

# 枸杞多糖对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用

王 昕<sup>1\*</sup>, 陈莉芬<sup>1#</sup>, 谭昌洪<sup>2</sup>, 谢代鑫<sup>3</sup>(1.重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010; 2.重庆市第六人民医院, 重庆 400060; 3.重庆市第三人民医院, 重庆 400014)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1365-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.07

**摘要** 目的:研究枸杞多糖对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用。方法:采用线栓法复制大鼠脑缺血再灌注损伤模型。84只SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、尼莫地平(0.5 mg/kg)组与枸杞多糖高、中、低剂量(60.0、30.0、15.0 mg/kg)组。于复制模型前2 d开始灌胃给药,每天2次,连续3 d。对大鼠进行神经症状评分,测定大鼠脑含水量,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法测定半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-12 mRNA的表达,Western blot法测定Caspase-12蛋白的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经症状评分、脑含水量增加,Caspase-12 mRNA和蛋白表达增强,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,枸杞多糖高、中剂量组大鼠神经症状评分、脑含水量减少,Caspase-12 mRNA和蛋白表达减弱,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。结论:枸杞多糖对脑缺血再灌注损伤模型大鼠有一定保护作用,其机制与减少神经症状评分、脑含水量及调节Caspase-12 mRNA与蛋白的表达有关。

**关键词** 枸杞多糖;大鼠;脑缺血再灌注;半胱氨酸蛋白酶-12

## Protective Effect of *Lycium barbarum* Polysaccharides on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

WANG Xin<sup>1</sup>, CHEN Li-fen<sup>1</sup>, TAN Chang-hong<sup>2</sup>, XIE Dai-xin<sup>3</sup> (1.The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2.Chongqing Sixth People's Hospital, Chongqing 400060, China; 3.Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400014, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. METHODS: Cerebral ischemia-reperfusion injury was induced by suture method. 84 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), nimodipine group (0.5 mg/kg), *L. barbarum* polysaccharide high-dose, medium-dose, low-dose groups (60.0, 30.0, 15.0 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically 2 days before modeling, twice a day, for consecutive 3 days. Neural symptoms score and the determination of water content in cerebral tissue were carried out. RT-PCR method was used to determine the expression of caspase-12 mRNA, and Western blot method was used to determine the expression of Caspase-12 protein. RESULTS: Compared with sham operation group, the neurological symptom score, brain water content, and the expression of caspase-12 mRNA and protein were all significantly increased; there was statistical significance ( $P<0.01$ ). Compared with model group, neurological symptom score, brain water content, the expression of Caspase-12 mRNA and protein were all significantly decreased. there was statistical significance ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: *L. barbarum* polysaccharide can protect the rat from cerebral ischemia-reperfusion injury, Which maybe associated with the reduction of neural symptoms score and brain water content, and the regulation of Caspase-12 mRNA and protein expression.

**KEYWORDS** *Lycium barbarum* polysaccharide; Rat; Cerebral ischemia-reperfusion; Caspase-12

脑缺血再灌注损伤可造成神经元的坏死与凋亡,是脑梗死后遗症产生的主要因素之一,而神经元凋亡会引发机体产生一系列病理生理反应,因此减轻神经元凋亡对保护脑功能具有重要意义<sup>[1]</sup>。半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族与凋亡关系密切,Caspase-12前体位于细胞内质网中,是细胞凋亡的内质网相关性死亡途径<sup>[2]</sup>。枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides)是从宁夏特色植物枸杞(*Lycium bararum*)中分离出的主要多糖之一。现代药理学研究证实,枸杞多糖有多种药理学作用,如抗衰老、抗肿瘤、促免疫等<sup>[3-4]</sup>,但对脑卒中保护还未

见文献报道。本研究拟通过大鼠脑缺血再灌注损伤模型,观察枸杞多糖是否对其具有保护作用,为临床脑缺血、脑卒中的治疗提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Mini-PROTEAN3型垂直板式电泳仪(美国Bio-Rad公司);电子天平(上海精科实业有限公司);HMIAS-2000型高清晰度彩色病理图文分析系统(武汉同济医科大学)。

