

莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Wnt7a 和 APC 表达的影响

薛金龙^{1,2}, 孙芳玲², 刘婷婷², 侯虹丽³, 魏仁平³, 向本旭², 艾厚喜²,
王玉兰², 张 丽², 石淑先¹, 王 文²

(1. 北京化工大学材料科学与工程学院, 北京 100029; 2. 首都医科大学宣武医院药理研究室, 北京 100053;
3. 河北北方学院, 河北 张家口 075000)

【摘要】 目的 观察莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Wnt7a 和 APC 表达的影响。**方法** 用线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型(MCAO)。将 50 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 莫诺苷小、中、大剂量组(30 mg/kg, 90mg/kg, 270 mg/kg)。利用蛋白免疫印迹法检测 Wnt7a 和 APC 表达变化。**结果** 造模 7 d, 模型组大鼠皮层 Wnt7a 的表达比假手术组显著升高, APC 表达显著下降; 与模型组相比, 莫诺苷大剂量组 Wnt7a 表达明显升高; 莫诺苷小、中、大剂量组 APC 的表达显著降低。**结论** 莫诺苷可以促进缺血性脑损伤后 Wnt7a 表达, 抑制 APC 表达, 从而激活 Wnt 信号通路。

【关键词】 莫诺苷; Wnt 7a; 结肠腺瘤样息肉病蛋白; 脑缺血; 再灌注

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 09-0009-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 009. 003

Effects of morroniside on the expression of Wnt7a and APC in rat cortex of focal cerebral ischemia/ reperfusion

XUE Jin-long^{1,2}, SUN Fang-ling¹, LUI Ting-ting², HOU Hong-li³, WEI Ren-ping³,
XIANG Ben-xu², AI Hou-xi¹, ZHANG Li¹, SHI Shu-xian², WANG Wen¹

(1. Beijing University of Chemical Technology, College of Materials Science and Engineering, Beijing 100029, China;
2. Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China;
3. Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of morroniside on the expression of Wnt7a and APC in rat cortex of focal cerebral ischemia/reperfusion. **Methods** After middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was performed SD rats were divided into groups of sham, model, and morroniside (30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg). The expression of Wnt7a and APC were evaluated by Western blot. **Results** Compared with the sham group, the expression of Wnt7a in rats of MCAO model was increased, and the expression of APC was decreased. Compared with model group, morroniside at the concentrations of 30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg decreased APC expression respectively, while 270 mg/kg

【基金项目】 国家自然科学基金(30973893, 81173575, 81373994); “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102-201-016); 北京市自然科学基金(7102077); 北京市教委科研基地-科技创新平台(112219); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才(2011-3-097); 第 52 批中国博士后资助(106455); 北京市博士后资助(106455)。

【作者简介】 薛金龙(1989-)男, 硕士生, 研究方向: 神经药理和生物功能材料制备与应用。E-mail: xxuuee1989@163.com。

【通讯作者】 石淑先(1971-)女, 副研究员, 研究方向: 生物材料制备与应用和聚合物改性及应用。E-mail: shisx@mail.buct.edu.cn; 王文(1968-)男, 研究员, 研究方向: 神经药理和天然药物化学。E-mail: lzwang@163.com。

morroniside-treatment obviously increased the expression of Wnt7a. **Conclusion** Morrioniside could increase the expression of Wnt7a, and inhibit the expression of APC after ischemic injury, therefore activating the Wnt signaling pathway.

【Key words】 Morrioniside; Wnt7a; APC; Cerebral ischemia; Reperfusion

脑血管病(cerebral vascular diseases, CVD)是危害人类健康和生命的三大疾病之一,而缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICD)更是占了其中的 50% 以上。缺血性脑损伤病理机制复杂,一直是神经科学领域研究的热点。Wnt 信号通路是调控细胞生长增殖分化的关键途径,在大脑的可塑性中起至关重要的作用。此前对于 Wnt 信号通路在神经发生的作用已经有了一定的研究,最近研究表明, Wnt 信号通路在缺血性脑损伤的修复过程中和神经血管稳态重构中作用机制明显^[1]。Wnt7a 是 Wnt 信号通路上游重要配体,对调解 Wnt 信号通路作用关键,并且 Wnt7a 可以调节加速细胞的生长和分化的进程,抑制神经胶质再生^[2]。APC 是 Wnt 信号通路的抑制剂,可以通过抑制 Wnt 信号通路的激活调节细胞的增殖分化^[3]。

