

阮中繁,谢明,李艳,等. 参麦对急性脑梗死小鼠脑组织的保护作用及相关机制的探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 23 - 27.

Ruang ZF, Xie M, Li Y, et al. Exploration of the protective effect of Shenmai injection on brain tissue and its related mechanisms in a mouse model of cerebral infarction [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 23 - 27.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.004

参麦对急性脑梗死小鼠脑组织的保护作用及相关机制的探讨

阮中繁¹, 谢 明^{1*}, 李 艳², 王桥生³

(1. 南华大学附属第一医院神经内科; 2. 南华大学附属南华医院麻醉科;
3. 南华大学附属第一医院重症医学科, 湖南 衡阳 421000)

【摘要】 目的 研究参麦注射液对急性脑梗死小鼠脑组织保护作用并初步探讨其可能的机制。方法 本实验以 30 只成年雄性 CD-1 小鼠为研究对象, 随机分为对照组、模型组和实验组, 每组各 10 只。采用线栓法构建急性脑梗死小鼠模型, 实验组给予 0.3 mL 参麦注射液治疗, 对照组和模型组均给予同等剂量生理盐水干预, 比较各组小鼠的红细胞功能指标。采用 TUNEL 法测定脑组织的神经元凋亡率, 使用 Western blot 和 q-PCR 技术检测小鼠脑皮层 calpain-1 及 Bcl-2 的表达情况。结果 与对照组比较, 实验组 RBC-C3bR 明显降低, RBC-ICR 显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 实验组 RBC-C3bR 明显增高, RBC-ICR 显著降低 ($P < 0.05$)。模型组和实验组小鼠脑组织切片的 TUNEL 阳性细胞数显著高于对照组 ($P < 0.05$); 实验组小鼠脑组织切片的 TUNEL 阳性细胞数明显低于模型组小鼠 ($P < 0.05$)。与对照组小鼠比较, 模型组和实验组小鼠的 calpain-1 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高, Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组小鼠相比, 实验组小鼠 calpain-1 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 参麦注射液可改善急性脑梗死小鼠红细胞功能和抑制神经元凋亡, 其可能的机制是下调 calpain-1 蛋白的表达, 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 发挥脑组织神经保护作用。

【关键词】 参麦注射液; 急性脑梗; 小鼠; 红细胞免疫功能; 机制

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 04-0023-05

Exploration of the protective effect of Shenmai injection on brain tissue and its related mechanisms in a mouse model of cerebral infarction

RUAN Zhongfan¹, XIE Ming^{1*}, LI Yan², WANG Qiaosheng³

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of University of South China; 2. Department of Anesthesiology, Nanhua Hospital of University of South China; 3. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, 421000, China)

【Abstract】 **Objective** To study the protective effect of a Chinese medicine, Shenmai injection, on brain tissue in a mouse model of cerebral ischemia and explore its possible mechanism. **Methods** Thirty healthy adult male CD-1 mice were randomly divided into control, model, and experimental groups with 10 mice in each group. The mouse model of acute

[基金项目] 湖南省教育厅资助项目 (12C0355)。

[作者简介] 阮中繁 (1985—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事缺血性脑血管病方面的研究。E-mail: rzf7245@163.com

[通信作者] 谢明 (1963—), 男, 博士, 主任医师, 主要从事脑血管病、神经康复等方面的研究。E-mail: 1306330605@qq.com

cerebral infarction was established by permanent middle cerebral artery occlusion. The experimental group was treated with Shenmai injection. The control and model groups were administered the same dose of physiological saline. The red blood cell functional indexes were compared among groups. The neuronal apoptosis rate of brain tissue was determined by TUNEL assay. Calpain-1 and Bcl-2 expression in the mouse cortex was detected by Western blot and qPCR. **Results** Compared with the control group, RBC-C3bR was significantly decreased and RBC-ICR was significantly increased in the experimental group ($P < 0.05$). Compared with the model group, RBC-C3bR was significantly increased, and RBC-ICR was decreased significantly in the experimental group ($P < 0.05$). The number of TUNEL-positive cells in the brain tissue sections of model and experimental groups was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The number of TUNEL-positive cells in brain tissue sections of the experimental group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of calpain-1 protein and mRNA in model and experimental groups were significantly increased, and the expression levels of Bcl-2 protein and mRNA were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the experimental group, the expression levels of calpain-1 protein and mRNA were significantly decreased, and that of Bcl-2 protein and mRNA were increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Shenmai injection improves erythrocyte functions and inhibits neuronal apoptosis in this mouse model of cerebral infarction. The possible mechanism of the protective effect of Shenmai injection on brain infarction may be the downregulating of expression of calpain-1 protein and upregulating of expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in the brain tissues.

