

促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤模型新生大鼠认知功能的影响及对相关PARP-1/AIF信号通路的调控机制研究[△]

段淼*,黄婷,张莘琳,李清香,刘雅,曹云涛*(遵义市第一人民医院新生儿科,贵州遵义 563002)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2492-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.11

摘要 目的:研究促红细胞生成素(EPO)对缺氧缺血性脑损伤(HIBI)模型新生大鼠认知功能的影响以及对相关聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(PARP-1)/凋亡诱导因子(AIF)信号通路的调控机制。方法:将SD新生大鼠随机分为假手术组(Sham组)、模型组(HIBI组)和EPO干预组(EPO组),每组22只。HIBI组和EPO组大鼠采用Rice法建立HIBI模型,Sham组大鼠切口后即缝合而不作缺氧缺血处理。造模完毕后,EPO组大鼠每天腹腔注射重组人促红素注射液5 000 IU/kg,连续给药14 d;Sham组和HIBI组大鼠则腹腔注射等容生理盐水。取大鼠脑组织,采用TTC染色法检测梗死情况;采用TUNEL法检测海马组织CA1区神经细胞凋亡情况;采用蛋白免疫印迹法检测海马组织CA1区中PARP-1、AIF、Bax蛋白表达水平;采用Morris水迷宫实验考察大鼠空间学习记忆能力。结果:与Sham组比较,HIBI组大鼠脑组织梗死面积比显著升高,海马组织CA1区中TUNEL阳性凋亡细胞数显著增多,PARP-1、AIF、Bax蛋白表达水平均显著升高;Morris水迷宫实验中大鼠的逃避潜伏期显著延长,穿台指数显著减少;上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。与HIBI组比较,EPO组大鼠脑组织梗死面积比显著降低,海马组织CA1区中TUNEL阳性凋亡细胞数显著减少,PARP-1、AIF、Bax蛋白表达水平均显著降低;Morris水迷宫实验中大鼠的逃避潜伏期显著缩短,穿台指数显著增加;上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:EPO能够明显抑制HIBI引起的大鼠神经细胞凋亡而发挥脑组织保护作用,并能促进大鼠认知功能的恢复,这一作用很可能是通过抑制细胞凋亡PARP-1/AIF信号通路来实现的。

关键词 缺氧缺血性脑损伤;促红细胞生成素;神经细胞;凋亡;认知功能;大鼠;聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1;凋亡诱导因子

Effects of Erythropoietin on Cognitive Function of Neonatal Rats with Hypoxic-ischemic Brain Injury and Regulation Mechanism Study of PARP-1/AIF Signaling Pathway

DUAN Miao, HUANG Ting, ZHANG Pinglin, LI Qingxiang, LIU Ya, CAO Yuntao (Dept. of Neonatology, Zunyi First People's Hospital, Guizhou Zunyi 563002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of erythropoietin (EPO) on cognitive function of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury (HIBI), and the regulation mechanism of related PARP-1/AIF signaling pathway. **METHODS:** SD neonatal rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), model group (HIBI group) and EPO intervention group (EPO group), with 22 rats in each group. HIBI model was induced by Rice method in HIBI group and EPO group, and rats in sham group received suturing after cutting without hypoxic-ischemic treatment. After modeling, rats in EPO group was given Erythropoietin injection intraperitoneally each day, 5 000 IU/kg, for consecutive 14 d. Rats in Sham group and HIBI group were given constant volume of normal saline intraperitoneally. Cerebral tissue of rats was collected, and TTC staining was used to detect cerebral infarction. Neuronal apoptosis in hippocampal CA1 region was detected by TUNEL method. The expression of PARP-1, AIF and Bax protein in hippocampal CA1 region was detected by Western blot. Morris water maze was used to examine the spatial learning and memory abilities of rats. **RESULTS:** Compared with Sham group, the cerebral infarction area of rats in HIBI group was increased significantly; the number of TUNEL positive apoptosis cells in neuron of hippocampal CA1 region was increased significantly; the protein expression levels of PARP-1, AIF and Bax were increased significantly; in Morris water maze experiment, the escape latency of rats was prolonged significantly, while the index of crossing the platform was decreased significantly, with statistical significance ($P<0.05$). Compared with HIBI group, cerebral infarction area of rats in EPO group was decreased significantly; the number of TUNEL positive apoptosis cells in neuron of hippocampal CA1 region was decreased significantly; the protein expression levels of PARP-1, AIF and Bax were decreased significantly; in Morris water maze experiment, the escape latency of rats was shortened significantly, while the index of crossing the platform was increased significantly, with statistical significance ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** EPO can significantly inhibit HIBI-induced neuron

