

七叶皂苷钠对一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型细胞凋亡及调控凋亡基因表达的影响

欧阳晓春 余小骊 景少巍[△] 王水华 张萃萍

(解放军第 94 医院神经内科 江西 南昌 330002)

摘要 目的 探讨七叶皂苷钠对一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型细胞凋亡及 Caspase-3 表达的影响。方法 将 30 只大鼠随机分为正常对照组、一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型对照组和七叶皂苷钠治疗组,原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡,免疫组化法检测 Caspase-3 的表达。结果 治疗组大鼠脑细胞凋亡率及 Caspase-3 表达较迟发性脑病对照组显著降低($P<0.01$)。结论 七叶皂苷钠对一氧化碳中毒迟发性脑病的脑保护作用机制可能与干预脑细胞凋亡相关基因表达并减少神经细胞凋亡有关。

关键词 七叶皂苷钠;一氧化碳中毒;细胞凋亡;抗凋亡-3;实验大鼠

中图分类号 Q95-3 R595.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)05-865-03

Effects of Sodium Aescinate on Cell Apoptosis and Expression of Apoptotic-Related Genes in Delayed Encephalopathy Rat Model of Carbon Monoxide Poisoning

OUYANG Xiao-chun, YU Xiao-li, JING Shao-wei[△], WANG Shui-hua, ZHANG Cui-ping

(Department of Neurology, the 94 Hospital of PLA, NanChang, Jiangxi 330002, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Sodium Aescinate on cell apoptosis and the expression of caspase-3 in delayed encephalopathy rat model of carbon monoxide poisoning. **Methods:** Thirty rats were randomly divided into three groups, that is, normal group, delayed encephalopathy rate model of carbon monoxide poisoning control group and Sodium Aescinate treatment group. The cell apoptosis was detected by TUNEL staining. The expression of caspase-3 was determined by immunohistochemical staining. **Results:** The cell apoptosis rate and the positive cell number of caspase-3 were significantly lower ($P<0.01$) in Sodium Aescinate treatment group than those in the delayed encephalopathy after carbon monoxide poisoning control group. **Conclusion:** The protective effect of Sodium Aescinate on the cerebral tissue after carbon monoxide poisoning may be related with its intervening in the expression of apoptosis-related gene and decreasing the degree of nerve cell apoptosis.

Key words: Sodium Aescinate; Carbon monoxide poisoning; Apoptosis; Caspase-3; Animals laboratory Rats

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R595.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)05-865-03

急性一氧化碳中毒后迟发性脑病(DEACMP)系指急性一氧化碳中毒患者经抢救恢复,于数日至数周表现基本正常的间歇期后再次出现以急性痴呆为主的一组神经精神症状。其发病机制尚无定论,多数意见倾向于 CO 中毒对细胞的兴奋性毒性作用和氧应激增强诱导了细胞凋亡^[1-3]。本研究通过观察七叶皂苷钠对一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型神经细胞凋亡和 Caspase-3 表达的影响,探讨七叶皂苷钠在迟发性脑病大鼠模型抗细胞凋亡作用和 Caspase-3 介导的信号传导机制的影响,为进一步明确七叶皂苷钠的药理作用及应用于迟发性脑病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

作者简介 欧阳晓春(1970-)男,硕士,主治医师,研究方向 脑血管病,中毒性脑病

[△]通讯作者 景少巍(1977-)女,硕士,主治医师,研究方向 脑血管病,中毒性脑病,脑血管病

(收稿日期 2011-09-21 接受日期 2011-10-18)

8-10 周龄健康 SD 雄性 30 只,体重 220-260g,平均 240±25g,购于南昌大学医学院实验动物中心。随机分为 A、B、C 三组,每组 10 只。其中 A 组为正常对照组,B 组为一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型对照组,C 组为七叶皂苷钠治疗组。

