

• 论著 •

金纳多注射液对脑缺血/再灌注后 caspase - 3 和 caspase - 9 表达的影响

宋利春¹, 张 鸿¹, 刘艳艳², 马 英¹, 郑东明¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院神经内科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 天津市天和医院脑系科, 天津 300050)

【摘要】 目的: 观察金纳多注射液对大鼠局灶性脑缺血/再灌注后天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase - 3) 和 caspase - 9 蛋白及 mRNA 表达的影响。方法: 40 只 Wistar 雄性大鼠被随机分为假手术组、缺血组、金纳多小剂量治疗组及金纳多大剂量治疗组, 每组 10 只。采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。应用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测神经元凋亡; 应用免疫组化检测 caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白表达; 应用逆转录-聚合酶链反应(RT - PCR)方法检测 caspase - 3 和 caspase - 9 的 mRNA 表达。结果: 与假手术组比较, 缺血组、金纳多小剂量治疗组和大剂量治疗组凋亡细胞数以及 caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白及 mRNA 表达均显著增高(P 均 <0.01); 与缺血组比较, 金纳多小剂量治疗组和大剂量治疗组凋亡细胞数、caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白及 mRNA 表达均显著减少(P 均 <0.01); 与金纳多小剂量治疗组比较, 金纳多大剂量治疗组凋亡细胞数、caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白及 mRNA 表达均明显减少(P 均 <0.05)。结论: 金纳多注射液能显著减少脑缺血/再灌注后神经元凋亡以及 caspase - 3、caspase - 9 的 mRNA 和蛋白表达, 疗效表现为剂量依赖性。

【关键词】 金纳多注射液; 缺血/再灌注损伤; 脑; 凋亡; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9

中图分类号: R285.5; R255.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)06-0344-05

Effects of ginkgo biloba extract injection (金纳多注射液) on the expression of caspase - 3 and caspase - 9 mRNA and protein in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion SONG Li-chun¹, ZHANG Hong¹, LIU Yan-yan², MA Ying¹, ZHENG Dong-ming¹. 1. Department of Neurology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China; 2. Department of Neurology, Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

【Abstract】 Objective: To study the effects of ginkgo biloba extract (GBE) injection (金纳多注射液) on the expression of caspase - 3 and caspase - 9 protein and mRNA after focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R). **Methods:** Forty male Wistar rats were randomly divided into sham operation group, I/R group, small - dose GBE treatment group and high - dose GBE treatment group (each $n=10$). The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established by using the intraluminal suture occlusion method, neuronal apoptosis were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP - biotin nick end labeling (TUNEL) staining, the expression of caspase - 3 and caspase - 9 protein were detected by immunohistochemical method, the expression of caspase - 3 and caspase - 9 mRNA were detected by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) method. **Results:** The number of apoptotic cells, the expression of caspase - 3 and caspase - 9 mRNA and protein in I/R group, small - dose GBE treatment group and high - dose GBE treatment group were significantly higher than those of sham operation group (all $P<0.01$). The number of apoptotic neurons, the expression of caspase - 3 and caspase - 9 mRNA and protein in small - dose GBE treatment group and high - dose GBE treatment group were significantly less than those of I/R group (all $P<0.01$). The number of apoptotic neurons, the expression of caspase - 3 and caspase - 9 mRNA and protein in high - dose GBE treatment group were less than those of small - dose GBE treatment group (all $P<0.05$). **Conclusion:** GBE injection can significantly decrease neuronal apoptosis, inhibit the expressions of caspase - 3 and caspase - 9 mRNA and protein following cerebral I/R, and the effect of GBE is correlated with dose.

【Key words】 ginkgo biloba extract injection; cerebral ischemia/reperfusion injury; apoptosis; caspase - 3; caspase - 9

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(20052097)

作者简介: 宋利春(1961-), 男(汉族), 辽宁省人, 医学硕士, 副教授, 研究方向为缺血性脑血管疾病治疗。

银杏叶提取物近年在临床上被广泛用于治疗缺血性心脑血管疾病^[1-2]。有研究发现银杏叶提取物能减轻脑缺血后神经元凋亡^[3-4],但其抗凋亡的信号传导机制尚不完全清楚。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)家族是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,凋亡的最后实施都是通过 caspases 的激活而实现的。本实验观察银杏叶提取物金纳多注射液对大鼠局灶性脑缺血/再灌注(I/R)后神经元凋亡、caspase-3 和 caspase-9 蛋白及 mRNA 表达的影响,以探讨银杏叶提取物的脑保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及给药方法:将 40 只健康 Wistar 雄性大鼠按随机数字表法分为假手术组、缺血组以及金纳多小剂量治疗组和金纳多大剂量治疗组,每组 10 只。各组取 5 只大鼠用于制备石蜡切片,进行神经元凋亡及免疫组化染色;另 5 只用于逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测。金纳多小剂量治疗组和大剂量治疗组分别在缺血前 0.5 h 及缺血后 1 h 再灌注,同时分别给予金纳多注射液(由德国威玛制药厂生产)20 mg/kg 及 40 mg/kg 腹腔内注射。

