

谷红注射液对脑缺血大鼠大脑皮质线粒体功能的改善作用

冯 璐 王明洋 刘俊雅 杨 楠 刘雁勇 左萍萍

摘 要 **目的** 观察谷红注射液对缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质线粒体功能的影响。**方法** 采用线栓法制备 SD 大鼠大脑中动脉梗阻 (MCAO) 复灌模型, 术后即刻给药, 连续给药 14 天后通过神经功能缺损症状评分及贴纸去除实验评价药效。采用 Western blot 法检测线粒体自噬相关蛋白 Beclin1、Parkin、KIFC2、SNAP-25 及 UCP3 的表达变化。**结果** 与模型组相比, 谷红注射液能显著减轻缺血再灌注模型大鼠的神经功能缺损症状及恢复感觉运动功能, 并有效逆转缺血模型大鼠大脑皮质组织中线粒体与上述自噬相关蛋白表达的变化。**结论** 谷红注射液改善脑缺血损伤的作用机制可能与激活线粒体自噬功能有关。

关键词 谷红注射液 脑缺血再灌注 大鼠大脑皮质 线粒体自噬

中图分类号 R966

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.008

Effect of Gu Hong Injection on the Function of Cerebral Cortex Mitochondria in Rats with Cerebral Ischemia. Feng Lu, Wang Mingyang, Liu Junya, et al. Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences / Peiking Union Medical School, Chinese Academy Medical Sciences, Beijing 100005, China

Abstract Objective To observe the effect of Gu Hong injection on the function of cerebral cortex mitochondria in rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in SD rats was prepared by the method of thread embolism. The drug was administered immediately after the operation, and the effect was evaluated by 14 days after continuous administration. The expression changes of mitochondrial autophagy related protein Beclin1, Parkin, KIFC2, SNAP-25 and UCP3 were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the Guhong injection can significantly reduce the symptoms of the neurological deficit in ischemia and reperfusion rat model and recovery of sensorimotor function, and effectively reverse the lack of changes in mitochondria and the autophagy related protein expression in cerebral cortex of the model rats. **Conclusion** It is possible that the action mechanism of Gu Hong injection on improving cerebral ischemic injury may be related to the activation of mitochondrial autophagy.

Key words Gu Hong injection; Cerebral ischemia reperfusion; Rat cerebral cortex; Mitochondrial autophagy

随着对缺血性脑卒中研究的进展, 发现神经细胞内线粒体功能改变与其相关^[1,2]。由于细胞是依赖线粒体产生的 ATP 提供能量, 当缺血带来细胞与线粒体损伤时, 需要激活线粒体自噬 (mitochondrial autophagy) 功能。这一过程存在于损伤与修复的各个阶段^[3]。

谷红注射液是由乙酰谷酰胺和红花提取液制成的复方制剂。前者是谷氨酰胺乙酰基化的衍生物, 作为神经肽有对抗脑缺血引起的神经元损伤作用^[4]。红花提取液含有红花黄色素和红花苷类等有效成分,

对缺血性脑卒中的保护作用已被众多基础研究证实^[5,6]。但谷红注射液对缺血性脑损伤作用与线粒体之间的关系少有报道。本实验拟采用大鼠 MCAO 复灌模型, 观察谷红注射液对大脑皮质线粒体相关蛋白表达的影响。

材料与方法

1. 实验动物: 健康雄性 SD 大鼠 45 只, 体重 260 ~ 280g。由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (军) 2012-0004。SPF 级环境饲养, 光照为 12h/12h 明暗交替, 室温保持在 20 ~ 25℃, 自由进食进水。

2. 试剂与仪器: 谷红注射液 (国药准字 H22026638) 由通化谷红制药有限公司提供, 硅胶线栓购自北京西浓科技有限公司, 戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司, 兔抗 Beclin1 抗体、兔抗 SNAP25 抗体、小

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81100801); 菏泽步长制药有限公司基金资助项目

作者单位: 100005 北京, 中国医学科学院基础医学研究所药理室

通讯作者: 左萍萍, 教授, 博士生导师, 电子信箱: zuopp@vip.126.

