

- (1):16-20
- 16 Zhang Z, Wang J, Li J, *et al.* MicroRNA - 150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97(4):511-517
- 17 Li SJ, Liu HL, Tang SL, *et al.* MicroRNA - 150 regulates glycolysis by targeting von Hippel - Lindau in glioma cells. [J]. *Am J Translat Res*, 2017, 9(3):1058-1059
- 18 王义彪, 赵建农, 王鹏程, 等. miR - 150 过表达对小鼠垂体瘤细胞株 GT1 - 1 增殖的调控作用及机制[J]. *山东医药*, 2017, 57(21):21-23
- 19 李阅历, 钟理, 杨攀, 等. SD 大鼠房颤模型的构建及其外周血 IL - 17A 变化的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(3):253-258
- (收稿日期:2018-04-21)
- (修回日期:2018-05-06)

银杏内酯 B 对外伤后神经细胞凋亡 Omi/HtrA2 信号通路影响的实验研究

陈方慧 王 弋 方金燕 吴泽生 陈子晞 谢 贇 肖 晨 赵 雪

摘 要 **目的** 使用银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 治疗大鼠颅脑损伤, 揭示其对 Omi/HtrA2 介导的神经细胞凋亡线粒体途径的影响。**方法** 分设假手术组、脑外伤组和治疗组, 30 只大鼠随机分配, 每组 10 只。脑外伤组和治疗组大鼠接受外力打击, 假手术组大鼠不做外力打击。治疗组大鼠外伤后连续 3 天按照 20mg/(kg·d) 剂量腹腔注射 GB, 脑外伤组和假手术组大鼠连续 3 天腹腔注射 1ml 0.9% 氯化钠溶液。外伤后第 3 天, 检测海马组织凋亡神经细胞及 Omi/HtrA2、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、pro-caspase-3、pro-caspase-9 和剪切聚腺苷二磷酸-核糖多聚酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 蛋白表达和 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性。**结果** 与假手术组比较, 脑外伤组海马凋亡神经元比例、Omi/HtrA2、pro-caspase-3、pro-caspase-9 和剪切 PARP 蛋白表达及 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性均显著升高 ($P < 0.01$), XIAP 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$); 与脑外伤组相比, 治疗组海马凋亡神经元比例、Omi/HtrA2、pro-caspase-3、pro-caspase-9 和剪切 PARP 蛋白表达及 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性均显著下降 ($P < 0.01$), XIAP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** GB 可能通过抑制 Omi/HtrA2 介导的线粒体途径从而降低颅脑损伤大鼠神经细胞凋亡。

关键词 大鼠 颅脑损伤 神经细胞凋亡 Omi/HtrA2 银杏内酯 B

中图分类号 R651 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.01.020

Experimental Study on Influence of Ginkgolide B on Omi/HtrA2 Signaling Pathway Involved in Post-traumatic Neuronal Apoptosis. Chen Fanghui, Wang Yi, Fang Jinyan, *et al.* Department of Emergency Medicine, Hangzhou First People's Hospital, Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China.

Abstract Objective To utilize Ginkgolide B for treatment of rat craniocerebral injury and investigate its influence on Omi/HtrA2-mediated mitochondrial pathway implicated in neuronal apoptosis after rat craniocerebral injury. **Methods** Sham-operation group, brain trauma group and treatment group were formed. 30 rats were randomly assigned and 10 rats were arranged in each group. Rats in brain trauma group and treatment group underwent external force hit, while rats in sham-operation group did not. Rats in treatment group were administrated intraperitoneally with 20mg/(kg·d) Ginkgolide B daily for 3 days, while rats in sham-operation group and brain trauma group were given an intraperitoneal injection of 1ml normal saline until completion of day 3. At post-traumatic day 3, apoptotic neuronal cells, expressions of Omi/HtrA2, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), pro-caspase-3, pro-caspase-9 and cleaved poly ADP-ribose polymerase (PARP) and activities of caspase-3 and caspase-9 proteins were determined in hippocampus tissues. **Results** As compared with sham-operation group, percentage of apoptotic neurons, expressions of Omi/HtrA2, pro-caspase 3, pro-caspase 9 and cleaved PARP and activities of caspase-3 and caspase-9 proteins were significantly elevated (all $P < 0.01$) and expression of XIAP was obviously decreased ($P < 0.01$) in rat hippocampus tissues of brain trauma group. Percentage of apoptotic neurons,

