

黄芪对新生鼠缺氧缺血脑损伤后皮质的治疗作用

贾瑞喆 蒋 犁 乔立兴

摘要 目的 探讨新生儿围产期缺氧缺血脑损伤(hypoxia-ischemia brain damage, HIBD)时皮质区神经细胞损伤的机制和黄芪对皮质区的神经保护作用。**方法** 建立新生大鼠 HIBD 模型,分假手术组(Sham 组)、模型组、黄芪治疗组。于缺氧后不同时间点取脑,分别行组织病理学检查并计数皮质区神经细胞死亡率、免疫组化检测结扎侧皮质区半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白的表达、半定量逆转录-聚合酶反应(RT-PCR)检测 caspase-3 mRNA 表达。**结果** 模型组结扎侧皮质 caspase-3 mRNA 和蛋白表达于缺氧缺血(HI)后 6h 轻度升高,24h 达高峰,48h 后下降,5 天和 7 天时恢复至基础水平。黄芪治疗组 HI 后结扎侧皮质神经细胞死亡率明显降低,caspase-3 mRNA 和蛋白的表达峰值降低了 45% (mRNA)、40%~43% (蛋白)。**结论** 黄芪对未成熟脑 HIBD 后皮质部位有明显的神经保护功能,此功能与抑制 caspase-3 的表达有关。

关键词 脑缺氧;脑缺血;半胱氨酸蛋白酶;凋亡;黄芪

Study on Effect of Radix Astragali on Injury of Cerebral Cortex in Neonatal Rats after Hypoxia/Ischemia Brain Damage JIA Rui-zhe, JIANG Li, QIAO Li-xing *Clinical Medical College of Southeast University, Nanjing (210009)*

Objective To study the mechanism of injury of cortical nerve cell in the newborn with hypoxia/ischemia brain damage (HIBD), and the neuroprotective effect of Radix Astragali (RA). **Methods** Neonatal HIBD model rats were established and divided into the sham group, the model group and the RA group. Brain of rats obtained at different time points after HIBD to conduct histopathological examination, neuron death rate count, as well as determination of caspase-3 (cysteiny aspartate-specific proteinase-3) protein mRNA expression in cerebral cortex by immunohistochemistry, semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. **Results** In the model group, caspase-3 mRNA and protein showed an increase at 6 hrs, reached the peak at 24 hrs, and decreased at 48 hrs after HIBD, on the 5th and 7th day restored to baseline level. After being treated by RA, the neuron death rate of ligated side was obviously reduced, caspase-3 mRNA and protein expression peak value decreased by 45% (mRNA) and 40% - 43% (protein). **Conclusion** RA shows markedly neuron protection in immature brain cortex after HIBD, which is related with the inhibition on caspase-3 expression.

Key words cerebral hypoxia; cerebral ischemia; cysteinyl aspartate proteinase; apoptosis; Radix Astragali

围产期缺氧缺血脑损伤(hypoxia-ischemia brain damage, HIBD)是造成新生儿死亡和永久性神经系统功能损害的主要原因之一,皮质是对缺氧缺血非常敏感的区域^[1]。最新研究显示:凋亡是未成熟脑 HIBD 时细胞死亡的主要形式^[2,3],而天冬氨酸特异酶切的半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的激活是凋亡过程的一个重要环节^[4]。caspase 抑制剂对 HIBD 具有神经保护功

能^[5,6]。本研究将黄芪用于未成熟大鼠脑 HIBD 的治疗,通过检测皮质缺氧缺血(hypoxia ischemia, HI)后 caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平的变化,一方面观察 caspase-3 的表达时程,探讨新生儿 HIBD 的机制及 HIBD 的最佳治疗时机,另一方面探讨黄芪对未成熟脑 HIBD 时皮质部位的神经保护功能和机制,为临床探索新生儿 HIBD 的治疗提供实验依据。

