

黄芪注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后 BDNF 表达的影响

孙丽 刘英北 王岭 陈晶 李海燕 王超 李艳

(青岛大学医学院第二附属医院神经内科, 青岛, 266042)

摘要 目的:探讨黄芪注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。方法:应用线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型,经腹腔注射黄芪注射液(6 mL/kg)干预治疗。Longa 法评分评价大鼠神经行为功能,蛋白印迹法(Western-blot)定量检测 BDNF 蛋白的表达,荧光定量 PCR(Real-Time PCR)检测 BDNF 基因的表达。结果:经黄芪注射液治疗后,大鼠大脑海马区 BDNF 蛋白和 BDNF mRNA 表达较对照组明显增加,动物神经行为功能显著改善。结论:黄芪注射液可通过上调 BDNF 的表达而促进受损神经的修复,刺激神经再生,改善动物的神经行为功能。

关键词 脑缺血;再灌注损伤;黄芪注射液;BDNF;大鼠

Effect of Astragalus Injection on Expression of BDNF in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

Sun Li, Liu Yingbei, Wang Ling, Chen Jing, Li Haiyan, Li Yan

(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Qingdao Medical College, Qingdao 266042, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of astragalus injection on expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** The middle cerebral artery occlusion reperfusion (MCAO/R) rat models were established by inserting filament suture from right external-internal carotid artery and treated by intraperitoneal astragalus injection (6 mL/kg). The neurobehavioral function of rats was evaluated by Longa's test, and neuronal apoptosis was detected by TUNEL staining with Western-blot as the quantity analysis method to detect the expressions of brain derived neurotrophic factor (BDNF). The expression of BDNF mRNA was determined by Real-Time PCR. **Results:** After the treatment with astragalus injection, the expression of BDNF and BDNF mRNA in rats hippocampus increased significantly compared with those of the control group. Neuronal apoptosis was significantly reduced and the animal neurobehavioral function improved significantly. **Conclusion:** Astragalus injection may inhibit apoptosis, promote the nerve repair, stimulate the nerve regeneration and improve the nervous behavioral function by up-regulated the expressions of BDNF.

Key Words Cerebral ischemia; Reperfusion injury; Astragalus injection; BDNF; Rats

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.032

缺血再灌注性脑损伤的直接后果是神经细胞的凋亡或难逆性坏死和超微结构的损坏^[1]。脑源性神经营养因子(Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)是神经营养因子家族的一员,在神经系统的发育和神经突触的形成中起着重要作用^[2-3]。Han 等^[4]研究发现,BDNF 在骨髓间充质干细胞分化为神经元细胞的过程中发挥重要的作用。Grade 等^[5]研究证实,BDNF 能够促进神经元前体细胞向缺血区迁移,促进神经再生。赵宇等^[6]研究指出,BDNF 和神经干细胞联合移植能够促进大鼠中动脉阻塞大鼠神经功能的恢复^[7]。因此,增加脑缺血/再灌注损伤后 BDNF 的表达,诱导神经元前体细胞迁移以及

分化为成熟的神经细胞,刺激神经再生,促进受损神经的修复,减少细胞凋亡,可能成为缺血再灌注性脑损伤治疗的一种有效途径。Yin 等^[8]研究指出,黄芪注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抗氧化、调节 iNOS、NGF 和 TrkA mRNA 的表达有关。罗玉敏等^[9]研究指出,黄芪甲苷是一种脑组织保护剂,可以降低血脑屏障的通透性,保护脑组织。张海宇等^[10]研究发现,黄芪注射液能保护脑出血灶周围的神经元,减缓大鼠脑出血后神经元的凋亡。大量研究表明,黄芪提取物对缺氧诱导的大脑神经元损伤具有保护作用,但其脑保护作用的机制仍需进一步探讨^[11-12]。我们的前期实验^[13-14]

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(编号:2011HW034)

通信作者:孙丽(1965.08—),女,硕士,主任医师,硕士生导师,研究方向:主要从事脑血管病防治研究,E-mail:806451617@qq.com;sunli_qd@163.com

