

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.005

复方脑肽节苷脂对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用*

徐悦, 郑永强, 付蓓蓓[△]

(湖北省十堰市人民医院·湖北医药学院附属人民医院神经内科, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨复方脑肽节苷脂对大鼠脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用。方法 将120只SD大鼠随机分为假手术组(等体积0.9%氯化钠注射液)、模型组(等体积0.9%氯化钠注射液)、金纳多组(50 mg/kg)与复方脑肽节苷脂低、中、高剂量组(2, 4, 8 mg/kg), 各20只。模型组、金纳多组、复方脑肽节苷脂各剂量组大鼠予缺血再灌注以建立模型, 假手术组不阻塞血流。建模成功后各组大鼠腹腔注射相应药物, 每天1次, 持续14 d。给药7 d及14 d时进行神经运动功能评分; 给药14 d后进行贴纸去除及平衡木行走试验, 采用逆转录定量聚合酶链反应(PCR)法, 酶联免疫吸附(ELISA)法和免疫组化法分别检测大鼠缺血脑组织 Beclin1 mRNA, Parkin mRNA, PINK1 mRNA及蛋白表达水平。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高, 双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均显著延长, Parkin mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$), Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA和蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 金纳多组及复方脑肽节苷脂低、中、高剂量组神经功能缺损评分均显著降低, 双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均显著缩短, Parkin mRNA和蛋白表达水平均显著降低, Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 复方脑肽节苷脂对脑缺血再灌注损伤模型大鼠具有较好的保护作用, 能明显改善其神经、感觉及运动功能, 其机制与其促进 Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA及蛋白表达, 抑制 Parkin 表达, 从而抑制神经细胞凋亡有关。

关键词: 复方脑肽节苷脂; 脑缺血再灌注模型; 大鼠; 自噬基因; 作用机制

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)10-0013-04

Protective Effect of Compound Porcine Cerebroside and Ganglioside Injection on Cerebral Ischemic Reperfusion Injury in Model Rats

XU Yue, ZHENG Yongqiang, FU Beibei

(Department of Neurology, Shiyan People's Hospital, Affiliated People's Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Compound Porcine Cerebroside and Ganglioside Injection(CPCGI) on cerebral ischemic reperfusion injury in model rats. **Methods** Totally 120 SD rats were randomly divided into 6 groups: the sham operation group(equal volume of 0.9% Sodium Chloride Injection), model group(equal volume of 0.9% Sodium Chloride Injection), ginkgo group(50 mg/kg) and CPCGI low, medium, high dose groups(2, 4, 8 mg/kg), 20 rats in each group. Rats in the model group, ginkgo group and CPCGI groups were subjected to ischemic reperfusion to establish the models, while the blood flow of rats in the sham operation group was not obstructed. After 1 d of successful modeling, rats in each group were intraperitoneally injected with corresponding drugs once a day for 14 consecutive days. 7 and 14 d after administration, the neuromotor function scores were scored. After 14 d of administration, sticker removal and balance beam walking test were carried out. The expression levels of Beclin1 mRNA, Parkin mRNA, PINK1 mRNA and protein in brain tissue of rats were detected by reverse transcription polymerase chain reaction(PCR), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and immunohistochemistry respectively. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological deficit score increased significantly, the removal time of bilateral stickers and the time of crossing the balance beam prolonged significantly, the expression levels of Parkin mRNA and protein increased significantly($P < 0.05$), and the expression levels of Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA and protein decreased significantly in the model group($P < 0.05$). Compared with the model group, the neurological deficit scores decreased significantly, the removal time of bilateral stickers and the time of crossing the balance beam shortened significantly, the expression levels of Parkin mRNA and protein decreased significantly, the expression levels of Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA and protein increased significantly in the ginkgo group and the CPCGI low, medium, high dose groups($P < 0.05$). **Conclusion** CPCGI has good protective effect on cerebral ischemic reperfusion injury model rats, and can significantly improve their neurological, sensory and motor functions. Its mechanism is related to promoting the expression of Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA and protein, inhibiting the expression of Parkin and inhibiting the apoptosis of nerve cells.

