

• 论著 •

# 补阳还五汤对大鼠心肺复苏后脑水肿和细胞凋亡的影响

李章平, 陈寿权, 李惠萍, 黄唯佳, 程俊彦, 章杰, 晏平

(温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江温州 325000)

**【摘要】** 目的 探讨补阳还五汤(BHD)对心肺复苏(CPR)后脑水肿和细胞凋亡的影响。方法 雄性SD大鼠24只按随机数字表法均分为假手术组、复苏组、BHD组。采用窒息法建立大鼠CPR模型,分别于自主循环恢复(ROSC)时和ROSC 12 h灌胃生理盐水或BHD。各组于ROSC 24 h取左侧大脑,采用干湿比重法计算脑组织含水量,原位末端缺刻标记法检测凋亡细胞,免疫组化法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Fas 蛋白表达。结果 与假手术组比较,复苏组在ROSC后24 h脑含水量增加[(80.99±0.83)%比(78.60±0.46)%], $P < 0.05$ ,脑凋亡相关蛋白 Bax[(32.1±6.4)个/HP比(5.6±3.0)个/HP]、Bcl-2[(15.0±6.0)个/HP比(6.9±2.9)个/HP]、Fas[(17.3±7.7)个/HP比(3.9±2.0)个/HP]以及脑细胞凋亡[(47.5±8.5)个/HP比(10.6±4.7)个/HP]的表达增加(均 $P < 0.01$ );与复苏组比较,BHD组脑含水量[(79.09±0.97)%]减少,Bax[(17.1±6.2)个/HP]、Fas蛋白[(10.9±4.3)个/HP]表达和细胞凋亡[(33.4±6.6)个/HP]明显降低,Bcl-2蛋白表达[(35.5±7.0)个/HP]明显增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论 BHD能够减轻脑水肿,减少细胞凋亡,具有脑保护作用。

**【关键词】** 补阳还五汤; 心肺复苏; 凋亡; 脑水肿

中图分类号:R285.5;R541.7 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2010.02.008

**Effect of Buyang Huanwu decoction (补阳还五汤) on cerebral edema and apoptosis after cardiopulmonary resuscitation in rats** Li Zhang-ping, CHEN Shou-quan, LI Hui-ping, HUANG Wei-jia, CHENG Jun-yan, ZHANG Jie, YAN Ping. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Buyang Huanwu decoction (BHD, 补阳还五汤) on cerebral edema and apoptosis after cardiopulmonary resuscitation (CPR) in rats. **Methods** Twenty-four male adult Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups by means of random number table: control, CPR and BHD groups. Asphyxiation cardiac arrest model was used. Physiological saline or BHD was administered intra-gastrically at the time of restoration of spontaneous circulation (ROSC) and 12 hours after ROSC, and left cerebrum was taken at 24 hours after ROSC in different groups. The brain water content was measured by dry-wet weight method. The cell apoptosis was detected by means of terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) in situ. The expressions of apoptosis related Bax, Bcl-2 and Fas proteins in cerebral cortex were measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the brain water content [(80.99±0.83)% vs. (78.60±0.46)%],  $P < 0.05$ , the expressions of Bax [(32.1±6.4)/HP vs. (5.6±3.0)/HP], Bcl-2 [(15.0±6.0)/HP vs. (6.9±2.9)/HP] and Fas protein [(17.3±7.7)/HP vs. (3.9±2.0)/HP] and cell apoptosis [(47.5±8.5)/HP vs. (10.6±4.7)/HP] were significantly increased at the time of 24 hours after ROSC in CPR group (all  $P < 0.01$ ). Compared with CPR group, the brain water content [(79.09±0.97)%], the expressions of Bax [(17.1±6.2)/HP] and Fas protein [(10.9±4.3)/HP] and cell apoptosis [(33.4±6.6)/HP] were obviously decreased at the time of 24 hours after ROSC in BHD group, but the expression of Bcl-2 protein [(35.5±7.0)/HP] was markedly elevated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** BHD can lessen cerebral edema and apoptosis and has the effect of brain protection.

