

·论 著·

银杏叶黄酮对急性脑梗死小鼠血清 TNF- α 、Caspase-3 及 HIF-1 α 表达及神经细胞凋亡的影响

俞海红 吴美能

[摘要] 目的 探究银杏叶黄酮通过下调急性脑梗死小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、半胱天冬酶 (Caspase-3) 及低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达对抑制神经细胞凋亡的影响。方法 选择健康清洁级6周龄雌性昆明小鼠45只, 随机分为观察组、模型组和假手术组, 每组15只。观察组和模型组小鼠建模成功后, 模型组给予腹腔注射0.9%的氯化钠注射液, 连续注射1周; 观察组给予腹腔注射银杏叶黄酮注射液20 mg/kg, 连续注射1周。比较三组小鼠脑梗死面积、神经细胞凋亡率, 以及 TNF- α 、Caspase-3、HIF-1 α 水平和蛋白相对表达量。结果 模型组大脑皮质神经元细胞结构功能不完整, 突触小泡、细胞器数目减少, 核膜断裂, 染色质凝集成块。观察组小鼠大脑皮质神经元细胞损伤程度轻于模型组, 仅少数细胞呈现固缩和空泡化现象。与假手术组比较, 观察组和模型组小鼠 TNF- α 、Caspase-3 及 HIF-1 α 水平明显升高 (t 分别=3.89、4.68、5.23、4.67、4.21、4.71, P 均 <0.05); 且与模型组比较, 观察组小鼠 TNF- α 、Caspase-3 及 HIF-1 α 水平明显降低 (t 分别=4.04、4.66、3.66, P 均 <0.05)。与假手术组比较, 模型组和观察组小鼠 TNF- α 、Caspase-3 及 HIF-1 α 蛋白表达量明显升高 (t 分别=3.98、4.56、4.18、4.39、3.67、4.29, P 均 <0.05); 且与模型组比较, 观察组小鼠 TNF- α 、Caspase-3 及 HIF-1 α 蛋白表达量明显降低 (t 分别=5.03、4.32、6.30, P 均 <0.05)。与假手术组比较, 观察组和模型组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率明显升高 (t 分别=4.56、4.98, P 均 <0.05); 且与模型组比较, 观察组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率明显降低 (t 分别=4.38、6.39, P 均 <0.05)。结论 银杏叶黄酮通过下调急性脑梗死小鼠 TNF- α 、Caspase-3 及 HIF-1 α 表达来抑制神经细胞凋亡。

[关键词] 银杏叶黄酮; 急性脑梗死; 肿瘤坏死因子- α ; 半胱天冬酶; 低氧诱导因子-1 α

Effect of Ginkgo biloba flavonoids on the expression of serum TNF- α , Caspase-3, HIF-1 α and neuronal apoptosis in mice with acute cerebral infarction YU Haihong, WU Meineng. Department of Pharmacy, The First Hospital of Jiaxing (The Affiliated Hospital of Jiaxing University), Jiaxing 314000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the effect of Ginkgo biloba flavone on inhibiting neuronal apoptosis by down regulating the expression of serum TNF- α , caspase-3 and HIF-1 α in mice with acute cerebral infarction. **Methods** Totally 45 healthy and clean 6-week-old female Kunming mice were selected, and randomly divided into observation group, model group and sham operation group, with 15 mice in each group. After successfully modeled, the model group was given intraperitoneal injection of 0.9% normal saline for 1 week. The observation group was given intraperitoneal injection of Ginkgo biloba flavone injection 20 mg/kg for 1 week. The cerebral infarction area, apoptosis rate of nerve cells, the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), caspase-3 and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and the relative protein expression of TNF- α , caspase-3 and HIF-1 α were compared among the three groups. **Results** The structure and function of cortical neurons in the model group are incomplete, with a decrease in synaptic vesicles and organelles, nuclear membrane rupture, and chromatin aggregation into blocks. The degree of damage to cortical neurons in the observation group was milder than that in the model group, with only a few cells showing consolidation and vacuolization. Compared with the sham surgery group, the levels of TNF- α , Caspase-3, and HIF-1 α in the observation group and model group were significantly increased (t =3.89, 4.68, 5.23, 4.67, 4.21, 4.71, P <0.05). Compared with the model group, the levels of

TNF- α , Caspase-3, and HIF-1 α in the observation group were significantly reduced (t =4.04, 4.66, 3.66, P <0.05). Compared with the sham surgery group,

