

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.006

毛蕊异黄酮通过抑制 calpain-1 的表达发挥抗脑缺血再灌注损伤的研究 *

郭超¹ 卞涛² 卜伟¹ 马善波¹ 段佳林¹ 王艳华¹ 文爱东^{1△}

(1 空军军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032; 2 陕西省交通医院药械科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:探讨毛蕊异黄酮抗脑缺血再灌注损伤的作用是否与抑制 calpain-1 的表达有关。**方法:**将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组以及药物组,采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)模型,于缺血再灌注前 30 min 腹腔注射给予 20 mg/kg 毛蕊异黄酮或等体积的溶剂。再灌注 24 h 后,行神经功能学评分、脑梗死面积以及神经元凋亡检测;再灌注 12 h、24 h 时,采用免疫组化和蛋白印迹技术检测大鼠脑皮层 calpain-1 的表达。**结果:**与假手术组大鼠比较,MCAO 模型组大鼠再灌注 24 h 后神经功能学评分、梗死面积、神经元凋亡率及 calpain-1 的表达均明显升高($P < 0.05$),而毛蕊异黄酮能够降低模型组大鼠再灌注 24 h 后神经功能学评分、梗死面积、神经元凋亡率以及 calpain-1 的表达($P < 0.05$)。**结论:**毛蕊异黄酮可能通过抑制 calpain-1 的表达发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

关键词:毛蕊异黄酮;脑缺血;卡配因;作用机制

中图分类号:R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-631-05

Calycosin Exerts Neuroprotective Effect on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibiting Calpain-1 Expression*

GUO Chao¹, BIAN Tao², BU Wei¹, MA Shan-bo¹, DUAN Jia-lin¹, WANG Yan-hua¹, WEN Ai-dong^{1△}

(1 Department of pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Drug and Equipment, Shaanxi Traffic Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether calpain-1 was involved in the protective effect of calycosin against cerebral ischemia/reperfusion injury. **Methods:** Rats were randomly allocated to sham-operated, middle cerebral artery occlusion (MCAO) model and calycosin groups. MCAO model was made by suture-occluded method. At 30 min before ischemia/reperfusion, rats were injected intraperitoneally with 20 mg/kg calycosin and the same volume of resolver. The neurologic score, infarct area and neuronal apoptosis were measured at 24 h after ischemia/reperfusion. At 12 h and 24 h after ischemia/reperfusion, the calpain-1 protein expression of cerebral cortex were detected by immunohistochemical and western blot. **Results:** The neurologic score, infarct area, the number of TUNEL positive neurons and the level of calpain-1 of MCAO model group were obviously increased compared with those of the sham group at 24 h after reperfusion ($P < 0.05$). However, the calycosin was significantly decreased the elevation of these biological markers in MCAO model group after 24 h reperfusion ($P < 0.05$). **Conclusion:** Calycosin exerted neuroprotective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting calpain-1 expression.

Key words: Calycosin; Cerebral Ischemia; Calpain-1; Mechanism

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

Article ID: 1673-6273(2019)04-631-05

前言

缺血性脑卒中是危害人类健康的难治性疾病之一。重组组织型纤溶酶原激活物(Recombinant tissue plasminogen activator, r-tPA)是迄今为止唯一被美国 FDA 批准且用于治疗缺血性卒中的药物,但因苛刻的筛选条件和潜在的出血风险严重限制了其在临床上的应用与推广^[1]。脑缺血损伤的发病机制主要与谷氨酸兴奋性中毒^[2]、氧化应激^[3]、细胞凋亡^[4]、炎症损伤^[5,6]以及钙超载有关^[7]。当脑缺血时,脑内兴奋性物质氨基酸浓度增多,刺

激 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体,导致 Ca^{2+} 通道开放,大量 Ca^{2+} 内流造成钙超载。细胞内钙超载可激活溶解酶,损害线粒体,进一步诱导自由基的产生,导致氧化应激等一系列细胞的损伤。因此,细胞内钙超载被认为是造成细胞不可逆损伤的最终共同途径。

近年来,随着研究的不断深入,一些学者发现细胞内 Ca^{2+} 超载后,其下游钙离子依赖性蛋白酶-卡配因(calpain)也被激活。Calpain 是一种钙离子依赖性的蛋白酶,属于半胱氨酸蛋白酶中香木瓜蛋白酶的家族成员之一,细胞内一定浓度的钙离子是

