

脑心通对大鼠脑缺血损伤的保护机制

张红菊*, 赵忠新, 夏斌

(第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**观察脑心通对大鼠缺血脑组织(纹状体)葡萄糖调控蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、GRP94 表达的影响,探讨其对大鼠局灶性脑缺血损伤可能的保护机制。**方法:**大鼠随机分为假手术组、缺血损伤组(线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型)以及脑心通治疗组(缺血损伤前予脑心通治疗, $n=30$)。应用组织学观察、免疫组织化学及半定量 RT-PCR 检测缺血不同时段(6、12、24 h)各组大鼠纹状体 GRP78、GRP94 表达的变化。**结果:**成功建立大鼠局灶性脑缺血模型。组织学观察表明脑心通治疗组大鼠脑缺血损伤程度较缺血损伤组明显减轻。免疫组织化学检查和 RT-PCR 检测均发现各时间点假手术组大鼠纹状体 GRP78、GRP94 表达高于缺血损伤组($P<0.01$);缺血后 6、12、24 h 缺血损伤组、脑心通治疗组 GRP78、GRP94 表达呈现先升高后降低趋势,缺血后 12 h 的表达最高;各时间点缺血损伤组 GRP78、GRP94 表达低于脑心通治疗组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**大鼠纹状体缺血损伤后 12 h 内出现 GRP78、GRP94 表达升高;脑心通能够提高脑缺血损伤组织 GRP78、GRP94 表达;脑心通可能是通过促进 GRP78、GRP94 表达来发挥保护内质网功能,减轻脑缺血损伤。

[关键词] 纹状体;脑缺血;GRP78;GRP94;脑心通

[中图分类号] R 287.2; R 743.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0165-04

The protective mechanism of *Naoxintong* on cerebral ischemic injury in rats

ZHANG Hong-ju*, ZHAO Zhong-xin, XIA Bin (Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of *Naoxintong* on expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) and GRP94 in the striatum of rats with focal cerebral ischemic injury, so as to investigate their possible protective mechanism on cerebral ischemic injury. **Methods:** Ninety rats were equally randomized into 3 groups ($n=30$): sham operated group, ischemic group (Focal transient cerebral ischemia model was established with intraluminal occlusion of left middle cerebral artery) and *Naoxintong* pre-treated group (Treated with *Naoxintong* 5 d before ischemic injury). The expression of GRP78, GRP94 in rats striatum was detected by histological method, immunohistochemistry staining and semiquantitative RT-PCR at the different time points (6, 12 and 24 h after ischemic treatment). **Results:** The focal transient cerebral ischemia model was successfully established in rats. Histological results showed that the degree of focal cerebral ischemic injury in *Naoxintong* pre-treated group was significantly lower than that in ischemic group. Immunohistochemistry staining and RT-PCR results illustrated that the expression of GRP78 and GRP94 in ischemic group was lower than that in sham operated group at each time point after ischemic treatment ($P<0.01$). The expression of GRP78 and GRP94 in ischemic group and *Naoxintong* pre-treated group were the lowest at 6 h and the highest at 12 h, and the expression at 24 h was lower than that at 12 h but higher than that at 6 h. Compared with the ischemic group, the expression of GRP78 and GRP94 was higher in *Naoxintong* pre-treated group at the same time point ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** The expression of GRP78 and GRP94 is upregulated within 12 h of cerebral ischemic injury in rats. *Naoxintong* can promote the expression of GRP78 and GRP94 in ischemic cerebral areas, protect the function of endoplasmic reticulum and relieve the cerebral injury caused by ischemia.

[KEY WORDS] striatum; cerebral ischemia; GRP78; GRP94; *Naoxintong*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 165-168]

脑心通具有益气活血、化瘀通络、醒脑开窍、宣痹止痛之功效,临床上常用于治疗脑梗死、冠心病、血管性痴呆等,取得了较好的疗效,但目前未见对其脑保护作用的具体机制探讨。葡萄糖调控蛋白 (glucose-regulated protein 78、94, GRP78、GRP94) 是内质网上的伴侣分子,具有减轻内质网的负担、保护内质网的功能。本实验通过观察脑心通作用下脑

缺血损伤大鼠纹状体 GRP78、GRP94 表达的变化,来探讨脑心通对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护机制。

[作者简介] 张红菊, 硕士生, 副主任医师。

* Corresponding author. E-mail: zhjgxb@sohu.com

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 90只健康成年Wistar大鼠,雌雄各半,体质量250~300g,由复旦大学动物实验中心提供。脑心通由陕西咸阳步长制药有限公司提供(批号20040312),成份包括黄芪、当归、赤芍、川芎、丹参等16味中药,用生理盐水配制成质量浓度为250mg/L的药液备用。免疫组化中一抗、二抗均购于Santa Cruz公司。引物自行设计,由上海博亚生物技术有限公司合成;TRIzol购自Invitrogen公司;Taq酶购自TaKaRa公司;逆转录盒购自Promega公司。