初步证实,黄芪注射液可能通过抑制 JNK3 的表达抑制神经细胞凋亡及促进神经营养因子和血管生长因子的表达诱导血管新生,抑制神经元的凋亡或坏死。本实验拟进一步观察黄芪注射液对脑缺血/再灌注损伤后 BDNF 表达的影响,探讨其在神经保护方面的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组 22 只成年雄性(SPF 级,体重 230 ~ 250 g)Wistar 大鼠,青岛药检所动物中心提供(SCXK20090007)。随机选择 5 只大鼠为对照组,其余 17 只仰卧固定在手术台上,注意无菌操作,取颈部右侧旁正中切口,经右侧颈外-颈内动脉插入线栓建立 MCAO/R 模型^[15],缺血 2 h 后退出线栓实现再灌注。对照组采用相同的手术步骤,但不插入线栓。动物苏醒后将出现右侧 Horner 征,爬行时向右侧划圈,提尾左前肢内收屈曲的 10 只大鼠随机分为模型组和治疗组各 5 只,术后死亡和造模不成功的 7 只大鼠剔除。

1.2 治疗方法 参照前期实验报道^[16]的剂量,在造模成功 2 h 后,治疗组大鼠,经腹腔注射黄芪注射液(国药准字 Z31020084)6 mL/kg,之后每隔 24 h 给药 1 次,连续给药 2 次,对照组和模型组按同样方法注射等量生理盐水。

1.3 检测指标

1.3.1 神经行为功能评分 所有大鼠($n = 15$)在最后一次给药 24 h 后,参照 Longa 评分标准^[17]进行神经行为功能评分。评分越高表示神经行为功能损伤越严重。

1.3.2 Western blot 定量检测 BDNF 蛋白表达 Longa 评分后,每组的 5 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉,剪开胸壁,暴露心脏,输液器针头刺入左心室,同时快速剪破右心耳,经心脏灌注生理盐水约 250 mL,待大鼠四肢和肺部发白后,将大鼠断头取出脑组织,用生理盐水洗净,迅速剥离缺血侧(右侧)海马区脑组织 200 mg, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取脑组织 100 mg,按 100 mg 组织:1 mL RIPA 组织裂解液:1 LPMSF 的比例加入组织裂解液(北京盖宁科技有限公司), $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰浴中充分研磨,置于冰上裂解 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液于 EP 管中,取 100 L 用 BCA 蛋白浓度试剂盒(北京索莱宝公司)测定样品总蛋白浓度。其余样品按体积比 4:1 加入 $5\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,使蛋白质变性, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。制备 SDS-PAGE 凝胶,下层为 10% 的

离胶,上层为 5% 的浓缩胶。根据测得的蛋白浓度,各组分别取蛋白样品 40 g,各组分别取蛋白样品 40 g,应用 SDS-PAGE 凝胶电泳仪(Bio-Rad, USA)分离蛋白,全湿法转膜(Bio-Rad, USA)。转膜结束后将 PVDF 膜浸入封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST)中,室温下摇床封闭 2 h,取出 PVDF 膜 PBST 漂洗 3 次, 10 min/次,将一抗以一定比例的稀释比例(BDNF 为 1:1 000, β -actin 为 1:6 000)加入 PBST 中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, PBST 漂洗 3 次, 10 min/次。以 HRP 标记的羊抗兔二抗稀释液(1:10 000)室温摇床孵育 2 h。PBST 漂洗 3 次, 10 min/次。将化学发光液底物 A 和 B 按 1:1 的比例混合后,滴加到 PVDF 膜上,静置 1 min,送入暗箱曝光,用凝胶成像系统显影。应用 Quantity one 软件进行条带灰度值的分析,以同一标本 β -actin 的灰度值作为内参照,按公式计算相对值(目的蛋白的灰度值 = 样品灰度值/ β -actin 灰度值),重复测定 3 次,以均数 \pm 标准差表示。

