

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.12.003

对羟基苯甲醛对模型大鼠脑缺血再灌注损伤修复作用研究*

杨媛,代蓉[△],张冰琳,贾媛媛,马琛婧

(云南中医药大学中药学院,云南昆明 650500)

摘要:目的 探讨对羟基苯甲醛(PHBA)对模型大鼠脑缺血再灌注损伤的修复作用。方法 以线栓法建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型。建模成功的20只大鼠分为模型组(等体积含吐温-80的蒸馏水)和PHBA组(20 mg/kg),各10只;设假手术组(等体积含吐温-80的蒸馏水);各组灌胃相应药物,每天1次,连续14 d。给药7 d及14 d后,进行大鼠神经病学评分;采用免疫荧光法检测神经元特异性核蛋白(NeuN)阳性表达水平;采用Western blot法检测血管内皮生长因子A(VEGF-A)、脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达水平。结果 与假手术组比较,模型组大鼠神经病学评分和VEGF-A、BDNF蛋白表达水平显著升高,NeuN阳性表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,PHBA组大鼠给药7 d及14 d后的神经病学评分显著降低,BDNF蛋白表达水平和NeuN阳性表达水平均显著升高,大鼠给药7 d后的VEGF-A蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 PHBA可促进脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经的修复,其作用机制与促进内皮细胞释放神经营养因子VEGF-A和BDNF有关。

关键词:对羟基苯甲醛;脑缺血再灌注损伤;神经营养因子;神经修复;大鼠;作用机制

中图分类号:R965;R743.3

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)12-0011-04

Repair Effect of P-Hydroxybenzaldehyde on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Model Rats

YANG Yuan, DAI Rong, ZHANG Binglin, JIA Yuanyuan, MA Chenjing

(College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: **Objective** To investigate the repair effect of p-hydroxybenzaldehyde(PHBA) on cerebral ischemia reperfusion injury(CIRI) model rats. **Methods** The CIRI model rats were established by the suture method. Totally 20 rats were divided into the model group (equal volume of distilled water containing polysorbate-80) and PHBA group(20 mg/kg), 10 rats in each group. The sham operation group(equal volume of distilled water containing polysorbate-80) was set up. Each group was given corresponding drugs once a day for 14 d. 7 and 14 d after administration, the neurological scores were scored, the positive expression of neuron-specific nucleoprotein(NeuN) was detected by immunofluorescence assay, the protein expression of vascular endothelial growth factor A(VEGF-A) and brain-derived neurotrophic factor(BDNF) protein was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological score and the expression levels of VEGF-A and BDNF protein in the model group were significantly increased, while the positive expression level of NeuN was significantly decreased($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the neurological score was significantly decreased, the expression level of BDNF protein and the positive expression level of NeuN were significantly increased after 7 and 14 d of administration in the PHBA group, and the expression level of VEGF-A protein were significantly increased after 7 d of administration in the PHBA group($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** PHBA can promote nerve repair in CIRI model rats, and its mechanism is related to promoting the release of neurotrophic factors VEGF-A and BDNF by endothelial cells.

Key words: p-hydroxybenzaldehyde; cerebral ischemia reperfusion injury; neurotrophic factor; nerve repair; rats; mechanism of action

脑缺血再灌注损伤(CIRI)是导致缺血性脑卒中进一步恶化的主要原因^[1],其病理过程涉及复杂的时间级联反应,早期以神经损伤为主,后期以神经修复为主^[2]。机体在CIRI的后期触发启动内源性修复机制,通过多种途径进行神经的自我修复,其中神经营养因子的释放,对缺血灶周围神经细胞的恢复、神经突起新生、新突触形成及神经功能重塑等的促进作用明显^[3]。但这种神经自我修复能力是有限的,因此通过药物增强机体的内源性神经修复,对于CIRI的恢复及预后具有重要意义^[4]。前期研究发现,天麻主要活性成分之一对羟基苯甲醛

