

补阳还五汤对大鼠脑缺血后白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响

易健 黄昕 俞悦 蔡光先 刘柏炎

【摘要】 目的 探讨补阳还五汤对脑缺血后大鼠脑组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。方法 按随机数字表法将SD大鼠分为正常对照组、假手术组、模型组、补阳还五汤组,后3组再按给药后1、3和7d分为亚组,每组5只。采用大脑中动脉闭塞法(MCAO)建立右侧局灶性脑缺血大鼠模型;补阳还五汤组于术后2h起灌服补阳还五汤10 ml/kg(14.2 g/kg),每日1次。分别于相应时间点处死大鼠后取脑组织,采用酶联免疫吸附法(ELISA)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定IL-1 β 和TNF- α 的蛋白及mRNA表达。结果 正常对照组和假手术组有低水平的IL-1 β 和TNF- α 蛋白及mRNA表达。模型组IL-1 β 、TNF- α 蛋白及mRNA表达于给药后1d开始升高,IL-1 β 蛋白及mRNA表达在3d时达高峰后开始下降,TNF- α 蛋白及mRNA表达于7d达高峰。与模型组比较,补阳还五汤组给药后1、3和7d脑组织中IL-1 β 和TNF- α 蛋白及mRNA表达均明显下降[IL-1 β 蛋白(ng/L),1d:90.290 \pm 8.693比102.556 \pm 13.934,3d:129.632 \pm 11.050比150.117 \pm 8.552,7d:66.185 \pm 9.020比91.362 \pm 9.901;TNF- α 蛋白(ng/L),1d:210.341 \pm 19.247比236.887 \pm 20.137,3d:267.503 \pm 21.006比322.659 \pm 15.068,7d:299.637 \pm 17.717比386.678 \pm 16.297;IL-1 β mRNA,1d:0.54 \pm 0.09比0.64 \pm 0.11,3d:0.80 \pm 0.06比0.89 \pm 0.07,7d:0.70 \pm 0.09比0.78 \pm 0.08;TNF- α mRNA,1d:0.64 \pm 0.09比0.73 \pm 0.11,3d:0.74 \pm 0.13比0.85 \pm 0.07,7d:0.82 \pm 0.07比0.93 \pm 0.08],差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 补阳还五汤可能通过下调缺血脑组织IL-1 β 和TNF- α 的蛋白及mRNA表达来调控炎症因子的释放,从而起到脑保护作用。

【关键词】 补阳还五汤; 脑缺血; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

Effect of Buyang Huanwu decoction (补阳还五汤) on interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α expression in rats after cerebral infarction YI Jian, HUANG Xin, YU Yue, CAI Guang-xian, LIU Bai-yan. Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: LIU Bai-yan, Email: lby1203@sina.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD, 补阳还五汤) on pro-inflammatory cytokines in rats after focal cerebral infarction. **Methods** Adult Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into following groups: normal control, sham, model, BYHWD. The rats in latter three groups were subdivided into subgroups of 1, 3, and 7 days after medication, with 5 rats in each group. The right side focal cerebral infarction model was reproduced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). The rats in BYHWD group were gavaged with BYHWD of 10 ml/kg (14.2 g/kg, once a day) 2 hours after operation. Animals were sacrificed at corresponding time points. The protein and mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** There were low levels expression of IL-1 β and TNF- α protein and mRNA in normal control group and the sham group. After cerebral infarction, the protein and mRNA expression of IL-1 β and TNF- α began to increase in rats 1 day after the insult, and the protein and mRNA expression of IL-1 β reached the peak on 3rd day, and then lowered, and the protein and mRNA expression of TNF- α reached the peak on 7th day. Compared with model group on 1st, 3rd and 7th day, the protein expression of IL-1 β (ng/L; 90.290 \pm 8.693 vs. 102.556 \pm 13.934 on 1st day, 129.632 \pm 11.050 vs. 150.117 \pm 8.552 on 3rd day, 66.185 \pm 9.020 vs. 91.362 \pm 9.901 on 7th day) and TNF- α (ng/L; 210.341 \pm 19.247 vs. 236.887 \pm 20.137 on 1st day, 267.503 \pm 21.006 vs. 322.659 \pm 15.068 on 3rd day, 299.637 \pm 17.717 vs. 386.678 \pm 16.297 on 7th day), and mRNA expression of IL-1 β (1 day: 0.54 \pm 0.09 vs. 0.64 \pm 0.11, 3 days: 0.80 \pm 0.06 vs. 0.89 \pm 0.07, 7 days: 0.70 \pm 0.09 vs. 0.78 \pm 0.08) and TNF- α (1 day: 0.64 \pm 0.09 vs. 0.73 \pm 0.11, 3 days: 0.74 \pm 0.13 vs. 0.85 \pm 0.07, 7 days: 0.82 \pm 0.07 vs. 0.93 \pm 0.08), were all decreased obviously in BYHWD group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** BYHWD could reduce the protein and mRNA expressions of IL-1 β and TNF- α in levels after cerebral infarction. The result shows that it protects brain by modulating expression of pro-inflammatory mediators.