com

鼠抗 Parkin 抗体均购自美国 CST 公司,兔抗 KIFC2 抗体购自美国 Santa cruz 公司,兔抗 UCP3 抗体购自美国 Novus 公司,小鼠抗 β -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠二抗及辣根酶标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Western blot 法实验相关材料购自北京普利莱生物技术有限公司。低温高速离心机购自美国 Sigma 公司,恒温水浴锅购自天津泰斯特净化设备有限公司,电泳仪购自北京市六一仪器厂。

3. 实验动物分组和给药:通过线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型。假手术组设为 A 组,将模型制作成功的大鼠随机分成 B 组(模型组)和 C 组(谷红注射液治疗组),每组大鼠 15 只。各组大鼠缺血 2h 后再灌注即开始给药。A 组和 B 组腹腔注射生理盐水(1ml/100g),C 组腹腔注射谷红注射液(0.5g/ml, 1ml/100g)。注射剂量根据本实验室谷红注射液的前期研究确定^[7,8]。

4. 模型的建立:参照 Longa 法造模^[9]。大鼠在适应环境 1 周后手术。以 1% 戊巴比妥钠麻醉后(50mg/kg 腹腔注射)仰卧固定在手术台上。颈部皮肤用碘伏消毒,沿颈正中线切开长约 2cm 切口,分离右侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA),颈内动脉(ICA)。在两分支 5mm 处用动脉夹夹闭 CCA,将 ECA 结扎并在 ECA 分支点附近挂线。在分支点处夹闭 ICA 后,于结扎的 ECA 和挂线之间剪开一小切口,将一根圆头硅化尼龙线(长 4.0cm,直径 0.26mm)插入至 CCA。将 ECA 挂线轻轻扎紧并在结扎处近心端剪断,撤掉 ICA 动脉夹。将尼龙线头部插入 ICA 2.0cm 至大脑中动脉起始处,阻断来自 Willis 环的血流供应。术后 2h 抽出尼龙线结扎 ECA 开口,撤出动脉夹,缝合手术切口。手术室温保持在 25℃。假手术组经历过程而不插线。

5. 神经缺损症状评分:参照 Chen 等^[10]采用的神经功能缺损评分方法,分别在术后 1、3、7 和 14 天对各组动物进行神经功能症状缺损评分观察与评价,包括运动、感觉、反射和平衡能力测试等。该方法损伤的严重程度评分越高,表明损伤越严重。

6. 贴纸去除实验:在给药 2 周后对每组动物进行贴纸去除实验。步骤如下:将大鼠置于测试圆筒中 60s 以使其适应测试环境,使用 2 片黏性纸(边长 10mm 的正方形)黏住大鼠 2 个前肢掌面,大鼠会本能的将纸片咬掉,记录大鼠去除两侧前肢每个纸片的时间,若 120s 内未去除纸片,记为 120s。

7. Western blot 法实验:取约 50mg 大鼠损伤侧大脑皮质组织加入组织裂解液(RIPA:蛋白酶抑制剂:蛋白磷酸酶抑制剂 = 100:1:1),冰浴条件超声 1min 后冰上裂解 20min,之后于 4℃,12000r/min 离心 15min,上清为组织蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度。组织蛋白 97℃ 水浴 6min 变性后进行 SDS-PAGE 电泳。恒压 80V 电泳至样品进入分离胶后调整为恒压 110V 电泳直至溴酚蓝条带至电泳槽底部;恒流 200mA 将蛋白印迹电转到 PVDF 膜上;将膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h;去除封闭液,加入一抗(兔抗 Beclin1 抗体,1:1000;小鼠抗 Parkin 抗体,1:1000;兔抗 KIFC2 抗体,1:200;兔抗 SNAP25 抗体,1:1000;兔抗 UCP3 抗体,1:200;小鼠抗 β -actin 抗体,1:1000),4℃ 过夜;洗膜,后加入稀释好的二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗,1:5000),室温孵育 1h;膜清洗后用 ECL 荧光检测仪显影;用 Gelpro 软件进行灰度扫描,采用百分比归一法进行统计,比较各组之间目的蛋白的表达差异。