### 1.2 药品与试剂

枸杞多糖(上海源叶生物科技有限公司,批号:91087,纯度: $>98\%$ );兔抗Caspase-12抗体(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物(HRP)羊抗兔IgG(瑞典Amersham公司);逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(大连宝生物技术有限公司)。

\* 主治医师,硕士研究生。研究方向:脑血管疾病。E-mail: 13883838116@163.com

# 通信作者:副主任医师。研究方向:脑血管疾病。E-mail: lifen\_chen@163.com

### 1.3 动物

SPF级SD大鼠84只,♀♂兼半,体质量220~240 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(渝)2011-0002]。

## 2 方法

### 2.1 模型的复制

参照改良的Longa法<sup>[5]</sup>,采用线栓法复制大鼠脑缺血再灌注损伤模型。ip 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠,将其仰卧固定,于颈部皮肤行常规纵行切口(约25.0 mm),暴露并钝性游离右侧颈总动脉(CCA),结扎同侧CCA近心端和颈外动脉(ECA)分叉部并反向拉直ECA,距CCA末端约5 mm处剪口,用直径0.26 mm的鱼线沿颈内动脉(ICA)方向插入,深度由分叉部算约计(18.5±0.5) mm,于ICA近心端结扎,全层缝合切口,阻断2 h后,再灌注时抽出鱼线10 mm,术中室温保持(22±2)℃。模型复制成功的判定标准:大鼠手术麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪,无力,站立不稳,提尾时左侧前爪抱爪。假手术对照仅线栓插入深度小于9 mm,不闭塞大脑中动脉。

### 2.2 分组与给药

84只SD大鼠随机均分为7组,即正常对照(等容生理盐水)组、假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、尼莫地平(0.5 mg/kg)组与枸杞多糖高、中、低剂量(60.0、30.0、15.0 mg/kg)组。于复制模型前2 d开始ig给药,每天2次,连续3 d。

### 2.3 指标的测定

2.3.1 神经症状评分 参考文献评分标准<sup>[6]</sup>,缺血2 h再灌注24 h后观察各组大鼠行为。0分:无任何神经功能缺失;1分:左前爪不能完全伸直;2分:向左侧行走;3分:向左侧转圈成追尾状;4分:不能自行行走,意识丧失。

2.3.2 脑组织含水量的测定 缺血2 h再灌注24 h后各组随机选取6只大鼠,麻醉后断头取脑,切开大鼠两侧大脑半球,左右各取两侧皮层区和基底节区两个部位的脑组织0.2 g,用电子天平称定其湿质量,在100℃烤箱中烘烤72 h后再称定其干质量。根据公式计算出脑组织含水量:脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

2.3.3 RT-PCR法测定Caspase-12 mRNA的表达<sup>[6]</sup> Caspase-12引物序列为上游:5'-TCCTGGTCTTTATGTCCC-3'(GenBank NM-130422),下游:5'-CGATAGCCCAAGGAAGT-G3'(GenBank NM-130422),片段长度:180 bp;内参β-actin引物序列为上游:5'-CACCTGTGCTGCTCACCGAGGCC-3',下游:5'-CCACACAGATGACTTGCGCTCAGG-3',片段长度:690 bp。PCR体系:ddH<sub>2</sub>O 17.1 μl, cDNA 3 μl, 10×buffer 2.5 μl, dNTPs (2.5 mmol) 2 μl, Taq-E (5 u/L) 0.2 μl, Caspase-12、β-actin上下游引物各0.1 μl。反应条件:94℃ 10 min预变性,94℃ 40 s变性,51.5℃ 1 min退火,72℃ 1 min延伸,32个循环,72℃ 7 min终止。