材料和方法

1 动物 出生 7 天的同窝 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄不限,体重 12~14g,均由母鼠带养。由复旦大学提供鼠种,东南大学医学院实验动物中心繁殖。

基金项目:江苏省科委社会发展基金资助项目(No. BS-98058)

作者单位:东南大学临床医学院(南京 210009)

通讯作者:蒋 犁, Tel: 025-83272533; E-mail: Jiang Li7@sohu.

com

2 药物及试剂 黄芪注射液由成都地奥九泓制药厂生产(批号:0203097),规格为每支 10ml,含生药 20g。

TriPure isolation reagent 购自冷泉港生物公司(Roche Diagnostics Corp 产品)。TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 为宝生物(大连)有限公司产品。caspase-3 及 β -actin cDNA 引物由上海申友生物技术公司合成。链霉菌抗生物素—过氧化物酶(S-P)超敏试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品。DAB 显色试剂盒及兔抗大鼠 caspase-3 和其 p20 亚单位多克隆抗体均为武汉博士德生物工程有限公司产品,其他试剂均为分析纯。

3 模型制备 按照 Rice^[7]方法制备 HIBD 模型:将新生鼠吸入乙醚麻醉后仰卧位固定。颈正中切口,游离左侧颈总动脉,4-0 号线结扎,恢复 2~3 h 后置于 2 000 ml 密闭容器中,37℃ 恒温。以 2 L/min 的速度输入 8% O₂、92% N₂ 混合气体 2 h,取出后置于原饲养环境中。

4 动物分组与处理 取新生大鼠共 148 只(造模过程中死亡 16 只),随机分成 3 组:假手术(Sham)组 12 只,模型组 60 只,黄芪治疗(黄芪组)组 60 只。黄芪组幼鼠于造模后即刻及每日同一时间腹腔注射黄芪注射液 0.08ml^[8],7 天后停药。模型组于同时时间腹腔注射等量生理盐水。Sham 组仅游离左颈总动脉但不结扎,不给药。

5 组织病理检查 于缺氧缺血(HI)后 6 h、24 h、48 h、5 天、7 天及假手术后 24 h,将各组幼鼠断头取脑,甲醛溶液固定后,沿丘脑中 1/3 平面行冠状位切块,常规石蜡包埋、切片,厚度 4 μ m。分别行苏木素—伊红(HE)染色和 SP 免疫组化染色。

切片经 HE 染色后,取 24 h 与 5 天的切片,每张切片在结扎侧脑顶叶皮质区取 3 个不同视野($\times 400$),计数每视野的存活神经细胞数^[5],并计算神经细胞死亡率,公式如下:

神经细胞死亡率(%) = (Sham 组神经细胞数 - 模型组或黄芪治疗组存活神经细胞数) / Sham 组神经细胞数 $\times 100\%$ 。

6 caspase-3 蛋白表达的检测 免疫组化主要步骤:切片经微波修复抗原,灭活内源性过氧化物酶,封闭非特异染色,加一抗(caspase-3 抗体),4℃ 过夜,加生物素标记二抗,室温 10 min,加链霉菌抗生物素—过氧化物酶溶液,室温 10 min,DAB 溶液显色,苏木素复染切片。阳性结果为细胞浆呈棕褐色;PBS 代表一抗作为阴性对照,肠管状腺癌切片作阳性对照。应用

计算机图像处理系统(OPTIMAS 图像分析系统)分析切片,每张切片于结扎侧皮质区取 6 个视野($\times 400$),计数每视野阳性细胞率(阳性细胞率 = 阳性细胞/全部细胞)。

