

水蛭素类和重组抗凝多肽的序列或引物,而非牛蛭相关信息较少。粗提物经电泳分离后各蛋白条带的 PMF 在数据库未找到相似蛋白,一方面说明了数据库信息量的不足;另一方面也提示研究的目的蛋白与已发现的“菲牛蛭素”不同,属新型抗凝蛋白。

实验以菲牛蛭冷冻鲜体为原材料,结合超滤技术、层析技术进行分离纯化,全程以凝血酶滴定法和聚丙烯酰胺电泳分析对抗凝活性物质进行追踪,获得菲牛蛭抗凝活性多肽,经验证,此工艺路线稳定可行。后续研究将对菲牛蛭抗凝活性多肽进行氨基酸序列分析,探讨其抗凝作用机制。

参考文献

- 1 张卫,张瑞贤,李健,等. 中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):914-918
- 2 刘晓帆. 龟甲、水蛭的品种与质量研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013:61-65
- 3 汪蜜,刘义梅,陈科力. 水蛭抗凝血活性物质提取工艺研究概况[J]. 亚太传统医药,2013,9(3):56-57
- 4 方富永,苗艳丽,苏舒华. 双水相萃取-凝胶色谱联用法提取菲牛蛭中的水蛭素[J]. 中国药理学杂志,2012,47(7):489-494
- 5 唐芸芸. 基于移动反应界面的聚丙烯酰胺凝胶电泳及其应用研究[D]. 上海:上海交通大学,2013:32-35

(收稿日期:2013-12-21)

(修回日期:2014-01-07)

西洛他唑通过 P38 MAPK 信号途径对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

蓝琳友 洪溪屏 蔡元晖

摘要 目的 探讨西洛他唑对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 将 75 只成年雄性 SD 大鼠按数字表法随机分成假手术组、模型组、西洛他唑低剂量(10mg/kg)组、西洛他唑中剂量(20mg/kg)组和西洛他唑高剂量(40mg/kg)组,每组 15 只,通过大脑中动脉阻塞法建立起脑缺血再灌注模型。按照 Longa EZ 法评估动物神经功能;Tunel 染色法检测大鼠脑神经细胞凋亡,采用 Western blot 法检测半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路相关蛋白的表达。**结果** 与假手术组相比较,模型组神经功能评分和细胞凋亡率均升高,差异有统计学意义;西洛他唑组的神经功能评分和细胞凋亡率较模型组均降低($P < 0.05$);与模型组相比较,caspase-3 和 MAPK 信号转导通路中 p-P38 的表达水平均随西洛他唑剂量的增加而逐渐降低($P < 0.05$),而西洛他唑对 MAPK 信号转导通路中其他成员 p-ERK 和 p-JNK 的表达无明显影响。**结论** 西洛他唑对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与抑制神经细胞凋亡有关,其抗凋亡作用机制可能与抑制 P38 MAPK 信号转导途径有关。

关键词 脑缺血再灌注 凋亡 P38

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Protection Effect of Cilostazol on Cerebral Ischemia/reperfusion in Rats via P38 MAPK Pathway. Lan Linyou, Hong Xiping, Cai Yuanhui. The Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To elucidate the anti-apoptotic protection and the mechanism of cilostazol on focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** Seventy-five healthy male SD rats were divided into five groups ($n = 15$) for experiments: sham-operated group, ischemia/reperfusion (I/R) group, the low dose cilostazol (10mg/kg) group, the middle dose cilostazol (20mg/kg) group and the high dose cilostazol (40mg/kg) group. The neurofunction was measured by Longa EZ method. The Tunel test kit was used to explore the cellular apoptosis in hippocampus. The expression of caspase-3, MAPKs, p-P38, p-ERK and p-JNK were detected by western blot. **Results** As compared with the sham-operated group, the score of neurofunction and apoptotic cells in I/R group was increased statistically. The score of neurofunction and apoptosis rate in each cilostazol group was lower than that of I/R group. Compared with the I/R group, the expression of caspase-3 and p-P38 was down-regulation in cilostazol group in a dose-dependent manner. **Conclusion** Cilostazol has certain neuroprotective effect in rats after ischemia/reperfusion injury, which may be related to down-regulation of the level of P38 MAPK pathway.

