

益气活血方对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及相关基因表达的影响

王宗仁¹, 赵燕玲¹, 曲友直², 马 静¹, 李晶华¹, 刘 雅¹

(1. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学唐都医院神经外科, 陕西 西安 710038)

【摘要】 目的: 探讨益气活血方对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2 和 Fas-L 蛋白表达的影响。方法: 采用 Longa 报道的线栓法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型。将 36 只 SD 大鼠按随机数字表法均分为假手术组、模型组和益气活血方组。采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 检测各组大鼠脑组织凋亡神经元细胞; 用免疫组化法与医学图像分析相结合的方法检测各组大鼠脑组织 Bcl-2 和 Fas-L 的蛋白表达。结果: ①与假手术组相比, 模型组大鼠缺血侧脑组织 TUNEL 阳性细胞及 Bcl-2、Fas-L 蛋白阳性细胞数目均增多 (P 均 < 0.01); ②与模型组相比, 益气活血方组大鼠缺血侧脑组织 TUNEL 阳性细胞及 Fas-L 蛋白阳性细胞数目减少, Bcl-2 蛋白阳性细胞数目增多 (P 均 < 0.01)。结论: 益气活血方药 (芪丹通脉片) 可增强 Bcl-2 蛋白的表达, 同时下调 Fas-L 蛋白的表达, 从而抑制脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡, 这可能是益气活血方对脑缺血/再灌注损伤起神经保护作用的机制之一。

【关键词】 益气活血方; 缺血/再灌注损伤; 脑; 凋亡; Bcl-2; Fas-L

中图分类号: R285.5; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)06-0335-03

Effects of Qi-reinforcing and blood-activating prescription (益气活血方) on apoptosis of neuronal cells and expression of apoptosis-associated genes after cerebral ischemia/reperfusion WANG Zong-ren¹, ZHAO Yan-ling¹, QU You-zhi², MA Jing¹, LI Jing-hua¹, LIU Ya¹. 1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China; 2. Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shanxi, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects of Qi-reinforcing and blood-activating prescription (益气活血方) on apoptosis of neuronal cells and expression of apoptosis-associated genes Bcl-2 and Fas-L proteins after cerebral ischemia/reperfusion (I/R). **Methods:** According to Longa's report, the string inserting method was employed to reproduce the rat model of focal cerebral I/R. Thirty-six SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Qi-reinforcing and blood-activating prescription group. Apoptosis of neuronal cells of rats' brain tissues in each group was analyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). The immunohistochemistry combined with medical image pathological system (MIPS) were used to measure the number and mean grey level of Bcl-2 and Fas-L positive cells in rats' cerebral cortex of each group. **Results:** ① Compared with sham operation group, the expression of positive neuronal cells of TUNEL, positive cells of Bcl-2 and Fas-L protein expressions were increased in rats' ischemic brain tissues of model group (all $P < 0.01$). ② Compared with model group, the positive neuronal cells of TUNEL and the positive cells with expression of Fas-L protein in Qi-reinforcing and blood-activating prescription group were decreased, while the positive cells with expression of Bcl-2 protein were increased (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Qi-reinforcing and blood-activating prescription [Qidan Tongmai tablet (芪丹通脉片)] can inhibit neuronal cells apoptosis by improving the expression of Bcl-2 protein and down-regulating the expression of Fas-L protein, which may be one of the mechanisms of neuroprotective effects of the prescription on cerebral I/R injury.

【Key words】 Qi-reinforcing and blood-activating prescription; cerebral ischemia/reperfusion injury; apoptosis; Bcl-2; Fas-L

缺血性脑血管病是临床常见病、多发病, 脑缺

基金项目: 陕西省中医管理局科研课题(062)

作者简介: 王宗仁(1951-), 男(汉族), 河南灵宝人, 教授, 博士生导师 (Email: zongren@fmmu.edu.cn)。

血/再灌注损伤是缺血性脑血管病的重要病理生理机制, 其病理过程涉及氧自由基、钙超载、兴奋性氨基酸、炎症反应、细胞凋亡等多方面因素, 其中神经细胞凋亡是脑缺血/再灌注损伤的主要环节^[1]。祖国

医学采用益气活血中药治疗缺血性中风具有肯定的临床疗效,但作用机制尚未完全阐明。芪丹通脉片是治疗缺血性脑血管病的有效中药复方制剂,由黄芪、丹参、当归、红花、桂枝组成,具有益气活血功效。本研究拟通过观察益气活血方药(即芪丹通脉片)对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2、Fas-L 蛋白表达的影响,探讨益气活血中药对局灶性脑缺血/再灌注损伤起保护作用的机制。

1 材料与方药

1.1 主要药物、试剂及仪器:益气活血方煎剂,由黄芪、丹参、当归、红花、桂枝按原方比例组成,浓缩煎至 1.15 g/ml,由本院中药制剂室制备;细胞凋亡检测试剂盒[末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒],Bcl-2、Fas-L 免疫组化卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC)试剂盒均购于武汉博士德公司;医学图像分析系统由同济医科大学千屏影像公司生产。