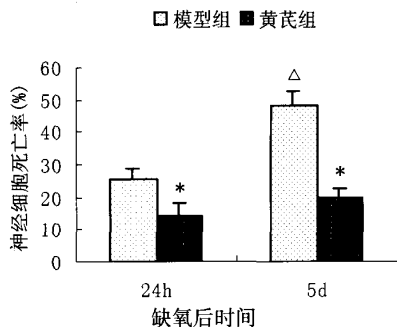
7 caspase-3 mRNA 表达检测 于 HI 后 6 h、24 h、48 h、5 天、7 天和假手术后 24 h,将各组幼鼠断头取脑,快速游离结扎侧皮质,用 TriPure isolation reagent 提取其总 RNA。测 OD 值 A260/A280 均在 1.7 以上。取 1 μ g 总 RNA 用 TaKaRa RNA PCR Kit 进行逆转录,Oligo dT 为引物,AMV 为逆转录酶,E_p 管中整个反应体系的体积是 20 μ l,42℃ 反应 30 min 合成 cDNA 第一条链。取逆转录产物 10 μ l 为模板进行 PCR 扩增, β -actin 作为内参照同时扩增。caspase-3 引物序列为 5'-AGTCTGACTGGAAAGCCGAA-3', 5'-CGGGA-TCTGTTTCTTTGCAT-3', β -actin 引物序列为 5'-CAATTCCATCATGAAGTGTGAC-3', 5'-CCACACAGAGTACTTGCCTC-3'。循环条件:94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1.5 min,共 28 个循环。扩增片段长度为 342 bp(caspase-3)和 184 bp(β -actin)。扩增产物进行 1.7% 琼脂糖凝胶电泳,结果用 Image Master VDS 凝胶成像系统(美国 Pharmacia Biotech 公司)对条带扫描和分析。以 β -actin 为内参分别计算 caspase-3 产物与 β -actin 产物光密度积分的比值。

8 统计学处理 结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间多个样本均数间比较采用方差分析,两两之间用 q 检验;两样本均数比较用 t 检验。

结 果

1 组织病理学检测结果比较 Sham 组:双侧皮质区组织无水肿,神经细胞形态正常,神经细胞计数为 (88.4 ± 0.7) /高倍视野(HP)。模型组:24 h 时结扎侧皮质区水肿,细胞周围间隙增宽,神经细胞数减少,计数为 (65.7 ± 2.8) /HP,与 Sham 组比较差异有显著性($P < 0.01$)。退变的神经细胞多数显示出凋亡的形态学特征:胞浆浓缩,核质凝集,分离包裹成多个圆形、规则的蓝紫色染色质块,形成凋亡小体。5 天时结扎侧皮质变薄,神经细胞稀少,为 (46.2 ± 4.0) /HP,与 Sham 组及同侧 24 h 时比较差异均有显著性($P < 0.01$)。黄芪组 24 h 时皮质区组织水肿较模型组明显减轻,5 天时皮质无明显变薄,此两时间点神经细胞死亡率均较模型组明显减低,差异有显著性($P < 0.01$) (见图 1)。

2 caspase-3 蛋白表达变化比较 Sham 组皮质 caspase-3 蛋白以极低水平表达,皮质区为 $(2.16 \pm$



注:与同时时间模型组比较,* $p < 0.01$;与本组 24 h 比较, $^{\Delta}p < 0.01$

图 1 模型组与黄芪组 24 h、5 天结扎侧皮质区神经细胞死亡率比较

0.36) %。模型组结扎侧皮质区:缺氧后 6 h 时 caspase-3 蛋白仅低水平表达,以后逐渐升高,24~48 h caspase-3 蛋白表达达高峰,较 Sham 组差异有显著性 ($P < 0.05$),然后下降,5 天和 7 天时恢复低水平表达。黄芪组结扎侧皮质 caspase-3 蛋白 0~7 天中的变化趋势与模型组相似,但其 24~48 h 的峰值较模型组减低了 40%~43% ($P < 0.05$,见图 2)。

