

本文引用: 彭定伟, 董化江, 单娜娜, 等. 脑缺血再灌注损伤大鼠降钙素基因相关肽水平的变化及蕨麻正丁醇提取物对其保护作用[J]. 新乡医学院学报 2014, 31(1): 5-7.

【基础研究】

脑缺血再灌注损伤大鼠降钙素基因相关肽水平的变化及蕨麻正丁醇提取物对其保护作用

彭定伟¹, 董化江², 单娜娜³, 臧照辉⁴, 单云官²

(1. 武警后勤学院附属医院脑科医院, 天津 300162; 2. 武警后勤学院人体解剖学与组织胚胎学教研室, 天津市遗体防腐与整形整容重点实验室, 天津 300162; 3. 武警后勤学院教育技术中心, 天津 300162; 4. 武警后勤学院研究生处, 天津 300162)

摘要: 目的 探讨蕨麻(Pa)正丁醇提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 Wistar 大鼠 60 只, 采用随机数字表法分为 6 组, 即假手术组(C 组)、缺血组(I 组)、缺血再灌注 1 h 组(R1h 组)、缺血再灌注 2 h 组(R2h 组)、Pa 正丁醇提取物预处理后缺血再灌注 1 h 组(Pa + R1h 组)及 Pa 正丁醇提取物预处理后缺血再灌注 2 h 组(Pa + R2h 组)。放射免疫法测量各组血清内皮素-1(ET-1)、降钙素基因相关肽(CGRP)水平; 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blot 检测各组脑组织中 CGRP mRNA 和蛋白的表达。结果 与 C 组比较, I 组、R1h 组、R2h 组血清 ET-1 水平升高($P < 0.05$), 血清 CGRP、脑 CGRP mRNA 及蛋白水平均显著降低($P < 0.05$)。与 I 组比较, R1h 组、R2h 组血清 ET-1 水平升高($P < 0.05$), 血清 CGRP 水平、脑组织 CGRP mRNA 和蛋白水平显著降低($P < 0.05$); Pa + R1h 组较 I 组的血清 ET-1 水平升高、脑组织 CGRP mRNA 水平下降($P < 0.05$); Pa + R2h 组较 I 组的血清 ET-1 水平升高、脑组织 CGRP mRNA 及蛋白水平下降($P < 0.05$)。与 R1h 组、R2h 组比较, Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组血清 ET-1 水平下降, 血清 CGRP、脑 CGRP mRNA 及蛋白水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 大鼠脑缺血再灌注损伤过程中 ET-1 表达上调, CGRP 表达下降, Pa 正丁醇提取物进行干预可降低 ET-1、上调 CGRP 的表达。

关键词: 蕨麻; 大鼠; 脑缺血再灌注; 降钙素基因相关肽

中图分类号: R338.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)01-0005-03

Change of calcitonin gene related peptide in acute cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and protection effect of potentilla anserina

PENG Ding-wei¹, DONG Hua-jiang², SHAN Na-na³, ZANG Zhao-hui⁴, SHAN Yun-guan²

(1. Neurological Hospital Affiliated Hospital of Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 2. Department of Anatomy and Histoembryology, Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 3. Department of Technique and Education, Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 4. Graduate School, Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protection effect of potentilla anserina(Pa) in acute cerebral ischemic-reperfusion injury. **Methods** A total of 60 Wistar rats were randomly divided into sham-operated group(group C), ischemic 15 minutes group(group I), ischemic 15 minutes + reperfusion 1 hour group(group R1h), ischemic 15 minutes + reperfusion 2 hours group(group R2h), potentilla anserina + ischemic 15 minutes + reperfusion 1 hour group(group Pa + R1h) and potentilla anserina + ischemic 15 minutes + reperfusion 2 hours group(group Pa + R2h). The changes of endothelin 1(ET-1) and calcitonin gene related peptide(CGRP) in serum were determined by radioimmunoassay, and the CGRP mRNA and protein in brain tissue were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot methods. **Results** Compared with group C, the level of ET-1 in serum was increased, CGRP level in serum, CGRP mRNA and protein levels in brain tissue were reduced obviously in group I, R1h and R2h($P < 0.05$). Compared with group I, the level of ET-1 in serum was increased, CGRP levels in serum, mRNA and protein in brain tissue reduced obviously in group R1h and R2h($P < 0.05$). In group Pa + R1h, the ET-1 in serum increased and CGRP in level of serum and mRNA decreased comparison with group I, and the ET-1 in serum increased and CGRP in level of mRNA and protein decreased in group Pa + R2h compared with group I($P < 0.05$). Com-

