

· 实验研究 ·

脑心通对脑缺血再灌注损伤细胞外信号 调节激酶活化的影响

张晓燕* 杨金升* 谷有全* 石向群*

(* 兰州军区兰州总医院神经内科, 甘肃省兰州市七里河区南滨河路 333 号 730050)

摘要 目的: 观察大鼠局灶性脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion I/R)后信号转导介质细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase ,ERK)的活化情况以及脑心通对其的影响。方法: 雄性成年 Wistar 大鼠 90 只, 随机分成 3 组: 假手术组、对照组和脑心通组(每组 30 只), 分别于缺血前 6 日每日用生理盐水 4ml、和脑心通 0.48g/kg(4ml 生理盐水溶解)灌胃。采用线栓法致大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion ,MCAO)模型, 在脑缺血再灌注后的 3h、6h、24h、48h 和 72h 分别处死大鼠(各组每个时间点 6 只), 将脑组织进行免疫组织化学、TTC 染色, TUNEL 法观察细胞凋亡。结果: 脑缺血诱导 ERK 活化, 第 6h 达高峰, 并持续到 72h。脑心通组 ERKs 活化明显较对照组增强, 而且各时间点 ERK 免疫反应阳性细胞数脑心通组较对照组显著增多($P < 0.01$)。脑心通组 TTC 染色梗死体积及凋亡细胞数较对照组明显较少($P < 0.01$)。结论: 局灶性脑缺血再灌注可诱导缺血脑细胞部分 ERK 活化, 脑心通干预可使缺血大脑海马 ERK 活化增强, 减轻细胞的缺血性损伤。

关键词 脑缺血 细胞外信号调节激酶 ;@ 脑心通

Effect of Naoxintong on Activation of Extracellular Signal Regulated Kinases after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

Zhang Xiaoyan , Yang Jinsheng , Gu Youquan , et al.

(Lanzhou General Hospital of PLA , Lanzhou 730050)

Abstract Objective :To study the activation of extra-cellular signal regulated kinase (ERK) after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and effect of Naoxintong on it. **Methods** :Ninety male adult wistar rats were randomly divided into 3 groups ,the sham-operated group,the control group and the Naoxintong group. The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by introducing a nylon suture to the right internal carotid artery. Before the ischemic phase ,to rats in the sham-operated group and the control group ,4ml of normal saline was intragastric administrated ,and to rats in the Naoxintong group ,Naoxintong dissolved in 4ml of normal saline(0.48g/kg) was intragastric administrated for 6 days. The rats were decapitated at 3hrs ,6hrs ,24hrs ,48hrs ,72hrs after reperfusion. 6 rats of every group at each time point. The volume of infarction were observed by the TTC staining method ;The apoptosis neurons were detected in CA1area by TUNEL method ;ERK phosphorylation was detected by immunohistochemistry. **Results** :The cerebral ischemia induced ERK activation reached the peak at 6hrs and maintained to 72hrs after reperfusion. As compared with the control group ,the ERK activation in the Naoxintong group was significantly enhanced with increased positive immune reacted cells($P < 0.01$). As compared with the control group ,the volume of infarction and the apoptosis neurons in the Naoxintong group was significantly decreased($P < 0.01$). **Conclusion** :Cerebral ischemia/reperfusion could induce the activation of ERK in the ischemic brain cells ,intervention of Naoxintong could enhance the activation and decrease the volume of infarction and the apoptosis neurons ,alleviate the ischemic injury.

Key Words Cerebral ischemia ;Extracellular signal regulated kinase ;@ Naoxintong

近年来人们对脑缺血再灌注损伤进行了广泛研究,认为细胞信号转导级联参与调节中枢神经系统神经细胞的损伤^[1]。丝裂素活化蛋白(mitogen-activation protein kinases ,MAPKs)是一组细胞内广泛存在的丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶,通过转录因子磷酸化而改变基因的表达水平,在细胞信号转导中起着重要的作用,参与细胞生长、发育、分化、凋亡等生理、病理过程。包括 3 个亚组: ERK、P38 和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun-NH₂-terminal kinase ,JNK)。他们可被许多因子激活,并通过调节转录因子活性而控制基因表达^[2,3]。研究

