

人参皂甙 Rd 抑制大鼠局灶性脑缺血后趋化因子 CXCL1 和 γ - 干扰素的蛋白表达

张云霞 赵 钢[△] 史 明 周林甫

(第四军医大学附属西京医院神经内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究人参皂甙 Rd(Ginsenoside-Rd, GS-Rd)在大鼠局灶性脑缺血后对炎症趋化因子 CXCL1 和 γ - 干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)的影响。方法: 将 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常组(n=5), 假手术组(n=5), GS-Rd 对照组(n=5), 大脑中动脉栓塞模型(MCAO)组(n=20), MCAO+GS-Rd 组(n=20)。正常组不做任何处理, 假手术组进行大脑中动脉栓塞手术, 但不插入栓线, GS-Rd 对照组给予腹腔注射 10 mg/Kg GS-Rd, 不进行手术, MCAO 组(n=20)和 MCAO+GS-Rd 组(n=20)进行大脑中动脉栓塞手术, 术后 2 小时拔出栓线, MCAO+GS-Rd 组在术前 15 分钟腹腔注射 10 mg/Kg GS-Rd。在 12 小时、1 天、3 天、7 天四个时间点分别提取脑组织蛋白, 通过液相芯片技术检测 CXCL1, IFN- γ 含量。结果: 正常组、假手术组和 GS-Rd 对照组间 CXCL1, IFN- γ 含量无统计学差异; 与三个对照组相比, MCAO 组和 MCAO+GS-Rd 组中 CXCL1, IFN- γ 蛋白含量均有明显增加($P<0.05$); 而与 MCAO 组相比, MCAO+GS-Rd 组 CXCL1, IFN- γ 的生成明显减少($P<0.05$)。结论: 10 mg/Kg GS-Rd 预处理可有效抑制大鼠短暂性脑缺血后 CXCL1, IFN- γ 的生成, 通过抑制炎症反应, GS-Rd 可能在神经保护中发挥重要的作用。

关键词: 人参皂甙 Rd, 液相芯片, 趋化因子 CXCL1, γ - 干扰素

中图分类号: Q95-3, R743.31 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)06-1059-04

Ginsenoside-Rd Inhibits CXCL1 and Interferon- γ Protein Expressions in Rats after Focal Cerebral Ischemia

ZHANG Yun-xia, ZHAO Gang[△], SHI Ming, ZHOU Lin-fu

(Department of Neurology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Ginsenoside-Rd (GS-Rd) on protein expression of CXCL1 and IFN- γ (interferon- γ , IFN- γ) in rats after focal cerebral ischemia. **Methods:** A total of 55 rats were randomly divided into the five groups: blank group (n=5); Sham group (n=5), with surgery but no occlusion; GS-Rd group (n=5), with 10 mg/kg GS-Rd treatment but no surgery; middle cerebral artery occlusion(MCAO) group (n=20), with vehicle application before surgery; MCAO+GS-Rd group (n=20), with 10 mg/kg GS-Rd treatment before MCAO. After 2 h of occlusion, the suture was carefully removed to restore blood flow. Then the brain protein were extracted respectively at 12hour, 1day, 3day, 7day and were tested by LUMINEX 200. **Results:** Our results showed that the protein levels of CXCL1 and IFN- γ were significantly increased after MCAO insult at all time points ($p<0.05$). Pretreatment of 10 ml/kg GS-Rd inhibited MCAO-induced protein expressions of CXCL1 and IFN- γ ($p<0.05$). **Conclusion:** These results suggest that neuroprotection of GS-Rd following cerebral ischemia may be at least due to inhibition of the proteins expression of CXCL1 and IFN- γ .