8. 统计学方法:计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),若数据方差齐时,使用 LSD-t 检验进行组间均数的多重比较,若方差不齐则用 Dunnett-t 检验进行各组均数与模型组的比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠神经功能评分比较:对每组大鼠神经缺损症状评分得分进行评价,结果如表 1 所示。与假手术组比较,损伤组大鼠评分均显著增加($P = 0.000$)。随术后时间的延长,各组大鼠神经缺损评分逐渐降低。经过 14 天治疗后,谷红注射液治疗组神经缺损评分显著低于模型组($P < 0.01$)。

2. 大鼠感觉运动功能的比较:采用贴纸去除实验评价各组大鼠的肢体感觉运动功能,结果见表 1。与假手术组相比,模型组大鼠去除两侧前肢贴纸的时间

表 1 各组大鼠术后各时间点神经功能评分及
贴纸去除时间比较($n = 8$)

分组	神经功能缺损症状评分			贴纸去除 时间(s)
	1 天	7 天	14 天	
假手术组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	17.00 $\pm$ 6.13
模型组	11.33 $\pm$ 1.53*	7.33 $\pm$ 0.58*	5.67 $\pm$ 0.57*	87.67 $\pm$ 28.50*
谷红注射 液治疗组	11.25 $\pm$ 1.04	6.75 $\pm$ 1.16	4.00 $\pm$ 1.09**	46.70 $\pm$ 20.66*

与假手术组比较,* $P = 0.000$;与模型组比较,** $P < 0.05$,** $P < 0.01$

显著延长($P=0.000$),经过 14 天的治疗,谷红注射液治疗组大鼠去除两侧前肢贴纸的时间明显缩短($P<0.05$)。

3. 线粒体自噬相关蛋白表达结果:本实验采用 Western blot 法对各组大鼠大脑皮质组织中线粒体自噬相关蛋白 Beclin1、Parkin、KIFC2、SNAP25 和 UCP3 的表达水平进行了检测,结果如图 1 所示。模型组大

鼠皮质组织中 Beclin1 和 Parkin 蛋白的表达较对照组显著降低($P=0.000,P=0.01$),而谷红注射液治疗组能显著使其表达升高($P<0.01$)。此外,与假手术组相比,模型组 KIFC2、SNAP25 及 UCP3 蛋白的表达均显著降低($P=0.000$),经过 14 天谷红注射液的治疗后,几项指标表达水平均显著升高($P<0.01$)。

