

• 论著 •

补阳还五汤对老龄大鼠脑缺血/再灌注核转录因子-κB 和一氧化氮合酶的影响

高剑峰^{1a}, 吴磊^{1b}, 刘柯², 卢昱^{1a}

(1. 河南中医学Ⓐ生理学科, Ⓑ药学院研究生, 河南 郑州 450008;

2. 河南中医学Ⓐ院一附院脑病科, 河南 郑州 450008)

【摘要】 目的 从核转录因子-κB(NF-κB)、热休克蛋白 70(HSP70)和一氧化氮合酶(NOS)表达变化揭示补阳还五汤抗老年脑缺血/再灌注(I/R)损伤的保护机制。方法 采用大脑中动脉闭塞(MCAO)方法复制脑缺血动物模型,将 96 只老龄 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平(6 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组和补阳还五汤(0.9 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,观察各组脑缺血(I)3 h 和再灌注(R)1、3、6 和 12 d 神经功能障碍评分、脑组织含水量、病理学变化以及 NF-κB、HSP70 和 NOS 的表达变化。结果 与假手术组比较,模型组脑组织含水量、神经功能障碍评分均显著升高,NF-κB、HSP70、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达均增强(P<0.05 或 P<0.01);与模型组比较,补阳还五汤组神经功能障碍评分、脑组织含水量显著下降,NF-κB、iNOS、nNOS 表达减弱,HSP70 和 eNOS 表达增强(P<0.05 或 P<0.01);与尼莫地平组比较,补阳还五汤组神经功能障碍评分和 NF-κB、iNOS、nNOS 表达减弱,eNOS 表达增强(P<0.05 或 P<0.01)。结论 补阳还五汤抗脑 I/R 损伤的机制与抑制 NF-κB、iNOS、nNOS 表达和上调 HSP70、eNOS 表达有关。

【关键词】 补阳还五汤; 老年; 缺血/再灌注损伤; 脑; 核转录因子-κB; 热休克蛋白 70; 一氧化氮合酶
中图分类号:R285.5;R255.2 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)05-0296-04

Effect of Buyang Huanwu decoction (补阳还五汤) on nuclear factor-κB and nitric oxide synthase expression in aged rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury GAO Jian-feng^{1a}, WU Lei^{1b}, LIU Ke², LU Min^{1a}.
1. Ⓐ Department of Geriatrics, Ⓑ Master student of Pharmacy Department, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China; 2. Neurological Department, The First Hospital Affiliated to Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China

【Abstract】 Objective To study the protective mechanism of Buyang Huanwu decoction (补阳还五汤) on brain damage after focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in aged rats from the expression changes of nuclear factor-κB (NF-κB), heat shock protein 70 (HSP70) and nitric oxide synthase (NOS). **Methods** A focal cerebral ischemia model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO), and the models were duplicated. Ninety-six aged rats were randomly divided into four groups; sham-operated group, model group, nimodipine group (6 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Buyang Huanwu decoction group (0.9 g·kg⁻¹·d⁻¹). The ischemia (I) was performed for 3 hours and reperfusion (R), for 1, 3, 6 and 12 days. The effects of Buyang Huanwu decoction on the nervous dysfunction score, the water content of cerebral constitution and the expressions of NF-κB, HSP70 and NOS were observed at different time points of reperfusion. **Results** The nervous dysfunction score, the water content of cerebral constitution, the expressions of NF-κB, HSP70, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the model group were higher than those of the sham-operated group (P<0.05 or P<0.01). The nervous dysfunction score, the water content of cerebral constitution, the expressions of NF-κB, iNOS, nNOS in the Buyang Huanwu decoction group were lighter than those of the model group, on the contrary, the HSP70 and eNOS expressions were higher in the former than those in the latter group (P<0.05 or P<0.01). Compared with the nimodipine group, the nervous dysfunction score, the expressions of NF-κB, iNOS and nNOS were lower and eNOS higher in the Buyang Huanwu decoction group (P<0.05 or P<0.01). **Conclusion** The anti-brain I/R injury mechanisms of Buyang Huanwu decoction are related to the inhibition of the expressions of NF-κB, iNOS, nNOS and up-regulation of the expressions of HSP70 and eNOS.