中药山茱萸是山茱萸科植物山茱萸(*cornus officinalis* Sieb. et Zucc)的干燥成熟果肉,具有补肝益肾、涩精固脱的作用。本实验室对其有效成分山茱萸环烯醚萜苷进行进一步分离,得到单体化合物莫诺昔(morrioniside)。我们的前期研究发现,莫诺昔能减小局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积,增强皮层抗氧化、抗炎和抗凋亡能力^[4-9],并在体外和体内实验对血小板聚集有一定抑制作用^[10-13]。我们推测莫诺昔对缺血性脑损伤有神经保护作用,并且能够促进缺血性脑损伤的神经修复。本文通过体内实验研究莫诺昔对缺血性脑损伤大鼠皮层 Wnt7a 和 APC 含量的影响,初步探讨莫诺昔促进缺血性脑损伤后神经发生的机制。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 50 只,体重 250 ~ 280 g,购自北京斯贝福实验动物科技有限公司【SCXK(京)2011-0004】。由首都医科大学宣武医院 SPF 级实验动物室常规饲养【SYXK(京)2010-0013】。自由进食进水,温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 $55 \pm 5\%$ 。

1.2 药物

莫诺昔:由本室从山茱萸中提取制备,采用高

效液相分析,纯度约 98.5%,蒸馏水溶解配制新鲜溶液。

1.3 试剂和仪器

一抗 Anti-APC antibody (批号: ab40778), Abcam (香港); 一抗 Anti-Wnt7a antibody (批号: ab100792); 小鼠抗 β -catenin 一抗(批号: TA09); 山羊抗鼠 IgG (批号: ZB-2010) 和山羊抗兔 IgG (批号: ZB-2301), 北京市中杉金桥生物技术有限公司。

超声波细胞破碎粉碎机: JY92-II 型, 宁波市新芝科技研究所; 台式微量冷冻离心机: Microfuge 22R, 美国 Beckman Coulter 公司; 电泳仪: Bio-Rad 043BR1549, 美国 BIORAD 公司; 小型垂直电泳槽: 1658004, 美国 BIORAD 公司; 高分辨率多模式分子成像系统: Image Station 4000R, 美国 Carestream Health 公司; 全波长酶标仪: Multiskan Spectrum, 美国 Thermo Fisher 公司。

1.4 方法

1.4.1 模型制备

采用 Longa 等^[14]所介绍的大脑中动脉线栓模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)并稍加改进。大鼠术前禁食 12 h。10% 水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 切开右侧颈部, 沿胸锁乳突肌分离肌肉和筋膜, 暴露右侧颈总动脉。分离右侧颈外动脉和颈内动脉。于近心端结扎颈总动脉, 且在颈总动脉分岔处结扎颈外动脉。动脉夹夹闭颈内动脉, 在近心端距颈总动脉分岔约 4 mm 处用眼科剪剪一斜行细小动脉切口, 将直径 0.28 mm 的栓线从颈总动脉插入颈内动脉约 18 mm, 此时栓线已进入大脑中动脉, 到达大脑前动脉起始部, 阻断大脑中动脉的所有血供, 造成大脑中动脉供血相关区的梗死灶。栓塞 30 min 后缓慢拔出栓线, 实现再灌注。假手术组只分离动脉结扎, 不插线。

1.4.2 分组及给药

大鼠苏醒后提尾时出现对侧前肢内收屈曲, 爬行时向对侧转圈, 站立时向对侧倾倒等症状即为 MCAO 模型成功。随机将 MCAO 成模大鼠分为: 模型组, 莫诺昔小、中、大高剂量组(30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg), 每组 10 只。采用灌胃给药, 每天 1 次, 连续给药 7 d。假手术组和模型组给予蒸馏水灌