Key words Cerebral ischemia reperfusion; Apoptosis; P38

脑卒中目前是全球第2常见死因,在我国已成为第1位死因,其中缺血性脑卒中占全部脑卒中的大部分,而缺血再灌注损伤是大多数缺血性脑血管疾病的主要病理生理过程,其发生机制尚未完全阐明^[1]。有研究表明,缺血后神经元细胞凋亡参与了缺血性脑损伤的过程^[2]。因此,抑制神经元细胞凋亡可减轻脑缺血损伤。

西洛他唑是一种选择性磷酸二酯酶3抑制剂,可通过增加细胞内环磷腺苷酸含量和激活蛋白激酶A从而发挥抗血小板凝聚和舒张血管的作用,本研究拟观察西洛他唑对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型中神经细胞凋亡的影响及其作用机制^[3]。

材料与方法

1. 动物和材料:成年雌性SD大鼠,体重 304.5 ± 25.4 g,由温州医学院动物实验中心提供;西洛他唑(纯度>98%)购自Sigma公司;免疫组化染色试剂盒购自上海碧云天生物技术研究;Tunel试剂盒购自瑞士罗氏公司;caspase-3、p-p38、p-ERK、p-JNK和 β -actin抗体购自美国Epitomics公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国Sigma公司。

2. 动物分组和模型制备:将SD大鼠按照数字表法随机分成5组:假手术组、模型组、西洛他唑低剂量(5mg/kg)组、西洛他唑中剂量(10mg/kg)组和西洛他唑高剂量(20mg/kg)组,每组15只。按照Longa EZ等报道的线栓法制作大鼠右侧大脑中动脉闭塞模型,以动物出现右眼Horner征为模型成功的标志,阻断血流2h后再灌注24h,成功建立缺血再灌注模型45只^[5]。假手术组仅将缝线插入后拔出,不阻断大脑中动脉。西洛他唑在术前2h和6h分别经灌胃给药1次,模型组和假手术组分别灌胃给予等量生理盐水。

3. 神经功能评分:所有实验大鼠在手术清醒后自由饮食,术后4、24和48h根据Longa EZ法分别进行神经功能评分:0分,无明显神经功能缺损;1分,提尾时不能伸展左前肢;2分,行走时向左侧旋转;3分,行走时向左侧倾斜;4分,不能自主活动或伴意识障碍。大鼠清醒后首次评分在1~3分者为造模成功,作为本次实验用大鼠。

4. Tunel法检测细胞凋亡:术后24h每组随机取5只大鼠同时腹腔内注射10%水合氯醛麻醉后,迅速开胸,用PBS灌注后用多聚甲醛灌注固定,取出脑组织后剔除小脑、脑干和嗅球取出脑组织,一半放置液氮中保存,一半置4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,进行连续切片,切片厚 $3\mu\text{m}$,烘干备用。细胞凋亡检测按Tunel试剂盒说明书操作,细胞核固缩、染色体凝集呈棕褐色染色者为凋亡细胞,低倍镜($\times 100$)下观察20个视野,图片结果用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件进行分析。

5. Western blot法检测脑组织中蛋白的表达:将液氮中保存的脑组织粉碎后加入RIPA裂解液裂解细胞,提取上清液。用Bradford法测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品(20微克/

孔),常规8%SDS-PAGE电泳,半干转膜仪转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗(1:1000)于4℃下孵育过夜,HRP标记的羊抗兔IgG为第2抗体(1:2500)室温孵育1h,ECL显色,条带曝光强度用Quantity One 4.6.2(BIO, RAD)软件分析,以 β -actin为内参,通过与内参的灰度比,得出目的条带的相对表达水平。

6. 统计学方法:实验所得结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用SPSS 11.5统计软件进行方差检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组神经功能缺损评分:与假手术组相比较,模型组各时间点神经功能评分均显著升高,在24h时达到高峰($P < 0.05$)。与模型组相比较,西洛他唑各剂量组在各时间点神经功能评分均降低($P < 0.05$)。与西洛他唑低剂量组相比较,西洛他唑高剂量组神经功能评分低于低剂量组,各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 各组大鼠在不同时间点的神经功能评分比较($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, 分)