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.01.002

收稿日期: 2013-10-07

基金项目: 国家十一五科技支撑计划项目(编号: 2007BAK38B05); 武警后勤学院科研创新团队项目(编号: WHTD201308-2)

作者简介: 彭定伟(1983-), 男, 湖南长沙人, 硕士, 住院医师, 主要从事神经外科临床与基础研究及心脑血管缺血再灌注的分子生物学研究。

通信作者: 董化江(1983-), 男, 山东淄博人, 硕士, 讲师, 主要从事解剖学教学科研临床应用及缺血再灌注损伤的研究。

pared with group R1h and R2h, ET-1 was decreased and CGRP in serum mRNA and protein was increased obviously in group Pa + R1h and Pa + R2h ($P < 0.05$). **Conclusion** ET-1 increases while CGRP decreases in cerebral ischemia and reperfusion injury in rats. Pa can reduce ET-1 level and increase CGRP level at some stages.

Key words: potentilla anserina; rat; cerebral ischemia-reperfusion; calcitonin gene related peptide

急性脑缺血再灌注 (acute cerebral ischemia reperfusion, ACIR) 损伤对患者生命威胁极大, 研究 ACIR 损伤机制十分重要^[1-2]。内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 的缩血管效应为缺血再灌注损伤的重要机制之一, 降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 是拮抗 ET-1 的神经肽。近年来研究证实蕲麻 (potentilla anserina, Pa) 具有抗缺血缺氧之功效, 本研究通过建立 ACIR 损伤大鼠模型, 探讨 Pa 对 ACIR 损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 无特定病原体 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 245 ~ 295 g, 购于军事医学科学院实验动物中心, 合格证号: No. 0040188, 随机数字表法分为 6 组, 每组 10 只, 即假手术组 (C 组)、缺血组 (I 组)、缺血再灌注 1 h 组 (R1h 组)、缺血再灌注 2 h 组 (R2h 组)、Pa 正丁醇提取物预处理后缺血再灌注 1 h 组 (Pa + R1h 组) 及 Pa 正丁醇提取物预处理后缺血再灌注 2 h 组 (Pa + R2h 组)。

1.2 主要试剂 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购于上海西唐生物科技有限公司; 羧甲基纤维素钠购于天津科瑞斯公司; ET-1 放射免疫试剂盒、CGRP 放射免疫试剂盒购于上海雅吉生物科技有限公司; Pa 来源于天津中医药大学, 正丁醇购于天津大茂化学试剂厂, Pa 经其萃取并减压浓缩后冷冻干燥得正丁醇部位浸膏, 并以质量分数 0.3% 羧甲基纤维素钠药物溶解, 制成 100 mg · kg⁻¹ 混悬液备用。

1.3 主要仪器 眼科镊、微创缝合针、止血钳、手术剪购于上海医菱医疗器械有限公司; 反转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 仪购于美国 MJ Research 公司; 电泳仪与电转仪购于美国 Bio-Rad 公司。

1.4 大鼠模型建立 采用常规可逆性大脑中动脉栓塞法制作成脑组织局灶性 ACIR 模型: (1) 动物取仰卧位, 用体积分数 10% 水合氯醛按 350 mg · kg⁻¹ 腹腔注射麻醉, 在颈部行正中纵向切口, 分离皮肤、肌肉后仔细暴露分离颈外动脉、颈内动脉及分叉处, 结扎颈外动脉, 动脉夹夹闭颈总动脉、颈内动脉分叉处, 颈外动脉远端结扎处剪一小口, 将单丝尼龙线打一小结使其头端呈鼓槌形, 经由颈内动脉插入, 稍

