

## ● 实验研究 ●

三七总皂苷对小鼠脑缺血再灌注损伤  
海马 Bax、Bcl-2 表达的影响李衍兴<sup>1</sup>, 陈燕珊<sup>1</sup>, 潘鹏春<sup>1</sup>, 张少君<sup>1</sup>, 陈小娟<sup>1</sup>, 李若兰<sup>1</sup>, 陈盛强<sup>2</sup>

(1. 广州医科大学, 广东 广州, 511436;

2. 广州医科大学附属第二医院神经科学研究所, 广东 广州, 510260)

**[摘要]** 目的: 观察三七总皂苷(PNS)对脑缺血再灌注损伤小鼠海马 Bax 和 Bcl-2 表达的影响。方法: 采用双侧颈总动脉夹闭法构建缺血再灌注损伤模型, 选用健康的6周龄昆明小鼠33只, 分为空白组、PNS组、缺血9d组(缺血再灌注9d后取脑)、缺血24h组(缺血再灌注24h后取脑)。PNS组于缺血前3d开始腹腔注射PNS[30mg/(kg·d)], 直至再灌注9d后取脑, 缺血9d组和缺血24h组予以等体积0.9%氯化钠注射液腹腔注射。各组取脑后制作冰冻切片, 采用免疫组织化学法检测小鼠海马区脑组织 Bax 和 Bcl-2 阳性表达细胞数。结果: 与空白组比较, 缺血9d组 Bcl-2、Bax 水平均明显增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与缺血9d组比较, PNS组 Bax 的表达水平平均值明显降低, Bcl-2/Bax 的表达水平明显增高, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 缺血9d组 Bax 和 Bcl-2 的表达均较缺血24h组增高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: PNS对短暂性双侧颈动脉闭塞型小鼠缺血再灌注损伤的作用机制是早期通过降低 Bax 表达, 增大 Bcl-2/Bax 比值, 抑制神经元凋亡, 从而对大脑海马神经元起保护作用, 且再灌注第9天损伤程度可能更大。

**[关键词]** 脑缺血再灌注损伤; 三七总皂苷; Bax; Bcl-2; 实验研究

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.10.058

**Effect of Panax notoginseng saponins on the expression of Bax and Bcl-2 in the hippocampus in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury**LI Yanxing<sup>1</sup>, CHEN Yanshan<sup>1</sup>, PAN Pengchun<sup>1</sup>, ZHANG Shaojun<sup>1</sup>, CHEN Xiaojuan<sup>1</sup>, LI Ruolan<sup>1</sup>, CHEN Shengqiang<sup>2</sup>

(1. Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, Guangdong, China;

2. Institute of Neuroscience, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the effect of Panax notoginseng saponins (PNS) on the expression of Bax and Bcl-2 in the hippocampus in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury. Methods: A mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury was established by clipping of both common carotid arteries. A total of 33 healthy Kunming mice aged 6 weeks were divided into blank group, PNS group, 9-day ischemia group (brain tissue was collected after 9 days of ischemia/reperfusion), and 24-hour ischemia group (brain tissue was collected after 24 hours of ischemia/reperfusion). The mice in the PNS group were given intraperitoneally injected PNS 30mg/kg·d since day 3 before ischemia, and brain tissue was collected after 9 days of reperfusion; those in the 9-day ischemia group and the 24-hour ischemia group were given intraperitoneal injection of an equal volume of 0.9% sodium chloride injection. After brain tissue was collected for the preparation of frozen sections, immunohistochemistry was used to measure the number of cells with the expression of Bax and Bcl-2 in the hippocampus. Results: Compared with the blank group, the 9-day ischemia group had a significant reduction in the mean level of Bcl-2 and Bax ( $P < 0.05$ ). Compared with the 9-day ischemia group, the PNS group had a signifi-

基金项目: 广州医科大学大学生课外科技活动立项资助项目(编号:2016A018)

第一作者: 李衍兴, 男, 2015级本科生, 研究方向: 神经生物学

通讯作者: 陈盛强, 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 神经科学, E-mail: chenshengq66@163.com

cant reduction in the mean level of Bax and a significant increase in Bcl - 2/Bax ratio ( $P < 0.05$ ). The 9 - day ischemia group had significantly higher expression of Bax and Bcl - 2 than the 24 - hour ischemia group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: In the mouse model of transient ischemia - reperfusion injury due to occlusion of both carotid arteries, PNS exerts a protective effect on hippocampal neurons by reducing Bax expression, increasing Bcl - 2/Bax ratio, and inhibiting neuron apoptosis in the early stage, and there may be a relatively high degree of injury on day 9 of reperfusion.

