

复方蒲黄颗粒对局灶性脑缺血再灌注大鼠热休克蛋白 70 及其 mRNA 表达的影响

夏 韵¹ 向 军¹ 刘小雨¹ 石红军²

(1. 同济大学附属第十人民医院中医科, 上海市延长中路 301 号, 200072;

2. 同济大学分子生物学实验室)

[摘 要] **目的** 观察复方蒲黄颗粒对大鼠脑缺血再灌注后热休克蛋白 70(HSP-70) 及其 mRNA 表达的影响。 **方法** 75 只雄性 SD 大鼠, 采用大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血再灌注大鼠模型, 随机分为假手术组、模型组, 蒲黄颗粒大、中、小剂量组, 每组 15 只。各组大鼠分别在缺血 2 小时再灌注 6、24、72 小时断头取脑组织, 每时间点 5 只。再灌注 24 小时进行神经功能缺陷评分, 采用 Nissl 染色观察神经元形态学变化; 采用原位杂交检测 HSP-70 mRNA 的表达; 采用免疫组化法检测 HSP-70 蛋白的表达。 **结果** 蒲黄颗粒大、中剂量组在缺血再灌注 24 小时神经功能改善显著优于模型组 ($P < 0.05$); Nissl 染色结果显示, 模型组大脑皮层神经元形态不规则, 体积缩小, 胞核固缩深染, 细胞间质水肿, 尼氏体减少, 可见明显的神经元丢失, 而蒲黄颗粒各剂量组未见明显的神经元损伤和丢失; 模型组在再灌注 6~72 小时 HSP-70 及其 mRNA 的表达均增加, 与假手术组比较各时间点差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 蒲黄颗粒各剂量均能增强 HSP-70 及其 mRNA 的表达, 与模型组各时间点的差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 复方蒲黄颗粒能促进脑缺血再灌注后 HSP-70 的表达, 减轻缺血再灌注损伤。

[关键词] 复方蒲黄颗粒; 脑缺血再灌注损伤; 热休克蛋白 70; mRNA

Effect of Fufang Puhuang Granule on Expression of Heat Shock Protein-70 and Its mRNA in Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion

XIA Yun, XIANG Jun, LIU Xiaoyu, et al.

(The 10th People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Fufang Puhuang Granule (Compound Pollen Typhae Granule) on the expression of Heat Shock Protein-70 (HSP-70) and its mRNA in rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** The 75 SD male rats were randomized into 5 groups ($n = 15$): sham operation group, ischemia reperfusion model group, Puhuang Granule large, medium, and small doses groups. The rats were surgically prepared for occlusion of the middle cerebral artery. Reperfusion was conducted at 2 hours after ischemia. At 6, 24, 72 hours after reperfusion the rats were decapitated, 5 at each time point. At 24 hours after reperfusion, scores of neurological deficit were estimated, the morphologic changes of neurons were observed by using Nissl staining, the expression of HSP-70 mRNA were examined by using in situ hybridization, and the expression of HSP-70 was detected by immunohistochemical method. **Results** The effect of Puhuang Granule large and medium groups at 24 hours after reperfusion on improving the neurological functions was better than that of the model group ($P < 0.05$). The result of Nissl staining showed irregular shaped and small sized neurons with pyknosis, interstitial edema, and Nissel body decrease in the model group, and there was an obvious neuron loss. But in all Puhuang Granule groups, there was no obvious injured neurons and neuron loss. In the model group, the expression of HSP-70 and its mRNA were both enhanced at 6~72 hours after reperfusion, compared with the sham operation group at each time point, the difference was significant ($P < 0.01$). The expression of HSP-70 and its mRNA were enhanced in all Puhuang Granule groups, compared with the sham operation group at each time point, the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Puhuang Granule improves the expression of HSP-70 of rats with the injury of cerebral ischemia-reperfusion.

Key Words Fufang Puhuang Granule (Compound Pollen Typhae Granule); Cerebral ischemia-reperfusion injury; HSP-70; mRNA

复方蒲黄颗粒是治疗脑梗死、短暂性脑缺血发作等缺血性脑病的中药制剂, 既往的临床与实验研究中已发现其良好的脑缺血保护作用^[1,2], 为明确其对神经元的保护作用机制, 本研究观察了复方蒲黄颗粒干预下的局灶性脑缺血再灌注大鼠热休克蛋白 70(HSP-70) 及其 mRNA 表达的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性 SD 大鼠 75 只, 3~4 月龄, 体重 240~300g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 生产许可证号 SCXK(沪) 2002-0010。75 只 SD 大鼠随机分为 5 组: 假手术组、模型组、复方蒲黄颗粒大剂量(大剂量)组、复方蒲黄颗粒中剂量(中剂量)组、复方蒲黄颗粒小剂量(小剂量)组, 每组 15 只, 每组分为脑缺血 2 小时再