遇阻力即停止, 此时头端达大脑中动脉和大脑前动脉处, 用缝合线系住栓塞线, 缺血 15 min 后拔出栓塞线即为再灌注阶段; (2) C 组为假手术组, 不结扎; (3) I 组缺血 15 min; (4) R1h 组缺血 15 min 后再灌注 1 h 组; (5) R2h 组缺血 15 min 后再灌注 2 h; (6) Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组在施行缺血再灌注前, 先以 0.2 g · kg⁻¹ · d⁻¹ Pa 正丁醇提取物灌胃 30 d, 其余操作同 R1h 组、R2h 组。本研究中动物处置符合动物伦理学标准。

1.5 标本采集及检测 到达实验点后右心房取血, 4 °C 800 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 -40 °C 保存。血清 ET-1 及 CGRP 活性检测采用放射免疫法, 取 -40 °C 保存的上清液按试剂盒说明书操作。脑组织 CGRP 的 mRNA 和蛋白表达测定采用 RT-PCR 及蛋白印迹法, 取各组大鼠脑组织, TRIzol 匀浆, 提取总 RNA, 紫外光检测吸亮度 (A), A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.95 ~ 2.10, 检测 CGRP mRNA 表达; 各组大鼠脑组织加入裂解液, 研磨, 用 200 μL 裂解液冲洗研磨器, 4 °C 800 r · min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清即为组织总蛋白; 蛋白印迹法检测 CGRP 蛋白表达。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 ET-1、CGRP 比较 结果见表 1。与 C 组比较, I 组、R1h 组、R2h 组、Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组血清 ET-1 水平均显著升高, CGRP 水平均显著下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 I 组比较, R1h 组、R2h 组、Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组血清 ET-1 水平均显著升高, R1h 组、R2h 组 CGRP 水平显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 R1h 组、R2h 组比较, Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组血清 ET-1 水平均显著下降, CGRP 水平均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组脑组织 CGRP mRNA 及蛋白表达比较 结果见表 2。与 C 组比较, I 组、R1h 组、R2h 组、Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组的脑 CGRP mRNA 及蛋白水平表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 I 组比较, R1h 组、R2h 组、Pa + R2h 组的 CGRP mRNA

及 CGRP 蛋白水平显著下降,Pa + R1h 组的 CGRP mRNA 水平显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 I 组比较,Pa + R1h 组脑 CGRP 蛋白有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);与 R1h 组、R2h 组比较,Pa + R1h 组和 Pa + R2h 组的 CGRP mRNA 及 CGRP 蛋白水平均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组血清 ET-1、CGRP 水平比较

Tab.1 Comparison of ET-1 and CGRP in serum among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET-1/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	CGRP/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
C 组	10	24.58 \pm 3.41	54.12 \pm 5.44
I 组	10	66.49 \pm 8.61 ^a	35.50 \pm 9.91 ^a
R1h 组	10	104.60 \pm 6.64 ^{ab}	31.00 \pm 9.77 ^{ab}
R2h 组	10	108.82 \pm 6.22 ^{ab}	28.40 \pm 6.10 ^{ab}
Pa + R1h 组	10	81.14 \pm 9.42 ^{abc}	39.55 \pm 4.65 ^{abc}
Pa + R2h 组	10	88.66 \pm 15.32 ^{abc}	33.58 \pm 3.47 ^{ac}

注:与 C 组比较^a $P < 0.05$;与 I 组比较^b $P < 0.05$;与 R1h 组和 R2h 组比较^c $P < 0.05$ 。

表2 各组脑组织 CGRP mRNA 和蛋白表达比较

Tab.2 Comparison of CGRP mRNA and protein expression among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脑 CGRP mRNA	脑 CGRP 蛋白
C 组	10	0.781 \pm 0.067	0.803 \pm 0.109
I 组	10	0.641 \pm 0.040 ^a	0.699 \pm 0.078 ^a
R1h 组	10	0.401 \pm 0.073 ^{ab}	0.435 \pm 0.092 ^{ab}
R2h 组	10	0.306 \pm 0.090 ^{ab}	0.400 \pm 0.075 ^{ab}
Pa + R1h 组	10	0.564 \pm 0.050 ^{abc}	0.701 \pm 0.121 ^{ac}
Pa + R2h 组	10	0.501 \pm 0.034 ^{abc}	0.609 \pm 0.069 ^{abc}