1.2 CO 中毒箱

用白铁皮自行设计焊接而成。其中部为直径 45cm、高 15cm 的圆筒,内外圆筒上下口分别对称焊接高 15cm 的锥形筒。上下锥形筒的尖端分别焊接直径 0.8 cm 的气体出、入管口。圆筒中央为直径 13cm 的密封小圆筒,内外两圆筒壁之间的环形空间被平均分成 10 份,每份即为 1 个大鼠中毒室。每个中毒室内置 5 ml 饮水瓶,外壁开 4cm×4 cm 开口。中毒室底为均匀打孔的下筛板,筛孔直径 0.2 cm,间距 0.5 cm;顶为均匀打孔的上筛板,筛孔直径 1.5cm 间距 2.0cm。中毒时,气体由下锥形筒尖端入口进入,经筛孔进入中毒室,尾气由上锥形筒尖端出口排出。

1.3 迷宫

采用 Piantadosi 法,由木板制作,为辐射状八臂迷宫。其中央为八棱柱形箱体,底为正八边形,每个角到中心的距离为

35cm;箱体高 30cm,每个侧面向外延伸长 80cm、宽 10cm 的臂,距臂末端 2cm 处有深 1cm 的饲料槽。

1.4 CO 混合气体

体积分数为 15.0×10^{-4} ,由 CO 与空气混合而成。

1.5 主要试剂

TUNEL 检测试剂盒、兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体为武汉博士德公司生产。

1.6 方法

1.6.1 迷宫试验方法 采用 Plantadosi 法并经改进。每只大鼠每天测试一次,测试前每个臂补加一次饲料,每次测试不重复补加,以使大鼠仅在第一次入臂时觅到食物。大鼠被放置于箱底自由漫游,4 只爪全进入一个臂时算 1 次入臂,一次测试过程中再次进入同一个臂即算 1 次错误入臂。每次测试持续到大鼠进入全部 8 个臂或实验持续时间达 5min 时结束,记录第 1 次错误入臂前的正确入臂数。中毒前连续测试 21d,使每只大鼠正确入臂数达到或接近 8 次;中毒后继续测试,以评估大鼠智力改变程度。根据中毒后迷宫试验结果,把中毒 5d 后、10d 内发生昏迷或一次迷宫试验正确入臂数少于 3 次者定为迟发性脑病大鼠。

1.6.2 动物模型的制备 将大鼠放入 CO 中毒箱的中毒室中,每室 1 只,再用玻璃片和透明胶布将开口密封。A、B、C 三组分别通入体积分数为空气、 15.0×10^{-4} 、 15.0×10^{-4} 的 CO 混合气体。前 5h 气体流量为 800L/h,中间 4h 为 1000L/h,最后 3h 为 1200L/h,共通气 12h。取出后观察大鼠中毒症状,并经尾部采血法采血以测定血液碳氧血红蛋白(HBCO)浓度。

1.6.3 染毒方法 A 组大鼠未予特殊处理,B 组大鼠致伤染毒后予生理盐水 $10\mu\text{L/g}$ 腹腔内注射,连续 10d,C 组大鼠在染毒后按 5mg/kg 七叶皂苷钠腹腔内注射,连续 10d。

1.6.4 取材 分别于染毒后 15d 断头处死各组大鼠,完整取出全脑。每只大鼠均在双侧大脑半球任意位置及海马回各取大小约 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 脑组织作为标本。标本先置于多聚甲醛中固定 6h,然后梯度酒精脱水。二甲苯透明常规石蜡包埋。

1.6.5 检测 采用 TUNEL 法原位标记 DNA 片段检测凋亡细胞,采用 SP 法进行 Caspase-3 免疫组织化学染色,均严格按照说明书操作。观察记录:细胞核染色呈棕黄色或棕红色定义为 TUNEL 阳性。细胞浆染色呈棕黄色或棕褐色定义为 Caspase-3 染色阳性。在 Olympus-CH 光学显微镜下计算 10 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个细胞,总计 1000 个细胞,计算出平均阳性率,即得 LI(labeling index),计算公式为:LI=(阳性细胞数/计数细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 中毒后表现及迷宫试验结果

