

• 论著 •

银杏叶对缺血性脑损伤后 Bcl-2 和 Bax 基因表达的作用

张继龙¹, 翁方中¹, 陈国华¹, 殷萌²

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉市中西医结合医院神经内科, 湖北 武汉 430022;

2. 新疆博尔塔拉蒙古自治州人民医院内二科, 新疆 博乐 833400)

【摘要】 目的:探讨化学预处理对脑缺血后海马组织原癌基因 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和 Bax 基因表达的影响。方法:采用 Nagasaway 与 Zea Longa 等介绍的线栓阻塞大脑中动脉(MCA)方法制备大鼠脑缺血模型,并用银杏叶制剂术前连续预处理模型大鼠 7 d。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定假手术组、模型组和银杏叶预处理组大鼠缺血后 6、12、24 和 48 h 海马组织中 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达变化。结果:行大脑中动脉闭塞(MCAO)后大鼠海马组织 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 均被诱导表达,缺血后不同时间点 Bcl-2 mRNA 表达量持续升高;而 Bax mRNA 表达量在脑缺血 24 h 才达到峰值,随后表达量逐渐下降。银杏叶制剂预处理 7 d 后,缺血后 6 h 和 24 h 大鼠海马组织 Bcl-2 mRNA 表达水平较模型组明显上调,而 Bax mRNA 表达于缺血后 24 h 明显下调。结论:银杏叶制剂能有效调控缺血脑损伤后海马组织 Bcl-2 和 Bax 的基因表达水平,从而在缺血性脑损伤中起到神经保护作用。

【关键词】 脑缺血;银杏叶;预处理;凋亡;基因表达

中图分类号:R285.5;R255.2 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)01-0056-04

Effect of Yinxingye (银杏叶) on Bcl-2 mRNA and Bax mRNA expression following cerebral ischemiaZHANG Ji-long¹, WENG Fang-zhong¹, CHEN Guo-hua¹, YIN Meng². 1. Department of Neurology, Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China; 2. Department of Internal Medicine, People's Hospital, Bole 833400, Xinjiang, China

Corresponding author: WENG Fang-zhong (Email: Belle1999@tom.com)

【Abstract】 Objective: To explore whether expressions of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in the hippocampus induced after ischemia can be modulated by chemistry pretreatment. **Methods:** The rat cerebral ischemia models were made by middle cerebral artery occlusion (MCAO) using improvement methods introduced by Nagasaway and Zea Longa. The rats were pretreated with Yinxingye (银杏叶) for 7 days before ischemian in Yinxingye pretreatment group. The changes of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA expressions in the hippocampus of rats were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method in sham operation group, model group and Yinxingye pretreatment group at 6, 12, 24 and 48 hours after ischemia. **Results:** After MCAO, Bcl-2 mRNA and Bax mRNA were both induced to express. Level of Bcl-2 mRNA persistently increased at each time point, while the level of Bax mRNA increased gradually, reached a peak at 24 hours, and then decreased slowly. In comparison with the model group, after Yinxingye pretreatment for 7 days, Bcl-2 mRNA in the hippocampus was up-regulated at 6 and 24 hours after ischemia while Bax mRNA was down-regulated at 24 hours after ischemia. **Conclusion:** Yinxingye can efficiently regulate Bcl-2 mRNA and Bax mRNA expressions in hippocampus to protect the nerves after cerebral ischemic injury of rats.

【Key words】 cerebral ischemia; Yinxingye; pretreatment; apoptosis; gene expression

现代医学的发展已证实细胞凋亡是许多疾病的发病机制。近年来研究显示,凋亡也是缺血性脑损伤后海马组织迟发性神经元死亡的显著特点^[1]。原癌基因 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)基因家族中 Bcl-2

和 Bax 基因是反映细胞凋亡但作用相反的一组重要调控基因,Bcl-2 抑制细胞凋亡,Bax 促进细胞凋亡^[2,3];短暂性脑缺血后海马 CA1 区神经元 Bcl-2 蛋白表达明显受抑,而 Bax 表达不受影响^[4];在局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠模型中也发现,缺血中心区和半暗带早期 Bcl-xL 和 Bax 表达均增强,随着再灌注时间的延长,其表达逐渐下降^[3]。银杏叶制剂

通讯作者:翁方中,住院医师(Email: Belle1999@tom.com)

