

芪棱汤对线粒体介导 caspase - 9 依赖凋亡通路的干预

余琴华¹, 蒋红玉², 张思为², 何 纲², 谭 遥³, 唐海兰⁴

(1. 广州医学院从化学院中医教研室, 广东 广州 510900; 2. 暨南大学第二临床医学院中医科, 广东 深圳 518020; 3. 默沙东(中国)有限公司广州办事处, 广东 广州 510095; 4. 暨南大学实验中心电镜室, 广东 广州 510632)

【摘要】 目的: 从细胞凋亡及其信号转导通路角度, 探讨芪棱汤抗局灶性脑缺血/再灌注损伤的部分机制。方法: 将大鼠随机分为假手术组、生理盐水对照组、芪棱汤组。采用改良线栓法制备局灶性脑缺血/再灌注模型。在大鼠脑缺血 2 h, 再灌注 2、4、6、12、24 和 48 h 不同时间点进行神经功能评分; 观察再灌注 24 h 脑皮质和海马 CA1 区神经元病理形态改变和线粒体超微结构的改变; 应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)和免疫组化技术分别观察不同时间点缺血半暗带区神经细胞凋亡、细胞色素 C(cyt C)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(caspase - 9)表达的变化。结果: 芪棱汤对再灌注各时间点神经功能评分和再灌注 24 h 组病理形态学均有不同程度的改善, 可减轻线粒体水肿, 减少内部嵴断裂和基质颗粒的脱落, 维持线粒体的基本形态, 降低缺血半暗带区凋亡指数, 减少 cyt C 和 caspase - 9 的表达。结论: 芪棱汤对线粒体介导的 caspase - 9 依赖的凋亡通路有干预作用, 通过保护线粒体的形态功能, 稳定线粒体膜, 抑制 cyt C 和 caspase - 9 的释放和激活, 降低细胞凋亡率, 发挥神经保护作用, 这可能是其改善缺血/再灌注损伤的部分作用机制。

【关键词】 芪棱汤; 益气养阴活血; 缺血/再灌注损伤; 脑; 细胞凋亡; 线粒体; 细胞色素 C; caspase - 9
中图分类号: R285.5; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 1008 - 9691(2007)01 - 0021 - 05

Study on the intervention effect of Qileng decoction (芪棱汤) on mitochondria mediated and caspase - 9 dependent apoptotic pathway YU Qin-hua¹, JIANG Hong-yu², ZHANG Si-wei², HE Gang², TAN Yao³, TANG Hai-lan⁴. 1. Conghua Institution of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510900, Guangdong, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Medical College, Ji'nan University, Shenzhen 518020, Guangdong, China; 3. Office in Guangzhou, MSD (China) Limited Company, Guangzhou 510095, Guangdong, China; 4. Division of Electron Microscope, Lab Center of Ji'nan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

【Abstract】 Objective: To evaluate the effects and partly mechanism of Qileng decoction (QLD, 芪棱汤) resisting focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by apoptosis and signal transduction pathway. Methods: The rats were randomly divided into three groups including sham operation group, normal saline (NS) control group and QLD group. The model of focal cerebral I/R injury was induced by using modified thread embolizing in rats. Rats were evaluated by neurologic function score at 2 hours after ischemia and 2, 4, 6, 12, 24 and 48 hours after cerebral reperfusion, and the pathological changes of nerve cells and mitochondria ultrastructure at pallium and hippocampus CA1 region were observed at 24 hours after reperfusion. Immunohistochemical method was performed to examine the expression of cytochrome C (cyt C) and caspase - 9 at different time points after reperfusion. Apoptosis of nerve cells in ischemic penumbra (IP) was also characterized by terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method. Results: Compared with NS control group, neurologic function scores at different reperfusion time points were improved and the pathological changes were ameliorated at 24 hours after cerebral I/R in QLD group. Mitochondria hydropsia was alleviated, mitochondrial cristae fragmentation and granulum basale shedding were diminished, and mitochondrial basal morphology was retained. Meanwhile, apoptosis index (AI) was decreased and the expressions of cyt C and caspase - 9 were reduced in IP in QLD group. Conclusion: QLD intervenes in mitochondria mediated and caspase - 9 dependent apoptotic pathway. QLD lowers AI and plays a role of protecting nerve by maintaining mitochondrial basal form, stabilizing mitochondrial membrane and inhibiting the release of cyt C and activation of caspase - 9. The above actions are possibly some parts of mechanisms of QLD resisting focal cerebral I/R injury.