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2015ZA123)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院(南京医科大学附属杭州医院)急诊科

通讯作者:王弋,电子邮箱:1873098337@qq.com

expressions of Omi/HtrA2, pro - caspase 3, pro - caspase 9 and cleaved PARP and activities of caspase - 3 and caspase - 9 proteins were significantly decreased (all $P < 0.01$) and expression of XIAP was obviously elevated ($P < 0.01$) in rat hippocampus tissues of treatment group when compared with brain trauma group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Ginkgolide B might depress neuronal cellular apoptosis of craniocerebral injury rats via inhibiting Omi/HtrA2 mediated mitochondrial pathway.

Key words Rat; Craniocerebral injury; Neuronal apoptosis; Omi/HtrA2; Ginkgolide B

银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 是银杏叶的主要提取物,对血小板活化因子具有明显的拮抗作用,已用于治疗血栓形成、急性胰腺炎和心血管疾病等疾病^[1]。GB 可显著抑制神经细胞凋亡,但具体机制尚不明确^[2]。Omi/HtrA2 是一种由线粒体产生并可进入细胞质的丝氨酸蛋白酶。X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 是内源性的 caspases 抑制物;而 Omi/HtrA2 通过降解 XIAP 来增强 caspase 活性从而参与线粒体凋亡途径发挥致凋亡作用^[3~6]。线粒体 Omi/HtrA2 信号通路参与大鼠脓毒症性脑病、幼鼠癫痫持续状态和大鼠脑缺血/灌注损伤中的神经细胞凋亡过程^[7~9]。但目前少有研究揭示该信号途径在颅脑损伤后神经细胞凋亡中的作用。本研究检测颅脑损伤大鼠海马组织细胞凋亡,观察 Omi/HtrA2 通路上 XIAP、pro - caspase 3 和 pro - caspase 9 等蛋白的表达及 GB 的干预作用,从而揭示大鼠颅脑损伤后 Omi/HtrA2 介导的神经细胞凋亡线粒体途径的激活及 GB 抗神经细胞凋亡的信号通路。

材料与方法

1. 材料:健康 Wistar 大鼠(南京大学模式动物研究所,雄性,清洁级);GB(规格:10mg,批号:15291 - 77 - 7,上海诺辰生物技术有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(批号:23256,美国 Thermo Scientific 公司);TUNEL 试剂盒(批号:TUN11684817,北京嘉美诺生物科技有限公司);caspase - 3 和 caspase - 9 底物(批号:T9281、T9275,美国 Livemore 公司);转印槽(型号:Trans - Blot,美国 Biorad 公司);电泳仪(型号:BG - caTANK,北京百晶生物技术有限公司);小型垂直电泳槽(型号:164 - 8001,美国 Biorad 公司);脱色摇床(型号:RCK 2D 200,上海达姆实业有限公司);生物倒置显微镜(型号:IX - 71,中国奥林巴斯有限公司);低温高速离心机(型号:TD4,盐城凯特实验仪器设备有限公司);荧光分光光度计(型号:B - 500,上海元析仪器有限公司)。

2. 方法:本实验设立假手术组、脑外伤组和治疗组,随机分配 30 只大鼠,每组 10 只。大鼠腹腔注射

戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉后,取右侧冠状缝后 1mm 和中线旁开 2mm 为撞击位点,切开头皮后,钻直径 5mm 骨孔一枚,采用 Feeney 自由落体损伤装置,选择 40g 重击锤从 25cm 处自由坠落冲击撞杆,打击深度 5mm,缝合头皮。脑外伤组和治疗组大鼠按上述标准制作大鼠颅脑损伤模型,假手术组大鼠切开头皮但未作自由落体打击。模型形成前 0.5h,治疗组大鼠予以 20mg/(kg · d) GB 腹腔注射,其余两组大鼠腹腔注射 1ml 0.9% 氯化钠溶液,均连续用药 3 天。在第 3 天,取大鼠以 80mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射深度麻醉后断头处死,分离海马组织。假手术组、脑外伤组和治疗组 3 天内死亡大鼠依次是 1、2 和 2 只。大鼠死亡后补充成活大鼠,保证每组 10 只大鼠。3 组大鼠病死率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.516$, $P = 0.773$)。

