

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-08-0774-07

## 丁苯酞对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 CA<sub>1</sub> 区神经细胞凋亡、SIRT1 及 PGC-1 $\alpha$ 表达的影响

赵秀芹<sup>1</sup>, 毛文静<sup>1</sup>, 李世英<sup>1</sup>, 张晋霞<sup>1</sup>, 贺永贵<sup>1</sup>, 余红<sup>2</sup>, 刘斌<sup>1</sup>

(1.华北理工大学附属医院神经内科, 2.华北理工大学基础医学院, 河北省唐山市 063000)

[关键词] 丁苯酞; 缺血再灌注; 神经细胞凋亡; 沉默信息调节因子 2 相关酶 1; 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  共激活因子 1 $\alpha$

[摘要] **目的** 观察丁苯酞(NBP)注射液对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区神经细胞凋亡、沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)及过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  共激活因子 1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )表达的影响,探讨 NBP 的脑保护机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 160 只,随机分为假手术组、脑缺血组、NBP 高剂量后处理组(高剂量组)、NBP 中剂量后处理组(中剂量组)、NBP 低剂量后处理组(低剂量组),采用改良的 Zea Longa 线栓法制作局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,后四组大鼠分为缺血 2 h 再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 5 个时间点,应用 TUNEL 法检测神经细胞凋亡;免疫组织化学染色法和实时荧光定量 PCR 检测 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  的表达。**结果** 与脑缺血组比较,NBP 后处理组各时间点凋亡细胞数减少,SIRT1、PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数增多( $P<0.05$ )。与低、中剂量组比较,高剂量组凋亡细胞数显著减少,SIRT1、PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数显著增多( $P<0.05$ );与低剂量组比较,中剂量组 SIRT1 阳性细胞数除再灌注 6 h 外,其余时间点均增高( $P<0.05$ ),PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数除再灌注 6 h、72 h 外,其余时间点均增高( $P<0.05$ )。与脑缺血组比较,高剂量组各时间点 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达增多( $P<0.05$ )。**结论** NBP 抑制细胞凋亡,减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,发挥脑保护作用,其机制可能与上调 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Butylphthalide on the Expression of the Neuronal Apoptosis, SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ in Hippocampus CA<sub>1</sub> of Rats with Focal Cerebral Ischemia-reperfusion

ZHAO Xiu-Qin<sup>1</sup>, MAO Wen-Jing<sup>1</sup>, LI Shi-Ying<sup>1</sup>, ZHANG Jin-Xia<sup>1</sup>, HE Yong-Gui<sup>1</sup>, YU Hong<sup>2</sup>, and LIU Bin<sup>1</sup>

(1.Department of Neurology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, 2.Basic Medical College of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

[KEY WORDS] Butylphthalide; Ischemia-reperfusion; Neuronal Apoptosis; Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog 1; Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of butylphthalide (NBP) injection on the expression of the neuronal apoptosis, SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion, then explore the mechanisms of neuroprotection from NBP. **Methods** 160 male SD rats were randomly divided into sham group, middle cerebral artery occlusion group (MCAO group), high dose NBP post-treatment group (high dose group), middle dose NBP post-treatment group (middle dose group) and low dose NBP post-treatment group (low dose group). Focal cerebral ischemia reperfusion model was established with the improved Zea Longa method. The later four groups were further divided into 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h point after model. TUNEL staining was used to observe the expression of neuronal apoptosis. Immunohistochemistry and quantitative real-time PCR were used to observe the expression of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . **Results** Compared with MCAO group, the number of apoptotic cells were significantly decreased and the number of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  positive cells were significantly increased in NBP post-treatment group at each time point ( $P<0.05$ ).

[收稿日期] 2015-10-08

[修回日期] 2015-12-05

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20130382)

[作者简介] 赵秀芹,硕士研究生,主要研究方向为缺血性脑血管病。毛文静,主治医师,硕士研究生,主要研究方向为脑血管病与神经免疫。通讯作者李世英,硕士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为脑血管病与神经免疫,E-mail 为 lishiying19701970@163.com。

Compared with low dose and middle dose group, the number of apoptotic cells were significantly decreased and the number of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  positive cells were significantly increased in high dose group ( $P<0.05$ ). Compared with low dose group, the number of SIRT1 positive cells were significantly increased except for 6 h and the number of PGC-1 $\alpha$  positive cells were significantly increased except for 6 h and 72 h in middle dose group at related point ( $P<0.05$ ). Compared with MCAO group, the expression of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  mRNA were significantly increased in high dose group at each time point ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The findings demonstrate that NBP can inhibit cell apoptosis and relieve the brain damage of focal cerebral ischemia reperfusion in rats, which may significantly associate with the up-regulating of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ .

在脑缺血再灌注损伤过程中,细胞凋亡起着关键性作用,有效抑制细胞凋亡,可以减轻缺血再灌注损伤。近年来,沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 和过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  共激活因子 1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 作为神经系统的保护因子引起广泛关注,目前研究认为,上调 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的表达可以增强脑保护作用。丁苯酞 (butylphthalide, NBP) 注射液是一种新型抗脑缺血药,可通过多个环节阻断缺血再灌注损伤,发挥脑保护作用<sup>[1-5]</sup>。本研究通过观察 NBP 对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区神经细胞凋亡、SIRT1 及 PGC-1 $\alpha$  表达的影响,探讨 NBP 的脑保护作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

NBP 注射液(石药集团恩必普药业有限公司); SIRT1、PGC-1 $\alpha$  兔抗大鼠多克隆抗体(Affinity 公司);兔免疫组织化学试剂盒(pv-6001)、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);TUNEL 试剂盒(罗氏公司);引物(上海生物工程有限公司);逆转录试剂盒、RNAiso Plus(TaKaRa 公司);石蜡切片机、光学显微镜(日本 Olympus 公司);高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司);荧光定量 PCR 仪(Rotor-Gene 3000)。

### 1.2 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 160 只,体重 200~250 g,购自中国人民解放军医疗科学院卫生学环境医学研究所,许可证号为 SCXK-(军)2009-003。随机分为假手术组( $n=10$ )、脑缺血组( $n=50$ )、NBP 高剂量后处理组(高剂量组, $n=50$ )、NBP 中剂量后处理组(中剂量组, $n=25$ )和 NBP 低剂量后处理组(低剂量组, $n=25$ )。后四组按再灌注时间点不同分为缺血 2 h 再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 5 个时间点,每个时间点各 5 只用于 TUNEL 染色和免疫组织化学

染色,在假手术组、脑缺血组及 NBP 最佳剂量组中每个时间点各 5 只用于实时荧光定量 PCR。

### 1.3 模型的制作

脑缺血组、丁苯酞后处理组参照 Zea Longa 线栓法<sup>[6]</sup>加以改良制备大鼠右侧大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。模型成功的标准为:提尾时大鼠左侧前爪内收屈曲,爬行时向左侧转圈甚至倾倒,右侧出现 Honner 征。假手术组线栓插至颈总动脉,余操作同脑缺血组。NBP 后处理组大鼠于缺血 2 h 再灌注后分别腹腔注射 6、4 及 2 mg/kg NBP 注射液;假手术组、脑缺血组腹腔注射等量生理盐水。假手术组大鼠于术后 24 h 处死,其余各组大鼠分别于再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 处死。

### 1.4 病理组织学切片制备

大鼠用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,从心尖插入粗针头,剪开右心耳开放静脉血,0.9% NaCl 快速心脏灌流,至右心耳流出清澈液体,4%多聚甲醛灌流固定,迅速断头取脑,浸泡于 4%多聚甲醛固定 24 h。于视交叉后 2 mm 处切取 3 mm 厚的冠状位脑组织块,常规包埋,切取 4  $\mu$ m 厚的脑片。

### 1.5 TUNEL 法检测神经细胞凋亡

按 TUNEL 试剂盒说明书进行染色。TUNEL 染色阳性细胞:细胞核固缩浓染,呈深棕色,细胞体积缩小且形状不规则。每张切片于高倍镜下随机选取 5 个非重叠视野,计数阳性细胞,取其平均值。

### 1.6 免疫组织化学染色法检测 SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 阳性细胞

应用免疫组织化学染色二步法检测 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  阳性细胞。镜下胞质或(和)胞核染成棕黄色者为 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  阳性细胞。每张切片于高倍镜下随机采集 5 个非重叠视野,记录阳性细胞数,取其平均值。

### 1.7 实时荧光定量 PCR 检测 SIRT1、PGC-1 $\alpha$ mRNA 的表达

假手术组、脑缺血组、NBP 最佳剂量组各取 5 只大鼠,10%水合氯醛腹腔注射深度麻醉,断头取脑,冰盘上迅速剥离缺血侧海马组织,-80 $^{\circ}$ C 冰箱冻

