

方药研究

天麻超微粉对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用

陶 陶* 曾可斌* 胡常林*

摘要 目的:探讨天麻超微粉对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用。方法:采用大鼠脑缺血 2 小时再灌注 24 小时的局灶性缺血再灌注模型。用 HE 染色、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色、免疫组化方法分别观察使用天麻超微粉后脑片的病理改变、脑梗塞的体积和神经细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的变化。结果:(1)各组脑梗塞体积比较:天麻超微粉能缩小脑梗塞的体积,其低、中、高剂量组与缺血组相比差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);(2)HE 染色结果:天麻超微粉低、中、高剂量组缺血半球纹状体残存细胞百分率与缺血组相比差异均有显著性($P<0.01$);(3)各组 Bcl-2/Bax 比值比较:缺血组与假手术组相比差异有显著性($P<0.01$);天麻超微粉低、中、高剂量组与缺血组相比差异均有显著性($P<0.01$)。结论:天麻超微粉具有抗脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,其作用可能与调控凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达有关。

主题词 脑缺血/中医药疗法 再灌注损伤/中医药疗法 @ 天麻超微粉

Protective Action of Ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae on Nerves in the Rat of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

Tao Tao, Zeng Kebin, Hu Changlin

(The Second Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400010)

Objective: To explore protective action of ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae on nerves in the rat of Cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods:** The local ischemia-reperfusion injury at model was established by cerebral ischemia for 2 hours and reperfusion for 24 hours. HE staining, 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) staining, immunohistochemical methods were respectively used to investigate pathological changes of brain slices, the size of cerebral infarction and nervous cell apoptotic relative proteins Bcl-2, Bax expression after treatment with ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae. **Results:** (1) Ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae could reduce the size of cerebral infarction. When the low, middle and high dose groups were compared with the ischemia group there were significant differences ($P<0.05$ or $P<0.01$); (2) There were significant differences in the percentage of survival cells of the striatum of ischemic hemisphere in ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae low, middle and high dose groups when compared with the ischemic group ($P<0.01$); (3) There was a very significant difference in Bcl-2/Bax ratio between the ischemia group and the sham operation group ($P<0.01$); and between the Rhizoma Gastrodiae ultramicro-powder low, middle and high dose groups compared and the ischemia group ($P<0.01$). **Conclusion:** Ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae has protective action on the nerve in the ischemia-reperfusion injury, which is possibly related with apoptosis-relative proteins Bcl-2 and Bax expression.

Key Words Cerebral ischemia/TCM therapy; Reperfusion injury/TCM therapy; @Ultramicro-powder of Rhizoma Gastrodiae

脑缺血一段时间后再恢复灌注时常发生严重的脑组织损伤现象,神经细胞凋亡是造成缺血再灌注损伤的重要因素,防治凋亡是减轻缺血性脑损伤的重要环节。近年已有研究认为中药对脑缺血后神经细胞凋亡有影响^[1]。本实验采用大鼠脑缺血 2 小时再灌注 24 小时的局灶性缺血再灌注模型观察天麻超微粉对脑梗塞的体积和神经细胞凋亡相关蛋白的影响,探讨其对缺血性脑损伤的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:SD 大鼠,雄性,250~300g,由重庆

医科大学实验动物中心提供。随机将大鼠分为 6 组,即假手术组 6 只,缺血组 8 只,尼莫地平组 8 只,天麻超微粉低、中、高剂量组各 8 只。均为缺血 2 小时,再灌注 24 小时。

1.2 脑缺血再灌注模型的制备:参照 Longa 等的线栓法^[2]。大鼠麻醉后颈部正中切口,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)等,由 ECA 残端起始部剪一个小口,选用头端烫圆的 4-0 号尼龙外科线插入,以 CCA 分叉处算起进线深度为 (18 ± 0.5) mm,至大脑中动脉(MCA)起始部以完全阻断 MCA 的血供,2 小时后退出尼龙线即为再灌注。模型制成的标志为麻醉苏醒时出现同侧的 Horner 征和对侧以前肢为重的偏瘫。假手术组做相同的手术,但不阻断