2.3.4 Western blot法测定Caspase-12蛋白的表达 大鼠迅速断头取脑,冰上分离缺血侧顶叶大脑皮质约100 mg,冰上研磨组织后加预冷的蛋白裂解液,继续碾磨至液态,然后于4℃下,以离心半径为8 cm、12 000 r/min离心30 min,留上清液,取40 μl用BCA法进行蛋白定量测定,所剩上清液按4:1(V/V)的比例加变性PAGE胶上样缓冲液,100℃下水浴10 min。取蛋白样品(40 μg)采用10% SDS-PAGE垂直电泳进行分离,然

后转至PVDF膜上进行免疫反应。5%脱脂奶粉37℃封闭2 h,然后依次加入兔抗Caspase-12抗体,37℃孵育2 h,4℃过夜;偶联用HRP羊抗兔IgG室温孵育2 h,LumiGLO(20×)发光剂中X-感光盒内曝光。以上反应均在塑料袋内进行,其间用PBS充分洗涤。将胶片进行扫描或拍照,采用病理图文分析系统进行图像分析,获取各组蛋白条带的平均光密度(OD),内参为GAPDH,目的蛋白与内参光密度比值即为目的蛋白的相对值。

### 2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件处理分析实验数据。等级计数资料用Ridit法统计,计数资料用方差分析;多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 枸杞多糖对模型大鼠神经症状评分的影响

正常对照组与假手术组大鼠神经症状均正常;模型组大鼠神经症状评分增加,与假手术组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明模型复制成功;与模型组比较,枸杞多糖高、中剂量组大鼠神经症状评分减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),表明受损机体得到一定修复。枸杞多糖对模型大鼠神经症状评分的影响见表1。

表1 枸杞多糖对模型大鼠神经症状评分的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effects of *L. barbarum* polysaccharide on neural symptoms score of model rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量,mg/kg	n	神经症状评分
正常对照组		12	0
假手术组		12	0
模型组		12	2.53±0.47*
尼莫地平组	0.5	12	1.46±0.39**
枸杞多糖高剂量组	60.0	12	1.51±0.45**
枸杞多糖中剂量组	30.0	12	1.87±0.52*
枸杞多糖低剂量组	15.0	12	2.24±0.59

与假手术组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$   
vs.sham-operation group: \* $P < 0.01$ ;vs.model group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.2 枸杞多糖对模型大鼠脑组织含水量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑含水量增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,枸杞多糖高、中剂量组大鼠脑含水量减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。枸杞多糖对模型大鼠脑组织含水量的影响见表2。

表2 枸杞多糖对模型大鼠脑组织含水量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Effects of *L. barbarum* polysaccharide on water content of cerebral tissue in model rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量,mg/kg	n	脑含水量,%
正常对照组		6	75.43±0.64
假手术组		6	76.02±0.63
模型组		6	86.59±0.72*
尼莫地平组	0.5	6	78.38±0.71**
枸杞多糖高剂量组	60.0	6	78.96±0.75**
枸杞多糖中剂量组	30.0	6	81.45±0.76*
枸杞多糖低剂量组	15.0	6	83.81±0.82

与假手术组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$   
vs.sham-operation group: \* $P < 0.01$ ;vs.model group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.3 枸杞多糖对模型大鼠脑组织 Caspase-12 mRNA 表达的影响

由前述实验可看出,枸杞多糖低剂量组未达到明显变化,因此,以下实验采用枸杞多糖高、中剂量组进行。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 Caspase-12 mRNA 表达增强,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,枸杞多糖高、中剂量组大鼠脑组织 Caspase-12 mRNA 表达减弱,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。Caspase-12 mRNA 的表达见图1。

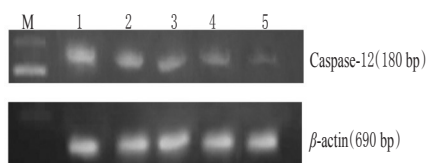


图1 Caspase-12 mRNA 的表达

1.模型组;2.枸杞多糖中剂量组;3.枸杞多糖高剂量组;4.尼莫地平组;5.假手术组;M.蛋白标记

Fig 1 The expression of Caspase-12 mRNA

1. model group; 2. *L. barbarum* polysaccharide medium-dose group, 3. *L. barbarum* polysaccharide high-dose group; 4. nimodipine group; 5. sham-operation group; M. Mark