**【Key words】** Buyang Huanwu decoction; Cardiopulmonary resuscitation; Apoptosis; Cerebral edema

心搏骤停后心肺复苏(CPR)患者脑组织经历了无血流、低血流和再灌注等多重损伤,其病理生理主要是全脑缺血/再灌注(I/R)损伤。补阳还五汤(BHD)是祖国传统医学中治疗脑I/R损伤的有效方剂,但其对CPR后脑损伤的作用及机制尚未完全阐明。本实验中通过观察BHD对CPR后脑水肿、细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响,进一步探讨其对CPR后脑损伤的保护作用及机制。

基金项目:浙江省中医药科技项目(2008CA072)

作者简介:李章平(1971-),男(汉族),浙江省人,医学硕士,副教授,副主任医师,Email:wzlizhangping@126.com。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及模型制备:**雄性SD大鼠24只,日龄70~90 d,体重300~400 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。按随机数字表法分为假手术组、复苏组、BHD组,每组8只。采用窒息法<sup>[1-2]</sup>建立大鼠CPR模型,实验参数设计和记录均参照复苏实验研究 Utstein 模式<sup>[3]</sup>。于大鼠呼气末夹闭气管插管,窒息7 min后开始CPR,并快速经颈动脉推注肾上腺素20 μg/kg。当出现自主心律、脉搏波,动脉收缩压>60 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)并持续10 min以上判断为自主循环恢复(ROSC)。在ROSC

时和 ROSC 后 12 h, 复苏组各灌胃生理盐水 1 ml。BHD 组各灌胃 BHD 浓缩剂 1 ml, 每次用药剂量为生药量 18 g/kg, 药物和比例依《医林改错》原方, 按每钱 3 g 计算<sup>[4]</sup>, 即黄芪 120 g, 赤芍 4.5 g, 当归 6 g, 地龙、川芎、红花、桃仁各 3 g, 药材由本院药剂科提供, 由制剂室按文献常规水提纯法浓缩<sup>[5]</sup>。假手术组动物仅进行麻醉和气管插管、血管穿刺, 不进行窒息及 CPR, 其余处理与复苏组相同。各组大鼠于 ROSC 后 3 h 开始逐步脱机, 并于角膜反射和疼痛反射均出现后拔除颈动脉插管, 结扎血管, 留置部分气管插管, 缝合颈部创口, 放入鼠笼内, 自由饮食、饮水, 室温控制在 23~26 ℃。各组于 ROSC 后 24 h 断头处死大鼠, 取左侧大脑分为 3 块, 分别用于测定脑含水量、细胞凋亡和凋亡相关蛋白。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 脑组织含水量测定: 取左侧 1/4 大脑半球, 称重后烘干 24 h, 称干重。按干湿比重法 (Elliott 方法) 计算脑组织含水量: 脑含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.2.2 脑细胞凋亡检测: 将待测脑皮质组织用甲醛水溶液固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片。采用原位末端缺刻标记法 (TUNEL) 检测凋亡细胞, 按试剂盒 (购自德国 Roche 公司) 说明书要求操作。

1.2.3 免疫组化测定凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Fas 的表达: 标本固定、包埋、切片方法同 1.2.2, 每个标本取相邻的 4 张分别进行 Bax、Bcl-2 和 Fas 免疫组化染色, 采用兔二步法 (非生物素) 进行检测 (试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司), 操作严格按说明书要求进行。

1.3 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 软件处理, 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用方差分析, 方差齐性检验采用 Levene 法, 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用 Tamhane 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组参数比较 (表 1): 各组大鼠体重、基线平均心室内压、心率等一般参数比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠基础参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	体重 (g)	心室内压 (mm Hg)	心率 (次/min)
假手术组	8	368.3 ± 13.9	61.56 ± 7.29	421 ± 39
复苏组	8	365.3 ± 16.7	61.29 ± 5.76	424 ± 36
BHD 组	8	368.0 ± 11.0	61.69 ± 5.19	433 ± 28

注: 1 mm Hg = 0.133 kPa

2.2 BHD 对 CPR 后脑含水量的影响: 假手术组、复苏组和 BHD 组在 ROSC 后 24 h 脑含水量分别为 (78.60 ± 0.46)%、(80.99 ± 0.83)% 和 (79.09 ± 0.97)%。与假手术组比较, 复苏组脑含水量明显增加 ( $P < 0.05$ ), 而 BHD 组与假手术组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与复苏组比较, BHD 组脑含水量显著降低 ( $P < 0.05$ )。

