

# 丹参酮 II A 对鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl-2 和 caspase-3 表达的影响\*

李浩<sup>1</sup> 刘开祥<sup>1</sup> 俸军林<sup>1</sup> 唐永刚<sup>1</sup> 蒋静子<sup>1</sup> 林小慧<sup>1</sup>

**摘要** 目的:探讨丹参酮 II A(Tan II A)对缺血再灌注损伤大鼠 Bcl-2 及 caspase-3 蛋白表达的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组、Tan II A 低剂量治疗组和 Tan II A 高剂量治疗组,线栓法建立局灶性脑缺血再灌注模型。Tan II A 高、低剂量治疗组于术前连续灌胃给予高、低剂量 Tan II A 3d,每天 1 次。用免疫组化法观察缺血 90min 再灌注 24h 大鼠额顶部皮质 Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达,并进行 2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色和 HE 染色观察脑梗死体积及病理形态学变化。结果:脑缺血再灌注 24h,缺血再灌注组 Bcl-2 和 caspase-3 表达增加,与假手术组比较,差异具有显著性意义( $P<0.05$ );与缺血再灌注组比较,Tan II A 高、低剂量治疗组均显著增加 Bcl-2 表达,减少 caspase-3 表达,高、低剂量组之间差异亦具有显著性意义( $P<0.05$ )。Tan II A 高、低剂量治疗组脑梗死体积较缺血再灌注组减小,高、低剂量组之间差异具有显著性意义( $P<0.05$ )。Tan II A 高、低剂量治疗组脑组织缺血损伤病理学改变明显轻于缺血再灌注组,Tan II A 高剂量治疗组缺血改变亦轻于低剂量治疗组。结论:Tan II A 对缺血再灌注脑损伤具有保护作用,其机制可能与增加 Bcl-2 蛋白表达同时降低 caspase-3 蛋白表达有关。

**关键词** 脑缺血再灌注; Bcl-2; caspase-3; 丹参酮

中图分类号: R743.3, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2008)-08-0691-03

**Effects of Tanshinone II A on expressions of Bcl-2 and caspase-3 following cerebral ischemic reperfusion injury in rats/LI Hao, LIU Kaixiang, FENG Junlin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(8): 691-693**

**Abstract Objective:** To study the effects of Tanshinone II A(Tan II A) on expressions of Bcl-2 and caspase-3 of cerebral ischemia reperfusion(I/R) injury in rats. **Method:** Rats were randomly divided into four groups, which were sham operated group (SG), I/R group, low dose Tan II A treated group (LG) and high dose Tan II A treated group (HG). The focal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was made in rats with suture-occluded method except SG group. LG and HG groups were pretreated with low and high doses Tan II A, for 3d, before MCAO. After 90min MCAO following 24h reperfusion, expressions of Bcl-2 and caspase-3 in cerebral cortex were investigated with immunohistochemistry technique. **Result:** Compared with SG group, in I/R group expressions of Bcl-2 and caspase-3 elevated at 24h reperfusion in ischemic region ( $P<0.05$ ). Compared with I/R group, in LG and HG groups expression of Bcl-2 elevated dose-dependently and expressions of caspase-3 reduced dose-dependently ( $P<0.05$ ). Compared with I/R group, in LG and HG groups cerebral infarction volumes decreased dose-dependently ( $P<0.05$ ). In LG and HG groups changes of cerebral ischemic impairment were lighter than that in I/R group, and in HG group the changes were lighter than that in LG group. **Conclusion:** Tan II A may reduced cerebral ischemia-reperfusion injury by elevating the expressions of Bcl-2 and reducing the expression of caspase-3. It plays protective effect on cerebral ischemia injury.

**Author's address** Dept. of Neurology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, 541002

**Key words** cerebral ischemia-reperfusion; Bcl-2; caspase-3; Tanshinone

丹参酮是中药丹参的有效活性成分,具有抗缺血缺氧、改善微循环、抑制血小板聚集等功能和抗血栓形成作用,其中丹参酮 II A(Tanshinone II A, Tan II A)为丹参酮中含量最高的活性成分。本实验采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究丹参酮 II A 对大鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达的影响,探讨其保护作用的可能分子生物学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物分组:**健康 Wistar 大鼠,雄性,清洁级,共 40 只,体质量  $250\pm 30$ g(广西医科大学动物实验

\* 基金项目:广西自然科学基金资助(编号 0542110)

<sup>1</sup> 桂林医学院附属医院,广西桂林,541002

作者简介:李浩,男,硕士研究生,主治医师

收稿日期:2007-12-11

中心提供)。按随机分组原则分成假手术组(10只)、缺血再灌注组(10只)、Tan II A 低剂量治疗组(10只)及 Tan II A 高剂量治疗组(10只)。

**1.1.2 给药途径与药量:** Tan II A 低剂量治疗组(15mg/kg)和高剂量治疗组(30mg/kg)均于术前连续灌胃给药 3d, 每天 1 次, 假手术组和缺血再灌注组给予等量的生理盐水灌胃。第 3d 给药后 1h 建立局灶性脑缺血 90min 再灌注 24h 动物模型。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立:** 参照 Longa 等<sup>[1]</sup>方法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。采用颈外动脉插入线栓法, 各组均进行左侧大脑中动脉栓塞。线栓采用石蜡线栓。线栓直径约 0.27mm, 插入深度约 18mm, 此时线栓头位于大脑中动脉起始部。缺血 90min 时, 抽提线栓实现再灌注。神经功能缺陷评分: 按照 Longa 等<sup>[1]</sup>评分标准, 各组分别在再灌注 24h 进行评分。神经功能缺陷评分在 1—3 分为模型成功。