[Key words] cerebral ischemia/reperfusion injury; Panax notoginseng saponins; Bax; Bcl - 2; experimental study

大脑短暂缺血性损伤或再通可见于头颈部手术出现的并发症,脑血栓形成后部分脑血管的自然再通或者药物溶栓再通也会出现缺血再灌注损伤。在脑缺血再灌注损伤时,大脑缺血边缘区(半暗区)细胞以凋亡为主要死亡方式,及时的药物干预可以抑制细胞凋亡,因此该区域为脑缺血以及再通后重点抢救区域。而海马区对缺血缺氧相当敏感,及时抢救海马区的神经元凋亡,对保护海马区的记忆、学习功能有重要意义。缺血再灌注损伤产生大量羟自由基,自由基通过促进细胞色素 C 从线粒体释放到胞质,在胞质内激活 caspase3,启动凋亡,促进神经元凋亡;胞内钙离子流入增多和钙超载促使氧自由基释放增多。Bax 和 Bcl - 2 是细胞凋亡的密切相关基因。Bcl - 2 可以通过抑制钙离子的释放和抗氧化作用抑制细胞凋亡,Bax 与 Bcl - 2 功能相拮抗,Bax 的大量表达能促进 caspase3 激活而促凋亡,Bcl - 2 的表达能抑制 caspase3 激活而抗凋亡<sup>[1]</sup>。

植物三七的干燥根以及根茎有抑制炎症因子、清除自由基、抗氧化应激的作用,可以降低血管阻力及血液黏度,改善微循环,对脑缺血/再灌注损伤有保护作用。而三七的有效成分是三七总皂苷(PNS),其主要成分包括人参皂苷 Rb1、Rg1、Re、Rd 及三七皂苷 R1 等,在心脑血管疾病的治疗中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。

本实验旨在观察 PNS 对脑缺血再灌注损伤小鼠海马区损伤相关蛋白缺氧诱导因子 Bax 和 Bcl - 2 表达的影响,从而探讨 PNS 对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制。现将实验结果报告如下。

## 1 实验材料

1.1 动物 SPF 级健康 6 周龄雌性昆明种小鼠 33 只,体重 22 ~ 30g,由广州中医药大学实验动物实验中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013 - 0034。自由饮食饮水饲养,自然光暗周期。

1.2 药物与试剂 三七总皂苷,云南玉溪万方天然药物有限公司提供,规格:200mg/支,批准文号:国药准字 Z20026437;兔抗小鼠 Bax 和 Bcl - 2 多克隆抗体,CST 公司提供;SABC 免疫组化染色试剂盒,规格:1kit,购自武汉博士德生物试剂公司;DAB 显色试剂盒(20 ×),规格:3ml,购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 主要仪器 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);冰冻切片机(德国 LEICA 公司);电热恒温水槽(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)。

## 2 实验方法

2.1 动物分组 将实验小鼠随机分为空白组(7 只)、PNS 组(8 只)、缺血 9d 组(9 只)、缺血 24h 组(9 只)。

2.2 模型制备 PNS 组、缺血 9d 组和缺血 24h 组参照相关文献<sup>[3]</sup>中的方法改进制备缺血再灌注模型。称小鼠体重,腹腔注射水合氯醛(0.003ml/g)麻醉小鼠,待小鼠无翻正反射后,固定于手术台上,常规消毒,颈部切开 0.8 ~ 1cm 正中切口,剪毛,切开皮肤和皮下组织,钝性分离肌肉,暴露颈动脉鞘,然后分离双侧颈总动脉及迷走神经约 0.5 ~ 1cm,并用丝线穿过颈总动脉下方,提拉丝线,以动脉夹夹闭颈总动脉阻断血流 20min,然后去除,恢复灌注,最后缝合皮肤,消毒。