[△] 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合SY字[2009]3007);遵义市红花岗区科技项目(No.遵红科合社字[2009]19号)

* 副主任医师,博士。研究方向:新生儿脑损伤。电话:0851-28925530。E-mail:weimiao123@163.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:新生儿脑损伤。E-mail:cyto827@aliyun.com

apoptosis of rats so as to play protective effect on cerebral tissue, and promote the recovery of cognitive function, the mechanism of which may be associated with inhibiting apoptosis PARP-1/AIF signaling pathway.

KEYWORDS Hypoxic-ischemic brain injury; Erythropoietin; Neuron; Apoptosis; Cognitive function; Rat; PARP-1; AIF

缺氧缺血性脑损伤(Hypoxic ischemic brain injury, HIBI)是新生儿死亡和发生神经功能障碍的常见原因之一^[1]。研究显示,0.1%~0.2%的新生儿会出现由围产期窒息而引起的HIBI,其中约20%死亡,而幸存者中有高达40%出现脑性麻痹、认知功能障碍或癫痫等残疾^[2]。已有研究证实,细胞凋亡、氧化应激、缺氧缺血后的兴奋性毒性等均能导致神经细胞死亡继而引发神经功能障碍^[3-4]。其中,细胞凋亡是HIBI过程中神经细胞死亡的主要形式,由相关信号转导途径和凋亡基因共同决定^[5]。因此,采用抗神经细胞凋亡药物治疗成为目前恢复HIBI后认知功能的重要手段。已有研究显示,促红细胞生成素(又称“促红素”,EPO)能通过抑制细胞凋亡,从而在发生HIBI后起到神经保护作用^[6-7],然而EPO对发生HIBI后认知功能的影响及对相关信号转导途径的作用机制尚未见研究报道。本课题组考察EPO对HIBI模型新生大鼠认知功能的影响,并探究其对关键的非胱天蛋白酶(Caspase)依赖的细胞凋亡途径——聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(PARP-1)/凋亡诱导因子(AIF)信号通路的调控机制,旨在为EPO临床用于新生儿发生HIBI后的认知功能改善提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Mcllwain型切片机(瑞士Science Products GmbH公司);水迷宫(东乐自然基因生命科学公司);ChemiDoc Touch化学发光成像系统(美国伯乐公司);550D型数码相机(日本佳能公司);TCS SP5型激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡公司)。

1.2 药品与试剂

重组人促红素注射液(哈药集团生物工程有限公司,批号:S20050090,规格:3 000 IU/支);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,美国Sigma-Aldrich公司);ApopTag[®]荧光素原位细胞凋亡检测(TUNEL法)试剂盒(美国EMD Millipore公司,批号:S7110);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)荧光染料(美国Abcam公司);兔抗大鼠PARP-1、AIF抗体(北京博奥森生物技术有限公司);内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(H+L)(武汉艾美捷科技公司);兔抗大鼠Bax抗体、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)(武汉博士德生物工程有限公司);10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)制备试剂盒(中国生物技术研究所);其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 动物

