

· 论著摘要 ·

三七三醇皂苷对慢性脑缺血大鼠脑源性神经营养因子表达及认知功能的影响

顾勤 姜嘟嘟 肖俊杰 单圣道 詹青 赵江民

关键词: 脑缺血; 认知障碍; 脑源性神经营养因子; 大鼠; 三七三醇皂苷

doi:10.3969/j.issn.1672-5921.2010.08.011

慢性脑缺血是神经系统的一种常见的病理状态,是血管性痴呆、Alzheimer 病(AD)和 Binswanger 病等多种疾病发展过程中的一个共同病因。早期以认知功能损害为主要表现,最终导致持久或进展性认知与神经功能障碍^[1]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factors, BDNF)是维持神经元功能和再生修复及防止神经元退行性变的重要细胞因子。脑缺血可导致 BDNF 的广泛表达,且其 mRNA 表达水平与局部神经元抵抗损伤的能力呈正相关^[2]。三七三醇皂苷是从我国传统中药三七中提取出的有效成分,其可以透过血-脑屏障,使脑内蛋白质合成显著增加^[3],具有改善微循环及抗炎等作用,在急性脑缺血治疗中显示出其良好的应用前景。但是三七三醇皂苷是否可以改善 BDNF mRNA 的表达,改善慢性脑缺血所致的认知功能障碍尚不得而知,故本研究对此进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选用清洁级 11~12 月龄的 Wistar 大鼠 36 只(购自上海斯科特动物实验中心),雌雄各半,体质量 300~400 g,随机分为假手术组、慢性脑缺血组(模型组)、慢性脑缺血+三七三醇皂苷组(治疗组),每组 12 只。

1.2 主要药品与设备

三七三醇皂苷(三七通舒胶囊,由成都华神集团股份有限公司制药厂提供,批号:Z20030109),每粒含三七三醇皂苷 100 mg;PrimeScript™ RT 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq™ TM 试剂盒,由宝生物工程(大连)有限公司提供。Y 型迷宫(张家港生物医学仪器厂)。

1.3 模型的制作

参照 Bennett 等^[2]制作慢性脑缺血大鼠模型的方法,将大鼠麻醉后颈正中切开皮肤,钝性分离双侧颈总动脉,每侧用 0 号手术线分别结扎近、远心端后,从中间剪断。假手术组,只分离不结扎。治疗组,于术后 3 周开始,先将三七三醇

皂苷用无水乙醇溶解,然后以 100 mg/次,灌胃,2 次/d。模型组和假手术组分别灌以等量的等渗盐水,6 周后作各项指标的检测。

1.4 认知功能的检测

术后第 6 周用 Y 型迷宫实验测试认知功能,以达到连续 10 次测试中至少有 9 次正确反应(正确反应率≥90%)时所需的电击次数表示。术前预测试 1 次,剔除灵活性过差的大鼠。电击次数越高表示认知功能越差。

1.5 实时荧光 PCR 检测

1.5.1 样本准备:脱臼处死大鼠后立即断头取出海马组织,用 RNAlater 液浸泡在 EP 管中,保存在液氮中。

1.5.2 引物设计:按照实时荧光定量技术对引物的要求,用 Beacon Designer 7.0 进行引物设计的筛选,BDNF 上游引物序列的 5'-CTGGAGAAAGTCCCGGTAT-3',下游引物序列的 5'-GGTAGTTCGGCATGCGAGT-3';内参 β -actin 上游引物序列的 5'-GTTGACATCCGTAAGACC-3',下游引物序列的 5'-TGGAAGGTGGAC AGTGAG-3',由上海生物工程公司合成。

1.5.3 RNA 的抽提:从液氮中的 EP 管中取出海马组织,加入含有 1 ml 预冷 Trizol 提取液的 EP 管中,摇匀静置 10 min,加 200 μ l 氯仿混匀,离心(12000 g, 4 $^{\circ}$ C, 15 min)取上清,加入等体积异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤 2~3 次,20~50 μ l DEPC 水溶解。RNA 纯度和浓度用 OD260/OD280 来检测。

1.5.4 cDNA 合成:严格按照逆转录试剂盒说明书进行,逆转录反应液:5 \times PrimerScript™ Buffer 2 μ l; PrimerScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μ l; Oligo dT Primer (50 μ M mol/L) 0.5 μ l; Random 6 mers (100 μ M mol/L) 0.5 μ l; 总 RNA 100~200 ng; 补充无核酶水至 10 μ l; 反应液配制均在冰上进行。逆转录反应条件:37 $^{\circ}$ C、15 min; 85 $^{\circ}$ C、5s。

1.5.5 实时荧光 PCR 的检测:严格按照 SYBR Premix Ex Taq™ TM 试剂盒说明操作,PCR 反应液:SYBR Premix Ex Taq™ TM (2 \times) 12.5 μ l; PCR 引物 (10 μ M) 0.5 μ l; cDNA 溶液 5 μ l (总量在 10 ng 左右); 无核酶水 7 μ l。反应液配制均在冰上进行。实时荧光 PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性、1 min, 然后 95 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 共 45 个循环。扩增完成后进行融解曲线分析 (55~95 $^{\circ}$ C, 80 个循环, 每个循环增加 0.5 $^{\circ}$ C), 得到扩增曲线、融解曲线和样本的相对定量 Ct 值。采用相对定量的方法进行数据分析, 具体方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

