

实验研究

健脑方对 SHRsp 大鼠卒中后脑神经细胞凋亡的防治作用

王少杰^{*} 白文^{*} 王春玲^{*} 李红军^{*} 高艳斌^{*}

摘要 目的:观察急性脑卒中后大鼠脑神经细胞凋亡的变化及健脑方对凋亡的防治作用。方法:选择易卒中型自发性高血压(SHRsp)大鼠制作急性脑卒中动物模型,用健脑方干预治疗,观察造模前后大鼠神经系统症状、体征及大鼠海马组织病理结构的改变,应用原位末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)标记(TUNEL)法、免疫组化法及固定化蛋白质印迹(Western blot)法观察大鼠造模及药物干预前后脑神经细胞凋亡的改变。结果:预防给药组大鼠卒中发生率明显低于模型组($P<0.01$)。TUNEL法显示模型组棕色颗粒在3天后达到高峰,应用健脑方干预后,棕色颗粒表达明显减少($P<0.05$)。Western结果显示,模型组 bcl-2、bax、caspase3 在卒中后不同时相较正常组表达均增加。应用健脑方预防及治疗后均可使 bcl-2 表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),caspase3 表达下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);bax 在预防给药组表达下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),与治疗给药组比较差异无显著性($P>0.05$)。结论:健脑方对脑卒中大鼠有明显的脑保护作用,其机制与抑制神经细胞凋亡及凋亡相关信号的传导有关。

主题词 垂体卒中/中医药疗法 细胞凋亡/药物作用 @ 健脑方

Effect of Jiannao Decoction on Cerebral Nerve Cell Apoptosis of SHRsp Model Rat after Stroke

Wang Shaojie, Bai Wen, Wang Chunling, et al.

(People's Hospital of Peking University, Beijing 100044)

Objective: To observe changes of cerebral nerve cell apoptosis of the rat after acute stroke and the preventive and treating effect of Jiannao Decoction on the apoptosis. **Methods:** SHRsp rats were used to establish the model of acute stroke, which were treated with Jiannao Decoction. Symptoms and signs of the nervous system and changes of pathological structures of the hippocampus were investigated before and after establishment of the model, and changes of cerebral nerve cell apoptosis before and after establishment of the model and medication were investigated with TUNEL, immunohistochemical and Western blot methods. **Results:** The incidence rate of stroke in the prevention group was significantly lower than that of the model group ($P<0.01$). TUNEL showed that the brown granules in the model group reached the high peak at 48h, and after treatment of Jiannao Decoction, the brown granules decreased significantly ($P<0.05$); Results of Western blot indicated that expressions of bcl-2, bax, caspase3 increased at different time after stroke as compared with those in the normal group, and after prevention and treatment of Jiannao Decoction, expression of bcl-2 increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), expression of caspase3 decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and expression of bax in the prevention group decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$) but with no significant difference as compared with that of the treatment group ($P>0.05$). **Conclusion:** Jiannao Decoction has significant protective action on brain in the rat with stroke, which is related with inhibiting the effect of nerve cell apoptosis and conduction of apoptosis-related signals.

Key Words Pituitary stroke/TCM therapy; Apoptosis/drug action; @ Jiannao Decoction

脑卒中是目前危害人类健康的三大疾病之一。我们选择易卒中型自发性高血压(SHRsp)大鼠制作急性脑卒中动物模型,用健脑方干预治疗,观察大鼠脑神经细胞凋亡的变化及健脑方对凋亡的防治作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:选用从美国 NIH 公司引进的易卒中型自发性高血压(SHRsp)大鼠 55 只(由中国医

学科学院阜外医院实验动物科提供,雌雄各半,鼠龄 7 周)。实验大鼠随机分为模型组 25 只,药物干预组 30 只;模型组按大鼠发生卒中后 6 小时、24 小时、48 小时、3 天、7 天分为 5 个时间段,每时间段 5 只;药物干预组中再随机分为治疗给药组、预防给药组,每组各 15 只,并根据大鼠卒中后 6 小时、3 天、7 天分为 3 个时间段,每时间段 5 只。此外,另选 7 周龄正常 Wistar 大鼠 5 只作为正常对照组。