* 重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆市临江路 76 号 (400010)

收稿日期:2004-08-13;修回日期:2004-11-19

MCA。

1.3 药物与试剂:天麻超微粉用细胞级微粉碎设备,将天麻药材粉碎成微粉,制成每毫升相当于 4.5g 水溶液,由贵州益康制药有限公司提供,批号 20010802;尼莫地平由山东新华制药厂生产,批号 0112039;Bcl-2 和 Bax 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)为华东师范大学化工厂生产。

1.4 给药方式及途径:假手术组不给药;缺血组给生理盐水(1.5ml/kg);尼莫地平组给尼莫地平(5mg/kg);天麻超微粉低、中、高剂量组分别给天麻超微粉 0.9、1.2、1.5g/kg。均于造模后即刻腹腔注射给药。

1.5 TTC 染色和脑梗死体积测定:大鼠于缺血 2 小时再灌注 24 小时后麻醉,快速断头取脑,在冠状面将脑组织均匀切成 6 片,放入 1%的 TTC 中,37℃恒温孵育 20 分钟,然后用 10%甲醛固定,过夜^[3]。采用病理图像分析仪测量脑梗死面积,根据梯形法则计算脑梗死体积。

1.6 标本制备:大鼠于缺血 2 小时再灌注 24 小时后麻醉,开胸经心脏灌流生理盐水继之以 4%多聚甲醛灌流固定。剥取脑组织,冠状切取含纹状体部位脑块,浸入上述固定液中,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,冠状连续切片,片厚 5μm,HE 染色,光镜下观察组织病理学变化。

1.7 Bcl-2 和 Bax 免疫组织化学染色:采用 SABC 法,切片常规脱蜡至水。蒸馏水新鲜配制 3% H_2O_2 ,室温 5~10 分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次,将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 分钟后,反复 1~2 次。冷却后 PBS 洗涤。抗原修复液 1 滴加在切片上室温 5~10 分钟后 PBS 洗涤。滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,不洗。分别滴加适当稀释的 Bcl-2 或 Bax 的单克隆 I 抗(兔 IgG),4℃过夜。PBS 洗涤,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37℃20 分钟,PBS 洗涤,滴加试剂 SABC,DAB 显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。

1.8 定量分析方法:采用图像分析仪,对切片任意取 10 个视野,对显色阳性的细胞计数。显微镜下胞浆或胞核有棕黄色颗粒者为阳性细胞。

1.9 统计学处理:应用 SPSS10.0 软件包进行统计分析。各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 HE 染色结果

2.1.1 光镜下观察:假手术组:神经元形态正常,核仁

清晰。缺血组:缺血对照侧神经元形态正常,核仁清晰;缺血中心区纹状体神经元脱失明显,残存细胞多无完整细胞结构,缺血周边区皮层未见明显神经元脱失;残存细胞可见坏死性细胞形态及凋亡性细胞形态,后者表现为圆形或椭圆形的凋亡小体,边缘光滑,或胞浆及核固缩,细胞膜边缘有出芽状小泡等。尼莫地平组:缺血中心区神经元脱失明显减轻,周边区皮层细胞形态接近正常。天麻超微粉低剂量组:缺血中心区神经元脱失减轻,周边区皮层细胞形态接近正常。天麻超微粉中、高剂量组:与尼莫地平组相似。

2.1.2 细胞计数:用图像分析系统分别对缺血侧及对照侧(缺血对侧)的皮层及纹状体进行细胞计数,以缺血侧细胞数占缺血对侧细胞数的百分率作为残存细胞百分率。表 1 示,尼莫地平组,天麻超微粉低、中、高剂量组缺血半球纹状体残存细胞百分率与缺血组相比差异均有显著性($P < 0.01$);天麻超微粉中、高剂量组与尼莫地平组相比差异无显著性($P > 0.05$);天麻超微粉低剂量组与尼莫地平组、天麻超微粉中、高剂量组相比差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示天麻超微粉能减轻纹状体细胞脱失程度,增加纹状体残存细胞百分率,其作用与剂量呈正相关。