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.007.006

作者单位: 314000 浙江嘉兴, 嘉兴市第一医院(嘉兴大学附属医院)药学部

the expression levels of TNF- α , Caspase-3, and HIF-1 α proteins in the model group and observation group were significantly increased ($t=3.98, 4.56, 4.18, 4.39, 3.67, 4.29, P<0.05$). Compared with the model group, the expression levels of TNF- α , Caspase-3, and HIF-1 α proteins in the observation group were significantly reduced ($t=5.03, 4.32, 6.30, P<0.05$). Compared with the sham surgery group, the apoptosis rate of nerve cells in the observation group and model group was significantly increased ($t=4.56, 4.98, P<0.05$). Compared with the model group, the infarct size and neuronal apoptosis rate of the observation group were significantly reduced ($t=4.38, 6.39, P<0.05$). **Conclusion** Ginkgo biloba flavonoids inhibit neuronal apoptosis by down regulating the expression of TNF- α , Caspase-3, and HIF-1 α in mice with acute cerebral infarction.

[Key words] Ginkgo biloba flavonoids; acute cerebral infarction; tumor necrosis factor- α ; caspase-3; hypoxia inducible factor-1 α

急性脑梗死是指脑部血供突然中断导致脑组织缺血、缺氧引起的脑组织局部坏死,进而导致临床上对应的神经功能缺失的表现^[1-3]。介入治疗因其对医疗设备要求高,难以推广,因此早预防、早诊断、早治疗显得尤为重要^[4]。研究显示,银杏叶黄酮对改善心脑血管疾病症状具有重要作用^[5]。此外,半胱天冬酶(Caspase-3)及低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是神经元凋亡的关键因子^[6],而肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)在脑梗死早期含量异常升高,与病情严重程度密切相关^[7]。故本次研究采用银杏叶黄酮处理急性脑梗死小鼠,观察小鼠血清TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 表达,旨在探究其对神经细胞凋亡抑制的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 2020年9月,嘉兴市第一医院获取健康清洁级6周龄雌性昆明小鼠45只,随机分为观察组、模型组和假手术组,每组15只。

1.2 建立小鼠急性脑梗死模型 按照文献《注射用丹参多酚酸配伍注射血栓通(冻干)通过抑制MMPs对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响及机制》^[7]建立小鼠急性脑梗死模型,假手术组仅分离双侧颈总动脉及伴行的迷走神经。术后1 d,按照神经功能缺损评分对小鼠神经功能进行评价,1~3分表示建模成功。

1.3 方法 假手术组及模型组给予腹腔注射0.9%氯化钠注射液,连续注射1周;观察组给予腹腔注射银杏叶黄酮注射液(由石药银湖制药有限公司生产)20 mg/kg,连续注射1周。

1.4 观察指标 1周后,采集三组小鼠眼眶全血4 mL,静置后以3 000 r/min离心10 min取上清液,采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清TNF- α 、Cas-

pase-3及HIF-1 α 含量变化,酶联免疫试剂盒由上海恒远生物科技有限公司生产。采用免疫印迹法检测三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 蛋白相对表达量。将小鼠处死取出脑组织,经脱水、包埋、切片及尼氏染色后置于光学显微镜(由上海炳宇光学仪器有限公司生产)下观察,采用Image Pro Plus 6.0计算小鼠脑梗死面积。小鼠神经凋亡率采用原位末端标记技术法检测。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间计量资料比较采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组小鼠脑组织切片结果 假手术组小鼠神经元细胞结构和功能完整,可见突触细胞,细胞核呈卵圆形且核内染色质分布均匀,胞浆内细胞器丰富。模型组大脑皮质神经元细胞结构功能不完整,突触小泡、细胞器数目减少,核膜断裂,染色质凝集成块。观察组小鼠大脑皮质神经元细胞损伤程度轻于模型组,仅少数细胞呈现固缩和空泡化现象。

2.2 三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平比较结果见表1

表1 三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平比较/ng/mL

组别	TNF- α	Caspase-3	HIF-1 α
观察组	23.75 $\pm$ 11.28* [#]	11.35 $\pm$ 1.69* [#]	627.35 $\pm$ 213.87* [#]
模型组	34.13 $\pm$ 21.45*	13.34 $\pm$ 3.56*	736.30 $\pm$ 325.16*
假手术组	5.17 $\pm$ 1.15	6.65 $\pm$ 0.35	509.05 $\pm$ 124.29

