

四君子汤加减对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织 ERK1/2, Akt, Bax 表达的影响

胡康丽^{1,2}, 李花^{1,2*}, 刘旺华^{1,2,3}, 何倩¹, 钟银玲¹, 彭智远¹

(1. 湖南中医药大学 数字中医药协同创新中心, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学 中医诊断学湖南省重点实验室, 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学 中医诊断学科, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 观察四君子汤加减对脑缺血/再灌注损伤大鼠细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2), 蛋白激酶 B (Akt), 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的影响, 探讨其保护神经细胞可能作用机制。方法: 将 55 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、依达拉奉组、四君子汤加减低、中、高剂量组 (3.69, 7.38, 14.76 g·kg⁻¹)。采用线栓法制备大鼠中动脉阻塞 (MCAO) 模型, 治疗 7 d 后处死, 取大鼠缺血侧脑组织, 运用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2), 磷酸化 Akt (p-Akt), Bax 蛋白含量。应用实时荧光定量聚合酶链式反应法 (Real-time PCR) 测定脑缺血再灌注后脑组织内 ERK1/2, Akt, Bax mRNA 的表达变化。结果: 与假手术组比较, 模型组 p-ERK1/2, p-Akt 蛋白及 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$); Bax 蛋白及 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 四君子汤加减低、中、高剂量组 p-ERK1/2, p-Akt 蛋白及 mRNA 表达明显上调, Bax 蛋白及 mRNA 表达明显下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 四君子汤加减可能通过上调 p-ERK1/2, p-Akt, 下调 Bax 蛋白表达发挥脑保护作用。

[关键词] 脑缺血/再灌注; 四君子汤加减; 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2); 蛋白激酶 B (Akt); 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白 (Bax)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0152-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181092

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1021.010.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 10:48

Effect of Modified Si Junzitang on Expression of ERK1/2, Akt, Bax in Rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury

HU Kang-li^{1,2}, LI Hua^{1,2*}, LIU Wang-hua^{1,2,3}, HE Qian¹, ZHONG Yin-ling¹, PENG Zhi-yuan¹

(1. Digital Collaborative Innovation Center of traditional Chinese medicine (TCM), Changsha 410208, China;

2. The key Laboratory of Diagnostics of TCM in Hunan Province, Changsha 410208, China;

3. Institute of TCM Diagnostics of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Si Junzitang on the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), protein kinase B (Akt) and B cell lymphoma/leukemia-2 associated X protein (Bax) in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury, and to explore its possible protective mechanism on nerve cells. **Method:** Totally 55 male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, edaravone group, modified Si Junzitang low-dose group, middle-dose group, and high-dose group (3.69, 7.38,

[收稿日期] 20171201(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202632, 81473567); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(14B134); 湖南省高校创新平台基金项目(15K092); 湖南省中医药科研计划项目(201723)

[第一作者] 胡康丽, 在读硕士, 从事《黄帝内经》治则治法理论与脑血管病防治研究, Tel: 0731-8410504, E-mail: 893334151@qq.com

[通信作者] *李花, 博士, 副教授, 从事中医临床基础研究, Tel: 0731-85381126, E-mail: flora119@sina.com

14.76 g·kg⁻¹). The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was induced by suture method, after 7d treatment, the rats were sacrificed and ischemic side brain tissues were taken. Phosphorylation of ERK1/2 (p-ERK1/2), p-Akt and p-Bax protein contents were detected by Western blot; the mRNA expression levels of ERK1/2, Akt and Bax were detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with sham operation group, the p-ERK1/2, p-Akt and p-Bax protein and mRNA expression levels were significantly reduced in model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, the protein and mRNA expression levels of p-ERK1/2 and p-Akt were up-regulated, the expression of protein and mRNA of Bax were significantly reduced in low-dosed group, middle-dosed group, high-dosed group, with statistically significant difference ($P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Si Junzitang can protect brain with cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating the expression of p-ERK1/2 and p-Akt, reducing the expression of Bax.