新生7 d龄SD大鼠幼仔66只,雌雄兼用,体质量为(13.6±1.7)g,清洁级,由陆军军医大学野战外科研究所动物室提供,动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-0001,合格证号:SYXK(渝)2017-0012。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将大鼠随机分为假手术组(Sham组)、模型组(HIBI组)和EPO干预组(EPO组),每组22只。HIBI组和EPO组大鼠根据参考文献[8]采用Rice法建立HIBI模型:采用乙醚吸入法麻醉大鼠,在中位颈部切口,分离其左颈总动脉,使用6-0号线进行血管结扎,立刻缝合伤口;2 h恢复期后,将大鼠置于37 ℃水浴密闭缺氧环境中,持续给予8%O₂+92%N₂混合气体进行缺氧处理2.5 h。Sham组大鼠在颈部切口后即缝合,未进行血管结扎和缺氧处理。缺血缺氧处理完毕后,EPO组大鼠每天腹腔注射重组人促红素注射液(CHO细胞)5 000 IU/kg(根据预实验设置剂量),连续给药14 d;Sham组和HIBI组大鼠则同法腹腔注射等容生理盐水。

2.2 大鼠脑组织梗死情况观察

给药结束后,每组随机取4只大鼠断头处死,取出脑组织,置于4 ℃的PBS中冷却5 min后,沿冠状面切片(厚度2 mm×6片)。采用TTC染色法,将切片浸入以PBS制备的2% TTC溶液中,室温孵育30 min后,再以4 ℃的PBS冲洗2次,随后在4 ℃的10%福尔马林溶液中避光固定后拍摄图像。染色固定后,正常脑组织显红色,梗死区域脑组织显白色。采用Image J 1.8.0软件测量切片图像的梗死面积,并计算梗死面积占同侧缺血脑组织总面积的百分比。

2.3 大鼠海马组织CA1区神经细胞凋亡情况检测

给药结束后,每组随机取6只大鼠断头处死,快速取出脑组织,于无菌条件下解剖海马组织并分离其CA1区^[9],切片(厚度6 μm),于4%多聚甲醛中固定过夜,在一定浓度的蔗糖溶液(PBS配制)中浸渍脱水。采用TUNEL法进行海马组织CA1区神经细胞凋亡情况检测。实验步骤严格按照ApopTag[®]荧光素原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行,通过末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)催化修饰基因组DNA,用荧光抗体标记后,加入终质量浓度为1 μg/mL的DAPI进行染色。采用激光扫描共聚焦显微镜进行成像分析并对TUNEL阳性细胞(镜下细胞核呈绿色荧光者即为凋亡细胞)进行计数并计算百分比;同时对DAPI染色细胞(镜下细胞呈蓝色者即为神经细胞)进行观察,判断凋亡细胞的分布。

2.4 大鼠海马组织CA1区中PARP-1、AIF、Bax蛋白表达水平检测

给药结束后,每组随机取6只大鼠,按“2.3”项下方法处死并取大脑海马组织CA1区,于-80 ℃保存。采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测海马组织CA1区中PARP-1、AIF、Bax蛋白表达水平。以RIPA裂解液提取组织蛋白质,4 ℃下以12 000×g离心15 min;通过10% SDS-PAGE分离,转膜,在5%脱脂乳中室温封闭1 h;然后在4 ℃条件下,分别与兔抗大鼠PARP-1(1:200)、AIF(1:200)、GAPDH(1:200)一抗孵育过夜;孵育完毕后,以三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)洗涤3次,加入

HRP 标记的二抗(1:5 000),在室温下孵育 1 h, TBS 洗涤 4 次后显色。利用化学发光成像系统进行成像,以 Quantity One 4.6.6 软件计算相对灰度值用于表示蛋白表达水平。

2.5 大鼠空间学习记忆能力考察

给药结束 7 d 后(即大鼠 28 d 龄时),每组取 6 只大鼠,采用 Morris 水迷宫实验考察其空间学习记忆能力。第 1~5 天为平台训练阶段:将高 32 cm、直径 14 cm 的平台置于迷宫的一个象限中,位于水下 1 cm 处;大鼠从 4 个不同方向分 4 次随机放入迷宫中进行 2 min 的自由探索直至到达平台,以其到达平台的时间作为逃避潜伏期;2 min 内未找到平台的大鼠被引导至平台,并停留 15 s,逃避潜伏期记为 2 min。第 6 天为空间搜索阶段:将平台从迷宫中移除,大鼠从平台相对应的位置放入迷宫中,同法测试 2 min,以其穿过平台位置的次数作为穿台指数。采用 MT-200 Morris 水迷宫自动跟踪系统软件记录大鼠的活动情况并分析其逃避潜伏期和穿台指数。