2.3 给药方法 PNS 组于缺血前 3d 开始腹腔注射 PNS 30mg/(kg · d)<sup>[4]</sup>,之后每天同一时间注射等体积 PNS,持续至再灌注第 9 天后取脑。缺血 9d 组和缺血 24h 组均在造模前 3d 以等体积的 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射,之后每天同一时间等体积注射 0.9% 氯化钠注射液,分别持续注射至再灌注第 9 天和再灌注 24h 后取脑。空白组在缺血 9d 组造模前 3d 以等体积 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射,之后每天同一时间注射等体积 0.9% 氯化钠注射液,持续注射至第 9 天后取脑。

2.4 观察指标 SABC 免疫组化方法:获得鼠脑后按冰冻切片制作方法进行切片,厚度 30μm。按照 SA1020 - 小鼠/兔 IgG SABC 免疫组化染色试剂盒说明书<sup>[5]</sup>进行染色,步骤为消除组织内源性过氧化物酶、抗原修复、封闭、孵育一抗、孵育二抗、孵育 SABC、DAB 显色、脱水、透明、封片。其中每组脑片分别进行 2 次免疫组化染色,分别孵育 Bax 抗体(工作浓度 1:800)和 BCL - 2 抗体(工作浓度 1:1600)。其中,DAB 显色法步骤按照 DAB 显色试剂盒(20 ×)说明书进行,具体步骤:将工作 A 液、B 液、PBS 液按 50:50:900 稀释并混合,室温避光孵育切片 30min,在显微镜下观察显色,用蒸馏水洗涤终止反应。

阳性细胞计数:在 200 倍光学显微镜下在脑组织切片的海马区内随机选取 5 个视野计数免疫组化染色阳性的细胞数。并分别记录每组切片 Bax 和 Bcl - 2 免疫组化染色阳性的细胞数。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据,2 组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

3 实验结果

各组小鼠海马区 Bax、Bcl-2 表达水平比较:与空白组比较,缺血 9d 组 Bcl-2、Bax 水平均明显增高;与缺血 9d 组比较,PNS 组 Bax 的表达水平明显降低,Bcl-2/Bax 的表达水平明显增高;缺血 9d 组 Bax 和 Bcl-2 的表达均较缺血 24h 组增高;差异均具有统计学意义。(见表 1、图 1、图 2)

| 表 1 各组小鼠海马区 Bax、Bcl-2 水平比较( $\bar{x} \pm s$ , 个) |    |                              |                              |                           |
|--------------------------------------------------|----|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 组别                                               | 只数 | Bcl-2                        | Bax                          | Bcl-2/Bax                 |
| 空白组                                              | 7  | 2.94 ± 2.15                  | 4.00 ± 4.10                  | 0.92 ± 0.52               |
| PNS 组                                            | 8  | 7.30 ± 3.75                  | 3.35 ± 1.81                  | 2.26 ± 0.70 <sup>cd</sup> |
| 缺血 9d 组                                          | 9  | 27.44 ± 19.59 <sup>abd</sup> | 63.44 ± 12.77 <sup>abd</sup> | 0.46 ± 0.32               |
| 缺血 24h 组                                         | 9  | 0.58 ± 0.88                  | 1.58 ± 1.44                  | 0.61 ± 1.11               |

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PNS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与缺血 9d 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与缺血 24h 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