胃。

1.4.3 western-blot 分析 Wnt7a 和 APC 蛋白表达

取新鲜大鼠右侧皮层脑组织裂解提取蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶 10%,浓缩胶 5%),每孔加入 50 μ g 蛋白质,先恒压 70 V 电泳 40 min;然后恒压 100 V 电泳至分离胶底部,电转移到硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 1:1000 稀释的兔抗大鼠 APC 单克隆抗体和 1:500 稀释的兔抗大鼠 Wnt7a 多克隆抗体,4℃ 过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,再加入 1:2000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,室温摇床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,ECL 试剂显色、曝光并拍照,以 β -actin 作为内参,将曝光后的图片导入软件 Quantity One 中分析。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行处理,实验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 ANOVA 方差分析和 t 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 免疫印迹法观察莫诺昔对缺血性脑损伤后 Wnt7a 表达的影响

造模后 7 d,模型组大鼠大脑皮层 Wnt7a 蛋白表达水平比假手术组升高($P < 0.01$);与模型组相比,莫诺昔大剂量组(270 mg/kg)大鼠大脑皮层 Wnt7a 蛋白表达水平升高显著,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 1,表 1)。

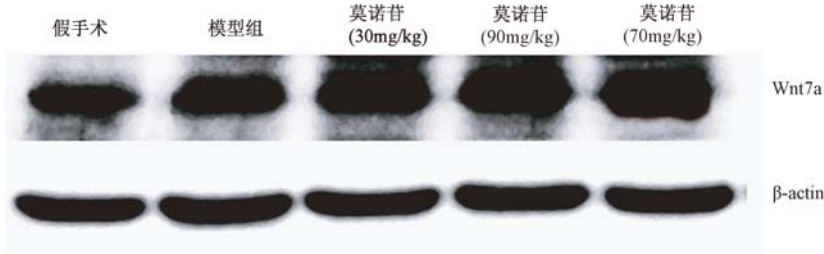


图 1 免疫印迹检测缺血性脑损伤大鼠皮层 Wnt7a 表达

Fig. 1 The expression of Wnt7a in rat cortex of focal cerebral ischemia/ reperfusion was examined with western blot

表 1 免疫印迹法检测 Wnt7a 表达变化统计结果

Tab. 1 The statistical results of Wnt7a expression changed by western blot

组别 Group	Wnt7a/ β -actin (Mean $\pm$ SEM)
假手术 Sham	1.0080 $\pm$ 0.0410
模型组 Model	1.3538 $\pm$ 0.0264 ^{##}
莫诺昔 (30 mg/kg) Morroniside (30 mg/kg)	1.1957 $\pm$ 0.0993
莫诺昔 (90 mg/kg) Morroniside (90 mg/kg)	1.3012 $\pm$ 0.1001
莫诺昔 (270 mg/kg) Morroniside (270 mg/kg)	1.8186 $\pm$ 0.2066 ^{**}

注: $n = 5$, $\bar{M} \pm S. E. M.$ ^{**} $P < 0.01$ 与模型组相比; ^{##} $P < 0.01$, 与假手术组相比。

Note: $n = 5$, $\bar{m} \pm S. E. M.$ ^{**} $P < 0.01$ vs. model; ^{##} $P < 0.01$ vs. sham.

2.2 免疫印迹法观察莫诺昔对缺血性脑损伤后 APC 表达的影响

造模 7 d 后,模型组大鼠大脑皮层 APC 蛋白表达水平比假手术组显著降低($P < 0.001$);与模型组大鼠相比,莫诺昔小、中、大剂量组(30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg)大鼠大脑皮层 APC 蛋白表达水平均降低显著,差异有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)(图 2,表 2)。

3 讨论

脑卒中有高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点,给社会和家庭造成巨大负担,研发有效的治疗缺血性脑损伤的药物至关重要,也是今

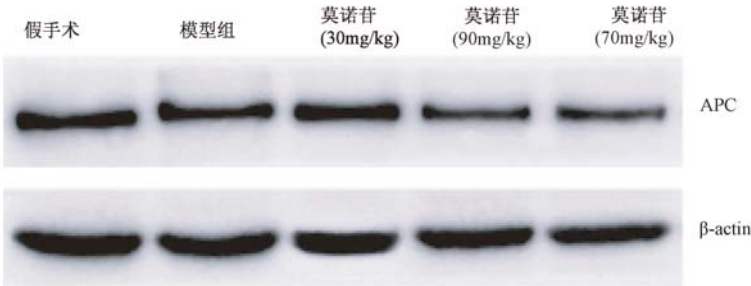


图 2 免疫印迹检测缺血性脑损伤大鼠皮层 APC 表达

Fig. 2 The expression of APC in rat cortex of focal cerebral ischemia/ reperfusion was examined with western blot