【Keywords】 Shenmai injection; acute cerebral infarction; mouse; erythrocyte function; mechanism

急性脑梗死(acute cerebral infarct, ACI)是指脑部供血障碍引起的脑组织坏死,具有较高的致死率和致残率,严重威胁国民健康^[1]。参麦注射液是由红参和麦冬两味中药制备而成的复方制剂,现代药理学发现,其具有改善微循环,增强免疫力,增加脑血流量,降低脑组织耗氧量及清除自由基的作用^[2]。研究发现,参麦注射液对于急性脑梗死的治疗具有较好的临床疗效,但其机制还尚未明确^[3]。B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)是一类抑制细胞凋亡的蛋白,钙蛋白酶 1(calcium activated papain-like cysteine protease-1, calpain-1)是一种降解各种肌肉蛋白的酶^[4-5]。研究发现,上调 Bcl-2 和 calpain 均可减轻脑缺血性损伤^[6]。因此,本研究通过构建急性脑梗死小鼠模型并给以参麦注射液干预,测定 Bcl-2 和 calpain-1 的表达来探讨参麦注射液对其作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级雄性 CD-1 小鼠 30 只,体重 25~30 g,购于南华大学实验动物中心[SCXK(湘)2015-0002],饲养于南华大学实验动物中心屏障环境中[SYXK(湘)2015-0001]。常规饲料喂养,自由饮用洁净水(均由南华大学实验动物中心提供)。饲养环境:12 h 光照/12 h 黑暗,黑暗,湿度恒定,温度 20℃~25℃。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:TSME1 2016-001)。

1.2 主要试剂与仪器

A1 级 MCAO 线栓(广州佳灵生物技术有限公司),参麦注射液(神威药业集团有限公司,规格 10 mL×5 支,国药准字 Z13302088),0.9%氯化钠注射液(湖南科伦制药有限公司,500 mL,国药准字 H43020454),4%多聚甲醛(北京索莱宝生物科技有限公司),Abgent calpain-1 单克隆抗体,Bcl-2 单克隆抗体(北京拜尔迪生物技术有限公司),TRIzol™ Reagent(购自赛默飞世尔科技中国有限公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉生物工程有限公司),TUNEL 试剂盒(默克生命科学)。半自动轮转式切片机 CUT5062(北京莱比信科技发展有限公司),ND-2000 超微量分光光度计(北京科誉兴业科技发展有限公司),光学显微镜(北京博恒远科技有限公司),超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建及处理

本实验以 30 只成年雄性 CD-1 小鼠为研究对象,随机分为对照组、模型组和实验组,每组各 10 只。按照文献法^[7]构建小鼠永久性大脑中动脉闭塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)模型,对照组接受假手术操作 1 h 后腹腔注射 0.3 mL 生理盐水,每天 1 次;模型组小鼠接受线栓法大脑中动脉闭塞手术 1 h 后腹腔注射 0.3 mL 生理盐水,每天 1 次;实验组小鼠接受线栓法大脑中动脉闭塞手术后 1 h 腹腔注射 0.3 mL 参麦注射液,每天 1 次。三组小鼠均干预 2 周。

1.3.2 红细胞免疫功能指标的检查

采用眼球后静脉丛采血 1 mL 置于枸橼酸钠抗凝管中,离心取上层血浆备用,从下层取出 50 μL 红细胞加 450 μL 0.9% 氯化钠注射液混匀,检测红细胞浓度,加 0.9% 氯化钠注射液稀释至终浓度 1.25×10⁷/mL。将冻存致敏酵母菌混匀,将 50 μL 红细胞液与 50 μL 血浆及 50 μL 酵母菌混匀,37℃ 水浴 10 min,加入 25 μL 0.25% 戊二醛,分别取 1/2 的量以毛细吸管涂片,吹干,加 100 μL 甲醇固定后,采用瑞氏染液与缓冲液(1:3)染色 30 s,自来水冲洗 3 遍后,湿片镜检并计数(与红细胞结合 2 个以上酵母菌),得出红细胞复合物花环形成率(red blood cell-immune complex rosette, RBC-ICR)。同法测定红细胞表面 C3b 受体(RC3bR)。

