

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.002

乌灵菌粉水提物对 MCAO 小鼠海马结构及 BDNF, GABA 水平的影响 *

舒忙巧^{1,2} 何珊珊^{1,3} 彭正午¹ 陈云春¹ 王化宁¹ 乔昱婷^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院心身科 陕西 西安 710032; 2 西安市长安医院心身科 陕西 西安 710016;

3 第四军医大学唐都医院康复医学科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨乌灵菌粉(*xylaria nigripes*, XN)水提物对脑缺血再灌注模型小鼠海马形态和高分子量神经丝蛋白(neurofilament high molecular weight, NF-H)表达以及脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和 γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的影响。**方法:**将 32 只昆明小鼠随机分为对照组(sham)、模型组(MCAO)和乌灵菌粉水提物低、高剂量组,即 XN(L)和 XN(H)。sham 组进行假手术(皮肤切开,分离颈动脉),模型组(MCAO)及乌灵菌粉组进行大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO), sham 组和 MCAO 组术后即刻腹腔注射生理盐水,乌灵菌粉组则注射不同剂量的乌灵菌粉水提物(0.3 g/kg 和 0.6 g/kg),术后 24 h,通过尼氏染色、免疫组化染色和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa)分别观察海马结构和 NF-H 的表达情况以及 BDNF 和 GABA 水平。**结果:**(1)模型组小鼠海马出现大量的空洞样改变,细胞排列不整齐, XN(H)组空洞样改变减少;(2)模型组 NF-H 染色的积分光密度显著低于对照组和 XN(H)组,差异具有统计学意义($P<0.05$);(3)Elisa 检测显示,模型组海马 BDNF 和 GABA 水平显著低于对照组和 XN(H)组,差异具有统计学意义($P<0.01$),而且模型组与 XN(L)组的 GABA 水平之间也存在显著性差异($P<0.05$)。**结论:**乌灵菌粉水提物对 MCAO 模型小鼠海马结构具有保护作用,这一作用可能与其调节 GABA 和 BDNF 水平有关。

关键词:乌灵菌粉;海马;脑保护;BDNF;GABA

中图分类号:R-33;R338;R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)13-2407-04

The Effects of Aqueous Extract from *Xylaria Nigripes* on the Morphosis and BDNF and GABA Levels in Hippocampus during Cerebral*

SHU Mang-qiao^{1,2}, HE Shan-shan^{1,3}, PENG Zheng-wu¹, CHEN Yun-chun¹, WANG Hua-ning¹, QIAO Yu-ting^{1Δ}

(1 Department of Psychiatry, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Psychiatry, Chang'an Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710016, China; 3 Department of Rehabilitation, Tangdu Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of aqueous extract from *oxylaria nigripes* (XN) on the morphosis and BDNF and GA-BA levels in hippocampus during cerebral ischemia-reperfusion in mice. **Methods:** The Kunming mice were randomly divided into 4 groups: sham, MCAO, XN (L) and XN (H) group. The mice in sham group were received fake surgery and saline, MCAO and XN groups were exposed to middle cerebral artery occlusion (MCAO), and received saline or XN (300 or 600 mg/kg) immediately after the operation. Nissl staining was performed and the expression of NF-H of hippocampus was assessed at 24 h after reperfusion. In addition, the levels of BDNF and GABA were estimated by Elisa. **Results:** (1) There were obviously cavity like change and neuronal damage in the dentate gyrus and CA1 of hippocampus in MCAO group. And this morphological change was relieved in XN (H) group. (2) The expression of NF-H in MCAO group was significantly reduced when compared with that of sham and XN (H) group ($P<0.05$). (3) The result of Elisa showed that the levels of BDNF and GABA in MCAO group was significantly lower than that of sham and XN (H) group ($P<0.01$), and there was also significant difference between MCAO and XN (L) group in the levels of BDNF and GABA ($P<0.05$). **Conclusion:** The aqueous extract from *oxylaria nigripes* could protect the cellular damage and nerve fiber in the hippocampus of mice after middle cerebral artery occlusion, and the regulation of BDNF and GABA may play a critical role in this protective effect of XN.