[**Key words**] cerebral ischemia / reperfusion; modified Si Junzitang; extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2); protein kinase B (Akt); B cell lymphoma/leukemia-2 associated X protein (Bax)

脑卒中是一种发生在脑部动脉的脑血管疾病,也是临床常见疾病,可分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中。其中缺血性脑卒中占有所有卒中的 80%。脑血管意外在我国疾病死亡中占据了第 1 位,死亡率大大高于其他欧美国家。脑卒中现已严重威胁到人类特别是老年人的身心健康,由于其发病率高、愈后较差,且发病率呈逐年上升的趋势,也给不断老年化社会带来了沉重负担^[1]。因此,为降低脑卒中的致残率与死亡率,改善患者生活质量,减轻社会负担,研究抗脑卒中的发病机制及抗脑卒中神经功能损伤的相关新药也就具有了现实意义。

神经元细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是神经元生存的外环境,对神经元有支撑、营养与保护作用,与中医脾土“主承载”,滋生万物的功能相似的特点。中医认为脾为后天之本,气血生化之源,“脾者土也……土者生万物……”,土为坤元,“至哉坤元,万物滋生,坤厚载物”。而神经细胞外 ECM 是神经元赖以生存的外环境和载体,具有承载、营养、保护、促进神经元突触生长、促进干细胞转化为神经元的作用,由此可见,ECM 的功能当属中医“脾土”功能范畴。然而脑缺血从脾论治的文献不多,以从脾论治来保护 ECM 的研究亦较少。以往研究多拘泥于“肾生髓通于脑”,倾向于偏重补肾或滋补肝肾,厚先天之本“肾”而薄后天之本“脾”,干预靶点亦多重神经元而轻 ECM。

中医药在脑缺血治疗方面,显示出广阔的发展前景。四君子汤加减以《太平惠民和剂局方》健脾益气经典名方四君子汤为基础加入黄芪、山药、薏苡仁组成。方中人参为君,甘温益气,健脾养胃;臣以黄芪、山药,黄芪益气升阳,与人参相伍益气作用大

增,山药补脾养胃,与人参相伍,补脾养胃相得益彰;佐以茯苓、白术、薏苡仁,白术苦温之,健脾燥湿,加强益气助运之力,甘淡茯苓、薏苡仁,健脾渗湿,三者相配,则健脾祛湿之功益著;使以炙甘草,益气和中,调和诸药。七药配伍,共奏健脾补土之功。若能在中医理论的指导下,从神经元 ECM 入手阐明四君子汤加减对脑缺血损伤的保护作用及机制,将能为临床防治脑缺血损伤提供新的切入靶点和有效的治疗方法和药物,促进中药抗脑缺血损伤的研究发展,为脑血管疾病中医治则治法研究提供新的思路和方法,因而具有良好的社会经济效益及广阔的应用前景。

课题组以往在中医药抗脑缺血损伤研究方面有一定的积累,曾进行过活血通络法、益气活血法对脑缺血再灌注后神经元损伤的保护作用及机理研究,取得了较大的成绩,曾获得湖南省科技进步二等奖,并成功开发中药三类新药“丹龙醒脑片”^[2-4]。近年来进一步开展了健脾补土法组方(即四君子汤加减)抗脑缺血损伤的研究,并进行了健脾补土法治疗中风后遗症的临床研究,结果显示使用该法具有良好的神经功能保护作用,能改善智能减退者记忆力、计算能力、定向能力,有利于精神症状好转,提高日常生活自理能力^[5]。前期研究也显示,健脾补土法组方(四君子汤加减)能增加某些 ECM 成分如层粘连蛋白(LN)表达和减少基质金属蛋白酶(MMPs)MMP-2, MMP-9 的表达,能下调组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及上调纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的表达,从而减少 ECM 的降解,上调胶原蛋白 IV 的表达^[6-9]。此外,健脾补土组方(四君子汤加减)也能促进整合素 β_3 (INT β_3),整合素连接激酶

