼠。

1.4 模型复制

大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型的建立应用改良的 Longa^[8]法。10%的水合氯醛腹腔注射麻醉动物(300 mg/kg),颈部正中切口,结扎左侧颈外动脉远端,热凝其分支,颈总动脉及颈内动脉放置动脉夹,断开颈外动脉后插入远端涂有硅胶直径约为 0.203 mm 的强力渔线,深度为距颈总动脉分叉处 18±0.5 mm,缝合皮肤。90 min 后,拉渔线至颈外动脉残端。假手术组强力渔线仅插入 9 mm,使其不致阻塞,其余步骤同模型组。动物麻醉清醒后,参照 Longa 5 分法^[8]进行神经功能评价:0 分为无神经损伤体征;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为向对侧转圈;3 分为向对侧倾斜;4 分为不能自发行走,意识丧失。动物麻醉清醒后,评分在 2~3 分者纳入实验研究。

1.5 凋亡的检测

大鼠再灌注 2 h 后断头取脑,取缺血灶周围脑组织,置于盛有冰盐水的小号培养皿中,用二张洁净的载玻片轻轻研磨成均浆状,经 300 目网筛过滤后即成单细胞悬液,用冰预冷的 PBS 液冲洗 2 次。加入 250 μL 结合缓冲液悬浮细胞,调其浓度为 1×10⁹/L,然后吸取 100 μL 细胞悬液加入 5 μL Annexin-V-FITC 和 10 μL PI,避光孵育 15 min 后,在反应管中加 400 μL PBS 上流式细胞仪。用 System ④V3.0 软件,获取 10⁴ 个细胞并分析。

1.6 线粒体膜电位的检测

单细胞悬液制作同上,然后用冰预冷的 PBS 液冲洗 2 次。将冲洗好的细胞加入到 500 μL 配制好的 JC-1 工作液中,37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 15~

20 min;然后于室温下 2 000 r/min 离心 5 min,用 1×Incubation Buffer 洗两次后,再用 1×Incubation Buffer 重新悬浮细胞,调其浓度为 1×10⁹/L,再上流式细胞仪。用 System ④V3.0 软件,获取 10⁴ 个细胞并分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 行 ANOVA 分析处理,两两之间经 LSD 行显著性检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 神经细胞凋亡检测结果

与假手术组相比,模型组神经细胞凋亡明显升高($P < 0.01$);二甲基亚砜组神经细胞凋亡率与模型组相比无统计学差异,而海风藤组凋亡率比模型组明显降低($P < 0.01$,表 1 和图 1)。

表 1. 各组间神经细胞凋亡率比较

组别	凋亡率
假手术组	5.8% ± 1.8%
模型组	72.7% ± 6.5% ^a
二甲基亚砜组	65.6% ± 6.5% ^a
海风藤组	47.0% ± 3.8% ^b

a 为 $P < 0.01$,与假手术组相比; b 为 $P < 0.01$,与模型组相比。

2.2 线粒体膜电位检测结果

与假手术组相比,模型组线粒体膜电位下降($P < 0.01$);与模型组相比,二甲基亚砜组的线粒体膜电位差异无统计学意义,而海风藤组明显升高($P < 0.01$,表 2 和图 2)。

表 2. 各组间线粒体膜电位的比较

组别	荧光强度
假手术组	0.331 ± 0.016
模型组	0.117 ± 0.011 ^a
二甲基亚砜组	0.130 ± 0.007 ^a
海风藤组	0.182 ± 0.023 ^b

a 为 $P < 0.01$,与假手术组相比; b 为 $P < 0.01$,与模型组相比。

3 讨论

正常细胞中磷脂酰丝氨酸仅存在于细胞膜内表面,在细胞凋亡过程的早期阶段,磷脂酰丝氨酸发生不可逆的外翻,暴露于细胞膜外表面,预连荧光素 FITC 的 Annexin-V 蛋白能与磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合,从而检测到磷脂酰丝氨酸的变化,成为