表 1 各组缺血半球纹状体和皮层残存细胞百分率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	纹状体	皮层
假手术组	6	0	0
缺血组	8	45.55±8.70	86.31±4.24
尼莫地平组	8	75.01±7.22* $\Delta\Delta$	97.33±3.68
天麻超微粉低剂量组	8	60.12±7.80*	94.08±3.93
天麻超微粉中剂量组	8	68.56±7.81* Δ	95.78±3.01
天麻超微粉高剂量组	8	74.33±8.21* $\Delta\Delta$	96.43±4.56

与缺血组比较,* $P < 0.01$;与天麻超微粉低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组脑梗死体积比较:TTC 染色后,正常脑组织呈红色,而缺血梗死区为苍白色,与正常组织边界清晰,显示出明显的梗死区域。梗死体积比(%)=脑缺血再灌注后形成的脑梗死体积/对侧正常半球体积。表 2 示,假手术组没有梗死灶形成,缺血组脑组织梗死面积较大,尼莫地平组,天麻超微粉中、高剂量组梗死面积

表 2 各组脑组织梗死体积比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	梗死体积比
假手术组	6	0
缺血组	8	34.35±6.23
尼莫地平组	8	15.89±7.08**
天麻超微粉低剂量组	8	25.74±9.16* Δ
天麻超微粉中剂量组	8	20.96±8.53**
天麻超微粉高剂量组	8	17.11±8.89**

与缺血组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与尼莫地平组比较, $\Delta P < 0.05$

表3 各组 Bcl-2、Bax 在同侧皮层表达的百分率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2(%)	Bax(%)	Bcl-2/Bax
假手术组	6	4.39±0.47	2.23±0.61	1.97±0.14
缺血组	8	22.91±4.13 $\Delta\Delta$	32.35±4.48 $\Delta\Delta$	0.71±0.13 $\Delta\Delta$
尼莫地平组	8	37.82±1.01 $^{**}\Delta\Delta$	19.66±1.12 $^{**}\Delta\Delta$	1.92±0.10 **
天麻超微粉低剂量组	8	28.81±5.12 $^{**}\Delta\Delta\Delta$	28.55±3.64 $\Delta\Delta\Delta$	1.01±0.21 $^{**}\Delta\Delta\Delta$
天麻超微粉中剂量组	8	30.26±2.33 $^{**}\Delta\Delta\Delta$	26.73±1.99 $^{**}\Delta\Delta\Delta$	1.13±0.26 $^{**}\Delta\Delta\Delta$
天麻超微粉高剂量组	8	36.92±1.53 $^{**}\Delta\Delta$	21.55±1.69 $^{**}\Delta\Delta$	1.71±0.17 $^{**}\Delta$

与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与缺血组比较, $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与尼莫地平组比较, $\Delta P < 0.01$

较缺血组明显缩小, 差异均有显著性($P < 0.01$); 天麻超微粉低剂量组与缺血组相比差异有显著性($P < 0.05$); 天麻超微粉中、高剂量组与尼莫地平组相比差异无显著性($P > 0.05$)。提示天麻超微粉能缩小脑梗死的体积, 其作用与剂量呈正相关。

2.3 各组凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的比较: 由于缺血中心区 Bcl-2 几乎无表达, 只有 Bax 大量表达, 而周边区皮层 Bcl-2 和 Bax 都有表达, 故只比较两者皮层的表达变化。以阳性细胞数占残存细胞数的百分率进行统计。表3示, 假手术组 Bcl-2 和 Bax 表达很少, 与其他各组比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 尼莫地平组, 天麻超微粉中、高剂量组 Bcl-2 和 Bax 表达与缺血组相比差异均有显著性($P < 0.01$); 天麻超微粉低剂量组 Bcl-2 表达与缺血组相比差异有显著性($P < 0.05$), 而 Bax 表达与缺血组相比差异无显著性($P > 0.05$); 天麻超微粉高剂量组与尼莫地平组相比差异无显著性($P > 0.05$)。提示天麻超微粉能提高 Bcl-2/Bax 的表达比例, 其作用与尼莫地平相当, 且与剂量呈正相关。