【Key words】 Qileng decoction; benefiting vital energy, nourishing Yin and activating blood circulation; cerebral ischemia/reperfusion injury; apoptosis; mitochondria; cytochrome C; caspase - 9

越来越多的研究说明,脑缺血/再灌注后的细胞死亡是一个极其复杂的病理过程。脑缺血/再灌注所触发的一系列复杂的级联反应,包括线粒体损害、钙超载、兴奋性氨基酸毒性作用、自由基生成、蛋白酶激活、基因表达和炎症反应等,这些因素都以不同的时间、空间和程度相互作用导致多种形式的神经元死亡。研究表明,神经元死亡主要有坏死和凋亡两种形式,在脑缺血急性期,神经元坏死与凋亡并存,细胞坏死位于缺血中心区,细胞凋亡主要出现在缺血半暗带区(ischemic penumbra),凋亡可能决定了最终梗死体积^[1,2]。有学者提出细胞凋亡是受细胞内活性基因、酶和信号转导途径调控的一个“瀑布式”过程^[3],是细胞主动死亡的过程。研究表明,可有多条通路分别独立地引发细胞凋亡,根据其起始信号转导的细胞部位不同,已发现至少有死亡受体途径、线粒体途径和内质网通路 3 条诱导途径,不同的死亡信号通过不同的途径诱导细胞凋亡^[4]。线粒体介导的凋亡通路在脑缺血/再灌注损伤引起的细胞凋亡中发挥着重要作用,经由线粒体氧化磷酸化功能受损,ATP 合成减少,线粒体 Ca^{2+} 超载,通透性转变,内膜跨膜电位下降,自由基形成等因素相互作用,诱导神经元凋亡。其中最重要也是研究得较为清楚的是线粒体介导的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(caspase-9)依赖的凋亡通路。

我们在前期的实验研究中已经观察到芪棱汤对脑缺血/再灌注后的神经元损伤有保护作用^[5,6]。本实验旨在通过观察芪棱汤对缺血半暗带区神经元病理形态和线粒体超微结构改变的影响,对神经细胞凋亡及线粒体通路中关键蛋白细胞色素 C(cyt C)和 caspase-9 表达的影响,进一步深入探讨芪棱汤抗局灶性脑缺血/再灌注损伤的部分机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、试剂和药物:戊二醛、ERL-4206 环氧树脂、加速剂 S-1(美国 Fluka 公司),钨酸(日本和光纯药株式会社),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、蛋白酶 K、BCIP/NBT 显色液、核快红复染液(福州迈新生物科技开发有限公司),caspase-9 单克隆抗体、cyt C 多克隆抗体(美国 Santa Cruz),鼠 SP kit 试剂盒(福州迈新生物科技开发有限公司)。芪棱汤精制液生药含量为 1.0 g/ml,由深圳市人民医院制剂中

基金项目:国家中医药管理局科研基金项目(2000-J-P-33)

作者简介:余琴华(1980-),女(汉族),湖北省人,硕士,助教,主要从事脑血管疾病的临床及科研工作。

心生产。

1.2 动物分组及模型制备方法:选择 3 月龄无特殊病原体 SPF 级 SD 雄性大鼠 120 只(由广东省医学实验动物中心提供),体重(200±50)g(合格证号:2005A010)。按照随机数字表法分为假手术组($n=12$)、生理盐水对照组($n=54$)、芪棱汤组($n=54$)。假手术组只作 24 h 时间段(6 只用于制作成石蜡标本,6 只用于制作成电镜标本),余两组再随机分为再灌注 2、4、6、12、24 和 48 h 时间点,每时间点 8 只;24 h 点另有 6 只作为电镜取材用。采用改良的 Zea-Longa 等^[7]介绍的线栓法制备大鼠局灶性大脑中动脉(MCA)阻断模型,术后 2 h 将栓线撤出直至头端达到颈总动脉分叉处,进行 6 个时段的再灌注。假手术组仅分离血管及神经,并不插入线栓。剔除标准:心率超出 290~390 次/min;或呼吸超出 60~100 次/min;或肛温超出 36.5~37.7 °C 范围;或栓线插入深度不足 18.5 mm,且无明显神经功能缺损表现或症状很轻的大鼠;或蛛网膜下腔出血, MCA 起始部或其附近的 Willis 环动脉有凝血块的大鼠;或手术时出血较多、症状很重的动物。大鼠清醒后出现同侧 Horner 征(梗死灶同侧瞳孔缩小,眼裂变小,眼球内陷)、爬行时向对侧转圈、提尾时向对侧旋转、提尾倒立时对侧前肢屈曲的即可入选。实验前 7 d 采用盲法给药灌胃,每次 20 ml/kg,每日 2 次(按体表面积计算约为临床 70 kg 成人用量的 3 倍,08:30 和 17:00 给药)。生理盐水对照组和假手术组予等量生理盐水。