(ILK)表达,使神经细胞与细胞外基质之间的黏附增加,减少神经细胞凋亡^[10]。

整合素是细胞与ECM黏着的重要成分。整合素介导细胞存活信号,是调节细胞失巢凋亡的关键。研究表明,整合素与其相应配体结合后,可激活多条信号转导通路,如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路等。细胞外蛋白激酶1/2(ERK1/2),Akt是已被证实的细胞广泛存在的参与细胞凋亡信号通路的关键蛋白,细胞凋亡因子Bax有促凋亡的作用,在细胞凋亡过程中发挥着重要的作用^[11]。因此,本研究将从ERK1/2,Akt,Bax入手进一步探讨四君子汤加减脑保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级SD大鼠55只,250~280g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCSK(湘)2013-0004。湖南中医药大学伦理委员会编号HN-LL-2017-025-03,符合动物伦理委员会的要求。SPF级实验室饲养,室温23~25℃,相对湿度40%~70%。

1.2 药物及试剂 人参15g,白术12g,茯苓10g,黄芪15g,山药12g,薏苡仁12g,炙甘草6g(各药物从湖南中医药大学附属第一医院统一购买,并由湖南中医药大学黄小平教授鉴定均为正品,符合2015年版《中国药典》规范;依达拉奉注射液(吉林省博大制药有限公司,批号80-140603,规格10mL/15mg);兔抗磷酸化FAK(Tyr397)抗体(英国Abcam公司,批号170210-307);兔抗磷酸化Akt(Ser473)抗体,兔抗磷酸化ERK1/2(Thr202/Thr204)抗体, β -肌动蛋白(β -actin)(13E5)Rabbit mAb(美国Cell Signalling公司,批号分别为K162711C,K155922D,#4970);PVDF膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010);RIPA裂解液,磷酸化蛋白酶抑制剂,BCA蛋白定量检测试剂盒,显影定影试剂(武汉谷歌生物科技公司,批号分别为G2002,G2007,G2003,G2019);trizol试剂(美国Invitrogen Life Technologies公司,批号15596-026)。

1.3 仪器 DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂),alphaEaseFC型灰度分析软件(美国Alpha Innotech公司),V300型扫描仪(日本Epson公司),Step One Plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司),UVP型凝胶成像系统(美国Thermo公司),WSE-4040型半干转膜仪系统(德国Eppendorf公司),Neofuge 15R型台式高速冷冻离

离心机(力康生物医疗科技公司),752-P型紫外分光光度计(上海现科仪器有限公司)。

2 方法

2.1 四君子汤加减配置及动物分组 取各药加水适中,浸泡2h,水煎煮。第1次用6倍水,煎煮50~60min;第2次用3倍水,煎煮30min,2次煎煮液混合,并浓缩至生药质量浓度为 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。造模之前先将55只SD雄性大鼠进行初分组,按随机数表法分为假手术组8只、模型制备组47只。

2.2 模型制备与评价 采用改良Longa等^[12]等的线栓法建立大脑中动脉闭塞局灶性脑缺血模型(MCAO模型),于缺血2h后进行再灌注。假手术组除不插线外,其他步骤同造模组。缺血2h后进行再灌注,动物清醒后进行模型评价,术后评分为1~3分者评定为造模成功,纳入为研究对象。实验过程中死亡4只,2只造模不成功。

2.3 造模后分组及给药 将造模后的大鼠随机分成模型组(9只)、依达拉奉组(8只)、四君子汤加减低、中、高剂量组(8只),加上假手术组共6组。给药剂量根据70kg成人每日服用82g生药剂量按体表面积进行换算,从造模后2h后开始首次给药。首次给药后,每日同一时间点给药1次,连续给药7d。假手术组:灌胃蒸馏水、腹腔注射生理盐水;模型组:灌胃蒸馏水、腹腔注射生理盐水;依达拉奉组: $3.2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,腹腔注射、灌胃蒸馏水;四君子汤加减低剂量组:灌胃剂量 $3.69\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于1/2临床等效剂量)、腹腔注射生理盐水;四君子汤加减中剂量组:灌胃剂量 $7.38\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量)、腹腔注射生理盐水;四君子汤加减高剂量组:灌胃剂量 $14.76\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量2倍)、腹腔注射生理盐水。