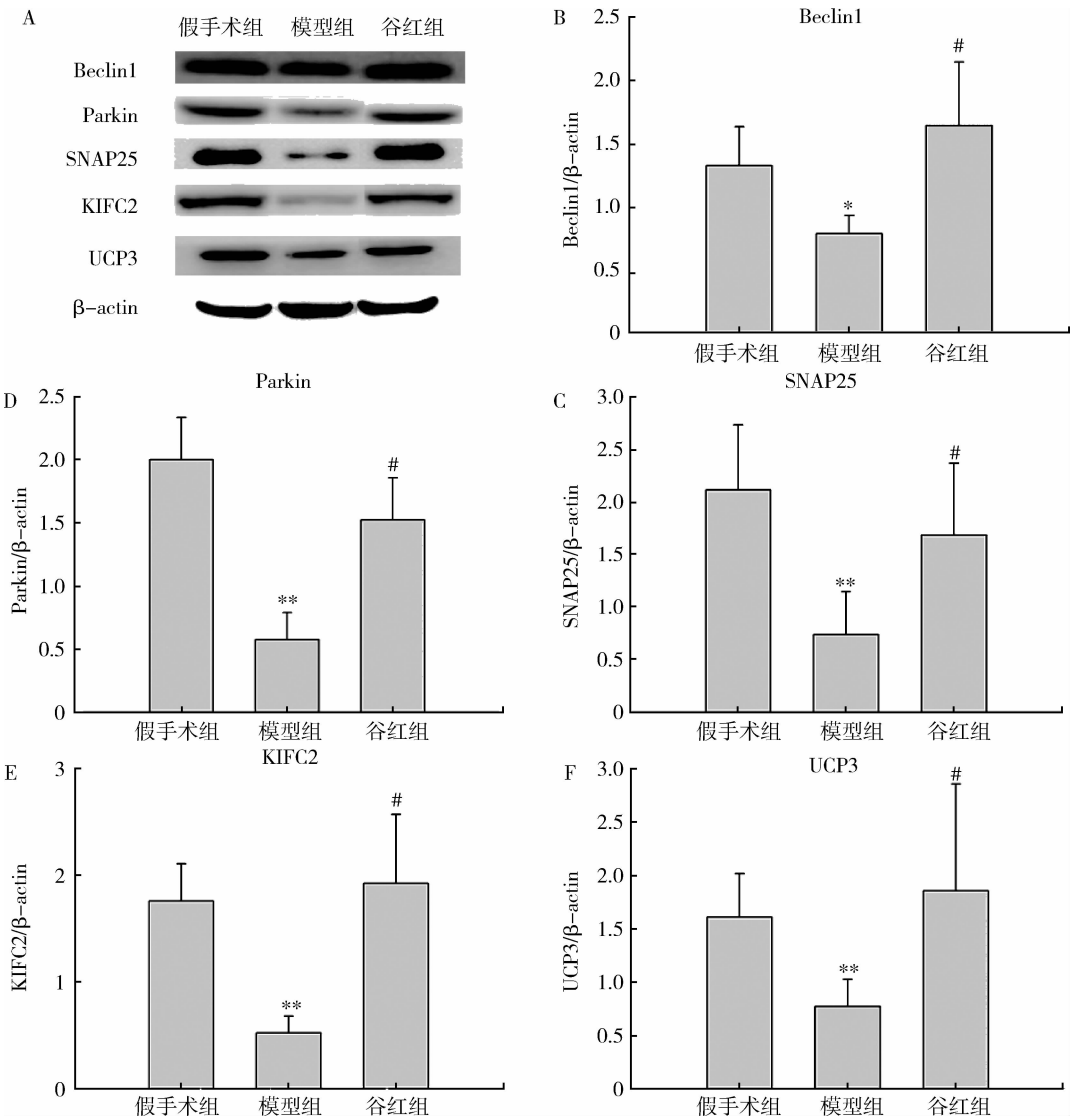


图 1 Western blot 法检测各组大鼠皮质与线粒体功能相关蛋白的表达
与假手术组比较,* $P<0.01$,** $P=0.000$;与模型组比较,# $P<0.01$

讨 论

近年来,越来越多的研究表明脑缺血再灌注损伤的机制很可能与线粒体功能障碍有关^[11~13]。有研究者认为改善线粒体功能可能成为治疗缺血损伤的新靶标^[3]。本实验采用 Western blot 法检测了与线粒体功能相关的多种蛋白 Beclin1、Parkin、KIFC2、SNAP25

和 UCP3 的表达水平。
Beclin1 作为首个被鉴定可介导哺乳动物自噬的基因,在细胞自噬与凋亡之间起到正向调控作用^[14]。结果显示,谷红注射液可使缺血再灌大鼠大脑皮质组织中 Beclin1 表达显著上调,从而促使受损线粒体及时被清除,对细胞起到保护作用^[15]。Parkin 是一种

与癌症等多种疾病相关的基因,其过量表达可使多种外膜蛋白泛素化,并募集自噬小体选择性诱导损伤的线粒体产生自噬^[16]。正常表达水平的 Parkin 对维持细胞内环境稳态起着重要作用。笔者观察到谷红注射液能显著提高损伤后大鼠皮质组织中 Parkin 的表达。快速轴浆顺向运输的动力分子 KIFC2 特异性的表达于成熟神经元的胞体及树突,驱动多泡体从细胞体到外周的树突运输^[17]。神经细胞中大多数线粒体在细胞体中产生,因此,细胞远端(如突触)所需的 ATP 由高效的轴突运输来提供^[18]。本实验结果显示脑缺血再灌注损伤后大鼠脑皮质组织中 KIFC2 蛋白表达显著下调,说明胞内快速轴浆运输功能下降,新合成的细胞器例如线粒体可能无法及时送达细胞远端而导致能量代谢障碍,从而进一步诱导线粒体损伤。而谷红注射液治疗可显著上调 KIFC2 的表达水平,有效促进轴浆运输功能的恢复,进而保证新合成的线粒体的运送。