Key words: Ginsenoside-Rd; Luminex xMAP technology; CXCL1; IFN- γ

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R743.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1059-04

前言

缺血性脑血管疾病是世界范围内最常见的致死和致残的原因之一, 有着重要的临床和社会经济的影响^[1]。针对这一疾病, 大量药物的基础和临床研究都未能取得突破性进展^[2,3]。人参和三七是我国传统药物, 有着上千年的临床应用史, 由于药理作用广泛, 使用安全而被应用于多种疾病的治疗。作为它们的主要有效成分之一, 人参皂甙 Rd(Ginsenoside-Rd, GS-Rd)已被证实具有神经保护作用^[4-6], 但作用机制并不完全清楚。本研

究探讨 GS-Rd 对于脑缺血再灌注后趋化因子 CXCL1 和 IFN- γ 的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器和药物

GS-Rd 由广州泰禾生物药业有限公司提供。栓线(2838-4A)由北京沙东生物技术公司提供; 水合氯醛由上海生物技术公司提供; 蛋白裂解液(P0013C)和蛋白定量试剂盒(P0012-1)由上海碧云天生物技术有限公司提供; IFN- γ 和 CXCL1 检测试剂盒为 MILLIPLEX MAP RAT CYTOKINE KIT, 由 MILLIPORE 公司提供; 4℃离心机(5417R)由 EPPENDORF 公司提供; LUMINEX200 由美国 LUMINEX 公司提供。

1.2 动物分组和模型制作

一级雄性 SD 大鼠 55 只, 由第四军医大学实验动物中心

作者简介: 张云霞(1985-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 脑血管疾病和脑保护, 电话: 029-84775368, E-mail: halo712@live.cn

[△]通讯作者: 赵钢, 电话: 029-84775361,

E-mail: zhaogang@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2010-11-07 接受日期: 2010-11-30)

提供,体重 250-300 g,分笼饲养于安静环境中。动物室温度控制在 20-24℃,湿度控制在 50 %左右,动物自由进食、饮水,正常日光周期。饲养一周后,将大鼠随机分组:正常对照组(不进行任何处理, $n=5$)、假手术组(不给予药物,手术未插栓线梗阻, $n=5$)、GS-Rd 对照组(给予 GS-Rd,不进行手术, $n=5$)、MCAO 组($n=20$)、MCAO+GS-Rd 组(术前 15 分钟给予 10 mg/kg GS-Rd, $n=20$)。所有手术动物术前禁食 12 小时,自由饮水,SD 大鼠以 10 %水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射实施麻醉。用插线法制备 MCAO 模型^[7,8]。动物麻醉后取仰卧位,颈正中切口,暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎 CCA 和 ECA,于 CCA 分叉下方剪一小口,将预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线置入 ICA 约 18-20 mm,至有轻微阻力感为止。阻断 2 小时后抽出尼龙线,形成再灌注,并缝合皮肤结束手术。术后以出现对侧轻偏瘫(行走时向左侧跌倒或转圈)为手术成功的标志。术后每只动物腹腔注射生理盐水 5 ml,单笼饲养。假手术组动物实验操作同上,但不将尼龙线插入 ICA。

1.3 蛋白提取和定量

分别在术后 12 小时、1 天、3 天和 7 天四个时间点,将术后大鼠以 10 %水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后,断头取出脑组织,浸在冰 PBS 中冲洗,分为正常对照、假手术对照、GS-Rd 对照、MCAO+GS-Rd 半影区和梗死区、MCAO+GS-Rd 半影区和梗死区分别放入匀浆器(已加入配好的裂解液)。其中,缺血梗死区为缺血侧大脑半球距离嗅球尖端 7-11 mm,矢状裂至外侧裂下 2/3 的皮质;缺血半影区则为上 1/3 皮质。研磨 30 分钟

至无肉眼可见的组织块后,转移液体到预冷的 1.5 ml EP 管中,4 度离心机 12000 转离心 30 分钟。吸出上清,80 度保存。整个过程需在冰上进行。使用蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,计算蛋白浓度,调整所有待测蛋白浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.4 使用 LUMINEX200 检测细胞因子

使用 LUMINEX200 检测样本蛋白中 CXCL1 和 IFN- γ 的含量。

1.5 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析,两组间均数比较用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 CXCL1 的检测结果