(PHBA)对模型大鼠的CIRI有改善作用,其保护机制与抗神经细胞凋亡有关,抗凋亡保护受损神经元是促进神经修复的重要环节,提示PHBA具有促CIRI神经修复的作用^[5]。本研究中从调控内源性神经营养因子的角度出发,探讨PHBA促大脑中动脉栓塞再灌注(MACO/R)大鼠神经修复的作用及其机制。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,雄性,体质量250~300 g,购自四川省医学科学院实验动物研究所,动物生产许可

*基金项目:国家自然科学基金资助项目[81560664,81660677];云南省科技计划项目[2015FB205(-028)];云南省教育厅科学研究基金项目[2017ZZX287]。

第一作者:杨媛,女,硕士研究生,研究方向为中药药理与应用,(电子信箱)619842698@qq.com。

[△]通信作者:代蓉,女,副教授,研究方向为中药药理与应用,(电子信箱)1647029626@qq.com。

证号为 SCXK(川)2016-16。标准条件饲养,自由进食、饮水,适宜温度、湿度,人工黑暗和光照交替。

仪器:165-8001 型垂直电泳系统、1654100 型半干转膜装置,均购自 Bio-Rad 公司;BioSpectrum AC Chemi HR410 型凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司);Primo R 型高速台式冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司);Ti-S 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

试剂:PHBA(北京百灵威科技有限公司,批号为 L760N29);血管内皮生长因子 A (VEGF-A) 多克隆抗体(批号为 EP1176Y)、脑源性神经营养因子(BDNF)单克隆抗体(批号为 EPR1292)、神经元特异核蛋白(NeuN)多克隆抗体(批号为 EPR12763),均购自英国 Abcam 公司;磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国 Proteintech Group, Inc., 批号为 10494-1-AP);吐温-80(天津市风船化学试剂科技有限公司,批号为 Q/HG3020-99)。

1.2 方法

1.2.1 建模、分组与给药

选取体质量大于 280 g 的大鼠 30 只,腹腔注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,以线栓法建立大鼠中动脉缺血再灌注模型^[6-7]。建模成功标准:激光散斑监测大鼠脑血流量降至基础值的 43%~53%;激光多普勒监测大鼠脑血流量降低至基础值的 10%~20%;Longa 5 分法检测神经学评分为 1~3 分。取建模成功大鼠 20 只,分为模型组(等体积含吐温-80 的蒸馏水)和 PHBA 组(20 mg/kg),各 10 只。另取正常大鼠 10 只,进行阻塞中动脉线栓法操作,作为假手术组(等体积含吐温-80 的蒸馏水),各组灌胃给予相应药物,每天 1 次,连续 14 d,灌胃体积为每 100 g 体质量 1 mL。以 PHBA 200 mg,加吐温-80 助溶,完全溶解后用蒸馏水定容至 100 mL,作为受试药品溶液。

1.2.2 考察指标

神经病学评分:给药 7 d 及 14 d 后,参照 Longa 5 分法^[8]行大鼠神经病学评分。0 分,无明显神经功能障碍;1 分,提尾悬空不能伸展左侧前爪、有运动障碍;2 分,行动不协调,行走时向左侧倾斜、划圈;3 分,行走困难,并向左侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识水平下降。

NeuN 阳性表达水平检测:采用免疫荧光法。给药 7 d 及 14 d 后,各组取 4 只大鼠,快速断头取脑,4% 对多聚甲醛固定 2 h,20%、30% 蔗糖梯度脱水后包埋、切片(15 μ m),复温 40 min,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,含 0.1% Triton)漂洗 3 次,50% 山羊血清室温孵育 2 h;在 0.01 mol/L PBS 中加入一抗 NeuN(1:100, V/V),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;取出后用 0.01 mol/L PBS(含 0.1% Triton)漂洗 3 次,在 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中

加入二抗室温孵育 1 h;取出后用 0.01 mol/L PBS(含 0.1% Triton)漂洗 3 次,擦干水分,避光封片,荧光显微镜拍摄。以镜下绿色与蓝色荧光重合表达处,作为阳性表达。

