

· 基础研究 ·

丁基苯酞对沙土鼠脑缺血再灌注损伤后 p-ERK 表达的影响

赵丽薇¹, 聂莹雪²

(1. 沈阳医学院沈洲医院神经内一科, 辽宁沈阳 110002; 2. 中国医科大学附属一院神经内科, 辽宁沈阳 110001)

摘要:目的 采用沙土鼠全脑缺血再灌注模型动态观察丁基苯酞(NBP)对脑缺血再灌注损伤后 p-ERK 表达的影响。方法 健康雄性沙土鼠分为 3 组:假手术组、再灌注组、NBP 治疗组,采用 Nissl 染色和 Western blot 法分别于 1、3、7 d 测沙土鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区神经锥体细胞的变化和 p-ERK 的表达。结果 与假手术组对比,再灌注组神经元数量大量减少,NBP 治疗组神经元数量相对较多。NBP 治疗组较再灌注组 p-ERK 升高明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 NBP 能通过调节 p-ERK 的表达起到改善沙土鼠脑缺血再灌注损伤的作用。

关键词: NBP; p-ERK; 脑缺血; 再灌注损伤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)12-1377-03

Effect of NBP on the expression of p-ERK in gerbil after cerebral ischemia-reperfusion

Zhao Liwei¹, Nie Yingxue²

(1. First Department of Neurology, Shenzhou Hospital, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110002, China;

2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

Abstract: Objective To observe the effect of NBP on the impact of p-ERK in gerbil after cerebral ischemia reperfusion(I/R) injury. Methods Healthy male gerbils were randomly divided into 3 groups(CON, I/R, I/R+NBP). Measurement of the gerbil global cerebral ischemia reperfusion in hippocampus CA1 pyramidal cells and the changes of p-ERK expression were conducted by Nissl staining and Western blot method after 1, 3, 7 days. Results A large number of neurons reduced in the reperfusion group. The number of neurons in the NBP treatment group was more than that of reperfusion group. P-ERK rose in reperfusion group, which showed significant difference($P < 0.01$). Conclusion NBP may protect the brain tissue in gerbil after cerebral ischemia reperfusion injury by regulating p-ERK expression.

Key words: NBP; p-ERK; brain ischemia; reperfusion injury

许多临床及实验研究证明,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号传导通路对脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡起到重要的调控作用^[1]。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)是 MAPK 家族中的一个亚族,在脑缺血发生后,释放出许多因子包括生长因子、细胞因子等,它们可激活 MAPK 通路,在细胞质中使细胞骨架磷酸化,通过磷酸化转录因子调节基因表达^[2]。有研究表明缺血后再灌注时 ERK 活性的增加是促进细胞存活的保护机制^[3]。丁基苯酞(NBP)是从芹菜籽中提取的经合成的消旋化合物,已有研究表明 NBP 能够从多个环节改善脑缺血的损伤。本次实验旨在研究 NBP 能否通过调节 p-ERK 的表达起到对沙土鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织的保护作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物及分组 54 只健康雄性沙土鼠(体质量 60~70 g)随机分为 3 组:假手术组(CON 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、NBP 治疗组(I/R+NBP 组),每组 18 只。每组又分为 3 个亚组(1、3、7 d),每个亚组 6 只。I/R+NBP 组:造模过程同 I/R 组,于缺血后 10 min 松开夹子立即腹腔注射 NBP 40 mg/kg。CON 组:仅游离双侧颈总动脉但不阻断,术后立即腹腔注射植物油(量同 I/R+NBP 组),余步骤相同。I/R 组:行双侧颈总动脉钳夹术。于缺血后 10 min 松开夹子立即腹腔注射植物油(量同 I/R+NBP 治疗组)。以上各组分别于再灌注 1、3、7 d 用 Western blot 法检测海马 p-ERK 的表达,用 Nissl 染色法观察海马 CA1 区神经锥体细胞的变化。