2.4 动物取材 再灌注7d后取材,各组大鼠用10%水合氯醛($3.5\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,迅速断头取脑置于冰盘上,剥离软脑膜,并分离出缺血侧顶叶大脑皮质,将取的缺血侧组织用冰磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,然后放入消毒的离心管中并标记。 -80℃ 保存备用。

2.5 观察指标与方法

2.5.1 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定缺血侧脑皮质内p-ERK1/2,p-Akt,Bax蛋白表达 取出RIPA裂解液,融解,混匀,加入PMSF,蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂。取组织块100mg,用冷PBS洗涤3次,冰上匀浆。转速多少离心10min,上清液即为蛋白提取物,并按照BCA蛋白定量试剂盒使用说

明操作。将 10% 分离胶灌入制胶架后加入双蒸水, 加 4% 浓缩胶, 后加电泳缓冲液后上样, 样品旁边加预染蛋白 Marker 后电泳, 转膜。用甲醇活化 PVDF 膜, 将 PVDF 膜盖于胶上, 100 V 恒压转膜 1 h。膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h; 加一抗, 稀释, 平铺, 4 ℃ 孵育过夜; 加偶联有 HRP 二抗, 平铺, 室温下孵育 1 h; 一抗、二抗孵育结束后均用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。显影定影试剂显影、定影。用 alphaEaseFC 灰度分析软件对条带行灰度扫描分析, 结果以样品条带灰度值/相应内参灰度值表示目的蛋白的表达。本研究以 β -actin 为内参。

2.5.2 Real-time PCR 检测脑组织 ERK1/2, Akt, Bax mRNA 的表达水平 取匀浆器, 加入 trizol reagent 1 mL, 预冷后加组织 100 mg 并研磨充分。离心 10 min 后取上清。加入三氯甲烷 250 μ L, 混匀, 静置后低温离心取上清, 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀。-20 ℃ 放置 15 min 后 5 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。加入无菌 DEPC 处理水配制的 75% 乙醇洗涤底部沉淀, 再次低温离心, 并将多余的溶液清除; 加入无 RNA 酶的水 20 μ L 溶解 RNA。紫外吸收法对 RNA 的浓度和纯度进行测定。利用 NCBI 数据库分别查询大鼠 ERK1/2, Akt, Bax 作为内参 β -actin 基因的序列, 通过 Primer Premier 5.0 引物设计软件引物序列(引物序列见表 1)。将标本 mRNA 逆转录合成 cDNA。准备反转录体系。依次加入反应体系, 每个反转录体系配置 3 管。将配置好的溶液放到 PCR 仪上进行扩增反应。反应条件为预变性, 95 ℃ 10 min, 循环(40 次), 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s; 溶解曲线, 75 ℃ 至 95 ℃, 每 20 s 升温 1 ℃。结果分

析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 反映目的基因表达倍数, 其数值越大, 表达越强。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度 /bp
β -actin	上游 TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG	240
	下游 GTTGGCATAGAGGCTTTACGG	
ERK	上游 TGCCATTGAGCAGGACTACC	181
	下游 GGTGATGTTGCCACAGTCTT	
Akt	上游 TGAGACCCGACACCAGGTATTTTG	135
	下游 GCTGAGTAGGAGAACTGGGGAAA	
Bax	上游 TGAAGTGGACAACAACATGGAG	148
	下游 AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC	

2.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 分析软件进行统计, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布, 多组间均数比较用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐者用 LSD 法检验, 方差不齐时用 Dunnett's T3 检验; 不符合正态分布者用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 p-Akt, p-ERK1/2, Bax 蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 p-ERK1/2, p-Akt 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 依达拉奉组、四君子汤加减各剂量组 p-ERK1/2, p-Akt 蛋白表达上调, Bax 蛋白表达则下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2, 图 1。