CXCL1 正常大鼠脑组织中表达量很低,假手术组和 Rd 对照组与正常对照组之间无统计学差异。在脑缺血再灌注后,12 小时 CXCL1 含量开始升高,1 天时达到高峰,3 天和 7 天 CXCL1 的含量较 12 小时和 1 天减少,但与对照组相比仍有统计学意义($P < 0.05$)。使用 GS-Rd 预处理 15 分钟后,各个时间点的 CXCL1 含量与 MCAO 组比较均有明显减低,但仍然高于三个对照组($P < 0.05$)。半影区和梗死区 CXCL1 变化趋势相同(见图 1A、1B)

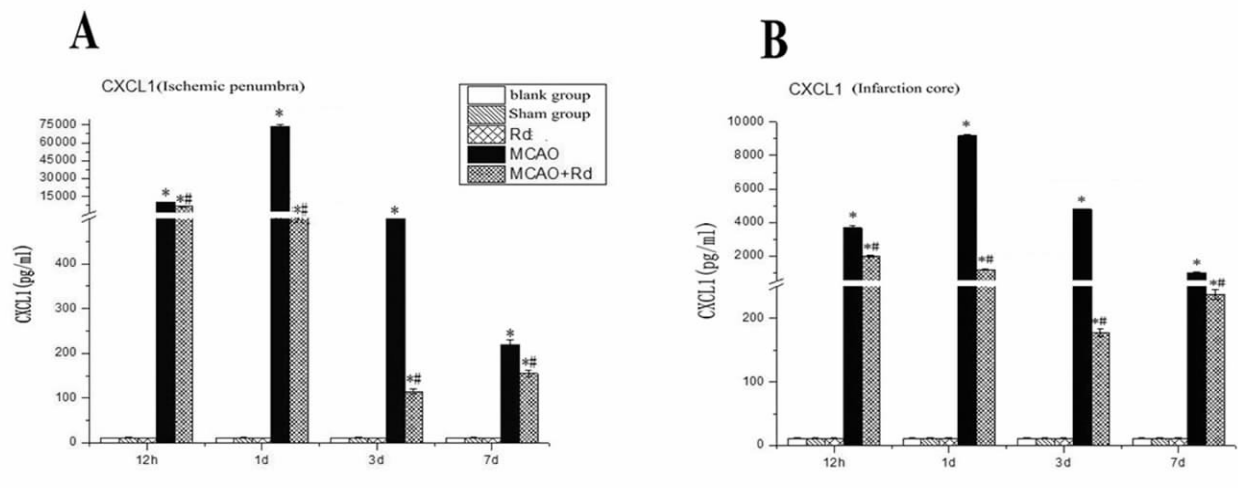


图 1 半影区(A)和梗死区(B)CXCL1 蛋白水平变化

Fig. 1 The protein level of CXCL1 (pg/ml) in ischemic penumbra (A) and infarction core (B)

注: * $P < 0.05$ MCAO 组和 MCAO+GS-Rd 组与正常组、假手术组和 GS-Rd 对照组相比; # $P < 0.05$ MCAO 组与 MCAO+GS-Rd 组相比。

Note: * $P < 0.05$ MCAO group and MCAO+GS-Rd group compared with control groups; # $P < 0.05$ MCAO group compared with MCAO+GS-Rd group.

2.2 IFN- γ 的检测结果

IFN- γ 正常含量较低,假手术组和 Rd 对照组与正常对照组之间无统计学差异。而缺血再灌注后,各个时间点 IFN- γ 的含量显著高于三个对照组($P < 0.05$),并且在 1 d 天后达到高峰。在使用 GS-Rd 预处理后,各个时间点的 IFN- γ 生成均受到抑制,与 MCAO 组相比含量降低($P < 0.05$),但仍高于三个对照组($P < 0.05$)。半影区和梗死区 IFN- γ 变化趋势相同。(见图 2A、2B)