1.2 脑缺血模型的建立 大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(300mg/kg)麻醉,采用Nagasawa等^[1]改良的线栓法制成Wistar大鼠永久性大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,Zealunga 5分制^[2]评分在1~3分者为成功建模。假手术组动物为尼龙线入颈内动脉后不到达大脑中动脉分叉处。

1.3 动物分组与给药 90只大鼠随机平均分为假手术组、缺血损伤组和脑心通治疗组,每个时间点(6、12、24h)为10只,半数供免疫组化使用,半数供RT-PCR使用。给药途径:脑心通治疗组给予脑心通药液灌胃(2g/kg,药物剂量相当于70kg成人体质量剂量的10倍;每天1次,连续5d),于第5天灌胃1h后手术制备局灶脑缺血模型。缺血损伤组仅制备局灶脑缺血模型,不作治疗。假手术组大鼠不作缺血处理,也不予药物治疗。

1.4 组织学观察 各组动物在以上各缺血时间点(6、12、24h),用10%水合氯醛10ml/kg的剂量腹腔注射,动物瘫倒后开胸暴露心脏,经升主动脉插管,用生理盐水100ml快速冲洗,再用4%多聚甲醛(pH 7.4,4℃)250ml快速灌注,随后慢速灌注250ml,再用4℃4%多聚甲醛浸泡24h,取出大鼠纹状体组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。切片后用H-E染色进行病理组织学观察。

1.5 免疫组织化学染色 采用SP法。常规脱蜡至水,PBS洗3min×3次,加0.3% H_2O_2 20min,PBS洗3min×3次,98℃ 20min进行抗原修复,室温冷却,PBS洗3min×3次,加一抗GRP78(1:50)羊抗鼠、GRP94(1:60)兔抗鼠,4℃过夜。PBS洗3min×3次,加b-驴抗羊(1:200)、b-驴抗兔(1:200),37℃ 30min,PBS洗3min×3次,加strepta-

vidin-HRP(1:200) 37℃ 30min,PBS洗3min×3次。0.04% DAB+0.03% H_2O_2 显色8~12min,水洗。苏木精衬染1min,水洗。常规树脂封片,观察。正常血清取代一抗作替代对照。图像经北京中科通用医学图像分析系统(GMIAS 2.0)处理,每片随机取3个视野(×100)输入图像分析仪,以阳性染色细胞数进行统计分析。

1.6 RT-PCR反应 取50mg冻存组织置于1.5ml Eppendorf管中,加入1ml TRIzol试剂,匀浆后经氯仿抽提,异丙醇沉淀出RNA,溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水中。通过Beckman coulter DU640核酸蛋白分析系统测量光密度值,重复测定3次,计算样品总RNA浓度,并通过琼脂糖电泳检测其纯度。根据Medline基因文库用Primer Premier5.0自行设计引物,目的基因GRP78的上游引物为5'-ATC AGG GCA ACC GCA TCA CAC C-3',下游引物为5'-ACG CCT CGG CAG TTT CCT TCA TTT-3',预增片段为312bp。GRP94的上游引物为5'-GAC GGG CAA GGA CAT CTC TAC AAA-3',下游引物为5'-CTT CTT CTT CTG CC C CTG CGT CTG-3',预计扩增片段为362bp。GAPDH的上游引物为5'-CAC GAA TTC GGT CAT CAT CTC TGC CCC CTC TGC-3',下游引物为5'-GCT GGA TCC GAC GCC TGC TTC ACC ACC TTC TT-3',预计扩增片段462bp。PCR反应体系为: H_2O 2.12 μ l,2×buffer 5 μ l,dNTP 1.6 μ l(终浓度0.2mmol/L核苷酸),模板RNA为1 μ l(2g/L左右的浓度),目的基因及GAPDH各自上下游引物(10 μ mol/L)各0.16 μ l(各自终浓度达到1 μ mol/L),Taq酶为0.12 μ l,共10 μ l。反应条件为99℃ 2min;94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 45s,30个循环;72℃ 5min。取5 μ l RT-PCR产物,加上样缓冲液1 μ l,2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相,复日科技Smart view RT-PCR系统软件分析条带的积分光密度,计算GRP78、GRP94 mRNA相对表达水平,计算公式如下:GRP mRNA相对表达水平=样品GRP扫描值/样品GAPDH扫描值。

1.7 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 病理组织学观察 缺血损伤组(图1A)大鼠纹状体区组织坏死明显,神经元形态不完整,仅有少量