【Key words】 Buyang huanwu decoction; aged; cerebral ischemia/reperfusion injury; nuclear factor-κB; heat shock protein 70; nitric oxide synthase

临床补阳还五汤治疗脑梗死具有明显效果^[1], 机制可能与其改善微循环、拮抗血栓形成及抑制细胞凋亡有关^[2-3]。本研究中以老龄大鼠为研究对象, 从脑组织核转录因子- κ B(NF- κ B)和一氧化氮合酶(NOS)表达的变化等方面揭示补阳还五汤拮抗老年脑缺血/再灌注(I/R)损伤的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:兔抗大鼠 NF- κ B p65、兔抗大鼠内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、兔抗大鼠诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、兔抗大鼠神经元型一氧化氮合酶(nNOS)及小鼠抗大鼠热休克蛋白 70(HSP70)均由博士德生物工程有限公司提供;尼莫地平片(批号:0312079;规格:每片 20 mg)由山东新华制药股份有限公司提供;补阳还五汤颗粒(批号:01346;规格:每袋 5 g)由河南中医学院制药厂提供。

1.2 动物分组及模型制备:20~21 月龄老龄雄性 SD 大鼠 96 只,体重 450~600 g(由河南省实验动物中心提供,动物合格证号:医动字第 410117 号)。采用改良的 Longa 方法^[4]制备大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型。按随机数字表法分为假手术组、模型组、尼莫地平($6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、补阳还五汤($0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组,后 3 组再分为缺血(I)3 h 及再灌注(R)1、3、6 和 12 d 亚组,每组每个时间点 6 只。制模前 5 d 开始灌胃给药,制模前 2 h 加灌 1 次;假手术组和模型组灌注等量生理盐水。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 神经功能障碍评分:参考吴俊芳等^[5]提出的 8 个等级评分标准进行神经功能障碍评分。

1.3.2 脑组织含水量:取脑组织标本,用分析天平分别称湿重及在电热恒温干燥箱中 100°C 干燥 48 h 后的干重,按公式计算含水量:含水量=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

1.3.3 脑组织病理学观察:脑组织常规行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下进行病理学观察。先用体积分数为 2.5%的戊二醛固定,再放入体积分数为 1%的锇酸溶液中固定,常规制作超薄切片,经醋酸铀-枸橼酸铅双染色后,在透射电镜下观察神经细胞、胶质细胞和毛细血管等超微结构的变化。

1.3.4 NF- κ B、HSP70、NOS 表达:采用免疫组化方法测定,用全自动彩色图像处理系统进行图像分析,测定阳性反应的灰度值,计算平均灰度值以表示

其表达的相对强度。

1.4 统计学处理:应用 SPSS 10.0 软件包,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病理学观察:模型组(R 1 d 和 R 3 d)可见神经元、神经胶质细胞肿胀、排列紊乱,出现典型的梗死灶,神经元数目减少,血管周高度水肿、结构欠清晰,炎性细胞浸润明显,形成“血管套”。各药物组可见神经元、神经胶质细胞排列轻度紊乱,部分细胞出现细胞核固缩、深染及肿胀,血管轻度扩张,血管周水肿,部分血管受压变形,管周有炎性细胞浸润,细胞间隙轻度水肿,与同时点模型组比较病理损伤均减轻,说明补阳还五汤可明显减轻脑 I/R 损伤。

2.2 电镜下观察:模型组 I 3 h 后神经元、胶质细胞胞质出现水肿,线粒体水肿,嵴和膜消失,内质网脱颗粒,染色质浓缩及边缘聚集;R 3 d 超微结构破坏最严重,胞质、胞核高度水肿,线粒体水肿,嵴模糊、消失;R 6 d 和 12 d 细胞超微结构破坏略减轻。尼莫地平组 R 12 d 神经元、胶质细胞、血管内皮细胞超微结构较模型组病理变化明显减轻,仅见线粒体轻度嵴排列紊乱,粗面内质网轻度脱颗粒,可见大量线粒体,线粒体周围轻度水肿。补阳还五汤组 R 3 d 以后脑细胞的超微结构病理变化明显减轻,胞质中可见脂褐素,线粒体仅有轻度水肿,嵴部分消失,膜部分消失,粗面内质网正常,其余细胞器正常;R 12 d 观察细胞质、胞核、细胞器基本正常。