作者简介:张继龙(1973-),男(汉族),湖北省人,医学硕士,主治医师。

是临床上普遍应用的脑神经保护剂。本实验通过建立大鼠局灶性脑缺血模型,采用化学预处理方法和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,研究大鼠行大脑中动脉闭塞(MCAO)后海马组织 Bcl-2 和 Bax 基因诱导表达的情况,以及银杏叶制剂对两者表达水平的调控作用。

1 材料与方法

1.1 药品及主要试剂:银杏叶制剂为湖南麓山天然植物制药有限公司生产的华宝通;RT-PCR 试剂为 Sigma 公司产品。

1.2 动物模型制备及分组:Wistar 大鼠 120 只(由华中科技大学同济医学院动物实验室提供),体重 250~300 g,雌雄各半。按随机数字表法分为假手术组、模型组和银杏叶预处理组,各组又按缺血时间分为 6、12、24 和 48 h 4 个时间点,每个时间点均为 10 只大鼠。参照 Nagasaway 与 Zea Longa 等介绍的线栓阻断大脑中动脉(MCA)方法制备脑缺血动物模型。将麻醉的大鼠仰卧位固定,颈正中切口,结扎并游离左侧颈外动脉主干,在游离端上剪开一小口,使尼龙线(长 0.25 mm)经过颈总动脉分叉处进入颈内动脉,入颅至 MCA 起始处,栓线插入深度约为(18.5±0.5)mm。假手术组插入栓线长约 1 cm,其余方法相同。

1.3 干预措施:银杏叶预处理组大鼠于实验前灌服银杏叶制剂(含总黄酮醇苷 4 mg/kg),每日 2 次,连续 7 d;模型组和假手术组大鼠于实验前灌服等量的安慰剂,每日 2 次,连续 7 d。

1.4 海马组织 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达检测

1.4.1 引物设计:Bcl-2 上游引物:5'-AGCGTC-TTCAGAGACTGCCAG-3',下游引物:5'-CAC-CCCTGGCATCTTCTCCTT-3';Bax 上游引物:5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGATGGT-3',下游引物:5'-CCACCAGCTCTGAACAGTTCATGA-3';β-actin 上游引物:5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAAC-3',下游引物:5'-TTCATCTTCATGGTGCTAGGA-3'。各引物合成于上海博亚生物技术有限公司。

1.4.2 RT-PCR 分析:于 MCAO 后不同时间点断头处死动物取脑,将海马组织放入冻存管,液氮中保存。采用 TRI REAGENT 试剂抽提总 RNA,操作按试剂盒说明书。然后将每份提取的总 RNA 溶解于 40 μl 的经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水中。取总 RNA 溶液 2 μl,寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸 [Oligo(dT)12-18(1 mg/L)2 μl,5×Buffer]5 μl,

4 种 dNTP 混合液(每种均 10 mmol/L)2 μl,莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶(200 U/μl)1 μl,RNA 酶抑制剂 1 μl,加入经 DEPC 处理的双蒸水至总体积 25 μl,将所有反应成分混匀后置 37 °C 温育 1 h。然后加热置 95 °C、5 min,灭活逆转录酶;取逆转录混合物 3 μl,分别取 β-actin 和 Bcl-2 或 Bax 的上游引物和下游引物各 2.5 μl(10 μmol/L),10×Buffer 5 μl,4 种 dNTP 混合液(均 10 mmol/L)1.5 μl,氯化镁溶液(750 mmol/L)3 μl,Taq DNA 聚合酶(5 U/μl)0.5 μl,加双蒸水至总体积为 50 μl。

1.4.3 PCR 循环设置:94 °C、1 min,60 °C、1 min,72 °C、1 min,30 个循环(Bcl-2 和 β-actin);94 °C、45 s,55 °C、1 min,72 °C、1 min,27 个循环(Bax 和 β-actin);以 β-actin 为内参照,用 Bcl-2 或 Bax 与 β-actin 吸收峰面积的比值对扩增循环数作图,选择最适循环数。

1.4.4 海马 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达测定:将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并应用 DNA 扫描仪和相应分析软件测定 DNA 条带(UVP grab-it, British)。Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 相对表达量以 Bcl-2/β-actin 或 Bax/β-actin 计算。

1.5 主要观察指标:①动物的行为学特点;②海马组织 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达。

