

本文引用:陈媛,吴海金,黄晓松,罗银利,王艳,谭李红.葛根素对脑缺血再灌注大鼠海马组织 P-STAT3、P53 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):36-39.

葛根素对脑缺血再灌注大鼠海马组织 P-STAT3、P53 表达的影响

陈媛¹,吴海金¹,黄晓松²,罗银利²,王艳²,谭李红^{3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省第二人民医院,湖南长沙 410007;3.湖南省儿童医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 探讨葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤后海马组织磷酸化的转录激活蛋白 3(STAT3)、凋亡因子 P53 表达的影响及其保护机制。**方法** 采用线栓法制备大鼠左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,利用葛根素干预,分别于缺血 2 h 再灌注 6 h、24 h、72 h 3 个不同时间点采用 Longa 评分法进行神经功能缺损评分、TUNEL 法检测凋亡细胞数,免疫组织化学法检测海马组织磷酸化的 STAT3(P-STAT3)及细胞凋亡因子 P53 的表达。**结果** 与假手术组比较,葛根素组与缺血再灌注组的神经功能缺损加重,凋亡细胞数增多,P-STAT3 和 P53 表达增高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与缺血再灌注组比较,葛根素组神经功能缺损评分明显下降,凋亡阳性细胞数均见明显减少,P-STAT3 和 P53 表达显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 脑缺血再灌注损伤后 STAT3 被异常激活,其磷酸化水平显著增高;葛根素可能是通过抑制 STAT3 的磷酸化水平,降低 P53 的表达起到抗神经细胞凋亡作用,从而改善大鼠脑组织的缺血性损伤。

[关键词] 葛根素;脑缺血再灌注损伤;转录激活蛋白 3;P53;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5;R743.3

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.01.009

Effects of Puerarin on the Expression of P-STAT3 and P53 in Hippocampus Tissue of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Model Rats

CHEN Yuan¹, WU Haijin¹, HUANG Xiaosong², LUO Yinli², WANG Yan², TAN Lihong^{3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of puerarin on the expression of phosphorylated transcription activator protein three (STAT3) and apoptosis factor P53 in the hippocampus tissue of cerebral ischemia reperfusion injury rats and to investigate its mechanism. **Methods** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of left cerebra in rats were prepared by using suture method. The rats were given puerarin to intervene at 6 h, 24 h, 72 h for reperfusion after ischemia for 2 h. The neurologic impairment score was evaluated by Longa scoring, apoptotic cells number was detected by TUNEL method, and the expression of STAT3 (P-STAT3) and apoptosis factor P53 in hippocampal tissue was detected by immunohistochemistry method. **Results** Compared with the sham-operation group, neurological impairment in puerarin group and cerebral ischemia-reperfusion group was more serious, the apoptosis numbers of hippocampus nerve cells and the expression levels of P-STAT3 and P53 increased significantly, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with cerebral ischemia-reperfusion group, the neurological impairment score, the apoptosis number of hippocampus nerve cells and the expression lev-

[收稿日期] 2016-07-17

[基金项目] 湖南省教育厅研究生创新课题(CX2015B338);湖南省中医药管理局一般项目(201653)。

[作者简介] 陈媛,女,在读硕士研究生,医师,研究方向:脑血管疾病。

[通讯作者] * 谭李红,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:tanlihong118@163.com。

els of P-STAT3 and P53 decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** STAT3 was activated abnormally after cerebral ischemic reperfusion injury, showing a significant increase in phosphorylation level. Puerarin could improve brain tissue damage, reduce the expression level of P53 and P-STAT3, and play a protective role in anti-apoptosis.

[**Keywords**] puerarin; cerebral ischemia reperfusion injury; transcription activator protein 3; P53; cell apoptosis