Key words: *Xylaria nigripes*; Hippocampus; Cerebral protection; BDNF; GABA

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R338; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2407-04

前言

乌灵菌粉是我国一种珍贵的传统菌类中药,别名乌灵参,具有益肾健脑,养心血补心神的药用价值,常用来治疗患者的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81401109,81571309);陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF005)

作者简介:舒忙巧,主治医师,主要从事精神疾病方面研究, E-mail: shumq2011@163.com

Δ 通讯作者:乔昱婷, E-mail: qiaoyuting1230@126.com

(收稿日期:2016-11-20 接受日期:2016-12-18)

失眠导致的心烦心悸以及大脑的神经功能衰弱导致的健忘等^[1]。海马是调节认知的中枢脑区之一,研究显示,中枢内海马区域对缺血环境较为敏感,短暂性脑缺血极易引起海马神经元损伤^[2],维持海马的结构和功能完整在缺血性卒中的治疗中具有重要意义^[3]。最近研究表明,乌灵菌粉水提取物具有较强的抗炎活性和抗氧化活性^[4,5]。但是乌灵菌粉水提取物对缺血性脑卒中所致海马结构损伤的保护作用及其相关机制研究还不清楚。因此,本研究建立了 MCAO 模型,观察了其对于脑缺血再灌注模型小鼠海马结构和 NF-H 表达以及 BDNF 和 GABA 释放水平的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

实验动物选择雄性清洁级昆明小鼠,由第四军医大学动物实验中心提供。体质量在 18-25g。根据随机数字表法将小鼠随机分为 4 组:对照组(sham)、模型组(MCAO)、乌灵菌粉低、高剂量组,每组 8 只。动物饲养条件为室温(23 ± 1)℃,湿度 50%-55%,12 h/12 h(8:00-20:00)明暗控制。实验已经获得第四军医大学动物研究伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

尼氏染液(碧云天公司),兔抗 NF-H 抗体(abcam 公司),荧光显微镜(奥林巴斯公司),小鼠 BDNF 和 GABA 检测试剂盒(Elabscience 公司),全波长酶标仪(Thermo 公司)。

1.3 乌灵菌粉水提物

乌灵菌粉(浙江佐力药业有限公司提供),参考 Zhao 等的方法^[6],乌灵菌粉经水提后浓缩并冷冻干燥为粉末,储存在 4℃直到使用。腹腔注射前用生理盐水溶解,低剂量为 300 mg/Kg 体重,高剂量为 600 mg/Kg 体重。

1.4 小鼠 MCAO 再灌注模型制备

将小鼠用 10%水合氯醛(1.0 g/kg)腹腔注射麻醉后,逐层分离暴露右侧颈总动脉,结扎翼外动脉和颈外动脉,将预先制备好末端圆钝的尼龙六号线经颈总动脉插入约 7-10 mm 至大脑中动脉近端,阻断大脑中动脉血供,缺血 60 min 后拔出尼龙线,形成再灌注^[7]。

1.5 冰冻切片的制备

各组小鼠用 10%水合氯醛麻醉后(n=5),打开胸腹腔,充分暴露心脏,将灌注针经左心室-主动脉插入,剪开右心耳使之形成灌注液排放通道,经 50 mL 生理盐水快速灌注冲洗,随后用 4%的多聚甲醛 PBS 液(pH=7.4)100 mL 灌注固定。灌注固定完毕后,剥离取脑,放入多聚甲醛中进行后固定 1 h 后,将脑组织置于 20%蔗糖溶液中浸泡脱水直至组织完全沉底。随后将脑组织置于冰冻切片机上,进行组织切片,厚度约为 16 μ m。待海马出现后,将切片贴在 APES 挂胶片上,隔 6 张取一张,保存于 -20℃备用。

1.6 Nissl 染色

切片晾干,经 PBS 漂洗后,按照染色说明书步骤,用尼氏染色液染色,并以乙醇分色后梯度酒精脱水,二甲苯透明并以中性树胶封片。待树胶凝固后置于显微镜下观察。

1.7 免疫组化染色

每只小鼠大脑取一套海马切片进行染色,组织切片经 PBS

漂洗后,加入兔抗 NF-H 抗体,孵育过夜,PBS 漂洗后加入免疫荧光二抗,室温孵育 3 小时,PBS 漂洗,甘油封片。荧光显微镜下观察染色结果。并以用图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0)分析计算图片积分光密度值(IOD),求平均值。

1.8 Elisa 检测

处死动物后迅速在冰上剥离大脑(n=5),分离出缺血侧海马组织,制备样品。取出 GABA 或 BDNF 检测试剂盒,复温 30 min。加入对照及样品,随后按试剂盒说明加入相应试剂,终止实验,在 450 nm 范围测吸光度(OD)值,根据标准曲线计算 GABA 或 BDNF 的含量。

1.9 统计分析

采用 SPSS19.0 进行数据统计分析,数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组之间的比较用单因素方差分析,两两数据比较前进行方差齐性检验,满足方差齐性则采用 LSD-t 检验,方差不齐则采用 Dunnett T3 检验。设 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 尼氏染色结果