1.2 方法

1.2.1 仪器及试剂 沙土鼠手术器械一套,电热恒温水浴箱,台式高速离心机(TG 16-WS 型长沙湘仪仪器有限公司),匀浆机(DLAX900 型德国 Heidolph 公司),分光光度计(722S 型,上海精密科学仪器有限公司),电泳仪(Multiplier II,瑞典 Pharmacia Biotech 公司),水浴式电转印槽(DDY-III 型,北京六一仪器厂),显微摄影系统(Olympus AX70,日本),显微图像分析系统(Meta-morph),丁基苯酞(石药集团丁基苯酞药业公司),多克隆抗磷酸化 ERK 抗体(武汉博士德生物制剂公司),山羊抗兔的 IgG 辣根过氧化物酶的二抗(武汉博士德生物制剂公司)。

1.2.2 实验方法 沙土鼠用 4% 的戊巴比妥钠(40 mg/kg,腹腔注射)进行麻醉,在沙土鼠的颈部采取正中切口分离双侧颈部肌肉和脂肪组织以及游离双侧迷走神经纤维,暴露双侧颈总动脉,用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉,夹闭 10 min 后松开动脉夹,见双侧颈总动脉血液充盈,双侧颈总动脉重新恢复供血,颈部切口用 4 号尼龙线缝合,乙醇消毒。然后分别再灌注 1、3、7 d,制备脑缺血再灌注模型。

1.2.3 Nissl 染色 石蜡切片常规脱蜡,脱蜡之后,切片用 ddH₂O 冲洗 10 min,2 次,然后放在 Nissl 染液中 2 h(37 °C),结束后按照 100%乙醇(2 次)→二甲苯(2 次)顺序脱水,最后中性树胶封片。镜下观察海马 CA1 区神经锥体细胞的变化。

1.2.4 Western blot 法测沙土鼠海马 CA1 区 p-ERK 每只沙土鼠从左侧大脑半球分离出海马组织,称质量,按 1:4 的比例加入蛋白裂解液,超声粉碎海马组织,4 °C 水平摇床过夜。

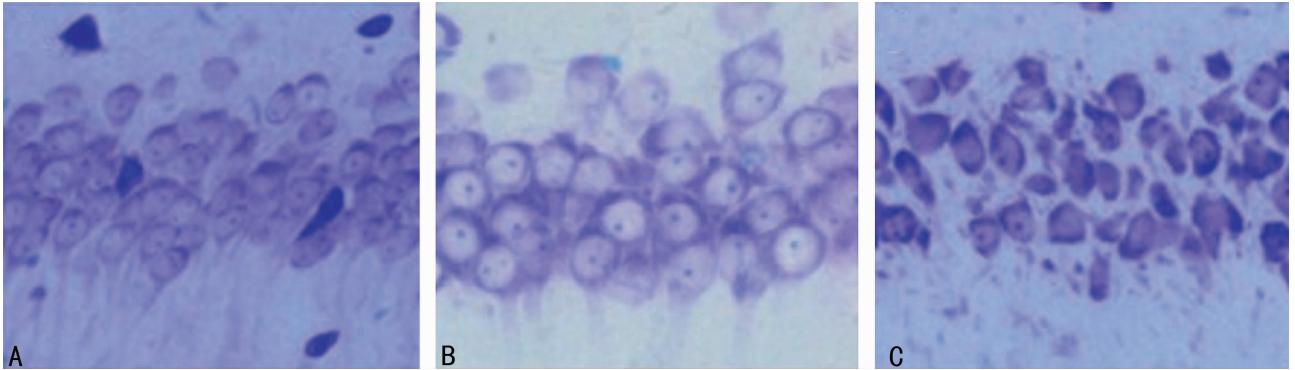
次日 12 000 r/min, 离心 30 min, 分装蛋白, 用紫外分光光度计测蛋白质水平, 然后配胶→上样→跑电泳(浓缩胶 90 V×30 min, 分离胶 110 V×1 h)→转膜(50 V×2 h), 用丽春红染液染色, 裁取目的条带, TBST(PH 7.6, 下同)洗膜 10 min×3 次, 室温下封闭液(5 g 脱脂奶粉+100 mL TBST)封闭 1 h, TBST 洗膜 10 min×3 次, 然后加入多克隆抗磷酸化 ERK 抗体的一抗(1:200), 4℃水平摇床过夜。次日, TBST 洗膜 10 min×3 次, 加山羊抗兔的 LgG 辣根过氧化物酶的二抗(1:5 000), 室温下水平摇床 1 h, TBST 洗膜 10 min×3 次, 发光, 用 Image J 对目的条带进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件处理分析。计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