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81403134)

作者简介:郭超(1985-),男,硕士,主管药师,研究方向:中药心脑血管药理,电话:029-84775471, E-mail: xysn@163.com

△ 通讯作者:文爱东,男,博士,教授,研究方向:新药研发与临床药物, E-mail: adwen_2015@sina.cn

(收稿日期:2018-06-30 接受日期:2018-07-26)

其激活的必要条件^[8]。Calpain 广泛分布于哺乳动物的各类组织中,如细胞质、质膜及其它细胞器膜等。在静息条件下,calpain 主要以无活性的酶原形式存在;当机体缺血时,大量 Ca^{2+} 聚集,calpain 被激活,随后会导致下游保护性蛋白降解,产生一系列诱导细胞凋亡的信号通路开放^[9]。本课题组前期研究已经证实黄芪中的活性单体毛蕊异黄酮具有显著的脑缺血保护作用,但其具体分子作用机制仍不清楚^[10]。毛蕊异黄酮是一种可以抑制电压和受体依赖性的钙离子通路抑制剂^[11],而 calpain 又是一种钙离子依赖性蛋白酶。因此,在前期研究基础上,本研究旨在深入探讨毛蕊异黄酮对脑缺血损伤的保护作用机制是否与抑制 calpain 的活化和过表达有关。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

毛蕊异黄酮(分子量:284.26,CAS:20575-57-9,纯度>99%)购于成都维克奇生物科技有限公司;10%水合氯醛购于空军军医大学(第四军医大学)唐都医院;三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride,TTC,50g)和二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide,DMSO,药用级)均购于美国 Sigma 公司;兔抗大鼠 calpain-1(ab108400)和 β -tubulin(ab6046)抗体均购于美国 Abcam 公司;蛋白提取和定量试剂盒、TUNEL 凋亡检测试剂盒等购于江苏南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物及分组

成年健康 SD 大鼠(雄性)60 只,体质量 200~250 g,购于空军军医大学实验动物中心[合格证编号:SCXK(军)字第 2007-007 号]。实验前,将大鼠随机分为假手术组(sham)、模型组(MCAO)和药物组(calycosin),再灌注实验开始前 30 min 分别于大鼠腹腔内注射 20 mg/kg 剂量的毛蕊异黄酮或等体积溶媒,待再灌注 24 h 后,进行神经功能评分、并检测脑梗死面积及细胞凋亡情况,通过免疫组化和蛋白印记技术观察缺血再灌注 12、24 小时 calpain-1 的表达。

1.3 模型建立

实验大鼠在术前禁食 8~12 h,期间可以自由饮水,参照 Yu 等人^[12]的改良方法经颈内动脉尼龙线线栓法制备大鼠的 MCAO 模型。大鼠称重之后,于腹腔内注射 10%的水合氯醛(3 mL/kg),并且将其仰卧位固定,依次钝性分离出大鼠的颈总动脉和颈内动脉,用小剪刀在大鼠颈总动脉分叉处剪小口,将无菌级别的尼龙线(购于北京西浓科技有限公司,2636-A5 级)从颈总动脉缓慢插入颈内动脉内约 17~18 mm,当感觉有轻微阻力时立即停止;缺血 2 h 后,将尼龙线轻轻拔出,使脑血流恢复即实现再灌注。假手术组大鼠除不将线栓插入颈内动脉外,其余操作过程相同。为验证造模成功与否,使用激光多普勒血流仪(瑞典 Perimed AB,PeriFluxPF5000)监测大鼠术前、术中以及术后的脑血流变化情况,并以术前脑血流为参照值,当插入线栓后脑血流减少 80%以上、再灌注后脑血流恢复 70%以上则认为造模成功,将造模不成功的大鼠剔除掉^[13]。

1.4 神经功能评分

造模成功的大鼠放入笼内,环境温度保持(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 。再灌注 24 h 后,由另一观察者评估并且记录神经功能缺陷分数。评分标准参考 Ge 等人^[14]改良的评分标准:无运动功能障碍记 0