1.2 动物模型及标本制备:大鼠中动脉(MCA)缺血大鼠模型参考改良 Nagasawa 法^[5]。大鼠以体积分数为 10%的水合氯醛(350 mg/kg)腹腔内注射麻醉,仰卧位固定,颈部正中切口,分离并暴露左侧颈总动脉及颈内、外动脉,结扎左侧颈总动脉及颈外动脉根部,由颈总动脉近分叉处剪一小口插入尼龙线(长 50 mm,直径 0.23 mm,在 18 mm 处作标记),插入长度约(18.0±0.5)mm 时感到有轻微阻力时停止,扎紧并固定插线,缝合皮肤,阻断血流 1 h 后,拔线实现再灌注。假手术组除不插线外,其余步骤相同。用于神经元凋亡和免疫组化检测的大鼠在 I/R 24 h 后经 10%水合氯醛深度麻醉(600 mg/kg),迅速打开胸腔,暴露心脏,剪开右心房,于心尖部剪开左心室,插管至主动脉,快速注入 100 ml 生理盐水冲洗后,再以体积分数为 4%的多聚甲醛灌注固定;断头取脑,以 4%多聚甲醛固定 24 h。常规脱水、透明、石蜡包埋、连续冠状切片,切片厚度 6 μm。用于 RT-PCR 检测的大鼠在 I/R 后 24 h 快速断头取脑,取左侧缺血侧大脑半球半暗带区皮质,即距离嗅球尖端 7~11 mm,矢状裂至外侧裂上 1/3 的皮质^[6], -70℃冰箱统一保存进行 RT-PCR 检测。

1.3 神经元凋亡检测:采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)进行检测。切片滴加体积分数为 3%的 H₂O₂ 室温处理 10 min,蒸馏水洗 2 min×3 次,加

0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(TBS)1:200 新稀释的蛋白酶 37℃消化 10 min,加标记液 20 μl,37℃标记 2 h,0.1 mol/L TBS 洗 2 min×3 次,加封闭液 50 μl,室温 30 min,用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体 50 μl 加至标本片上,37℃反应 30 min,0.1 mol/L TBS 洗 2 min×3 次,取链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)加至切片,37℃反应 30 min,0.1 mol/L TBS 洗 5 min×4 次,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,水洗,苏木素轻度复染,0.1 mol/L TBS 洗,蒸馏水洗,脱水,透明,封片,显微镜下观察,细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。

1.4 免疫组化检测:切片滴加 3% H₂O₂ 室温处理 10 min,蒸馏水洗 3 min×3 次,微波修复抗原,滴加体积分数为 5%的牛血清白蛋白(BSA)血清封闭液,室温下 20 min 甩去多余液体,不洗,滴加一抗(兔抗大鼠 caspase-3、caspase-9 IgG),37℃孵育 120 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 min×3 次,滴加二抗(生物素标记山羊抗兔 IgG),37℃孵育 20 min,PBS 洗 2 min×3 次,滴加试剂 SABC,37℃反应 20 min,PBS 洗 5 min×4 次,DAB 显色,蒸馏水洗,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察,胞浆着色呈棕黄色为阳性细胞。

1.5 RT-PCR 检测:按常规方法提取 RNA。逆转录反应:反应体系总体积 20 μl,包括 2×buffer 10 μl、MgSO₄ (25 mm) 4 μl、dNTPs (10 mm) 1 μl、BcaBEST Polymerase (22 U/μl) 1 μl、Oligo-dT15 (50 μm) 1 μl、Rnase-Inhibitor (40 U/μl) 0.5 μl、dd.H₂O 0.5 μl、样品 RNA 2 μl (1 μg)。PCR 扩增反应引物序列分别为:caspase-3 上游正义链 5'-CTG GAC TGC GGT ATT GAG-3' (GenBank NM_012922),下游反义链 5'-GGG TGC GGT AGA GTA AGC-3' (GenBank NM_012922),扩增产物片段长度为 102 bp;caspase-9 上游正义链 5'-CCA GAT GCT GTC CCA TAC C-3' (GenBank NM_031632),下游反义链 5'-ATT GGC GAC CCT GAG AAG-3' (GenBank NM_031632),扩增产物片段长度为 228 bp;内参照 β-actin 引物序列为:上游正义链 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3',下游反义链 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3',扩增产物片段长度为 690 bp。反应条件为 94℃预变性 10 min,94℃变性 40 s,51.5℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 32 个循环,最后 72℃ 7 min,然后终止。