2.3 补阳还五汤对神经功能障碍评分和脑组织含水量变化的影响(表 1):与假手术组比较,模型组各时间点神经功能障碍评分、脑组织含水量均显著升高;与模型组比较,补阳还五汤组神经功能障碍评分(R 3、6 和 12 d)、脑组织含水量(R 1、3 和 6 d)降低;与尼莫地平组比较,补阳还五汤组神经功能障碍评分(R 6 d 和 12 d)降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 补阳还五汤对 HSP70 和 NF- κ B 表达水平的影响(表 2):与假手术组比较,模型组脑组织 HSP70(I 3 h、R 1、3 和 6 d)、NF- κ B(各时间点)表达均增强;与模型组比较,补阳还五汤组脑组织 HSP 70(R 1、3、6 和 12 d)表达增强、NF- κ B(R 1、3、6 和 12 d)表达减弱;与尼莫地平组比较,补阳还五汤组 NF- κ B(R 1 d)表达减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 补阳还五汤对 NOS 表达水平的影响(表 3):与假手术组比较,模型组脑组织 iNOS(各时间点)、nNOS(I 3 h、R 1、3 和 6 d)、eNOS(R 1、3 和 6 d)

基金项目:河南省杰出青年科学基金项目(0612000700)

作者简介:高剑峰(1972-),男(汉族),河南省人,博士研究生,副教授,Email:jc.gjfeng@hotmail.com。

表达均增强;与模型组比较;补阳还五汤组 iNOS (R 1 d 和 3 d)、nNOS(I 3 h、R 1 d 和 3 d)表达减弱, eNOS(R 1、3 和 6 d)表达增强;与尼莫地平组比较,补阳还五汤组 iNOS(R 1 d)、nNOS(R 1 d)表达减弱,eNOS(R 1 d)表达增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 补阳还五汤对老龄大鼠神经功能障碍评分和脑组织含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 时间, 动物数, 神经功能障碍评分(分), 脑组织含水量(%). Rows include 假手术组, 模型组, 尼莫地平组, and 补阳还五汤组 with various time points.

注:与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与尼莫地平组同期比较,^e $P < 0.05$

表 2 补阳还五汤对老龄大鼠 HSP70 和 NF-κB 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 时间, 动物数, HSP70 (灰度值), NF-κB (灰度值). Rows include 假手术组, 模型组, 尼莫地平组, and 补阳还五汤组 with various time points.

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与尼莫地平组同期比较,^e $P < 0.05$

表 3 补阳还五汤对老龄大鼠 NOS 表达水平影响的比较($\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 时间, 动物数, iNOS (灰度值), nNOS (灰度值), eNOS (灰度值). Rows include 假手术组, 模型组, 尼莫地平组, and 补阳还五汤组 with various time points.

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与尼莫地平组同期比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$

3 讨论

气虚血瘀证贯穿于中风病的始终,益气活血为治疗中风之大法。补阳还五汤具有补气活血、通经活络的功效,可有效改善脑血流及血液流变性,拮抗兴奋性氨基酸的毒性及合理调控 NOS 表达,拮抗脑 I/R 损伤,主要用于治疗缺血性卒中及其后遗症[2-3,6]。以往缺血性脑血管疾病的实验研究多忽视了脑血管疾病中增龄因素的重要性,使用年轻动物的研究结果与临床有较大差距[7]。因此,本研究中以老龄大鼠为研究对象,研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用。结果表明,补阳还五汤能改善脑水肿、神经功能障碍,并对 I/R 损伤后脑组织神经细胞病理损伤具有明显保护作用。

NF-κB 是一种多向性核转录因子,出现脑 I/R 时被特异性激活,诱导细胞因子、黏附分子、NOS 等基因表达,参与脑缺血后的炎症反应。本研究中发现,脑 I/R 老龄大鼠 NF-κB 表达明显增强,因此,拮抗 NF-κB 的过度激活为有效预防和治疗脑 I/R 损伤提供新的思路和途径[8]。Williams 等[9]和 Berti 等[10]以 SD 雄性大鼠 MCAO 模型为实验对象,采用免疫组化技术,发现有抗炎作用的蛋白激酶抑制剂 MLN519 可降低缺血侧脑组织 NF-κB 的免疫活性,进而下调脑组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、白细胞介素-1(IL-1)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表

达;减少中性粒细胞浸润,有效减少神经元及星型胶质细胞退行性改变,通过合理控制炎症级联反应减轻脑 I/R 损伤。本组资料表明,补阳还五汤能够明显抑制脑 I/R 老龄大鼠脑组织 NF-κB 的表达,合理调控 I/R 炎症级联反应信号转导,发挥对脑 I/R 损伤的保护作用。

缺血、缺氧应激可以诱导神经细胞 HSP70 的合成。HSP70 可促进新生多肽的正确折叠,维持解聚蛋白恰当构型,通过上调 bcl-2 对抗神经细胞凋亡和坏死,发挥细胞保护作用^[11]。Giffard 等^[12]对脑 I/R 大鼠皮下注射抗癫痫药戊二酸(VPA),观察到 VPA 可上调模型大鼠脑皮质和纹状体 HSP70 表达水平,从而显著改善神经功能障碍、缩小脑梗死体积。本研究显示,补阳还五汤可上调脑 I/R 老龄大鼠脑组织 HSP70 的表达,从而拮抗脑 I/R 损伤。