【Key words】 Buyang Huanwu decoction; Cerebral infarction; Interleukin-1 β ; Tumor necrosis factor- α

补阳还五汤是中医学治疗气虚血瘀型脑缺血的传统名方,大量研究证实补阳还五汤方剂能改善模型大鼠的神经功能缺失症状,减少梗死面积,减轻脑组织水肿,抑制脑内炎症因子的表达^[1];临床报道其能促进脑梗死患者神经功能的康复^[2]。本课题组前期研究也发现,补阳还五汤能减轻大鼠脑缺血损伤,具有脑保护作用^[3]。本实验中拟通过观察补阳还五汤对脑缺血后大鼠脑组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因和蛋白表达的影响,探讨其脑保护作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组:健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(动物合格证号:004535)。按随机数字表法分为假手术组、模型组、补阳还五汤组,每组 15 只,各组分别于首次给药后 1、3、7 d 各处死 5 只大鼠;另设正常对照组 5 只,不予任何处理。

1.2 药物:补阳还五汤中药饮片购自湖南省春光中药饮片有限责任公司,经鉴定符合 2005 年《中国药典》的规定。将饮片分煎两次后混合,浓缩至含生药 2 g/ml 的汤剂冷藏备用。

1.3 模型制备及给药:采用大脑中动脉闭塞法(MCAO)复制局灶性脑缺血大鼠模型^[4]。假手术组仅切开皮肤、分离右颈总动脉后即缝合。动物清醒后 2 h 进行神经功能评分^[5],分值在 1~3 分者入组,剔除死亡及分值不足的动物,并随机替补。补阳还五汤组于术后 2 h 起灌服 10 ml/kg 补阳还五汤药液(按体表面积计算,相当 60 kg 成人用量的 3 倍,14.2 g/kg),每日 1 次;模型组和假手术组动物均给予等量无菌蒸馏水,自由饮食、活动。

1.4 检测指标及方法:相应时间点处死大鼠后取脑组织,置于液氮中冻存备检。

1.4.1 脑缺血组织 IL-1 β 、TNF- α 蛋白含量测定:制备脑组织匀浆,离心取上清液。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定脑组织 IL-1 β 、TNF- α 含量,按试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司)说明书操作。

1.4.2 脑缺血组织 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达测定:以 TRIzol 法提取总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳鉴

定 RNA 的完整性,进行逆转录反应,聚合酶链反应(PCR)引物根据基因库(www.ncbi.nlm.nih.gov)基因序列用 Primer 5 软件自行设计,IL-1 β 、TNF- α 、内参照 β -肌动蛋白(β -actin)引物由上海捷瑞生物工程公司合成。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 45 s,52 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,35 个循环。取 3 μ l 扩增产物在琼脂糖凝胶上电泳,采用凝胶图像分析仪对 IL-1 β 、TNF- α 、 β -actin PCR 产物进行吸光度扫描,采用数码凝胶图像分析系统观察条带的灰度强弱,结果以目的基因与内参照的电泳条带吸光度(A)值比值表示。

