

熄风通络方与补阳还五汤对大鼠脑缺血神经细胞凋亡调控基因(bcl-2、bax)的影响

李佑生¹ 陈朝晖² 胡耀强³ 吴云虎³ 指导:王行宽⁴

摘要 目的:比较熄风通络方与补阳还五汤对大鼠脑缺血神经细胞凋亡调控基因 bcl-2、bax 的影响。方法:造成大鼠全脑缺血后,分别予以熄风通络方与补阳还五汤治疗,于缺血后 24 小时检测海马区细胞凋亡调控基因 bcl-2、bax 的表达量(定性定量)。结果:模型组 bcl-2 mRNA 的表达较正常对照组与假手术组明显降低,而熄风通络方组呈过表达,高于正常对照组与假手术组,也高于补阳还五汤组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);模型组 bax mRNA 表达量则较正常组与假手术组增高,而熄风通络方组明显低于模型组,也低于补阳还五汤组,但高于正常对照组与假手术组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论:熄风通络方防治大鼠脑缺血的可能机制是影响细胞凋亡调控基因 bcl-2、bax 的表达,其对凋亡调控基因的影响优于补阳还五汤。

关键词 脑缺血/中医药疗法 细胞凋亡/药物作用 补阳还五汤/药理学

益气活血法以补阳还五汤为代表方剂,是治疗缺血中风的重要治法之一,有不少相关报道认为,该方可用于脑梗死急性期的治疗,且有文献报道可改善脑缺血引起的神经细胞凋亡。而有关熄风通络法的报道少见,也未见与益气活血法对比研究的相关报道。本研究即在比较两种治法对脑缺血细胞凋亡方面影响的基础上,从比较两种治法对影响细胞凋亡调控基因方面,对熄风通络方与补阳还五汤进行比较研究,探讨这两种治法治疗急性脑梗死的疗效机理。

1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠 39 只,月龄 18 个月以上,体重多在 300g 以上,购自湖南省防疫站实验动物中心。

1.2 药物:(1)熄风通络方:天麻 10g,钩藤 12g,石决明 30g,珍珠母 30g,全蝎 5g,地龙 10g,丹参 15g,水蛭 1g,川芎 6g,僵蚕 10g,牛膝 10g,葛根 15g,稀莪草 15g,红花 10g,水煎,浓缩至 1g 生药/ml,每剂总体积为 179ml,给药量为 100ml/100g。(2)补阳还五汤:黄芪 120g,当归尾 6g,赤芍 4.5g,川芎 3g,地龙 3g,桃仁 3g,红花

3g,常规水煎,浓缩至与熄风通络方等体积,即每剂 179ml,浓度为 0.80g 生药/ml,给药量为 100 ml/100g。

1.3 主要试剂及仪器:HYBAID PCR 仪、超低温高速离心机、DU640 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司)、Eagle Eye II 凝胶成像分析系统(美国 Beckman 公司)、YYD-III 电泳仪(美国 Beckman 公司)等仪器,以及胆固醇(进口,购自长沙化玻公司)、DEPC、Trizol、Oligo(dT)、Rnasin、AML transcriptase、DNTps、Taq DNA Polymerase、Agarose 等试剂(均购自上海生工)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

2.1.1 高脂血症大鼠动物模型造模方法:参照文献[1]报道的方法,给予高脂饲料(基础饲料中加胆固醇 4%、猪油 10%、甲基硫氧嘧啶 0.2%),预先喂饲 3 周,加上给药及造模时间共给高脂饮食 25 天。

2.1.2 大鼠持续性脑缺血模型造模方法:参照文献[2],取大鼠,称重,按 20mg/kg 剂量,以 1%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,固定于手术台上,分离双侧颈总动脉,同时分离其迷走神经,以免误扎。自其颈总动脉下分别穿入 1 根 0 号丝线,做双结扎,记录结扎时间,放入鼠笼中待其清醒,并记录清醒时间,继续喂饲,直至处死。