1.3.3 TUNEL 试剂盒检测各组神经元凋亡

制备脑组织石蜡切片,依据 TUNEL 试剂盒说明书操作,光学显微镜下观察各组小鼠脑组织凋亡神经元并拍照计数。

1.3.4 Western blot 法检测 calpain-1、Bcl-2 蛋白水平的影响

剪取部分脑组织提取总蛋白,调整蛋白浓度后进行蛋白电泳,转膜后进行封闭,清水洗膜后,Abgent calpain-1 单克隆抗体或 Bcl-2 单克隆抗体 4℃ 孵育 12 h。洗膜后,室温孵育荧光标记羊抗兔抗体 2 h,免疫印迹显色后进行曝光,采用 ImageJ 软件对条带进行分析。

1.3.5 q-PCR 法检测 calpain-1、Bcl-2 mRNA 的表达

剪取部分脑组织,液氮研磨后严格按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,并将总 RNA 逆转录为总 cDNA,进行荧光定量反应。

1.4 统计学处理

所有数据使用 SPSS 20.0 统计学软件处理,本研究 RBC-ICR 等水平经统计学检验符合正态分布,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用方差分析,组内两两比较采用 SNK-q 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组红细胞免疫功能比较

与对照组比较,实验组 RBC-C3bR 明显降低,RBC-ICR 显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,实验组 RBC-C3bR 明显增高,RBC-ICR 显著降低($P<0.05$),见表 1。

2.2 各组脑组织的神经元凋亡率比较

对照组小鼠脑组织切片 TUNEL 阳性细胞较少,模型组和实验组小鼠脑组织切片的 TUNEL 阳性细胞数显著高于对照组($P<0.05$);实验组小鼠脑组织切片的 TUNEL 阳性细胞数明显低于模型组小鼠($P<0.05$),见图 1。

2.3 各组脑组织 calpain-1、Bcl-2 蛋白水平比较

与对照组小鼠比较,模型组和实验组小鼠的 calpain-1 蛋白显著升高,Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组小鼠相比,实验组小鼠 calpain-1 蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),见图 2。

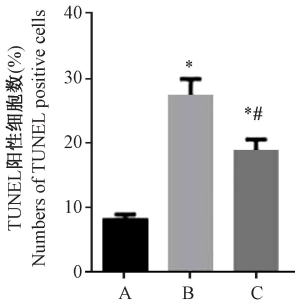
2.4 各组脑组织 calpain-1、Bcl-2 mRNA 水平比较

与对照组小鼠比较,模型组和实验组小鼠的 calpain-1 mRNA 表达水平显著升高,Bcl-2 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组小鼠相比,实验组小鼠 calpain-1 mRNA 表达水平显著降低,Bcl-2 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$),见图 3。

表 1 各组红细胞免疫功能比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Comparison of the erythrocyte immune function in each group

组别 Groups	红细胞表面 C3b 受体 RBC-C3bR	红细胞复合物花环形成率 RBC-ICR
对照组 Control group	11.03±1.12	6.67±0.67
模型组 Model group	7.31±0.74 [*]	11.54±1.16 [*]
实验组 Experiment group	9.18±0.91 ^{**}	9.67±0.97 ^{**}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

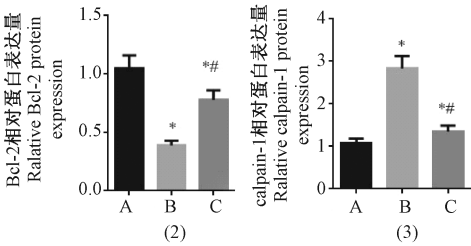
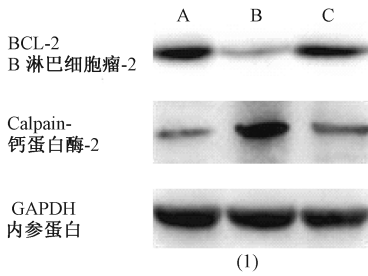


注:A:对照组;B:模型组;C:实验组。与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。下图同。

图1 各组脑组织的神经元凋亡率比较

Note. A, Control group. B, Model group. C, Experiment group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. The same in the following figures.