### 3.4 枸杞多糖对模型大鼠脑组织 Caspase-12 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 Caspase-12 蛋白表达增强,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,枸杞多糖高、中剂量组大鼠脑组织 Caspase-12 蛋白表达减弱,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。Caspase-12 蛋白的表达见图2。

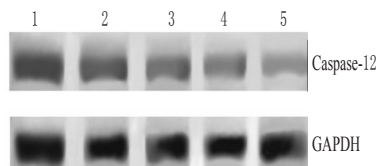


图2 Caspase-12 蛋白的表达

1.模型组;2.枸杞多糖中剂量组;3.枸杞多糖高剂量组;4.尼莫地平组;5.假手术组

Fig 2 The expression of Caspase-12 protein

1. model group; 2. *L. barbarum* polysaccharide medium-dose group, 3. *L. barbarum* polysaccharide high-dose group; 4. nimodipine group; 5. sham-operation group

## 4 讨论

脑缺血再灌注损伤是引起多种脑血管病的重要病理生理机制,故抗脑缺血再灌注损伤是治疗脑梗死的有效措施。许多中药对脑缺血再灌注损伤有保护作用,主要表现为抗氧化及病理损伤、减轻兴奋性氨基酸的神经毒性、清除自由基、减轻钙超载、影响血小板与血栓形成、影响基因表达与凋亡调控等诸方面<sup>[7-9]</sup>。本研究采用大鼠脑缺血再灌注损伤模型探讨枸杞多糖对脑缺血再灌注损伤的影响,结果表明,枸杞多糖可以明显减少缺血再灌注损伤模型大鼠脑含水量,减轻脑水肿,说明其具有明显的脑保护作用。

Mouw G 等<sup>[9-10]</sup>发现,敲除 Caspase-12 基因的细胞虽然仍

对其他各种凋亡诱导因素敏感,但对内质网应激诱导的凋亡却产生耐受,说明 Caspase-12 在内质网应激诱导的凋亡通路中具有重要作用。本研究表明,枸杞多糖可以明显减弱脑缺血再灌注损伤模型大鼠 Caspase-12 mRNA 与蛋白的表达,说明其可通过抑制 Caspase-12 酶的活性进而稳定内质网从而起到抑制神经细胞凋亡的作用。

本研究表明,高、中剂量枸杞多糖可使脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经症状评分减少、脑含水量减少、Caspase-12 mRNA 及蛋白表达减弱,说明枸杞多糖对脑缺血再灌注损伤模型大鼠有一定保护作用。

## 参考文献

- [1] Li Q, Huang XJ, He W, *et al.* Neuroprotective potential of fasudil mesylate in brain sschemia-reperfusion injury of rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(2): 169.
- [2] 张建华, 赵泽燕, 张华. Caspase-12 在胎鼠宫内缺血/再灌注后脑神经元凋亡中的作用[J]. *重庆医学*, 2007, 36(9): 834.
- [3] Gan L, Hua ZS, Liang YX, *et al.* Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(4): 563.
- [4] Yu MS, Ho YSh, Yuen WH, *et al.* Cytoprotective effects of *Lycium barbarum* against reducing stress on endoplasmic reticulum[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17(6): 1 157.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [6] 张鸿, 宋利春, 贾春红, 等. 大鼠脑缺血/再灌注后神经元凋亡及 Caspase-12 mRNA 和蛋白表达的改变[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(8): 1 069.
- [7] 王宝亮, 韩艳丽. 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(3): 138.
- [8] 杨德森, 游秋云, 田先翔, 等. 红景天苷对老龄大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(9): 738.
- [9] Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, *et al.* Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat[J]. *Neuroreport*, 2003, 14(2): 183.
- [10] Hu Q, Lee SY, O'Kusky JR, *et al.* Signalling through the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) interacts with canonical Wnt signalling to promote neural proliferation in developing brain[J]. *ASN Neuro*, 2012, 4(5): 92.

(收稿日期:2014-01-04 修回日期:2014-02-15)