

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.10.002

TERT 基因转染 BMSC 血管性痴呆大鼠记忆功能及 海马 CA1 区突触可塑性的影响*

段金旗¹, 马丽琼², 刘远林¹, 任 炜¹, 陈媛媛¹, 李春岩³

(1. 张家口学院医学院, 河北张家口 075000; 2. 解放军 251 医院重症医学科, 河北张家口 075000; 3. 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000)

[摘要] **目的** 探讨端粒酶逆转录酶(TERT)基因转染骨髓基质干细胞(BMSC)对血管性痴呆大鼠记忆功能及海马 CA1 区突触可塑性的影响。**方法** 60 只大鼠随机分为阴性对照组(A组)、模型组(B组)、常规 BMSC 组(C组)和转染 BMSC 组(D组); 采用 Morris 迷宫测试、RT-PCR 和蛋白免疫印迹法检测各组大鼠相关指标。**结果** C组、D组逃避潜伏期显著长于 B组; D组逃避潜伏期显著长于 B组。与 A组比较, B组、C组、D组脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA、TERT mRNA、突触前区突触素(SYP)mRNA 及蛋白表达均显著降低, A组大鼠突触间隙排列清晰, SYN 阳性细胞数较多; D组突触间隙更为清晰, SYN 阳性细胞数量和突触间隙排列结构都接近于 A组。**结论** TERT 转染 BMSC 对血管性痴呆大鼠的治疗作用明显, 其作用机制与促进 BDNF、TrkB 表达、改善突触的可塑性有关。

[关键词] 端粒酶逆转录酶; 骨髓基质干细胞; 痴呆, 血管性; 记忆功能; 突触; 可塑性

[中图分类号] R743.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)10-1300-04

Effect of TERT gene transfected BMSC on memory function and hippocampal CA1 region synaptic plasticity in vascular dementia rat*

Duan Jinqi¹, Ma Liqiong², Liu Yuanlin¹, Ren Wei¹, Chen Yuanyuan¹, Li Chunyan³

(1. Medical College of Zhangjiakou University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Department of Intensive Care Medicine, 251 Hospital of PLA, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

3. Department of Neurology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of telomerase reverse transcriptase(TERT) gene transfected bone marrow stem cell(BMSC) on the memory function and hippocampal CA1 region synaptic plasticity in vascular dementia rat. **Methods** A total of 60 rats were randomly divided into the negative control group(group A), model group(group B), conventional BMSC group(group C) and transfected BMSC group(group D). The related indicators in each group were detected by using the Morris maze test, RT-PCR and Western blot respectively. **Results** The escape latency period in the group C and group D was significantly longer than that in the group B, which in the group D was significantly longer than that in the group C. Compared with the group A, the expressions of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) mRNA, TERT mRNA, SYP mRNA and protein in the group B, group C and group D were significantly decreased. The synaptic cleft arrange in group A was clear with more SYN positive cells. The synaptic cleft in the group D was clearer, and the number of SYN positive cells was close to that in group A. **Conclusion** TERT transfected BMSC has obvious therapeutic effect on vascular dementia rats and its mechanism may be related to the promotion of BDNF, TrkB expression and the improvement of synaptic plasticity.

[Key words] telomerase reverse transcriptase; bone marrow stromal stem cells; dementia, vascular; memory function; synaptic; plasticity

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是脑血管病所诱发的智力损害,目前 VD 已经成为老年期痴呆的主要病因之一^[1-2]。骨髓基质干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)具有促进神经元细胞分化能力,是一种理想的种子细胞^[3]。有报道称对脑缺血大鼠移植 BMSC 能够促进脑组织重塑和血管再生^[4];然而在移植 BMSC 过程中常发生 BMSC 衰老、凋亡以及增殖不稳定情况,表现为突触前区突触素(synaptophysin, SYP)数量、密度显著降低,这可能与端粒酶活性降低有关^[5]。鉴于此,本研究将端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)转染的 BMSC 移植至 VD 大鼠中,观察大鼠的行为学及海马 CA1 区 SYP、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)其受体酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase B, TrkB)变化水平,旨在为 VD 的治疗提供依据,现将研