分;不能伸展左前肢记 1 分;向左侧旋转记 2 分;向左侧倾倒记 3 分;无自主活动并伴有意识障碍记 4 分。

1.5 脑梗死面积评估

实验大鼠进行神经功能评分之后,用水合氯醛麻醉,用快速断头法处死实验大鼠,取出脑,用冰生理盐水冲洗,然后将其切成冠状切片(厚度约 2 mm),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用 2%的 TTC 染色 5~10 min 后,将其置于 4%的多聚甲醛中固定 8-12 h,按序摆好脑片并用数码相机(日本 SONY,DSC-W520)拍照,最后使用 Photoshop CS 软件计算脑梗死面积。为了消除因水肿造成脑梗死面积大于实际值的影响,可用相对脑梗死面积计算公式校正:相对脑梗死面积=[对侧脑半球面积-(缺血脑半球面积-梗死面积)/对侧脑半球面积] $\times 100\%$ 。

1.6 神经元凋亡评估

麻醉实验大鼠、开胸、游离出心脏,由左心室插入灌流针,切开右心耳,快速灌入生理盐水将血液冲洗干净,缓慢注入约 400 mL 4%的多聚甲醛。断头取脑之后,用多聚甲醛浸泡、固定 24 h,用石蜡包埋,在脑门前各 3 mm 的区域做连续冠状切片(厚度约 5 μm),用二甲苯脱蜡、蛋白酶 K 处理、PBS 洗涤干净,加入荧光标记的 TUNEL 检测液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 液体条件下孵育 1 h,再用抗荧光淬灭封片液封片。在显微镜(IX71,奥林巴斯,日本)下选取皮层同一位置,观察并计数阳性细胞的数量。

1.7 calpain-1 免疫染色

先用 1.6 的方法处理组织样本,再将 5 μm 的石蜡切片脱蜡和抗原修复,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中用 10%的胎牛血清封闭 30 min,然后再加入 anti-Calpain-1(1:500)抗体,置于孵育箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用 PBS 缓冲液冲洗干净后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温条件下孵育 45 min,再用 PBS 缓冲液冲洗干净,然后滴加 DAB 显色液,在显微镜下控制显色时间,用自来水冲洗以终止显色,苏木素复染并脱水封片,将其置于荧光显微镜下(IX71,奥林巴斯,日本)观察。

1.8 calpain-1 蛋白表达

将实验大鼠先断头后取脑,在冰上迅速分离皮层组织,用常规法提取皮层组织蛋白,并测定蛋白含量(BCA 蛋白定量试剂盒),分装后放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。取等量的蛋白(30 μg),SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、PBS 缓冲液冲洗,先加入一抗(anti-calpain-1, β -tubulin)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,再加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育约 2 h,用化学发光 ECL 试剂显影,X 线曝光,显影定影后再扫描,应用 Quantity One 图像分析软件分析电泳和蛋白条带的灰度值,经各组与 β -tubulin 灰度比值表示蛋白的相对表达量。

1.9 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件分析,神经功能学数据用中位数表示,其他实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较可采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛蕊异黄酮改善 MCAO 模型大鼠神经功能学评分

与假手术组大鼠相比,MCAO 模型组大鼠神经功能学评分明显升高($P < 0.05$);与模型组大鼠相比,给予毛蕊异黄酮治疗的大鼠神经功能学评分明显降低($P < 0.05$),见图 1。

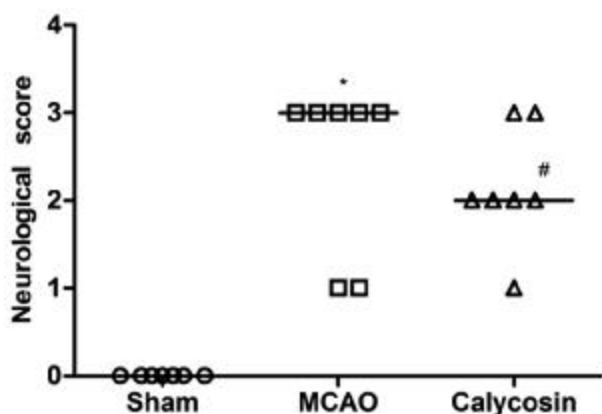


图1 毛蕊异黄酮对 MCAO 大鼠神经功能学评分的影响

Fig.1 Effect of calycosin on the neurologic score of MCAO rats

Note: Data were expressed as median, $n=7$. * $P<0.01$, compared with sham group; # $P<0.05$, compared with MCAO group.