扩增产物用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶,电泳缓冲液电泳。

1.6 统计学处理:神经元凋亡和免疫组化检测部分采用高倍物镜,取每张切片中梗死灶边缘区域相互不重叠的 4 个视野,使用 Meta Morph(美国)图像分析系统测定其阳性细胞数和积分吸光度(A)值。RT-PCR 检测部分应用 1D Kodak 成像分析系统(美国)对电泳条带进行 A 值的半定量分析,结果以 caspase-3、caspase-9 的 mRNA 产物 A 值与同一样本 β -actin 产物的 A 值比值(Ac/A β)来表示。所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经元凋亡结果(表 1,彩色插页图 1):假手术组仅见少量凋亡细胞出现。缺血组、金纳多小剂量治疗组和大剂量治疗组凋亡细胞数均较假手术组显著增多(P 均 <0.01),凋亡细胞主要分布在缺血周边区内。两个金纳多治疗组凋亡细胞数均较缺血组明显减少(P 均 <0.01),且大剂量治疗组凋亡细胞数少于小剂量治疗组($P<0.05$)。

2.2 caspase-3 及 caspase-9 的蛋白表达(表 1,彩色插页图 2,图 3):假手术组可见少量 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达。缺血组、金纳多小剂量治疗组和大剂量治疗组 caspase-3 和 caspase-9

的蛋白表达均较假手术组显著增多(P 均 <0.01),其分布范围与凋亡细胞的分布基本一致,同样也集中在缺血周边区内。两个金纳多治疗组 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达均较缺血组明显减少(P 均 <0.01),而且大剂量治疗组 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达也均少于小剂量治疗组(P 均 <0.05)。

2.3 caspase-3 及 caspase-9 的 mRNA 表达(表 1,图 4,图 5):RT-PCR 结果显示,假手术组 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 仅见微弱表达,其他 3 组 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达均较假手术组显著增多(P 均 <0.01),两个金纳多治疗组 caspase-3 及 caspase-9 的 mRNA 表达与缺血组比较均显著下降(P 均 <0.01),且大剂量治疗组 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达均较小剂量治疗组下降明显(P 均 <0.05)。

3 讨论

银杏叶提取物的主要有效成分为含有体积分数为 24% 的类黄酮和 6% 的萜内酯。银杏叶具有广泛生物学效应,其主要作用机制是能清除自由基,扩张血管,增加脑血流量,改善脑缺血、缺氧,减轻脑水肿,拮抗血小板活化因子(PAF),影响神经介质和改善学习记忆等^[7]。

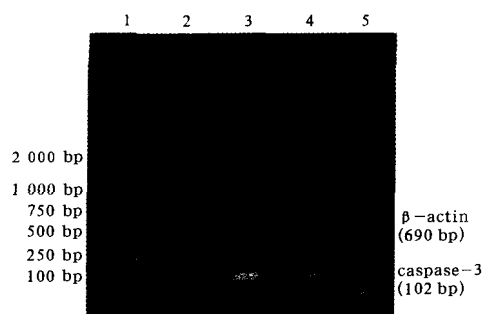
脑缺血时缺血中心区神经元以坏死为主,而缺

表 1 各组大鼠脑 I/R 后神经元凋亡及 caspase-3、caspase-9 的蛋白和 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of apoptotic cells, caspase-3, caspase-9 proteins and mRNA of rats after cerebral I/R in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	神经元凋亡	caspase-3 蛋白	caspase-9 蛋白	caspase-3 mRNA	caspase-9 mRNA
假手术组	5	3.20 $\pm$ 1.79	1.94 $\pm$ 0.68	1.67 $\pm$ 0.76	0.71 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.07
缺血组	5	64.40 $\pm$ 11.59*	43.32 $\pm$ 7.11*	42.95 $\pm$ 7.43*	1.89 $\pm$ 0.16*	1.99 $\pm$ 0.17*
金纳多小剂量治疗组	5	41.20 $\pm$ 7.79*#	29.05 $\pm$ 5.81*#	28.72 $\pm$ 5.68*#	1.58 $\pm$ 0.13*#	1.51 $\pm$ 0.14*#
金纳多大剂量治疗组	5	30.60 $\pm$ 7.06*# Δ	20.14 $\pm$ 4.28*# Δ	19.81 $\pm$ 4.66*# Δ	1.39 $\pm$ 0.10*# Δ	1.29 $\pm$ 0.11*# Δ