3 讨论

缺血性脑血管疾病的主要病理过程是脑缺血再灌注损伤,氧化应激损伤、能量代谢障碍、兴奋性毒性损伤和钙超载等参与此过程,但新近的研究表明,炎症免疫反应亦参与此病理过程^[9],通过抑制炎症反应来减轻脑缺血再灌注的损伤程度成为脑保护的新思路。

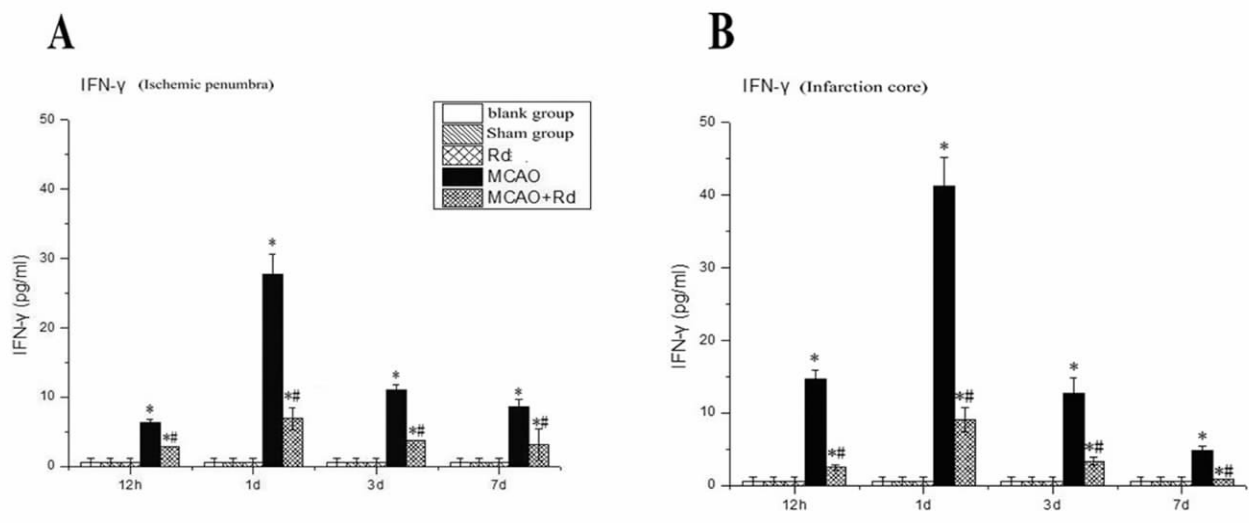


图2 半影区(A)和梗死区(B)IFN-γ 蛋白水平变化

注 * $P < 0.05$ MCAO 组和 MCAO+GS-Rd 组与正常组、假手术组和 GS-Rd 对照组相比 # $P < 0.05$ MCAO 组与 MCAO+GS-Rd 组相比。

Fig. 2 The protein level of IFN-γ (pg/ml) in ischemic penumbra (A) and infarction core (B)

Note: * $P < 0.05$ MCAO group and MCAO+GS-Rd group compared with control groups # $P < 0.05$ MCAO group compared with MCAO+GS-Rd group.

人参和三七是五加科人参属植物,人参皂甙(Ginsenoside, GS)是发挥重要作用的有效活性成分。目前已从人参中分离提取出了 40 多种人参皂甙单体。按照这些单体的化学结构,可分为达玛烷型和齐墩果烷型,其中达玛烷型是最主要的活性组分。Yu 等^[9]指出人参总皂甙可以抑制老年大鼠慢性炎症反应中 IL-1 β 和 IL-6 的表达,Rhule 等^[10]证实三七提取物不仅能够浓度依赖性地抑制肿瘤坏死因子 TNF- α 和 IL-6 的产生,还可以减少 COX-2 和 IL-1 β mRNA 的表达,降低巨噬细胞表达共刺激分子 CD40 和 CD86,而其单体 GSRb1 和 GSRg1 能够抑制 TNF- α 的产生。Wu^[11]等研究报道,GS-Rd、GS-Rb2、GS-Rg1、GS-Re 可以抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症损伤。这些研究均表明人参和三七具有明显的抗炎作用。GS-Rd 属于二醇型的达玛烷型皂甙。既往研究表明 GS-Rd 可以减轻过氧化氢对 PC12 细胞的毒性损伤作用^[4],提高氧糖剥离模型中神经元细胞的存活率,减低活性氧簇和丙二醛的水平,提高超氧化物歧化酶活性,稳定线粒体膜电位,从而抑制氧化应激损伤^[5],改善大鼠缺血再灌注损伤后的神经功能评分,减少脑梗死体积,还可以抑制高浓度谷氨酸 NMDA(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)引起的大量钙内流,减轻兴奋性毒性损伤^[6]。这些发现均是 GS-Rd 具有神经保护作用的有力证据。