Figure 1 Comparison of neuronal apoptosis rates in the brain tissue of each group

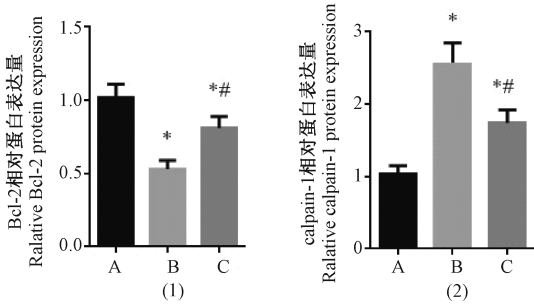


注:(1)各组脑组织中 Bcl-2、calpain-1 蛋白的表达;
(2)各组脑组织中 Bcl-2 蛋白表达统计分析;(3)各组脑组织中 calpain-1 蛋白表达统计分析。

图2 各组脑组织 Bcl-2、calpain-1 蛋白水平比较

Note. (1) Calpain-1 and Bcl-2 protein levels in brain tissue of each group. (2) Bcl-2 protein levels. (3) Calpain-1 protein levels.

Figure 2 Comparison of calpain-1 and Bcl-2 protein levels in the brain tissue of each group



注:(1)各组脑组织中 Bcl-2 mRNA 水平的统计分析;(2)各组脑组织中 calpain-1 mRNA 水平的统计分析。

图3 各组脑组织 Bcl-2、calpain-1 mRNA 水平比较

Note. (1) Bcl-2 mRNA levels in brain tissue of each group. (2) Calpain-1 mRNA levels in brain tissue of each group.

Figure 3 Comparison of Bcl-2 and calpain-1 mRNA levels in the brain tissue of each group

因此,选择接近临床实际情况的脑梗死动物模型进行药物研究具有重要的价值。中药制剂疗效确切、安全性高、价格低廉,已经广泛运用于临床治疗中^[8]。参麦注射液主要成分为红参、麦冬,具有益血生津、补气滋阴的作用,有文献报道,参麦注射液可显著提高急性脑梗死的治疗效果,但机制研究较少^[9-10]。因此,本研究通过构建急性脑梗死小鼠模型并进行参麦注射液干预治疗,探讨其作用机制。

pMCAO 模型具有操作性强和重复性高的优点,是目前国际上应用较为广泛的脑梗死动物模型,模型构建成功后可模拟脑梗死的病理过程进行缺血后继发脑损伤的研究,并且数分钟内可诱导炎症反应及凋亡等一系列继发性脑损伤^[11]。本实验通过线栓法大脑中动脉闭塞手术构建 pMCAO 模型小鼠,目的是研究参麦注射液对模型小鼠红细胞免疫功能及凋亡的影响。参麦注射液是由生脉散改变剂型而成,包含人参皂甙、麦冬黄酮等有效成分^[12]。人参皂甙可有效改善脑损伤组织的代谢,麦冬黄酮可改善脑细胞的能量缺乏及缺氧状态。参麦注射液被广泛地运用到心脑血管病、脓毒血症、肿瘤、膝骨关节炎等疾病,并取得较好的疗效。在治疗脑血管疾病上,陈中明等^[13]采用参麦注射液辅助治疗急性脑梗死患者,发现治疗后联合用药组明显改善凝血功能,降低 VEGF、GFAP 和 TNF- α 水平,提示其具有抗凝、抗炎、改善血液循环,从而发挥疗效。耿武军等^[14]发现参麦注射液通过上调 Bcl 蛋白和 Bcl/Bax 比率改善脑缺血再灌注损伤大鼠的脑损伤。红细胞免疫是目前免疫学领域中重要的研究内容,研究发现,机体发生脑梗死时,RBC-ICR 升

3 讨论

ACI 是人类死亡和致残的主要原因^[7]。目前临床上治疗此疾病的主要方式为溶栓治疗,由于时间窗较狭窄,因此仅有小部分患者能接受溶栓治疗。

高,RBC-C3bR 降低,从而降低机体的免疫功能^[15]。本研究采用参麦注射液对急性脑梗死模型小鼠进行干预治疗。结果发现,实验组 RBC-C3bR 明显高于模型组,RBC-ICR 显著低于模型组。结果表明了参麦注射液能够改善模型小鼠的红细胞免疫功能,与以往研究一致^[13]。