2.2 毛蕊异黄酮减少 MCAO 模型大鼠脑梗死面积

MCAO 模型组大鼠脑梗死面积明显高于假手术组($P<0.05$),

而给予毛蕊异黄酮治疗的 MCAO 大鼠脑梗死面积较 MCAO 大鼠明显减少($P<0.05$),见图 2。

2.3 毛蕊异黄酮减少 MCAO 模型大鼠神经元凋亡

与假手术组大鼠相比, MCAO 模型组大鼠脑皮层神经元凋亡率显著升高 ($P<0.05$), 而给予毛蕊异黄酮治疗的 MCAO 大鼠神经元凋亡率较 MCAO 模型组大鼠明显降低 ($P<0.05$), 见图 3。

2.4 毛蕊异黄酮抑制 MCAO 大鼠脑皮层组织 calpain-1 的表达

与假手术组大鼠比较, 模型组大鼠再灌注 12 h、24 h 后脑皮层组织的 calpain-1 表达均显著升高($P<0.05$), 而毛蕊异黄酮治疗组大鼠脑皮层组织的 calpain-1 的表达均较模型组下降, 两组在再灌注 24 h 时差异具有统计学意义($P<0.05$), 见图 4A、4B。如图 4C-D 所示, 假手术组大鼠脑皮层仅可见到少量 calpain-1 阳性细胞, 而模型组大鼠再灌注 12 h、24 h 时, 其脑皮层可观察到大量的 calpain-1 阳性细胞; 给予毛蕊异黄酮的药物治疗组大鼠 calpain-1 阳性细胞的表达量显著减少。

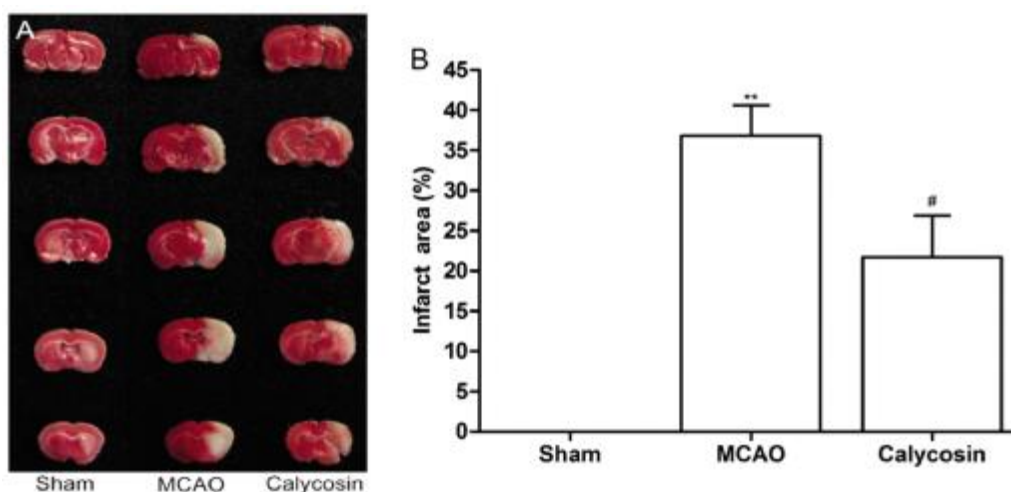


图2 毛蕊异黄酮对 MCAO 模型大鼠脑梗死面积的影响

Fig.2 Effect of calycosin on the Cerebral infarction area of MCAO rats

A: Representative TTC staining of the cerebral infarct in each group. B: Statistical analysis of the percentage of infarct area in each group.

Note: Data were expressed as mean $\pm$ S.D, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with group sham; # $P<0.05$, compared with group MCAO.