1.3.3 荧光定量 PCR(Real-Time PCR):检测 BDNF 基因表达 取上述缺血侧脑组织 100 mg,加冷的 Trizol(Invitrogen, USA) 1 mL,匀浆;然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心, 12 000 r/min, 10 min。收集上清,置于 1.5 mL EP 管中。室温放置 5 min 后,加 0.2 mL 氯仿,用振荡器振荡 15 s,室温放置 5 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 12 000 r/min, 15 min 取上清,加等体积异丙醇,室温放置 10 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 12 000 r/min, 10 min。弃上清,加 75% 乙醇 1 mL,旋涡器混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 7 500 r/min, 5 min。在空中短暂凉干 RNA 沉淀。加超纯水 20 μL 溶解,用枪头吹打数次,紫外分光光度计(Beckman, USA)测定 RNA 浓度备用。大鼠 BDNF cDNA 引物(F:5'-CAG TGG CTG GCT CTC ATA CC-3', R:5'-CGG AAA CAG AAC GAA CAG AA-3')扩增片段长度为 115 bp。内参 GAPDH cDNA 引物(F:5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3', R:5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3')扩增片段长度为 206 bp,由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。利用 Takara RNA 反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time))根据说明书操作,按下列组成配制反转录反应液: $5\times$ PrimeScript Buffer 2 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer 0.5 μL , Random 6 mers 0.5 μL , Total RNA(量由浓度定), RNase Free dH₂O up to 10 μL 。按下列条件进行反转录反应: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s,进行 1 个循环,将 RNA 反转录成 cDNA。之后利用 Takara 荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR[®] Premix Ex TaqTM II

(Tli RNaseH Plus)), 根据说明书, 按下列组成配制 PCR 反应液: SYBR® Premix Ex Taq II 10 μL, 上游引物(5uM) 1.6 μL, 下游引物(5uM) 1.6 μL, 灭菌蒸馏水 4.8 μL。取反转录反应结束后的产物 2 μL, 加入 PCR 反应液中, 轻轻混匀。按以下条件进行 PCR 反应: 95 °C 5 min, 进行 1 个循环; 95 °C 10 s, 57 °C 30 s, 72 °C 10 s, 进行 40 个循环; 72 °C 1 min 进行 1 个循环。反应结束后, 应用 LightCycler480 软件分析内参基因 GAPDH 和目的基因 BDNF 的扩增曲线, 得出各试验孔的 Ct 值, 同一 cDNA 样本设置 4 个复孔, 求其 Ct 值的均值, 并以同一样本中的 GAPDH 的 Ct 值作为内参, 按照公式计算各组样品的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{实验组目的基因Ct}-\text{实验组GAPDH Ct}-(\text{对照组目的基因Ct}-\text{对照组GAPDH Ct})]}$) 将对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值设为 1, 分别计算模型组和治疗组与对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值的比值, 进行相对定量。

1.4 统计学分析 实验结果采用 SPSS 17.0 软件分析, 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验。

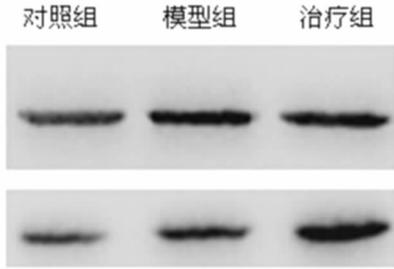


图 1 Western blot 法检测 BDNF 蛋白表达

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 BDNF 基因的表达 Real-Time PCR 显示, 对照组 BDNF mRNA (115 bp) 表达较弱, 将对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值设为 1, 分别计算模型组和治疗组与对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值的比值, 进行相对定量。模型组 BDNF mRNA 表达较对照组显著增强 ($t = 5.25, P < 0.05$), 治疗组 BDNF mRNA 表达较模型组显著增强 ($t = 3.47, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠神经元细胞 BDNFmRNA 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	BDNFmRNA
对照组	5	1.00 ± 0.00
模型组	5	1.55 ± 0.23 *
治疗组	5	3.07 ± 0.95 *#

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺血再灌注性脑损伤是导致死亡和残疾的重要原因, 严重威胁人类健康。目前对于缺血再灌注损伤的治疗以恢复部分脑组织的再灌注, 改善脑组织