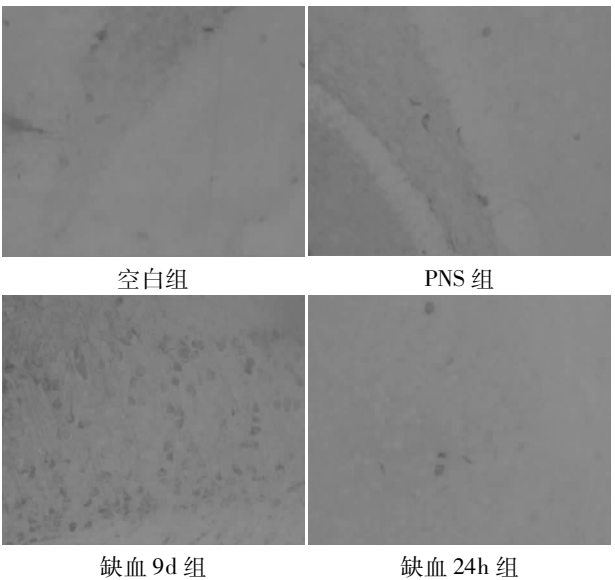


图 1 小鼠海马区 Bax 的表达(×200)

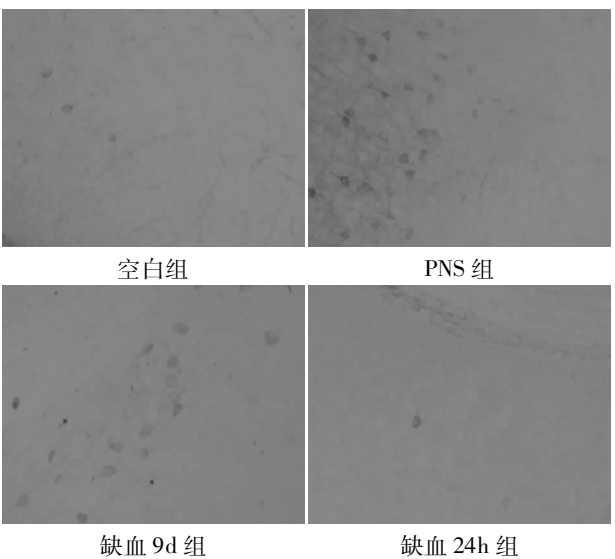


图 2 小鼠海马区 Bcl-2 的表达(×200)

4 讨 论

PNS 具有广泛的药理作用,实验研究证实其不仅能抑制炎症因子、清除自由基、抗氧化应激,还能通过活血化痰、扩张毛细血管,降低血管阻力及血液黏度,改善微循环,对脑缺血再灌注损伤有保护作用,因此可用于缺血性脑血管疾病的治疗<sup>[6]</sup>。黄小平等<sup>[7]</sup>将三七的 3 种有效成分人参皂苷 Rg1、Rb1 以及三七皂苷 R1 分别与黄芪甲苷配对,然后注入脑缺血模型小鼠后发现,注入人参皂苷 Rg1 的小鼠脑组织中一氧化氮含量明显降低,说明人参皂苷 Rg1 具有抗脑缺血的作用,对再灌注后氧化应激损伤的亦有明显的保护作用。

缺血再灌注后神经元内羟自由基含量大量增加启动细胞凋亡,自由基促进线粒体内细胞色素 C 释放,与胞质内的 Apaf-1 以及 Caspase9 结合,激活 Caspase3,再激活核酶剪切 DNA,使细胞凋亡发生。活性氧自由基可调控细胞色素 C 的释放,而细胞色素 C 释放因影响了呼吸链的进行而使活性氧自由基产生增多,形成恶性循环,最终自由基大量产生和广泛激活 caspase3,启动细胞凋亡的瀑布效应<sup>[8]</sup>。同时,因通透性的改变,大量钙离子进入胞内,进一步促进自由基产生并且促进胞内细胞器钙离子释放引起钙超载。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要蛋白,可通过抑制钙离子的释放、抗氧化作用、降低 caspase3 的表达实现抗凋亡。Bcl-2 和 Bax 作用相互拮抗,Bcl-2 的过量表达能抑制细胞凋亡,而 Bax 则通过抑制 Bcl-2 的活性,促进细胞色素 C 释放,激活 Caspases 介导细胞凋亡。