究成果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物来源 本研究设计动物实验及操作均经张家口学院伦理委员会审核批准。60 只健康 SD 级成年雄性大鼠购自河北北方学院动物实验中心,体质量 240~310 g,平均(278.5±13.7)g。所有大鼠均常规自由进食进水,喂养室温 20~22℃,空气湿度 50%,光照 12 h 后黑暗 12 h 昼夜交替,待饲养 1 周后进行实验。

1.2 主要仪器与试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 ATCC 公司;DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司;TERT、BMSC 均购自上海桑尼生物科技有限公司;BDNF、TrkB、SYP 抗体均购自美国 Sigma 公司。PCR 仪购自美国 ABI 公司;H-7650 透射电镜购自日本日立公司;Nucleofector II 细胞核转染仪瑞士

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171210)。 作者简介:段金旗(1975—),副教授,本科,主要从事急救医学教学工作。

Lonza 公司。

1.3 方法

1.3.1 VD 大鼠模型的制备 60 只大鼠按照随机数字表分为阴性对照组(A 组)、模型组(B 组)、常规 BMSC 组(C 组)和转染 BMSC 组(D 组),每组各 15 只;其中阴性对照组不给予任何干预措施,VD 大鼠模型制备方法:采用结扎双侧颈总动脉(2-VO)法^[6]:术前大鼠禁水 4 h、禁食 12 h,腹腔注射 10%水合氯醛(注射剂量:0.5 mL/100 g);待大鼠麻醉后置于操作台上,取出颈部毛,常规消毒将于颈部正中做一约 2~3 cm 切口,皮下组织钝性分离后将气管充分暴露,用眼科镊将气管两侧颈总动脉逐层分离并显露,再采用 3-0 缝合线将双侧颈总动脉结扎,确认结扎成功后缝合伤口,并涂抹万古霉素消毒。大鼠苏醒后常规进食进水,检测大鼠生命体征并观察行为变化。术后第 2 天将存活的大鼠进行 Morris 迷宫测试,大鼠平均逃避潜伏期大于 2 倍对照组大鼠平均逃避潜伏期判定为 VD 大鼠造模成功标准。

1.3.2 TERT 转染 BMSC 将 BMSC 接种于 6 孔板中,分为 3 组:对照组、逆转录病毒载体(plxsn)组,plxsn-TERT 组,待细胞汇合率达到 90%时,分别于每孔加入 3 μg 载体、Lipofectamine 2000 10 mL、LDMEM 培养基 3 mL,转染 6 h 后更换培养基,转染 24 h 后进行传代(1:10),转染 48 h 后加入 G418 (200 μg/mL)筛选。

1.3.3 BMSC 细胞移植 A 组和 B 组不注射任何药物,常规喂养;常规 BMSC 组尾静脉注射 1 mL BMSC(浓度:4×10⁶ 个/mL),转染 BMSC 组尾静脉注射 1 mL TERT-BMSC(浓度:4×10⁶ 个/mL);注射后常规喂养 6 周。

1.4 观察指标 (1)移植 2 个月对 4 组大鼠采用 Morris 迷宫测试^[7-9]:①定位航行测试,将大鼠分别从 4 个象限放入水中,记录大鼠的逃避潜伏期;②空间探索测试:撤去平台,记录 120 s 内大鼠在第一象限停留的时间。(2)将大鼠处死,快速切取大鼠海马 CA1 区组织,采用 Trizol 法提取脑组织 RNA 并逆转录成 cDNA,以 β-actin 为内参,采用 RT-PCR 法检测组织中 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA 表达水平。RT-PCR 总反应体系 20 μL,其中 cDNA 3 μL,上下游引物 0.5 μL。设置 PCR 反应条件:94 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 1 min,55 °C 退火 30 s,总计 30 个循环;各引物序列及长度见表 1。(3)采用蛋白免疫印迹检测大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYP 蛋白表达:取各组大鼠海马 CA1 区脑组织 200 g,加入 1 mL 蛋白酶抑制剂,提取总蛋白。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各蛋白,再将分离出的蛋白转移至 PVDF 膜上 25 mA 恒流过夜。分别加入 BDNF、TrkB、SYP 一抗室温孵育 2 h,再加入辣根过氧化物标记的二抗室温孵育 1.5 h,最后加入辣根过氧化物标记的 actin 抗体,经化学发光法检测,图片扫描保存,计算目的蛋白相对含量,其中目的蛋白相对含量=目的蛋白灰度值/内参 actin 蛋白灰度值。(4)切取海马 CA1 区脑组织,常规固定、切片、染色后,用透射电镜观察海马 CA1 区神经元突触的超微结构。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行检验,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