1.3 神经功能评分:于缺血 2 h,再灌注 2、4、6、12、24 和 48 h 时,参照行为检查评分标准^[8]由两位参与实验的人员分别以单盲法对实验大鼠进行评分和记录,然后将两组的均值作为最后得分。

1.4 标本制备:腹腔注射体积分数为 10%的水合氯醛 1 ml 麻醉动物,开胸暴露心脏,以 100 ml 肝素生理盐水经主动脉弓快速灌注冲洗,随后以体积分数为 4%的多聚甲醛磷酸盐缓冲液(PBS, 40 °C, pH 7.4)经主动脉弓灌注约 30 min。立即取脑,取视交叉中段,4 °C 甲醛固定 7 d,常规冲洗、脱水、透明、包埋,连续冠状切片,片厚 5 μm,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察再灌注 24 h 脑皮质和海马 CA1 区的形态学改变。于缺血半暗带额叶皮质区处取脑组织块,戊二醛和钨酸双重固定,脱水、包埋,行超薄切片,采用醋酸铀和硝酸铅双重染色,透射电镜下观察大脑皮质线粒体超微结构变化。

1.5 TUNEL 原位检测凋亡细胞:将石蜡切片放于

37 °C 恒温箱烤 15 min 后,脱蜡,0.2 mol/L PBS 冲洗 2 min×3 次,置蛋白酶 K(20 μg/ml, pH 7.4) 溶液中,于室温孵育 30 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加 50 μl 的 TUNEL 反应混合溶液,加盖玻片,在湿盒中 37 °C 孵育 30 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 5 min×3 次,加入 50 μl 转化剂 AP,加盖玻片,在湿盒中 37 °C 孵育 30 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 5 min×3 次,加入 BCIP/NBT 显色溶液 50 μl,室温孵育 10 min,显微镜下观察;流水冲洗 20 min,用核快红复染 2 min,流水冲洗 20 min,脱水、透明、封片、镜检。设立阳性对照(加 DNase I 1 μg/ml)、阴性对照(不加 TdT)切片, TUNEL 阳性细胞胞核中呈现蓝黑色颗粒。每组每只动物随机取 3 张切片,在 400 倍光镜下随机选取缺血半暗带区相应部位 30 个不重复视野,计数阳性细胞数及细胞总数,计算阳性细胞表达率(凋亡指数, AI)。

$$AI = \text{TUNEL 阳性细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

1.6 SP 法染色免疫组化检测 cyt C 和 caspase-9: 将切片放于 37 °C 恒温箱烤 15 min 后,脱蜡,使用 0.2 mol/L PBS 冲洗 2 min×3 次,滴加新鲜配制的 3% H₂O₂, 室温放置 10 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 2 min×3 次,浸泡于抗原修复液(0.01 mol/L 枸橼酸盐溶液, pH 6.0)中,微波加热至 92~98 °C,修复 10 min,室温放置冷却;0.2 mol/L PBS 冲洗 3 次,滴加 cyt C 浓缩液以 1:200 稀释成的工作液,或用 caspase-9 浓缩液以 1:100 稀释成的工作液,滴加 50 μl 于每一块玻片上,置于湿盒中,4 °C 过夜;0.2 mol/L PBS 冲洗 3 min×3 次,滴加二抗,室温静置 10 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 3 min×3 次,加三抗(辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP)) 1:100, 37 °C 放置 10 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 2 min×3 次,滴加新配制的 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液,显微镜下观察,以片子出现较强的棕黄色后终止染色,然后充分冲洗;苏木素淡染细胞核 3 min,水洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明封片,显微镜下观察。每次实验均设立替代对照组(以免血清替代一抗)及空白对照组(以 PBS 替代一抗)。胞浆中出现棕黄色颗粒、胞核不着色者为免疫阳性细胞。每组每只动物随机取 3 张切片,随机选取缺血半暗带区相应部位 10 个不重复视野,计数阳性细胞数。