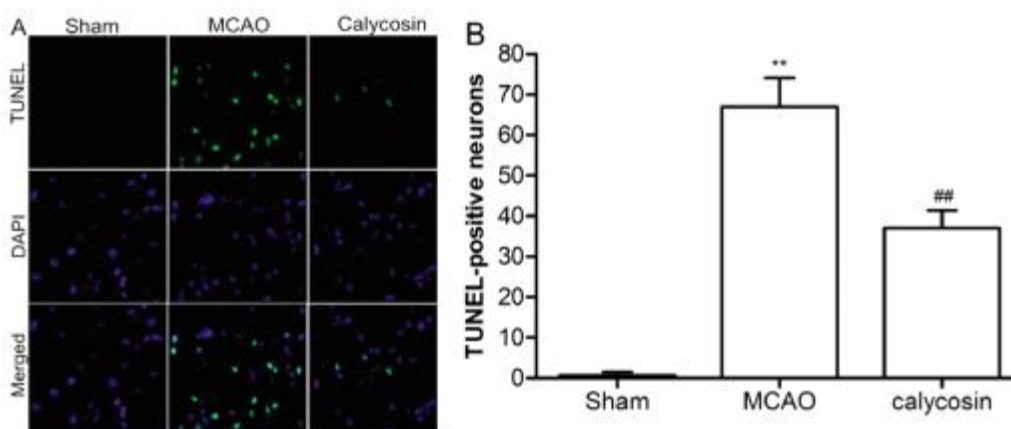


图3 毛蕊异黄酮对 MCAO 模型大鼠脑神经元凋亡的影响

Fig. 3 Effect of calycosin on the apoptosis of Cerebral neurous of MCAO rats. A: Representative images of TUNEL staining; DAPI stain was used to label the nucleus. B: Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive neurons in each group

Note: Data were expressed as mean $\pm$ S.D, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with sham group; ## $P<0.01$, compared with MCAO group.