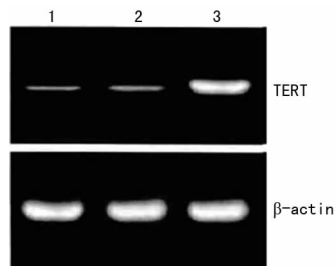
2.1 各组大鼠一般情况比较 A 组大鼠均正常喂养,全部存活;B 组有 3 只大鼠在行颈总动脉结扎时死亡,其余 12 只存活;C 组有 2 只在颈总动脉结扎时死亡,2 只因腹腔感染死亡,其余 11 只存活;D 组 1 只在颈总动脉结扎时死亡,1 只在注射

TERT-BMSC 后第 2 天不明原因死亡,其余 13 只存活;各组存活大鼠生长发育情况良好。

表 1 RT-PCR 各引物序列及长度

基因	引物序列	长度(bp)
TERT	上游:5'-TCG CGA GCT TGC TTG GCG AC-3'	201
	下游:5'-GCT GTC AGG CGC GCT GCG ATA -3'	
BDNF	上游:5'-GTG ACA TAA GTT CGG ACT GCG-3'	276
	下游:5'-TTT CGA TTA CAT CGC GGA GCT-3'	
TrkB	上游:5'-GCT ACA GCG TAT ATG GTG TGC-3'	246
	下游:5'-GCT GGT TAG GAT CAT GGC AAG T-3'	
SYP	上游:5'-GCC TAG ATT GAC CGA GTT GTG C-3'	361
	下游:5'-TAT TGT GGT GTG TGC GCG TAT G-3'	
β-actin	上游:5'-CAG AGC TAG AAC ACG GCA GCG-3'	436
	下游:5'-TGC GGC GAT GGC TAG GCG TGA-3'	

2.2 TERT mRNA 表达及端粒酶活性与对照组和 plxsn 组比较 plxsn-TERT 组 TERT mRNA 表达水平显著升高,端粒酶活性也显著上升,见图 1~2。



1: 对照组;2: plxsn 组;3: plxsn-TERT 组。

图 1 各组 TERT mRNA 表达水平



1: 对照组;2: plxsn 组;3: plxsn-TERT 组。

图 2 各组端粒酶活性

2.3 各组大鼠 Morris 迷宫测试结果比较 B 组、C 组、D 组逃避潜伏期显著长于 A 组,第一象限停留时间显著少于 A 组(P<0.05);C 组、D 组逃避潜伏期显著长于 B 组,第一象限停留时间显著少于 B 组(P<0.05);D 组逃避潜伏期显著长于 C 组,第一象限停留时间显著少于 C 组(P<0.05),见表 2。

2.4 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA 表达水平 与 A 组比较,B 组、C 组、D 组 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA 均显著降低(P<0.05),其中 D 组 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA 显著高于 B 组、C 组(P<0.05),C 组 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA

又显著高于正常值 ($P < 0.05$), 见图 3、表 3。

表 2 各组大鼠 Morris 迷宫测试结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

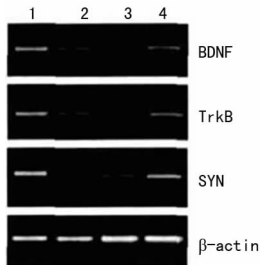
组别	n	逃避潜伏期	第一象限停留时间
A 组	15	22.5 ± 3.5	84.2 ± 15.8
B 组	12	67.4 ± 9.2 ^a	36.8 ± 8.3 ^a
C 组	11	43.2 ± 6.7 ^{ab}	53.2 ± 10.9 ^{ab}
D 组	13	30.9 ± 5.6 ^{abc}	69.7 ± 12.4 ^{abc}
F		120.203	35.723
P		0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 B 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 C 组比较。