灌注 6、24、72 小时 3 个亚组,每亚组 5 只大鼠。

1.2 药物

复方蒲黄颗粒由上海市第十人民医院药剂科生产,沪药制字 Z04190434。主要由生蒲黄、海藻、葛根、通天草、石菖蒲、水蛭等组成,先将前 5 味以等比例配制颗粒剂,每袋 15g,再将水蛭粉(另包每袋 1.5g)混和而成。

1.3 试剂

HSP-70 mRNA 原位杂交检测试剂盒及 HSP-70 抗体、SABC 试剂盒、DAB(3'-二氨基联苯胺)均购自武汉博士德生物科技公司,焦油紫购自美国 Electron Microscopy Sciences 公司,DEPC(焦碳酸二乙酯)购自美国 Sigma 公司,戊巴比妥购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器

NU-5500E 恒温培养箱(美国 NUAIRE 公司);TE2000-U 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);HM 325 轮转式石蜡切片机(德国 Microm 公司);SS325 高压蒸汽消毒锅(日本 TOMY 公司)。

1.5 给药方法

蒲黄颗粒大、中、小剂量组给药剂量分别为 $10\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 及 $2.5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,将各个剂量的复方蒲黄颗粒溶于水中,每天灌胃 1 次,余组以等体积生理盐水灌胃,连续饲养 2 周后造模。

1.6 模型制备

采用线栓法,参照 Longa 等^[3]的方法并改良。以 3%戊巴比妥 0.1ml/100g 腹腔注射麻醉大鼠,结扎左颈总动脉近心端、颈外动脉远心端,颈总动脉远心端备线,颈内动脉放置微动脉夹。于颈总动脉近分叉处做切口,向颈内动脉方向插入头端蘸有石蜡的尼龙线(直径 0.26mm),以颈总动脉分叉处计算进线深度(18~20mm),阻塞大脑中动脉起始部。2 小时后轻提栓线至有阻力。动物苏醒后出现手术同侧 Horner 征和对侧肢体运动障碍即为模型成功。假手术组仅分离颈总动脉不插线栓。

1.7 取材与石蜡切片的制备

各组大鼠分别于脑缺血 2 小时再灌注后 6、24、72 小时后再麻醉,打开胸腔,剪开右心室,插入针头至体主动脉,体主动脉处穿线扎牢针头,防止滑脱,剪开左心耳,迅速灌入生理盐水约 500ml,将血液冲净。待生理盐水将灌完时,及时倒入含 0.1%DEPC 的 4%多聚甲醛约 1L,进行心脏灌注预固定,后断头取脑,浸入含 0.1%DEPC 的 4%多聚甲醛溶液固定 2 小时,以鼠脑洁白完整较硬,无肉眼可见的血管为度,以视交叉和其后

4mm 处两点冠状切片,片厚 4mm,经处理切成 6mm 厚的连续冠状石蜡切片。

1.8 脑缺血再灌注 24 小时神经功能缺陷评分

参照 Longa 等^[3]的评分标准,于脑缺血 2 小时再灌注 24 小时对模型组和蒲黄颗粒各剂量组大鼠进行神经功能缺陷评分。0 分:正常,无神经病学征象;1 分:不能完全伸展右前肢;2 分:行走时向右侧转圈;3 分:行走向右侧跌倒;4 分:不能行走,意识水平下降。累积 1 分以上即为造模成功。

1.9 Nissl 染色

石蜡切片脱蜡至水;0.5%焦油紫染色(5g 焦油紫溶于 100ml 双蒸水) 37℃ 30 分钟;充分水洗,95%盐酸酒精分色;100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,高倍镜($\times 400$)下观察。

1.10 原位杂交检测 HSP-70 mRNA 的表达

石蜡切片经常规脱蜡至水,采原位杂交试剂盒检测 Caspase-3 mRNA 的表达,检测方法参照试剂盒说明书进行。阳性染色为胞浆或胞核棕黄色颗粒。阴性对照以 PBS 代替核酸探针,余步骤同上。高倍镜下($\times 400$)观察,随机选取不重叠的 5 个视野,进行阳性细胞计数,取其平均值。