1.2 动物模型制备及分组:健康成年雄性 SD 大鼠 36 只,体重 250~350 g,购于第四军医大学实验动物中心。将大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和益气活血方组,每组 12 只。假手术组及模型组以生理盐水 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹灌胃;益气活血方组以益气活血方药 11.5 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃。各组每日灌胃 1 次,7 d 后制模。参照 Longa 等^[2]报道的方法,采用线栓法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型。结扎大鼠颈总动脉和颈外动脉,自颈总动脉分叉处向颈内动脉插入约(18.5±0.5)mm 栓线,阻断大脑中动脉(MCA)血流,造成局灶性脑缺血。术后将栓线尾部置于皮下,缺血 2 h 后轻拔栓线造成血流再灌注。假手术组颈内动脉中也插入栓线,但深度仅为 6 mm,不阻断 MCA。每组中 6 只大鼠于再灌注 6 h 后取脑组织标本检测 Bcl-2 和 Fas-L 蛋白表达;另外 6 只于再灌注 24 h 后取脑组织标本检测凋亡神经细胞。

1.3 检测指标及方法:再灌注结束后将大鼠用体积分数为 10%的水合氯醛过量麻醉,迅速开胸暴露心

脏,经升主动脉插管后灌注生理盐水快速冲洗,再用体积分数为 4%的冷多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗灌注至肝脏褪色变硬,四肢、尾变硬。断头取脑,取视交叉前后约 2~3 mm 范围的冠状切片脑组织置于 4%多聚甲醛中,4℃条件下固定 24~48 h,常规石蜡包埋,连续冠状切片,片厚约 4 μm,分别行 TUNEL 阳性细胞(凋亡神经细胞)及 Bcl-2 和 Fas-L 蛋白阳性细胞检测,分别按 TUNEL 试剂盒说明书和免疫组化 ABC 法步骤操作。每张切片在缺血侧(假手术组取假手术侧)大脑皮质和基底节区随机采集 5 个高倍视野(400 倍)输入图像分析系统,检测 TUNEL 阳性细胞数及 Bcl-2 和 Fas-L 蛋白阳性细胞数和平均灰度值。

1.4 统计学分析:所有计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凋亡神经细胞的检测(表 1):凋亡神经细胞胞体缩小,核膜皱缩,染色不均,浓集于核膜附近,胞核呈棕褐色,可见核固缩和核碎裂,主要分布于梗死灶周围纹状体及额顶部皮质。假手术组偶见凋亡细胞;模型组凋亡神经细胞数较假手术组显著增多;与模型组相比,益气活血方组大鼠缺血侧脑组织凋亡神经细胞数显著减少(P 均 < 0.01)。

2.2 Bcl-2 和 Fas-L 蛋白阳性细胞检测结果(表 1):与假手术组比较,模型组脑组织 Bcl-2 蛋白阳性细胞数增多,平均灰度值降低(P 均 < 0.01);假手术组未见 Fas-L 蛋白阳性细胞表达,模型组可见 Fas-L 蛋白阳性细胞高表达。与模型组比较,益气活血方组大鼠缺血侧脑组织 Bcl-2 蛋白阳性细胞数增多,平均灰度值降低(P 均 < 0.01);Fas-L 蛋白阳性细胞数减少,平均灰度值升高(P 均 < 0.01)。图像分析中平均灰度值越高,说明其免疫组化染色越浅,阳性物质含量越低。

3 讨论

局灶性脑缺血由严重缺血的中心区和处于低灌

表 1 益气活血方对脑缺血/再灌注大鼠凋亡神经细胞及相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of Qi-reinforcing and blood-activating prescription on apoptosis of neuronal cells and expression of apoptosis-associated genes after cerebral I/R($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TUNEL 阳性细胞数 (个)	Bcl-2 蛋白阳性细胞		Fas-L 蛋白阳性细胞	
		数目(个)	平均灰度值	数目(个)	平均灰度值
假手术组	1.6±0.6	1.7±0.6	205.9±11.5		
模型组	49.9±9.8*	12.5±1.2*	182.8±13.6*	18.1±2.3	162.7±10.4
益气活血方组	17.5±1.8 [△]	20.9±2.7 [△]	143.3±10.7 [△]	10.9±1.7 [△]	197.1±12.5 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

流状态的边缘区即缺血半暗带组成。缺血中心区脑组织短时间内即发生不可逆性损伤,成为梗死区,缺血半暗带区的神经细胞却发生以凋亡为主的迟发性神经元死亡^[3]。细胞凋亡是一种生理或病理条件下的细胞死亡模式,是有核细胞在一定条件下启动其自身内部机制,主要通过激活内源性核酸内切酶而发生的细胞死亡过程,主要以细胞皱缩、胞核凝聚及在核小体间被活化的核酸内切酶切断 DNA 链,形成 180~200 bp 等倍体 DNA 片段(寡聚核小体)为特点。TUNEL 利用分子生物学与组织化学相结合的技术,特异性标记 DNA 片段,原位检测凋亡细胞,并具有较高敏感性。本研究结果显示,大鼠脑缺血/再灌注后,在缺血侧脑组织可检测到较多的凋亡细胞,主要分布在梗死灶周围脑组织,表明细胞凋亡是缺血性脑损伤中细胞死亡的主要途径之一。