表 2 四君子汤加减对各组大鼠脑组织 p-ERK1/2, p-Akt, Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

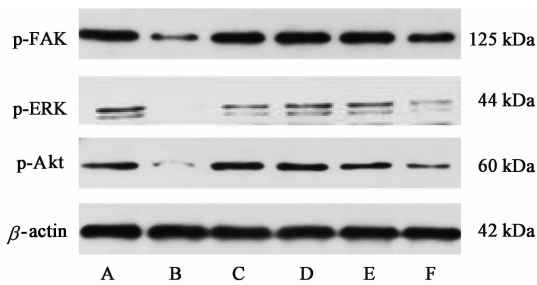
Table 2 Effect of modified Sijunzi Tang on expression of p-ERK1/2, p-Akt, Bax in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot \text{kg}^{-1}$	P-Akt/ β -actin	P-ERK/ β -actin	Bax/ β -actin
假手术	8	-	0.302 \pm 0.014	0.138 \pm 0.005	1.486 \pm 0.137
模型	9	-	0.099 \pm 0.022 ¹⁾	0.016 \pm 0.001 ¹⁾	5.801 \pm 0.384 ¹⁾
依达拉奉	8	3.2 $\times 10^{-3}$	0.330 \pm 0.020 ²⁾	0.101 \pm 0.010 ²⁾	1.889 \pm 0.283 ²⁾
四君子汤加减	8	14.76	0.342 \pm 0.030 ²⁾	0.123 \pm 0.014 ²⁾	1.821 \pm 0.137 ²⁾
	8	7.38	0.334 \pm 0.033 ²⁾	0.121 \pm 0.012 ²⁾	1.845 \pm 0.156 ²⁾
	8	3.69	0.331 \pm 0.013 ²⁾	0.109 \pm 0.011 ²⁾	1.812 \pm 0.178 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对脑缺血再灌注大鼠 ERK1/2, Akt, Bax mRNA 表达的影响 与假手术组比较, 模型组 ERK1/2, Akt mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$), Bax mRNA 表达明

显上调 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 依达拉奉组、四君子汤加减各剂量组 ERK1/2, Akt mRNA 表达上调, Bax mRNA 表达下调 ($P < 0.01$)。见表 3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 依达拉奉组; D. 四君子汤加减 14.76 g·kg⁻¹组; E. 四君子汤加减 7.38 g·kg⁻¹组; F. 四君子汤加减 3.69 g·kg⁻¹组

图 1 各组大鼠脑组织 p-ERK1/2, p-Akt, Bax 蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression of p-ERK1/2, p-Akt, Bax in brain tissue of rats

表 3 四君子汤加减对各组大鼠脑组织 ERK, Akt, Bax mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of modified Sijunzi Tang on relative expression of ERK, Akt and Bax mRNA in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ERK	Akt	Bax
假手术	8	-	0.998 ± 0.088	0.950 ± 0.870	1.018 ± 0.052
模型	9	-	0.275 ± 0.029 ¹⁾	0.255 ± 0.025 ¹⁾	4.823 ± 0.449 ¹⁾
依达拉奉	8	3.2 × 10 ⁻³	0.613 ± 0.010 ²⁾	0.585 ± 0.065 ²⁾	2.652 ± 0.145 ²⁾
四君子汤加减	8	14.76	0.636 ± 0.065 ²⁾	0.588 ± 0.061 ²⁾	2.457 ± 0.173 ²⁾
	8	7.38	0.610 ± 0.071 ²⁾	0.565 ± 0.092 ²⁾	2.557 ± 0.257 ²⁾
	8	3.69	0.587 ± 0.070 ²⁾	0.523 ± 0.092 ²⁾	2.690 ± 0.180 ²⁾