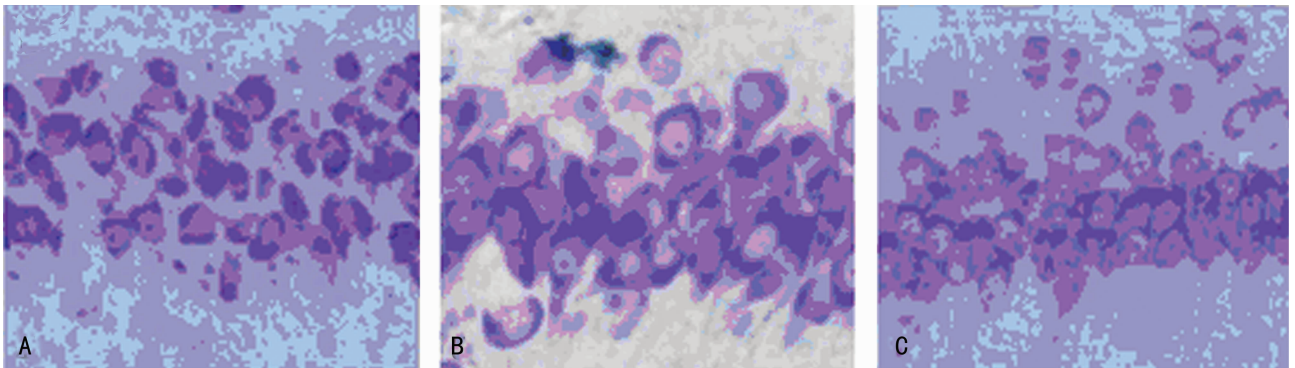
2 结 果

2.1 Nissl 染色 光镜下, CON 组海马 CA1 区锥体细胞形态完整, 细胞大而圆, 尼氏体位于胞浆, 深染(图 1)。I/R 组海马 CA1 区大多数锥体细胞排列紊乱, 胞体缩小、变形, 核固缩, 并向周围扩散(图 2)。I/R+NBP 组细胞排列较整齐, 细胞大而圆, 尼氏体深染, 但仍可见少量胞浆浓染(图 3)。从锥体细胞数的变化上, I/R 组神经元大量减少, 不着色; I/R+NBP 组神经元数量较多($P < 0.01$)。再灌注 3 d 锥体细胞减少最多, I/R+NBP 组与 I/R 组趋势一致, 见图 10。



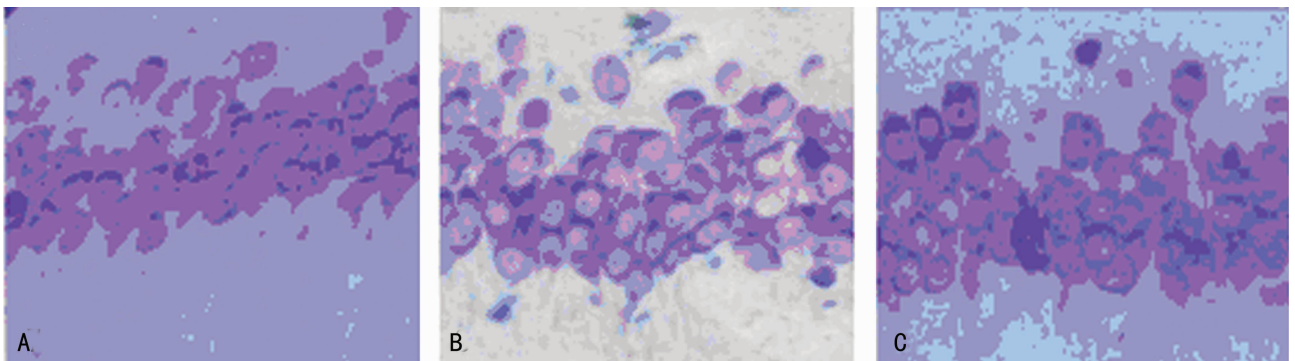
A:1 d;B:3 d;C:7 d.