Bcl-2 家族在在细胞凋亡过程中发挥重要作用。Bcl-2 可通过细胞凋亡信号途径阻遏细胞凋亡,延长细胞寿命^[15]。calpain 家族在脑缺血后细胞凋亡过程中扮演重要角色,研究发现,缺血再灌注后 1 h,脑部皮层和海马 calpain 活性明显增高,再灌注后 24 h calpain 活性可再次达到最高水平^[16]。calpain-1 是 calpain 主要的亚家族成员之一,可裂解多种酶,选择性降解细胞骨架蛋白及转录因子等。calpain-1 可通过裂解半胱氨酸蛋白酶 Caspases-3、7、8 等,并可调节 Bcl 家族介导凋亡。本结果发现,模型组和实验组小鼠脑组织切片的 TUNEL 阳性细胞数显著高于对照组,实验组小鼠脑组织切片的 TUNEL 阳性细胞数明显低于模型组小鼠,结果说明了参麦注射液能够抑制神经元的凋亡。推测其原因可能是参麦注射液具有降低氧自由基,减少脑组织损伤后脂质过氧化物生成作用,且可促进 ATP 合成,提高 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性及膜转运电位,抑制 Na⁺、K⁺内流,减轻脑水肿,发挥神经元的保护作用,抑制神经元的凋亡。进一步研究其机制,结果发现,实验组小鼠 calpain-1 蛋白和 mRNA 表达水平低于模型组,Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达水平高于模型组。结果说明,参麦注射液可通过上调 Bcl-2 蛋白的表达,下调 calpain-1 蛋白的表达,从而抑制神经元的凋亡。

综上所述,参麦注射液可改善急性脑梗死小鼠红细胞功能和抑制神经元凋亡,其可能的机制是下调 calpain-1 蛋白的表达,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,发挥脑组织神经保护作用。

参考文献:

[1] 章耀华,马志伟,王海茹.丁苯酞联合丹参酮注射液治疗急性脑梗死临床疗效观察[J].实用老年医学,2017,31(11):1082-1083.

[2] 陈红英,郭俐宏,王文杰,等.参麦注射液联合长春西汀治疗脑梗死的临床研究[J].中国医药导报,2015,12(18):126

-129.

[3] 刘敏,张勤帅,陈学君,等.参麦注射液治疗急性脑梗死有效性和安全性的 Meta 分析[J].辽宁中医杂志,2017,44(02):228-232.

[4] Tanji N, Kikugawa T, Yokoyama M. Immunohistochemical study of cyclooxygenases in prostatic adenocarcinoma; relationship to apoptosis and Bcl-2 protein expression [J]. Anticancer Res, 2016, 20(4):2313-9.

[5] Liu ZF, Zheng D, Fan GC, et al. Heat stress prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells by blocking calpain/p38 MAPK signalling [J]. Apoptosis, 2016, 21(8):896-904.

[6] Nada SE, Tulsulkar J, Shah ZA. Heme oxygenase 1-mediated neurogenesis is enhanced by Ginkgo biloba (EGb 761®) after permanent ischemic stroke in mice [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(2):945-956.

[7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.

[8] 王渝蓉,余晓霞.化痰祛瘀汤对脑梗死患者的治疗效果及血液流变学、血流动力学的影响 [J]. 环球中医药, 2016, 9(7):856-858.

[9] 李琳,赵丹鹏,刘喜灿,等.参麦注射液对急性缺血性脑卒中患者预后及血清细胞因子水平的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017,33(2):195-197.

[10] 黄一伟,林斌,张明英.参麦注射液联合阿托伐他汀治疗急性心肌梗死临床疗效观察 [J]. 中华中医药学刊, 2015,33(10):2558-2560.

[11] Han Z, Li L, Wang L, et al. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bone fracture [J]. J Neurochem, 2015, 131(4):498-508.

[12] 刘育清.丹红注射液联合参麦注射液治疗急性脑梗塞的疗效观察 [D]. 广州:广州中医药大学, 2015.

[13] 陈中明,刘文兵.参麦注射液辅助治疗对老年急性脑梗死患者红细胞免疫功能、凝血功能及细胞因子的影响 [J]. 中国老年学杂志,2018,38(05):1043-1045.

[14] 耿武军,陈成宇,莫云长,等. Wnt/β-catenin 信号通路介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志,2018,26(02):109-114.

[15] 臧红敏. α-硫辛酸对电点燃致痫大鼠海马的保护作用及其机制研究 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.

[16] 何军娜.瑞替加滨对实验性脑梗死小鼠的脑保护作用:下调 calpain-1、Bax,上调 Bcl-2 的表达 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2016.