组别	4h	24h	48h
假手术组	$0.00 \pm 0.00^*$	$0.00 \pm 0.00^*$	$0.00 \pm 0.00^*$
模型组	2.20 ± 0.45	2.80 ± 0.58	2.60 ± 0.35
西洛他唑低剂量组	$1.50 \pm 0.24^*$	$1.90 \pm 0.34^*$	$1.50 \pm 0.30^*$
西洛他唑中剂量组	$1.40 \pm 0.30^*$	$1.50 \pm 0.45^*$	$1.45 \pm 0.35^*$
西洛他唑高剂量组	$0.60 \pm 0.24^{* \#}$	$0.80 \pm 0.25^{* \#}$	$0.50 \pm 0.12^{* \#}$

与模型组比较, * $P < 0.05$; 与西洛他唑低剂量组比较, # $P < 0.05$

2. Tunel法检测神经细胞凋亡:如图1所示, Tunel染色阳性细胞表现为仅为胞核染成棕褐色,图片经过Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析后, Tunel阳性细胞比例用累积光密度值IOD来表示。假手术组中有少量凋亡细胞,模型组中可见大量神经细胞凋亡,显著高于假手术组($P < 0.05$);西洛他唑低、中、高剂量组的细胞凋亡率均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与西洛他唑低剂量组相比较,西洛他唑中、高剂量组的IOD值均明显下降,有统计学差异($P < 0.05$),详见表2。

3. 西洛他唑对大鼠脑组织细胞MAPK信号通路中p-p38、p-ERK、p-JNK以及caspase-3蛋白表达的影响:如图2所示,与假手术组相比较,模型组中MAPK信号通路调节蛋白p-p38、p-ERK和p-JNK以及caspase-3的表达均显著增加;与模型组相比较,西洛他唑作用后大鼠脑组织中p-p38的表达水平降低,呈浓度依赖性,而西洛他唑对其他MAPK

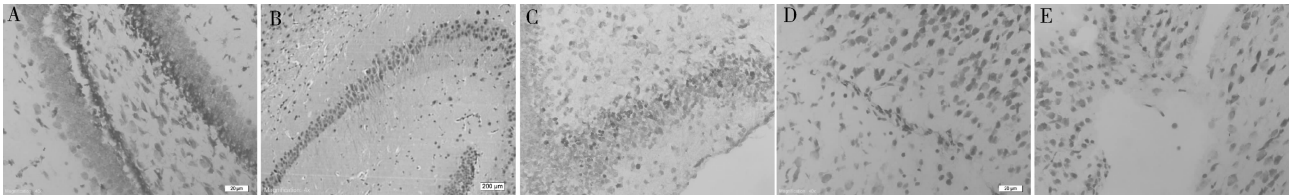


图 1 各组大鼠脑组织神经细胞凋亡结果 (×100)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 西洛他唑低剂量组; D. 西洛他唑中剂量组; E. 西洛他唑高剂量组

表 2 Tunel 法检测各组大鼠神经细胞
凋亡的 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IOD 值
假手术组	34.59 ± 6.19 *
模型组	254.51 ± 35.45
西洛他唑低剂量组	156.35 ± 20.69 *
西洛他唑中剂量组	94.31 ± 15.81 **
西洛他唑高剂量组	61.29 ± 8.24 **

与模型组比较, * $P < 0.05$; 与西洛他唑低剂量组比较, # $P < 0.05$

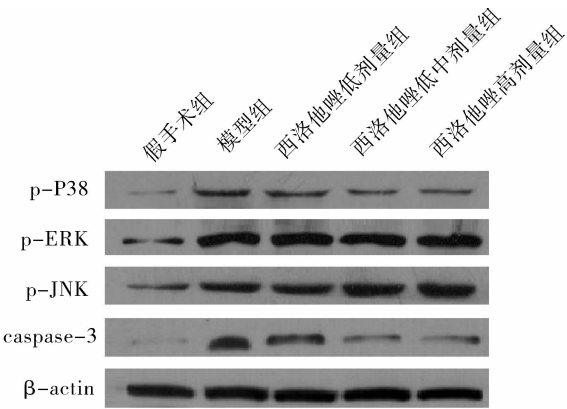


图 2 Western blot 检测各组大鼠脑组织中 p - P38、
p - ERK、p - JNK 以及 caspase - 3 蛋白表达
(以 β - actin 为内参)