发现 ERK、p38 和 JNK 在心、脑、肝、肾等组织细胞的缺血/再灌注过程中被激活^[2,4,5,6,7]。研究表明脑心通对短暂性局灶性脑缺血损伤有明显保护作用。步长脑心通是由黄芪、乳香、没药、全蝎、地龙等 16 味中药组成,具有益气活血、化瘀通络、醒脑开窍、宣痹止痛之功效,临床上用于治疗脑梗塞、冠心病、血管性痴呆等取得了较好的疗效。本研究选择血管内栓线法致大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,观察大鼠大脑缺血再灌注后 ERK 的活化、细胞凋亡的变化规律、梗塞体积及脑心通对其的影响,探讨脑心通防治缺血性脑血管病的作

用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要药物和试验试剂:脑心通胶囊粉由陕西咸阳步长制药有限公司提供,临用时以蒸馏水制成适当浓度混悬液。凋亡检测试剂盒、ERKs 试剂盒、DAB 显色剂均购于武汉博士德公司。红四氮唑(TTC),为淡黄色粉末,北京化学试剂公司提供。

1.2 试验动物分组及给药:健康雄性 Wistar 大鼠 90 只,体重 200 ~ 250g,由兰州大学试验动物中心提供。术前夜禁食,随意进水。随机分成假手术组(sham 组)、缺血 2h 再灌注组(I/R 组)、脑心通组,每组根据再灌注时间不同再分为 3h、6h、24h、48h、72h,5 个亚组,每亚组各 6 只鼠。脑心通胶囊 0.48g/kg,于术前先连续灌胃给药 6d,第 7 天给药 1h 后造模。假手术组、模型对照组灌服等容积的生理盐水。

1.3 模型制作:根据 Koizumi^[8]、Nagasawa^[9]的改良线栓法制成大鼠大脑中动脉缺血模型。用 10% 的水合氯醛 3ml/kg 腹腔麻醉大鼠后,将其仰卧固定,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA)结扎 ECA 与 CCA,用动脉夹夹闭 ICA 远心端后,迅速于 ECA 与 ICA 分叉下方剪一切口,将一预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线插入颈内动脉,插入深度为(18.5 ± 0.5)mm,直到有轻微阻力感为止,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。结扎入口处,尼龙线外留约 1cm 缝合皮肤。2h 后轻轻提拉所留线头至略有阻力,实现大脑中动脉再灌注,造模完成。在缺血 2h 和再灌注 1h 内,用白炽灯加热维持大鼠的体温,体温维持在肛温 36.5℃ ~ 37.5℃。假手术组只结扎 CCA 与 ECA。动物模型建立成功后按 Longa^[10]法对动物的神经功能进行评分,均在 2 ~ 3 分,即以动物清醒后,爬行时向左转圈(追尾现象),提尾时左前肢内收屈曲并且排除有蛛网膜下腔出血者为入组标准。术后苏醒回笼,自由食水。

1.4 组织切片的制备:大鼠再灌注后 3h、6h、24h、48h、72h,在 10% 水合氯醛深度麻醉动物后开胸暴露心脏,经升主动脉插管剪开左心耳,用生理盐水 250ml 快速冲洗,随后用 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(4℃, pH7.4)先后慢灌注约 250ml 固定,断头取脑后,在 4% 多聚甲醛中固定 6 ~ 8h,取视交叉后 1 ~ 4mm 脑块进行石蜡包埋,冠状面切片,取齿状回与海马互包平面的切片,片厚 3μm。

1.5 脑梗范围的测定方法:模型大鼠再灌注 24h,断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,剩余部分在 -20℃ 冰箱冷冻 10min,在冰盘上冠状切成 6 片,迅速将脑片置于 TTC 染液中(每 5ml 染液中含 4% TTC1.5ml, 1mol/L K₂HPO₄ 1ml,其余加蒸馏水至刻度),37℃ 避

光温孵 20min,取出后置于 10% 甲醛液中避光保存 24h。经染色后非缺血区为玫瑰红色,梗死区为白色。数码相机拍照后,应用病理图像分析仪测量脑梗死面积。根据公式 $V = (A_1 + \dots + A_n)t/2$ 算出梗死体积,其中 t 为切片厚度, A 为梗死面积。