表 2 免疫印迹法检测 APC 表达变化统计结果

Tab. 2 The statistical results of APC expression changed by western blot

组别 Group	APC/ β -actin (Mean $\pm$ S. E. M.)
假手术 Sham	0.7340 $\pm$ 0.0275
模型组 Model	0.5209 $\pm$ 0.0426 ^{###}
莫诺昔 (30 mg/kg) Morrisonide (30 mg/kg)	0.3299 $\pm$ 0.0118 ^{***}
莫诺昔 (90 mg/kg) Morrisonide (90 mg/kg)	0.2985 $\pm$ 0.0068 ^{***}
莫诺昔 (270 mg/kg) Morrisonide (270mg/kg)	0.2680 $\pm$ 0.0180 ^{***}

注: $n = 5$, mean $\pm$ S. E. M. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 与模型组相比; ^{###} $P < 0.001$, 与假手术组相比。

Note: $n = 5$, mean $\pm$ S. E. M. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. model; ^{###} $P < 0.001$ vs. sham.

Wnt 信号通路是广泛存在于多细胞真核生物中的信号通路,是调控细胞生长增殖分化的关键途径并且调节成年神经发生^[15],并与脑缺血后的神经修复有着密切的联系。很有可能作为药物促进脑缺血损伤后神经修复的靶点之一。

在 Wnt 信号通路中 Wnt7a 配体与细胞膜上的 Fzd 结合,联合低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 可以激活 Wnt 信号通路^[16]。Wnt7a 具有促进突触发生的作用,在体外对大鼠颗粒细胞神经元培养的试验中发现, Wnt7a 的提高可以通过轴突微管的重构导致轴突的扩展和分支;并能促进小脑皮层中的小脑粒细胞和苔藓纤维之间突触联系成熟^[17]。Wnt 7a 促进皮质层神经细胞的分化和前体细胞的自我更新能力^[18]。

在 Wnt 信号通路中, APC 蛋白与 β -连环蛋白 (β -catenin) 的稳定性密切相关, APC 调节 β -catenin 的含量,控制相关转录过程。APC 会与 β -catenin 结合,促使细胞核内 β -catenin 运出,减少 β -catenin/TCF 结合,抑制转录过程。Wnt-7a 可诱导 APC 蛋白从 β -catenin 细胞质络合物上解离^[19]。另外, Sierra 等^[20]研究发现, APC 会破坏 Axin 和 Gsk-3 β 组成的降解复合体,从而促使 β -catenin 降解。因此作为 Wnt 信号通路的抑制剂^[21], APC 含量的增加会抑制 Wnt 通路激活而调节细胞的增殖分化。

本文采用免疫印迹法检测 MCAO 模型大鼠大脑皮层 Wnt7a 和 APC 的表达,发现造模 7 d 后,模型组大鼠大脑皮层 Wnt7a 的表达比假手术组显著升高, APC 表达显著下降,表明 MCAO 造模后激活了 Wnt 信号通路。大量研究表明脑梗死可激发短暂和微弱的内源性代偿性修复机制^[22],其中 Wnt 信

号通路被激活很可能是所涉及的修复机制之一。李等^[23]发现脑缺血 7 d 后海马区的 Wnt7b 和 β -catenin 表达量均明显增加,也提示在成年大鼠脑缺血损伤后可内源性激活 Wnt 信号通路。但脑缺血后短暂的应激修复机制不足以最终修复神经血管的损伤,需要外源性药物的干预治疗。我们发现给予莫诺昔治疗 7 d 后, Wnt7a 表达量较模型组相比明显上升, APC 的表达则显著降低,表明莫诺昔很可以通过促进 Wnt7a 的表达、抑制 APC 的表达来进一步激活 Wnt 信号通路,并进一步发挥保护神经,促进神经发生的作用。由于 Wnt 通路的调节机制比较复杂,莫诺昔如何通过调节 Wnt 信号通路来促进脑缺血后的神经恢复,需要进一步实验研究。