表 3 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BDNF mRNA	TrkB mRNA	SYP mRNA
A 组	15	31.8 ± 7.4	33.9 ± 8.6	39.5 ± 10.1
B 组	12	3.5 ± 0.6 ^a	2.9 ± 0.4 ^a	3.1 ± 0.8 ^a
C 组	11	4.7 ± 0.8 ^{ab}	3.4 ± 0.5 ^{ab}	4.0 ± 0.9 ^{ab}
D 组	13	23.1 ± 4.9 ^{abc}	21.5 ± 6.9 ^{abc}	22.5 ± 8.4 ^{abc}
F		112.102	87.224	81.903
P		0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 B 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 C 组比较。



1: A 组; 2: B 组; 3: C 组; 4: D 组。

图 3 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF mRNA、TrkB mRNA、SYP mRNA 表达水平

表 4 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYP 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

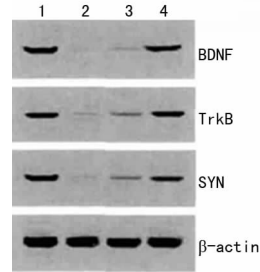
组别	n	BDNF	TrkB	SYP
A 组	15	75.4 ± 12.7	81.4 ± 15.1	68.7 ± 11.9
B 组	12	14.7 ± 4.6 ^a	17.1 ± 5.2 ^a	9.5 ± 3.1 ^a
C 组	11	25.6 ± 9.4 ^{ab}	29.5 ± 10.3 ^{ab}	17.3 ± 5.3 ^{ab}
D 组	13	62.8 ± 11.3 ^{abc}	70.2 ± 12.5 ^{abc}	59.4 ± 9.8 ^{abc}
F		105.314	91.320	151.201
P		0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 B 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 C 组比较。

2.5 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYP 蛋白表达水平与阴性对照组比较 B 组、C 组、D 组 BDNF、TrkB、SYP 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 其中 D 组 BDNF、TrkB、SYP 蛋白表达水平显著高于 B 组、C 组 ($P < 0.05$), C 组 BDNF、

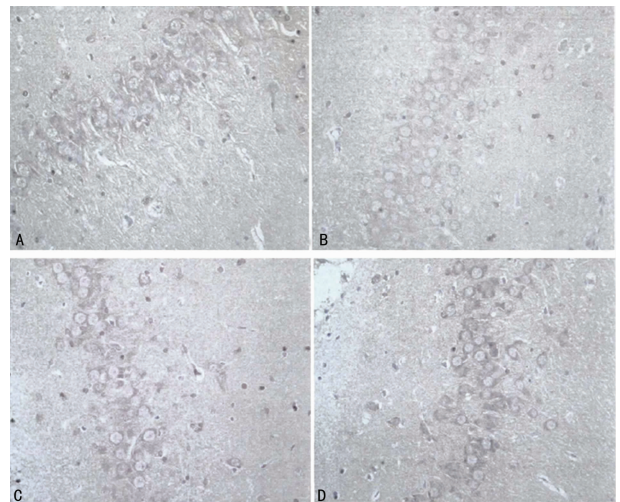
TrkB、SYP 蛋白表达水平又显著高于 B 组 ($P < 0.05$), 见图 4、表 4。

2.6 各组大鼠海马 CA1 区突触素观察结果比较 A 组大鼠突触间隙排列清晰, SYN 阳性细胞数较多; B 组突触间隙排列紊乱, SYN 阳性细胞数量明显减少; C 组突触间隙较模型组更加有序, 且阳性细胞数量有所增加; D 组突触间隙更为清晰, SYN 阳性细胞数量和突出间隙排列结构都接近于 A 组; 见图 5。



1: A 组; 2: B 组; 3: C 组; 4: D 组。

图 4 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF、TrkB、SYP 蛋白表达水平



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 5 光镜下突触素观察结果 (×400)