1.6 统计学分析:采用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物行为特征:模型组动物在麻醉清醒后呈现不同程度的局限性脑缺血表现,如手术对侧前爪不能伸直、向对侧旋转爬行及向一侧倾倒等。

2.2 3 组海马组织 Bcl-2 mRNA 表达量的比较(表 1):动物行 MCAO 后,海马组织 Bcl-2 mRNA 表达量随着缺血时间的延长而缓慢增加;于缺血 6 h 和 24 h,银杏叶预处理组 Bcl-2 mRNA 表达量明显高于模型组,差异均有显著性(P 均 < 0.05)。

表 1 3 组海马组织 Bcl-2 mRNA 表达量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 1 Comparison of Bcl-2 mRNA expression level in hippocampus in three groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	0.21±0.02	0.23±0.19	0.19±0.07	0.20±0.11
模型组	0.30±0.42 [△]	0.37±0.28 [△]	0.46±0.38 [△]	0.59±0.43 [△]
银杏叶预处理组	0.48±0.01 ^{△*}	0.57±0.08 ^{△*}	0.73±0.16 ^{△*}	0.78±0.12 ^{△*}

注:与假手术组比较:[△] $P < 0.05$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$

2.3 3 组海马组织 Bax mRNA 表达量比较(表 2):海马组织 Bax mRNA 表达量在脑缺血初期很低,但

随着缺血时间的延长而逐渐增加,缺血 24 h 达到峰值,随后逐渐下降;于缺血 24 h,银杏叶预处理组 Bax mRNA 表达量明显低于模型组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 2 3 组海马组织 Bax mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of Bax mRNA expression level in hippocampus in three groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	0.17±0.06	0.19±0.04	0.20±0.11	0.16±0.03
模型组	0.18±0.12	0.49±0.15 [△]	0.88±0.07 [△]	0.45±0.01 [△]
银杏叶预处理组	0.10±0.13	0.27±0.14 [△]	0.49±0.09 ^{△*}	0.37±0.20 [△]

注:与假手术组比较;[△] $P < 0.05$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$

3 讨论

局灶性脑缺血损伤后,神经元死亡有细胞坏死和细胞凋亡两种不同的方式,两者可并存;在缺血中心区域以神经元坏死为主,在缺血周围区(半暗带)以神经元凋亡为主,且随着缺血时间延长,神经细胞死亡数目增多。因此,如何恢复局部血液供应和避免细胞坏死是脑缺血损伤后的治疗研究核心。

Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 基因家族中已知与细胞凋亡关系密切的两种基因蛋白表达产物,在中枢神经系统均有表达。Bcl-2 在脑缺血/再灌注过程中通过抑制 Ca^{2+} 释放、阻止凋亡基因信号传递、抑制自由基及抗过氧化作用而抑制细胞凋亡的发生^[5]; Bax 蛋白与 Bcl-2 具有 53% 的同源性,细胞中的 Bax 蛋白高表达可加速细胞凋亡^[3]。Bcl-2 的过度表达可抑制自由基增加及神经生长因子缺乏等多种因素所致的神经细胞凋亡;而 Bax 的作用与 Bcl-2 相反,并通过与 Bcl-2 的相互作用而发挥功能,即可能通过 Bcl-2-Bax 异二聚体形式抑制 Bcl-2 的作用而促进细胞凋亡,因此 Bcl-2 与 Bax 的比值决定着细胞在缺血后是生存还是凋亡,Bcl-2/Bax 的比值与细胞凋亡成反比^[6]。

蒲传强等^[7]研究发现,大鼠行 MCAO 2 h、再灌注 30 min 即可出现凋亡细胞,用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)可见 DNA 梯(DNA Laddering)于 24~48 h 达到高峰,DNA 梯形成是细胞凋亡的重要特征。本研究结果显示,MCAO 后 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 几乎同时被诱导表达,表达量与脑缺血损伤程度密切相关,但两者并非平行表达,Bcl-2 mRNA 表达量缓慢上升,而 Bax mRNA 表达量在 MCAO 12 h 后才明显增加,24 h 左右达峰值,48 h 左右明显降低。

Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的重要调控因子,但其促进或抑制细胞凋亡的作用机制仍不清楚。相