作者单位:200065 上海, 同济大学附属同济医院神经内科(顾勤、姜嘟嘟、詹青)、心血管内科(肖俊杰)、普通外科(单圣道); 同济大学附属东方医院影像科(赵江民)

通讯作者:赵江民, Email: johnmzhao@mail.tongji.edu.cn; 詹青, Email: zhanqing@mail.tongji.edu.cn

1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行分析, 各组数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。采用 Pearson 相关性分析来分析 BDNF mRNA 的表达水平与认知功能的关系。

2 结果

2.1 各组大鼠认知功能检测结果

模型组 (90.6 ± 5.56) 和治疗组 (80.9 ± 2.4) 大鼠学会主动逃避所需的电击次数高于假手术组 (68.6 ± 3.6), $P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 治疗组大鼠学会主动逃避所需的电击次数低于模型组, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。

2.2 各组大鼠 BDNF mRNA 的表达

假手术组、模型组和治疗组 BDNF mRNA 的相对表达值分别为 0.177 ± 0.065 , 0.023 ± 0.011 和 0.102 ± 0.054 。假手术组 BDNF mRNA 的表达量分别为模型组和治疗组的 7.69 倍和 1.73 倍。模型组和治疗组 BDNF mRNA 表达量低于假手术组, 差异具有统计学意义; 模型组 BDNF mRNA 表达量低于治疗组, 差异具有统计学意义。BDNF 的扩增曲线见图 1。

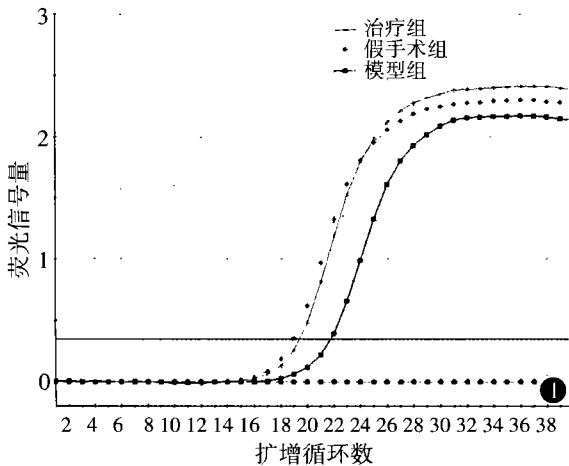


图 1 BDNF 扩增曲线

2.3 相关性分析

采用 Pearson 相关性分析来分析 BDNF mRNA 表达水平与认知功能的关系, BDNF mRNA 表达量与认知功能成正相关 ($r = 0.42, P < 0.05$)。

3 讨论

本研究主要发现, 慢性脑缺血可以导致认知功能障碍, 三七三醇皂苷治疗可以改善 BDNF mRNA 表达, 改善慢性脑缺血所致的认知功能障碍。本研究中动物模型为经典的脑缺血模型, 3 周之后按照惯例定义为慢性脑缺血, 本研究发现 3 周后大鼠认知功能显著下降, 与文献的多数报道一致。但是我们未行病理学的检测, 这是本研究的一个缺陷^[1,4]。

慢性脑缺血是以导致进行性或持久性的认知功能障碍为主要特点, 伴发于多种临床疾病, 严重影响患者的生活质

量。迄今为止, 近 200 个大规模临床试验结果显示, 单一的药物治疗脑缺血很难获得满意疗效。根据疾病的不同阶段采取多种药物的复合治疗成为当前新的趋势^[4]。中药可以多层性、多途径、多靶点综合作用慢性脑缺血多个环节, 有望从整体上有效保护慢性脑缺血所致的认知功能障碍。本实验通过 Y 型迷宫实验检测大鼠的认知功能, 证实慢性脑缺血确实能够损害大鼠的认知功能, 这与既往的研究高度一致^[5]。我们在术后 3 周开始给予患者药物治疗, 是因为术后第 3 周是慢性脑缺血介导的进行性脑损伤开始的转折点^[5]。治疗 3 周后, 运用 Y 型迷宫实验检测大鼠的认知功能, 发现三七三醇皂苷确实可以改善慢性脑缺血所致的认知功能障碍。