1.11 免疫组化 SABC 法检测 HSP-70 蛋白的表达

石蜡切片经常规脱蜡、水化,滴加一抗后,以免疫组化 SABC 法对切片标本进行染色,DAB 显色,苏木素复染,充分水洗,脱水、透明、封片。阳性染色为胞浆或胞核棕色颗粒。阴性对照以 PBS 代替一抗,余步骤同上。高倍镜下($\times 400$)观察,随机选取不重叠的 5 个视野,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算光密度值(OD),取其平均值。

1.12 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组实验数据的比较采用单因素方差分析,两组数据之间的比较采用非配对 t 检验;方差非齐性资料采用秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠脑缺血再灌注 24 小时神经功能缺陷评分的比较

评分显示,假手术组无神经功能缺陷,模型组的神经功能缺陷评分为(2.43 ± 0.21)分($n=5$),高于复方蒲黄颗粒大、中剂量组(1.26 ± 0.15)分、(1.45 ± 0.19)分($P < 0.05$),而与复方蒲黄颗粒小剂量组(1.91 ± 0.22)分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 神经元组织形态学变化

Nissl 染色结果显示,假手术组脑组织无水肿、充

血,脑组织呈均匀一致的紫蓝色,细胞密度大,神经元形态结构完整,为三角形、长条形或多边形,胞浆染色清晰,尼氏体着蓝色,胞核淡染,海马CA1区锥体细胞³~4层,形态规则,排列整齐,未见明显神经元丢失;模型组大脑皮层可见较明显的充血,血管周围间隙增宽,细胞间质水肿,神经元皱缩体积缩小,与周围组织脱离,胞核固缩深染,有核分裂及核溶解,具有凋亡的特征,部分神经元肿胀,胞浆呈空泡状,海马CA1区细胞排列散乱,无层次感,尼氏体减少,大量神经元丢失,细胞密度小;复方蒲黄颗粒各剂量组可见较多神经元肿胀,少量神经元皱缩、胞核固缩深染,细胞密度较大,与模型组比较神经元损伤减轻、丢失减少,提示复方蒲黄颗粒对脑缺血再灌注后神经元损伤具有一定的保护作用。

2.3 各组脑缺血再灌注后 HSP-70 mRNA 表达的比较

HSP-70 mRNA 原位杂交阳性染色为胞浆或胞核棕黄色颗粒。假手术组仅可见少量的 HSP-70 mRNA 阳性细胞,与模型组及复方蒲黄颗粒各剂量组比较差异有统计学意义($P<0.01$);模型组缺血再灌注 6 小时可见较多的阳性细胞,主要分布于缺血侧背外侧皮层,再灌注 24 小时阳性细胞增多,在海马区出现不同强度的阳性信号,再灌注 72 小时阳性细胞开始减少,信号强度减弱。复方蒲黄颗粒各剂量组在脑缺血 2 小时再灌注 6 小时即出现较强的杂交信号,再灌注 24 小时时杂交信号最强,波及整个缺血侧大脑,再灌注 72 小时仍处于较高的表达水平。与模型组比较,复方蒲黄颗粒各剂量组 HSP-70 mRNA 的表达均增强,且表达时间延长($P<0.05$)。见表 1。

表1 各组大鼠 HSP-70 mRNA 阳性细胞计数比较(细胞/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	缺血再灌注后		
		6 小时	24 小时	72 小时
假手术组	5	32.40±3.22	35.20±4.12	30.20±3.34
模型组	5	131.60±5.55△	143.20±6.53△	131.40±6.11△
大剂量组	5	141.60±6.80▲	165.80±5.59▲	149.00±8.75▲
中剂量组	5	142.20±5.58▲	157.60±4.16▲	146.80±6.42▲
小剂量组	5	140.80±8.07▲	152.20±6.87▲	143.20±5.76▲

与假手术组比较,△ $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$

2.4 各组脑缺血再灌注后 HSP-70 蛋白表达的比较

阳性染色为胞浆棕黄色,假手术组未见或仅见少量表达的 HSP-70 蛋白阳性信号,与模型组及复方蒲黄颗粒各剂量组比较差异有统计学意义($P<0.01$);模型组在缺血 2 小时再灌注 6 小时可见蛋白表达增多,信号增强,再灌注 24 小时蛋白的表达波及整个皮质,再灌注 72 小时开始减弱;复方蒲黄颗粒各剂量组在脑缺

血 2 小时再灌注 6 小时出现较强的 HSP-70 蛋白阳性信号,再灌注后 24 小时显著增强,波及整个皮层,扩散到海马区,再灌注 72 小时仍处于较高水平,复方蒲黄颗粒各剂量组各时间点 HSP-70 蛋白的表达均高于模型组($P<0.05$)。见表 2。