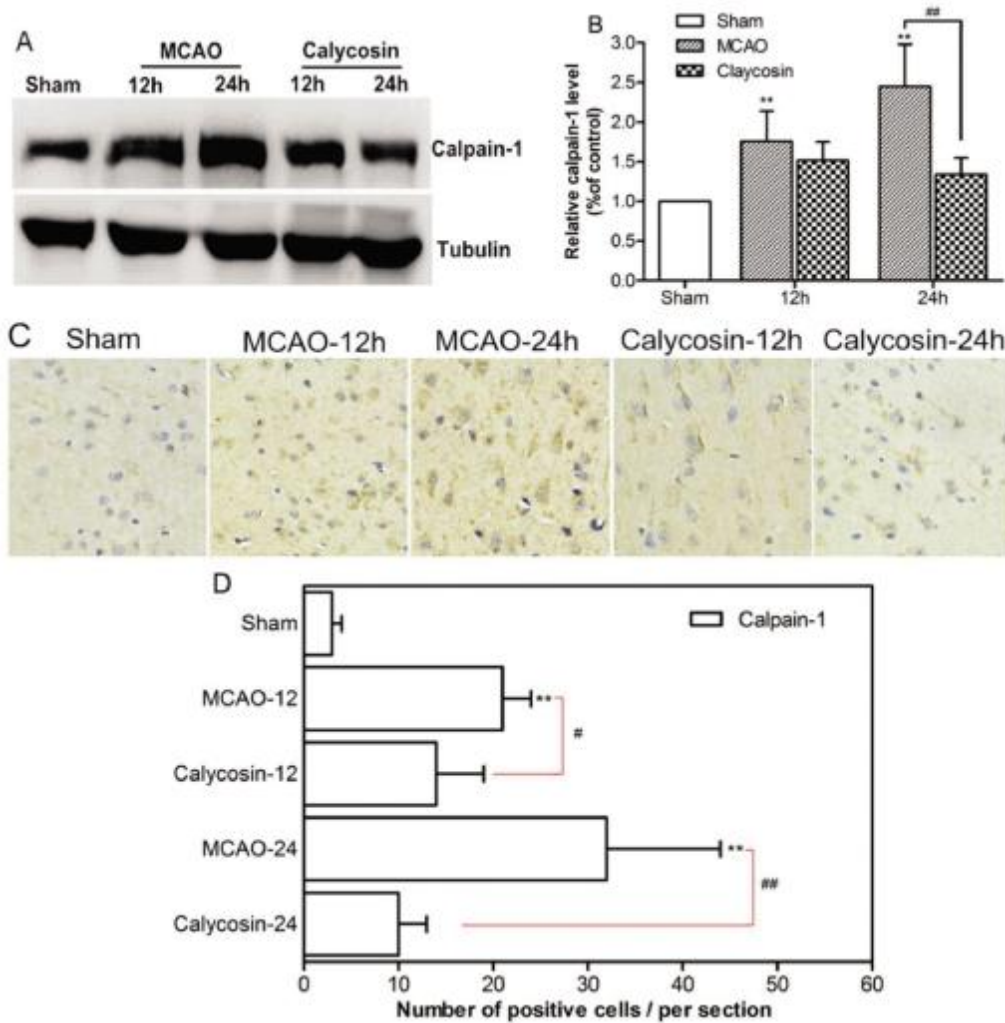


图4 各组大鼠脑皮层 calpain-1 的蛋白印迹和免疫组化结果

Fig.4 Calpain-1 expression from the ischemic cortex in rats from different groups was detected by western blot and immunohistochemical analysis.

A: Representative western blot bands of calpain-1 and β -tubulin; B: The quantification analysis of the expression levels of calpain-1; C: Representative sections of calpain-1 immunohistochemical staining in each group; D: Quantitative analysis of the number of positive immune cells.

Note: Data were expressed as mean $\pm$ S.D, n=6. **P<0.01, compared with sham group; #P<0.05, ##P<0.01 compared with MCAO group.

3 讨论

脑卒中的病理生理过程涉及多种细胞毒性级联过程。研究表明 calpain 在缺血性脑卒中的发生发展过程中起着至关重要的作用,已成为近年来缺血性脑卒中发病机制研究的热点之一。Calpain 是一种钙离子依赖性蛋白酶,属于半胱氨酸蛋白酶超家族中番木瓜蛋白酶的家族成员,可以分为两种亚型: calpain-1 (μ -calpain) 和 calpain-2 (m-calpain)。两种形式的 calpain 均广泛分布于中枢神经系统,但其存在于不同的神经细胞。Calpain-1 的分布比较广泛,比如树突、胞体和轴突等;而 Calpain-2 主要分布于胶质细胞。研究表明激活两种类型的 calpain 所需的 Ca^{2+} 浓度也不相同^[5],激活 calpain-1 需要微摩尔浓度的钙离子,而激活 calpain-2 则需要毫摩尔浓度的钙离子。在正常生理状态,calpain 以酶原的形式存在于神经细胞质中;当脑缺血发生后,胞内大量堆集的 Ca^{2+} 可与 calpain 催化区的特异性钙调蛋白样位点结合从而导致构象改变并使其激活,活化后的 calpain 可水解细胞骨架蛋白并诱导细胞死亡^[6]。Chen 等^[7]研究证实 calpain 的激活与胞内 Ca^{2+} 浓度的增加有

关。Neumar 等人^[8]通过建立短暂性大鼠前脑缺血模型,并分析缺血损伤后 calpain 的表达位置和表达时间,结果表明再灌注 1 h 时 calpain 被激活,再灌注 24 h 和 48 h 时 calpain 的活化从纹状体背侧然后到腹侧,最后再到海马 CA1 区。再灌注 1 h 和 36 h 时出现 calpain 介导的 α 导血影蛋白降解高峰。王宇卉等人^[9]研究也发现脑缺血损伤后,再灌注 1 h 后即出现 calpain 的活化,并在 24 h 及 48 h 点到最高峰,且 48 h calpain 活化更为明显。江克文等人^[20]研究了新生实验大鼠脑缺血后 calpain 的表达情况,发现 calpain 在海马中的表达最为明显,皮层的 calpain 表达水平在 24 h 达到高峰,海马的 calpain 表达水平在 12 h 就已经达峰值。这些研究都证实了 calpain 活化是脑缺血损伤的重要环节。

黄芪中的毛蕊异黄酮已被报道可能通过抗氧化、抗凋亡、抗炎以及自噬作用发挥抗脑缺血/再灌注损伤保护作用。此外,研究也证实毛蕊异黄酮可保护血脑屏障完整性而发挥脑缺血/再灌注损伤保护作用。然而揭示毛蕊异黄酮抗脑缺血/再灌注损伤的作用机制与钙超载诱导的 calpain 活化有关尚未有报道,在本研究中,我们发现缺血再灌注 12 h 实验大鼠脑皮层