注:*,与假手术组比较, $P<0.05$;[#],与模型组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平比较,差异均有统计学意义(F 分别=16.68、34.24、3.64, P 均 <0.05)。进一步组间比较,

与假手术组比较,观察组和模型组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平明显升高(t 分别=3.89、4.68、5.23、4.67、4.21、4.71, P 均 <0.05);且与模型组比较,观察组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平明显降低(t 分别=4.04、4.66、3.66, P 均 <0.05)。

2.3 三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 蛋白相对表达量比较见表2

表2 三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 蛋白相对表达量比较

组别	TNF- α	Caspase-3	HIF-1 α
观察组	0.22 $\pm$ 0.04*#	0.11 $\pm$ 0.02*#	0.44 $\pm$ 0.03*#
模型组	0.49 $\pm$ 0.05*	0.38 $\pm$ 0.03*	1.09 $\pm$ 0.05*
假手术组	0.14 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.02

注: *:与假手术组比较, $P<0.05$; #:与模型组比较, $P<0.05$ 。

由表2可见,三组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 蛋白表达量比较,差异均有统计学意义(F 分别=334.06、917.30、2306.10, P 均 <0.05)。进一步组间比较,与假手术组比较,模型组和观察组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 蛋白表达量明显升高(t 分别=3.98、4.56、4.18、4.39、3.67、4.29, P 均 <0.05);且与模型组比较,观察组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 蛋白表达量明显降低(t 分别=5.03、4.32、6.30, P 均 <0.05)。

2.4 三组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率比较见表3

表3 三组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率比较/%

组别	梗死面积	神经细胞凋亡率
观察组	13.23 $\pm$ 1.53*#	21.13 $\pm$ 2.23*#
模型组	28.29 $\pm$ 1.74*	42.33 $\pm$ 3.33*
假手术组	0	1.43 $\pm$ 0.52

注: *:与假手术组比较, $P<0.05$; #:与模型组比较, $P<0.05$ 。

由表3可见,三组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率比较,差异均有统计学意义(F 分别=1736.78、1193.42, P 均 <0.05)。进一步组间比较,与假手术组比较,观察组和模型组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率明显升高(t 分别=4.56、4.98, P 均 <0.05);且与模型组比较,观察组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率明显降低(t 分别=4.38、6.39, P 均 <0.05)。

3 讨论

脑梗塞起病急,致死致残率高,其发生发展与脑组织缺血、缺氧、炎症因子、免疫活性异常升高、钙超载等因素密切相关^[8]。临床资料显示动脉粥样

硬化是引起脑梗塞病理基础,其病灶的缺血半暗带是一个可逆性病变区,该区血流在一定时间内可迅速恢复,使神经细胞得以恢复和存活^[9]。传统医学将急性脑梗死归属于“中风”范畴,认为瘀血阻络是其基本病机,应以活血散瘀、通脉活络为主要治疗方法。银杏叶提取物注射液成为近年来出现的新型药物^[10]。药理研究显示银杏叶黄酮对增加脑血流量、改善脑部血管微循环、保护神经细胞、预防血栓形成等具有重要作用^[11]。

本次研究结果显示:与假手术组比较,模型组、观察组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平和蛋白表达量明显升高;且与模型组比较,观察组小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平和蛋白表达量明显降低(P 均 <0.05);同时,与模型组比较,观察组小鼠梗死面积、神经细胞凋亡率明显降低。以上结果说明银杏叶黄酮通过下调急性脑梗死小鼠TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 表达来抑制神经细胞凋亡。细胞凋亡是一个由基因引发的细胞死亡过程,受多种因素调控,具有清除功能性细胞,主动耗能的作用^[12]。临床研究显示,TNF- α 可诱导血管内皮细胞、中性粒细胞、肿瘤细胞及神经细胞凋亡,与多种疾病的发生和预后密切相关,是评估疾病临床和预后的重要指标^[13]。Caspase-3是一种可促进病变神经元凋亡的蛋白酶,在多种因素影响的凋亡过程中起重要作用^[14]。在正常情况下,Caspase-3以非活性的酶原形式存在于人体且不具备生物活性,只有在被细胞凋亡信号激活的情况下才能活化并起到促进细胞凋亡的作用,是缺血神经元凋亡的重要效应分子。有研究显示,干预Caspase-3表达能明显降低急性脑梗死患者脑组织病变区缺血神经元的损伤程度,减少梗死面积且降低致残率。HIF-1 α 是一种具有促进神经细胞凋亡及保护作用的基因转录因子,在氧气充足的条件下其生物学效应不发挥^[15]。当机体组织持续缺氧,HIF-1 α 被诱导激活并发挥其生物学效应,进而激活下游执行细胞凋亡蛋白Caspase-3的表达。当急性脑梗死发作后,诱发一系列炎症反应,引起TNF- α 的分泌,血脑屏障遭到损害,导致细胞功能与信号通路损害进而导致细胞坏死和凋亡。此外,本次研究仍存在局限性,使用小鼠模型研究银杏叶黄酮对急性脑梗死的影响未考虑到该药物的用量和浓度,并且本次研究的样本量较小,还需要更多实验和数据进一步证明结果的可靠性。