表2 各组大鼠 HSP-70 蛋白表达 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	缺血再灌注后		
		6 小时	24 小时	72 小时
假手术组	5	0.1120±0.0200	0.1151±0.0255	0.1093±0.0156
模型组	5	0.2284±0.0288△	0.2581±0.0182△	0.2460±0.0122△
大剂量组	5	0.2643±0.0163▲	0.3129±0.0392▲	0.2914±0.0158▲
中剂量组	5	0.2736±0.0203▲	0.2881±0.0143▲	0.2735±0.0141▲
小剂量组	5	0.2833±0.0136▲	0.2890±0.0147▲	0.2735±0.0185▲

与假手术组比较,△ $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$

3 讨论

复方蒲黄颗粒是在总结全国名老中医颜德馨教授治疗缺血性脑血管病的经验和大量临床观察的基础上研制而成。中风之病其本在于气虚,其标在于痰瘀,病位在脑窍,发病由元气亏虚,瘀痰留阻,气血瘀滞,闭于脑窍所致。本病之关键又在于气血失调,痰瘀为患,痰瘀阻络,脑络受损,清灵之气不能与脏气相接。痰瘀互结,贯穿于中风病的始终,因此治疗上强调疏通脉道,祛瘀生新。复方蒲黄颗粒正是在这一指导原则下组方而成,方中生蒲黄、水蛭活血化瘀,其中水蛭味咸性寒,专入血分而药力迟缓,借其破瘀而不伤气血之力祛沉痾瘀积,共为君药;海藻化痰软坚,因痰瘀同源,故海藻能助君药化瘀之效;石菖蒲有舒肝化浊、宁脑神之功,与蒲黄合用能祛瘀以通脑络,醒心脑以复神明,奏开窍安神、醒脑益智之功,为臣药;葛根、通天草均为轻清上逸之剂,能引药入脑,为佐使药。全方共奏祛瘀化痰,疏通脉道之功^[1~2]。

HSP 是在热应激(或其他应激)下细胞合成或合成增加的一组蛋白质,非由细胞分泌到血浆或组织液中发挥作用,而是在细胞内发挥作用,属于非分泌性蛋白质。正常脑组织 HSP-70 mRNA 及蛋白含量极少,局灶及全脑缺血后,受损细胞内的变性蛋白可诱导 HSP-70 的表达,脑缺血后 HSP-70 蛋白合成增加,增强脑细胞对缺血、缺氧的耐受性,与缺血耐受现象的产生关系密切^[4]。有学者认为,HSP-70 有可能成为治疗缺血性脑损伤的又一靶点^[5],如能通过某些方法、途径或药物提高缺血组织 HSP-70 的合成,可能为防治缺血性脑血管疾病提供新的思路和途径。

本研究原位杂交和免疫组化结果显示,在假手术组及非缺血侧大脑半球仅有微量的 HSP-70 mRNA 及蛋白的表达,而在模型组再灌注 6 小时即可见 HSP-70 mRNA 及蛋白的表达增强,再灌注 24 小时阳性染色进

一步增强,再灌注 72 小时阳性染色有所减弱。复方蒲黄颗粒各剂量组 HSP-70 mRNA 及蛋白的表达量明显高于模型组,且其表达增强,时间延长,复方蒲黄颗粒各剂量组在脑缺血 2 小时再灌注 6 小时即出现较强的阳性信号,再灌注 24 小时时信号最强,波及整个缺血侧大脑,再灌注 72 小时仍处于较高水平。提示复方蒲黄颗粒能促进脑缺血再灌注后 HSP-70 的表达,延长其表达时间,延缓其降解。同时 Nissl 染色结果显示,脑缺血 2 小时再灌注 6 小时内即已出现了神经元坏死,再灌注 24~72 小时加重。复方蒲黄颗粒各剂量组较之模型组细胞密度未见明显减小,神经元损伤减轻、丢失减少。缺血 24 小时的神功评分表明,复方蒲黄颗粒大、中剂量对大鼠神经功缺陷具有较为明显的改善。提示 HSP-70 表达增加可以提高神经元的应激能力,减轻脑缺血再灌注损伤。总之,复方蒲黄颗粒能减轻脑缺血再灌注后的神经元损伤和丢失,改善神经功能缺损,对

脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与促进缺血后脑组织内 HSP-70 的表达有关。

参考文献

- [1] 夏韵,姚德民,韩天雄,等.脑梗灵冲剂治疗脑梗死临床观察.河北中医,2000,22(11):813~814.
- [2] 夏韵,汤德生,姚德民,等.脑梗灵颗粒治疗脑梗死临床与实验研究.实用中西医结合临床,2002,2(4):1~4.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20(1):84~91.
- [4] Masada T, Hua Y, Xi G, et al. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(1):22~33.
- [5] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell, 2004, 116(2):205~219.