Key words: Compound Porcine Cerebroside and Ganglioside Injection; cerebral ischemic reperfusion model; rats; autophagy gene; mechanism of action

*基金项目: 2015年湖北省十堰市科学技术研究与开发项目[15Y33]。

第一作者: 徐悦, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为脑血管疾病、眩晕疾病的诊治, (电子信箱)175860313@qq.com。

[△]通信作者: 付蓓蓓, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为脑血管疾病的诊治, (电子信箱)627674393@qq.com。

脑缺血再灌注会导致局部缺血脑组织功能损害,其损害程度与缺血时间长短及残存血流量有关,短期不完全性缺血引起可逆性损害,而长期完全缺血或严重缺血会引起梗死^[1-3]。内质网是细胞表面和细胞外蛋白质的合成、加工和转运的主要场所,当未折叠蛋白聚集及 Ca^{2+} 平衡紊乱时,将发生内质网应激,进而诱导神经细胞凋亡^[4-5]。自噬基因 Beclin1, Parkin, PINK1 是细胞凋亡调节因子^[6]。复方脑肽节苷脂具有抗炎、抗氧化、免疫调节、保肝等多种作用,能通过抑制缺血区苯二氮䓬受体的表达,减少半暗区面积,从而发挥对缺血脑组织的保护作用^[7]。本研究中探讨了复方脑肽节苷脂对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用及对 Beclin1, Parkin 和 PINK1 表达的影响,为脑缺血再灌注损伤的临床治疗提供了理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

动物:清洁级 SD 大鼠 120 只,12 周龄,体质量(109.76 ± 11.03)g,雌雄兼半,由山东大学医学院实验动物中心提供[动物生产许可证号 SCXK(鲁)20090001],大鼠自由摄食及饮水,自动控制昼夜循环(12/12 h),室温(22 ± 1)℃。每周称体质量 1 次,每周调换位 1 次,符合《实验动物管理条例》要求。

仪器:MK3 型酶标仪(美国热电公司);ABI7500 型荧光聚合酶链反应(PCR)仪(赛默飞世尔科技<中国>有限公司)。

试剂:复方脑肽节苷脂注射液(吉林步长制药有限公司,国药准字 H22026472,规格为每支 2 mL);银杏叶提取物注射液(金纳多,台湾济生化学制药厂股份有限公司,规格为每支 5 mL:17.5 mg);Beclin1, Parkin, PINK1 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号为 KIT10154-2, KIT10416-7, KIT10575-1),均购自南京金益柏生物科技有限公司;Beclin1, Parkin, PINK1 一抗、二抗均购自武汉伊艾博科技有限公司;DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;miRNeasy Mini 试剂盒购自美国 Qiagen 公司;水为蒸馏水。

1.2 方法

建模与分组、给药:将 120 只 SD 大鼠随机分为 6 组,即假手术组(A 组,等体积 0.9% 氯化钠注射液),模型组(B 组,等体积 0.9% 氯化钠注射液),金纳多组(C 组,50 mg/kg)与复方脑肽节苷脂低、中、高剂量组(D_1 , D_2 , D_3 , 2, 4, 8 mg/kg)。B 组、C 组、 D_1 组、 D_2 组、 D_3 组大鼠腹腔注射戊巴比妥麻醉后,结扎颈外动脉远端,在颈外动脉上切开 1 个小口,将 1 条尼龙线(直径 0.25 mm,尖端

涂抹硅胶)插入颈内动脉至 20 mm,并结扎,4 h 后,将线栓轻轻拉出,以建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型。A 组只切开皮肤和分离血管,不进行阻塞血流。术后给予大鼠 20 万 U 青霉素肌肉注射,连续使用 3 d。建模成功后各组大鼠腹腔注射相应药物,每天 1 次,持续 14 d,根据成人剂量公式相应换算,大鼠用量为成人的 6.24 倍,将注射液溶于蒸馏水,以 20.0 mL/kg 剂量腹腔注射,配制药液质量浓度为 10.0 g/mL。

神经功能缺损评分:分别于给药 7, 14 d 时,根据 Bederson JB 评分法^[8]进行神经功能缺损评分,包括运动、感觉、反射和平衡能力测试等。

贴纸去除及平衡木行走试验:给药 14 d 时,依据相关文献^[9]方法进行。

Beclin1, Parkin, PINK1 mRNA 水平检测:给药 14 d 后,处死大鼠,以逆转录定量聚合酶链反应(PCR)检测 Beclin1, Parkin, PINK1 mRNA 的表达水平。大鼠脑组织样品中提取总 RNA,合成 cDNA,以 β -actin 引物为内参。PCR 条件:95℃持续 10 min,40 个循环,持续 15 s,温度 60℃。使用 SDS 2.0.1 软件(Applied Biosystems)计算循环阈值(C_t)值。

Beclin1, Parkin, PINK1 蛋白水平检测:称取大鼠缺血脑组织,制成匀浆,收集上清液,以 ELISA 法检测 Beclin1, Parkin, PINK1 蛋白水平。