3 讨论

目前已证实骨髓内含大量干细胞, 其中 BMSC 能够定向分化为成骨细胞、脂肪细胞、神经元细胞等中胚层来源细胞^[10]。BMSC 取材简单、培养方便、具有弱免疫原性等特点, 被认为是理想的干细胞。Park 等^[11]对缺血性脑损伤大鼠移植 BMSC, 结果显示大鼠损伤脑组织血管重新生成, 部分脑组织也得以重塑。但是 BMSC 存在分化能力容易丧失、过度老化、增值不稳定等情况。Veronesi 等^[12]学者对 BMSC 的生物学现象进行研究, 最终提出 BMSC 多种生物学功能均与端粒酶活性有关, 特别是其神经保护功能的效果与端粒酶活性呈明显正相关。端粒酶是核糖核蛋白酶的一种, 在调节染色体的复制中发挥重要作用^[13-14]。本研究亦证实经过端粒酶逆转录酶转染能够使 BMSC 获得更高的端粒酶活性, 这对于提高 BMSC 的增殖速度、预防 BMSC 过度衰老凋亡具有重要作用。Jiang 等^[15]也证实将慢病毒携带的 VEGF 转染至 BMSC, BMSC 的新生血管的形成和自身的增殖能够显著增强。

本研究对 VD 大鼠注射 TERT 转染的 BMSC, 结果显示转染 BMSC 组逃避潜伏期显著长于常规 BMSC 组, 第一象限停

留时间显著少于常规 BMSC 组,说明相比较于普通 BMSC 替代治疗,TERT 转染的 BMSC 治疗 VD 后大鼠学习、记忆能够改善更为明显。Baranova 等^[16]证实 BMSC 能够抑制兴奋性氨基酸所产生的细胞毒作用,使突触传递功能重新恢复,从而改善因神经元损伤所引起的学习、记忆功能损害。Kishi 等^[17]证实 BDNF 是保护神经细胞的主要营养因子,敲除 BDNF 基因后大鼠发生 VD 的风险显著升高。BDNF 发挥相应的作用有赖于与其特异性受体 TrkB 结合;Yasutake 等^[18]报道 BDNF 首先在组织中合成,然后顺轴突运输至突触间隙,并与间隙中受体 TrkB 结合,从而参与神经元细胞的增殖、分化,并对损伤的神经元有恢复作用。本研究亦证实转染 BMSC 组 BDNF、TrkB 表达水平显著高于常规 BMSC 组,提示转染 BMSC 对神经元的修复作用与增强 BDNF、TrkB 表达有关。

Schroeter 等^[19]称通过观察突触结构的变化能够反映出突触结构的可塑性。SYN 是神经元突触前的特异性生物学标志物,能够促进多种神经递质的释放,还能调节突触传递效能;而突触素是反映突触数量、密度和分布的指标之一^[20]。本研究显示转染 BMSC 组 SYN 表达水平显著高于常规 BMSC 组,电镜下观察转染 BMSC 组突触间隙更为清晰,SYN 阳性细胞数量和突出间隙排列结构都接近于阴性对照组,说明移植转染 BMSC 能够透过血脑屏障,从而促进神经细胞的生长,并诱导和产生新生轴突和树突,证实转染 BMSC 能显著改善 VD 大鼠海马 CA1 区突触可塑性,这亦是治疗 VD 的生物学基础。