从中毒箱中取出时,A 组无中毒表现,B 组、C 组中毒症状明显,表现为不同程度的行动迟缓,肌力减低,走路不稳等,且 B、C 二组同组个体之间中毒症状亦存在明显差异,均未出现昏迷及死亡。中毒后前 3d,B、C 二组均出现觅食反应迟钝,迷宫实验正确入臂数显著减少,A 组则无异常。中毒后第 3d 开始,B、C 二组逐渐出现活动增多,觅食反应增强,迷宫实验正确入臂数则跳跃式增多;中毒 7d 后 B、C 二组个体症状出现分化,大部分个体继续好转,一部分先后出现活动减少,觅食反应迟钝,迷宫实验正确,入臂数跳跃式减少,B 组在中毒后的 7-14d 先后出现 4 只符合迟发性脑病诊断标准者,发病率为 40.0%,C 组在中毒后的 7-14d 先后出现 2 只符合迟发性脑病诊断标准者,发病率均为 20.0%,其中 B 组于第 5d 出现一只昏迷;B、C 二组发病率与 A 组比较差异有显著意义($P < 0.01$)。

2.2 TUNEL 法染色结果

细胞凋亡状态 TUNEL 法显示,三组大鼠脑组织中均有 TUNEL 阳性细胞,但其中 B 组大鼠脑组织中,TUNEL 阳性细胞数明显较多。正常组、对照组和七叶皂苷钠组三组 LI 值两两比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 三组大鼠脑组织及 Caspase-3 的表达($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The expression of brain tissues and Caspase-3 of three groups

Group	Onset number	Apoptosis cells	Caspase-3 number of positive cells
Normal control group	0	3.6 ± 1.12	11.2 ± 1.32
DEACMP model group	4	34.2 ± 3.21	22.8 ± 2.15
Aescin control group	2	18.4 ± 2.24	16.5 ± 1.46

由附表可见,与正常组比较,对照组大脑皮层及海马区神经元 Caspase-3 的表达增强,其平均密度值显著高于正常组($P < 0.01$),给予七叶皂苷钠处理后其表达显著减弱($P < 0.01$)。

3 讨论

有研究发现,CO 中毒可以使脑细胞以两种方式死亡,即坏死和细胞凋亡。脑细胞坏死主要发生在急性 CO 中毒所致的严重损伤之后,病变以炎症反应和组织损伤为特点;迟发性脑病是在经历一段“假愈期”后才出现,故推测神经组织细胞凋亡可

能与本病关系较大。李青波等^[4]在实验中采用凋亡细胞原位末端转移酶标记(TUNEL)发现,急性 CO 中毒后大鼠海马神经元发生凋亡,凋亡神经元从染毒后第 3d 开始显著增加,第 7d 达到高峰,以后逐渐减少,直到实验期结束仍可观察到凋亡的神经元。

人们已发现哺乳动物的细胞中存在切冬酶(Caspase)家族,是凋亡过程的重要影响因素之一。活化的 Caspase 通过酶解不同的底物蛋白产生不同的生物效应:①对凋亡抑制因子进行灭活(如 CAD/ICAD);②破坏细胞结构(如板层);③通过分离蛋白

的催化及调控功能区使其获得或失去一定的功能,从而进一步调控相关的下游事件。其中参与凋亡执行的 Caspase-3 能降解多种底物,导致核纤层和细胞骨架的断裂崩解^[5-6]。有研究发现报道在脑缺血模型缺血周边区及海马等 Caspase mRNA 及其相应蛋白表达增加^[7-10]。

β -七叶皂甙钠能抑制神经细胞凋亡^[11-12]。 β -七叶皂甙钠是中药娑罗子的成熟果实提取得到的皂钠盐经冷冻干燥制造而成。 β -七叶皂甙钠能提高机体 ACTH 和可的松血浆水平;能促进血管壁增加血小板生长因子(PGF)分泌;能清除机体内自由基,有抗感染、抗渗出作用,抗水肿,提高静脉张力,加快静脉血流,促进淋巴回流,改善微循环,并有保护血管壁的作用^[13]。它还能改善迟发性脑病损伤处组织淋巴和血液循环,逆转电解质的紊乱及失调,抑制炎症反应,减少氧自由基、脂质过氧化的作用,保护脑神经细胞的亚微结构,促进神经功能恢复。 β -七叶皂甙钠对 Ca^{2+} 通道有阻断作用,对致炎物质磷酸组胺、缓激肽引起的血管通透性增高有抑制作用,并能影响细胞膜、 Na^+/K^+ -ATP 酶与离子通道,具有抑制损伤脑脊液屏障通透性作用,从而抑制神经细胞的凋亡^[14]。