此外,SNAP25 是一种广泛分布于神经元细胞的突触前膜、突触小泡、轴突膜、树突上的蛋白,其表达也与脑缺血关系十分密切。SNAP25 与突触融合蛋白、突触小泡蛋白结合后可变构成一种相当稳定的三元复合物,在突触小泡的分泌、外排及其融合过程中发挥着重要作用^[19]。近年来有研究表明,SNAP25 与神经细胞逆行轴突运输、自噬也有相关性。笔者发现当脑缺血再灌注损伤时 SNAP25 蛋白表达减少,而谷红注射液可显著上调之。解偶联蛋白(uncoupling proteins, UCPs)家族是线粒体阴离子转运体超家族中的一个亚家族,定位于线粒体内膜上。UCP3 有较强的减少线粒体活性氧簇(ROS)产生和从线粒体基质中输出脂肪酸阴离子或脂质过氧化产物的能力,这样可以进一步减少氧化应激、甘油三酯、脂质衍生物以及线粒体破坏等,并最终起到增加细胞活力和寿命、增强机体代谢适应性和对胰岛素敏感度的作用。笔者的研究结果发现,缺血再灌注损伤 14 天后大鼠大脑皮质组织中 UCP3 蛋白的表达显著降低,而谷红治疗可显著提高其表达,从而改善缺血再灌注损伤。

综上所述,线粒体是脑缺血损伤的重要靶标,而笔者的实验证明谷红注射液的脑保护机制正是通过改善线粒体功能实现的。进一步开展脑缺血与线粒体功能关系的研究,将为阐明药物的脑保护机制开辟新路。脑缺血再灌注造成线粒体多种通路功能障碍以及能量衰竭,导致神经细胞凋亡或死亡,因此线粒体是脑缺血损伤的重要靶标,认识其在缺血机制中的地

位与影响,将有利于开展更好的脑保护措施。

参考文献

- 1 Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments [J]. *Neuron*, 2010, 67(2): 181-198
- 2 Vosler PS, Graham SH, Wechsler LR, *et al.* Mitochondrial targets for stroke: focusing basic science research toward development of clinically translatable therapeutics [J]. *Stroke*, 2009, 40(9): 3149-3155
- 3 Anne Stetler R, Leak RK, Gao Y, *et al.* The dynamics of the mitochondrial organelle as a potential therapeutic target [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(1): 22-32
- 4 Zhang R, Yang N, Ji C, *et al.* Neuroprotective effects of Aceglutamide on motor function in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2015, 33: 741-759
- 5 刘伊娜, 朱健华, 吴翔, 等. 羟基红花黄色素 A 抗心肌细胞缺氧复氧损伤的线粒体相关机制 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2013, 23(4): 313-316
- 6 付文国. 乙酰谷酰胺联合红花治疗短暂性脑缺血发作 70 例分析 [J]. *山西医药杂志下半月版*, 2010, 39(14): 671-672
- 7 徐蔚海, 崔丽英, 左萍萍, 等. 谷红对抵抗大鼠脑缺血能力影响的研究 [J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 20: 1627-1629
- 8 张蕊, 范思远, 梁珍, 等. 谷红注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠运动功能障碍的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(1): 12-16
- 9 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- 10 Chen J, Li Y, Wang L, *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011
- 11 Court FA, Coleman MP. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(6): 364-372
- 12 Liu W, Tian F, Kurata T, *et al.* Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice [J]. *Neurosci Res*, 2012, 90(6): 1183-1189
- 13 Besancon E, Guo S, Lok J, *et al.* Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29(5): 268-275
- 14 Liu K, Sun Y, Gu Z, *et al.* Mitophagy in ischaemia/reperfusion induced cerebral injury [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(7): 1295-1300
- 15 Wei K, Wang P, Miao CY. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(11): 879-886
- 16 Jiang YN, Lou YX, Zhang Z, *et al.* Some diseases caused by Parkin [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(1): 455-458
- 17 涂桂花, 梁尚栋. 神经轴浆运输的功能与疾病研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(1): 94-98
- 18 Mifsud G, Zammit C, Muscat R, *et al.* Oligo dendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(7): 603-612
- 19 Maslov LN, Lishmanov IuB, Khaliulin IG, *et al.* Uncoupling proteins and their role in the regulation of brain and heart tolerance to impact of ischemia and reperfusion [J]. *Russ Fiziol ZhIm I M Sechenova*, 2011, 97(8): 761-780

(收稿日期: 2016-07-06)

(修回日期: 2016-07-18)