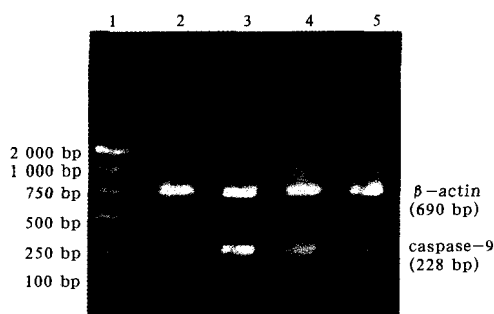
注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与缺血组比较,# $P<0.01$;与金纳多小剂量组比较, $\Delta P<0.05$



1~5 依次为:Marker、假手术组、缺血组、金纳多小剂量治疗组、金纳多大剂量治疗组

图 4 RT-PCR 检测各组大鼠 caspase-3 mRNA 表达

Figure 4 Comparison of caspase-3 mRNA after cerebral I/R in each group



1~5 依次为:Marker、假手术组、缺血组、金纳多小剂量治疗组、金纳多大剂量治疗组

图 5 RT-PCR 检测各组大鼠 caspase-9 mRNA 表达

Figure 5 Comparison of caspase-9 mRNA after cerebral I/R in each group

血半暗带区则以神经元凋亡为主要形式。脑缺血后治疗的关键就在于及时挽救缺血周边区即半暗带区内尚未死亡的神经元,因此如何有效的拮抗脑缺血后神经元凋亡、挽救半暗带是治疗缺血性脑血管病的关键^[8-9]。细胞内有一套精细复杂的信号系统在调控着凋亡过程。Caspases 是一大类凋亡调控基因,对神经元的凋亡起着关键的作用,凋亡的最后实施是通过 caspases 的激活而实现的。Caspases 通常以无活性的酶原形式存在,各种凋亡信号激活上游的 caspase 启动子,进而激活下游的 caspase 效应子,对特定的底物进行切割,激活核酸内切酶,抑制 DNA 修复酶,从而破坏细胞骨架蛋白和核蛋白,使染色体断裂成小片段,这些不可逆的改变最终可导致细胞死亡^[10]。线粒体通路是与 caspase 激活相关的一条凋亡调控通路。氧自由基、钙超载等凋亡刺激因素使线粒体通透性增加,线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)下降,释放细胞色素 C (CytoC), CytoC 主要激活 caspase - 9,进而也激活下游的 caspase - 3,诱导细胞凋亡^[11-13]。本实验显示,缺血组神经元凋亡数以及 caspase - 9 和 caspase - 3 的蛋白及 mRNA 表达均较假手术组显著增加,提示线粒体通路参与了脑缺血后神经元凋亡的调控。我们给予金纳多治疗能显著减少脑缺血后神经元凋亡,并能减少缺血周边区 caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白及 mRNA 表达,提示银杏叶提取物可能通过减少 caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白及 mRNA 表达,抑制线粒体通路来减少神经元凋亡,发挥其脑保护作用。另外还发现银杏叶提取物的抗凋亡作用与剂量有关,大剂量治疗组神经元凋亡数以及 caspase - 3 和 caspase - 9 的蛋白及 mRNA 表达均明显少于小剂量治疗组,提示银杏叶提取物的脑保护作用表现为剂量依赖性。

参考文献:

- [1]周宜轩,韩明向,孔秀妮,等.银杏叶胶囊治疗冠心病心绞痛的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,1997,4(3):109-111.
- [2]蒋军广,谭伟丽,王丽华,等.银杏叶提取物对老年肺心病患者脂质过氧化损伤的影响[J].中国危重病急救医学,2006,18(4):246-247.
- [3]张鸿,郑东明,赵冬雪,等.银杏叶提取物对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].中国老年学杂志,2004,24(5):439-440.
- [4]秦兵,张根葆,陈冬云,等.银杏内酯 B 对脑缺血/再灌注神经元损伤的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(1):17-20.
- [5]Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(8):1037-1043.
- [6]Shi J, Yang S H, Stubble L, et al. Hypoperfusion induces overexpression of β -amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model[J]. Brain Res, 2000, 853(1):1-4.
- [7]朱卫,张晓彪.银杏叶制剂对脑血管病治疗的概况[J].国外医学·脑血管疾病分册,1998,6(4):235-238.
- [8]Kametsu Y, Osuga S, Hakim A M. Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(4):416-422.
- [9]李建生,任小巧,刘柯,等.老龄大鼠脑缺血/再灌注神经细胞凋亡变化规律研究[J].中国危重病急救医学,2004,16(3):151-154.
- [10]Bratton S B, MacFarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1):27-33.
- [11]Zhou P, Chou J, Olea R S, et al. Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20):11265-11270.
- [12]张鸿,刘艳艳,马英,等.ATP 敏感性钾通道开放剂对脑缺血/再灌注损伤的保护作用及信号转导机制研究[J].中国危重病急救医学,2007,19(4):221-224.
- [13]余琴华,蒋红玉,张思为,等.芪棱汤对线粒体介导 caspase-9 依赖凋亡通路的干预[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(1):21-25.

(收稿日期:2007-05-12 修回日期:2007-07-27)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

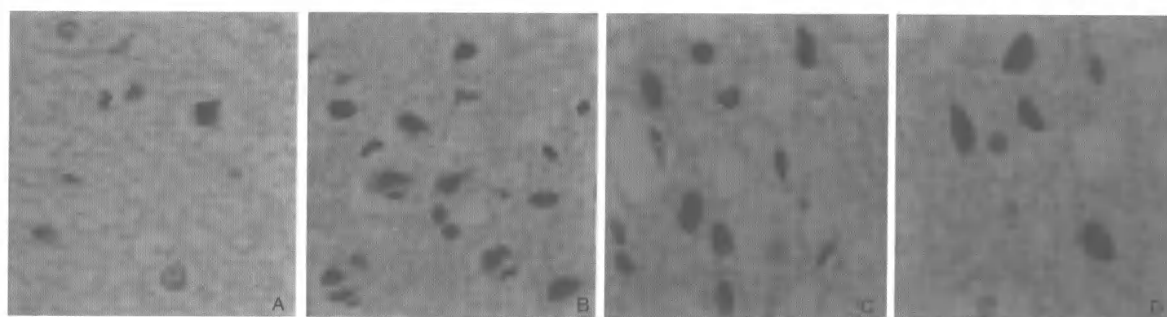
《中国危重病急救医学》杂志投稿须知

为缩短稿件修改时间,提高效率,加快文稿刊发速度,请作者在投稿时注意以下问题:①来稿须实事求是、数据可靠,具有科学性、逻辑性和时效性,文字精练,引用资料应给出文献依据。②论著类文章在正文前应有内容、格式完全相同的中英文摘要[按目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)、结论(Conclusions)4个部分分别说明]以及关键词(3~8个),全部作者的中、英文姓名及单位,中、英文摘要均一式2份。③文稿作者顺序排名(不排列作者),作者单位及邮政编码在作者姓名后注明。英文的作者顺序及单位写法与中文完全相同。④在文稿首页下脚注明第一作者姓名(出生年),性别(民族),籍贯,硕士以上学位,职称,主要研究方向、研究成果及业绩,发表论文数,国外进修情况及学术地位等。⑤如文稿属科研基金资助项目或重点攻关、研究课题,请在文稿首页的脚注中一并注明,出示课题号,并务必同时寄上述证明复印件(A4复印纸)。⑥投稿请提供软盘(WPS、WORD打字,如用方正、华光系统打字,请另存为“纯文本”文件,文件名控制在8个字符以内),并交文字稿2份。

(期刊编辑部)

金纳多注射液对脑缺血/再灌注后caspase-3和caspase-9表达的影响

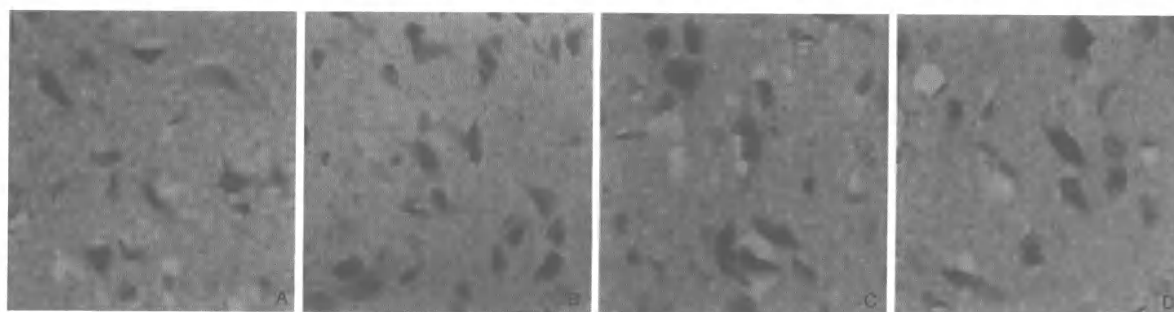
(正文见344页)