Bax 属于 Bcl-2 家族,是一种与 Bcl-2 共沉淀的蛋白质,也是人体中最主要的凋亡基因。Bax 分布广泛,可出现在肝细胞、上皮细胞、平滑肌细胞等中,且一般出现在胞浆中,作为一种细胞损伤和刺激的传感器,Bax 响应损伤和刺激,并破坏在正常情况下抗凋亡的 Bcl-2 的功能^[14]。Bax 的过度表达拮抗 Bcl-2 的保护作用,而使细胞死亡。目前对于 Bax 的研究成为了医学界研究的热点,特别是在细胞凋亡及癌症方面^[15-16]。

ERK1/2 是一类广泛存在于真核细胞内的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPKs) 信号通路中重要组成部分,也是神经细胞凋亡领域的热点之一,能被许多细胞因子所激活进而调节细胞生长、分化、凋亡等^[17]。ERK1/2 作为神经科学领域中重要的信号途径,它与中枢神经系统疾病的发生发展密切相关。目前对 ERK1/2 途径在脑缺血缺氧损伤中所起的作用始终存在争议, Alessandrini 等^[18] 研究给予栓塞小鼠大脑中动脉,发现小鼠在缺血缺氧的过程中 ERK 通路激活诱导缺血性脑损伤的形成,同时给予 MEK1 特异性抑制剂后脑缺血梗死面积显著减少,以及 ERK 蛋白表达逐渐减少。这说明 ERK 通路的激活加重脑缺血缺氧

4 讨论

脑缺血疾病主要由于神经细胞的凋亡而引起而造成神经系统的损伤。脑缺血后会引发氧化应激,兴奋性氨基酸,离子超载, DNA 损伤与炎症反应损伤等一系列病理生理变化,从而导致神经细胞凋亡^[13]。因其作用机制尚未完全清楚,且严重威胁到患者的生命。临床上抗脑缺血的药物很少,疗效也不容乐观。这就启示笔者要不断地了解,深入地探索脑缺血病理机制,研究出抗脑缺血新药,在脑缺血发生过程中,能及时利用脑神经损伤的机制,将脑缺血损伤降低到最小化。

性脑损伤。ERK 磷酸化可能引起兴奋性氨基酸的释放而使组织损伤,阻断 ERK 通路能保护细胞可能与阻止兴奋性氨基酸的释放有关,同时 ERK 通路也可通过细胞凋亡造成缺血缺氧脑损伤^[19]。

Akt 以 PI3K 依赖的形式被细胞外因子磷酸化和激活,与细胞凋亡等密切相关^[20]。Akt 为 PI3K 关键下游效应分子,经磷酸化作用而被激活, p-Akt 是其活化形式之一^[21]。Akt 活化后能促进细胞的存活,能通过直接磷酸化促凋亡基因,从而使细胞得以生存。局部粘着斑激酶 (FAK) 在 Ras 的参与下可以激活 Ras/MAPK, PI3K/Akt 信号转导通路,活化的 ERK1/2, Akt 可以激活多种转录因子,调控细胞凋亡、增值、分化等^[22]。在缺血诱导的神经细胞凋亡中, ERK, Akt 的协同表达起着重要神经保护作用^[23]。

前期临床研究显示,经健脾补土组方治疗后,脑卒中患者 MMSE, ADL, HDS 量表得分均有明显升高,说明了健脾补土组方对改善缺血性脑卒中患者后遗症有着较好疗效^[5]。前期实验研究显示,健脾补土组方能保护血脑屏障,抑制 NF-κB 炎症信号通路,且能增加某些 ECM 成分如 LN 表达和减少 MMP-2, MMP-9 的表达,能下调 t-PA 及上调 PAI-1

的表达,从而减少 ECM 的降解,上调胶原蛋白 IV 的表达^[6-9]。此外,健脾补土组方也能促进 INT β_3 , ILK, FAK 表达,使神经细胞与细胞外基质之间的粘附增加,减少神经细胞凋亡^[10]。研究也发现,整合素受体与某些 ECM 结合后,细胞能获得生存,避免凋亡^[24]。FAK 作为整合素介导的信号转导途径的关键蛋白,整合素与其相应配体结合后,多个 FAK 分子聚集在粘着斑处,使 FAK N-端区的酪氨酸 Tyr397 磷酸化而被激活,而 Tyr397 磷酸化水平可反映细胞内 FAK 的活化状况^[25-26]。p-ERK1/2, p-Akt 作为 FAK 信号通路中关键的活化蛋白,已被大量研究证实了其抗脑缺血损伤细胞凋亡的作用。