图 1 CON 组不同时间沙土鼠海马 CA1 区锥体细胞



A:1 d;B:3 d;C:7 d.

图 2 I/R 组不同时间沙土鼠海马 CA1 区锥体细胞

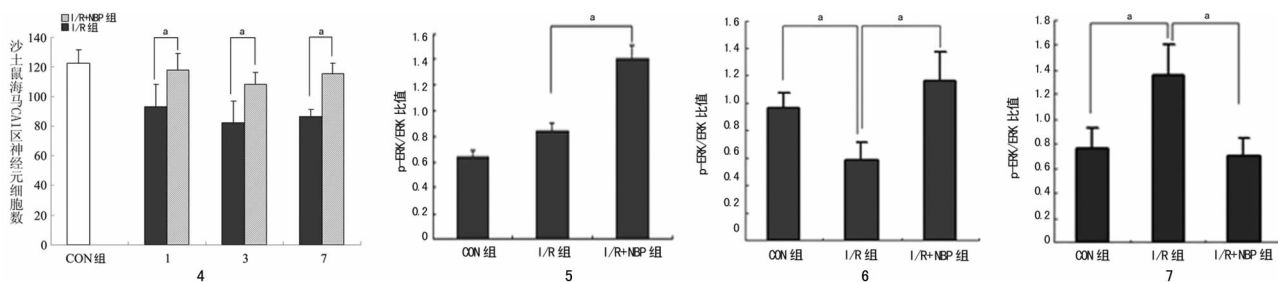


A:1 d;B:3 d;C:7 d.

图 3 I/R+NBP 组不同时间沙土鼠 CA1 区锥体细胞

2.2 Western blot 检测 p-ERK 的结果 Western blot 结果表明, CON 组 1 d 时的表达最低, I/R 组中海马组织的表达升高, 而 I/R+NBP 组的升高较之明显, 与 I/R 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 d 时两组的表达均有所下降, 但 I/R+

NBP 组仍明显高于 I/R 组($P < 0.01$)。7 d 时 I/R 组的表达再次升高, 而 I/R+NBP 组降至同 CON 组, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4~7。



a, $P < 0.01$.

图 4 沙土鼠脑缺血再灌注 1、3、7 d 后海马 CA1 区椎体细胞数的变化; 图 5 沙土鼠脑缺血再灌注 1 d 时 3 组 p-ERK 的表达; 图 6 沙土鼠脑缺血再灌注 3 d 时 3 组 p-ERK 的表达; 图 7 沙土鼠脑缺血再灌注 7 d 时 3 组 p-ERK 的表达

3 讨 论

随着对脑缺血再灌注损伤机制研究的不断深入,越来越多的证据表明细胞外信号转导系统对缺血后中枢神经系统神经细胞的存活与死亡起着重要的调节作用^[4]。其中脑缺血后 ERKs 的活性增强,在缺血区活化增多是一致的,但 ERKs 在脑缺血后对神经元的作用存在争议。Li 等^[5]报道 p-ERK 在脑缺血后活性增加与改善神经元存活有关,促进神经元细胞增殖、分化、抑制死亡。邢变枝等^[6]研究发现缺血后处理可提高大鼠脑缺血再灌注后皮质内 ERK1/2 和 Akt 活性,减少神经细胞凋亡。Alessandrini^[7]等报道在局灶性脑缺血前 30 min 应用 ERKs 抑制剂可分别减少再灌注 2 h 和 72 h 梗死容积,同时 ERKs 的活化减少,认为 ERKs 在脑缺血中被活化起神经毒性作用,诱导缺血性损伤。与决定神经元存活和死亡没有明显的关系。另一方面,更多的文献报道则证明 ERKs 在脑缺血后活性增加,与改善神经元存活有关。