2.1.3 动物分组:(1)正常对照组:6 只,给普通饲料。(2)假手术组:6 只,给高脂饲料 3 周,制成高脂血症动物模型,脑缺血造模前给予等体积(10ml·kg⁻¹·d⁻¹)生理盐水,连续 5 天,按前述造模方法,以 1%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠并分离右侧颈总动脉,但不结扎,随即缝合伤口,动物清醒后给予生理盐水 1 次,至缺血后 24 小时处死。(3)熄风通络方组:9 只,给高脂饲料 3 周,制成高脂血症动物模型,脑缺血造模前按 10ml/kg 剂量,给予熄风通络方治疗,连续给药 5 天,按前述方法制作大鼠脑缺血模型,动物清醒后再给予熄风通络方治疗,至缺血后 24 小时处死。(4)补阳还五汤组:9 只,给高脂饲料 3 周,脑缺血造模前按 10ml·kg⁻¹·d⁻¹剂量,给予补阳还五汤治疗,连续给药 5 天,按前述方法制作大鼠脑缺血模型,动物清醒后再给予补阳还五汤治疗,至缺血后 24 小时处死。(5)模型对照

基金项目:湖南省中医管理局资助课题(98310)

1 湖南省中医药研究院附属医院内二科,长沙市麓山路 273 号(410006)

2 中南大学湘雅医院

3 湖南中医学院 2000 级研究生

4 湖南中医学院第一附属医院

收稿日期:2003-02-08;修回日期:2003-03-25

组:9只,给高脂饲料3周,脑缺血造模前按 $10\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量给生理盐水5天后,按前述方法制作大鼠脑缺血动物模型,动物清醒后给等体积生理盐水2次,至缺血后24小时处死。

为检验高脂血症造模是否成功,在喂饲高脂饲料3周后,随机选取每组2只大鼠,取血检测血脂。

2.2 标本采集:各组大鼠待缺血至24小时,颈动脉放血,收集全血2ml,供检测血脂,立即断头处死大鼠,并(5分钟内)取脑,分离右侧海马,在1%的DEPC水中稍作漂洗,立即放入干净Eppendorf离心管中,存于 -70°C 超低温冰箱中待测(做RT-PCR)。

分离右侧海马,置于预先配制的4%多聚甲醛中固定,固定时间不少于24小时,石蜡包埋,常规切片,脱蜡入水,制作组织切片。

2.3 凋亡相关基因 bcl-2 mRNA 及 bax mRNA 表达的 RT-PCR 检测方法

2.3.1 脑组织总 RNA 的提取:参照文献[2]按步骤进行。

2.3.2 PCR Primer 及 Gene Ruler(由上海生工提供):用于扩增 bcl-2、bax 的引物:见表1。

表1 PCR 扩增2种靶基因的引物序列和反应基本参数

基因	引物序列	退火温度	循环次数	产物
bcl-2	5'-GGATTGTGGCTTCTTTGAG-3' 5'-TGTGTGTGTGTGTTCTGC-3'	60°C	30	411bp
bax	5'-TATTTGCCCTTGATCTTGGG-3' 5'-GCCTTTTGCTGAAATTCTCG-3'	57°C	30	500bp
GAPDH	5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	58°C	30	180bp

2.3.3 凋亡调控基因 bcl-2、bax mRNA 表达水平的结果分析方法:采用琼脂糖凝胶电泳,检测扩增效果(有无条带,条带的强弱)。

2.3.4 凋亡调控基因 bcl-2、bax mRNA 表达水平的半定量分析方法:为了更好地比较各组间表达水平的差异,在凝胶图像分析系统下将 bcl-2、bax 基因表达的强度与内对照进行比较,计算出比值,作为该基因的表达式,进行组间比较。

2.4 细胞凋亡的检测:行常规 HE 染色(切片常规胶蜡,入水,苏木素染色5min,盐酸乙醇分色30s,伊红复染1~2min,水洗、胶蜡、透明、中性树胶封片)。与原位细胞凋亡的检测参照博士德公司提供的细胞凋亡检测试剂盒(In Situ Cell Apoptosis Detection, POD)说明书进行操作,DAB显色,显微镜下观察。

2.5 统计学方法:两组间计量资料比较采用 t 检验,

多组间计量资料比较采用方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验或 $R \times C$ 表检验方法,所有统计学数据分析均采用 SPSS10.1 分析软件进行分析处理。