VEGF-A 和 BDNF 蛋白表达水平检测:采用 Western blot 法。给药 7 d 及 14 d 后,各组取 6 只大鼠,快速断头取脑,于 -80 $^{\circ}$ C 冻存。取冻存大鼠脑组织,加细胞裂解液,超声匀浆 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液,以二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量。95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,取上清液制备 50 μ g 蛋白样品。电泳后转 PVDF 膜,加一抗、BDNF(1:1 000, V/V)、VEGF-A(1:200, V/V)、GAPDH(1:1 000, V/V),室温孵育 2 h,回收一抗;TBST 洗膜 3 次,分别加入二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 洗膜,加入 ECL 化学发光试剂,将 PVDF 膜放入暗盒中,压上 X 胶片,取出胶片后显影、定影、清洗。然后,通过 Image J 软件将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析,计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1、表 2、图 1 和图 2。

3 讨论

CIRI 发生后,大脑皮质缺血或局灶性病变可引起损伤区微环境变化,导致神经细胞及胶质细胞结构改变,触发内源性神经修复,但这种由疾病引发的自身适应性改变由于缺乏促进轴突再生和引导其正确延伸发展的微环境,很难再生形成功能性突触联系,最终会导致神经功能完全缺失,这种内源性修复对受损神经功能的修复作用是有限的^[9]。神经修复治疗就是对 CIRI 这

表 1 各组大鼠神经病学评分及 NeuN 阳性表达水平比较

组别	神经病学评分(分)		NeuN 阳性表达水平	
	7d	14d	7d	14d
假手术组	0	0	0.20590 $\pm$ 0.03157	0.20140 $\pm$ 0.03244
模型组	3.0000 $\pm$ 0.8165 [#]	3.2000 $\pm$ 0.7888 [#]	0.06988 $\pm$ 0.05925 [#]	0.02556 $\pm$ 0.05834 [#]
PHBA 组	2.2000 $\pm$ 0.6325 [*]	2.2000 $\pm$ 0.6325 ^{**}	0.18180 $\pm$ 0.06575 ^{**}	0.17260 $\pm$ 0.07668 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。表 2 同。

表 2 各组大鼠脑内 VEGF-A 和 BDNF 蛋白表达水平比较

组别	VEGF-A		BDNF	
	7d	14d	7d	14d
假手术组	0.5513 $\pm$ 0.2238	0.4253 $\pm$ 0.1141	0.2035 $\pm$ 0.0089	0.1959 $\pm$ 0.0084
模型组	1.0960 $\pm$ 0.3441 [†]	1.2380 $\pm$ 0.5878 [†]	0.1633 $\pm$ 0.0153 ^{##}	0.1783 $\pm$ 0.0135 [†]
PHBA 组	1.6130 $\pm$ 0.5641 [*]	1.8900 $\pm$ 0.6246	1.3390 $\pm$ 0.5054 ^{**}	1.7780 $\pm$ 0.7909 ^{**}

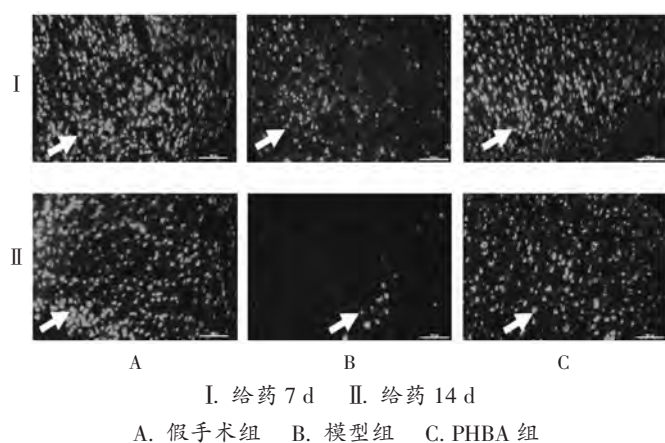


图1 大鼠大脑皮层 NeuN 表达水平 (×200)