1.6 免疫组织化学:采用免疫组化 SABC 法(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex technique)进行染色。切片上滴加 1:200 兔抗 ERK1/2 抗体,4℃ 孵育过夜,接着用生物素连接的羊抗兔二抗在室温下反应 90min,再用卵白素-生物素复合物室温下反应 90min,最后用 DAB 溶液显色,苏木素复染细胞核。贴片,空气中干燥,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,在显微镜下计数海马 CA1 区中段 100 单位长度内 ERK 染色阳性细胞数。

1.7 原位细胞凋亡检测:取海马冠状石蜡切片,常规二甲苯、乙醇脱蜡至水。蛋白酶 K(20mg/L)室温消化,用甲醇配制的 3% 过氧化氢消除内源性辣根过氧化物酶活性,加末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)与地高辛标记的 dUTP 混合反应液进行孵育,再加辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体孵育,用 DAB 显色,核呈深棕黄色者为凋亡细胞,最后脱水透明封片。在 10 × 10 倍 Olympus 显微镜下摄像观察各组间细胞凋亡变化趋势。在 400 倍光镜下计数海马 CA1 区中段 100 单位长度内 TUNEL 染色阳性细胞数。

1.8 统计学方法:所有数据全部以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS10.0 统计软件分析,两样本均数的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 脑心通胶囊对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗范围的影响:见表 1,与模型组大鼠相比较,在缺血 2h 再灌注 24h 时脑心通胶囊 0.48g/kg 组可明显减小模型大鼠的脑梗范围($P < 0.01$)。

表 1 脑心通胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑梗范围的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	梗塞范围
sham 组	6	0 ± 0 *
I/R 组	6	176.4 ± 23.44
脑心通组	6	102.9 ± 14.23 *

与 I/R 组比较, * $P < 0.01$

2.2 免疫组织化学染色及定量分析:结果见表 2,ERK 染色阳性呈现棕黄色颗粒状,主要表达于细胞核内,胞浆内有少数表达。ERK 活性表达于脑缺血再灌注后 3h 明显增加,阳性细胞胞体较大,并有树枝状突起,主要分布于缺血皮层细胞层及皮层下区域,如海马分子层、基底节外层及缺血侧胼胝体。ERK 活性于再灌注后 6h 达到高峰,72h 恢复到正常水平。与 sham 组

表 2 脑心通胶囊对大鼠 I/R 后缺血侧海马 CA1 区 ERKs 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	3h	6h	24h	48h	72h
sham 组	65 ± 6	68 ± 2	66 ± 7	65 ± 8	66 ± 7
I/R 组	82 ± 5 ^{**}	92 ± 3 ^{**}	86 ± 6 ^{**}	73 ± 5 ^{**}	65 ± 7
脑心通组	91 ± 6 ^{##}	103 ± 10 ^{##}	94 ± 6 ^{##}	85 ± 6 ^{##}	75 ± 8 ^{##}

与 sham 组比较 ,^{*} $P < 0.01$;与 I/R 组比较 ,^{##} $P < 0.01$

表 3 脑心通胶囊对大鼠 I/R 后缺血侧海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	3h	6h	24h	48h	72h
sham 组	0.83 ± 0.75	1.17 ± 1.17	1.67 ± 6.6	0.33 ± 0.82	2.50 ± 1.76
I/R 组	18.67 ± 4.89 ^{**}	32.17 ± 4.92 ^{**}	77.33 ± 5.50 ^{**}	87.33 ± 4.08 ^{**}	64.17 ± 6.27 ^{**}
脑心通组	9.83 ± 3.06 ^{##}	21.83 ± 5.08 ^{##}	60.67 ± 7.69 ^{##}	70.33 ± 7.50 ^{##}	46.67 ± 8.36 ^{##}