缺血性脑卒中常急性发病,临床上通过及时开通闭塞血管,可以促进缺血区血液供应,但随之继发的脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)严重影响患者的治疗进程与预后。脑缺血时,缺血半暗带的细胞损伤主要以细胞凋亡途径进行。CIRI 病理机制较为复杂,尚缺乏明确有效的临床治疗方法,因此进一步研究 CIRI 发病机制以及寻求抗凋亡的药物具有重大的临床意义。随着中医药的发展以及中药本身具有的高效、低毒等特性,防治脑缺血再灌注损伤逐步转入中医药方向。既往研究表明了葛根素(Puerarin, Pue)通过神经系统具有保护作用^[1]。转录激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)参与了 CIRI 的过程,但其异常激活后的作用一直存在争议。本研究通过建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,研究 STAT3 及凋亡因子 P53 在 CIRI 异常激活后的作用,进一步证实葛根素抗凋亡的神经保护作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康 SD 雄性大鼠 65 只,体质量(230±20) g,日龄 55~65 日,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2011-0003,质量合格证:43004700021531],饲养于湖南中医药大学动物实验中心[许可编号:SYXK(湘)2013-0005],标准饲料适应性喂养,自由饮水一周。

1.1.2 实验试剂 葛根素购自上海源叶生物有限公司(批号:B20446),质量分数≥98%;生理盐水购自湖南科伦制药有限公司(批号:2A16030602);TUNEL 凋亡试剂盒购自武汉博士德公司(编号:MK1023);兔抗鼠 P-STAT3 I 抗购自武汉博士德公司(批号:BAO621);兔抗鼠 P53 I 抗购自武汉博士德公司(批号:BAO521);通用型二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(批号:K152318A)。

1.2 方 法

1.2.1 模型的制备与干预 缺血再灌注组及葛根素组采用线栓法^[2]制备大鼠左侧 MACO 模型,假手术组只分离血管,不插鱼线,术中严格控制室温为 23~25 ℃,大鼠术后分笼饲养,自由饮水和进食。MACO 造模过程大致如下:大鼠于术前禁食 12 h,但自由饮水,称重后,腹腔注射 10%水合氯醛溶液(3.5 mL/kg)麻醉,颈部常规备皮消毒。取颈正中切口

逐层切开,显露胸锁乳突肌,延胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,深部分离暴露颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA),结扎 ECA 及 CCA 近心端,不剪断 CCA,不结扎翼腭动脉,以动脉夹夹闭 ICA;用眼科剪于离 CCA 分叉口近心端剪一小口,导入栓线,松开 ICA 动脉夹,将鱼线从 CCA 插入 ICA,遇到阻力停止,此时长度约 20 mm,用缝合线系住栓线,确认无活动性出血后缝合皮肤,术后 2 h 再拔出栓线。大鼠一般术后(或缺血)2 h 已清醒。葛根素临用前取出溶于生理盐水,配成 5 mg/mL 浓度,其中葛根素组分别于缺血前 30 min 和缺血 2 h 按体质量 100 mg/kg 灌胃共 2 次,缺血再灌注组于相同时间点灌胃等量的生理盐水,假手术组分别于血管分离术前 30 min 和分离术后 2 h 予以等容量生理盐水灌胃。

1.2.2 实验分组 选取实验动物 66 只,将其中 54 只按随机数字表法分为假手术组、缺血再灌注组和葛根素组各 18 只,分别按照“1.2.1”方法进行造模(注:造模过程被剔除的按照随机原则补足),每组分再灌注 6 h、24 h、72 h 三个时间点各 6 只。其中假手术组无死亡, MCAO 模型成功率约 85%。

1.2.3 实验取材 每组 18 只大鼠在相应观察的时间点进行神经功能缺损评分后,采用 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,打开大鼠胸腔,从左心室用灌流针插入升主动脉并用动脉夹固定,在右心耳剪一小口放血,注入生理盐水约 200 mL 后从右心耳流出的液体变清亮后,缓慢注入 4%多聚甲醛灌流,待肝脏变硬后,断头取脑,用直镊从大脑基底部剥取大脑,除去嗅脑、小脑和脑干,剩余脑组织放入 4%多聚甲醛液中固定 24 h 后,自前向后取每张切片包含海马的冠状位切面,脱水、透明、浸蜡、包埋后做成 3 μm 的连续冠状石蜡切片,用于 TUNEL 法及免疫组织化学法。

1.2.4 神经功能缺损评分 在相应观察时间点对大鼠进行神经功能缺损评分,采用 Longa^[3]5 分法,0 分:正常活动,无缺损症状;1 分:对侧前肢屈曲、不能伸直、同侧霍纳征;2 分:爬行时向外侧转圈;3 分:行走时向对侧倾倒,站立不稳;4 分:意识障碍,不能自发行走。评分采用双盲法,观察者不知实验分组情况,1~3 分纳入实验,0 分、4 分则予以剔除。符合评分但有蛛网膜下腔出血(SAH)、未到观察时间点死亡的都予以剔除,按随机原则补足。