本实验研究结果,在脑缺血在灌注后,缺血侧脑皮质 p-ERK1/2, p-Akt 含量显著减少, Bax 含量明显升高,可以推测在脑缺血再灌注后神经细胞与细胞外基质之间的粘附减少,细胞凋亡增多。连续给药 7 d 后,与模型组比较,依达拉奉组、四君子汤加减低剂量组、中剂量组、高剂量组 p-ERK1/2, p-Akt 蛋白表达上调, Bax 蛋白表达下调。说明四君子汤加减能不同程度上调 p-ERK1/2, p-Akt, 下调 Bax 蛋白表达,增加神经细胞与细胞外基质的黏附程度,减少脑神经细胞凋亡。

四君子汤加减药中黄芪、人参甘温共为君药,补益脾胃之气。实验研究表明,黄芪能改善血脑屏障的通透性,使大脑局部血流量增多,对缺血再灌注后的血脑屏障起到了一定的保护作用^[27]。姚灿坤^[28]研究发现黄芪注射液能促进脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的减少,与 PI3K, Akt 表达的上调相关。赖真等^[29]也认为黄芪能刺激 PI3K/Akt 通路的表达,从而减轻大鼠脑缺血再灌注神经损伤。焦俊霞等^[30]发现黄芪注射液抗凋亡的作用显著,其机制可能与下调 Bax, 上调 Bcl-2 水平有关。现代研究证实人参及其总皂苷有抗脑缺血的作用。人参皂苷 Rg₁ 来源于五加科植物人参的根,王巧云等^[31]研究证实人参皂苷 Rg₁ 对脑缺血再灌注大鼠具有保护作用,且与抑制海马神经元凋亡,调节 p-ERK1/2 表达水平有关。韩辉等^[32]研究发现由人参、川芎组合的益气活血药物能保护脑缺血再灌注损伤,可能通过激活 ERK 信号通路,促进神经再生。刘馨雨^[33]认为人参皂苷 Rd 能降低脑缺血再灌注神经行为学评分,缩小脑梗死面积,上调 p-Akt/Akt, 从而起到脑保护作用。

综上所述,四君子汤加减可能通过上调 p-ERK, p-Akt, 下调 Bax 表达,从而减少脑缺血再灌注大鼠

神经细胞凋亡而发挥脑保护作用。此研究为四君子汤加减抗脑损伤更深入的机制研究提供了实验基础,为后期的临床应用提供了更多的依据。

[参考文献]

- [1] 张振昶. 缺血性脑卒中相关易感基因及蛋白质组学研究[D]. 兰州:兰州大学, 2015.
- [2] 何倩, 李花, 周小青, 等. 丹龙醒脑片对大鼠脑缺血再灌注后海马区 AI 及 Fas/FasL, TNF- α 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(2): 23-25.
- [3] 马中建, 刘旺华, 李花, 等. 丹龙醒脑片对大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(3): 20-22.
- [4] 李花, 刘旺华, 刘建新, 等. 丹龙醒脑片对沙土鼠脑缺血再灌注保护作用的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(5): 29-31.
- [5] 李花, 刘旺华, 廖亮英, 等. 健脾补土方药治疗缺血性脑卒中后遗症疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3): 73-74.
- [6] 李花, 刘旺华, 廖亮英, 等. 健脾补土法对大鼠脑缺血再灌注后层黏连蛋白降解的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2010, 12(7): 645-647.
- [7] 李花, 刘旺华, 周小青, 等. 健脾补土法对脑缺血再灌注大鼠脑组织 MMP-2 的表达及血脑屏障通透性的影响[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(2): 115-117.
- [8] 付小金, 刘旺华, 李花, 等. 健脾补土方对脑缺血/再灌注损伤大鼠 NF- κ B 和 I κ B α 蛋白表达水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 5(3): 5-8, 73.
- [9] 钟银玲, 李花, 刘旺华, 等. 健脾补土法组方对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织 t-PA, PAI-1, Col IV 的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(12): 2213-2215, 2267.
- [10] 钟银玲, 李花, 刘旺华, 等. 健脾补土法组方对脑缺血/再灌注大鼠脑组织 INT β_3 , ILK 及 FAK mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(3): 513-516.
- [11] Looor G, Kondapalli J, Iwase H, et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(7): 1382-1394.
- [12] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [13] 张茵珊, 李娟娟, 吴春云. 脑缺血的损伤机制及相关信号通路的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(6): 729-732.
- [14] 杨雪, 隋海静, 李冬梅, 等. 丙泊酚对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注损伤时凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的影