的calpain-1的表达迅速升高,于24 h后达到相对峰值;而毛蕊异黄酮可以降低 calpain-1在缺血再灌注损伤后12 h、24 h的表达,这些结果提示毛蕊异黄酮抗缺血损伤作用可能与抑制 calpain-1的表达有关,这一新发现为毛蕊异黄酮作用机理深入研究提供了基础实验依据。

参考文献(References)

- [1] Guo C, Wang SQ, Duan JL, et al. Protocatechualdehyde Protects Against Cerebral Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Injury Via Protein Kinase C ϵ /Nrf2/HO-1 Pathway [J]. Neurobiol, 2017, 54(2): 833-845
- [2] Que J, Ye M, Zhang Y, et al. Bryonolic Acid, a Triterpenoid, Protect Against N-methyl-d-Aspartate-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells [J]. Molecules, 2016, 21(4): 418
- [3] Lou J, Cao G, Li R, et al. β -Caryophyllene Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats [J]. Neurochem Res, 2016, 41(6): 1291-1304
- [4] Gong L, Tang Y, An R, et al. RTN1-C mediates cerebral ischemia/reperfusion injury via ER stress and mitochondria-associated apoptosis pathways [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3080
- [5] Wang P, He Y, Li D, et al. Class I PI3K inhibitor ZSTK474 mediates a shift in microglial/macrophage phenotype and inhibits inflammatory response in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 192
- [6] Ai J, Wan H, Shu M, et al. Guhong injection protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury via anti-inflammatory effects in rats[J]. Arch Pharm Res, 2017, 40(5): 610-622
- [7] Huang L, Wang C, Ge R, et al. Ischemia deteriorates spike encoding at cortical GABAergic neurons and cerebellar Purkinje cells by increasing the intracellular Ca^{2+} [J]. Brain Res Bull, 2017, 131: 55-61
- [8] Mahmood Q, Wang G F, Wu G, et al. Salvianolic acid A inhibits calpain activation and eNOS uncoupling during focal cerebral ischemia in mice[J]. Phytomedicine, 2017, 25: 8-14
- [9] Que J, Ye M, Zhang Y, et al. Bryonolic Acid, a Triterpenoid, Protect Against N-methyl-d-Aspartate-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells [J]. Molecules, 2016, 21(4): 418
- [10] Guo C, Tong L, Xi MM. et al. Neuroprotective effect of calycosin on cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(3): 768-774
- [11] Wu XL, Wang YY, Cheng J, et al. Calcium channel blocking activity of calycosin, a major active component of Astragali Radix, on rat aorta [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(8): 1007-1012
- [12] Yu X, Peng Y, Liang H, et al. TSLP/TSLPR promote angiogenesis following ischemic stroke via activation of the PI3K/AKT pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 3411-3417
- [13] 徐芳琴, 郭超, 卞涛, 等. 丹红注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤治疗时间窗的影响[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1887-1892
- [14] Ge X H, Zhu G J, Geng D Q, et al. Metformin protects the brain against ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt1/JNK3 signaling pathways in rats[J]. Physiol Behav, 2017, 170: 115-123
- [15] Etehad M S, Azami T A, Vahidinia Z, et al. Neuroprotective Effects of Oxytocin Hormone after an Experimental Stroke Model and the Possible Role of Calpain-1 [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(3): 724-732
- [16] Vahidinia Z, Alipour N, Atlasi M A, et al. Gonadal steroids block the calpain-1-dependent intrinsic pathway of apoptosis in an experimental rat stroke model[J]. Neurol Res, 2017, 39(1): 54-64
- [17] Chen X, Zhang X, Kubo H, et al. Ca^{2+} influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes[J]. Circ Res, 2005, 97(10): 1009-1017
- [18] Neumar RW, Meng FH, Mills AM, et al. Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia[J]. Exp Neurol, 2001, 170(1): 27-35
- [19] 王宇卉, 夏春林, 强华, 等. 大鼠短暂局灶性大鼠中动脉缺血后 calpain 的表达[J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19(3): 151-160
- [20] 江克文, 杨翠微, 水泉祥, 等. 新生大鼠缺血缺氧脑损伤后 μ -calpain 活化及其他相关因子表达的过程及意义 [J]. 中国儿科杂志, 2004, 42 (6): 441-445