注:与 C 组比较^a $P < 0.05$;与 I 组比较^b $P < 0.05$;与 R1h 组和 R2h 组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前脑血管病发病率不断上升,缺血性脑血管病占有脑血管病近 80%。脑缺血后部分血管能非人为再通,或医源性溶栓治疗后血流可恢复再通,供血恢复后,终止了原本缺血损伤的过程,部分缺血组织功能可得到恢复。但血流恢复后部分受损脑细胞功能进一步恶化甚至继续死亡,这种病理生理过程称作 ACIR 损伤,其发病机制及治疗药物的研究颇受国内外医学界关注^[1-3]。研究证实,ET 是迄今为止最强的缩血管物质,是造成无复流的原因之一^[4-5]。Pa 具有提高机体免疫力、抗氧化、抗缺血、保护肝脏、耐缺氧等作用^[6-7],但 Pa 对 ACIR 损伤是否具有保护作用,以及具体保护机制尚不明确。

常见的脑组织缺血是局部或区域性脑组织缺血,采用大鼠模型制成大鼠中动脉闭塞与临床脑卒中情况类似。研究表明,大鼠大脑中动脉闭塞后在急性期造成脑梗死范围最大,神经行为缺失症状严重,并伴有较严重的脑水肿^[8],而早期干预可明显

改善预后。本研究运用可逆性大鼠中动脉栓塞法建立大鼠局灶性 ACIR 模型,探讨 Pa 抑制 ET-1、升高 CGRP 的作用及其间接的脑保护作用,结果显示,在 ACIR 损伤各阶段血清 ET-1、CGRP 及脑组织 CGRP mRNA 与蛋白表达变化存在一定规律,即 ET-1 水平在再灌注组高于缺血组,缺血组高于假手术组;而 CGRP 变化无论是在血清中还是在脑组织 mRNA 或蛋白水平,其变化规律均与血清 ET-1 表达趋势相反。在大鼠 ACIR 模型上,在某些阶段 Pa 干预可降低 ET-1 及升高 CGRP 的表达,调整 ET-1 与 CGRP 之间的平衡,从而起到保护缺血再灌注损伤后受损脑细胞的作用,为 Pa 在 ACIR 方面的开发利用提供了重要的实验依据。

近年来有文献报道,ET-1 受体抑制剂可减轻 ACIR 的损伤程度,因此,针对 ET-1 在 ACIR 模型中升高的规律,尝试给予相应实验剂量的 ET 受体抑制剂以对抗 ET-1 所造成的损害作用,但因其价格高昂、毒副作用大,限制了其在临床的广泛应用,仅仅限于个别病症的对症治疗。本研究通过大鼠 ACIR 实验证实,Pa 可作为 ET 受体抑制剂的替代品,在某些实验阶段降低血清中高表达的 ET-1,并可升高血清、mRNA 及蛋白水平的 CGRP 表达,逆转 ET 与 CGRP 之间动态失衡所致的恶性循环,从而起到保护受损脑组织的作用。

参考文献:

- [1] 李彦,高建芝,王建刚,等. L-肌肽预处理对小鼠缺血再灌注脑的保护作用[J]. 新乡医学院学报, 2009, 26(1): 28-31.
- [2] 范姗姗,曹永亮,王晓莉,等. MSC 移植对视网膜缺血-再灌注损伤后神经节中 HIF-1 α 及 Caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(7): 613-616.
- [3] 张晶晶,董化江,单娜娜,等. 蕨麻正丁醇提取物对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(5): 324-326.
- [4] 董化江,罗悦晨,刘未,等. 左旋精氨酸对急性脑缺血再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(12): 731-733.
- [5] 李龙学. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 C-反应蛋白和内皮素-1 水平与肺动脉高压的关系[J]. 新乡医学院学报, 2011, 28(4): 476-478.
- [6] 马春花. 藏药蕨麻的化学成分及药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1584-1585.
- [7] 谢学渊,王强. 蕨麻提取物抗衰老作用研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(8): 734-736.
- [8] 商崇智,董化江,单娜娜,等. 青蒿素对脑缺血/再灌注损伤大鼠白细胞介素-8 表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(4): 246-248.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)