1.2.5 凋亡细胞数测定 采用 TUNEL 法,具体操作按试剂盒说明书进行测定。每张切片在 400 倍视

野下随机选海马组织 5 个不重叠视野,胞核中出现棕黄色颗粒者为凋亡细胞,计算凋亡阳性细胞数。

1.2.6 P-STAT3 和 P53 的表达 采用免疫组织化学法,具体操作严格按照试剂盒说明书进行,切片置 400 倍显微镜下选取缺血侧海马组织 5 个不重叠视野观察,其中 P-STAT3 蛋白阳性细胞是以细胞核染为棕褐色或有棕褐色颗粒沉积者,P53 以细胞质染成棕黄色为阳性细胞。采用 Motic 6.0 数码医学图像分析系统对阳性细胞表达面积及平均光密度值 (average optical density,AOD)进行测定。值越大表示 P-STAT3 和 P53 表达越强。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。组间差异比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA)分析,P-STAT3 和 P53 平均光密度值、凋亡细胞数符合正态性分布及方差齐性检验,采用三组间两两比较的 LSD 检验法,大鼠神经功能缺损评分不符合正态性分布及方差齐性检验,采用 Mann-Whitney U 检验,均以 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经功能缺损评分

假手术组大鼠苏醒后活动正常,各观察时间点均无神经功能缺失。与假手术组比较,各时间点缺血再灌注组神经功能缺损程度明显加重,具有统计学意义 ($P<0.05$),各时间点葛根素组与缺血再灌注组相比较,神经功能缺损评分明显减少,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。组内各个时间点之间比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠各时间点神经功能缺损评分的比较

($\bar{x}\pm s, n=6, 分$)

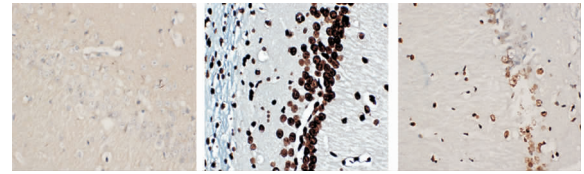
组别	6 h(8 h)	24 h(26 h)	72 h(74 h)
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
缺血再灌注组	2.17±0.75*	2.50±0.55*	2.33±0.52*
葛根素组	1.17±0.41 [△]	1.50±0.55 [△]	1.33±0.52 [△]
Z	-2.272	-2.345	-2.447
P	0.023	0.019	0.014

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与缺血再灌注组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.2 各组凋亡细胞数

凋亡阳性细胞主要是细胞核染成棕褐色,假手术组各时间点海马组织偶见少量凋亡细胞。缺血再灌注组海马组织可见大量凋亡细胞,葛根素组与缺血再灌注组比较,凋亡细胞数减少,具有统计学意义 ($P<0.05$);且缺血再灌注组与葛根素组随着脑缺血再灌注时间的延长,凋亡细胞数增加,6 h 见少量凋

亡细胞,24 h 达高峰,72 h 逐渐下降,但高于 6 h,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 1,表 2。



注:A.假手术组;B.缺血再灌注组;C.葛根素组

图 1 各组大鼠 24 h 海马组织凋亡细胞情况 (TUNEL 法,×400)

表 2 3 组大鼠各时间点海马组织凋亡细胞数的比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	6 h(8 h)	24 h(26 h)	72 h(74 h)
假手术组	10.33±1.03	12.83±2.79	11.17±1.94
缺血再灌注组	41.83±3.54*	102.33±7.58*	85.50±4.51*
葛根素组	25.33±3.56 ^{△△}	59.67±5.61 ^{△△}	39.83±3.06 ^{△△}
F	207.3	373.0	756.7
P	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与缺血再灌注组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.3 各组 P-STAT3、P53 表达水平