1.2 药物组成及给药方法:健脑方由天麻 15g、栀子 15g、板蓝根 15g、川芎 10g 组成,按常规煎煮法提取上清液,4℃冰箱保存待用。药物浓度按人与大鼠体表面

* 北京大学人民医院中医科,北京市西城区西直门南大街 11 号(100044)

收稿日期:2005-01-26;修回日期:2005-05-12

积公式计算出大鼠生药量 6.4g/kg 体重^[1],再核算成溶液灌胃,每次喂药量为 2ml,每天两次。

1.3 造模:模型组及药物干预组大鼠均喂 4%NaCl 饲料并饮用 1%的盐水,治疗给药组同时用中药健脑方灌胃。盐负荷饮食喂养至第 2 周时用尾套法(中日友好医院生产的尾压仪)测量大鼠收缩压,当收缩压超过 180mmHg 后观察大鼠有无脑卒中的各项指标并记录。大鼠发生卒中后即停止盐负荷改用普通水喂养。预防给药组大鼠发生卒中后即予健脑方灌胃。根据大鼠神经系统症状体征评分标准并按各个时间段处死动物。第 12 周结束实验,统一处死未卒中动物^[2]。

1.4 研究方法

1.4.1 大鼠神经系统症状体征评分标准:采用日本永冈明伸等的脑卒中症状体征评分标准^[3]。0 分:正常;1 分:运动量轻度减少,或轻度兴奋;2 分:运动量明显减少,或激惹性亢进;3 分:不能行走,忧郁性症状(体卧不动);4 分:不能站立,肢体麻痹(瘫痪)或任何一侧肢体瘫痪。每日上午 9 时及下午 3 时对大鼠进行评分(用恫吓的方式查看反应和活动能力)、称重、记录。当日平均积分达到 2 分以上即可判定大鼠已发生卒中^[2]。以 3 天评分的平均值评价脑卒中症状及体征变化程度。

1.4.2 大鼠脑组织病理改变:观察结束后,每组动物随即常规制作石蜡切片,HE 染色。

1.4.3 原位末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)标记(TUNEL)法进行细胞凋亡的检测。

1.4.4 免疫组织化学染色(SP)法:每组动物随即常规制作石蜡切片及冰冻切片,3% H_2O_2 灭活内源性酶,分别与一抗 caspase3、bcl-2、bax 抗体(1:100 稀释,美国 Santa Cruz 公司)、生物素标记 IgG 二抗(1:400 稀释,中山公司)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉素亲和素复合物(1:400 稀释,中山公司)孵育,DAB 显色,苏木素复染,封片观察。

1.4.5 固定化蛋白印迹(Western blot)法:参照 Santa Cruz 公司提供的蛋白提取方法,应用裂解缓冲液分别裂解脑组织得到总蛋白。以牛血清蛋白(BSA)作为标准品,根据蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)手册绘制蛋白定量标准曲线,于分光光度计 500nm 下测吸光值,计算出提取液的蛋白浓度。取总蛋白 50 μ g,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 NC 膜上,封闭后,加入一抗 caspase3、bcl-2、bax 抗体(Santa Cruz 公司),工作浓度 1:200,辣根过氧化物酶结合的二抗(英国 Amersham 公司),工作浓度 1:2000,用 ECL 化学发光试剂盒(Amersham 公司)检测杂交信号。

1.5 图像分析与统计方法:HE 染色切片直接在光镜

下观察,并在 10 $\times$ 40 倍视野下进行 TUNEL 计数,取每张切片中区域相互不重叠的 4 个视野,计算其中阳性细胞总数,实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,统计分析采用 *t* 检验。Western blot 结果用 PhosphoImager 图像分析仪(美国 Molecular Dynamics 公司)测定条带的吸光度(A 值),以 A 值代表蛋白的相对表达量,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计学软件,采用方差分析及组间多重比较分析。

2 结果

2.1 各组大鼠卒中发生率及神经系统症状体征积分比较:表 1 示,模型组有 2 只大鼠、预防给药组有 1 只大鼠意外死亡;发生卒中大鼠的症状轻重程度不等,轻者出现运动减少、易激惹,重者出现行走转圈或不能站立、身体向一侧倾倒、完全偏瘫、抽搐或大便失禁等。预防给药组大鼠卒中发生率明显低于模型组与治疗给药组(均 $P<0.01$),治疗给药组与预防给药组大鼠神经系统症状体征积分明显低于模型组(均 $P<0.01$),且预防给药组疗效优于治疗给药组($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠卒中发生率及神经系统症状体征积分变化比较