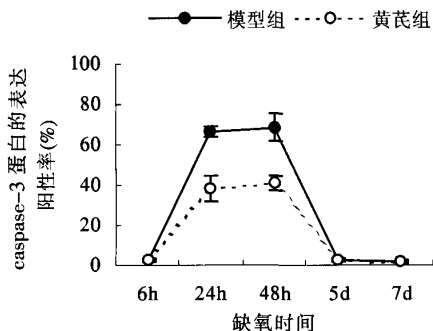
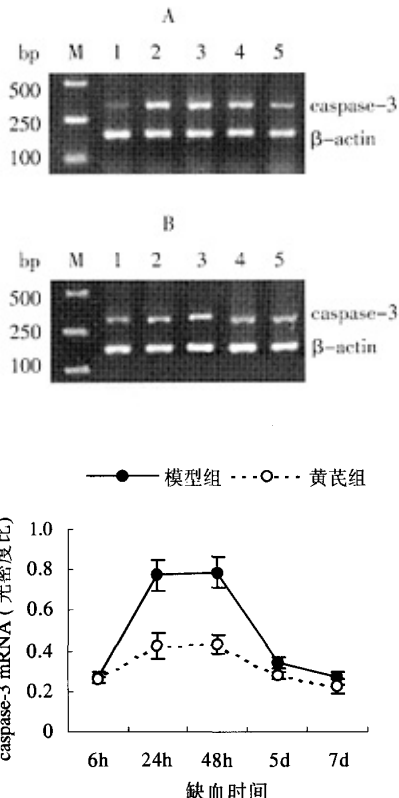


图 2 模型组与黄芪组不同时间点结扎侧皮质 caspase-3 蛋白的表达

3 caspase-3 mRNA 的表达变化 Sham 组皮质 caspase-3 mRNA 以低水平表达,为 0.217 ± 0.009 。模型组结扎侧皮质 caspase-3 mRNA 于 HI 后逐渐升高,6 h 时比 Sham 组升高了 11%,至 24 h 时 mRNA 水平达高峰,较 Sham 组升高了 260% ($P < 0.01$),高峰持续至 48 h 后下降,5 天和 7 天时恢复至基础水平。黄芪组有与模型组相似的变化趋势,但 24 h 和 48 h 两时间点峰值降低了 45%,与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.01$,见图 3)。

讨 论

本实验着重观察了皮质区 HIBD 后的镜下形态学改变,并计数神经细胞死亡率,发现模型组结扎侧皮质



注:A:模型组;B:黄芪组;M:DNA marker;1~5 分别代表 5 个缺血时间点

图 3 模型组与黄芪组结扎侧皮质 caspase-3 mRNA 的表达量

区的存活神经细胞数明显少于 Sham 组,并且退变的神经细胞多数显示出凋亡的形态学特征,证实未成熟脑皮质区对缺氧缺血的区域易感性^[1],并且凋亡在其损伤过程中发挥着重要作用^[2,3]。本实验还发现:结扎侧 5 天时皮质区神经细胞死亡率明显高于 24 h ($P < 0.01$)。由此可见:皮质区神经细胞在受到缺氧缺血这一较严重的刺激时,细胞死亡是一进行中的过程,受损细胞中仅少部分立即死亡,而多数可能在 HI 后推迟 2~4 天甚至更久才死亡。此迟发性神经元死亡 (delayed neuronal death, DND) 的现象在国内外的研究中均有发现^[1,9],而 DND 的发生机制就是凋亡^[3]。DND 的现象为挽救受损神经元提供了治疗的时机,更提醒我们在新生儿 HIBD 的治疗中,既要重视早期及时抢救的重要性,又不能忽视对晚期迟发性神经元死亡的保护性干预治疗。

凋亡在未成熟脑 HIBD 的病理进程中起着重要作用。细胞凋亡是由各种凋亡刺激信号始动,受细胞内源性基因、酶类和信号转导途径等调控的“瀑布式”激活过程。凋亡的最后过程是通过 caspases 的激活而实

现的,其中 caspase-3 的激活是凋亡进行的一个重要环节^[4]。Adachi^[5]和 Cheng^[6]研究发现:应用 caspase-3 抑制剂可通过抑制凋亡,来实现对 HIBD 的神经保护功能。