模型组海马细胞排列比其他组海马更加错乱,细胞数明显减少,海马齿状回和 CA1 区的神经元明显丢失,细胞质皱缩,尼氏小体浅染,说明神经元损伤严重。XN(L)组神经元排列较 MCAO 组整齐,CA1 区神经元尼氏小体较多,着色较深,但是细胞质皱缩。XN(H)组海马虽然仍有部分缺损区域,但是整体细胞层排列较整齐,细胞膜较完整,神经元胞体较清晰。见图 1。

2.2 各组小鼠海马 NF-H 的表达情况

模型组齿状回和 CA1 的 NF-H 积分光密度均较对照组减少(255871.7 ± 382.69 vs. 431529.7 ± 2902.34 ; 106328.85 ± 689.25 vs. 1213209.3 ± 49266.85 , 均 $P < 0.01$); XN(H)组齿状回(343349.22 ± 1413.91)和 CA1 区(838589.2 ± 8244.18)NF-H 积分光密度较模型组明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$); XN(L)组 CA1 区 NF-H 积分光密度(305916.1 ± 1107.39)也较模型组增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 Elisa 检测各组海马 GABA 和 BDNF 的水平

单因素方差分析显示,各处理组海马 GABA 水平($F_{3,19}=23.57$, $P < 0.01$)和 BDNF 水平($F_{3,19}=42.05$, $P < 0.01$)之间存在显著性差异。多重比较结果显示模型组 GABA 和 BDNF 水平与对照组和 XN(H)组之间存在显著差异($P < 0.01$),而且模型组 GABA 水平与 XN(L)组之间存在也显著差异($P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

缺血性脑卒中的治疗是临床不容忽视和亟待解决的问题。研究表明,缺血性脑卒中可引起海马神经元及胶质细胞结构的变化^[8]。有效的缺血性脑卒治疗可以缓解海马结构损伤,并且促进动物模型海马的神经发生^[9],因此对海马结构和功能的保护效应可能是改善缺血性脑卒中神经功能和记忆损伤重要机制之一。

本研究通过尼氏染色和 NF-H 免疫组化观察乌灵菌粉水提物对 MCAO 所致海马神经元损伤和轴突结构的影响。尼氏染色是反应神经元结构的常规方法,NF-H 在大脑高度磷酸化,

是目前较为认可的神经元轴突损伤和退化的标记物^[10], 神经元缺失 NF-H 可致轴突转运和细胞死亡^[11], 还有研究认为外周血的 NF-H 磷酸化程度可以作为脑缺血的标记物^[12]。结果显示, 一定剂量的乌灵菌粉水提物(300 mg/kg 和 600 mg/kg)在缺血即刻干预, 可以抑制 MCAO 对海马神经元的损伤, 而且高剂量的

保护效果更为明显; 此外, 本研究还发现 MCAO 可以显著减少 NF-H 在海马的表达水平; 高剂量乌灵菌粉水提物干预后, 其海马内 NF-H 表达上调, 而且低剂量乌灵菌粉水提物干预对 CA1 区的 NF-H 的表达也有促进作用。提示乌灵菌粉对海马神经元和神经纤维具有保护作用, 而且有一定的剂量依赖性。