存备用。Trizol 法提取总 RNA,测定总 RNA 浓度。按说明书配制 20  $\mu$ L 反应液,在 PCR 仪上进行反应,反应条件:42 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,进行逆转录反应;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,共 40 个循环,进行 PCR 反应。应用 Rotor-Gene 分析软件绘制 SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 的扩增曲线、溶解曲线,并得到各自的荧光域值(Ct 值),目的基因的相对表达量采用相对定量法  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。SIRT1 上游引物为 5'-GTC TGT GCC TTC CAG TTG CT-3',下游引物为 5'-CTG CTT GCT GTC CAT ACC TG-3',片段长度为 146 bp;PGC-1 $\alpha$  上游引物为 5'-TGG AGC AAT AAA GCA AAG AGC-3',下游引物为 5'-GTG TAG GGA GGG TCA TCG TT-3',片段长度为 104 bp; $\beta$ -actin 上游引物为 5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3',下游引物为 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3',片段长度为 150 bp。

## 1.8 统计学方法

所有数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,显著性水平  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区 TUNEL 染色阳性细胞数

假手术组偶见 TUNEL 染色阳性细胞 ( $0.98\pm 0.60$  个/HP);脑缺血组再灌注 6 h 凋亡细胞较前增多,至 24 h 达高峰,随后逐渐减少;NBP 后处理组凋亡细胞的表达趋势与脑缺血组相同,但各时间点凋亡细胞数均减少 ( $P<0.05$ );高剂量组凋亡细胞数较中、低剂量组减少更为显著 ( $P<0.05$ ),中、低剂量组之间凋亡细胞数差异也有统计学意义 ( $P<0.05$ );表 1 和图 1)。