2 实验结果

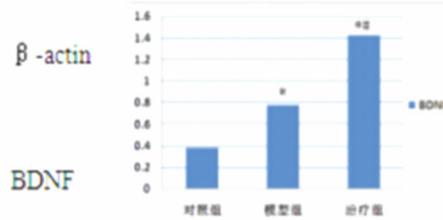
2.1 神经行为功能评分 对照组大鼠 Longa 法评分为 (0.00 ± 0.00), 模型组大鼠 Longa 法评分为 (2.50 ± 0.55), 较对照组显著增高 ($t = 10.11, P < 0.05$) 治疗组动物 Longa 法评分为 (1.50 ± 0.55), 较模型组显著降低 ($t = 3.16, P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠 Longa 法评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	Longa 法评分(分)
对照组	5	0.00 ± 0.00
模型组	5	2.50 ± 0.55 *
治疗组	5	1.50 ± 0.55 *#

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 Western blot 法检测 BDNF 蛋白表达 Western blot 法显示, 对照组 BDNF 蛋白形成较弱 28kD 片段; 模型组 BDNF 蛋白表达较对照组增强 ($t = 4.51, P < 0.05$); 治疗组 BDNF 蛋白表达较模型组明显增强 ($t = 3.61, P < 0.05$)。见图 1。



缺血缺氧状态为主, 远期效果欠佳^[18]。BDNF 不仅神经细胞的分化、发育以及神经的生长和再生起着维持和促进作用, 而且在神经细胞损伤修复过程中起着重要作用^[19]。因此, 通过增加脑缺血/再灌注损伤后 BDNF 的表达, 诱导神经元前体细胞迁移以及分化为成熟的神经细胞, 促进受损神经的修复, 刺激神经再生, 减少细胞凋亡可能成为缺血再灌注性脑损伤治疗的重要途径。Takemura 等^[20]利用大脑血管钳碾压 BDNF 灭活 (BDNF +/-) 小鼠左侧坐骨神经作为模型研究发现, BDNF +/- 小鼠神经功能和组织上的恢复缓慢, 而 BDNF 没有灭活 (BDNF +/) 和灭活后进行骨髓移植的小鼠 (BDNF +/-BMT) 的神经功能和组织恢复迅速, 证明 BDNF 能够刺激神经再生, 促进受损神经的修复, 在神经的形成和修复过程中起着重要作用。Shen 等^[21]研究发现, 茶氨酸能通过与氨基酸的相互作用和上调 BDNF mRNA 和 Bcl-2 mRNA 的表达对大鼠脑缺血再灌注损伤的

起到保护作用。黄芪作为传统的中药,具有及广泛的应用前景,Yu等^[22]研究发现,黄芪注射液具有诱导脊髓间充质干细胞分化为神经元的能力,并能协同间充质干细胞促进脊髓损伤的修复。江清林等^[23]研究发现在合适浓度范围内,黄芪甲苷可促进体外培养神经干细胞的增殖。Liu等^[24]研究发现黄芪注射液在大鼠脑缺血再灌注损伤后可下调 JNK3 基因的表达,抑制神经元凋亡,减少脑梗死体积。我们的前期实验证实,黄芪注射液可能通过抑制 JNK3 的表达抑制神经细胞凋亡及促进神经营养因子和血管生长因子的表达诱导血管新生,抑制神经元的凋亡或坏死。本研究结果表明,大脑缺血再灌注损伤后大鼠表现为行为功能障碍,同时海马区 BDNF 蛋白及 BDNF mRNA 的表达增强,经黄芪注射液干预治疗后,BDNF 蛋白及 BDNF mRNA 的表达较治疗前增强,动物神经行为功能改善。这些结果表明黄芪注射液可能通过增加 BDNF 的表达,诱导神经元前体细胞迁移以及分化为成熟的神经细胞,刺激神经再生,促进受损神经的修复,减少细胞凋亡,从而发挥对脑缺血/再灌注损伤的保护作用,有望为我们治疗缺血/再灌注脑损伤提供新的策略。当然,对于黄芪注射液的研究仍然有许多问题没有解决,其临床药理作用和作用机制仍需要进一步研究和探讨。目前关于黄芪注射液的研究大多停留在细胞和动物水平,对于分子水平和临床应用有待进一步加强。总之黄芪注射液为我们治疗缺血/再灌注性脑损伤提供了一种新方法,有广泛的应用前景和研究价值。今后我们将进一步研究黄芪注射液治疗缺血/再灌注性脑损伤的机制和治疗效果,争取将黄芪注射液治疗缺血/再灌注性脑损伤早日应用于临床。

参考文献

[1] Liang SL, Xu B, Zhang YY. Effect of Astragalus Injection on apoptosis of cerebral ischemic injury in rat brain[J]. Zhejiang Zhongxiyi Jiehe Zazhi, 2011, 21(3): 159-161.