P-STAT3 阳性细胞是以细胞核染为棕褐色或有棕褐色颗粒沉积者,P53 以细胞质染成棕黄色为阳性细胞。假手术组海马组织各时间点均可见少量 P-STAT3、P53 阳性表达,缺血再灌注组与葛根素组 P-STAT3、P53 的 AOD 值均显著增高,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);其中缺血再灌注组与葛根素组 P-STAT3、P53 的 AOD 值在 6 h 增加,24 h 达高峰,72 h 表达下调,但高于 6 h,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 3、表 4。

表 3 3 组大鼠各时间点海马组织 P-STAT3 的 AOD 值比较

($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	6 h(8 h)	24 h(26 h)	72 h(74 h)
假手术组	0.070 0±0.017 9	0.1317±0.0279	0.1083±0.0147
缺血再灌注组	0.190 0±0.017 9 ^{△△}	0.5983±0.0893 ^{△△}	0.3867±0.0423 ^{△△}
葛根素组	0.096 7±0.021 6 ^{**}	0.2500±0.0420 ^{**}	0.2083±0.0223 ^{**}
F	64.58	100.8	114.5
P	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与缺血再灌注组比较,** $P<0.01$ 。

表 4 3 组大鼠各时间点海马组织 P53 的 AOD 值比较

组别	6 h(8 h)	24 h(26 h)	72 h(74 h)
假手术组	0.048 3±0.021 4	0.191 7±0.074 1	0.140 0±0.030 3
缺血再灌注组	0.160 0±0.023 7 ^{△△}	0.433 3±0.058 2 ^{△△}	0.338 3±0.037 1 ^{△△}
葛根素组	0.093 3±0.031 4 ^{**}	0.273 3±0.043 7 ^{**}	0.175 0±0.032 7 ^{**}
F	28.36	25.21	59.92
P	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与缺血再灌注组比较,** $P<0.01$ 。

3 讨论

葛根素是中药葛根的主要成分,具有脑保护、心血管保护、抗炎、抗血小板聚集等药理活性^[4-5]。已有研究表明葛根素主要是通过抑制细胞凋亡、抑制炎症反应、减轻兴奋性氨基酸释放、抑制氧化反应、拮抗 Ca^{2+} 超载、减轻脑水肿等多种机制发挥脑保护作用^[6-13]。CIRI 过程中周围缺血半暗带的细胞损伤主要通过细胞凋亡途径进行,凋亡可能决定最终梗死体积,决定了预后及转归。有文献总结了脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡,主要是氯自由基的产生,钙超载以及线粒体损伤三种机制,且不论单味中药还是复方都对神经元起到抗细胞凋亡的保护作用^[14]。P53 作为转录因子通过调节多种基因的转录参与诱导细胞凋亡,与细胞凋亡有密切的关系。不少实验研究显示^[15-17]P53 的表达水平升高能促进脑缺血后的神经元细胞凋亡,干预 P53 的表达可有效地维持神经元的生存能力,起到神经保护作用。本研究显示葛根素能够下调 P53 表达,与文献报道相一致^[17],这进一步证实了葛根素抗凋亡的神经保护作用。

JAK-STAT 信号途径与脑缺血再灌注密切相关^[8],STATs 是该信号途径中 JAKs 的下游底物,STAT3 蛋白是其中重要成员之一,广泛分布于神经系统。STATs 在外界信号分子刺激下与特定受体结合,形成受体复合物在胞浆域结合 JAKs 后发生自身磷酸化被激活,直接转入细胞核内与靶基因调控区的 DNA 结合,调节特定基因的转录与表达^[19]。STAT3 活化后是以磷酸化水平存在,其在 CIRI 过程所起的作用一直存在争议:有文献报道在脑缺血后 STAT3 明显活化,并参与了 CIRI 的发生^[20],在 CIRI 中起到了破坏作用^[21];而有些研究则指出 STAT3 的激活可以阻止细胞凋亡,对 CIRI 起到神经保护作用^[22-24]。本实验则客观地评价了 CIRI 后磷酸化 STAT3 水平的变化,实验发现 STAT3 在 CIRI 后被异常激活,参与了损伤的发生,并且以高表达的磷酸化水平存在;葛根素能够减少凋亡细胞数,降低 MACO 大鼠的神经功能缺损评分,其机制之一可能是通过抑制 P-STAT3 和凋亡因子 P53 的表达,从而起到保护作用。

参考文献:

[1] 丁小明,廖丹琼.葛根素减轻大鼠海马区缺血/再灌注损伤[J].基础医学与临床,2016,36(4):534-536.
 [2] 赵凯,张国华,贾宇臣,等.线栓法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改良及探讨[J].中国卒中杂志,2012,7(12):916-921.
 [3] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke,1989, 20(1):84-91.