3 结果

3.1 各组大鼠血脂水平比较:表2示,通过比较,发现给予高脂饲料各组的胆固醇水平明显高于正常对照组,差异有非常显著性意义(P 均 <0.01),但给高脂饲料各组之间差异无显著性意义(P 均 >0.05),而甘油三酯水平各组之间差异均无显著性意义(P 均 >0.05)。表明高胆固醇血症造模成功。

表2 各组血脂水平比较(mmol/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	血清甘油三酯	血清胆固醇
正常对照组	6	0.94 ± 0.347	1.81 ± 0.435
模型组	8	1.14 ± 1.212	$7.52 \pm 3.253^*$
假手术组	6	1.34 ± 1.356	$7.86 \pm 2.769^*$
熄风通络方组	8	1.08 ± 0.396	$5.85 \pm 1.236^*$
补阳还五汤组	7	1.07 ± 0.642	$6.23 \pm 1.196^*$

与正常对照组比较, * $P < 0.01$

3.2 熄风通络方与补阳还五汤对脑缺血大鼠神经细胞凋亡影响的比较:正常组及假手术组 HE 染色光镜下观察,细胞形态结构完整,POD 均未发现阳性凋亡细胞出现;模型组 HE 染色见海马区神经细胞坏死,皮质可见多个小灶性细胞变性、坏死,POD 有明显阳性凋亡细胞,部分区域呈片状出现。补阳还五汤组 HE 染色也有海马区神经坏死,皮质个别小灶性细胞变性、坏死现象,POD 大多呈明显阳性凋亡细胞存在,个别呈散在性出现阳性凋亡细胞。熄风通络方组 HE 染色海马区神经细胞坏死明显轻于模型组与补阳还五汤组,只有个别皮质出现细胞水肿、间质水肿现象,未见明显坏死灶,POD 熄风通络方组大鼠中有1只有散在的凋亡细胞存在,其余未见凋亡细胞;另外,从实验过程看,补阳还五汤组大鼠在脑缺血造模清醒后,有部分大鼠出现跳跃等躁动现象,并有2只大鼠死亡,而熄风通络方组未见明显异常。

3.3 熄风通络方与补阳还五汤对持续性脑缺血大鼠海马区凋亡调控基因 bcl-2、bax mRNA 表达影响比较:PCR 电泳图示,模型组大鼠 bcl-2 mRNA 的表达水平较正常对照组与假手术组明显降低,熄风通络组大鼠 bcl-2 mRNA 的表达水平较正常对照组与假手术对照组高,呈过表达,而补阳还五汤组较正常对照组与假手术对照组明显降低,但明显高于模型对照组。

各组大鼠 bax mRNA 的表达水平:模型组大鼠 bax mRNA 的表达水平较正常对照组与假手术组明显增高,熄风通络方组的表达水平接近正常对照组与假

手术组,但略高,而补阳还五汤组较正常对照组与假手术对照组明显增高,但明显低于模型对照组(图略)。

3.4 熄风通络方与补阳还五汤对脑缺血大鼠海马区凋亡调控基因 bcl-2、bax mRNA 表达量影响的比较:为保证定量比较的齐同性,我们每组只取 6 只样品,在同一凝胶上进行电泳比较。表 3 示,模型组大鼠 bcl-2 mRNA 的表达量明显低于正常对照组与假手术组, bax mRNA 表达量则明显高于正常对照组与假手术组,差异均有统计学意义($P<0.01$),而熄风通络组 bcl-2 mRNA 的表达量明显高于模型组,也高于补阳还五汤组,且高于正常对照组与假手术组, bax mRNA 表达量则明显低于模型组,也低于补阳还五汤组,但高于正常对照组与假手术组,差异均有统计学意义($P<0.01$);补阳还五汤组 bcl-2 mRNA 的表达量也明显高于模型组,但低于正常对照组与假手术组, bax mRNA 表达量则明显低于模型组,但高于正常对照组与假手术组,各组间差异均有统计学意义($P<0.01$)。熄风通络方组与补阳还五汤组比较, bcl-2 mRNA、 bax mRNA 差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表 3 各组 bax、bcl-2 mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	bcl-2	bax
正常对照组	6	0.94±0.051	0.29±0.050
假手术组	6	0.91±0.067*	0.34±0.052*
模型组	6	0.39±0.050*	0.67±0.029*
熄风通络方组	6	1.29±0.167*▲△	0.43±0.047*▲△
补阳还五汤组	6	0.82±0.062*▲	0.52±0.022*▲