对分子质量为 29 000 的 Bcl-2 蛋白是必需的膜蛋白,主要位于线粒体膜、核膜和内质网膜中^[8],如此分布显示出 Bcl-2 蛋白与细胞内反应性氧化片断(ROS)的形成密切相关,而 ROS 已被证实是细胞凋亡调控的重要因子^[9]。通过细胞内 ROS 或内源性抗氧化物质的生成,Bcl-2 蛋白发挥其抗氧化作用而抑制细胞凋亡^[10]。核转录因子- κ B(NF- κ B)是一种氧化应激反应性转录因子,大鼠全脑缺血后能被诱导生成,Bcl-2 蛋白能够调控 NF- κ B 的作用^[11]。本研究结果还显示,Bax mRNA 迟发性表达、表达量显著改变以及峰值时间与 DNA 梯形成的峰值时间之间的关系都表明,Bax 蛋白可能在缺血性脑损伤后期对神经元凋亡发挥主要的调控作用,并通过 Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体而促进细胞凋亡。

细胞凋亡是有蛋白合成参与的自主过程,某些药物可以通过调节凋亡相关基因的表达水平来促进或抑制细胞凋亡的发生。银杏叶制剂是目前临床上广泛应用于缺血卒中后的脑保护剂之一,具有活血化瘀通络的药理作用。银杏内酯为银杏叶提取物的主要成分,徐江平等^[12]研究表明,银杏内酯可显著改善大鼠脑缺血/再灌注损伤引起的行为症状,减轻损伤侧脑水肿,缩小脑梗死体积,从而起到保护作用。而秦兵等^[13]研究表明,银杏内酯 B 能剂量依赖性地降低丙二醛水平,提高超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和 ATP 酶活性,明显减轻脑组织神经元细胞损害,减少细胞凋亡的发生率。本研究结果显示,经银杏叶制剂预处理的大鼠 Bcl-2 mRNA 表达量较未处理大鼠明显升高,而 Bax mRNA 表达量则明显降低,表明银杏叶制剂可能是通过抑制缺血区细胞凋亡的作用机制来发挥其神经保护作用,即银杏叶制剂可以调控凋亡相关基因的表达水平,如 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA。脑缺血损伤后,Bcl-2 mRNA 被诱导表达,但表达量达到一定水平的较迟,不足以保护神经元免受损伤;而银杏叶能促使 Bcl-2 mRNA 的表达量明显升高,且迅速达到一定水平,同时使 Bax mRNA 的表达量显著降低,提高了 Bcl-2/Bax 的比值,而 Bcl-2/Bax 的比值增高已被证实能阻止凋亡细胞死亡。

结论:MCAO 后在海马组织 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 被诱导表达,表达量与缺血损伤程度密切相关。银杏叶制剂不仅能促使 Bcl-2 mRNA 表达量明显升高,且时间更早,同时也使 Bax mRNA 表达量显著降低,Bcl-2/Bax 增加可能是银杏叶制剂抑制细胞凋亡,进而发挥神经保护作用的机制之一。

参考文献:

- [1] 周建光, 刘景昌, 方以群. 高压氧对脑缺血再灌注海马神经元 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(4): 298-301.
- [2] Yamamoto C M, Sinha Hikim A P, Huynh P N, et al. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia [J]. Biol Reprod, 2000, 63(6): 1683-1690.
- [3] 徐忠信, 钱佳利, 包晓群, 等. 流式细胞术检测局灶性脑缺血/再灌注 Bcl-xL 和 Bax 蛋白表达[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(8): 473-475.
- [4] 章翔, 李兵, 张志文, 等. 全脑缺血/再灌注大鼠不同时相海马 CA1 区 Bcl-2、Bcl-xL 及 Bax 蛋白的表达[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(8): 457-459.
- [5] 王春霞, 包仕尧, 刘春风, 等. 尼莫通和川芎嗪对脑缺血/再灌注时 c-fos 和 bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(10): 609-612.
- [6] Brambrink A M, Schneider A, Noga H, et al. Tolerance-inducing dose of 3-nitropropionic acid modulates bcl-2 and bax balance in the rat brain: a potential mechanism of chemical preconditioning[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 20(10): 1425-1436.
- [7] 蒲传强, 郎森阳, 吴卫平. 脑血管病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 141-144.
- [8] Botez G, Rami A. Immunoreactivity for Bcl-2 and C-Jun/AP1 in hippocampal corpora amylacea after ischemia in humans[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001, 27(6): 474-480.
- [9] Nelson C W, Wei E P, Povlishock J T, et al. Oxygen radicals in cerebral ischemia[J]. Am J Physiol, 1992, 263(5 Pt 1): H1356-1362.
- [10] Choi J M, Shin H K, Kim K Y, et al. Neuroprotective effect of cilostazol against focal cerebral ischemia via antiapoptotic action in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(3): 787-793.
- [11] Clemens J A, Stephenson D T, Dixon E P, et al. Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DAN fragmentation[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 48(2): 187-196.
- [12] 徐江平, 孙莉莎, 杨雪梅. 银杏内酯对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(1): 31-33.
- [13] 秦兵, 张根葆, 陈冬云, 等. 银杏内酯 B 对脑缺血/再灌注神经损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(1): 17-20.