脑缺血后的炎症反应是一个极为复杂的过程,涉及多种免疫细胞及免疫因子,其中 CXCL1 和 IFN- γ 作为重要的免疫调节分子,在炎症的发生发展过程中起着非常重要的作用。趋化因子在中性粒细胞浸润和脑水肿形成中起到了重要作用。它在正常细胞中不表达,然而,当受到多种炎性因子刺激后,与特异性受体结合,激活 G 蛋白,启动细胞内激酶级联反应。它们不仅具有强大的促黏附、趋化作用,而且是单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞的活化信号。其中趋化因子 CXCL1 为一种具有趋化作用的分泌型单链蛋白质,属于趋化因子 CXC 族,又被称作生长调节致癌基因 α (Growth-regulated oncogene α , GRO α)。

CXCL1 分子量较小,约为 8KD,在氨基酸序列上有 4 个保守的半胱氨酸,前两个半胱氨酸之间有一个非保守氨基酸相隔。因其第一个半胱氨酸前有 ELR (Glu-Leu-Arg, 谷氨酸-亮氨酸-精氨酸)功能区,故趋化因子 CXCL1 属于 ELR 趋化因子,对中性粒细胞有强烈的趋化活性,这正是 CXCL1 在炎症发展过程中发挥重要作用的机理^[12,13]。脑缺血后炎症反应的标志之一就是脑微血管内白细胞聚集并穿过血管壁、浸润脑组织,活化的白细胞可释放多种毒性物质,损害局部血管,造成组织水肿,还可激活脑内的小胶质细胞,加重缺血损伤。CXCL1 可将白细胞归巢到炎症组织和部位,说明它在脑缺血炎症过程中可能发挥中心作用。干扰素是由多种细胞产生的具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的可溶性糖蛋白。根据干扰素的产生细胞、受体和活性等综合因素将其分为 2 种类型: I 型和 II 型。I 型干扰素又称免疫干扰素或 IFN- γ ,是一个由 146 个氨基酸组成的二聚体蛋白,主要由活化的 T 细胞或 NK 细胞产生,此外 B 细胞也能产生 IFN- γ 。干扰素的生物活性之一表现在对宿主免疫细胞活性的影响。IFN- γ 可使巨噬细胞表面 MHC 类分子的表达增加,增强其抗原递呈能力,此外还能增强巨噬细胞表面表达 Fc 受体,促进巨噬细胞吞噬免疫复合物、抗体包被的病原体和肿瘤细胞。前炎性因子 IFN- γ 在脑缺血中的作用还没有完全阐明,脑缺血再灌注后,IFN- γ 既可与小胶质细胞相互作用^[14],又可诱导细胞产生诱导一系列炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子、白介素 1 和其他神经毒性细胞因子^[15],相互之间可以产生协同作用,促进炎症反应形成和炎性产物水平持续升高,加重脑缺血后的炎症反应。

本研究采用液相芯片技术来检测缺血再灌注后脑组织中 CXCL1 和 IFN- γ 含量。液相芯片即多功能悬浮点阵仪,是新一代分子检测技术平台,已被用于抗原抗体定性定量和细胞因子检测。与传统的免疫分析方法相比,它的优势在于高通量、敏感性高、特异性强、检测速度快,且节约样本量。我们将这项新