与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.01$;与补阳还五汤组比较,△ $P<0.01$

4 讨论

细胞凋亡是受到特定基因调控的,神经元凋亡也不例外。在脑缺血时,缺血是诱导脑中基因表达的强烈刺激因素之一,迄今已发现脑缺血至少可诱导产生 80 种不同的 mRNA^[3]。目前已知的神经元凋亡相关基因大体可分为两类^[4],一类是促进凋亡的基因,如 bax、bcl-Xs、BAD、P53、caspase 等;一类是凋亡抑制基因,如 bcl-2、bcl-XL 等。从现有文献分析,bcl-2 是一个公认的凋亡抑制基因, bax 是 bcl-2 家族中与 bcl-2 功能相反的一个基因,可促进细胞凋亡, bcl-2/bax 组成一个平衡体系。 bax/bcl-2 异源二聚体形成的调节是细胞凋亡调控中一个非常重要的环节,其最好的概括就是“二聚体决定细胞命运”。关于 bcl-2 家族基因在细胞凋亡调控中的机理,Stanley Korsmeyer 等进行了深入研究与分析^[5]。我们通过观察持续性脑缺血高脂血症大鼠海马区神经细胞凋亡调控基因 bcl-2 mRNA、 bax mRNA 的表达水平,证实在持续性脑缺血大鼠的海马区,其凋

亡抑制基因 bcl-2 mRNA 的表达水平降低,而促凋亡基因 bax mRNA 的表达水平增高,表明 bcl-2、 bax 基因参与了脑缺血神经细胞凋亡的调控。通过比较熄风通络方与补阳还五汤对持续性脑缺血大鼠神经细胞凋亡调控基因的影响,从观察结果来看,熄风通络方组抗凋亡基因 bcl-2 mRNA 表达水平明显高于模型对照组与正常对照组,且高于补阳还五汤组,呈过度表达。补阳还五汤组的抗凋亡基因 bcl-2 mRNA 表达水平虽也明显高于模型对照组,但未见明显的过度表达;熄风通络方组促凋亡基因 bax mRNA 表达水平明显低于模型对照组,且低于补阳还五汤组,补阳还五汤组的促凋亡基因 bax mRNA 表达水平虽也明显低于模型对照组,但仍高于熄风通络方组,各组 bax mRNA 表达水平均高于正常对照组。以上结果表明熄风通络法与益气活血法均可能通过影响凋亡调控基因 bcl-2 与 bax 的表达,达到抗脑缺血引起的神经元凋亡的作用,这一作用以熄风通络法为优。

已有不少研究证实,益气活血之代表方补阳还五汤可用于脑梗死急性期的治疗,且有减轻脑缺血再灌注引起的神经元凋亡的作用。我们认为,缺血中风主要与肝风内动、脑络痹阻有关,其治疗应以平肝熄风、活血通络为治疗大法。治疗上选用天麻钩藤饮之意,以天麻平肝熄风,合用地龙,既可熄风,又可活血通络,同为君药;钩藤、石决明、珍珠母重镇平肝,加强天麻平肝熄风之效;全蝎、僵蚕、稀莶草助地龙以活血化痰通络,共为臣药;佐以丹参、川芎、鸡血藤养血活血以通络,亦有养血熄风之意;牛膝与葛根合用,共为使药,乃升降并举,一以引逆乱之血气下行,一以升阳明清阳之气上荣痹阻之脑络,从而使逆乱不顺之气血因之而得顺畅,风自得平熄。诸药合用,共奏熄风通络之功效。而通过比较熄风通络方与补阳还五汤对老龄高脂血症双侧持续性脑缺血大鼠神经细胞凋亡调控基因的影响,熄风通络方在抑制促凋亡的表达、促进抗凋亡基因表达方面的作用优于同期对照的补阳还五汤。

参考文献

- 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1202-1203,1063-1064.
- 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京:中国协和医科大学出版社,1999:61-63.
- 张玲,王颖群,余绍祖. 脑缺血诱导的基因表达. 卒中与神经疾病, 1999,6(3):45-48.
- 彭黎明,王曾礼主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社,2000:298-310.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S. et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Mol Cell, 2001,8(3):705-711.