注 :与 sham 组比较 ,^{*} $P < 0.01$;与 I/R 组比较 ,^{##} $P < 0.01$

比较 I/R 组及脑心通干预大鼠组缺血脑组织中均有 ERK 活化 ,但 ERK 免疫反应阳性细胞的个数是不相同的。大鼠脑缺血再灌注后 3h、6h、24h、48h 和 72h ,两组间 ERK 免疫反应阳性细胞数差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 TUNEL 法检测神经细胞凋亡 :结果见表 3 ,观察各组大鼠海马 CA1 区 ,假手术组基本上未见到染色阳性的神经细胞。缺血再灌注 3h 开始即出现染色为黄色的凋亡细胞 ,随缺血时间延长 ,凋亡细胞增多 ,并有细胞核固缩、凋亡小体出现等凋亡中晚期形态特征。凋亡细胞数于 48h 达到高峰 ,72h 以后凋亡细胞逐渐减少。与对照组比较 ,脑心通干预组在各时间点均有所减少 ($P < 0.01$)。

3 讨论

采用免疫组织化学方法、TTC 染色及末端标记的凋亡检测方法证明局灶性脑缺血/再灌注期间大鼠缺血侧海马 ERKs 活化增多 ,脑心通可通过增加 ERKs 活性表达减轻脑缺血损伤 ,并且减轻脑梗死体积及细胞凋亡。

随着对脑缺血/再灌注损伤机制研究的不断深入 ,越来越多的证据表明细胞信号转导系统对缺血后中枢神经系统神经细胞的存活与死亡起着重要的调节作用^[11]。MAPKs 是一组分布于胞浆中具有丝氨酸/酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶 ,激活的 MAPKs 通过磷酸化多种转录因子、细胞骨架相关蛋白和其它酶类等多种蛋白底物来调节多种细胞生理过程 ,从而对刺激细胞的信号作出必要的反应 ,参与了细胞生长、发育、分裂、死亡及细胞间的功能同步化等多种生理过程 ,是细胞外信号引起的细胞核反应的共同通路^[12]。通过对脑缺血后 MAPKs 途径的研究 ,了解在脑缺血后其动态、复杂和时间依赖性的变化环节和规律 ,以寻找可行的方法来调控 ,阻断信号传导途径来减少神经细

胞的死亡 ,从而为脑缺血/再灌注损伤的基础研究和临床救治提供新的视角和手段。

目前对 ERKs 研究较清楚 ,认为 ERKs 激活与细胞增殖有关^[13] ,促进细胞存活^[14,15]。Wu DC 等^[16]应用大鼠永久性 MCAO 局灶脑缺血模型研究 ,显示 ERKs 在缺血后 30min 开始被激活 ,高峰活化时增加了 2.7 倍。另有研究^[15,17]发现 ,心跳骤停再灌注后 ERKs 活性增加 ,再灌注 6h 达高峰 ,与我们的研究结果是一致的。

虽然脑缺血后 ERKs 的活性增强 ,与在缺血区活化增多是一致的 ,但 ERKs 在脑缺血后对神经元的作用存在争议。Alessandrini A 等^[18]报道在局灶性脑缺血前 30min 应用 ERKs 抑制剂可分别减少再灌注 2h 和 72h55% 和 36% 的梗塞容积 ,同时 ERKs 的活化减少 ,认为 ERKs 在脑缺血中被活化起神经毒性作用 ,诱导缺血性损伤 ,与决定神经元存活和死亡没有明显的关系。另一方面 ,更多的文献^[14,15]报道 ERKs 在脑缺血后活性增加 ,与改善神经元存活有关 ,而且最近有学者^[13,19]研究认为 ERKs 激活是预处理产生神经元缺血耐受性的关键机制。脑缺血后 ERKs 激活的时序性变化不一致及其对脑缺血性损伤的不同作用 ,可能与实验动物模型如缺血和再灌注持续时间和动物种类不同有关。

研究证明脑心通可显著减少 MCAO 致大脑梗死体积和改善神经功能缺陷 ,本实验进一步从免疫组织化学证明脑心通可以增强 ERKs 的活化、减少细胞凋亡、减少组织梗死体积。因此 ,我们认为局灶性脑缺血后 ERKs 激活与神经元的存活有关 ,脑心通可能通过增强脑缺血 ERKs 活性而发挥其神经保护作用 ,这也许

是脑心通治疗缺血性脑血管病的分子机理之一。虽然脑心通对缺血后神经元中 ERKs 的活化 ,发挥调节作用的机制尚不清楚 ,但可能与脑心通益气活血、化痰

通路的药理作用有关,其内含有大量的“血栓融解因子(BDF)”能够通过血脑屏障,迅速融解血栓,加快侧支循环建立,改善血液微循环,减轻脑水肿。其机制可能是通过减少蛋白水解酶、线粒体、受损的内皮细胞的释放和抑制凝血纤溶途径的激活,抑制补体系统的激活和减少 MAC 的形成,促进脑细胞功能的恢复。临床研究也证实,脑心通对防治缺血性脑血管病有良好的疗效^[20]。