2.6 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理。计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EPO 对大鼠脑组织梗死的影响

染色结果显示,Sham 组大鼠脑组织均呈红色,表明无梗死现象发生;HIBI 组大鼠大脑皮层、纹状体和海马组织等区域中有大片明显的白色梗死区域,EPO 组大鼠脑组织有小部分白色梗死区域,但较 HIBI 组的梗死情况明显改善,详见图 1。定量分析结果显示,与 Sham 组比较,HIBI 组大鼠脑梗死面积比显著升高;与 HIBI 组比较,EPO 组大鼠脑梗死面积比显著降低,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 2。

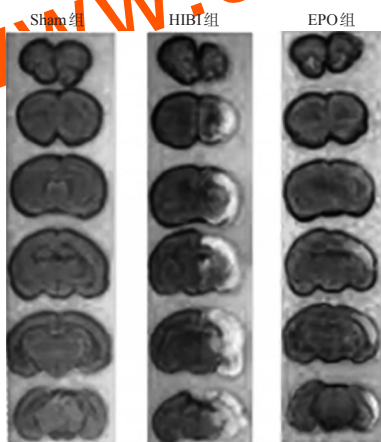
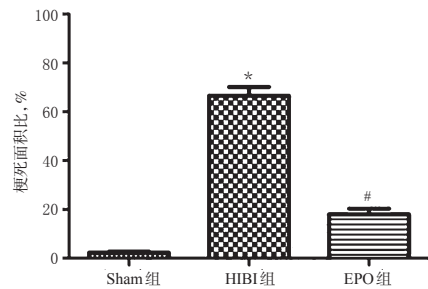


图 1 各组大鼠脑组织的 TTC 染色切片图

Fig 1 TTC staining chart of cerebral tissue of rats in each group

3.2 EPO 对大鼠海马组织 CA1 区神经细胞凋亡的影响

显微镜下可见,Sham 组大鼠海马组织 CA1 区未见明显呈绿色荧光的凋亡细胞;HIBI 组大鼠该区域组织有



注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$;与 HIBI 组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. Sham group,* $P < 0.05$; vs. HIBI group,# $P < 0.05$

图 2 各组大鼠脑组织梗死面积比比较($n = 4$)

Fig 2 Comparison of cerebral infarction area ratio of rats in each group($n = 4$)

大量呈绿色荧光的凋亡细胞,且细胞凋亡的荧光信号与神经细胞的分布一致;EPO 组大鼠该区域有少量呈绿色荧光的凋亡细胞,但较之 HIBI 组明显减少,详见图 3[图中,TUNEL 代表凋亡细胞分布图(绿色荧光);DAPI 代表神经细胞分布图(蓝色荧光);Merge 代表前两者的叠合图]。定量分析结果显示,与 Sham 组比较,HIBI 组大鼠海马组织 CA1 区中 TUNEL 阳性细胞数显著增加;与 HIBI 组比较,EPO 组大鼠该区域组织中 TUNEL 阳性细胞数显著减少,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 4。

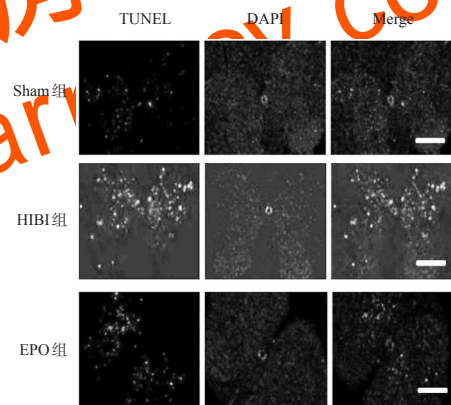


图 3 各组大鼠海马组织 CA1 区神经细胞的激光扫描共聚焦显微图($\times 200$)