3. 细胞凋亡检测:采用石蜡包埋大鼠海马组织,切取厚约 4 μ m 切片,按照说明书采用 TUNEL 法检测海马组织神经细胞凋亡。凋亡神经细胞为细胞核呈现棕黄色或棕红色。在光学显微镜下计算 10 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个细胞,总计 1000 个细胞,计算平均阳性率(%)。

4. 蛋白表达的检测:采用 BCA 法测定大鼠海马组织蛋白浓度,采用 Western blot 法检测大鼠海马组织 Omi/HtrA2、XIAP、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9 和剪切 PARP 蛋白表达,结果用 quality one 软件分析杂交条带灰度值,以 β - actin 水平为内对照,比较相对灰度值。

5. 蛋白活性的检测:采用四肽荧光底物法检测海马组织 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白活性。采用荧光分光光度计,取激发波长 400nm 和释放波长 505nm 处测定荧光强度。以未加脑组织时的荧光强度为参照值,计算荧光强度,最终比较相对荧光强度。

6. 统计学方法:应用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析假手术组、脑外伤组和治疗组 3 组间大鼠海马凋亡神经元比例、Omi/HtrA2、XIAP、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9、剪切 PARP 蛋白表达、

caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白活性,组间两两比较采用 *LSD* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. GB 对大鼠海马神经元凋亡的影响:由图 1 和图 2 可见,3 组大鼠凋亡的海马神经元比例比较,差

异有统计学意义($F = 157.806, P < 0.01$)。脑外伤组大鼠凋亡的海马神经元比例较假手术组显著升高($P < 0.01$),而治疗组大鼠凋亡的海马神经元比例较脑外伤组显著下降($P < 0.01$)。

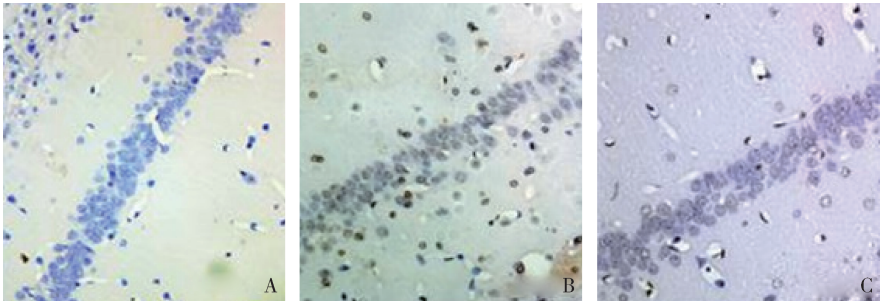


图 1 GB 对大鼠海马神经元凋亡的影响 (TUNEL, $\times 100$)
A. 假手术组;B. 脑外伤组;C. 治疗组

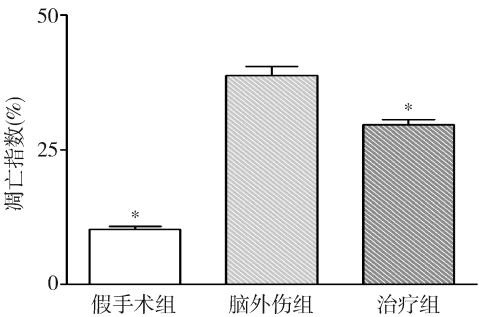


图 2 GB 对大鼠海马凋亡神经元比例的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

2. GB 对大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9、剪切 PARP 和 XIAP 蛋白表达的影响:由图 3 ~ 图 8 可见,3 组大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9、剪切 PARP 和 XIAP 蛋白表达比较,差异有统计学意义($F = 85.538、104.546、89.650、63.168$ 和 $53.096, P$ 均 < 0.01)。脑外伤组大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9 和剪切 PARP 蛋白表达均较假手术组显著升高($P < 0.01$),脑外伤组大鼠海马组织 XIAP 蛋白表达较假手术组显著下降($P < 0.01$);治疗组大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9 和剪切 PARP 蛋白表达均较脑外伤组显著下降(P 均 < 0.01),治疗组大鼠海马组织 XIAP 蛋白表达较脑外伤组显著升高($P < 0.01$)。