1.7 统计学处理:实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS12.0 软件包进行数据分析。采用多样本均数间两两比较,方差齐时用 Tukey 法,方差不齐时用多样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis

Test), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型复制情况:假手术组 12 只大鼠全部存活。制模成功后大鼠均可出现右侧偏瘫,其中有 22 只大鼠被剔除出本实验;生理盐水对照组保留 41 只,芪棱汤组保留 45 只,制模成功率为 79.6% (86/108 只)。

2.2 神经功能评分(表 1):假手术组神经功能评分为 0;其他两组再灌注后 0~6 h 神经功能缺损程度逐渐加重,随后改善,再灌注 2 h 两组神经功能评分差异无显著性,其余各个时间点芪棱汤组神经功能评分均显著低于生理盐水对照组(P 均 < 0.05)。

2.3 光镜下病理形态学观察:假手术组可见双侧脑皮质区神经元细胞多呈圆形或椭圆形,胞浆丰富、呈均匀淡红色,胞核呈蓝色、轮廓清晰,未见明显缺血损伤;海马 CA1 区锥体细胞层可分 3~5 层,结构清晰,细胞排列整齐紧密、分布均匀,核仁清晰。生理盐水对照组额顶叶皮质下部和纹状体外侧区神经细胞染色淡,数量明显减少,细胞周围出现空隙,超过胞体 100% 以上,部分区域呈点状坏死,细胞核固缩、胞核碎裂、溶解等细胞坏死特征,相当于缺血中心区的等值区;额顶叶皮质上部和纹状体内侧区神经细胞体积缩小,高倍镜下可见细胞核固缩,核仁消失,染色质浓缩、边聚,未发现典型的凋亡小体,相当于缺血周围区(半暗带区)的等值区;海马 CA1 区可见细胞层次变少,神经元嗜酸性变,呈杆状或三角形外观的急性型改变,部分神经元胞浆肿胀,胞核增大,但核膜边界清晰,细胞周围间隙增大。芪棱汤组缺血中心区未见明显改善,皮质区多数神经细胞形态、结构正常,细胞周围未见明显间隙,高倍镜下可见少量神经元胞体和胞核固缩、深染,核仁不清楚;海马 CA1 区细胞排列尚规整,可见较多核膜完整、核仁清晰的神经元。

2.4 透射电镜观察:假手术组神经细胞核呈卵圆形,无切迹,胞质有大量线粒体,切面为椭圆形,内有基质与排列密杂的嵴。生理盐水对照组神经细胞核不规则,细胞核均质化,核膜皱缩,呈节段性破坏,胞质中线粒体多数肿胀,呈烧瓶样或空泡化,其内部嵴断裂、脱失,基质颗粒脱落、消失。芪棱汤组神经细胞的超微结构与假手术组相似,无明显的损伤变化,核膜平滑、连续性较好,线粒体形态基本规则,大多数嵴完整,排列紧密规律,基质颗粒极少量脱落。

2.5 TUNEL 检测 AI(表 2):再灌注 2 h 缺血半暗带区即出现凋亡细胞,随再灌注时间延长 AI 不断

表 1 各组再灌注后不同时间神经功能评分比较($\bar{x}\pm s$)Table 1 Comparison of neurologic function scores at different time points after reperfusion in each group($\bar{x}\pm s$) 分

组别	动物数(只)	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
生理盐水对照组	41	8.08±0.67	9.08±0.59	10.75±0.76	9.33±0.41	8.58±0.80	8.75±0.61
芪棱汤组	45	6.25±0.42	7.25±0.69*	7.33±0.75*	7.00±0.55*	6.33±0.61*	4.75±1.08*

注:与生理盐水对照组比较:* $P<0.05$ 表 2 各组再灌注后不同时间神经细胞 AI 比较($\bar{x}\pm s$)Table 2 Comparison of AI of nerve cells at different time points after reperfusion in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	6					(1.23±0.89)%	
生理盐水对照组	35	(3.67±0.95)%	(7.83±1.12)%	(19.56±3.74)%	(30.53±8.85)%	(55.68±14.36)%	(33.04±5.72)%
芪棱汤组	39	(2.00±0.33)%**	(3.90±1.48)%**	(5.02±1.96)%**	(8.83±1.49)%**	(11.60±1.36)%**	(8.84±1.64)%**