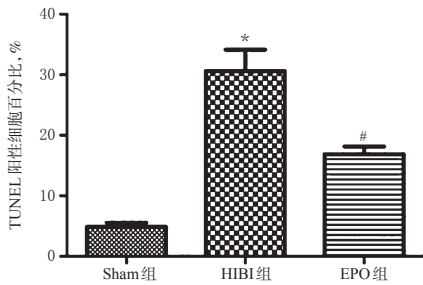
Fig 3 Laser scanning confocal microgram of neuron in hippocampal CA1 region of rats in each group($\times 200$)

3.3 EPO 对大鼠海马组织 CA1 区中 PARP-1、AIF、Bax 蛋白表达水平的影响

与 Sham 组比较,HIBI 组大鼠海马组织 CA1 区中 PARP-1、AIF、Bax 蛋白表达水平均显著升高;与 HIBI 组比较,EPO 组大鼠该区域组织中 PARP-1、AIF、Bax 蛋白表达水平均显著降低;以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠海马组织 CA1 区中 PARP-1、AIF、Bax 蛋白电泳图见图 5,蛋白表达水平比较见图 6。

3.4 EPO 对大鼠空间学习记忆能力的影响

在平台训练阶段,各组大鼠的逃避潜伏期均随着训



注:与Sham组比较,* $P<0.05$;与HIBI组比较,# $P<0.05$
Note: vs. Sham group, * $P<0.05$; vs. HIBI group, # $P<0.05$

图4 各组大鼠海马组织CA1区TUNEL阳性细胞数比较($n=6$)

Fig 4 Comparison of the number of TUNEL positive cells in hippocampal CA1 region of rats in each group ($n=6$)

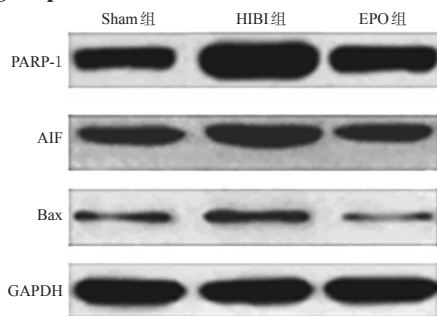
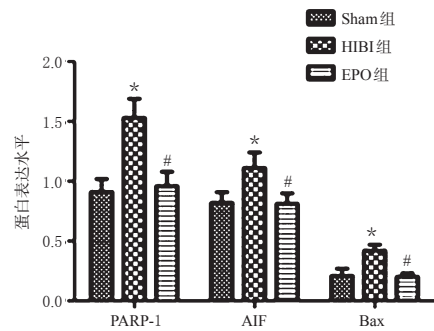


图5 各组大鼠海马组织CA1区中PARP-1、AIF、Bax蛋白电泳图

Fig 5 Electrophorogram of PARP-1, AIF and Bax protein in hippocampal CA1 region of rats in each group



注:与Sham组比较,* $P<0.05$;与HIBI组比较,# $P<0.05$
Note: vs. Sham group, * $P<0.05$; vs. HIBI group, # $P<0.05$

图6 各组大鼠海马组织CA1区中PARP-1、AIF、Bax蛋白表达水平比较($n=6$)

Fig 6 Comparison of the protein expression levels of PARP-1, AIF and Bax in hippocampal CA1 region of rats in each group ($n=6$)

练时间的推移和训练次数的增加而呈缩短趋势;与Sham组比较,HIBI组大鼠的逃避潜伏期在各时间点均显著延长;与HIBI组比较,EPO组大鼠的逃避潜伏期在各时间点均显著缩短;以上差异均有统计学差异($P<0.05$)。在空间搜索阶段,与Sham组比较,HIBI组大鼠的穿台指数显著减少;与HIBI组比较,EPO组大鼠的穿台指数显著增加;以上差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组大鼠的逃避潜伏期和穿台指数比较见表1。以上结果提示,大鼠发生HIBI后其空间学习记忆能力明显受损,而EPO能够逆转这一损伤,改善HIBI模型大鼠的认知功能。