(收稿日期: 2006-09-19)

(本文编辑: 李银平)

• 基层园地 •

急性乌头碱中毒 10 例临床分析

蔡琪琳

(重庆市梁平县中医院内二科, 重庆 405200)

【关键词】 乌头碱; 中毒; 预防; 治疗

中图分类号: R278 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2007)01-0059-01

川乌、草乌均为毛茛科植物乌头的母根, 附生于母根的部分称附子。此类药物味辛、性热、有大毒, 内含乌头碱及其衍生物, 口服极易中毒。1993 年 8 月—2006 年 10 月我院收治急性乌头碱中毒 10 例患者, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 10 例急性乌头碱中毒患者中男 8 例, 女 2 例; 年龄 40~66 岁, 平均 50 岁。患者均系口服川乌、草乌药酒后 30 min~2 h, 表现为中枢神经、心血管及消化系统症状。主要临床表现为口唇、舌及四肢麻木, 流涎、恶心、呕吐、头昏、面色苍白或发红、肢冷、脉弱, 进而出现呼吸困难、四肢抽搐及昏迷, 血压下降或测不到, 心律失常或心悸, 其中 1 例还伴有精神症状。

1.2 治疗及结果: 除给予催吐、质量分

数为 1%~2% 鞣酸洗胃、输液促进毒物排泄、营养心肌等治疗外, 常规用阿托品(视病情重复给药)。室性心律失常常用阿托品不能纠正时应用利多卡因 50~100 mg 静脉注射, 转为窦性心律后再用利多卡因维持静脉滴注, 根据心电监护情况决定是否持续用药。伴低血压、休克者给予升压、抗休克治疗; 伴昏迷、脑水肿者给予脱水、利尿以减轻脑水肿, 保持呼吸道通畅, 保护脑细胞等治疗。10 例患者平均住院 3 d 后痊愈出院。

2 讨论

乌头碱中毒的主要临床表现为口唇、舌及四肢麻木, 流涎、恶心、呕吐、头昏眼花、面色苍白、肢冷脉弱, 四肢抽搐及昏迷, 血压下降或测不到, 心律失常等^[1,2]。治疗中除催吐、洗胃, 排出尚未吸收的毒物外, 使用阿托品等抗胆碱类药物。阿托品能解除迷走神经对心脏的作用, 通过提高窦房结的自律性及传导性,

终止异位节律的发生^[2]; 如果使用阿托品不能终止异位节律, 则改用异搏定和利多卡因。对重症患者可给予血液灌流, 通过活性炭吸附以清除毒物和毒性代谢产物, 尤以早期进行疗效显著。

为防止乌头碱中毒, 必须掌握其适应症和用法、用量, 若必须超剂量使用时, 应至少煎 1 h 以上以减低毒性; 要禁服生药, 经蒸煮炮制后的乌头毒性较原生物碱降低, 而有效成分却未被破坏^[3]。

参考文献:

- [1] 雷玉艳, 张惠云, 雷光华, 等. 乌头碱中毒 25 例分析[J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(9): 901.
- [2] 朱永福, 宋江萍, 周水丽. 乌头碱类中药中毒致心律失常 22 例[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(3): 136.
- [3] 卢中秋, 胡国新. 乌头碱急性中毒及诊治研究现状[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(2): 119-121.

(收稿日期: 2006-10-29)

(本文编辑: 李银平)

作者简介: 蔡琪琳(1970-), 女(汉族), 重庆市人, 主治医师。