注:与生理盐水对照组比较:** $P<0.01$ 表 3 各组再灌注后不同时间 cyt C 阳性细胞计数比较($\bar{x}\pm s$)Table 3 Comparison of expression of cyt C positive cells at different time points after reperfusion in each group($\bar{x}\pm s$) 个/HP

组别	动物数(只)	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	6					3.05±0.80	
生理盐水对照组	35	17.59±4.16	31.50±6.74	54.35±10.31	85.77±15.96	60.94±12.70	42.89±8.35
芪棱汤组	39	7.69±1.19*	10.19±1.52**	17.71±6.53**	25.43±8.64**	16.39±3.85**	12.87±3.32**

注:与生理盐水对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$ 表 4 各组再灌注后不同时间 caspase-9 阳性细胞计数比较($\bar{x}\pm s$)Table 4 Comparison of expression of caspase-9 positive cells at different time points after reperfusion in each group($\bar{x}\pm s$) 个/HP

组别	动物数(只)	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	6					0.84±0.33	
生理盐水对照组	35	3.18±0.99	7.67±1.16	19.81±3.63	34.00±7.37	49.33±8.15	35.21±7.22
芪棱汤组	39	2.17±0.37	4.67±1.21**	7.17±2.25**	13.44±3.18**	20.83±2.75**	16.72±4.08*

注:与生理盐水对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

增长,6 h 明显增加,24 h 达峰值,48 h 后表达开始减少。芪棱汤组的 AI 变化规律与生理盐水对照组基本一致,但芪棱汤组 AI 较生理盐水对照组显著降低(P 均 <0.01)。

2.6 cyt C 和 caspase-9 阳性细胞的表达(表 3, 表 4):假手术组有少量 cyt C 阳性细胞出现,极少数 caspase-9 阳性细胞出现。其他两组再灌注 2 h 缺血半暗带区即有 cyt C 阳性细胞出现,随再灌注时间延长阳性细胞数不断增长,12 h 达峰值,24 h 后表达开始减少;而两组再灌注 2 h 缺血半暗带区有少量 caspase-9 阳性细胞出现,随再灌注时间延长阳性细胞数不断增长,24 h 达峰值,48 h 后表达开始减少。芪棱汤组阳性细胞数明显小于生理盐水对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

在脑缺血/再灌注损伤过程中,由线粒体介导的 caspase-9 依赖的细胞凋亡通路已得到实验研究的证实^[9]。在各种促细胞凋亡的信号作用下,线粒体膜

通透性发生转变,导致位于线粒体膜间隙的 cyt C 释放入细胞质参与细胞凋亡过程。在 ATP/dATP 存在的情况下,cyt C 与 Apaf-1 以 2:1 的比例结合,通过 Apaf-1 氨基端的 caspase 募集结构域,募集细胞质中 caspase-9 前体,经过自我剪切而成 caspase-9。活化的 caspase-9 直接切割 caspase-3 前体,使 caspase-3 活化,引发 caspase 级联反应,裂解核蛋白、细胞骨架、内质网等,造成凋亡典型的形态学改变,如细胞核染色体固缩和裂解,染色质密度增高,核和胞体分离,形成多个凋亡小体。

由于细胞凋亡的发生是多途径的,单纯对凋亡通路某一节点进行阻断只能延缓凋亡过程,而不能完全阻断凋亡的最终完成^[10],目前大部分神经保护剂对动物模型有效而临床疗效不显著,有的因严重不良反应而限制了其应用^[11]。因此,有人提出根据药物作用的不同信号配制不同的复方合剂是保护和防止神经元凋亡的思路,临床抗凋亡干预性药物应联合应用 caspases 抑制剂、神经营养因子等,并进

行多节点干预阻断。

虽然目前治疗缺血性脑卒中的药物很多,但血栓溶解药物受治疗时机的限制(必须在发病后 6 h 内)、而且用药时机和条件等尚需进一步探讨,否则有造成病灶内出血的危险^[12];血管扩张剂可能会促使病灶区过度灌注、加重脑水肿;低分子右旋糖酐、甘露醇、甘油等药物也仅供辅助用药^[13]。西药多为针对一种病因进行治疗,所以临床上为多种药物联合应用,多数患者治疗效果不能令人满意。因此,对卒中中医更应强调“预防为主”、“治未病”,且中药复方制剂有多种成分、多个作用靶点的特点。中药复方联合针灸疗法,能发挥对整体机能的调整作用。目前在中医药治疗脑缺血/再灌注损伤机制的研究中,主要还是围绕着对某一单一基因表达的干预,对凋亡通路和凋亡基因间相互作用的整体性研究资料还非常少^[14]。