3 讨论

近年研究认为^[4], 脑缺血时神经细胞凋亡受基因调控, 已知与神经元凋亡相关的基因有 ICE 酶系家族、P53 基因、Bcl-2 基因家族、即刻早期基因(c-fos 和 c-jun)等。各种基因和蛋白在细胞凋亡中的作用各不相同, 如 Bcl-2 与 Bax 同属 Bcl-2 蛋白家族, 但 Bcl-2 是 Bcl-2 基因家族中抑凋亡蛋白, Bax 是该基因家族中促凋亡蛋白。细胞凋亡的发生还与 Bcl-2/Bax 比值有关, 比值高, 细胞存活率高, 比值低, 细胞凋亡率高, 测定 Bcl-2/Bax 比值有利于判断是否发生细胞凋亡^[5]。

本研究所采用的 HE 染色能初步观察脑组织神经元的病理改变。TTC 染色作为线粒体活性指示剂, 通常用于评估局灶性脑缺血后脑梗死范围, 通过线粒体中过氧化氢酶还原作用, 正常脑组织呈红色, 而脑梗死区为苍白色^[6]。

药理研究表明天麻具有扩血管、抗缺血缺氧、降低血浆黏度, 对红细胞变形和聚集指数异常均有显著改

善作用^[7,8]。这为天麻防治缺血性中风提供了理论依据。天麻中的有效成分分布于细胞内与细胞间质, 而以细胞内为主。采用传统方式粉碎其细胞的破壁率极低, 有效成分释放速度很慢。采用细胞级微粉碎的方式, 将天麻粉碎成超微粉, 天麻细胞的破壁率 $\geq 95\%$, 细胞内的有效成分充分暴露出来, 其释放速度及释放大幅提高, 其生物利用度亦会相应提高。已有研究证明, 天麻超微粉和普通粉在药效学方面有差异^[9], 天麻经细胞级微粉碎后的超微粉, 其活性成分有所提高^[10]。

本实验的结果显示, 天麻超微粉能减轻纹状体细胞脱失程度, 增加纹状体残存细胞百分率, 缩小梗死体积, 提高 Bcl-2/Bax 的表达比例, 说明其可减轻脑缺血再灌注后神经细胞损伤, 具有神经保护作用。这种保护作用可能与其调控凋亡相关蛋白的表达有关, 这为临床应用天麻治疗缺血性脑血管疾病提供了一定的实验依据。

参考文献

- 田国庆, 郭赛珊, 卢贺起. 中药与脑缺血神经细胞凋亡. 四川中医, 2001, 19(3): 21~23.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20(1): 84~86.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke, 1986, 17(6): 1304~1308.
- 项永生, 徐昆. 凋亡与脑缺血损伤. 暨南大学学报(医学版), 2000, 21(2): 126~129.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 1993, 74(4): 609~619.
- Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY, et al. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. Stroke, 1996, 27(9): 1657~1662.
- 任世兰, 于龙顺, 赵国举. 天麻对血管阻力和耐缺血缺氧能力的影响. 中草药, 1992, 23(6): 302~304.
- 王正荣, 罗红淋, 肖静, 等. 天麻素对动脉血管顺应性以及血流动力学的影响. 生物医学工程学杂志, 1994, 11(3): 197~201.
- 刘智, 李诚秀, 李玲. 天麻粉不同粒径的镇静镇痛作用研究. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(5): 383~385.
- 刘智, 王丽. 天麻细胞级微粉碎和普通粉碎质量标准对比实验研究. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(6): 474~476.