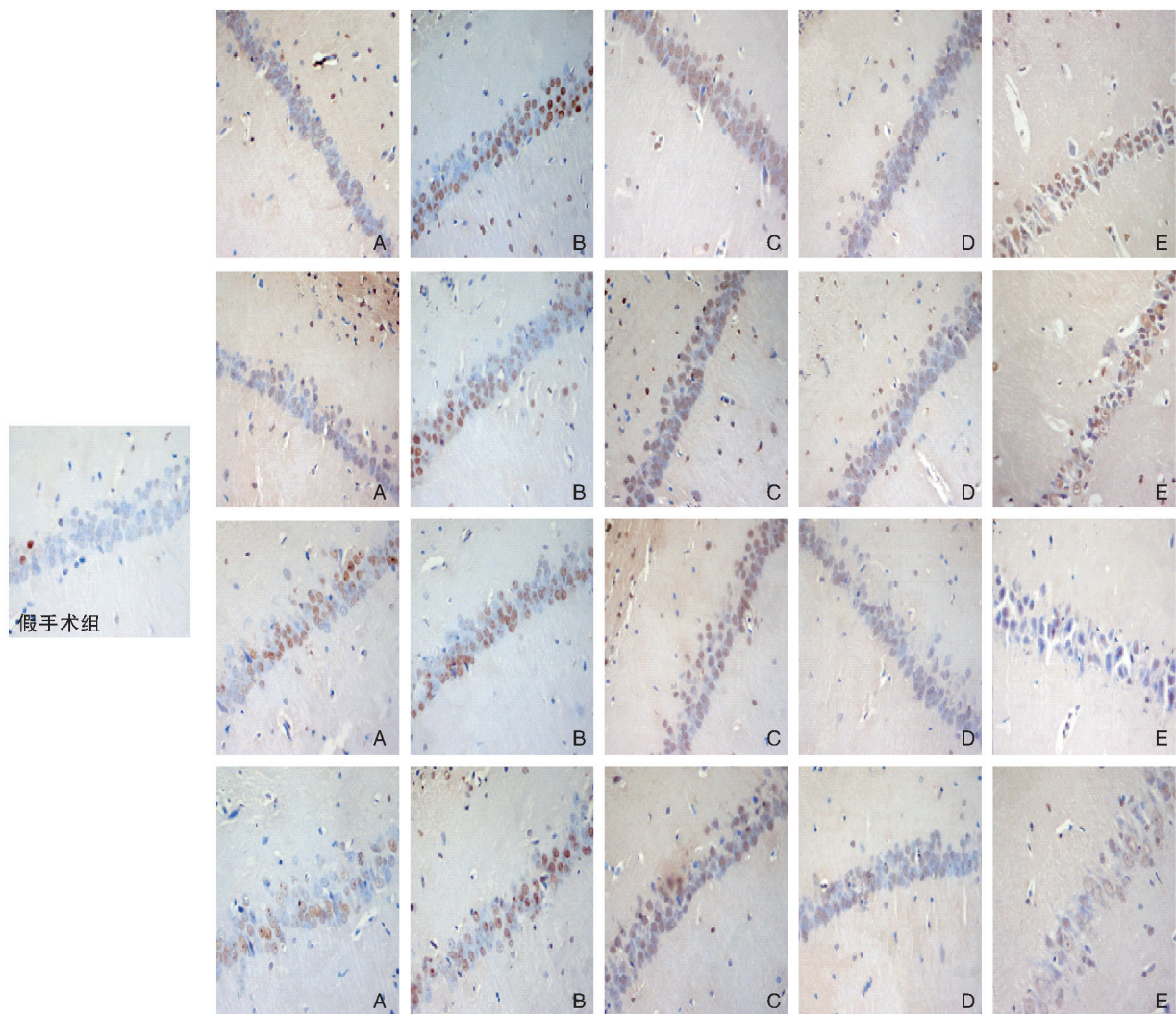


图 1. 各组大鼠海马 CA<sub>1</sub> 区凋亡细胞(TUNEL 染色,400 $\times$ ) 从上至下分别为脑缺血组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,A、B、C、D、E 分别为再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h。

Figure 1. The apoptotic cells in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats in each group(TUNEL staining, 400 $\times$ )

表 1. 大鼠缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区 TUNEL 染色阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ , 个/HP)

Table 1. The number of positive cells stained with TUNEL in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ , Cells/HP)

再灌注时间	n	脑缺血组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
6 h	5	24.76±2.29	20.08±2.74 <sup>a</sup>	15.3±2.82 <sup>ab</sup>	11.08±3.18 <sup>abc</sup>
12 h	5	33.3±3.07	27.26±2.72 <sup>a</sup>	22.3±3.30 <sup>ab</sup>	15.64±2.34 <sup>abc</sup>
24 h	5	46.68±2.97	40.18±2.86 <sup>a</sup>	36.1±2.76 <sup>ab</sup>	28.22±2.31 <sup>abc</sup>
48 h	5	39.68±2.00	33.30±2.75 <sup>a</sup>	26.6±1.59 <sup>ab</sup>	20.98±2.99 <sup>abc</sup>
72 h	5	28.34±3.60	22.30±3.19 <sup>a</sup>	18.1±3.03 <sup>ab</sup>	14.08±3.06 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与脑缺血组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与低剂量组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与中剂量组比较。

2.2 缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数

假手术组可见少量 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞 (7.84±0.57 个/HP 和 4.30±1.60 个/HP); 脑缺血组再灌注 6 h 时 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数较前增多, 至 24 h 达高峰, 随后逐渐减少; NBP 后处理组 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞的表达趋势与脑缺血组一致, 但相同时间点 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数均增多 ( $P < 0.05$ ); 高剂量组 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数较低、中剂量组增多 ( $P < 0.05$ ); 与低剂量组比较, 中剂量组 SIRT1 阳性细胞数除再灌注 6 h 外均增多 ( $P < 0.05$ ), PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数除再灌注 6 h、72 h 外均增多 ( $P < 0.05$ ); 表 2、表 3 和图 2、图 3)。