本实验结果显示缺血 9d 组的 Bax 阳性细胞数均比空白组增多,说明缺血再灌注造模成功对小鼠脑组织海马区有一定损害作用。PNS 组的 Bax 阳性细胞数较缺血 9d 组明显减少( $P < 0.05$ ),表明三七皂苷能降低 Bax 的表达以抑制神经元凋亡。当 Bcl-2 过量时,Bcl-2 之间结合成同源二聚体,对细胞抗凋亡;当 Bax 过量时,Bax 同样形成同源二聚体,细胞更容易凋亡。Bcl-2 的抗凋亡作用是与 Bax 结合成异源二聚体,从而阻止 Bax 介导细胞凋亡的作用。因此,细胞内 2 种蛋白的动态关系可用 Bcl-2/Bax 比值表示,而 Bcl-2/Bax 比值的与低,可能决定细胞在受到凋亡刺激信号后是趋向于存活还是死亡。比值越大,细胞倾向于修复,且大于 1 时细胞可抗凋亡;比值越小或少于 1 时,细胞倾向于凋亡。PNS 组的 Bcl-2/Bax 比值较缺血 9d 组增大,缺血 9d 组的 Bcl-2/Bax 比值较空白组小,缺血 9d 组更倾向于凋亡,说明缺血造模的成功和三七皂苷对缺血再灌注损伤有抗凋亡的修复作用。缺血 9d 组的 Bax 和 Bcl-2 的阳性细胞数均比缺血 24h 组的数量增多,两个组的差别是缺血再灌注后的时间不同,提示缺血再灌注时间在 9d 出现凋亡细胞数上升,机体可能相应地保护神经元而自身增加 Bcl-2 的表达以抗凋亡作用,但再灌注后时间长短的差异如何影响 Bcl-2 与 Bax 的表达仍需进一步探讨其相关机制。

(下转第 156 页)

IL-6等细胞因子含量<sup>[15]</sup>;山茱萸可对大鼠T淋巴细胞的增殖产生有效的抑制效应<sup>[16]</sup>;生地黄中所富含的多糖物质,可以促进Th1与Th2细胞因子的表达<sup>[17]</sup>;《中华本草》中又载诸如丹皮、金银花、连翘、玄参等药,均有抗感染之效。

从现代研究及本实验发现,补清方通过调节人体免疫系统,消炎抗敏干预CU发病,然对于补清方具体作用机制以及CU发病原理至今尚未明确。近年来研究发现,Th17作为与Th1、Th2同为CD4<sup>+</sup>效应T细胞的分化亚群,在CU的发病机制与治疗上同时起到了关键性作用<sup>[18]</sup>,是对原Th1/Th2模式的重要补充。对Th17细胞因子在CU中的相关研究,将会是进一步阐明CU发病以及补清方治疗作用机制的方向。