组别	卒中大鼠数(只)	大鼠总数(只)	卒中发生率(%)	积分(分, $\bar{x}\pm s$)
模型组	19	23	82.61	2.87 $\pm$ 0.16
治疗给药组	13	15	86.67	2.19 $\pm$ 0.09*
预防给药组	6	14	42.86 $\triangle$	2.08 $\pm$ 0.08* $\triangle$

与模型组比较,* $P<0.01$;与治疗给药组比较, $\triangle P<0.01$

2.2 HE 染色结果:正常大鼠神经细胞体呈圆形,核大,核膜清晰,核仁明显。神经细胞数目多且紧密、整齐,神经细胞结构和分布正常,神经纤维走向规则。模型 6 小时、24 小时、48 小时、3 天组大鼠可见局灶性出血坏死,神经元数目减少,神经纤维走向紊乱。7 天组不仅可见出血及梗死灶,还可见胶质细胞增生活跃。

2.3 TUNEL 染色结果:光镜下可见染色为棕色的细胞为凋亡细胞,阳性细胞主要分布在海马、皮层区。凋亡细胞在卒中发生 6 小时即出现,随时间延长凋亡细胞逐渐增多,并在 3 天时达到高峰,以后逐渐减少,7 天后凋亡细胞基本消失。表 2 示,预防给药组卒中 3 天后阳性细胞数明显低于同期模型组($P<0.05$)。

表 2 药物干预前后大鼠 TUNEL 阳性细胞计数(个, $\bar{x}\pm s$)

组别	卒中后 6 小时	卒中后 3 天	卒中后 7 天
模型组	14.50 $\pm$ 8.53(5)	49.83 $\pm$ 22.82(5)	18.83 $\pm$ 11.23(4)
治疗给药组	12.33 $\pm$ 12.98(5)	30.00 $\pm$ 15.67(5)	7.00 $\pm$ 11.37(5)
预防给药组	9.50 $\pm$ 4.04(5)	20.00 $\pm$ 7.13*(5)	11.50 $\pm$ 9.66(4)

与同期模型组比较,* $P<0.05$;括号内为大鼠数

2.4 免疫组化法染色结果:caspase3、bcl-2、bax 的阳性表达部位(棕色颗粒)均在胞浆和胞膜。其中 bcl-2 在

表3 各组大鼠不同时间段 bcl-2、caspase3 灰度值变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	bcl-2	bax	caspase3
模型组	6 小时	171949 ± 12312(5)	71702 ± 6689(5)	123948 ± 10223(5)
	3 天	230310 ± 7805(5)	10878 ± 7743(5)	175032 ± 9956(5)
	7 天	177099 ± 9632(4)	164617 ± 8045(4)	157208 ± 5545(4)
治疗给药组	6 小时	217104 ± 8044(5)*	61649 ± 9904(5)	104646 ± 7521(5)
	3 天	342246 ± 5867(5)**	97172 ± 6657(5)	56663 ± 4432(5)**
	7 天	342989 ± 5439(5)**	38587 ± 7137(5)	124314 ± 8094(5)*
预防给药组	6 小时	231885 ± 12647(5)*	92505 ± 3589(5)*	73249 ± 6840(5)*
	3 天	335781 ± 6694(5)**	64743 ± 6303(5)*	54419 ± 7567(5)**
	7 天	411639 ± 8485(4)**	65770 ± 8149(4)**	114210 ± 10275(4)**

与同时时间模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 括号内为大鼠数

正常组大鼠神经元细胞可见少量表达, 卒中后 6 小时表达有所增加, 3~7 天时达到高峰, 主要阳性部位是 caspase3 细胞; 预防给药组表达高于治疗给药组, 治疗给药组表达高于模型组; bax 在正常对照组大鼠神经元细胞可见表达, 发生卒中后 24~48 小时即达到高峰, 第 7 天表达有所下降; 而治疗给药组、预防给药组表达较模型组减轻, 但两组间差异无显著性; caspase3 在卒中后 48 小时表达有所增加, 3~7 天时达到高峰, 而治疗给药组、预防给药组表达较模型组略减轻, 但组间差异无显著性。