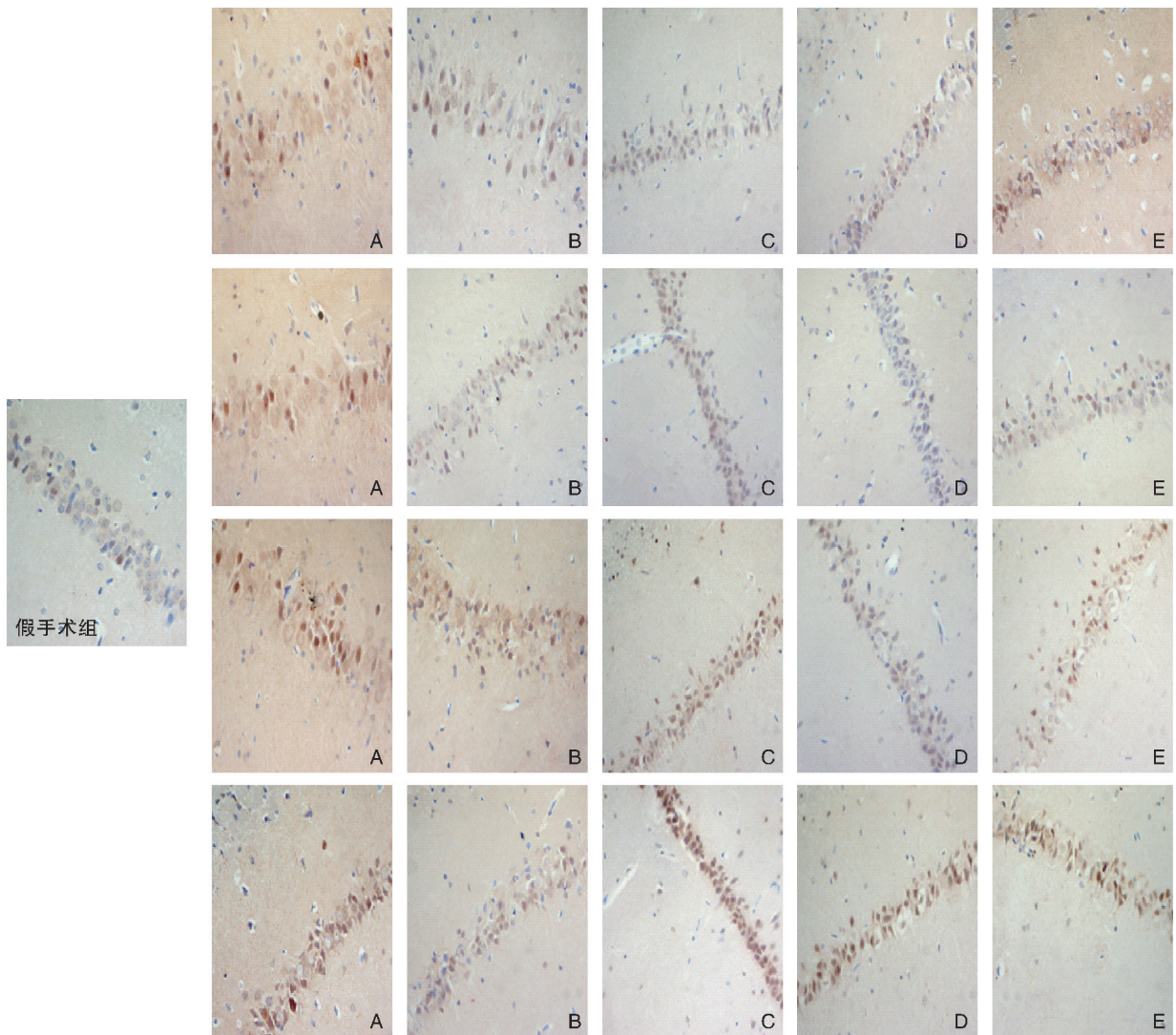


图 2. 各组大鼠海马 CA<sub>1</sub> 区 SIRT1 阳性细胞 (免疫组织化学染色, 400 $\times$ ) 从上至下分别为脑缺血组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, A、B、C、D、E 分别为再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h。

Figure 2. The SIRT1 positive cells in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats in each group (Immunohistochemical staining, 400 $\times$ )