**1.2.2 Bcl-2 和 caspase-3 表达的免疫组化染色:** 再灌注 24h, 各组随机取 5 只大鼠, 用生理盐水和多聚甲醛进行心脏灌流固定, 断头取脑。在左侧大脑半球距离嗅球尖端 7—11mm 之间冠状切取约 5mm 厚脑组织块, 固定、脱水、包埋成腊块, 连续切片, 厚 5 $\mu$ m。连取 5 张, 1 张作 HE 染色, 其余 4 张作免疫组化染色。用 SP 法进行 Bcl-2 和 caspase-3 蛋白的免疫组化染色。一抗由北京中山生物技术有限公司提供。阴性对照用 PBS 液代替一抗。在细胞质内出现棕黄染色颗粒染色代表 Bcl-2 和 caspase-3 蛋白阳性表达细胞。于每个鼠脑取 1 张切片, 每张切片分别随机选取左侧大脑半球额顶部皮质 5 个不重复高倍镜视野( $\times 400$ ), 计数每个视野阳性细胞数, 算出平均数即为每张切片阳性细胞数。

**1.2.3 TTC 染色:** 再灌注 24h, 将各组另外 5 只大鼠深麻后开颅取脑。将鼠脑置于 -4 $^{\circ}$ C 冰箱 20min 后, 将其切成 5 等份冠状位切片, 置于 2%TTC 溶液中, 水浴、多聚甲醛液固定。用计算机病理图像分析仪及梯形法计算出梗死灶体积, 各脑片梗死灶体积之和为梗死体积。左侧大脑半球梗死灶区呈白色, 主要为额顶部皮质和尾壳核, 正常组织呈红色。部分组织表现为由白色向红色过渡区。

**1.2.4 HE 染色:** 取再灌注 24h 大鼠脑切片进行常规 HE 染色, 观察病理形态学改变。

## 1.3 统计学分析

数据处理采用 SPSS11.5 统计软件进行运算, 结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间差异显著性检验采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 TAN II A 对 Bcl-2、caspase-3 蛋白表达和脑梗死体积的影响

见图 1—7, 见前置彩色插页 6。

假手术组可见 Bcl-2 呈少量表达。缺血再灌注组 BCL-2 阳性细胞表达增多, 部位主要分布于缺血周边区的额顶皮质, 与假手术组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ) (图 1)。与缺血再灌注组比较, TAN II A 高、低剂量治疗组的 BCL-2 阳性细胞均明显增加, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 高、低剂量组之间差异亦具有显著性意义( $P < 0.05$ ) 见表 1, (图 2、3)。

假手术组未见 caspase-3 表达。缺血再灌注组 caspase-3 阳性细胞表达增多, 部位主要分布于缺血周边区额顶皮质和海马组织, 与假手术组比较, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。与缺血再灌注组比较, TAN II A 高、低剂量治疗组的 caspase-3 阳性细胞明显减少( $P < 0.05$ ), 高、低剂量组之间差异亦具有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1 (图 5、6)。

表 1 各组 Bcl-2、caspase-3 表达和脑梗死体积的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bcl-2	caspase-3	脑梗死体积 (mm <sup>3</sup> )
假手术组	6.32 $\pm$ 0.52	0	0
缺血再灌注组	19.08 $\pm$ 2.47 <sup>①</sup>	38.52 $\pm$ 3.56 <sup>①</sup>	191.8 $\pm$ 9.62 <sup>①</sup>
TAN II A 低剂量治疗组	34.20 $\pm$ 4.83 <sup>②</sup>	27.56 $\pm$ 3.26 <sup>②</sup>	154.4 $\pm$ 12.22 <sup>②</sup>
TAN II A 高剂量治疗组	46.24 $\pm$ 4.65 <sup>③</sup>	21.44 $\pm$ 1.74 <sup>③</sup>	130.0 $\pm$ 13.1 <sup>③</sup>

①与假手术组比较  $P < 0.05$ ; ②与缺血再灌注组比较  $P < 0.05$ ; ③与 TAN II A 低剂量治疗组比较  $P < 0.05$

Tan II A 高、低剂量治疗组梗死体积较缺血再灌注组减小(均  $P < 0.05$ ), 高、低剂量组之间差异亦具有显著性意义( $P < 0.05$ ) 见表 1。TTC 染色后, 缺血再灌注 24h 左侧大脑半球梗死灶区呈白色, 主要为额顶部皮质和尾壳核, 正常组织呈红色。部分组织表现为由白色向红色过渡区。见图 7。