Beclin1, Parkin, PINK1 蛋白表达水平观察:制作常规大鼠缺血脑组织石蜡切片,使用常规链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶法进行免疫组化染色,将组织切片用二甲苯脱蜡,通过梯度乙醇脱水浸入含有 0.3% 过氧化氢的甲醇中 20 min,将切片浸入 pH 6 的柠檬酸盐缓冲液中,并在 800 W 微波炉中加热 10 min 进行实现抗原修复。以抗生素蛋白/生物素结合阻断内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,1% 的 Beclin1, Parkin, PINK1 抗体工作液(1:200, V/V)4℃孵育过夜(加链霉菌抗生素蛋白)。3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)显色,苏木精复染后封片,以乙醇脱水,以二甲苯澄清。随机选择 10 个高倍(400 倍)视野,按阳性细胞数量及着色强度进行计分:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;同时计数;阳性细胞 > 50% 为(+++),26%~50% 为(++),6%~25% 为(+),≤5% 为(-),(-)及(+)归为不表达或低表达,即为阴性,(++)及(+++)归为高表达,即为阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经运动功能评分

结果见表1。与A组比较,B组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组与D₁组、D₂组、D₃组大鼠给药7d及14d时神经功能缺损评分显著降低($P < 0.05$),且与复方脑肽节苷脂给药剂量呈负相关。

2.2 双侧贴纸去除时间和平衡木过杆时间

结果见表1。与A组比较,B组大鼠双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均显著延长($P < 0.05$);与B组比较,C组与D₁组、D₂组、D₃组大鼠双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均显著缩短($P < 0.05$),且与复方脑肽节苷脂给药剂量呈负相关。

2.3 Beclin1 mRNA, Parkin mRNA, PINK1 mRNA 表达水平

结果见表1。与A组比较,B组大鼠脑组织 Beclin1 mRNA 和 PINK1 mRNA 表达水平均显著降低, Parkin mRNA 表达水平显著升高;与B组比较,C组与D₁组、D₂组、D₃组大鼠脑组织 Beclin1 和 PINK1 mRNA 表达水平均显著升高, Parkin mRNA 水平显著降低($P < 0.05$),且随着复方脑肽节苷脂给药剂量的增加, Beclin1 和 PINK1 mRNA 表达水平逐渐升高, Parkin mRNA 表达水平逐渐降低。

2.4 Beclin1, Parkin, PINK1 蛋白表达水平

结果见表1和图1。与A组比较,B组大鼠脑组织 Beclin1 和 PINK1 蛋白表达水平均显著降低, Parkin 蛋

表1 各组大鼠观察指标比较($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量(mL/kg)	神经功能缺损评分(分)		双侧贴纸去除时间(s)	平衡木过杆时间(s)	mRNA 表达水平			蛋白表达水平		
		7 d	14 d			Beclin1	Parkin	PINK1	Beclin1	Parkin	PINK1
A组		1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	26.34 ± 6.87	1.99 ± 0.34	1.94 ± 0.11	1.13 ± 0.21	1.76 ± 0.17	183.67 ± 15.63	47.13 ± 15.95	145.77 ± 6.46
B组		10.66 ± 0.47 [#]	8.75 ± 0.37 [#]	103.63 ± 25.65 [#]	16.54 ± 6.87 [#]	0.56 ± 0.13 [#]	2.18 ± 0.19 [#]	0.98 ± 0.12 [#]	71.14 ± 16.78 [#]	187.66 ± 9.47 [#]	67.86 ± 6.98 [#]
C组	50	5.34 ± 0.14 [*]	3.50 ± 0.30 [*]	49.32 ± 8.76 [*]	4.67 ± 0.39 [*]	1.82 ± 0.12 [*]	1.23 ± 0.17 [*]	1.57 ± 0.17 [*]	155.13 ± 17.83 [*]	53.44 ± 10.04 [*]	139.58 ± 8.97 [*]
D ₁ 组	2	8.14 ± 0.34 [*]	5.35 ± 0.31 [*]	80.76 ± 8.12 [*]	12.30 ± 0.51 [*]	0.91 ± 0.18 [*]	1.87 ± 0.18 [*]	1.09 ± 0.17 [*]	103.73 ± 13.65 [*]	134.14 ± 12.74 [*]	89.45 ± 6.98 [*]
D ₂ 组	4	6.23 ± 0.23 [*]	4.91 ± 0.26 [*]	51.28 ± 9.88 [*]	8.65 ± 0.51 [*]	1.49 ± 0.20 [*]	1.52 ± 0.09 [*]	1.12 ± 0.16 [*]	123.17 ± 19.69 [*]	63.23 ± 10.73 [*]	120.15 ± 10.69 [*]
D ₃ 组	8	5.35 ± 0.16 [*]	3.51 ± 0.30 [*]	50.32 ± 9.16 [*]	4.71 ± 0.50 [*]	1.78 ± 0.11 [*]	1.32 ± 0.10 [*]	1.49 ± 0.20 [*]	152.58 ± 13.74 [*]	57.45 ± 8.76 [*]	137.63 ± 12.73 [*]