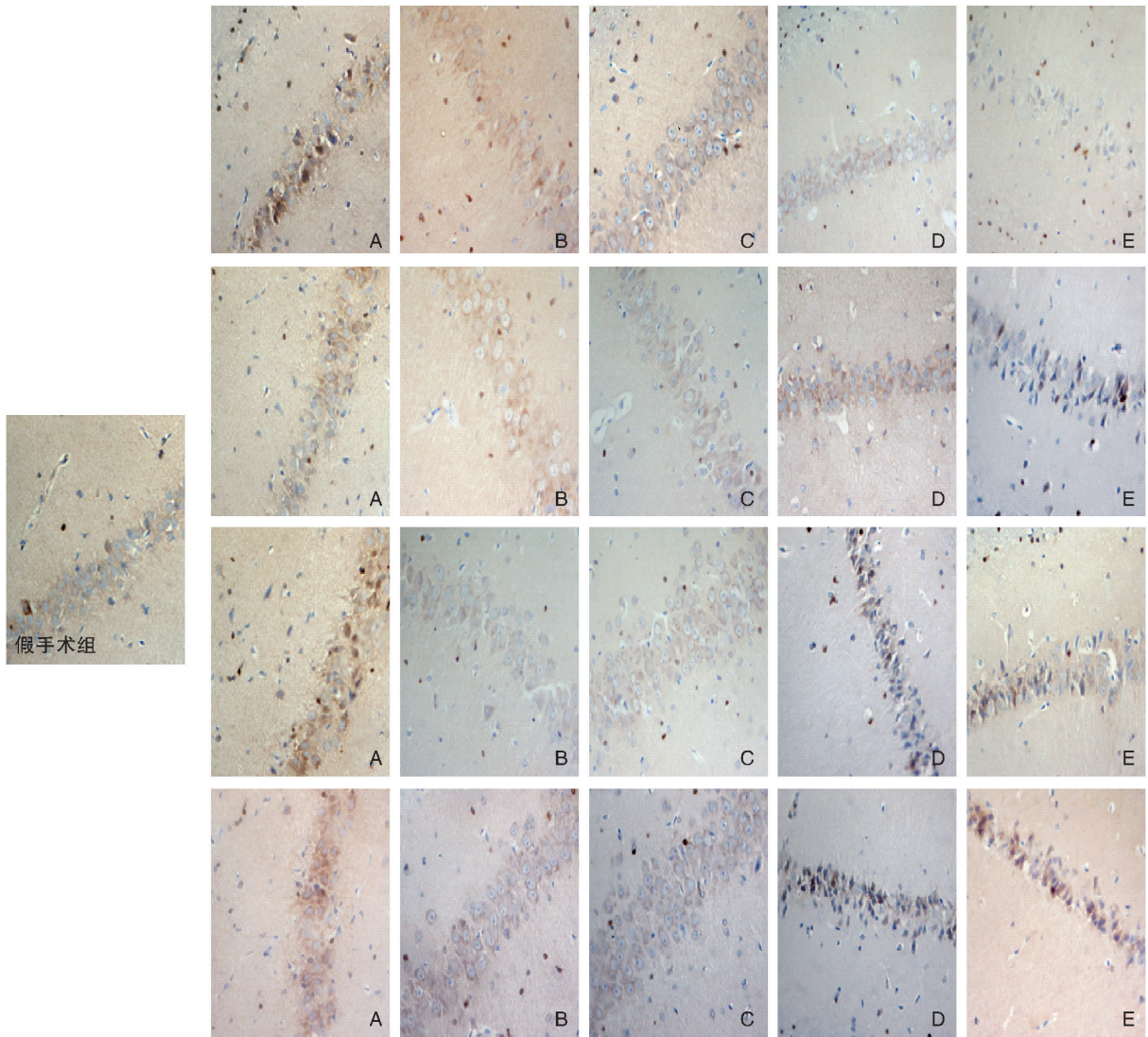


图 3. 各组海马 CA<sub>1</sub> 区 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞 (免疫组织化学染色, 400 $\times$ ) 从上至下分别为脑缺血组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, A、B、C、D、E 分别为再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h。

Figure 3. The PGC-1 $\alpha$  positive cells in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats in each group (Immunohistochemical staining, 400 $\times$ )

表 2. 大鼠缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区 SIRT1 阳性细胞数 ( $\bar{x}\pm s$ , 个/HP)  
Table 2. The number of SIRT1 positive cells in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x}\pm s$ , Cells/HP)

再灌注时间	n	脑缺血组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
6 h	5	11.12 $\pm$ 0.55	15.9 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	17.16 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>	25.78 $\pm$ 0.86 <sup>abc</sup>
12 h	5	14.02 $\pm$ 0.35	18.96 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	24.26 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>	31.08 $\pm$ 0.8 <sup>abc</sup>
24 h	5	19.88 $\pm$ 0.64	25.16 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	32.43 $\pm$ 0.92 <sup>ab</sup>	39.64 $\pm$ 0.68 <sup>abc</sup>
48 h	5	15.92 $\pm$ 0.71	20.66 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	26.14 $\pm$ 0.72 <sup>ab</sup>	32.36 $\pm$ 0.54 <sup>abc</sup>
72 h	5	9.00 $\pm$ 0.68	14.80 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	20.44 $\pm$ 0.59 <sup>ab</sup>	26.56 $\pm$ 0.59 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与脑缺血组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与低剂量组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与中剂量组比较。

表 3. 大鼠缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区 PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数 ( $\bar{x}\pm s$ , 个/HP)  
Table 3. The number of PGC-1 $\alpha$  positive cells in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x}\pm s$ , Cells/HP)

Table 3. The number of PGC-1 $\alpha$  positive cells in hippocampus CA<sub>1</sub> of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x}\pm s$ , Cells/HP)

再灌注时间	n	脑缺血组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
6 h	5	8.10 $\pm$ 2.38	12.10 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	12.94 $\pm$ 1.99 <sup>a</sup>	17.06 $\pm$ 2.10 <sup>abc</sup>
12 h	5	12.18 $\pm$ 2.65	16.12 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	19.30 $\pm$ 2.04 <sup>ab</sup>	24.58 $\pm$ 2.67 <sup>abc</sup>
24 h	5	19.40 $\pm$ 2.51	24.32 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	29.16 $\pm$ 3.32 <sup>ab</sup>	37.10 $\pm$ 2.16 <sup>abc</sup>
48 h	5	15.34 $\pm$ 2.47	19.08 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>	22.90 $\pm$ 1.70 <sup>ab</sup>	28.16 $\pm$ 2.22 <sup>abc</sup>
72 h	5	10.22 $\pm$ 2.56	15.3 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>	16.2 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	21.04 $\pm$ 3.64 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与脑缺血组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与低剂量组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与中剂量组比较。

2.3 缺血侧海马 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达  
高剂量组凋亡细胞更少, SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  阳