正常神经元,细胞周围间隙被坏死组织充填,部分细胞核消失,细胞缩小,细胞周围间隙增大。脑心通治疗组(图1B)纹状体区组织坏死不明显,神经元呈轻度缺血改变,细胞核少量消失,少部分细胞缩小,细胞周围间隙增大不明显。

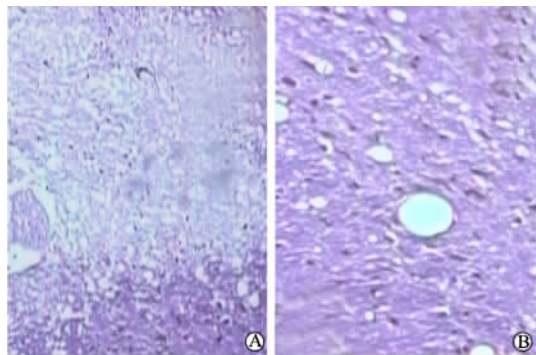


图1 缺血12 h缺血损伤组及脑心通治疗组纹状体组织的病理学改变

Fig 1 Pathological changes at 12 h in ischemic group and Naoxintong pre-treated group (H-E, $\times 100$)

A: Ischemic group; B: Naoxintong pre-treated group

2.2 大鼠脑组织免疫组织化学观察 纹状体区缺血损伤组织细胞内可见 GRP78、GRP94 阳性颗粒,呈棕黄色。如图2所示,缺血损伤组 GRP78、GRP94 在6、12、24 h 阳性细胞百分率均低于假手术组($P < 0.01$)。缺血后6、12、24 h 缺血损伤组、脑心通治疗组 GRP78、GRP94 阳性细胞百分率均呈现先升高后降低趋势。缺血损伤组 GRP78 阳性细胞百分率在6、12、24 h 分别为(0.37 \pm 0.01)、(0.65 \pm 0.01)、(0.46 \pm 0.01),脑心通治疗组 GRP78 阳性细胞百分率在6、12、24 h 分别为(0.45 \pm 0.01)、(0.88 \pm 0.01)、(0.66 \pm 0.01),各时间点两组间均有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);两组间 GRP94 的表达也有相似的结果。

2.3 大鼠脑组织 GRP78、GRP94 RT-PCR 检测结果 琼脂糖凝胶电泳可见 GRP78、GRP94 和 GAPDH 的条带分别为 312、362 和 462 bp,与预期结果相符。如图3所示,假手术组 GRP78、GRP94 mRNA 相对表达水平为(1.480 \pm 0.031)、(2.380 \pm 0.030),24 h 无明显波动,高于各时间点缺血损伤组($P < 0.01$)。缺血后6、12、24 h 缺血损伤组、脑心通治疗组 GRP78、GRP94 表达呈现先升高后降低趋势。缺血损伤组 GRP78 在6、12、24 h 表达分别为(0.450 \pm 0.030)、(0.890 \pm 0.029)、(0.660 \pm 0.020),脑心通治疗组各时间点 GRP78 的表达分别

为(0.650 \pm 0.029)、(2.520 \pm 0.032)、(1.810 \pm 0.031),各时间点缺血损伤组均明显低于脑心通治疗组($P < 0.01$);两组间 GRP94 的表达也有相似的结果。

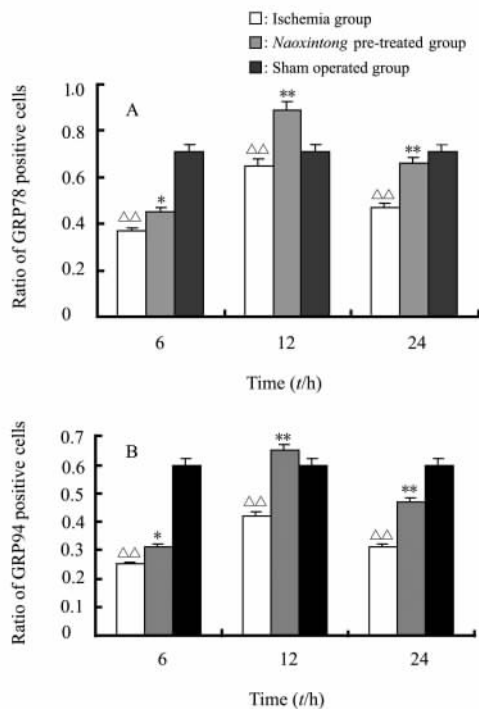


图2 不同时间点缺血损伤组、脑心通治疗组及假手术组大鼠纹状体 GRP78(A)、GRP94(B) 阳性细胞百分率

Fig 2 Positive rates of GRP78(A) and GRP94(B) at different time points in Naoxintong pre-treated, ischemic and sham operated groups

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ischemic group at the same time point; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs sham operated group; $n = 5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