表1 各组大鼠的逃避潜伏期和穿台指数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Comparison of escape latency and index of crossing the platform of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	n	逃避潜伏期, s					F	P	穿台指数
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天			
Sham组	6	50.87 ± 10.06	25.61 ± 10.88	29.12 ± 11.32	10.87 ± 6.95	8.82 ± 2.16	25.64	<0.01	5.38 ± 2.39
HIBI组	6	92.80 ± 26.69*	61.01 ± 8.75*	53.45 ± 19.45*	32.77 ± 13.81*	17.13 ± 5.37*	27.73	<0.01	1.99 ± 0.95*
EPO组	6	69.44 ± 12.32#	39.84 ± 16.33#	27.49 ± 13.17#	22.35 ± 9.77#	8.60 ± 1.49#	26.44	<0.01	3.25 ± 1.06#
F					3.97				4.19
P					<0.05				0.02

注:与Sham组比较,* $P<0.05$;与HIBI组比较,# $P<0.05$
Note: vs. Sham group, * $P<0.05$; vs. HIBI group, # $P<0.05$

4 讨论

有研究报道,缺氧缺血可引起新生大鼠海马部位大量神经细胞凋亡,且凋亡持续时间较长^[10-11]。本研究采用经典的Rice法^[8]对新生大鼠建立HIBI模型。结果显示,HIBI组大鼠缺血大脑半球皮层、纹状体和海马组织等区域表现出明显的梗死现象,表明模型建立成功。TUNEL法检测结果显示,HIBI组大鼠海马组织CA1区出现大量TUNEL阳性细胞,提示HIBI可导致海马组织CA1区神经细胞发生凋亡。已有研究证实,海马组织是对HIBI反应最为灵敏的部位,其中CA1区是与认知功能密切相关的脑区,该区发生神经损伤会显著影响大鼠

的学习记忆能力^[12]。本研究采用Morris水迷宫实验研究发现,HIBI组大鼠空间学习记忆能力显著降低,与过往研究^[13]结果一致。上述结果提示,HIBI能够引起海马组织CA1区的神经细胞凋亡,从而影响脑组织功能,导致大鼠认知功能障碍。

EPO是主要由胎儿肝脏和成人肾脏产生的糖蛋白,是红细胞生成所需的主要刺激因子^[14]。研究表明,EPO及其受体(EPOR)定位于啮齿类动物的大脑皮层、海马组织等区域^[15]。在包括脑卒中、脊髓损伤、创伤性脑损伤等多种实验模型中已证实,EPO具有神经保护功能,而外源性EPO治疗能够减轻脑组织病理学病变,有助于

神经功能恢复^[16-18]。本研究发现,EPO组大鼠缺血大脑半球的梗死面积比显著低于HIBI组,提示EPO对大鼠脑组织损伤有保护作用。TUNEL法检测结果显示,EPO组大鼠海马组织CA1区的神经细胞凋亡数显著少于HIBI组,提示EPO能有效抑制神经细胞凋亡。Morris水迷宫实验结果显示,EPO组大鼠空间学习记忆能力较之于HIBI组均有显著改善,提示EPO能够一定程度地恢复HIBI引起的大鼠认知功能障碍。

大量动物实验证明,EPO与EPOR结合后,可通过激活下游多种信号通路而发挥抑制神经细胞凋亡的作用,其中包括Caspase依赖的凋亡途径和非Caspase依赖的凋亡途径^[19-22]。AIF是定位于线粒体中的黄素蛋白,是非Caspase依赖凋亡途径的关键介质,在脑缺血损伤中起关键作用——AIF从线粒体中释放并转移至细胞核,引起大规模DNA断裂和神经细胞凋亡^[19-20]。PARP-1是引发AIF从线粒体释放并转移至细胞核的重要内在因素之一,在发生神经缺血损伤时PARP-1能够引起海马组织中AIF的释放^[21-22]。本研究采用Western blot法检测,结果显示,EPO能够显著降低大鼠海马组织CA1区中PARP-1、AIF蛋白表达水平,提示EPO的抗神经细胞凋亡作用可能与抑制PARP-1/AIF信号通路有关。