本研究观察七叶皂甙钠对一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型神经细胞凋亡和 Caspase-3 表达的影响,结果显示,七叶皂甙钠组 Caspase-3 表达均明显少于对照组,七叶皂甙钠可下调 Caspase-3 的表达,抑制神经元的凋亡,中止迟发性脑病损伤,抑制炎症反应,具有神经组织保护和治疗作用。

参考文献(References)

- [1] Plantadosi CA,Zhang J,Levin ED. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat[J].Experimental Neurol,1997,147:103-114
- [2] Beere HM, Wolf BB, Cain K,et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome[J]. Nat Cell Biol,2000,22: 469-475
- [3] Calderone A, Jover T, Noh K-M, et al. Ischemic insults de-repress the gene silencer rest in neurons destined to die [J]. J Neurosci,2003, 23: 2112-2121
- [4] LI Qing Bo,CHANG Yao Ming,LI Jing Sheng ,et al.Effects of hyperbaric oxygen on expression of Bcl-2 and delayed neuronal damage following acute carbon monoxide poisoning in the brain of rats[J]. J Fourth Mil Med Univ,2003,24(11):1014-1015
- [5] Peng h, Huang Y, Duan Z,et al. Cellular [A P]regulates TRAIL-induced apoptosis in human fetal cortical neural progenitor cells[J]. Neurosci Res, 2005,82(3):295-305
- [6] Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. (2003) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity[J]. Immunol Rev 193:10-21
- [7] Wang JW, Wang DX, Wang RJ,et al. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through a caspase-3 dependent pathway in primary cultures of cortical neuronal cells of fetal mice [J]. Acta Virol, 2005, 49(1): 45-49
- [8] Tanaka H, Yokota H, Jover T,et al. Ischemic preconditioning neuronal survival in the face of caspase-3 activation [J]. Neurol Sci, 2004, 24 (11):2750-2759
- [9] Uemura K,Harada K,Sadamitsu D,et al.Apoptotic and necrotic brain lesions in a fata case of carbon monoxide poisoning [J].Forensic Sci Int,2001,116(2-3):213-219
- [10] Garnier P, Ying W, Swanson RA. (2003) Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase-1 [J]. J Neurosci 23: 7967-7973
- [11] Thom SR, Fisher D, Xue Y,et al. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide [J]. PNAS, 2000, 97 (3):1305-1310
- [12] Myron D,Ginsberg MD,Ronald E, et al. Experimental carbon monoxide encephalopathy in the primate. clinical Aspects, Neuropstholohy and physiologic Correlation[J].Arch Neurol, 1974, 30:209
- [13] CesaroneMR,Belcaro G, Ippolito E,et al. Microcirculatory efficacy of topical treatmentwith aescin+ essential phospholipids gel on transactaneousPO2in venous insufficiency[J].Angiology, 2004,55(suppl 1): S7-S10
- [14] Hu XM, Zeng FD.Protective effectsofsodium beta-aescin on ischemia-reperfusion injury in rat brain [J].Acta Pharmacol Sin,2004,39(6): 419-423
- [15] 张明显,孙芳印. HE 染色过程中分化液的改进及注意事项[J].河北医药,1995,17(5):277
Zhang Ming-xian, Sun Fang-yin. Precautions and improvement of differentiation liquid during HE staining[J]. Hebei Medical Journal, 1995, 17(5):277
- [16] 罗小平,李广民,胡维维.自动染片机在 HE 染色中的应用及与手工染色的比较[J]. 诊断病理学杂志, 2007, 14(3):179-180
Luo Xiao-ping, Li Guang-min, Hu Wei-wei. Application of automatic staining machine in HE staining and comparison with manual staining [J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2007, 14(3):179-180

(上接第 875 页)