脑缺血作为一种应激源可引发脑组织细胞的内质网应激^[3],GRP78、GRP94 一般位于内质网上,可参与这一过程。组织器官在缺血、缺氧、低糖、内质网钙平衡紊乱等应激情况下,可导致 GRP78 大量表达^[4],GRP78 被诱导表达后重新分布,与 caspase-7 和 caspase-12 形成复合物,阻止其激活及释放,从而抑制 caspase-12 所致凋亡;并可以通过上调 JNK、Akr、PKC,下调 ERK 来保持信号转导的正常进行,抑制细胞凋亡^[5]。GRP78 可与错误折叠和未折叠蛋白质结合,修改其构型,维持新生肽的折叠、移位、组装、分泌,保持细胞在应激状态下蛋白质继续合成,维持内环境的稳定。应激条件下 GRP78 转录活

性可提高 10~25 倍,表达足够的 GRP78,结合激活的细胞内酶,未折叠蛋白反应(UPR)结束,恢复内质网功能^[6]。GRP78 还具有维持细胞内钙平衡,保护细胞的作用^[7]。

活,GRP78、GRP94 的表达逐渐上升,12 h 达到最高;然而长时间过强的应激,凋亡占主导地位^[8],GRP78、GRP94 的表达逐渐呈下降趋势,所以在 24 h 呈低表达。脑心通治疗组大鼠缺血脑组织 GRP78、GRP94 在 6、12、24 h 各时间点表达均高于缺血损伤组,这说明脑心通可能通过上调 GRP78、GRP94 表达,来对抗缺血应激损伤而发挥其保护作用。

本研究表明脑心通可能通过促进缺血损伤组织 GRP78、GRP94 表达来改善内质网功能,减轻脑缺血损伤,但其如何调节 GRP78、GRP94 的表达,以及具体的信号转导通路仍有待于进一步研究。

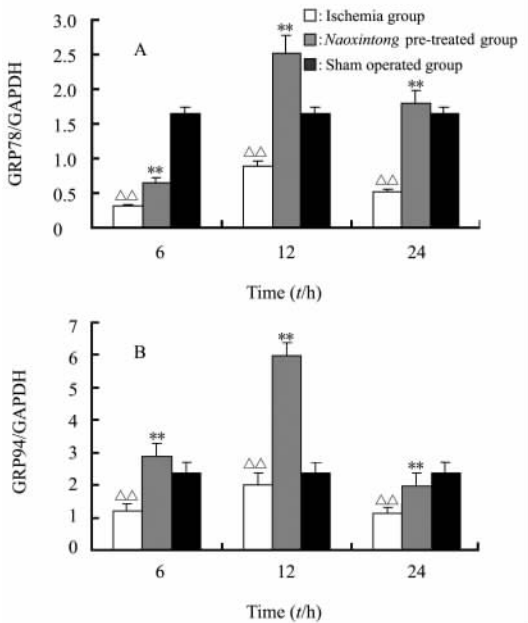


图 3 不同时间点缺血损伤组、脑心通治疗组及假手术组大鼠纹状体 GRP78(A)、GRP94(B) mRNA 的表达

Fig 3 Expression of GRP78(A) and GRP94(B) mRNA at different time points in Naoxintong pre-treated, ischemic and sham operated groups

** P<0.01 vs ischemic group at the same time point; ΔΔ P<0.01 vs sham operated group; n=5, x̄±s

本研究的组织形态学观察也表明脑心通治疗组损伤程度较轻。免疫组织化学染色和 RT-PCR 结果表明缺血后 6、12、24 h 假手术组 GRP78、GRP94 表达高于各时间点缺血损伤组,这表明缺血损伤时 GRP78、GRP94 表达受到明显抑制。缺血损伤组、脑心通治疗组 GRP78、GRP94 表达呈现先升高后降低趋势,12 h 为最高。这可能是由于在缺血早期血流的中断以及各种损伤机制的启动,机体的应激机制还没有被激活,所以表现为缺血初期 GRP78、GRP94 的低表达;随着时间的推移,应激机制的激

[参考文献]

- [1] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20:1037-1043.
- [2] Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20:84-91.
- [3] Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, et al. Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23:449-461.
- [4] DeGracia DJ, Montie HL. Cerebral ischemia and the unfolded protein response[J]. Neurochem, 2004,91:1-8.
- [5] Reddy Rk, Mao C, Baumeister P, et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 20915-20924.
- [6] Schneeloch E, Wenkel S, Mies G, et al. Spreading depression activates unfolded protein response[J]. Neurosci Lett, 2004, 368:37-40.
- [7] Verkhratsky A, Toescu EC. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis and neuronal death[J]. Cell Mol Med, 2003,4:351-361.
- [8] Shibata M, Hattori H, Sasaki T. Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Neuroscience, 2003, 118: 491-499.

[收稿日期] 2005-04-18

[修回日期] 2005-10-20

[本文编辑] 贾泽军