[4] MAJI A K, PANDIT S, BANERJI P, et al. Pueraria tuberosa: a review on its phytochemical and therapeutic potential [J]. Natural Products Research. 2014, 28(23): 2111-2127.
 [5] WEI S Y, CHEN Y, XU X Y. Progress on the pharmacological research of puerarin: a review [J]. Chinese Journal of Natural Medicine, 2014, 12(6): 407-414.
 [6] 余雪源,仲英,左春旭,等.羟乙葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注氧化损伤的保护作用[J].中国生化药物杂志,2012,33(1):4-7,11.
 [7] JIN S E, SON Y K, MIN B S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from Pueraria lobata roots[J]. Archives of Pharmacal Research, 2012, 35(5): 823-837.
 [8] 张茹,郭荷娜,吴海琴,等.葛根素对大鼠局灶性脑缺血后钙超载的保护作用[J].南方医科大学学报,2010,30(6):1268-1271.
 [9] MAHDY H M, MOHAMED M R, EMAM M A, et al. The anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of puerarin attenuate 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(3):252-258.
 [10] 韩进,万海同,李金辉,等.3'-甲氧基葛根素对缺血再灌注大鼠脑内氨基酸动态变化的实验研究[J].中国中药杂志,2012,37(7):1023-1027.
 [11] 刘亚军,洪旒,桂艳.葛根素对局灶性脑缺血再灌注大鼠行为及病理改变的保护作用[J].数理医药学杂志,2010,23(6):691-692.
 [12] 封菲,洪鸣鸣,高越.葛根素对脑缺血大鼠脑组织 MMP-9 表达和脑水肿的影响[J].浙江中西医结合杂志,2013,23(6):440-442.
 [13] 尹雪莉,桂丽,李珍.葛根素预处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区神经元损伤的影响及其机制[J].安徽医科大学学报,2015,50(6):723-726.
 [14] 邓文祥,潘继兴,黄惠勇.中药对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究进展[J].湖南中医药大学学报,2015,35(6):64-68.
 [15] LEKER R R, AHARONOWIZ M, GREIG N H, et al. The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin alpha[J]. Exp Neurol, 2004, 187(2): 478-486.
 [16] MORRISON R S, KINOSHITA Y, JOHNSON M D, et al. P53-dependent cell death signaling in neurons[J]. Neurochem Res, 2003, 28(1):15-27.
 [17] 潘登,谭军,赵秀娟,等.葛根素对脑缺血-再灌注损伤细胞凋亡和 p53 表达的影响[J].中国热带医学,2007,7(7):1100-1101.
 [18] 韩德雄,张莺,林成明,等.JAK/STAT 通路在脑缺血再灌注损伤细胞凋亡及电针干预作用[J].中华中医药杂志,2013,28(6):1839-1841.
 [19] 胡亚,杨志宏,孙晓波.JAK/STAT 信号转导通路及中药干预在缺血性脑卒中的研究进展[J].中国药理学通报,2016,32(7):889-894.
 [20] SUZUKI S, TANAKA K, NOGAWA S, et al. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) after focal cerebral ischemia in rats[J]. Exp Neurol,2001,170(1):63-71.
 [21] 陈真珍,王凯华,黄龙坚.JAK2/STAT3 信号转导通路在脑缺血再灌注损伤中的作用[J].中国实用神经疾病杂志,2013,16(10):29-32.
 [22] 梅志刚,王明智,刘晓洁,等.葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤 $\alpha 7nAChR$ 、NF- κB p65 及 STAT3 mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志(原中国医药学报),2013,28(1):113-117.
 [23] ZHU H B, ZOU LZ, TIAN JW, et al. SMND-309, a novel derivative of salvianolic acid B, protects rat brains ischemia and reperfusion injury by targeting the JAK2/STAT3 pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 714(9): 23-31.
 [24] YAMASHITA T, SAWAMOTO K, SUZUKI S, et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of STAT3 activation in the protection of neurons[J]. J Neurochem, 2005, 94(2):459-468.