图2 大鼠脑内 VEGF-A 及 BDNF 蛋白表达水平

一过程的发生、发展及影响因素进行研究,通过药物或细胞治疗刺激和促进机体分泌神经营养及保护因子等,为神经功能修复创造一个良好的微环境,促进内源性神经修复,并最大限度修复患者受损神经功能^[10]。因此,积极寻找可调控多种生长因子和使用安全、方便的促神经修复药物仍是目前 CIRI 研究的重点^[11]。

线栓法^[12]可机械性阻断大脑中动脉的血供来建立大脑中动脉缺血模型,在缺血后拔出线栓,恢复血流实现再灌注损伤,于是本试验中采用脑缺血再灌注模型,以模拟 CIRI 的损伤过程,对模型大鼠连续给予 PHBA 14 d,观察受试药对模型大鼠的促神经修复作用及其机制。

神经病学评分可通过模型大鼠体征异常变化判断神经功能缺损的程度。NeuN 是神经组织中成熟神经细胞的特异性表达蛋白,参与神经系统的发育、分化和功能维持,其表达数量变化可反映神经元的受损程度^[13]。

本研究中以神经病学评分和大脑皮层 NeuN 阳性表达为指标,以评价 PHBA 对神经功能的影响。结果表明,PHBA 给予 7 d 及 14 d 后,可降低模型大鼠的神经病学评分,升高模型大鼠大脑皮层 NeuN 阳性表达水平,提示其可促进神经功能的修复。

CIRI 的发生会导致 VEGF-A 表达水平的升高,VEGF-A 可直接促进脑缺血后海马区的神经再生,对脑缺血后内源性神经修复发挥着重要作用。

BDNF 是神经生长因子家族成员之一,在正常情况下能促进中枢神经系统发育过程中神经细胞的表达、分化及突触可塑性的调节;在 CIRI 发生过程中,其表达水平的升高能抑制神经细胞的凋亡,将有利于受损神经细胞的修复^[14-16]。VEGF-A 是由内皮细胞分泌的神经生长因子,在正常情况下能促进内皮细胞的增殖、迁移、分化,参与血管的生长^[17]。在 CIRI 发生过程中,其表达水平的升高能为受损神经元提供营养,以促进神经修复^[18-19]。本研究中以 BDNF 和 VEGF-A 表达水平为指标,以评价 PHBA 促神经修复的作用机制,结果表明,给予 PHBA 7 d 及 14 d 后,可升高模型大鼠脑内 BDNF 和 VEGF-A 的表达水平。

综上所述,PHBA 可促进脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经的修复,其作用机制与促进内皮细胞释放神经营养因子 VEGF-A 和 BDNF 有关。

参考文献:

- [1] ALMUFTI F, AMULURU K, ROTH W, et al. Cerebral Ischemic Reperfusion Injury Following Recanalization of Large Vessel Occlusions[J]. Neurosurgery, 2018, 82(6): 781-789.
- [2] WILLAND M P, ROSA E, MICHALSKI B, et al. Electrical muscle stimulation elevates intramuscular BDNF and GDNF mRNA following peripheral nerve injury and repair in rats[J]. Neuroscience, 2016, 34: 93-104.
- [3] WANG C, LU CF, PENG J, et al. Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury[J]. Neural Regeneration Research, 2017, 12(12): 2106-2112.
- [4] JAHANSHAH M, NIKMAHZAR E, YADOLLAHI N, et al. Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGB 761) on astrocytes of rat hippocampus after exposure with scopolamine[J]. Anat Cell Biol, 2012, 45(2): 92-96.
- [5] 周晓楠, 宋雪兰, 李 艳, 等. 对羟基苯甲醛对脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(12): 1729-1735.
- [6] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] 何芳雁, 韩春妮, 李 艳, 等. 制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要点及体会[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4): 46-48.
- [8] BEDERSON JB, PITTS LH, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of