### 2.2 各组缺血侧脑组织病理学改变的比较

假手术组脑组织切片可见神经细胞、胶质细胞及毛细血管形态正常, 结构完整, 锥体细胞核大而圆, 核仁明显。缺血再灌注组呈缺血改变, 梗死区正常组织结构消失, 结构不清, 间质水肿, 有炎性细胞浸润; 锥体细胞体积缩小, 细胞核固缩深染, 胞浆嗜伊红。部分细胞坏死, 并可见呈筛状坏死的坏死灶。Tan II A 不同剂量治疗组脑组织缺血改变较缺血再灌注组明显减轻, 坏死范围缩小, 细胞结构较完整, 细胞核固缩, 细胞间质水肿轻, 高剂量组与低剂量组之间比较, 缺血改变更轻。

## 3 讨论

胡霞敏等<sup>[2]</sup>研究发现, 丹参酮 II A 对脑缺血再灌

注大鼠有保护作用。本研究结果也证实,脑缺血再灌注损伤给予 Tan II A 治疗,可明显缩小脑梗死体积及减轻缺血病理损害,对缺血脑组织有保护作用,高剂量 Tan II A 的保护效果更显著。

研究表明,脑缺血后神经元的死亡主要表现为坏死和凋亡两种形式。细胞凋亡是在生理和病理条件下的一种主动死亡方式,是受细胞内、外因子调控的生物学过程。在脑缺血急性期,神经元坏死与凋亡并存,细胞坏死位于缺血中心区,细胞凋亡主要出现在缺血半暗带。Bcl-2 基因是一种癌基因,它所编码的膜相关蛋白是一种强有力的细胞死亡抑制因子,它在调节神经元凋亡过程中发挥着关键作用。目前认为 Bcl-2 是与脑缺血神经元凋亡关系最密切的内源性凋亡抑制基因<sup>[3]</sup>。Lawrence 等<sup>[4]</sup>在过度表达 Bcl-2 基因的转基因小鼠中发现,Bcl-2 蛋白能减轻大脑中动脉阻塞引起的缺血性脑损伤,使脑梗死体积缩小。本实验结果显示,Bcl-2 蛋白在假手术组大鼠脑组织中几乎没有表达,但在缺血再灌注后,Bcl-2 则出现了表达,主要出现在缺血半暗带的额顶皮质,我们推测这是机体对抗凋亡的一种反应。而 Tan II A 治疗组大鼠脑组织中 Bcl-2 蛋白的表达明显高于缺血再灌注组,表明 Tan II A 可能通过上调 Bcl-2 蛋白的表达从而对缺血再灌注脑损伤起到一定的保护作用。

天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白激酶家族(caspases)是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,凋亡的最后实施是通过 caspases 的激活而实现的。caspases 的激活表现为“瀑布式”的级联反应,而 caspase-3 是 caspases 级联反应中下行的最关键的凋亡执行蛋白酶,在各种程序启动的凋亡程序中起最后枢纽的作用<sup>[5]</sup>,它的激活可通过裂解 DNA 依赖性蛋白激酶等,改变其结构,促使细胞凋亡<sup>[6]</sup>。有研究发现<sup>[7-8]</sup>,在缺血性神经损伤过程中,抑制 caspase-3 活性可产生明显的神经保护作用。本研究表明,脑缺血再灌注 24h,额顶皮质 caspase-3 的表达显著增强,表明再灌注后缺血半暗带出现细胞凋亡反应增加;Tan II A 能明显抑制再灌注后脑组织中

caspase-3 的表达,提示 Tan II A 通过降低 caspase-3 的表达与活化,可能可以减少再灌注期神经元凋亡的发生,从而促进脑缺血后神经元的存活。

近年有研究表明<sup>[9]</sup>,缺血再灌注损伤中,缺血半暗带区 Bcl-2 过度表达可以抑制 caspase-3 的活性。我们的研究表明,Tan II A 增加缺血再灌注后 Bcl-2 蛋白表达同时抑制 caspase-3 蛋白表达,对凋亡有抑制作用。关于 Tan II A 是否通过对 Bcl-2 的激活抑制 caspase-3 蛋白表达发挥脑保护作用机制还应进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20(1): 84—91.
- [2] 胡霞敏,周密妹,胡先敏,等.丹参酮 II A 对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用及对能量代谢的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2006,15(3):176—179.
- [3] Graham SH, Chen J, Clark RS. Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2000,17:831—841.
- [4] Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, et al. Over expression Bcl-2 with Herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and vivo [J]. *J Neuroscience*, 1996,6 (2):394—396.
- [5] Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury [J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005,5(3):269—287.
- [6] Wellington CL, Hayden MR. Caspases and neurodegeneration: On the cutting edge of new therapeutic approaches [J]. *Clin Genet*, 2000,57(1):1—7.
- [7] Loetscher H, Niederhauser O, Kemp J, et al. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia [J]. *Drug Discov Today*, 2001,6 (13):671—680.
- [8] Li H, Colbourne F, Sun P, et al. Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2000,31(1):176—182.
- [9] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome C translocation and caspase-3 activity [J]. *Neurochem*, 2003,85: 1026—1036.