1.5 统计学分析:应用 SPSS 15.0 统计软件,数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达的影响(表 1;图 1):正常对照组和假手术组大鼠脑组织有低水平 IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达。模型组脑缺血后 1 d IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达水平迅速增加,3 d 达高峰,7 d 有所下降,但仍明显高于假手术组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补阳还五汤组脑组织 IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达水平较模型组同时时间点明显降低(均 $P < 0.05$)。

表 1 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	IL-1 β 蛋白 (ng/L)	IL-1 β mRNA
正常对照组	3 d	5	38.006 \pm 9.985	0.48 \pm 0.05
假手术组	1 d	5	38.205 \pm 10.707	0.45 \pm 0.07
	3 d	5	37.654 \pm 5.961	0.48 \pm 0.03
	7 d	5	37.838 \pm 7.850	0.47 \pm 0.05
模型组	1 d	5	102.556 \pm 13.934 ^a	0.64 \pm 0.11 ^a
	3 d	5	150.117 \pm 8.552 ^a	0.89 \pm 0.07 ^b
	7 d	5	91.362 \pm 9.901 ^a	0.78 \pm 0.08 ^b
补阳还五汤组	1 d	5	90.290 \pm 8.693 ^c	0.54 \pm 0.09 ^c
	3 d	5	129.632 \pm 11.050 ^c	0.80 \pm 0.06 ^c
	7 d	5	66.185 \pm 9.020 ^c	0.70 \pm 0.09 ^c

注:IL-1 β :白细胞介素-1 β ;与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$

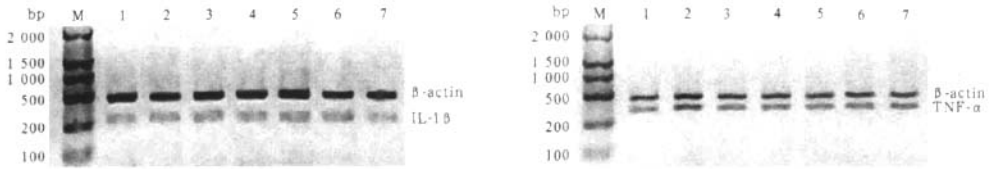
2.2 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 TNF- α 蛋白及 mRNA 表达的影响(表 2;图 1):正常对照组和假手术组大鼠脑组织有低水平 TNF- α 蛋白及 mRNA 表达。模型组脑缺血后 1 d 脑组织 TNF- α 蛋白及 mRNA 表达即明显升高,7 d 达高峰,与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补阳还五汤组脑组织 TNF- α 蛋白及 mRNA 表达较模型组同时时间点明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.10.008

基金项目:国家自然科学基金项目(30300470,30472217,30873355);教育部博士点专项科研基金项目(20060541007);教育部重点项目(209087);教育厅重点项目(08A049)

作者单位:410007 长沙,湖南中医药大学省部共建中医内科学教育部重点实验室

通信作者:刘柏炎,Email:lby1203@sina.com



IL-1 β :白细胞介素-1 β ,TNF- α ;肿瘤坏死因子- α , β -actin; β -肌动蛋白,M:Marker,

1:假手术组,2,3:模型组、补阳还五汤组给药 1 d,

4,5:模型组、补阳还五汤组给药 3 d,6,7:模型组、补阳还五汤组给药 7 d

图 1 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响

表 2 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 TNF- α 蛋白和 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	TNF- α 蛋白 (ng/L)	TNF- α mRNA
正常对照组	3 d	5	203.740 \pm 16.306	0.48 \pm 0.05
假手术组	1 d	5	202.135 \pm 17.162	0.45 \pm 0.07
	3 d	5	201.673 \pm 18.770	0.48 \pm 0.03
	7 d	5	202.100 \pm 18.057	0.47 \pm 0.05
模型组	1 d	5	236.887 \pm 20.137 ^a	0.73 \pm 0.11 ^a
	3 d	5	322.659 \pm 15.068 ^b	0.85 \pm 0.07 ^a
	7 d	5	386.678 \pm 16.297 ^b	0.93 \pm 0.08 ^a
补阳还五汤组	1 d	5	210.341 \pm 19.247 ^c	0.64 \pm 0.09 ^c
	3 d	5	267.503 \pm 21.006 ^d	0.74 \pm 0.13 ^d
	7 d	5	299.637 \pm 17.717 ^d	0.82 \pm 0.07 ^d