参考文献:

- [1] 王文,孙芳玲,艾厚喜,等. 神经血管稳态重构作用和机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3): 423.
- [2] Prajerova I, Honsa P, Chvatal A, et al. Distinct effects of sonic hedgehog and Wnt-7a on differentiation of neonatal neural stem/progenitor cells in vitro[J]. Neuroscience. 2010, 171(3): 693 - 711.
- [3] Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. Inestrosa. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(3): 281 - 296.
- [4] Wang W, Xu J, Li L, et al. Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res Bull, 2010, 7(83): 196 - 201.
- [5] Wang W, Sun F, An Y, et al. Morroniside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity [J]. Eur Journal Pharmacol., 2009, (613): 19 - 23.
- [6] 刘秀平,许栋明,王文,等. 莫诺昔对大鼠局灶性脑缺血模型脑梗死体积的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(10): 913 - 915.
- [7] 艾厚喜,李蕾,许栋明,等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层总抗氧化能力影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(9): 833 - 834.
- [8] 艾厚喜,汪莹,许栋明,等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层 IL-1 β 的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(10): 928 - 930.
- [9] 汪莹,高东明,许栋明,等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Caspase-3 活化程度的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(9): 801 - 802.
- [10] 左玮,王晓锋,艾厚喜,等. 莫诺昔对二磷酸腺苷诱导兔血小板聚集后血栓素 B2 的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(4): 329 - 330.
- [11] 孙盼莉,魏守蓉,王晓锋,等. 莫诺昔对二磷酸腺苷诱导兔血小板聚集后环氧酶的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(4): 331 - 332.

- [12] 艾厚喜,左玮,王晓锋,等. 莫诺昔对二磷酸腺苷诱导兔血小板聚集钙离子的影响[J]. 中国康复理论与实践,2012, 18(2): 131-133.
- [13] 程华,孙芳玲,王晓锋,等. 莫诺昔对二磷酸腺苷诱导局灶性脑缺血再灌注大鼠血小板聚集的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(2): 101-103.
- [14] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [15] Wu MV, Hen R. The Young and the Restless: Regulation of Adult Neurogenesis by Wnt Signaling[J]. *Cell Stem Cell*,2013, 12(2):139-140.
- [16] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*,2009,17(1):9-26.
- [17] 左玮,王起忠,王文,等. Wnt 信号对神经发生和血管新生的调控[J]. 中国康复理论与实践,2011,17(3):243-246.
- [18] Viti, J., Gulacsi, A., Lillien, L., 2003. Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2[J]. *J. Neurosci.* 23, 5919-5927.
- [19] Enrique M. Toledo, Marcela Colombres, *et al.* Inestrosa, Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. *Progress in Neurobiology*, 2008, (86): 281-296.
- [20] Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, *et al.* The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes[J]. *Genes Dev.*, 2006,20(5): 586-600.
- [21] Rina Rosin-Arbesfeld, Adam Cliffe, Thomas Brabletz, *et al.* Nuclear export of the APC tumour suppressor controls β -catenin function in transcription[J]. *EMBO J*,2003,22(5):1101-1113.
- [22] Jin K, Wang X, Xie L, *et al.* Transgenic ablation of double cortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2010, 107(17): 7993-8001.
- [23] 李慧,黄景阳,陈海丽,等. 脑缺血再灌注后大鼠海马 Wnt7b 的表达[J]. 山东大学学报(医学版),2013,52(2):7-11.

[修回日期]2014-06-11

(上接第7页)

- gene expression by polyunsaturated fatty acids[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(50): 35840-35844.
- [11] 周国利,金海国. 脂肪酸合成酶基因(FASN)的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 9: 3559-3560+3578.
- [12] Park KG, Min AK, Koh EH, *et al.* Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways[J]. *Hepatology*, 2008, 48(5): 1477-1486.
- [13] 王冰. 肝X受体上调肝脏和肾脏脂肪酸合成酶的表达及机制[D], 2007, 大连医科大学.
- [14] Shen QW, Zhu MJ, Tong J, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by alpha-lipoic acid in C2C12 myotubes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(4): C1395-C1403.

[修回日期]2014-08-26