参考文献

- 1 Wieloch T, Hu BR, Boris-Moller A, et al. Intracellular signal transduction in the postischemic brain. *Adv Neurol* 1996; 71: 371 ~ 387.
- 2 Lennmyr F, Karlsson S, Gerwins P, Ata KA, Terent A. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 2002 Dec; 106(6): 333 ~ 40.
- 3 Kaminska B, Kaczmarek L, Zangenehpour S, et al. Rapid phosphorylation of Elk-1 transcription factor and activation of MAP kinase signaling transduction pathway in response to visual stimulation. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13: 405.
- 4 Bendinelli P, Piccoletti R, Maroni P, et al. The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion. *FEBS* 1996; 398: 193.
- 5 Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, et al. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 1813.
- 6 Wu DC, Ye W, Che XM, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1320 ~ 1330.
- 7 Liu X, Wang S, Wu X, et al. Association between delayed cardioprotection of aged rat myocytes and activation of mitogen-activated protein kinase. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113: 5.
- 8 Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. I: A new experimental model of cerebral embolism in rat in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1 ~ 8.
- 9 Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989; 20: 84 ~ 91.
- 10 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989; 20: 84 ~ 91.
- 11 Wieloch T, Hu BR, Boris-Moller A, et al. Intracellular signal transduction in the postischemic brain. *Adv Neurol* 1996; 71: 371 ~ 387.
- 12 Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2001; 23(1): 1 ~ 19.
- 13 Gu ZL, Jiang Z, Zhang GY, et al. Diphosphorylation of extracellular signal regulated kinases and c-Jun N-terminal protein kinase in brain ischemic tolerance in rat. *Brain Res* 2000; 860(1-2): 157 ~ 160.
- 14 Irving EA, Barone FC, Reith AD, et al. Differential activation of MAPK/ERK and P38/SAPK in neurons and glia following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 77(1): 65 ~ 75.
- 15 Hicks SD, Parmele KT, Defranco DB, et al. Hypothermia differentially increase extracellular signal regulated kinase and stress activated protein kinase/C-Jun terminal kinase activation in the hippocampus during reperfusion after asphyrial cardiac arrest. *Neuroscience* 2000; 98(4): 677 ~ 685.
- 16 Wu DC, Ye W, Che XM, et al. Activation of mitogen activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(9): 1320 ~ 1330.
- 17 Ozawa H, Shioda S, Dohi K, et al. Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by the mitogen activated protein kinase signaling transduction pathway. *Neurosci Lett* 1999; 262(1): 57 ~ 60.
- 18 Alessandrini A, Namura S, Mokowitz MA, et al. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12866 ~ 12869.
- 19 Gonzalez Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, et al. Requirement for nitric oxide activation of P21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(1): 436 ~ 441.
- 20 方正龙,袁灿兴,颜乾麟,等.步长脑心通胶囊的临床研究. *中西医结合心脑血管病杂志* 2003(1): 32 ~ 34.

(2007-02-08 收稿)

《世界中医药》杂志社和日本国株式会社天兰 合作出版《世界中医药》日文版

《世界中医药》杂志社王炳岐社长与日本国株式会社天兰董巍先生于 2007 年 3 月 9 日在中国北京世界中联会议厅签订关于合作出版《世界中医药》日文版(季刊)协议书。世界中医药学会联合会秘书长李振吉、副秘书长姜再增出席了签字仪式。

《世界中医药》杂志日文版将在日本国注册,刊载文章三分之二从《世界中医药》中文版中选取,其余将由日本国株式会社天兰组织适合日本国情的中医学学术稿件。该杂志采用《世界中医药》杂志的封面设计,在“世界中医药”手写体刊名下注明“日文版”。并将在日本国翻译、编辑、印刷和出版、发行。

合作出版《世界中医药》日文版对促进两国医学交流,增进中日两国人民的情谊及传播中医药文化都将起到积极的推动作用。(汪焰)