[2] Leal G, Afonso PM, Salazar IL, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF[J]. Brain Res, 2014, 93(14): 1421-1428.

[3] Zhou LJ, Zhong Y, Ren WJ, et al. BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn[J]. Experimental Neurology, 2008, 212(2): 507-514.

[4] Han ZM, Huang HM, Wang FF. Brain-derived neurotrophic factor gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(2): 519-522.

[5] Grade S, Weng YC, Snaypan M, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum[J]. PLoS One, 2013, 8(1): 550-553.

[6] 赵宇, 谢鹏, 朱晓峰. 脑源性神经生长因子和神经干细胞联合移植对大鼠中动脉阻塞大鼠神经功能恢复的作用[J]. 中华实验外

科杂志, 2008, 25(8): 88-90.

[7] Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration[J]. Pharmacol Ther, 2013, 138(2): 16-18.

[8] Yin YY, Li WP, Gong HL, et al. Protective effect of astragaloside on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Am J Chin Med, 2010, 38(3): 517-527.

[9] 罗玉敏, 秦震. 黄芪甲苷对大鼠局灶脑缺血血脑屏障破坏的影响[J]. 中国临床神经科学, 2000, 8(4): 280-281.

[10] 张海宇, 马全瑞, 张逢香, 等. 黄芪注射液对大鼠脑出血灶周围神经元超微结构的影响[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(3): 295-301.

[11] Zhuo M, Chen H L, Cai N L, et al. A study on clinical effects and immunological mechanism of intravenous Astragalus injection therapy in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy[J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2008, 15(1): 13-15.

[12] Qu YZ, Li M, Gao GD. Protective effects of astragalus injection on blood-brain barrier and expressions of occludin and zonula occludens protein-1 after cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2011, 18(5): 263-265.

[13] 黄惠, 王岭, 李艳, 等. 黄芪注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 卒中与神经疾病, 2014, 21(1): 19-21.

[14] 孙丽, 王岭, 李艳, 等. 黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和机制研究[J]. 中国临床神经科学, 2014, 22(1): 43-49.

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

[16] 刘莎莎, 高维娟, 钱涛, 等. 黄芪注射液对脑缺血/再灌注大鼠海马组织 JNK-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(5): 665-670.

[17] Sun W, Gould T W, Newbern J, et al. Phosphorylation of c-Jun in avian and mammalian motoneurons in vivo during apoptosis: An early reversible event in the apoptotic cascade[J]. Neuroscience, 2005, 25(23): 5595-5603.

[18] 贾建平. 缺血性脑血管病治疗学进展[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(4): 241-243.

[19] 吴莎, 华清泉, 杨琨, 等. 脑源性神经营养因子研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 20(9): 23-26.

[20] Takemura Y, Imai S, Kojima H, et al. Brain-derived neurotrophic factor from bone marrow-derived cells promotes post-injury repair of peripheral nerve[J]. PLoS One, 2012, 7(9): 445-492.

[21] Shen H, Shen X, Wang R, et al. [Effects of theanine on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats][J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2011, 40(6): 684-687.

[22] Yu Q, Bai YS, Lin J. [Effect of Astragalus injection combined with mesenchymal stem cells transplantation for repairing the spinal cord injury in rats][J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2010; 30(4): 393-397.

[23] 江清林, 张天英, 李竹, 等. 黄芪甲苷对大鼠海马源神经干细胞体外增殖的影响[J]. 中国医药, 2013, 8(2): 179-181.

[24] Liu G, Song J, Guo Y, et al. Astragalus injection protects cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis and the expression of JNK3 after cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. Behav Brain Funct, 2013, 9: 33-36.