### 参考文献

- [1] 潘立文,丁昭莉,赵桂刚,等. 从少阳经论治慢性荨麻疹[J]. 吉林中医药,2018,38(8):876-879.
- [2] 陆江涛,孔珍珍,刘春保,等. 瘾疹丸联合盐酸西替利嗪片治疗慢性荨麻疹疗效观察[J]. 新中医,2018,50(7):154-156.
- [3] 展照双,王加锋. 从“冬不藏精,春必病温”探讨荨麻疹发病机制[J]. 山东中医杂志,2014,33(11):879,899.
- [4] 王加锋,展照双. 基于“藏于精者,春不病温”理论辨治荨麻疹[J]. 上海中医药杂志,2018,52(8):65.
- [5] 杨裕华,李震,陶汉华. 金匱肾气丸、右归丸对肾虚小鼠模型影响的脑基因组图谱研究[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(9):600-607.
- [6] 郭静,艾儒棣,段渠,等. 当归饮子治疗气血两虚型慢性荨麻疹小鼠的机理研究[J]. 广州中医药大学学报,2013,30(6):884-887.
- [7] 王朵勤,徐金华. 2016年慢性荨麻疹临床进展回顾[J]. 皮肤病与性病,2017,39(1):16-18.
- [8] 钟斐,蒋瑾瑾. 组胺及组胺受体对免疫系统调节作用[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(21):9753-9755.
- [9] 李朝阳,孙仁山,李菁,等. 慢性荨麻疹血清中组胺释放因子(HRF)及HRF反应性IgE的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志,2014,28(5):461-463.
- [10] 朱海,邓侃,连粤湘,等. 自拟中药汤联合非索非那定、匹多莫德治疗难治性慢性特发性荨麻疹的疗效观察及安全性分析[J]. 辽宁医学杂志,2017,31(2):20-21,24.
- [11] 施林林,刘振强,戚建明. 复方甘草酸苷片对慢性荨麻疹患者血清中白细胞介素水平的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(19):1931-1934.
- [12] Kim Y, Lee S, Kim YS, et al. Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: a mathematical model [J]. Math Biosci Eng, 2013,10(4):1095-1133.
- [13] 何泽生,安国芝,赵海春,等. 慢性特发性荨麻疹患者外周血总IgE与C3、C4、IL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ 的相关性[J]. 中国皮肤性病学杂志,2013,27(3):246-249.
- [14] 张敏,李桂珍,宋蒙蒙,等. 慢性荨麻疹患者血清二胺氧化酶活性和总IgE检测及意义[J]. 天津医药,2011,39(6):514-516.
- [15] 邵礼梅,许世伟. 山药化学成分及现代药理研究进展[J]. 中医药学报,2017,45(2):125-127.
- [16] 曹喻灵,雷小勇. 山茱萸现代药理作用研究进展[J]. 湖南学院学报:医学版,2013,15(2):76-78.
- [17] 冯建明,赵仁. 三种地黄炮制品现代研究进展[J]. 云南中医学院学报,2000,23(4):40-42.
- [18] 何沅莉,单葵,曹雨微,等. 慢性荨麻疹患者血清IL-17 IL-23 TGF- $\beta$ 水平检测分析[J]. 现代医药卫生,2018,34(3):364-365,368. (收稿日期:2019-03-28)

(上接第143页)

本实验通过观察PNS对脑缺血再灌注损伤小鼠海马区损伤相关蛋白缺氧诱导因子Bax和Bcl-2表达的影响,结果表明PNS可以减少脑组织细胞的凋亡,在脑缺血再灌注损伤可以起到一定的神经元保护作用。这种保护效应可以通过Bax和Bcl-2在脑的表达间接显示出来。本实验结果显示,给予PNS后脑缺血再灌注损伤中Bax的表达明显下降,且Bax的表达,由此推测PNS能明显降低缺血再灌注损伤的脑组织中Bax的表达,有效修复对脑缺血再灌注引起的损伤,在头颈部手术后的并发症治疗有的预防作用。

### 参考文献

- [1] 李琳,张志强. 脑缺血再灌注损伤中脑细胞凋亡的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志,2005,27(1):60-62.
- [2] 宋达,魏鑫,袁云云,等. 三七总皂苷治疗脑血管疾病研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(8):129-132.
- [3] 令狐艳,余资江,肖朝伦,等. 双侧颈总动脉夹闭法构建脑缺血再灌注损伤模型的经验总结[J]. 四川解剖学杂志,2010,18(4):19-20.
- [4] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报,1997,37(4):41.
- [5] 孙幼芳,余景瑞,王凡英. 简便快速敏感的一种免疫组化染色法——SABC法[J]. 铁道医学,1995,32(4):197-198.
- [6] 黄文琴. 三七的临床应用功效及药理分析[J]. 医学信息(中旬刊),2011,24(1):304.
- [7] 黄小平,邓常清,邱咏园,等. 黄芩甲苷和三七的三种有效成分分配伍对小鼠脑缺血/再灌注后氧化应激和Nrf2/HO-1途径的影响[J]. 中国药理学通报,2013,29(11):1596-1601.
- [8] 高阳,吴婷,丁新生,等. 伊达拉奉对沙土鼠全脑缺血再灌注损伤后海马CA1区神经元凋亡相关基因Bcl-2、Bax表达的影响[J]. 江苏大学学报:医学版,2004,14(5):19-20,23,97. (收稿日期:2019-03-13)