性细胞数更多, 因此, 以高剂量组作为最佳剂量组

检测 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达。假手术组 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的相对表达量为  $0.99 \pm 0.31$ 、 $1.01 \pm 0.05$ 。脑缺血组 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达于再灌注 6 h 增多, 24 h 达高峰, 而后逐渐减少。高剂量组 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达规律与脑缺血组一致, 但相同时间点 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达均增高 ( $P < 0.05$ ; 表 4 和 5)。

表 4. 脑缺血组与高剂量组大鼠缺血侧海马 SIRT1 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4. The comparison of the expression of SIRT1 mRNA in rat hippocampus between MCAO group and high dose group ( $\bar{x} \pm s$ )

再灌注时间	n	脑缺血组	高剂量组
6 h	5	1.05 $\pm$ 0.08	1.49 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
12 h	5	1.46 $\pm$ 0.06	1.91 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
24 h	5	1.95 $\pm$ 0.11	2.40 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
48 h	5	1.59 $\pm$ 0.07	1.99 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
72 h	5	1.35 $\pm$ 0.03	1.55 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与脑缺血组比较。

表 5. 脑缺血组与高剂量组大鼠缺血侧海马 PGC-1 $\alpha$  mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5. The comparison of the expression of PGC-1 $\alpha$  mRNA in rat hippocampus between MCAO group and high dose group ( $\bar{x} \pm s$ )

再灌注时间	n	脑缺血组	高剂量组
6 h	5	1.05 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
12 h	5	1.33 $\pm$ 0.07	1.77 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
24 h	5	1.72 $\pm$ 0.13	2.21 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
48 h	5	1.37 $\pm$ 0.08	1.91 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
72 h	5	1.20 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与脑缺血组比较。

### 3 讨论

NBP 注射液是治疗缺血性脑血管病的一种新型脑保护药。大量研究证明, NBP 可通过抑制神经细胞凋亡、缩小脑梗死体积; 解除微血管痉挛、抗血小板聚集; 促进微血管再生及侧支循环建立; 保护线粒体结构、改善线粒体功能; 抑制自由基形成等多种途径阻断再灌注损伤<sup>[1-5]</sup>。本研究结果发现, NBP 后处理组各时间点凋亡细胞数较脑缺血组减少, 并且与 NBP 存在剂量依赖关系, 说明随剂量的增加 NBP 抑制细胞凋亡的作用越强, 这与郑献召等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。

SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的蛋白去乙酰化酶类, 其通过促进神经元分化和轴突延长, 抑制炎症级联反应, 抑制氧化应激, 调节内皮细胞稳态, 介导基因组沉默, 减少蛋白表达、代谢及能量消耗, 抑制细胞凋亡等途径发挥神经保护作用<sup>[8-12]</sup>。在大鼠全脑缺血模型研究中发现, 缺血预处理和白藜芦醇减少海马 CA<sub>1</sub> 区神经损伤是通过增加 SIRT1 的活性实现的<sup>[13]</sup>; 在 MCAO 模型中, Yan 等<sup>[14]</sup>证实高压氧预处理可通过提高 SIRT1 蛋白和 mRNA 的表达, 减少神经元凋亡及脑梗死体积, 改善大鼠的神经行为评分。PGC-1 $\alpha$  作为一种转录调控辅助激活因子, 通过与不同的转录因子结合, 发挥不同的生理功能。其促进线粒体增殖、抗氧化、促进血管内皮细胞增殖、抑制细胞凋亡和炎症反应的作用为其发挥神经保护作用提供了理论依据<sup>[15-17]</sup>。在缺氧状态下, 小鼠缺血灶周围皮层区 PGC-1 $\alpha$  的表达明显增高<sup>[18]</sup>; PGC-1 $\alpha$  敲除小鼠缺血神经元损伤更加显著<sup>[19]</sup>。在氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 模型研究中, 魏欢等<sup>[20]</sup>发现 NBP 能够进一步增加 OGD 后 PGC-1 $\alpha$  的表达。本研究中, 随再灌注时间不同, 脑缺血组与 NBP 后处理组 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  的表达均呈现先上升后下降的规律性改变, 但与脑缺血组比较, NBP 后处理组各时间点 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  阳性细胞数及 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  mRNA 的表达均增多。说明在脑缺血再灌注损伤过程中, NBP 发挥脑保护作用可能与上调 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的表达有关。