线粒体损伤是AIF释放的前提条件,也是细胞凋亡PARP-1/AIF信号通路的中心环节。Bcl-2家族蛋白作为调节线粒体损伤的关键分子,在这一途径中起着重要作用^[23]。Bax是Bcl-2家族中重要的促凋亡蛋白,在细胞凋亡调控中起重要作用,其表达水平的增高能够促使细胞发生凋亡^[24-25]。本研究显示,与HIBI组比较,EPO组大鼠海马组织中Bax蛋白表达水平显著降低,表明EPO能够通过下调Bax表达,抑制PARP-1/AIF信号通路,从而发挥抗神经细胞凋亡的作用。

笔者在前期预实验中曾对EPO高、中、低3个剂量(15 000、10 000、5 000 IU/kg)进行考察,结果发现高、中剂量组大鼠各项指标与HIBI组比较差异无统计学意义,未能对大鼠认知功能产生显著的改善作用,这与已有报道结果不一致。因此,本研究最终选择5 000 IU/kg作为EPO的给药剂量进行实验。而对于高、中剂量组非但未呈现剂量依赖性药效,反而表现出用药量增大而效果下降的原因,有待后续设计实验进一步研究和分析。

综上所述,HIBI造模后,新生大鼠表现出明显的脑组织损伤及海马组织神经细胞凋亡,而EPO干预后能够明显抑制大鼠神经细胞凋亡从而发挥脑组织保护作用,并能促进大鼠认知功能的恢复,这一作用很可能是通过抑制细胞凋亡PARP-1/AIF信号通路来实现的。

参考文献

[1] PALMER C, MENZIES SL, ROBERTS RL, et al. Changes in iron histochemistry after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat[J]. *J Neurosci Res*, 2015, 56(1): 60-71.

[2] 陈长春,尹晓娟. 锂对缺氧缺血性脑损伤神经修复机制

研究进展[J]. *中国儿童保健杂志*, 2016, 24(2): 156-159.

[3] KIM HS, CHO IH, KIM JE, et al. Ethyl pyruvate has an anti-inflammatory effect by inhibiting ROS-dependent STAT signaling in activated microglia[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(7): 950-963.

[4] TOKUMARU O, KUROKI C, YOSHIMURA N, et al. Neuroprotective effects of ethyl pyruvate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion injury: a ³¹P-nuclear magnetic resonance study[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4): 775-785.

[5] 王军,程萍萍,袁俊英,等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织神经细胞凋亡情况及Tau、p-Tau蛋白表达变化[J]. *山东医药*, 2016, 56(15): 36-38.

[6] WU YW, GONZALEZ FF. Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy?[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2015, 57(S3): 34-39.

[7] TORUN YA, OZDEMIR MA, ULGER H, et al. Erythropoietin improves brain development in short-term hypoxia in rat embryo cultures[J]. *Brain Dev*, 2014, 36(10): 864-869.

[8] DEMAREST TG, WAITE EL, KRISTIAN T, et al. Sex-dependent mitophagy and neuronal death following rat neonatal hypoxia-ischemia[J]. *Neuroscience*, 2016, 335: 103-113.

[9] 孙晓彩,李力,张敏,等. Wistar大鼠海马CA1区、CA3区和齿状回区的解剖分割[J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(2): 189-192.

[10] PEREZ A, RITTER S, BROTSCHI B, et al. Long-term neurodevelopmental outcome with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *J Pediatr*, 2013, 163(2): 454-459.

[11] 段淼,曹云涛. 促红细胞生成素对新生鼠缺氧缺血性脑损伤后5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 23(31): 2337-2339.

[12] POURKHODADAD S, ALIREZAEI M, MOGHADDASI M, et al. Neuroprotective effects of oleuropein against cognitive dysfunction induced by colchicine in hippocampal CA1 area in rats[J]. *J Physiol Sci*, 2016, 66(5): 397-405.

[13] DING HF, ZHANG H, DING HF, et al. Therapeutic effect of placenta-derived mesenchymal stem cells on hypoxic-ischemic brain damage in rats[J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(1): 74-82.

[14] RANGARAJAN V, JUUL SE. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 51(4): 481-488.

[15] DIGICAYLIOGLU M, BICHET S, MARTI HH, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(9): 3717-3720.