2.3 BHD 对 CPR 后脑神经细胞凋亡的影响: 假手术组、复苏组和 BHD 组大鼠 ROSC 后 24 h 大脑皮质凋亡细胞数 (个/HP) 分别为 10.6 ± 4.7、47.5 ± 8.5、33.4 ± 6.6。与假手术组比较, 复苏组和 BHD 组大脑皮质凋亡细胞高度表达, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 与复苏组比较, BHD 组皮质凋亡细胞表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

2.4 BHD 对 CPR 后脑组织 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白表达的影响 (表 2): 与假手术组比较, 复苏组和 BHD 组大鼠在 ROSC 后 24 h 脑皮质 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白表达均升高, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。与复苏组比较, BHD 组 Bax 蛋白和 Fas 蛋白表达降低, 而 Bcl-2 蛋白表达升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠大脑皮质 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白

组别	动物数	表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )		
		Bax	Bcl-2	Fas
假手术组	8	5.6 ± 3.0	6.9 ± 2.9	3.9 ± 2.0
复苏组	8	32.1 ± 6.4 <sup>a</sup>	15.0 ± 6.0 <sup>a</sup>	17.3 ± 7.7 <sup>a</sup>
BHD 组	8	17.1 ± 6.2 <sup>ac</sup>	35.5 ± 7.0 <sup>ac</sup>	10.9 ± 4.3 <sup>b</sup>

注: 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与复苏组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$

3 讨论

多个研究认为 CPR 后 0.5 h 开始就出现脑水肿, 分为细胞毒性脑水肿和血管源性脑水肿, 两种脑水肿多交叠存在难以严格区分<sup>[6-7]</sup>。本研究中发现, 复苏组大鼠在 ROSC 后 24 h 脑含水量显著高于假手术组, 提示 ROSC 后 24 h 仍存在脑水肿; BHD 组脑含水量明显低于复苏组, 与假手术组无明显差异, 提示 BHD 能减轻大鼠复苏后的脑水肿。

I/R 损伤导致凋亡的研究已经开展多年, Hata 等<sup>[8]</sup>在 Bcl-2 基因敲除大鼠的脑 I/R 损伤研究中证实缺乏 Bcl-2 基因导致大鼠的脑 I/R 损伤加重。而更早期的研究在 Bcl-2 过表达大鼠的脑 I/R 实验中证实 Bcl-2 的过表达能够有效抑制 I/R 损伤<sup>[9]</sup>。Saitoh 等<sup>[10]</sup>在大鼠成纤维细胞缺氧复氧实验中证实 Bcl-2 能够通过阻断活性氧簇的生成, 抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 的激活,

通过减少线粒体膜电位的丧失来减少细胞的坏死。Saikumar 等<sup>[11]</sup>在大鼠肾脏细胞缺氧复氧实验中认为,在缺氧时 Bax 的移位是细胞坏死的触发点,而 Bcl-2 则能够保持线粒体的完整性,维持细胞活性。Matsuyama 等<sup>[12]</sup>研究发现,在脑缺血后神经细胞、胶质细胞、脑室膜细胞表面有 Fas 的高表达,并与凋亡细胞分布一致。但在 CPR 后脑细胞凋亡及凋亡相关蛋白的研究仍较少。本课题组在前期对 CPR 后脑组织基质金属蛋白酶表达研究的基础上<sup>[13]</sup>,进一步观察脑组织细胞凋亡情况发现,与假手术组比较,复苏组凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Fas 的表达均显著升高,并且凋亡细胞也较假手术组显著增多,与 Matsuyama 等的结果相类似,提示大鼠窒息后 CPR 激活了 Bcl-2/Bax 系统和 Fas/FasL 系统,导致细胞凋亡的发生,是 CPR 后脑组织损伤机制之一。

BHD 出自《医林改错》下卷,由清代医家王清任所创,此方重用黄芪,大补元气,令气旺血行,瘀去络通;其配伍特点为大量补气药与少量活血药相配伍,使气旺血行,活血而不伤正,共奏补气活血之功效,属于益气活血方剂代表。近年来研究表明,BHD 在大鼠全脑 I/R 模型中能够通过增加 Bcl-2 染色阳性细胞的表达,降低 Bax 阳性细胞的表达,起到抑制细胞凋亡,抗脑 I/R 损伤的作用,但其对 CPR 后脑细胞的凋亡作用尚未明确<sup>[14]</sup>。本研究中还发现,BHD 组大鼠皮质 Bax 和 Fas 的表达较复苏组显著降低,Bcl-2 表达显著升高。提示 BHD 能够通过抑制 CPR 后脑细胞 Bax 和 Fas 表达,上调 Bcl-2 表达而减轻细胞凋亡达到脑保护作用。另外,TUNEL 法检测 BHD 组脑凋亡细胞少于复苏组,也同样证实了 BHD 具有减少脑细胞凋亡的作用。