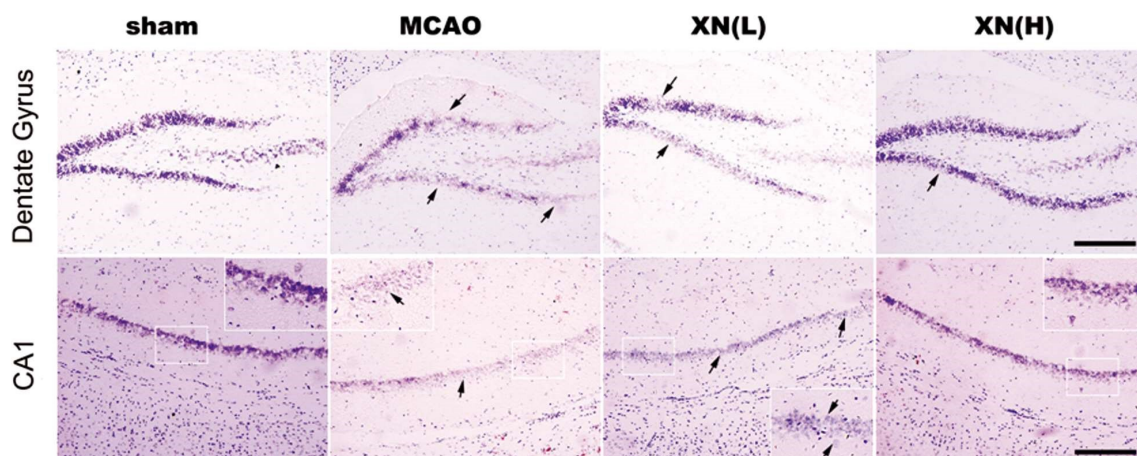


图1 各处理组海马齿状回和 CA1 区尼氏染色情况($\times 200$, 标尺 200 μm), 箭头所指为颗粒细胞排列不紧密和尼氏小体浅染的细胞

Fig.1 Nissl staining of hippocampal dentate gyrus and CA1 for each group. Bar: 200 μm . The arrow points to the cells that are not closely aligned or light stained with Nissl's body

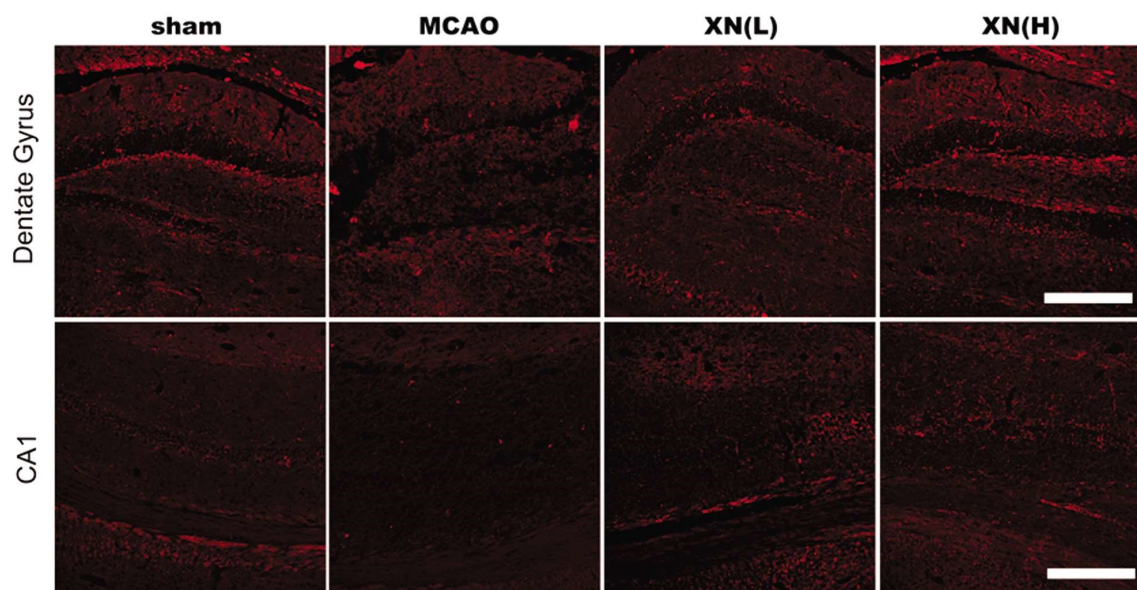


图2 各组小鼠 NF-H 在海马齿状回和 CA1 区的表达情况($\times 200$, 标尺 200 μm)

Fig.2 Representative NF-H immunofluorescence staining in the hippocampal dentate gyrus and CA1 for each group. Bar: 200 μm

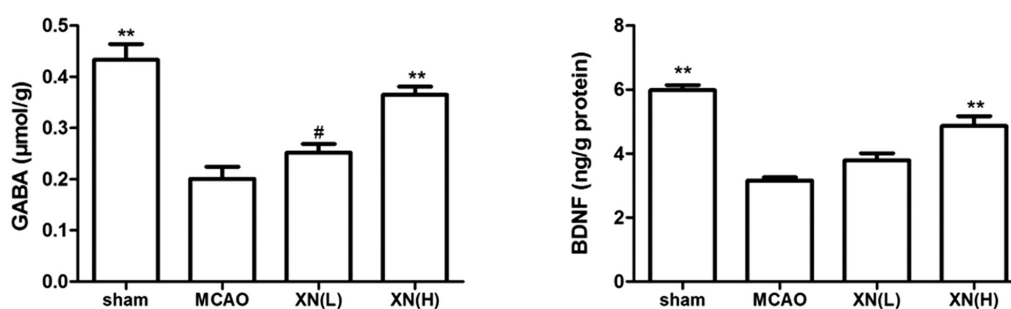


图3 各组小鼠海马 GABA 和 BDNF 水平的比较

注: **: 与 MCAO 组相比较, $P < 0.01$; #: 与 MCAO 组相比较, $P < 0.05$

Fig.3 Quantitative evaluation of GABA (left) and BDNF (right) in the ischemic hippocampus for each group

Note: ** $P < 0.01$ vs. MCAO; # $P < 0.05$ vs. MCAO.