近年 Nakajima^[2]和 Harrison^[10]通过免疫组化、RT-PCR 和 Western blots 的方法检测 HIBD 后 caspase-3 的表达发现:其表达峰值于 24 h 时出现。在本研究中用 RT-PCR 和免疫组化两方法,同样也观察到:HIBD 时结扎侧皮质 caspase-3 mRNA 和蛋白表达于 HI 后 6 h 时轻度升高,24 h 时达峰值,持续至 48 h 后下降,5 天和 7 天时渐恢复至基础水平。caspase-3 参与了未成熟脑 HIBD 的病理进程,并且其表达的区域及时程与凋亡的发生相对应^[10],因此在其高峰(HI 后 24~48 h)出现前给予适当的干预措施,才能通过有效的抑制凋亡而尽可能多的挽救受损神经细胞,而且此干预应一直持续至 caspase-3 恢复正常表达(HI 后 7 天)。

黄芪是我国的传统中药,最新研究显示:黄芪可通过减轻兴奋性氨基酸的释放及其在细胞间的堆积,缓解 Ca^{2+} 超载,抗氧化^[11]等机制抑制凋亡的发生。本研究将黄芪用于治疗未成熟脑 HIBD,从病理学检测, caspase-3 转录及翻译水平的表达观察黄芪对皮质区的疗效。结果显示:皮质区神经细胞死亡率、结扎侧皮质 caspase-3 mRNA 和蛋白表达峰值均明显降低,提示黄芪能有效地抑制未成熟脑 HIBD 后皮质区神经细胞的凋亡,提高神经细胞存活率,而且其神经保护机制与抑制 caspase-3 的表达有关。

通过本实验认为:黄芪对未成熟脑 HIBD 后皮质部位具有明显的神经保护功能,黄芪注射液在新生儿 HIBD 的治疗中具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Towfighi J, Mauger D. Temporal evolution of neuronal changes in cerebral hypoxia-ischemia in developing rats: a quantitative light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;109(2):169—177.
- 2 Nakajima W, Ishida A, Lange MS. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rats. *J Neurosci* 2000; 20(21):7994—8004.
- 3 蒋 犁,汤云珍,黄晓明,等. 新生大鼠脑细胞凋亡与缺氧、缺血两因素析因研究. *中华儿科杂志* 1998;36(7):408—411.
- 4 Jiang L, Tang YZ, Hong XM, et al. A study on apoptosis in neonatal rats with cerebral hypoxia-ischemia. *Chin J Pediatr* 1998;36(7):408—411.
- 5 Zhu C, Wang X, Hagberg H, et al. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem* 2000;75(2):819—829.
- 6 Adachi M, Sohma O, Tsuneishi S, et al. Combination effect of systemic hypothermia and caspase inhibitor administration against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res* 2001; 50(5):590—595.
- 7 Cheng Y, Deshmukh M, D Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia brain injury. *J Clin Invest* 1998;101(9):1992—1999.
- 8 Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9(2):131—141.
- 9 孙敬芳主编. *动物实验方法学*. 北京:人民卫生出版社, 2001:357.
- 10 Sun JF editor. *Animal experimental methodology*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001:357.
- 11 Jiang L, Ding YJ, Tang YZ. Relationship between the expression of c-fos gene and delayed neuronal death in rat neonatal hippocampus following hypoxic-ischemic insult. *Chin Med J* 2001;114(5):520—523.
- 12 Harrison DC, Davis RP, Bond BC, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;89(1—2):133—146.
- 13 蔡 琪,李晓玫,王海燕. 黄芪当归合剂对大鼠急性缺血/再灌注肾损伤的保护及加速修复作用. *中华肾脏病杂志* 2000;16(6):387—391.
- 14 Cai Q, Li XM, Wang HY. The protective and accelerating recovery role of astragali and angelica on renal ischemia/reperfusion injury. *Chin J Nephrol* 2000;16(6):387—391.

(收稿:2003-07-22 修回:2004-10-10)