3. GB 对大鼠海马组织 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白活性的影响:由图 9 和图 10 可见,3 组大鼠海马

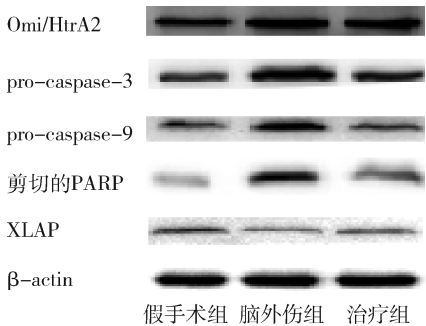


图 3 GB 对大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9、剪切 PARP 和 XIAP 蛋白表达的影响

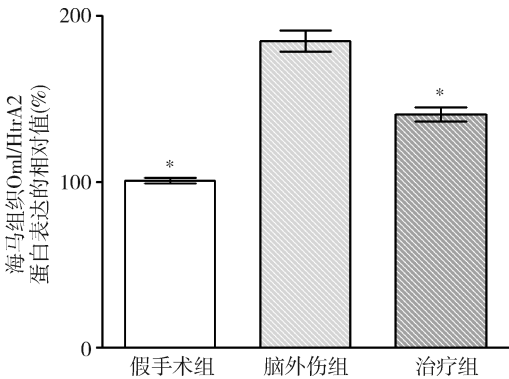


图 4 GB 对大鼠海马组织 Omi/HtrA2 蛋白表达相对值的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

组织 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白活性比较,差异有统计学意义($F = 62.716$ 和 $53.067, P$ 均 < 0.01)。脑外伤组大鼠海马组织 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白

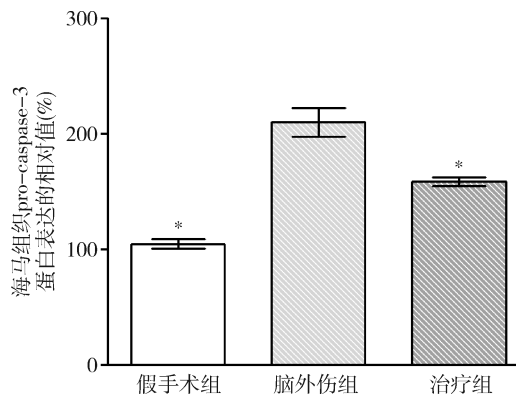


图5 GB对大鼠海马组织 pro-caspase-3 蛋白表达相对值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

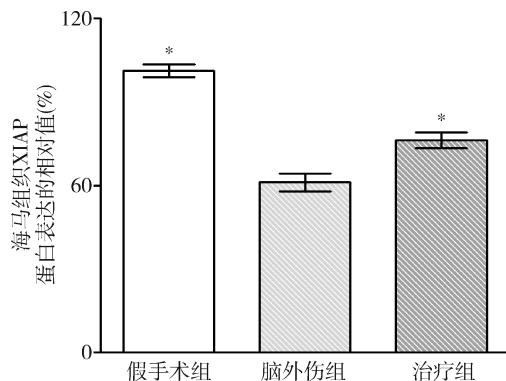


图8 GB对大鼠海马组织剪切的 XIAP 蛋白表达相对值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

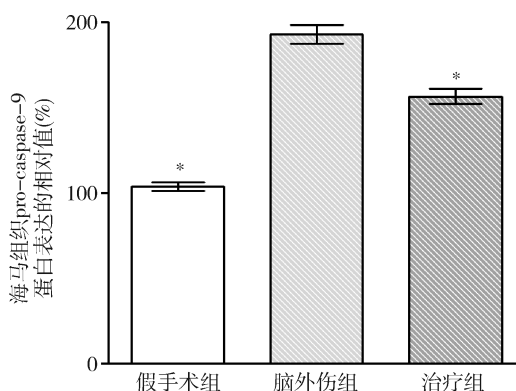


图6 GB对大鼠海马组织 pro-caspase-9 蛋白表达相对值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