技术应用于实验研究,保证了检测结果的准确性和灵敏性。

本研究结果表明 GS-Rd 可以有效的抑制缺血后细胞因子 CXCL1 和 IFN- γ 的蛋白合成,并且药效持久。由此可见,GS-Rd 可能通过抑制缺血后细胞因子 CXCL1 和 IFN- γ 的蛋白合成来保护缺血再灌的脑组织,推测整个过程为:脑缺血再灌注后,脑血管最早对损伤作出反应,触发炎症反应。此时,GS-Rd 减少了趋化因子 CXCL1 和前炎症因子 IFN- γ 的蛋白合成,也就抑制了趋化因子协同粘附分子、整合素招募中性粒细胞及淋巴细胞浸润缺血脑组织的病理反应^[16],从而减少炎症反应带来的二次损伤,尽可能保护和挽救缺血半球,达到神经保护的作用。但同时,我们发现,在第 7 天时, MCAO+GS-Rd 组的 CXCL1 蛋白表达量虽然低于同时时间点的 MCAO 组,但较第 3 天有升高的情况,这可能是因为 GS-Rd 的药效减低或是炎症反应中整个复杂调节机制作用的结果。

综上所述,GS-Rd 可明显抑制脑缺血再灌注后 CXCL1 和 IFN- γ 的生成,从而减少再灌后的炎症损伤,发挥神经保护作用。后续研究应继续完善 GS-Rd 影响其他细胞因子变化趋势的检测,进一步明确 GS-Rd 效果的时限,深入探讨 GS-Rd 影响细胞因子的机制,为 GS-Rd 作为一种新型神经保护剂的临床应用提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. [J]. J Neuroimmunol, 2007,184(1-2):53-68
- [2] Kidwell CS, Liebeskind DS, Starkman S, et al. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century [J]. Stroke,2001,32(6): 1349-1359
- [3] Macleod MR, O'Collins T, Howells DW, et al. Pooling of animal experimental data reveals influence of study design and publication bias. [J]. Stroke, 2004,35(5):1203-1208
- [4] Ye R, Han J, Kong X, et al. Protective effects of ginsenoside Rd on PC12 cells against hydrogen peroxide [J]. Biol Pharm Bull, 2008,31(10):1923-1927
- [5] Ye R, Li N, Han J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons.[J]. Neurosci Res, 2009,64(3):306-310
- [6] Lo YC, Chang YH, Wei B L, et al. Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and beta-catenin signals[J]. J Agric Food Chem, 2010,58(11):6643-6649
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.[J]. Stroke, 1989,20(1): 84-91
- [8] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model[J]. Stroke, 1996,27(9):1616-1622, 1623
- [9] Yu SC, Li XY. Effect of ginsenoside on IL-1 beta and IL-6 mRNA expression in hippocampal neurons in chronic inflammation model of aged rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000,21(10):915-918
- [10] Rhule A, Navarro S, Smith J R, et al. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2006,106(1):121-128
- [11] Wu CF, Bi XL, Yang JY, et al. Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-alpha production by LPS-activated N9 microglia[J]. Int Immunopharmacol, 2007,7(3):313-320
- [12] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.[J]. N Engl J Med, 2006,354(6): 610-621
- [13] Fujiwara K, Ohkawara S, Takagi K, et al. Involvement of CXC chemokine growth-related oncogene-alpha in monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits[J]. Lab Invest, 2002,82(10):1297-1304
- [14] 尹丽鹤,赵钢. 小胶质细胞的活化与细胞因子的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建,2008,3(6):422-424, 427
Ying Li-he, Zhao Gang. Study of activation of microglia and cytokine [J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2008,3(6):422-424, 427(in Chinese)
- [15] Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection.[J]. J Neural Transm Suppl, 2000,59: 81-89
- [16] Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments[J]. Neuron, 2010,67(2):181-198