的调节蛋白如 p - ERK 和 p - JNK 的表达无明显变化;同时随着西洛他唑剂量的增加, caspase - 3 的表达明显下降, 且表达强度随药物剂量的增加而降低 (表 3)。

表 3 各组大鼠脑组织 p - P38、p - ERK、p - JNK 以及
caspase - 3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p - P38	p - ERK	p - JNK	caspase - 3
手术组	1.00 ± 0.00 *	1.00 ± 0.00 *	1.00 ± 0.00 *	1.00 ± 0.00 *
模型组	2.45 ± 0.24	3.18 ± 0.52	2.49 ± 0.27	3.75 ± 0.61
西洛他唑低剂量组	1.62 ± 0.29 *	3.34 ± 0.59	2.64 ± 0.42	2.51 ± 0.34 *
西洛他唑中剂量组	1.07 ± 0.16 **	3.27 ± 0.43	2.67 ± 0.31	1.62 ± 0.25 **
西洛他唑高剂量组	0.84 ± 0.19 **	3.48 ± 0.49	2.59 ± 0.46	1.31 ± 0.14 **

与模型组比较, * $P < 0.05$; 与西洛他唑低剂量组比较, # $P < 0.05$

讨 论

脑缺血再灌注后可产生一系列神经功能缺损的表现,严重危害患者的生活质量, Longa EZ 法是在临床和科研实验中被广泛应用的神经功能评分法。在本研究中,模型组大鼠出现明显对侧肢体运动障碍和意识障碍等神经功能损害的表现,而假手术并未引起缺血再灌注,因此没有出现神经功能缺损症状,从而排除手术因素对大鼠神经学评分的影响,而西洛他唑可以有效改善缺血再灌注大鼠的神经症状,表明西洛他唑对大鼠缺血再灌注损伤有确切的保护作用,与文献报道相符^[4]。

脑组织缺血再灌注后继发的病理生理改变所造成脑细胞的损伤是脑缺血再灌注损伤的重要原因,研究表明,细胞凋亡是引起受损脑细胞死亡的主要机制之一,而海马 CA₁ 区是大脑缺血最为敏感的部位,被称为缺血易损区^[5,6]。因此,本研究采用该处脑组织进行脑缺血再灌注损伤的研究。Tunel 实验结果表明,模型组大鼠脑组织中凋亡细胞数较假手术组明显增多,而西洛他唑作用后脑组织中凋亡神经细胞数显著减少,并呈剂量依赖性,表明西洛他唑对大鼠脑组织中神经细胞凋亡具有保护作用。

细胞凋亡是一个复杂的过程,目前已知细胞凋亡有两条主要途径^[7]:一是 TNF 受体家族成员参与的通过 caspase - 8 活化途径,称为外源性凋亡途径;二是细胞色素 C 参与的通过 caspase - 9 活化的途径,称为内源性凋亡途径,两条途径最后均激活下游效应因子 caspase - 3 和 caspase - 7 从而使细胞发生凋亡。但除外 caspase 依赖的细胞凋亡通路外,还存在不依赖 caspase 的凋亡通路,如 MAPK 信号通路。MAPK 是细胞内丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族。MAPK 信号通路中的成员 P38、ERK 和 JNK 等可以被各种细胞外信号激活,引起细胞内的级联反应,从而参与细胞周期的调节、细胞增殖和细胞凋亡等一系列生理及病理过程。大量研究表明,阻断 JNK 通路可抑制细胞凋亡,而阻断 ERK 通路可促进细胞凋亡;而 P38 作为