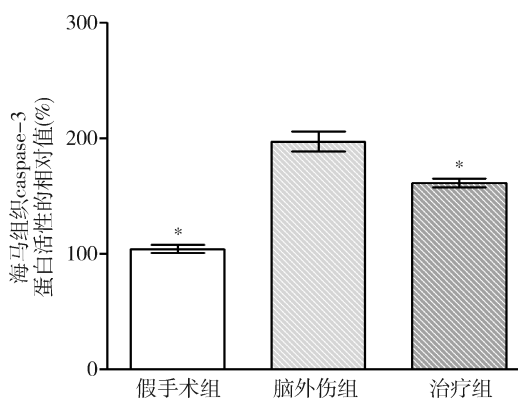


图9 GB对大鼠海马组织 caspase-3 蛋白活性相对值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

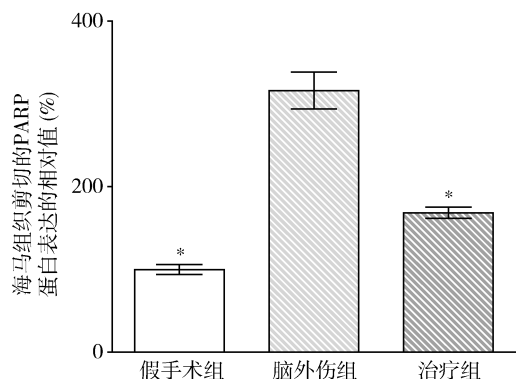


图7 GB对大鼠海马组织剪切的 PARP 蛋白表达相对值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

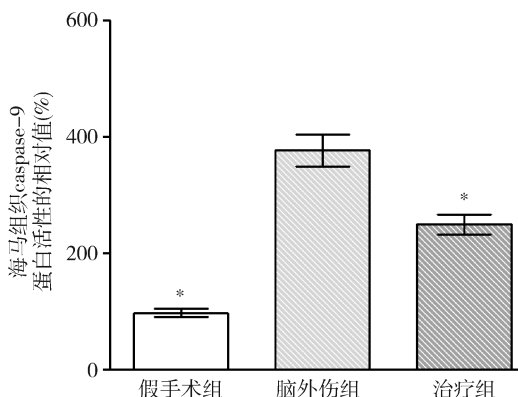


图10 GB对大鼠海马组织 caspase-9 蛋白活性相对值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
与脑外伤组比较, * $P < 0.01$

活性均较假手术组显著升高(P 均 < 0.01), 治疗组大鼠海马组织 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性均较脑外伤组显著下降(P 均 < 0.01)。

讨 论

颅脑损伤是一种严重的外伤形式, 发生率居四肢创伤之后, 但病死率和致残率居所有外伤之首。颅脑

损伤后继发性脑损伤的病理生理机制相当复杂,涉及炎症反应、自由基反应、氨基酸毒性作用和细胞凋亡等^[10~13]。哺乳细胞涉及外在途径、内在途径(即线粒体途径)和内质网途径在内的 3 种基本的细胞凋亡途径。线粒体凋亡是细胞凋亡的主要途径之一,是一种由凋亡基因调控的高度保守的死亡过程。炎症介质、缺血、缺氧及外伤等外在或内在的凋亡信号作用于线粒体,通过改变线粒体膜的通透性,导致线粒体内相关物质释放入胞质,从而介导线粒体乃至细胞的凋亡,因此线粒体可能在细胞凋亡中起到主开关的作用^[14~16]。研究证实,线粒体途径参与颅脑损伤后神经细胞凋亡的过程^[17~19]。然而,线粒体途径也涉及复杂的信号传递通路,剖析这些信号通路对进一步揭示外伤性脑损伤的病理生理机制具有重要意义,也为继发性脑损伤的药物治疗提供新思路。