(收稿日期:2007-12-07;修回日期:2008-03-27)

[编辑:行 之]

中药治疗环磷酰胺所致狼疮性肾炎患者白细胞减少症 18 例

刘 艳¹ 王 荣²

(1. 山东省立医院肾内科在职研究生,济南市经五纬七路 324 号,250021; 2. 山东省立医院肾内科)

环磷酰胺(CTX)冲击治疗是目前治疗狼疮性肾炎(LN)比较有效的方法之一,但其副作用较严重,特别是大剂量 CTX 冲击治疗引起的白细胞减少症,是继发感染和中断治疗的重要原因。近年来,本院采用自拟升白方治疗应用 CTX 冲击治疗 LN 引起的白细胞减少症,效果较好,现报道如下。

1 临床资料

本组 34 例均为本院 2003 年 1 月~2008 年 6 月的住院患者,均符合 1982 年美国风湿病学会修订的系统性红斑狼疮(SLE)诊断标准,并有明显的肾损害,其活动性按 LN 活动指数 SLEDAI 评估法,积分 3~7 分,CTX 冲击治疗后,白细胞计数 $\leq 3.0 \times 10^9/L$,其中男 2 例,女 32 例;年龄 16~55 岁,平均(23.6 $\pm$ 6.3)岁;病程 90 天~10.5 年。随机分为治疗组 18 例,对照组 16 例,两组间年龄、病史、性别、病情活动指数及肾损害方面均有可比性($P>0.05$)。

2 治疗方法

两组患者应用 CTX 治疗前及冲击治疗后 1 周,分别查外周血白细胞,当白细胞计数 $\leq 3.0 \times 10^9/L$,对照组予鲨肝醇、利血生、维生素 B₁₂ 等升白药物治疗,治疗组予自拟升白方治疗。处方:党参 30g,黄芪 30g,当归、制首乌各 20g,熟地黄 10g,鸡血藤 30g,炮穿山甲 10g,炒白芍 20g,补骨脂 10g,女贞子、山药各 15g,石韦 20g,甘草 10g。随症加减,每日 1 剂,早晚 2 次口服。疗程均为 2 周,进行疗效评定。

3 疗效观察

3.1 疗效评定标准

白细胞下降程度以治疗结束 1 周后结果为准,并参考 WHO 标准。

分级标准。显效 0 级:白细胞计数 $\geq 4.0 \times 10^9/L$;有效 I~II 级:白细胞计数(2.3~3.9) $\times 10^9/L$;无效 III~IV 级:白细胞计数 $< 2.0 \times 10^9/L$ 。

3.2 外周血白细胞计数比较

治疗组 18 例,冲击治疗前、冲击治疗后、冲击治疗 2 周后外周血白细胞计数分别为(4.51 $\pm$ 1.16) $\times 10^9/L$ 、(2.31 $\pm$ 0.54) $\times 10^9/L$ 、(4.22 $\pm$ 1.66) $\times 10^9/L$;对照组 16 例,3 次分别为(4.34 $\pm$ 1.25) $\times 10^9/L$ 、(2.33 $\pm$ 0.65) $\times 10^9/L$ 、(3.04 $\pm$ 1.38) $\times 10^9/L$ 。CTX 冲击前,两组白细胞平均值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);CTX 冲击后,两组白细胞均明显下降,但两组之间平均值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);疗程结束后,两组白细胞平均值差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 两组总疗效比较

治疗组 18 例,显效 8 例,有效 6 例,无效 3 例,死亡 1 例,总有效率 77.8%;对照组 16 例,分别为 3 例、5 例、6 例、2 例、50.0%。两组比较治疗组疗效明显优于对照组($P<0.05$)。

4 讨论

中医药具有补肾填精、益气养血、滋养肝肾之功效,可以起到补虚扶正的功效,减低细胞毒剂对骨髓造血系统的抑制,保护造血干细胞的正常分裂和增殖,从而达到升白细胞的目的。自拟升白方具有健脾益气、益肾填精、补血活血功效,方中黄芪、党参、甘草补气健脾;补骨脂、女贞子补肾填精;炒白芍、当归、鸡血藤补血活血;石韦清热解暑、凉血;炮穿山甲祛瘀散结、通经。现代药理研究证实黄芪、当归、党参、女贞子、鸡血藤、石韦、炮穿山甲等单味药均有提升白细胞的作用,并且还有提高机体免疫力的作用。

(收稿日期:2008-10-09)

[编辑:黄 健]