- 响[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(4): 385-388.
- [15] 孟凯. HCCR-1及Bax在乳腺癌中表达的临床基础研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [16] 刘英, 郭世杰, 孙景辉, 等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠心肌细胞凋亡及凋亡蛋白Bax、Bcl-2表达的变化[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(12): 1172-1176.
- [17] Jung J Y, Yoo C I, Kim H T, et al. Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in troglitazone induced osteoblastic cell death [J]. Toxicology, 2007, 234(1/2): 73-82.
- [18] Alessandrini A, Nanura S, Moskowitz M A, et al. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96(22): 12866-12869.
- [19] 马建鹏, 常青, 薛茜, 等. 康脑液对脑缺血大鼠BDNF, MMP-9, ERK1/2表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 131-135.
- [20] 邢变枝, 陈晖, 张苏明. 缺血后处理对脑缺血再灌注损伤后ERK1/2和Akt磷酸化及神经凋亡的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2012, 7(3): 175-179.
- [21] 成军, 现代细胞外基质分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 311.
- [22] 韩江全, 于奎营, 何敏等. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注侧皮质区细胞凋亡及p-Akt(Ser473)表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(8): 1069-1072.
- [23] LI F, Omori N, JIN G, et al. Cooperative expression of survival p-ERK1/2 and p-Akt signals in rat brain neurons after transient MCAO [J]. Brain Res, 2003, 962(1/2): 21-26.
- [24] Datta S R, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell - intrinsic death machinery [J]. Cell, 1997, 91(2): 231-241.
- [25] FU Y M, ZHANG H, DING M, et al. Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling [J]. Clin Exp Metastasis, 2004, 21(7): 587-598.
- [26] 刘畅, 赵峰, 李庆章. 整合素在细胞黏附中的功能[J]. 生物学杂志, 2012, 29(1): 75-78.
- [27] 陈春富, 郭述苏, 冯林, 等. 黄芪对大鼠脑缺血血脑屏障及脑血流的影响[J]. 卒中与神经疾病, 1998, 5(3): 132-134.
- [28] 姚灿坤. 黄芪对大鼠脑缺血再灌注后PI3-K/Akt通路的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2008.
- [29] 赖真, 姚灿坤, 程少冰, 等. 黄芪对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响及机制研究[J]. 中国中医急症, 2008, 17(11): 1565-1566.
- [30] 焦俊霞, 高维娟, 李玥明, 等. 黄芪注射液对缺氧缺血糖/复氧复糖大鼠海马神经元Bcl-2和Bax表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(5): 905-910.
- [31] 王巧云, 刘凤, 吴峰阶, 等. 人参皂苷Rg₁对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠海马p-ERK1/2与p-JNK表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 229-234.
- [32] 韩辉, 吴丽敏, 方芳, 等. 人参川芎含药血清对氧糖剥夺/复氧培养神经干细胞ERK信号通路和增殖、活力的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(4): 510-515.
- [33] 刘馨雨. 人参皂苷Rd通过激活PI3K/Akt通路促进脑缺血/再灌注大鼠神经发生的作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[责任编辑 周冰冰]