

2.4 心肾相交理论难以指导临床吗? 最后,“李文”通过对交通心肾代表方剂——交泰丸方义的分析得出结论:心肾相交理论难以指导临床。“李文”认为,“重用黄连苦寒清泻心火,少佐辛温的肉桂,其方义显然是为防止阴阳格拒,而不是引火归原。”肉桂性温,固然有反佐黄连、防止阴阳格拒之义,但其性下行,确有引火归原之功!“李文”进一步分析:“即便是按照心肾相交理论,这时的心火则是亢盛的‘邪火’而非能够下温肾水的心阳,若肉桂发挥引火归原作用,岂不是将引‘邪火’入肾,这难道不与传统的心肾相交理论相悖?”对于比类

取象思维来说,正与邪并非截然孤立(独立)的两种事物,而是同一事物的两种不同状态,它们是相互贯通的。如六气和六淫无非是风、寒、暑、湿、燥、火的正常状态和异常状态。同样,邪、正之心火本为一物,心火以下降为顺,下降即为正火;以上浮为逆,上逆即为邪火。肉桂引火下行,使心火复归正路,是转上浮之邪火为下降之正火,而非引邪火入肾。“李文”将肉桂的引火归原作用理解为引邪火入肾,是站在逻辑思维角度理解中医的正、邪关系,将两者截然割裂开来,其荒谬性、机械性是不言而喻的。

脑心通抑制脑梗死所致的 caspase-12 凋亡通路的实验研究

张红菊* 夏 斌* 赵忠新*

caspase-12 是 caspase 家族成员,是存在于内质网上的促凋亡因子,内质网应激早期可通过 GRP (glucose-regulated protein, GRP) 的表达增多来保护细胞,但长期过强的应激则启动凋亡通路,最终将导致细胞死亡。本实验的目的在于证实脑缺血后,启动了与内质网应激相关的 caspase-12 凋亡通路,并观察到脑心通可抑制 caspase-12 凋亡通路来保护细胞。

1 材料与方法

1.1 材料:72 只健康成年 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 250~300g,由复旦大学动物实验中心提供。脑心通由陕西咸阳步长制药有限公司提供,由黄芪、当归、赤芍、川芎、丹参等 16 味中药组成,用生理盐水配制成浓度为 25% 的药液备用。免疫组化中一抗、二抗均购于 Santa Cruz 公司。引物自行设计,由上海博亚生物技术有限公司合成;Trizol 购自 Invitrogen 公司;Taq 酶购自 Taka 公司;逆转录盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 脑缺血模型:大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛 (300mg/kg) 麻醉,采用改良的线栓法制成 Wistar 大鼠永久性 MCAO 模型成功的标志按 zealanga⁵ 分制评分在 1~3 分者为成功。假手术为尼龙线入颈内动脉后不到达大脑中动脉分叉处。

1.2.2 动物分组与给药:72 只大鼠随机分为假手术组、模型组和模型加脑心通治疗(脑心通治疗组),每个时间点为 6 只,半数供免疫组化使用,半数供 RT-PCR 使用。给药途径:治疗组给预生理盐水和脑心通药液灌胃 (2g/kg, 药物剂量相当于 70kg 成人剂量剂量的 10 倍)。每天 1 次,连续 5 天,于第 5 日灌胃 1 小时后手术制备局灶脑缺血模型。模型组仅制备局灶脑缺血模型,不做治疗。假手术组大鼠不做治疗。

1.2.3 免疫组织化学和病理学观察:各组动物在以上各缺血时间点 (6 小时、12 小时、24 小时),用 10% 水合氯醛 10ml/kg 剂量腹腔注射,开胸暴露心脏,经升主动脉插管,用生理盐水 100ml 快速冲洗,再用 4% 多聚甲醛 (pH7.4, 4℃) 250ml 快速灌注,随后慢速灌注 250ml,再用 4% 多聚甲醛 4℃ 浸泡 24 小时,

取出脑组织进行脱水,透明,浸蜡,包埋,切片。切片后分别用 HE 染色进行病理组织学观察及进行免疫组化测定。

免疫组织化学采用 SP 法:羊抗鼠 caspase-12 (Santa Cruz, C-19)。常规脱蜡至水, PBS 洗 3 分钟 3 次,加 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 20 分钟, PBS 洗 3 分钟 3 次, 98℃ 20 分钟进行抗原修复,室温冷却, PBS 洗 3 分钟 3 次,加一抗 caspase-12 (1:50) 羊抗鼠, 4℃ 过夜。 PBS 洗 3 分钟 3 次,加 b-兔抗羊 (1:200) 37℃ 30 分钟, PBS 洗 3 分钟 3 次,加 streptavidin-HRP (1:200) 37℃ 30 分钟, PBS 洗 3 分钟 3 次。0.04% 二氨基联苯胺镍法 (DAB) 加 0.03% H₂O₂ 显色 8~12 分钟,水洗。苏木精衬染 1 分钟,水洗。常规树脂封片,观察。正常血清取代一抗作替代对照。Caspase-12 呈棕黄色颗粒。计算机图像分析经北京中科通用医学图像分析系统 (GMIAS 2.0) 处理,每片随机取 10 个视野 (×100) 输入图像分析仪,以阳性染色细胞数进行统计分析。

2 结果

2.1 病理组织学观察:模型组大鼠纹状体区神经细胞呈缺血改变,神经元形态不完整,部分细胞核消失,细胞缩小,细胞周围间隙增大。脑心通治疗组纹状体区神经元呈轻度缺血改变,细胞核少量消失,少部分细胞缩小,细胞周围间隙增大不明显。

2.2 免疫组织化学结果:假手术组在各时间点无 caspase-12 免疫染色阳性细胞。模型组纹状体区缺血细胞内可见增多的 caspase-12 阳性颗粒,呈棕黄色;caspase-12 在 6~24 小时均增多,12 小时达峰值后逐渐下降。脑心通治疗组在纹状体区缺血细胞内可见较少的 caspase-12 阳性颗粒。图略。

2.3 RT-PCR 结果:经琼脂糖凝胶电泳可见 caspase-12 和 GAPDH 的条带分别为 512bp 和 462bp。假手术组无表达,模型组于梗死后 6 小时开始上升,12 小时达高峰,随后逐渐下降,24 小时仍有表达。脑心通治疗组在以上各时间点的表达均低于模型组。

3 讨论

我们的实验通过免疫组织化学和 RT-PCR 证实, caspase-12 无论是蛋白表达还是在其 mRNA 转录水平在 6~24 小时模型组纹状体缺血组织细胞内均增多,12 小时达峰值后逐渐下降,24 小时仍明显高于正常;脑心通治疗组在纹状体区缺血组织细胞内 caspase-12 明显减少。假手术组在各时间点无表达。

* 第三军医大学第二附属医院神经内科学科,上海市黄浦区凤阳路 415 号 (200003)

收稿日期:2005-06-14