注:TNF- α 、肿瘤坏死因子- α 、与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

目前认为脑缺血后激发的炎症级联反应可加重脑组织水肿,是继发性脑组织损伤的关键^[6],在炎症级联反应中,IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子起到了始动作用。因此,抑制炎症因子过表达,阻断炎症级联反应对减轻脑缺血损伤有着重要意义。

IL-1 β 在正常脑内有低水平表达,缺血后活化的星形细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞及浸润的巨噬细胞可分泌 IL-1 β ,IL-1 β 通过高亲和力受体来介导小胶质细胞释放细胞因子,促进内皮细胞黏附分子表达,刺激单核/巨噬细胞产生 IL-6、IL-8 和 TNF- α ,从而加强白细胞浸润,释放炎症介质,加重局部炎症反应^[7]。IL-1 β 还可通过上调基质金属蛋白酶(MMPs)的表达以损伤血脑屏障(BBB),增加其通透性,加重脑水肿^[8]。抑制 IL-1 β 表达可阻断 IL-1 β 对缺血区神经细胞的损伤作用,减轻缺血大鼠脑水肿,缩小梗死范围,减少梗死区的白细胞浸润^[9]。TNF- α 被认为是众多细胞因子的重要启动因子,其不仅能促进其他炎症因子分泌,也可诱导黏附分子表达,使白细胞、血小板黏附于微血管内,导致微血管阻塞,增加血栓形成的可能性,从而加重脑损害;TNF- α 还对毛细血管有直接毒性作用,增加毛细血

管通透性,加重外周白细胞浸润及脑水肿^[10]。抑制 TNF- α 合成及拮抗其活性均可减轻脑缺血损伤。有研究显示,预先静脉给予抗 TNF- α 抗体,可减轻脑缺血损伤,改善神经功能,说明 TNF- α 是再灌注期间改变 BBB 通透性的重要介质^[11]。

本实验研究发现,补阳还五汤能下调缺血早期脑组织内 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白和 mRNA 表达,这可能是补阳还五汤减少脑缺血后梗死面积,减轻脑组织水肿,从而达到脑保护作用的机制所在。

参考文献

- [1] 徐晶,辛随成,张青川.补阳还五汤治疗缺血性脑血管病的研究进展.山西中医学院学报,2009,10:73-76.
- [2] 郭志平,王玉玲,刘秀金.补阳还五汤加减治疗脑梗死后遗症的临床观察.中国中西医结合急救杂志,2007,14:380.
- [3] 易健,黄昕,谢勇,等.脑得健方对大鼠局灶性脑缺血后神经功能及梗死面积的影响.湖南中医药大学学报,2010,30:9-11.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989,20:84-91.
- [5] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion;evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke,1986,17:472-476.
- [6] 李建生,高剑峰,周友龙,等.老年脑缺血/再灌注大鼠炎症级联反应变化及其意义.中国危重病急救医学,2006,18:278-281.
- [7] Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. Eur J Neurosci,2008,8:1316-1328.
- [8] Pera J,Zawadzka M,Kaminska B,et al. Influence of chemical and ischemic preconditioning on cytokine expression after focal brain ischemia. J Neurosci Res,2004,78:132-140.
- [9] Thornton P, Pinteaux E, Gibson RM, et al. Interleukin-1 induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. J Neurochem,2006,98:258-266.
- [10] 曲友直,高国栋,赵振伟,等.川芎嗪对脑缺血/再灌注后脑组织肿瘤坏死因子- α 含量及髓过氧化物酶活性的影响.中国中西医结合急救杂志,2006,13:35-37.
- [11] Widera D,Mikenberg I,Elvers M,et al. Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappa B signaling. BMC Neurosci,2006,7:64.

(收稿日期:2010-06-25)

(本文编辑:李银平)