PGC-1 $\alpha$  位于 SIRT1 的下游区, SIRT1 通过直接去乙酰化增加 PGC-1 $\alpha$  活性<sup>[21]</sup>。目前关于 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  两者关系的报道主要集中在代谢性疾病方面<sup>[22]</sup>。当细胞能量不足时 SIRT1 活性增加, 促进 PGC-1 $\alpha$  去乙酰化, 进而增加线粒体呼吸以适应不同环境下能量需求<sup>[23]</sup>。在脑血管病方面, 有研究也发现, 过表达的 SIRT1 可通过其去乙酰化作用增强 PGC-1 $\alpha$  在神经元中的代谢, 发挥神经保护作用<sup>[24]</sup>, 但相关文章甚少。本研究结果发现, 在大鼠缺血侧海马 CA<sub>1</sub> 区 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  的表达随再灌注时间延长呈现先上升后下降的规律性改变, 并于 24 h 达高峰, 二者表达趋势一致, 说明 SIRT1 与 PGC-1 $\alpha$  的表达在空间及时间上具有一致性。

综上所述, NBP 注射液抑制细胞凋亡, 减轻脑缺血再灌注损伤, 发挥脑保护作用, 其机制可能与上调 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的表达有关, 这为 NBP 注射液的脑保护机制提供了新的思路, 为其治疗缺血性

脑血管病提供了更多的客观依据。

[参考文献]

- [1] 王伟, 李富强, 邓小影, 等. 丁苯酞预处理对缺血再灌注损伤后大鼠海马神经元的保护作用[J]. 临床神经病学杂志, 2015, 28 (1): 42-45.
- [2] Zhao Q, Zhang C, Wang X, et al. (S)-ZJM-289, a nitric oxide-releasing derivative of 3-n-butylphthalide, protects against ischemic neuronal injury by attenuating mitochondrial dysfunction and associated cell death[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60 (2): 134-144.
- [3] 魏微, 徐琴, 黄勇华. 丁苯酞对慢性低灌注后神经血管单元的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (10): 1 015-018.
- [4] 郭自清, 周颖, 舒孔亮, 等. 丁苯酞软胶囊对急性脑梗死患者氧化损伤及抗氧化能力的影响[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41 (1): 27-29.
- [5] 朱江, 窦志杰, 王维兴, 等. 丁苯酞氯化钠注射液对大鼠延髓缺血后微血管密度、NGF、BDNF表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32 (2): 137-139.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Calson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [7] 郑献召, 张三军, 石莉, 等. 丁苯酞治疗大鼠脑缺血再灌注损伤作用机制的研究[J]. 中国实用神经病学杂志, 2009, 12 (23): 59-61.
- [8] Sugino T, Maruyama M, Tanno M, et al. Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584 (13): 2 821-826.
- [9] 曲柳, 仇丽鸿. SIRT1抑制炎症反应的研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2013, 6 (9): 566-570.
- [10] Guarente L. Linking DNA damage, NAD<sup>+</sup>/SIRT1 and aging[J]. *Cell Metab*, 2014, 20 (5): 706-707.
- [11] 石瑶, 郭倩, 周也涵, 等. 白藜芦醇通过Sirtuins 1通路促进自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. 基础医学与临床, 2015, 35 (4): 496-501.
- [12] 刘晔, 王俊娟. 沉默信息调节蛋白1对神经变性疾病的神经保护作用研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39 (6): 562-566.
- [13] Morris KC, Lin HW, Thompson JW, et al. Pathways for ischemic cytoprotection: role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31 (4): 1 003-019.
- [14] Yan WJ, Fang ZP, Yang QZ, et al. SirT1 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33 (3): 396-406.
- [15] Chen SD, Lin TK, Yang DI, et al. Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptors gamma coactivator-1alpha against neuronal cell death in the hippocampal CA<sub>1</sub> subfield after transient global ischemia[J]. *Neurosci Res*, 2010, 88 (3): 605-613.
- [16] Scarpulla R. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813 (7): 1 269-278.
- [17] 王喜, 文芳, 洪涛. 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活因子1 $\alpha$ 的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 20 (8): 631-636.
- [18] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator[J]. *Endocr Rev*, 2003, 24 (1): 78-90.
- [19] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1[J]. *Cell*, 1999, 98 (1): 115-124.
- [20] 魏欢, 李玲, 战丽萍, 等. 丁基苯酞上调PGC-1 $\alpha$ 发挥内皮细胞保护作用的机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 8 (28): 697-700.
- [21] Canto C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20 (2): 98-105.
- [22] 邵芳, 郁建锋, 张燕萍, 等. SIRT1基因的表达调控及对动物脂类代谢的功能[J]. 常熟理工学院学报, 2015, 29 (4): 8-14.
- [23] Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, et al. Metabolic adaptations through the PGC-1alpha and SIRT1 pathways[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582 (1): 46-53.
- [24] Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, et al. PGC-1alpha and PGC-1beta regulate mitochondrial density in neurons[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (32): 21 379-385.

(此文编辑 文玉珊)