A:假手术组; B:缺血组; C:金纳多小剂量治疗组; D:金纳多大剂量治疗组

图1 各组大鼠脑I/R后神经元凋亡结果(TUNEL, ×400)

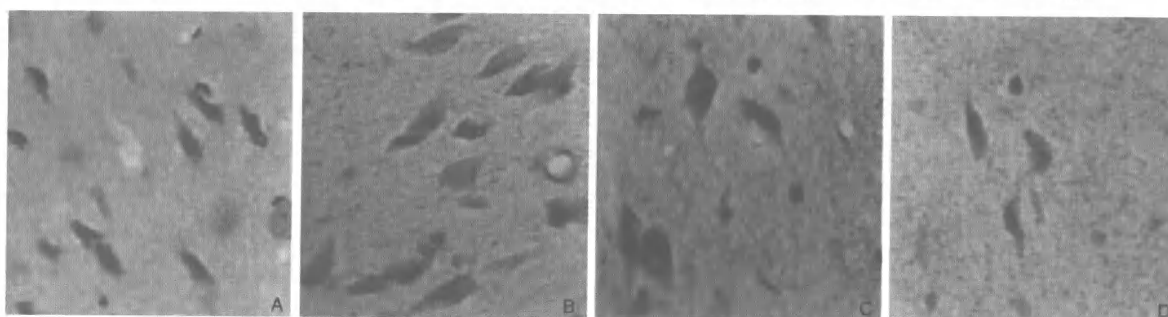
Figure 1 Comparison of neuronal apoptosis after cerebral I/R in each group(TUNEL, ×400)



A:假手术组; B:缺血组; C:金纳多小剂量治疗组; D:金纳多大剂量治疗组

图2 各组大鼠脑I/R后caspase-3蛋白表达(免疫组化, ×400)

Figure 2 Expression of caspase-3 protein after cerebral I/R in each group(immunohistochemical, ×400)



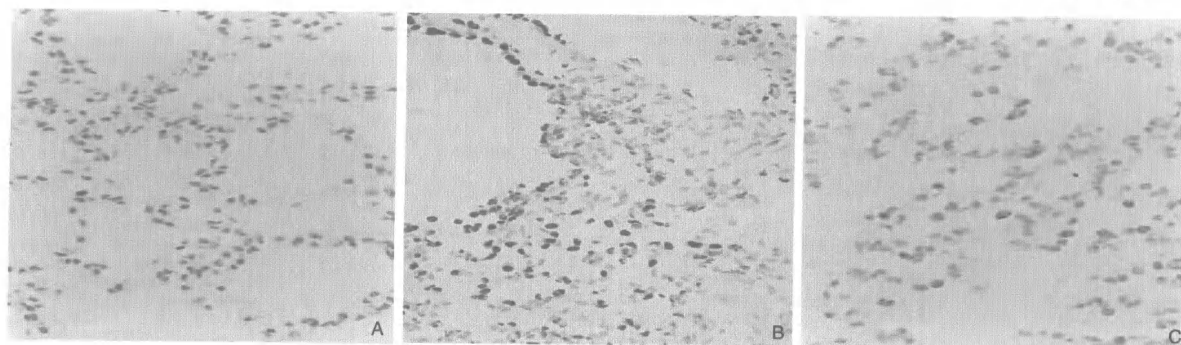
A:假手术组; B:缺血组; C:金纳多小剂量治疗组; D:金纳多大剂量治疗组

图3 各组大鼠脑I/R后caspase-9蛋白表达(免疫组化, ×400)

Figure 3 Expression of caspase-9 protein after cerebral I/R in each group(immunohistochemical, ×400)

生脉注射液对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响

(正文见361页)



A: C组; B: I/R组; C: SMI组

图1 LIRI时各组大鼠肺组织细胞凋亡的表达(TUNEL, ×400)

Figure 1 Expression of cell apoptosis in lung tissue in LIRI(TUNEL, ×400)