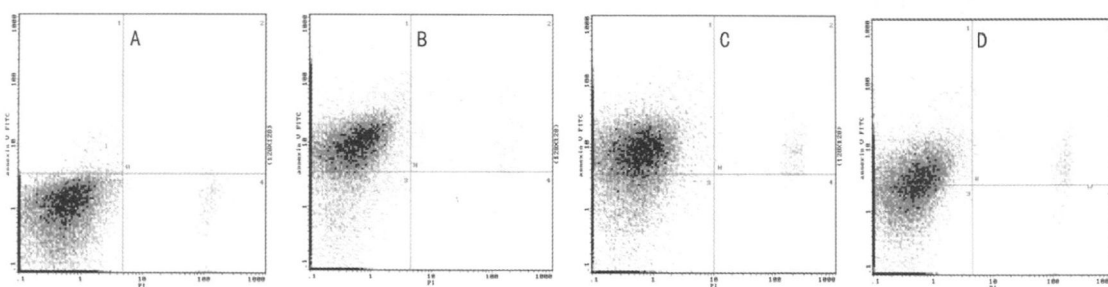


图 1. 神经细胞凋亡图 A 为假手术组, B 为模型组, C 为二甲亚砜组, D 为海风藤组。

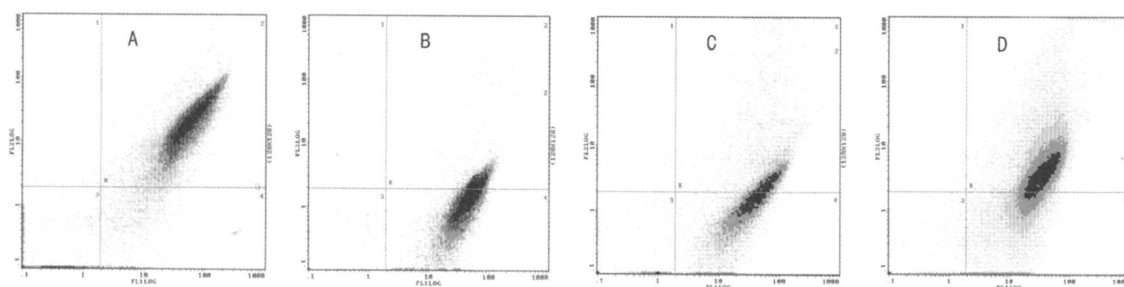


图 2. 线粒体膜电位图 A 为假手术组, B 为模型组, C 为二甲亚砜组, D 为海风藤组。

细胞凋亡的早期检测指标。同时, 凋亡的细胞膜是完整的, 所以对 PI 拒染。因此, PI 阴性且 Annexin V 阳性的细胞为早期的凋亡细胞。此实验采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞技术检测脑缺血再灌注模型大鼠神经细胞凋亡信号, 结果发现模型组细胞凋亡率高达 72.7%, 明显高于假手术组, 而海风藤提取物可使细胞凋亡率明显降低。提示脑缺血再灌注大鼠缺血灶周神经细胞凋亡增加, 这可能是脑缺血再灌注损伤的一个重要环节, 而海风藤提取物可部分地抑制这一病理过程的发生, 从而发挥其神经保护作用。

此外细胞凋亡除了细胞膜的变化外, 细胞质中的变化(主要表现为细胞器改变)也是细胞凋亡病理改变的重要组成部分, 其中以线粒体膜电位变化尤为明显。线粒体膜电位是由于细胞膜两侧离子分布的不对称而产生的, 细胞凋亡过程中常伴有电位下降, 导致线粒体膜通透性的转变从而启动细胞凋亡程序^[9]。JC-1 是一种指示线粒体功能的正电荷荧光探针, 其荧光强度与线粒体膜电位相关; 该实验通过定量测量 JC-1 的荧光强度(反映线粒体膜电位的高低)观察脑缺血再灌注模型大鼠缺血灶周神经细胞线粒体膜电位的变化, 结果发现模型组 JC-1 荧光强

度比值较假手术组明显降低, 而在使用海风藤之后比值升高。这一结果提示脑缺血再灌注模型大鼠缺血灶周的神经细胞存在线粒体膜电位的异常, 这可能是脑缺血再灌注损伤过程中神经细胞凋亡的始动环节之一, 海风藤则可能通过维持线粒体膜电位而减少缺血神经细胞的凋亡。但更深入的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王伟, 董为伟. 海风藤对缺血鼠脑磷脂酶 A2、三磷酸肌醇及自由基形成的影响[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 325-328.
- [2] 郭瑞友, 于义英, 方思羽, 等. 海风藤对局灶性脑缺血治疗作用的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(8): 461-463.
- [3] 方芳, 方云祥. 缺血耐受的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(2): 158-160.
- [4] Watson AJ. Apoptosis and colorectal cancer [J]. Gut, 2004, 53(11): 1701-709.
- [5] White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy [J]. Methods Mol Biol, 2004, 285: 105-111.
- [6] Clarke RG, Lund EK, Johnson IT, et al. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content [J]. Cytometry, 2000, 39(2): 141-150.
- [7] Lawry J. Detection of apoptosis by the TUNEL assay [J]. Methods Mol Med, 2004, 88: 184-190.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.

(此文编辑 陈临溪, 许雪梅)