细胞凋亡是一种受多种相关基因调控的细胞自主性死亡,是脑缺血/再灌注损伤的主要病理、生理机制之一。与凋亡相关的基因分为抗凋亡基因与促凋亡基因两大类。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要基因之一,Fas-L 被认为是主要的促凋亡基因。蒋祝昌等^[4]观察到,局灶性脑缺血/再灌注后大鼠脑组织 Bcl-2 表达显著增高,细胞凋亡参与了脑缺血/再灌注损伤的过程。我们也观察到同样的结果。

目前认为,Bcl-2 的抗凋亡作用机制主要有以下几方面^[5]:①抑制 Ca²⁺ 的释放;Bcl-2 是一种跨膜蛋白,主要分布于核膜和胞浆内质网。核内外膜之间由内质网管腔相联,而管腔则是细胞内 Ca²⁺ 的主要贮存处。Ca²⁺ 在细胞凋亡中起重要作用,应用转基因方法发现,Bcl-2 高表达可抑制内质网释放 Ca²⁺,因此,推测 Bcl-2 的抗凋亡作用可能与内质网中 Ca²⁺ 有关。②Bcl-2 通过阻止促凋亡基因信号传递而阻止这些诱导基因产物发挥作用;如 Bcl-2 蛋白可抑制 P53 诱导的细胞凋亡、可通过激活磷脂酶 A₂ 抑制 Fas-L 和 Fas 诱导的凋亡等。③Bcl-2 还可通过抑制氧自由基发挥抗凋亡作用。

Fas-L 又称为 Fas 配体。Fas 是一种细胞表面的受体,具有一个跨膜结构,Fas 的胞浆区有一段约 80 个氨基酸组成的肽链,在细胞凋亡过程中起传导细胞凋亡信号的作用,称为死亡区域。Fas-L 促进细胞凋亡的机制为:①Fas-L 与 Fas 结合后可诱导白细胞介素-1 β 转换酶(interleukin-1 β converting enzyme,ICE)基因活化,表达相关蛋白酶^[6]。这些蛋白酶切割细胞内蛋白,使 DNA 断裂,导致细胞凋亡。②Fas-L 与 Fas 结合,使 Fas 死亡区交联,产生

神经酰胺,通过某种途径,激活内源性核酸内切酶,引起细胞凋亡,并向细胞内传递死亡信号,数小时内导致细胞死亡^[7]。

益气活血方药由黄芪、丹参、当归、红花、桂枝组成。现代药理研究表明,黄芪以其活性成分具有减少缺血脑组织的氧自由基和兴奋性氨基酸含量,减轻缺血后脑水肿,改善血脑屏障通透性,抑制脑缺血区域促凋亡基因的表达,以及增强抑凋亡基因表达等作用^[8,9];丹参可抑制脑缺血/再灌注后的炎症反应^[10];红花可调节局灶性脑缺血后神经元凋亡相关蛋白 Bcl-2、caspase-3 的表达^[11];当归可减小脑梗死体积^[12]。本实验结果显示,益气活血方药可增强抗凋亡基因 Bcl-2 蛋白的表达,抑制促凋亡基因 Fas-L 蛋白的表达。我们推测这可能是芪丹通脉片抗局灶性脑缺血/再灌注损伤后神经细胞凋亡,防治脑缺血/再灌注损伤的作用机制之一。

参考文献:

- [1] Ferrer I, Planas A M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia; life and death struggle in the penumbra[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62: 329-339.
- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [3] 吴晓黎,何志义. 脑缺血后的神经发生与凋亡[J]. 国外医学·脑血管疾病分册, 2004, 12: 778-781.
- [4] 蒋祝昌,毕桂南,石胜良. 黄皮酰胺对高血压局灶性脑缺血/再灌注大鼠 Bcl-2 蛋白表达和细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 289-292.
- [5] Zhong L T, Sarafian T, Kane D J, et al. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4533-4537.
- [6] Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis; mutational analysis of human Fas antigen [J]. Nature, 1995, 375: 78-81.
- [7] Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis; mutational analysis of human Fas antigen [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 10932-10937.
- [8] 柯庆,邓常青. 黄芪对沙土鼠脑缺血/再灌注损伤的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8: 105-108.
- [9] 朱冬胜,麻志恒,祝翌,等. 不同治则方药对大鼠局部脑缺血/再灌注模型脑组织能量代谢的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10: 366-368.
- [10] 刘军,匡培根,李斌,等. 丹参对大鼠脑缺血再灌注损伤保护机制的实验研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1998, 5: 77-81.
- [11] 罗嘉,方治平,周黎明,等. 红花注射液对大鼠局灶性脑缺血后梗死体积和神经元凋亡相关蛋白 bcl-2, caspase-3 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29: 977-980.
- [12] 袁先厚,袁忠惠,江普鲁. 当归注射液保护鼠脑缺血再灌注自由基损伤的研究[J]. 中华实验外科杂志, 1996, 13: 371-373.

(收稿日期: 2006-02-25 修回日期: 2006-10-07)

(本文编辑: 李银平)