注:与A组比较,[#] $P < 0.05$;与B组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

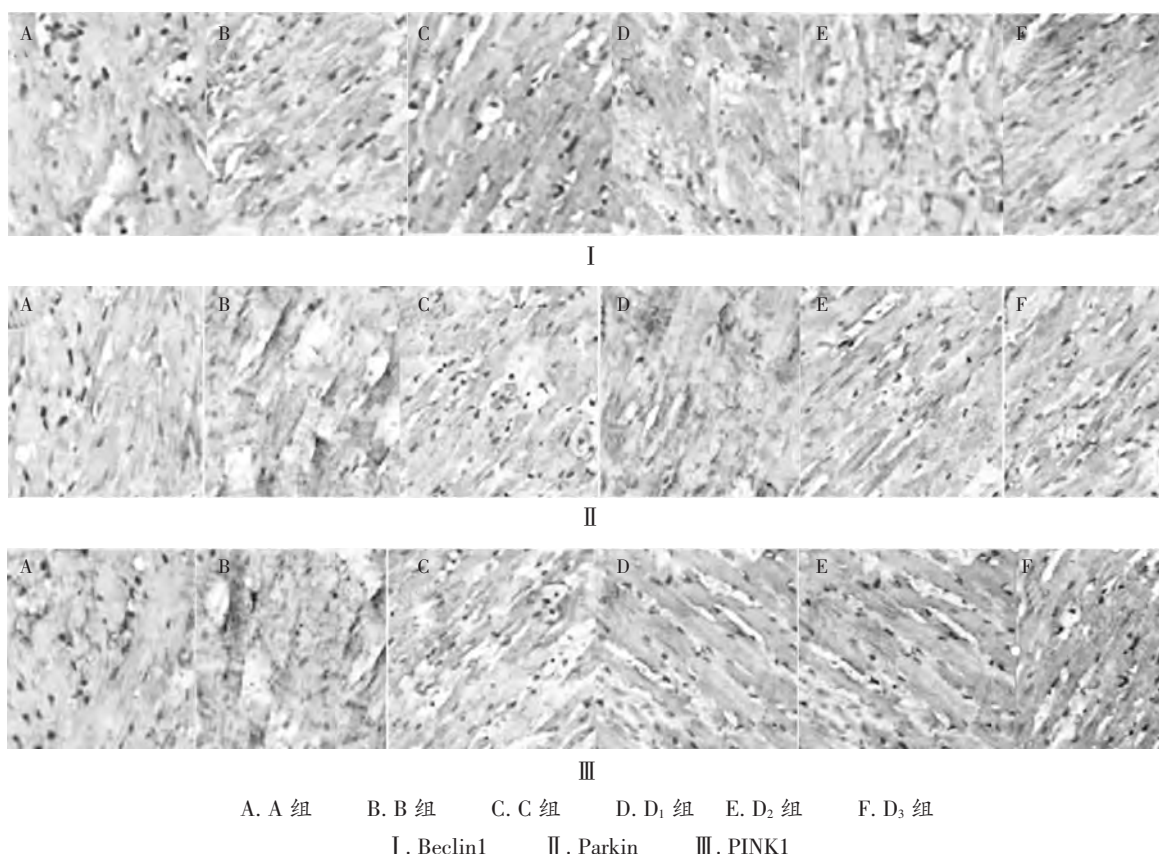


图1 复方脑肽节苷脂对模型大鼠自噬基因表达的影响($\times 400$)

白表达水平显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组与D₁组、D₂组、D₃组大鼠脑组织 Beclin1 和 PINK1 蛋白表达水平均显著升高, Parkin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),且随着复方脑肽节苷脂给药剂量的增加, Beclin1 和 PINK1 蛋白表达水平均逐渐升高, Parkin 蛋白水平逐渐降低。Beclin1, Parkin, PINK1 阳性表达为棕褐色,各组 Beclin1, Parkin, PINK1 阳性表达情况与各蛋白表达水平相符。