芪棱汤是笔者导师用来治疗缺血性中风的常用经验方,主要成分为黄芪、三棱、水蛭、桑椹、天花粉等。芪棱汤以“益气活血养阴”立论,根据“瘀血是贯穿疾病始终的重要病理产物,不仅气虚是致瘀因素,‘阴精亏虚、津枯血滞’更是致瘀的关键”这一理论,提出除了益气活血,更需滋阴活血以“增水行舟”,调畅血行,方中在应用益气活血药的同时,还运用大剂量的滋阴生津之品,以益气行血,滋补阴液、增水行血,濡润脉道,利于血行,从而达到有效防治缺血性中风的目的。

本研究结果显示,芪棱汤对脑缺血/再灌注模型动物神经功能评分有不同程度的改善作用;病理形态学观察显示,芪棱汤对缺血中心区已经坏死的区域没有明显的改善作用,而在缺血半暗带区和海马这些以细胞凋亡为主的区域则显示了其作用。进一步观察线粒体介导 caspase-9 依赖的细胞凋亡通路中关键蛋白 cyt C、caspase-9 的表达情况以及线粒体超微结构的变化,研究发现,缺血/再灌注脑缺血半暗带区有 cyt C 免疫阳性细胞出现,与 TUNEL 阳性细胞出现时间一致,而 caspase-9 免疫阳性细胞出现时间晚于 cyt C。芪棱汤对 cyt C、caspase-9 的释放和激活存在抑制作用;可减轻线粒体水肿,减少内部嵴断裂和基质颗粒的脱落,维持线粒体的基本形态,保护线粒体正常功能。提示芪棱汤的保护效应可在线粒体水平上发挥作用,通过保护线粒体的形态功能,稳定线粒体膜,从而阻止部分线粒体内膜

间隙中 cyt C 的释放,抑制 caspase-9 前体的激活,干预线粒体介导的 caspase-9 依赖的细胞凋亡通路,抑制细胞凋亡的发生。

综上所述,芪棱汤可以通过抑制线粒体介导的 caspase-9 依赖的细胞凋亡通路,降低缺血半暗带区的神经元凋亡率,减少脑缺血/再灌注损伤。

参考文献:

- [1] Terada K, Inao S, Mizutani N, et al. Cerebral blood flow, glucose metabolism and tunel-positive cells in the development of ischemia[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2001, 11(1): 9-19.
- [2] 李建生,任小巧,刘翔,等. 老龄大鼠脑缺血/再灌注神经细胞凋亡变化规律研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(3): 151-154.
- [3] Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis[J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 383-424.
- [4] 朱晓东,林庚金,钱立平. 凋亡通路及其调控研究进展[J]. *国外医学·生理、病理科学与临床分册*, 2002, 22(3): 248-251.
- [5] 蒋红玉,余琴华,曹平,等. 芪棱汤对脑缺血/再灌注后大鼠梗死边缘区胶质细胞纤维酸性蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12(5): 267-270.
- [6] 蒋红玉,贺会刚,山林林,等. 芪棱汤对脑缺血/再灌注大鼠 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. *中国中医急救*, 2006, 15(2): 174-175.
- [7] Zea-Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(2): 84-91.
- [8] 徐叔云,卞如镰,陈修. *药理学实验方法学* [M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1066-1067.
- [9] Sasaki C, Kitagawa H, Zhang W R, et al. Temporal profile of cytochrome c and caspase-3 immunoreactivities and TUNEL staining after permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Neurol Res*, 2000, 22(2): 223-228.
- [10] Simons M, Beinroth S, Gleichmann M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons[J]. *J Neurochem*, 1999, 72(1): 292-301.
- [11] DeGraba T J, Pettigrew L C. Why do neuroprotective drugs work in animals but not humans[J]? *Neurol Clin*, 2000, 18(2): 475-493.
- [12] 李斗,雷燕妮. 急性脑梗死静脉溶栓后脑出血的危险因素分析[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(10): 631-633.
- [13] 沈洪,陈涛. 《国际心肺复苏和心血管急救指南 2000》系列讲座(11)——急性脑卒中的再灌注治疗(2)[J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(1): 59-61.
- [14] 王宗仁,赵燕玲,曲友直,等. 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[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13(6): 335-337.

(收稿日期:2006-11-29 修回日期:2007-01-16)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

天津红日药业:血必净注射液…………… (封底)