GABA 和 BDNF 在改善脑缺血损伤和恢复机制中有重要作用,不仅可以维持神经元功能,还可以改善海马神经发生^[13,14]。而且 GABA 和 BDNF 之间存在相互调节的作用:GABA 可以促进 BDNF 的转运和表达水平^[15],BDNF 也可以促进海马 GABA 的转录活性^[16]。既往针对乌灵菌粉的生物学作用机制的研究发现,其可以提高谷氨酸脱羧酶的表达水平,而且选择性增加对 GABA 的摄取,也可以激活 GABA 受体^[17]。本研究结果显示,脑缺血可以显著降低海马 GABA 和 BDNF 的表达水平,而一定剂量的乌灵菌粉水提物则可以缓解这一现象。因此,对 GABA 和 BDNF 水平的调节可能是乌灵菌粉重要的中枢作用机制。

综上所述,本研究的结果提示乌灵菌粉水提物可以改善缺血性脑卒所致的大脑结构损伤,为乌灵菌粉治疗缺血性脑卒中提供了理论数据。但是乌灵菌粉作用的长时程研究,以及与之相关的细胞与分子机制还需要在后续的研究中进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Lin Y, Wang XY, Ye R, et al. Efficacy and safety of Wuling capsule, a single herbal formula, in Chinese subjects with insomnia: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145: 320-327
- [2] Lee J C, Tae H J, Cho G S, et al. Ischemic preconditioning protects neurons from damage and maintains the immunoreactivity of kynurenic acid in the gerbil hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1537-1544
- [3] Zhang L, Wang H, Wang T, et al. Ferulic acid ameliorates nerve injury induced by cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(3): 972-976
- [4] Ko HJ, Song A, Lai MN, et al. Immunomodulatory properties of *Xylaria nigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138: 762-768
- [5] Ko HJ, Song A, Lai MN, et al. Antioxidant and antiradical activities of Wu Ling Shen in a cell free system [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37: 815-828
- [6] Zhao Z, Li Y, Chen H, et al. *Xylaria nigripes* mitigates spatial memory impairment induced by rapid eye movement sleep deprivation [J]. *Int J Clin Exp Med*. 2014, 7(2): 356-362
- [7] Peng ZW, Wang SQ, Chen GJ, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischemic damage in mice by improving anti-oxidant and anti-inflammation activities and inhibiting apoptosis pathway [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(4): 661-673
- [8] Hermann D M, Chopp M. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(4): 369-380
- [9] Cai J, Yang M, Poremsky E, et al. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(7): 1017-1023
- [10] Shaw G, Yang C, Ellis R, et al. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(4): 1268-1277
- [11] Wong PC, Marszalek J, Crawford TO, et al. Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons[J]. *J Cell Biol*, 1995, 130(6): 1413-1422
- [12] Anderson KJ, Scheff SW, Miller KM, et al. The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(9): 1079-1085
- [13] Xu Q, Yang JW, Cao Y, et al. Acupuncture improves locomotor function by enhancing GABA receptor expression in transient focal cerebral ischemia rats[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 588: 88-94
- [14] Hang P, Sun C, Guo J, et al. BDNF-mediated Down-regulation of MicroRNA-195 Inhibits Ischemic Cardiac Apoptosis in Rats[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(8): 979-989
- [15] Fukuchi M, Kirikoshi Y, Mori A, et al. Excitatory GABA induces BDNF transcription via CRCT1 and phosphorylated CREB-related pathways in immature cortical cells [J]. *J Neurochem*, 2014, 131(2): 134-146
- [16] Colino-Oliveira M, Rombo DM, Dias RB, et al. BDNF-induced presynaptic facilitation of GABAergic transmission in the hippocampus of young adults is dependent of TrkB and adenosine A2A receptors[J]. *Purinergic Signal*, 2016, 12(2): 283-294
- [17] 马志章, 左萍萍, 陈宛如, 等. 乌灵菌粉的镇静作用及其机理研究 [J]. *中国药理学杂志*, 1999, 6(34): 14-17
- Ma Zhi-zhang, Zuo Ping-ping, Chen Wan-ru, et al. Studies on the sedative and sleeping effects of Wu ling mycelia and its pharmacological mechanism [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 1999, 6 (34): 14-17