2.5 Western blot 法测定结果: 表 3 示, 应用健脑方干预后, 预防给药组、治疗给药组均可使 bcl-2 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), caspase3 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 bax 仅在预防给药组表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 治疗组无明显变化 ($P > 0.05$), 这可能与治疗用药时间较短有关。

3 讨论

本研究选择 SHRsp 大鼠制作急性脑卒中动物模型, 并用健脑方干预治疗, 发现应用健脑方后可明显降低 SHRsp 大鼠卒中发生率 ($P < 0.01$); 无论预防给药组或治疗给药组, 其神经系统症状体征积分均明显低于模型组; 应用健脑方干预后, TUNEL 法显示大鼠脑组织棕色颗粒表达明显低于同期模型组 ($P < 0.05$), 同时 caspase3 表达亦下降; 正常脑组织有 bcl-2 和 bax 的散在微弱表达。脑卒中发生后 bcl-2 表达增加, 表达较强的细胞形态接近正常, 损伤较轻。bax 蛋白表达于卒中后 48 小时达到高峰, 表达较强的细胞形态变化较大, 损伤较重。bcl-2 可防止或减少脑卒中所致的细胞凋亡的发生发展, 但 bcl-2 抗细胞凋亡作用是有限的, 如果依然未能挽救凋亡的细胞, 则启动 bax 基因表达, 加速细胞的死亡。本研究显示, 应用健脑方预防及治疗后均可使 bcl-2 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), bax 在预防给药组表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 治疗

给药组则无明显下降 ($P > 0.05$), 说明健脑方是通过调节 bcl-2 家族蛋白而调节细胞凋亡进程的。

中医学认为, 中风主要在于患者素体气血不足或肝肾阴亏, 加之忧思恼怒、饮酒饱食、房劳过度或外邪侵袭, 致使肝阳暴张, 阳化风动, 气随血逆, 内风时起, 内风挟痰挟火, 横窜经络, 蒙蔽清窍, 因此风、火、痰、瘀是中风急性期的主要病理改变。健脑方主要由天麻、栀子、板蓝根、川芎组成, 具有清热解毒、祛风活血之功。其中川芎含川芎内脂、川芎酚和生物碱川芎嗪等成分, 特别是生物碱中含有钙离子拮抗剂, 能明显抑制高血压大鼠血管平滑肌钙离子内流, 并对血管内皮具有保护作用^[4]。天麻为平肝熄风药, 其化学成分香荚兰醛、香荚兰醇和天麻素等可增加大鼠和兔的脑血流量, 降低脑血管阻力。该药还可能通过影响凋亡基因的表达, 进而抑制细胞的死亡^[5]。板蓝根、栀子为清热解毒药, 对再灌注损伤的神经细胞具有明显的保护作用^[6], 与天麻、川芎等祛风活血药组合, 对不同时相的 bcl-2 表达均呈增加趋势。既往的研究提示, 中药的神经元保护作用可能是通过清除自由基、抗炎、拮抗钙超载以及调节细胞凋亡等共同作用实现的, 本实验表明, 中药对凋亡的调控作用主要是通过调节凋亡相关蛋白的表达而实现的, 从而为中药预防治疗脑卒中提供理论依据。

参考文献

- 徐叔云. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2003; 203.
- 王文, 张秀娥, 孙瑞成, 等. 艾地苯醌对卒中型自发性高血压大鼠脑卒中及急性脑缺血的影响. 中国高血压杂志, 1993, 1(2): 86.
- 永冈明伸, 垣花满, 藤原一男. 易卒中型自发性高血压大鼠的脑血管损害以及 CV-2619 对其神经系统症状的改善作用. 药理与治疗, 1984, 12(12): 5345~5351.
- 王玉良, 巴彦坤. 川芎嗪对心血管组织的药理和电生理作用——一种新的“钙拮抗剂”. 中西医结合杂志, 1985, 5(5): 291~294.
- 孙晓芳, 王巍, 王丹巧, 等. 天麻及其制剂神经保护机制的研究进展. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 292~294.
- 李伟华, 朱陵群, 王硕仁, 等. 黄芩、栀子对神经细胞缺氧缺血/再灌注损伤的保护作用. 中国药理学杂志, 2004, 39(5): 244~245.