MAPK 家族中最重要成员, P38 的丝氨酸/酪氨酸残基可以被磷酸化而激活为 p - P38, 从而在细胞凋亡中发挥重要的作用, p - P38 表达增加可促进细胞凋亡^[7,8]。在本研究中, 应用 Western blot 法检测了 MAPK 家族中 3 种调节蛋白的变化, 结果表明, 模型组中 p - P38、p - ERK、p - JNK 以及 caspase - 3 的表达较假手术组明显增加, 表明在缺血再灌注中, caspase 通路和 MAPK 通路可能都参与了神经细胞凋亡过程; 而经西洛他唑作用后 p - P38 表达水平显著降低, 而 p - ERK、p - JNK 的表达并没有发生改变, 而 caspase - 3 的表达也经西洛他唑作用后降低。由此表明, 抑制 caspase - 3 的表达以及阻断 P38 MAPK 信号通路的激活可能是西洛他唑抑制神经细胞凋亡的作用机制之一。

总之, 本次研究表明西洛他唑可通过抑制脑组织神经细胞凋亡, 同时对大鼠缺血再灌注神经功能损伤发挥一定保护作用, 其机制可能主要是通过抑制 caspase - 3 的表达以及阻断 P38 MAPK 信号通路的激活而实现。本次实验结果为西洛他唑应用于临床治疗提供了更多的实验依据, 但需进一步实验研究西洛他唑调节 MAPK 信号通路的具体机制。

参考文献

1 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指

南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中国全科医学, 2011, 14(35):4013 - 4017

2 Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective[J]. J Vasc Interv Radiol, 2004, 15(1 Pt 2):S3 - 12

3 Jung KI, Kim JH, Park HY, *et al.* Neuroprotective effects of cilostazol on retinal ganglion cell damage in diabetic rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 345(3):457 - 463

4 Yu BC, Lee DS, Bae SM, *et al.* The effect of cilostazol on the expression of matrix metalloproteinase - 1 and type I procollagen in ultraviolet - irradiated human dermal fibroblasts[J]. Life Sci, 2013, 92(4 - 5):282 - 288

5 Shi SS, Yang WZ, Tu XK, *et al.* 5 - Lipoxigenase inhibitor zileuton inhibits neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia[J]. Inflammation, 2013, 33(2):253 - 257

6 Zhao J, Xu H, Tian Y, *et al.* Effect of electroacupuncture on brain - derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampus following cerebral ischemia - reperfusion injury[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(2):253 - 257

7 Korhonen R, Hömmö T, Keränen T, *et al.* Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4 inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase - 1[J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(7):1525 - 1536

8 Pathak RK, Taj G, Pandey D, *et al.* Modeling of the MAPK machinery activation in response to various abiotic and biotic stresses in plants by a system biology approach[J]. Bioinformation, 2013, 25:9(9):443 - 449

(收稿日期:2013 - 07 - 20)

(修回日期:2013 - 11 - 30)

体外受精 - 胚胎移植后异位妊娠相关因素分析

周 燕 郭银花 王慧红 陈 楠

摘 要 目的 分析体外受精(IVF)或卵母细胞胞质内单精子注射(ICSI)后进行新鲜或冻融胚胎移植(ET)妇女异位妊娠的发生情况及其影响因素。**方法** 对接受胚胎移植治疗后获得临床妊娠的 1564 个周期的病因、年龄、移植时机、不育形式等高危因素进行回顾性调查。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计数资料采用 *t* 检验, 计量资料采用 χ^2 检验, 相关性统计采用 Logistic 回归分析。**结果** 冻融周期 ET 后异位妊娠发生率明显低于新鲜周期 ET。年龄 ≤ 30 岁的患者 ET 后发生异位妊娠率高于年龄 > 30 岁者, 继发不孕者较原发不孕者发生异位妊娠的比例更高。**结论** 年龄、移植时机和不育形式是体外受精 - 胚胎移植后发生异位妊娠的重要相关因素。

关键词 体外受精 胚胎移植 异位妊娠

[中图分类号] R321 [文献标识码] A

Analysis of Ectopic Pregnancy after in vitro Fertilization and Embryo Transfer. Zhou Yan, Guo Yinhua, Wang Huihong, *et al.* Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To investigate the incidence of ectopic pregnancy and influential factors of ectopic pregnancy in women with in fresh and cryopreservation thawed embryo transplantation after in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection

作者单位:310006 杭州市第一人民医院(周燕、王慧红、陈楠);321000 浙江省金华市人民医院(郭银花)