[16] GONZALEZ FF, LARPTHAVEESARP A, MCQUILLEN P, et al. Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial precursor cells after neonatal stroke[J]. *Stroke*, 2013, 44(3): 753-758.

妇科再造丸的体外溶出度测定[△]

郑晓霞*, 徐 剑#, 田洪星, 胡 蝶, 刘 慧(贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

中图分类号 R283.6;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2497-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.12

摘要 目的:建立测定妇科再造丸体外溶出度的方法。方法:采用高效液相色谱法测定制剂中黄芩苷和橙皮苷的含量,色谱柱为WondaSil-C₁₈,流动相为0.2%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL;采用桨法测定制剂的累积溶出度,溶出介质为磷酸盐缓冲液(pH 6.8),转速为100 r/min,温度为(37±0.5)℃,取样量为2 mL。结果:黄芩苷和橙皮苷检测质量浓度线性范围分别为6.936~23.12 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.620~3.10 μg/mL($r=0.999\ 0$);定量限分别为4.624、0.620 μg/mL,检测限分别为2.312、0.155 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为95.28%~99.22%(RSD=0.97%, $n=9$)、96.10%~99.84%(RSD=1.98%, $n=9$)。样品中黄芩苷和橙皮苷10 h时的平均累积溶出度分别为(97.10±0.09)%、(78.50±0.08)%;溶出63.2%所需时间($T_{63.2}$)分别为(1.88±0.12)、(3.26±0.10)h,溶出50%所需时间(T_{50})分别为(0.88±0.09)、(1.67±0.14)h。结论:该方法操作简便、准确,可用于妇科再造丸的体外溶出度测定。

关键词 妇科再造丸;桨法;体外溶出度

Detection on *in vitro* Dissolution of Fuke Zaizao Pills

ZHENG Xiaoxia, XU Jian, TIAN Hongxing, HU Die, LIU Hui(Pharmacy of College, Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of *in vitro* dissolution of Fuke zaizao pills. METHODS: HPLC method was adopted to determine the contents of baicalin and hesperidin in preparation. The determination was performed on WondaSil-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.2% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. The dissolution of the preparation was determined by paddle method using phosphate buffer solution (pH 6.8) as dissolution medium with rotate speed of 100 r/min, temperature was (37±0.5)℃, sample size was 2 mL. RESULTS: The linear range of baicalin and hesperidin

- [17] FREITAG MT, MÁRTON G, PAJER K, et al. Monitoring of short-term erythropoietin therapy in rats with acute spinal cord injury using manganese-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *J Neuroimaging*, 2015, 25(4):582-589.
- [18] BOUZAT P, MILLET A, BOUE Y, et al. Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin[J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(5):1316-1324.
- [19] NAKKA VP, GUSAIN A, MEHTA SL, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities[J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 37(1):7-38.
- [20] PLESNILA N, ZHU C, CULMSEE C, et al. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(4):458-466.
- [21] CAO G, XING J, XIAO X, et al. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(35):9278-9293.
- [22] CHIARUGI A. Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(3):122-129.
- [23] MOUBARAK RS, YUSTE VJ, ARTUS C, et al. Sequential activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13):4844-4862.
- [24] KOKAWA K, SHIKONE T, OTANI T, et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. *Cancer*, 2015, 85(8):1799-1809.
- [25] ZHANG T, TIAN F, WANG J, et al. Atherosclerosis-associated endothelial cell apoptosis by MiR-429-mediated down regulation of Bcl-2[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4):1421-1430.

△ 基金项目:国家苗药工程技术研究中心组建项目(No.2014FU125Q09);贵州省科学技术基金项目(No.黔科合LH字[2014]7332号);贵州省普通高等学校工程研究中心项目(No.黔教合KY字[2014]22号);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(No.黔科合人字[2015]23号);贵州省普通高等学校特色重点实验室建设项目(No.黔教合KY字[2016]005)

* 硕士研究生。研究方向:中药、民族药的新剂型及新制剂。E-mail:935122907@qq.com

通信作者:教授。研究方向:中药、民族药的新剂型及新制剂。E-mail:10423108@qq.com

(收稿日期:2018-01-19 修回日期:2018-08-02)
(编辑:段思怡)