NBP 是 2002 年研发的一种专门用于治疗脑血栓的国家级一类新药,主要成分是从南方水芹菜中发现的一种极微量的天然单体,目前的研究表明 NBP 主要从以下几个环节改善脑缺血的损伤。(1)改善脑微循环,抑制血小板聚集,发挥抗脑缺血作用。有学者研究发现 NBP 可抑制大脑皮层细胞 TXA2 的合成^[8],上调 VEGF 的表达和延长表达的时限^[8],以刺激体内(尤其是缺血部位)的血管形成。(2)抑制钙超载和兴奋性氨基酸的作用。李静等^[9]发现 NBP 能完全抑制低糖低氧造成的神经细胞内钙升高,降低内质网钙库释放,NBP 还对谷氨酸引起的内钙升高表现出抑制作用,从而减轻钙超载产生的严重毒性作用。(3)改善线粒体作用和抗氧化作用。肖向建等^[10]研究证明 NBP 能明显增加缺血侧神经细胞线粒体和脑皮层总超氧化物歧化酶(SOD)的活性,显著升高线粒体谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性,明显降低缺血时大脑线粒体丙二醛(MDA)的含量。(4)抑制细胞凋亡。熊杰等^[11]研究发现在缺血前 10 min 腹腔注射 NBP 可以明显降低 c-Fos 的表达,李嘉等^[12]发现丁苯酞可以减轻 SD 大鼠神经功能缺损症状,缩小梗死体积,减少 caspase-3 表达,参与细胞周期的调节、损伤后修复等生理过程。

本实验通过 Nissl 染色从形态学上可以观察到 NBP 确实具有减轻沙土鼠脑缺血再灌注损伤的作用。且实验显示,沙土鼠全脑缺血再灌注损伤后 p-ERK 在 CON 组的表达最低,而 I/R+NBP 组较 I/R 组的 p-ERK 升高明显,3 d 时最为明显。总之通过本实验可以提示 NBP 可能通过调节 p-ERK 的表达起到对沙土鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织的保护作用。支持 p-ERK 在脑缺血后活性增加与改善神经元存活的理论。

参考文献:

- [1] Ma XL, Kumar S, Gao F, et al. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Circulation*, 1999, 99(13): 1685-1691.
- [2] Wu DC, Ye W, Che XM, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(9): 1320-1330.
- [3] Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of caspases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387(1/2): 17-31.
- [4] Wieloch T, Hu BR, Boris-Moiler A, et al. Intracellular signal transduction in the postischemic brain[J]. *Adv Neurol*, 1996, 71(9): 371-387.
- [5] Li F, Omori N, Sato K, et al. Coordinate expression of survival p-ERK and proapoptotic cytochrome signals in rat brain neurons after transient MCAO[J]. *Brain Research*, 2002, 958(1): 83-88.
- [6] 邢变枝, 陈晖, 张苏明. 缺血后处理对脑缺血再灌注损伤后 ERK1/2 和 Akt 磷酸化及神经细胞凋亡的影响[J]. *神经功能损伤与重建*, 2012, 7(3): 175-179.
- [7] Alessandrini A, Namura S, Molkowitz MA, et al. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12866-12869.
- [8] Chong ZZ, Feng YP. Effects of dl-3-n-butylphthalide on production of TXB2 and reperfusion[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1997, 18(6): 505-508.
- [9] 李静, 魏光宇. 丁苯酞对缺氧/复氧诱导大鼠皮层神经元的保护作用[J]. *山西医科大学学报*, 2010, 41(1): 1-3.
- [10] 肖向建, 齐亚超, 张晓玲, 等. 丁苯酞注射液对慢性脑缺血大鼠自由基代谢及海马聚腺苷二磷酸核糖聚合酶表达的影响[J]. *山东医药*, 2010, 50(45): 26-27.
- [11] 熊杰, 冯亦璞. 丁苯酞对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑 hsp70mRNA 和 c-Fos 时相表达的影响[J]. *药学学报*, 1998, 33(6): 401-406.
- [12] 李嘉, 顾承志, 秦婧, 等. 丁苯酞预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的干预研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(17): 2104-2106.