综上所述,银杏叶黄酮可通过下调急性脑梗死小鼠血清中TNF- α 、Caspase-3及HIF-1 α 水平表达来抑制神经细胞凋亡,起到保护神经的作用。

参考文献

- 1 郝雅文.急性脑梗死的治疗进展[J].天津药学,2021,33(4):66-69.
- 2 衡海艳,蒋燕,杨红,等.CT血管造影检查急性脑梗死患者大脑中动脉粥样硬化斑块的特征及其临床意义[J].中国现代医学杂志,2023,33(10):18-22.
- 3 佟亚男,孙鲁生,陈锦荣,等.基于多准则决策的达格列净联合奥拉西坦治疗2型糖尿病合并急性脑梗死患者效益与风险评价[J].中国糖尿病杂志,2023,31(5):340-345.
- 4 梁文娜,李盈盈,赵晓荣,等.左归丸对急性脑梗死大鼠神经损伤与炎症反应的保护机制[J].中国临床药理学杂志,2023,39(6):829-833.
- 5 梁丽冰,陈静娟,章成国,等.血清脂蛋白相关磷脂酶A2水平与伴高血压的急性缺血性脑梗死复发正相关[J].南方医科大学学报,2023,43(2):317-322.
- 6 赵海燕,李源,欧阳辉,等.依达拉奉联合瑞舒伐他汀治疗心源性脑梗死的疗效及对血清CXCL12、UCH-L1、HC-gp39水平的影响[J].中国现代医学杂志,2023,33(10):23-27.
- 7 贾壮壮,赵磊,陈红阳,等.注射用丹参多酚酸配伍注射用血栓通(冻干)通过抑制MMPs对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响及机制[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(19):135-145.
- 8 黄丽,王磊,吴亚琴,等.血小板活化因子和ABCD3-I评分预测老年短暂性脑缺血发作后进展为脑梗死的价值[J].中华老年心脑血管病杂志,2023,25(4):399-403.
- 9 徐炳欣,李青华,田英娜,等.不同三磷酸腺苷结合盒转运体B1 G2677T基因型急性脑梗死患者应用阿托伐他汀的降脂疗效[J].中华行为医学与脑科学杂志,2023,32(4):308-315.
- 10 陈正文,李沛城,刘一之,等.静脉溶栓桥接血管内治疗术中替罗非班治疗急性前循环大血管闭塞性脑梗死的安全性研究[J].中华神经医学杂志,2023,22(2):149-156.
- 11 马辉,孙正启,李岩松.七十味珍珠丸干预脑梗死模型大鼠软脑膜微循环及胶质瘢痕的变化[J].中国组织工程研究,2023,27(28):4462-4467.
- 12 吴钟江,梁赋,黄达,等.阿托伐他汀联合氯吡格雷治疗老年急性脑梗死的1年短期疗效及对患者预后运动能力的影响[J].中国老年学杂志,2023,43(10):2332-2335.
- 13 徐守权,唐国文,黄舞标,等.BP神经网络、随机森林和决策树预测急性脑梗死患者静脉溶栓后发生早期神经功能恶化的效能比较[J].实用心脑血管病杂志,2023,31(2):16-21.
- 14 彭伟,汪慧,乔向亮.替罗非班可减少脑梗死静脉溶栓后进展性脑梗死的发生率[J].内科急危重症杂志,2023,29(2):137-140.
- 15 徐焜天,胡文霞,陈生,等.急性脑梗死患者血清hs-CRP、CaM、miR-365的变化及临床意义[J].中南医学科学杂志,2023,51(3):384-386,394.

(收稿日期 2023-06-26)

(本文编辑 高金莲)