综上所述,相比于普通 BMSC 替代治疗,TERT 转染 BMSC 对血管性痴呆大鼠的治疗作用明显,其作用机制与促进 BDNF、TrkB 表达、改善突触的可塑性有关。然而神经元损伤修复的作用机制是个复杂过程,包括各种酶、钙离子通道以及 NMDAR1 的磷酸化过程等,因此对其具体作用机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Meguro K, Tanaka N, Nakatsuka M, et al. Vascular lesions in mixed dementia, vascular dementia, and Alzheimer's disease with cerebrovascular disease: the Kurihara Project[J]. *J Neurol Sci*, 2012, 322(1/2): 157-160.
- [2] Meguro K, Akanuma K, Meguro M, et al. Prognosis of vascular mild cognitive impairment includes vascular dementia onset and death by cardiovascular disease: reanalysis from the Osaka-Tajiri project[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2012, 21(7): 607-611.
- [3] Kawakatsu M, Urata Y, Goto S, et al. Placental extract protects bone marrow-derived stem/progenitor cells against radiation injury through anti-inflammatory activity [J]. *J Radiat Res*, 2013, 54(2): 268-276.
- [4] Zhong Y, Xu J, Deng M, et al. Generation of a human bone marrow-derived mesenchymal stem cell line expressing and secreting high levels of bioactive α -melanocyte-stimulating hormone[J]. *J Biochem*, 2013, 153(4): 371-379.
- [5] Ding J, Cheng Y, Gao S, et al. Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(2): 222-230.
- [6] Etgen T, Hochreiter M, Kiechle V. Subclavian-axillary graft plus graft-carotid interposition in symptomatic radiation-induced occlusion of bilateral subclavian and common carotid arteries[J]. *Vasa*, 2013, 42(3): 223-226.
- [7] Gordan ML, Jungwirth B, Ohl F, et al. Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: a comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 235(1): 7-20.
- [8] Alam JJ. Selective Brain-targeted antagonism of p38 MAPK α reduces hippocampal IL-1 β levels and improves morris water maze performance in aged rats[J]. *J Alzheimer's Dis*, 2015, 48(1): 219-227.
- [9] Fridgeirsdottir GA, Hillered L, Clausen F. Escalated handling of young C57BL/6 mice results in altered Morris water maze performance[J]. *Ups J Med Sci*, 2014, 119(1): 1-9.
- [10] Togami W, Sei A, Okada T, et al. Effects of water-holding capability of the PVF sponge on the adhesion and differentiation of rat bone marrow stem cell culture[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(1): 247-253.
- [11] Park SY, Yoon H, Lee N, et al. Analysis of cerebral blood flow with single photon emission computed tomography in mild subcortical ischemic vascular dementia[J]. *Nucl Med Mol Imaging (2010)*, 2014, 48(4): 272-277.
- [12] Veronesi E, Murgia A, Caselli A, et al. Transportation conditions for prompt use of ex vivo expanded and freshly harvested clinical-grade bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for bone regeneration[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(3): 239-251.
- [13] Raichlin S, Sharon E, Freeman R, et al. Electron-transfer quenching of nucleic acid-functionalized CdSe/ZnS quantum dots by doxorubicin: a versatile system for the optical detection of DNA, aptamer-substrate complexes and telomerase activity[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(12): 4681-4689.
- [14] Holmstrom ED, Nesbitt DJ. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer studies of the human telomerase RNA pseudoknot: temperature-/urea-dependent folding kinetics and thermodynamics[J]. *J Phys Chem B*, 2014, 118(14): 3853-3863.
- [15] Jiang Y, Chen L, Tang Y, et al. HO-1 gene overexpression enhances the beneficial effects of superparamagnetic Iron oxide labeled bone marrow stromal cells transplantation in swine hearts underwent ischemia/reperfusion: an MRI study[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(3): 431-442.
- [16] Baranova O, Miranda LF, Pichiule P, et al. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(23): 6320-6332.
- [17] Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Telmisartan protects against cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B in hippocampus of hypertensive rats[J]. *J Cardiol*, 2012, 60(6): 489-494.
- [18] Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, et al. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2006, 256(7): 402-406.

显升高,即反映了肝细胞凋亡的发生。Bcl-2 和 Bax 是主要的细胞凋亡调控基因,Bcl-2 抑制细胞凋亡,Bax 促发细胞凋亡,Bcl-2 与 Bax 的比例决定细胞凋亡是否发生^[16-17]。本实验结果显示(图 2、3 和表 3),与 A 组比较,模型小鼠出现了明显的肝组织损伤和细胞凋亡。与 B 组比较,D 组都能显著减少肝细胞早期凋亡百分数和 caspase-3、Bax 蛋白的表达($P < 0.01$);显著增加小鼠肝细胞 Bcl-2 蛋白的表达($P < 0.05$);Bax/Bcl-2 比值显著降低($P < 0.05$)。提示萱草花黄酮对减轻肝细胞变性、坏死等损伤性变化,减少肝细胞凋亡具有重要作用,其抗凋亡机制可能与上调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达,下调促凋亡蛋白 Bax 蛋白,降低 Bax/Bcl-2 二者的比值,抑制 caspase-3 等途径有关^[18-21],从而降低了乙醇对细胞的促凋亡作用。结果表明,D 组对乙醇所致小鼠急性肝损伤具的保护作用机制可能与调节凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达有关。

本研究进一步证明氧化应激和肝细胞凋亡与急性酒精性肝损伤的发病机制有关,并且也说明萱草花黄酮具有增强内源性氧自由基清除系统和抑制肝细胞凋亡的功能,它对乙醇导致的急性肝损伤具有保护作用。