BDNF 是一种作用广泛而有效的神经生长因子, 属靶源性神经营养因子, 对多种损伤性中枢神经系统疾病具有保护作用。BDNF 可以保护缺血半暗区的神经元、抑制迟发性神经元坏死、减少梗死体积^[6]。但是, 直接外源性给予 BDNF 治疗脑缺血存在一系列问题^[7-14]: 首先, BDNF 为蛋白质类物质, 不能通过消化道给药; 其次, BDNF 为大分子亲水物质, 难以透过血-脑屏障, 即使鞘内给药, 其向脑实质内弥散也有限, 存在转运困难的问题; 最后 BDNF 脑室给药会带来体重减轻、饮水减少、活动过度等严重不良作用。三七三醇皂苷静脉给药后, 能广泛分布于大鼠的各组织, 并能透过血-脑屏障, 对急性脑缺血具有保护作用, 且其可以使脑内蛋白质合成显著增加。本研究发现, 慢性脑缺血可以导致 BDNF mRNA 表达相对减少, 这与郑萍等^[15]的研究结论基本一致。她们的研究发现, 结扎大鼠双侧颈总动脉组较对照组的认知功能明显下降, 慢性脑缺血大鼠缺血 4 个月较缺血 4 周的认知功能下降更明显; 慢性脑缺血 4 个月组大鼠海马 BDNF 表达的平均吸光度值与 Y 型迷宫实验正确次数间存在正相关。本研究在此基础上发现, 三七三醇皂苷可以降低慢性脑缺血所致 BDNF mRNA 表达减少的程度。更重要的是, 三七三醇皂苷是我国传统的中药, 其具有多层性、多途径、多靶点综合作用的特点, 在慢性脑缺血时可以诱导 BDNF mRNA 的产生, 完全克服了外源性 BDNF 治疗脑缺血所面临的一系列问题, 具有广阔的应用空间。

参考文献

[1] Lee JH, Park SY, Shin HK, et al. Protective effects of cilostazol against transient focal cerebral ischemia and chronic cerebral hypoperfusion injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2008, 14(2):143-152.
 [2] Endres M, Fan G, Hirt L, et al. Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(1): 139-144.
 [3] Lindvall O, Emfors P, Bengzon J, et al. Differential regulation of mRNA for nerve growth factor brain-derived neurotrophic factor and neurophin3 in the adult rat follow-

ing cerebral ischemia and hypoglycemic coma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(2):648-652.

[4] Bennett SA, Pappas BA, Stevens WD, et al. Cleavage of amyloid precursor protein elicited by chronic cerebral hypoperfusion [J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(2):207-214.

[5] De la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. Brain Res, 1992, 582(2):186-195.

[6] 詹合琴,尹志奎,翟成凯,等.三七皂苷 Rg1 对脑缺血后大脑皮质和海马 BDNF 蛋白的影响 [J]. 山东医药, 2006, 46(5):9-10.

[7] Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders [J]. Neuron, 2008, 57(2):178-201.

[8] Zhang Y, Partridge WM. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system [J]. Stroke, 2001, 32(6):1378-1384.

[9] Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, et al. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2006, 1(3):223-236.

[10] Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction [J]. Semin Immunopathol, 2009, 31(4):497-511.

[11] Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediated [J]. Pharm Res, 2007, 24(9):1759-1771.

[12] van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Couraud PO, et al. Identification of peptide ligands for targeting to the blood-brain barrier [J]. Pharm Res, 2010, 27(4):673-682.

[13] Laquintana V, Trapani A, Denora N, et al. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6(10):1017-1032.

[14] Liu DZ, Ander BP, Xu H, et al. Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury[J]. Ann Neurol, 2010, 67(4):526-533.

[15] 郑萍,章军建,刘汉兴,等.慢性脑低灌注大鼠海马 BDNF 的表达与认知功能损害 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2003, 12(4):407-410.

(收稿日期:2010-04-12)

(本文编辑:吴迪)

· 国外新信息 ·

SpideRX 栓子保护装置联合颈动脉支架置入术在重度颈动脉狭窄高危患者中的应用

CREATE (carotid revascularization with ev3 arterial technology evolution trial) 是一项前瞻性、非随机的多中心临床试验,研究联合栓子保护装置的颈动脉支架术对于高危/重度颈动脉狭窄患者的疗效。前后分为 4 个研究阶段,CREATE SpideRX 是其中第三个阶段,主要探讨联合采用 SpideRX 远端栓子保护系统(美国, ev3 公司)的颈动脉支架置入术的安全性。SpideRX 远端栓子保护系统是改良的 Spider 装置,交换更快速,已由美国 FDA 批准用于研究。研究者在 2005 年 3 月—5 月,共纳入 160 例重度颈动脉狭窄、且为颈动脉内膜切除术高危风险的患者。主要终点事件为术后 30 d 内出现严重心、脑血管事件。研究结果显示,有 9 例患者

(5.6%) 出现主要终点事件,其中 4 例死亡(2.5%), 5 例出现非致死性卒中(3.1%), 1 例出现非致死性心肌梗死(0.6%)。技术成功率为 97.%(156/160;操作成功作为次级终点,其定义为所有装置均成功释放,保护装置成功收回,且术后残余狭窄率 < 50%)。仅基线狭窄程度是术后 30 d 卒中或死亡唯一的独立预测因素($P < 0.05$)。该研究认为,对于重度颈动脉狭窄的高危患者,联合采用 SpideRX 远端栓子保护装置的颈动脉支架血管成形术是血管再通的可行措施。

译自 J Interv Cardiol, 2010, in print.

《中国脑血管病杂志》编辑部 编译