3 讨论

Parkin 和 PINK1 是调节神经细胞凋亡的重要调控因子, PINK1 是抑制细胞凋亡蛋白, Parkin 是促细胞凋亡蛋白^[10-11]。细胞中,当 Parkin 表达水平较高时, PINK1 与 Parkin 通过磷酸二酯脱氢键形成同源二聚体 PINK1/Parkin,促进细胞凋亡, PINK1 表达水平较高时则通过氢键形成异源二聚体 PINK1/Parkin,抑制细胞凋亡^[12-14]。Beclin1 是调节内质网应激效应介导的细胞凋亡的保护主要因素。Beclin1 可直接抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性,来阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程^[15]。

复方脑肽节苷脂能促进缺血脑组织的新陈代谢,参与缺血脑组织神经细胞生长、分化和再生过程,具有抗细胞凋亡作用。复方脑肽节苷脂可能通过降低核因子- κ B (NF- κ B)活性及调节其表达而起到抗凋亡作用^[16]。此外,复方脑肽节苷脂可以增强过氧化酶-6的表达,从而减少缺氧诱导的内质网应激效应和氧化应激反应,减少神经细胞凋亡,达到保护神经细胞的目的。本研究结果显示,复方脑肽节苷脂能明显改善脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经功能、感觉及运动功能,高剂量效果尤为明显;能促进脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织 Beclin1 及 PINK1 表达,抑制 Parkin 表达,进而抑制神经细胞凋亡。

综上所述,复方脑肽节苷脂对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用较好,能明显改善其神经功能、感觉及运动功能,其机制与复方脑肽节苷脂能促进 Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA 及蛋白的表达,抑制 Parkin mRNA 及蛋白的表达,进而抑制神经细胞凋亡有关。

参考文献:

[1] ZHANG LF, TENG JF, YUAN XQ, et al. Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting the expression of TNF- α [J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2017, 7(3): 90-91.
[2] DU X. Inhibition of cerebral ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis: nicotiflorin and JAK2/STAT3 pathway[J]. Neural Regeneration Research, 2017, 12(1): 96-102.

[3] LI Y, LIU S. The Effect of Dexmedetomidine on Oxidative Stress Response Following Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats and the Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and S100B[J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research, 2017, 23: 867-873.
[4] GONG J, WANG XZ. Signal pathway and regulation mechanism of endoplasmic reticulum stress[J]. Journal of Zhejiang University-Science B(Biomedicine & Biotechnology), 2017, 18(1): 1-14.
[5] 王沛坚,王芳,万进东,等.内质网应激及线粒体功能障碍在糖尿病血管内皮损伤中作用的研究进展[J].现代生物医学进展, 2017, 17(2): 389-392.
[6] MCWILLIAMS TG, MUQIT MM. PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 83-91.
[7] 黄伟毅,关良劲.亚低温联合复方脑肽节苷脂注射液治疗重症颅脑损伤的临床疗效及生活质量研究[J].脑与神经疾病杂志, 2018, 26(2): 100-104.
[8] 谭杰,李承晏,李涛,等.局灶性脑梗死模型大鼠相对体质量、Bederson 评分与梗死类型的鉴别[J].中国组织工程研究, 2011, 15(37): 6875-6878.
[9] ALTUMBABIC M, PEELING J, DEL BIGIO MR. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1917-1923.
[10] 许斌,李岚,宋启斌.内质网应激的致癌性和免疫抑制效应[J].肿瘤学杂志, 2018, 24(5): 492-498.
[11] 李军汉,苏全生,孙君志,等.运动和饮食调整对内质网应激介导非酒精性脂肪肝大鼠模型肝细胞凋亡的影响[J].中国运动医学杂志, 2017, 36(1): 36-43.
[12] XIAO B, GOH JY, XIAO L, et al. Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway-dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(40): 97-98.
[13] REN X, LUO P, ZHOU H, et al. Resveratrol Ameliorates Mitochondrial Elongation via Drp1/Parkin/PINK1 Signaling in Senescent-Like Cardiomyocytes[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017: 4195353.
[14] XIAO B, DENG X, LIM GGY, et al. Superoxide drives progression of Parkin/PINK1-dependent mitophagy following translocation of Parkin to mitochondria[J]. Cell Death & Disease, 2017, 8(10): 97-99.
[15] MIAO T, YU C, DAN T, et al. Beclin1 antagonizes LAPT4B-mediated EGFR overactivation in gastric cancer cells[J]. Gene, 2017, 626(2): 48-50.
[16] 赵丹,胡东懿,岑敏,等.脑苷肌肽注射液与复方脑肽节苷脂注射液治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床疗效比较和成本分析[J].实用心脑血管病杂志, 2018, 6(2): 76-78.

(收稿日期:2018-07-27)