源于 eNOS 产生的一氧化氮(NO)有神经保护作用,源于 nNOS 和 iNOS 过度表达所形成的 NO 有神经毒性作用^[13-14]。本研究结果显示,脑 I/R 老龄大鼠脑组织 nNOS、iNOS、eNOS 表达升高。因此,选择性地调控不同类型的 NOS 表达具有重要临床意义。Kim 等^[15]发现,胍基丁胺可降低缺氧、再复氧处理的培养皮质 nNOS 表达,减少神经元死亡;整体实验也发现,胍基丁胺下调 I/R 大鼠脑组织 iNOS 减少,有效减弱 NO 神经毒作用,较对照组脑梗死体积显著缩小。Gertz 等^[16]用阿伐他汀干预脑 I/R 小鼠 14 d,结果显示药物组大鼠脑血管和主动脉内皮细胞的 eNOS 表达较对照组分别提高 2.3 倍和 1.7 倍,增强了 NO 的神经保护作用,降低血浆血小板因子-1 和 β-血小板球蛋白浓度及其促凝血活性,抑制脑 I/R 损伤。本研究证实,补阳还五汤可显著下调脑 I/R 老龄大鼠 nNOS、iNOS 表达,抑制 NO 的神经毒性作用;上调 eNOS 表达,增强 NO 的早期脑保护作用,依此拮抗脑 I/R 损伤。

综上所述,NF-κB、HSP70、NOS 等参与了老龄大鼠脑 I/R 损伤,合理有效调控其表达,可能成为缺血性脑血管疾病治疗中潜在的治疗靶点。补阳还五汤可在一定程度上抑制老龄大鼠脑 I/R 有促炎作用的 NF-κB、iNOS、nNOS 的表达,增加有神经保护作用的 HSP70、eNOS 表达,从而发挥拮抗脑 I/R 损伤作用。

参考文献

[1] 谢明剑. 补阳还五汤与低分子肝素钙治疗急性脑梗死临床疗效比较[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 189-190.
[2] 刘超, 吴基良, 张婧娥, 等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25

(7): 818-819.
[3] 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.
[4] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1996, 17(6): 1304-1308.
[5] 吴俊芳, 史以菊, 刘天培. 小柴碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 156-158.
[6] 李铁军, 邱彦, 芮耀斌, 等. 基因芯片分析补阳还五汤对局灶性脑缺血再灌注大鼠的保护作用机制[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 559-563.
[7] 李建生, 刘敬霞, 于海滨, 等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(5): 272-274.
[8] D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of Nuclear factor kappa B (NF-κB): an emerging theme in anti-inflammatory therapies[J]. Mol Interv, 2002, 2(1): 22-35.
[9] Williams AJ, Hale SL, Moffett JR, et al. Delayed treatment with MLN519 reduces infarction and associated neurologic deficit caused by focal ischemic brain injury in rats via anti-inflammatory mechanisms involving nuclear factor-kappaB activation, gliosis, and leukocyte infiltration[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(1): 75-83.
[10] Berti R, Williams AJ, Velarde LC, et al. Effect of the proteasome inhibitor MLN519 on the expression of inflammatory molecules following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the rat[J]. Neurotox Res, 2003, 5(7): 505-514.
[11] 金惠铭, 卢建, 尹莲花. 细胞病理生理学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 129.
[12] Giffard RG, Yenari MA. Many mechanisms for HSP70 protection from cerebral ischemia[J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2004, 16(1): 53-61.
[13] Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(3): 271-279.
[14] Nakashima MN, Ajiki K, Nakashima K, et al. Possible role of nitric oxide in anxiety following transient cerebral ischemia in mice[J]. J Pharmacol Sci, 2003, 91(1): 47-52.
[15] Kim JH, Yenari MA, Giffard RG, et al. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury[J]. Exp Neurol, 2004, 189(1): 122-130.
[16] Gertz K, Laufs U, Lindauer U, et al. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice[J]. Stroke, 2003, 34(2): 551-557.

(收稿日期: 2007-12-29 修回日期: 2008-06-05)
(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①天津生化制药有限公司: 注射用氢化可的松琥珀酸钠 … (封二)
- ②天津红日药业: 血必净注射液 … (封底)