综上所述,大鼠窒息型心搏骤停 CPR 后,复苏组在 ROSC 后 24 h 脑含水量增加,脑凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Fas 以及脑细胞凋亡的表达增加;BHD 能够减少 ROSC 后 24 h 的脑含水量,抑制凋亡相关

蛋白 Bax 和 Fas 的表达,上调 Bcl-2 的表达,从而减少细胞凋亡,具有脑保护作用。

参考文献

- [1] 陈寿权,李章平,王姗姗,等.窒息致大鼠心脏骤停模型复苏的影响因素.中华急诊医学杂志,2005,14(10):814-817.
- [2] 李章平,陈寿权,章杰,等.不同剂量参附注射液对窒息型大鼠心肺复苏后心肌保护作用的研究.中国中西医结合急救杂志,2007,14(3):162-165.
- [3] Idris AH,Becker LB,Ornato JP,et al. Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research. Circulation, 1996,94(9):2324-2336.
- [4] 刘芳,白雪松,刘柏炎,等.补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响.中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):9-12.
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1993:67-81.
- [6] 陈俊,陈寿权,李章平,等.七叶皂苷对心肺复苏后大鼠脑水肿期脑水通道蛋白 4 mRNA 变化的作用.中国中西医结合急救杂志,2007,14(4):245-249.
- [7] Xiao F,Zhang S,Arnold TC,et al. Mild hypothermia induced before cardiac arrest reduces brain edema formation in rats. Acad Emerg Med,2002,9(2):105-114.
- [8] Hata R,Gillardon F,Michaelidis TM,et al. Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. Metab Brain Dis,1999,14(2):117-124.
- [9] Kitagawa K, Matsumoto M, Tsujimoto Y,et al. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of Bcl-2 in transgenic mice. Stroke, 1998,29(12):2616-2621.
- [10] Saitoh Y,Ouchida R,Miwa N. Bcl-2 prevents hypoxia/reoxygenation-induced cell death through suppressed generation of reactive oxygen species and upregulation of Bcl-2 proteins. J Cell Biochem,2003,90(5):914-924.
- [11] Saikumar P, Dong Z, Patel Y, et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. Oncogene,1998,17(26):3401-3415.
- [12] Matsuyama T,Hata R,Yamamoto Y,et al. Localization of Fas antigen mRNA induced in postischemic murine forebrain by in situ hybridization. Brain Res Mol Brain Res,1995,34(1):166-172.
- [13] 李章平,陈寿权,王姗姗,等.大鼠心肺复苏后脑组织基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达的研究.中国危重病急救医学,2005,17(9):548-551.
- [14] 张运克.补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响.中华中医药杂志,2007,22(6):404-407.

(收稿日期:2009-12-07)  
(本文编辑:李银平)

2008 年度中国百种杰出学术期刊

目前科技部中国科技信息研究所公布了 2008 年度的中国科技论文统计结果。根据《中国科学技术期刊综合评价指标体系》,采用分层分析法,由专家打分确定了重要指标的权重,对各学科的每种期刊进行了综合评定,评出了 2008 年度“中国百种杰出学术期刊”,其中医药卫生类期刊有 30 种,分别为:CHINESE MEDICAL JOURNAL、中华医学杂志、中华外科杂志、中华心血管病杂志、中华儿科杂志、中华结核和呼吸杂志、中华神经科杂志、中华流行病学杂志、中华口腔医学杂志、中华肿瘤杂志、中华骨科杂志、中华放射学杂志、中华检验医学杂志、中华耳鼻咽喉头颈外科杂志、中华护理杂志、中国危重病急救医学、中国病理生理杂志、中国药理学通报、中国中西医结合杂志、中国组织工程研究与临床康复、中国感染与化疗杂志、中国心理卫生杂志、中国中药杂志、遗传学报、药学报、营养学报、中草药、WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY、第三军医大学学报、第四军医大学学报。