参考文献

- [1] 高潇雪,刘立新.酒精性肝病流行病学及发病机制研究进展[J].中华消化病与影像杂志,2016,6(2):62-65.
- [2] 延华,张粉利,高艳琼,鲁晓岚,罗金燕.饮酒与酒精性肝病流行病学调查研究[J].陕西医学杂志,2015,44(7):917-920.
- [3] Wu D,Cederbaum A.Oxidative stress and alcoholic liver disease[J].Semin Liver Dis,2009,29(2):141-154.
- [4] 郭冷秋,张颖,张博,张鹏.萱草根及萱草花的化学成分和药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2013,31(1):74-76.
- [5] 林晓晖,黄玲,王一铮,等.小鼠急性酒精性肝损伤模型的制备及观察[J].北方药学,2014,11(6):67-69.
- [6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1169.
- [7] 王春梅,李贺,李生,等.北五味子木脂素对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J].食品科学,2014,35(13):262-265.
- [8] Harrison-Findik DD.Is the Iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? [J].World J Gastroenterol,2009,15(10):1186-1193.
- [9] Uemura M,Fujimura Y,Matsuyama T,et al.Potential role of ADAMTS13 in the progression of alcoholic hepatitis[J].Curr Drug Abuse Rev,2008,1(2):188-196.
- [10] Yin HQ,Choi YJ,Kim YC,et al.Salvia miltiorrhiza Bunge and its active component cryptotanshinone pro-

TECTS primary cultured rat hepatocytes from acute ethanol-induced cytotoxicity and fatty infiltration[J].Food Chem Toxicol,2009,47(1):98-103.

- [11] Tiniakos DG.Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients[J].Gastroenterol Clin Biol,2009,33(10/11):930-939.
- [12] Zhao J,Chen H,Li Y.Protective effect of bicyclol on acute alcohol-induced liver injury in mice[J].Eur J Pharmacol,2008,586(1/2/3):322-331.
- [13] Demir I,Kiyamaz N,Gudu BO,et al.Study of the neuroprotective effect of ginseng on superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) levels in experimental diffuse head trauma[J].Acta Neurochirurgica,2013,155(5):913-922.
- [14] Khanal T,Choi JH,Hwang YP,et al.Saponins isolated from the root of Platycodon grandiflorum protect against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice[J].Food Chem Toxicol,2009,47(3):530-535.
- [15] Pellegrini M,Bath S,Marsden VS,et al.FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells[J].Blood,2005,106(5):1581-1589.
- [16] Brandon-Warner E,Schrum LW,Schmidt CM,et al.Rodent models of alcoholic liver disease:of mice and men[J].Alcohol,2012,46(8):715-725.
- [17] Brooks C,Dong Z.Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins;a key in Bak? [J].Cell Cycle,2007,6(24):3043-3047.
- [18] 赵志明,杜元杰,左一鹏,等.中药何首乌饮对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2,Bax 表达的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(23):2530-2533,2564.
- [19] 汤小刚,王军伟,洪汝涛,等.乌药不同提取部位对急性酒精性肝损伤模型大鼠的抗氧化作用研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2934-2936.
- [20] 靳雅玲,欧士钰.Bcl-2、Bax 与肝纤维化关系的研究进展[J].临床医学工程,2013,20(1):124-126.
- [21] Li G,Ren J,Xu F,et al.Non-structural and nucleocapsid proteins of Punta Toro virus induce apoptosis of hepatocytes through both intrinsic and extrinsic pathways[J].Microbiol Immunol,2010,54(1):20-30.

(收稿日期:2016-11-18 修回日期:2017-01-22)

(上接第 1303 页)

- [19] Schroeter A,Wen S,Mölders A,et al.Depletion of the AMPAR reserve pool impairs synaptic plasticity in a model of hepatic encephalopathy[J].Mol Cell Neurosci,2015,68:331-339.
- [20] Elliott T.The mean time to Express synaptic plasticity in

integrate-and-express, stochastic models of synaptic plasticity induction[J].Neural Comput,2011,23(1):124-159.

(收稿日期:2016-10-26 修回日期:2017-01-21)