Omi/HtrA2 是一种在内质网合成,由 MTS/MLS 引导转运进入线粒体的丝氨酸蛋白酶。Omi/HtrA2 在线粒体内可通过自身蛋白酶解或被加工肽酶降解形成成熟 Omi 分子,并储存在线粒体膜间隙中。线粒体膜在细胞受到刺激发生应激反应时通透性增加,Omi/HtrA2 分子则从线粒体释放并进入细胞质^[3~6]。XIAP 是内源性 caspases 抑制物,可结合和抑制活化的 caspase - 9。Omi/HtrA2 分子在细胞受到刺激后被释放到细胞质,从而降解 XIAP,解除 XIAP 对 caspase - 9 的抑制,导致下游 caspase - 3 活化,从而 DNA 断裂发生凋亡,即 Omi/HtrA2 通过增强 caspase 活性参与线粒体凋亡途径发挥致凋亡作用^[3~6]。线粒体 Omi/HtrA2 信号通路参与了脓毒症性脑病、癫痫持续状态幼鼠和脑缺血/灌注损伤大鼠神经细胞的凋亡过程^[7~9]。本研究发现,颅脑损伤大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9 和剪切 PARP 蛋白表达及 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白活性出现明显的升高,而 XIAP 蛋白表达出现了下调。因此,线粒体 Omi/HtrA2 信号通路可能参与了颅脑损伤后神经细胞凋亡。

银杏是地球上最古老的植物之一,具有独特的药理作用和治疗价值。GB 为银杏叶提取物中主要的药效成分之一,为二萜类酸化合物^[1]。GB 能通过降低 Bax 和 caspase - 3 表达,增加 Bcl - 2 表达,抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡^[20]。GB 可通过抑制核因子 - κ B/Toll 样受体 4 途径影响神经炎症反应,从而降低脑出血或脑外伤大鼠的神经细胞凋亡^[21,22]。目前,GB 是否通过抑制细胞凋亡线粒体途径而降低神经

细胞凋亡还不得而知。本研究发现,使用 GB 腹腔注射后,颅脑损伤大鼠海马组织 Omi/HtrA2、pro - caspase - 3、pro - caspase - 9 和剪切 PARP 蛋白表达及 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白活性出现明显的下降,而 XIAP 蛋白表达出现了上升。因此,可以推测,抑制线粒体 Omi/HtrA2 信号通路可能是 GB 抗神经细胞凋亡的机制之一。

参考文献

- 1 万芬,唐金荣. 银杏内酯 B 对缺血性脑卒中的研究进展[J]. 医学综述, 2016,22(23):4667 - 4671
- 2 Gu JH, Ge JB, Li M, *et al.* Inhibition of NF - κ B activation is associated with anti - inflammatory and anti - apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(4):652 - 660
- 3 Dan HC, Sun M, Kaneko S, *et al.* Akt phosphorylation and stabilization of X - linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [J]. *J Biol Chem*, 2016,291(43):22846
- 4 Han J, Liu Z, Wang N, *et al.* MicroRNA - 874 inhibits growth, induces apoptosis and reverses chemoresistance in colorectal cancer by targeting X - linked inhibitor of apoptosis protein [J]. *Oncol Rep*, 2016,36(1):542 - 550
- 5 Xu Y, Yang W, Shi J, *et al.* Prohibitin 1 regulates tumor cell apoptosis via the interaction with X - linked inhibitor of apoptosis protein [J]. *J Mol Cell Biol*, 2016,8(3):282 - 285
- 6 Li H, He F, Zhao X, *et al.* YAP inhibits the apoptosis and migration of human rectal cancer cells via suppression of JNK - Drp1 - Mitochondrial fission - HtrA2/Omi pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,44(5):2073 - 2089
- 7 Hu Y, Huang M, Wang P, *et al.* Ucf - 101 protects against cerebral oxidative injury and cognitive impairment in septic rat [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013,16(1):108 - 113
- 8 Su D, Ma J, Zhang Z, *et al.* Protective effects of UCF - 101 on cerebral ischemia - reperfusion (CIR) is depended on the MAPK/p38/ERK signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016,36(6):907 - 914
- 9 Su D, Su Z, Wang J, *et al.* UCF - 101, a novel Omi/HtrA2 inhibitor, protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009,292(6):854 - 861
- 10 Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, *et al.* The far - reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017,13(3):171 - 191
- 11 Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury [J]. *Science*, 2016,353(6301):783 - 785
- 12 Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, *et al.* Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017,37(4):571 - 585
- 13 Joseph B, Haider A, Rhee P. Traumatic brain injury advancements [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2015,21(6):506 - 511
- 14 Kuhn H, Nieuwenhuijsen H, Karthe B, *et al.* Stretch - induced apoptosis in rat alveolar epithelial cells is mediated by the intrinsic mito-