

补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠 PTEN mRNA 的影响

朱原¹, 蔡俊², 徐愉林², 祝赫³, 姚晖⁴, 秦莎莎³, 郑丽娴¹, 张继平^{1,4*}

(1. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515; 2. 广东医学院 药学院, 广东 湛江 524023;
3. 广东药学院 中药学院, 广州 510006; 4. 佛山市第二人民医院, 广东 佛山 528000)

[摘要] **目的:**探讨补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(PTEN) mRNA表达与血小板活化的影响。**方法:**将无特定病原体(SPF)级SD大鼠60只随机分为假手术组、模型组、氢氯吡格雷组、补阳还五汤高、低剂量组,每组12只。氢氯吡格雷组*ig*给予氢氯吡格雷 $6.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,补阳还五汤高、低剂量组分别*ig*给予补阳还五汤 $26, 6.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,其余各组*ig*给予生理盐水,连续给药14 d后,采用大脑中动脉线栓法复制大鼠急性局灶性脑缺血再灌注模型,并在造模前2 h给予相应*ig*处理,造模60 min后拔除栓线再灌注12 h后收集相应标本保存,测定各组大鼠血浆P-选择素(CD62P)含量与海马组织PTEN mRNA表达情况。**结果:**与假手术组比较,模型组神经行为评分显著增加,与模型组比较,各用药组的神经行为评分显著降低;与假手术组比较,模型组血浆中CD62P表达显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,补阳还五汤组与氢氯吡格雷组均能显著抑制血浆中CD62P表达($P < 0.05$),但补阳还五汤组与氢氯吡格雷组之间抑制作用无显著性差异;与假手术组比较,模型组PTEN mRNA表达显著增加;与模型组比较,各用药组的PTEN mRNA表达显著降低($P < 0.05$),以补阳还五汤高剂量组尤为明显。**结论:**补阳还五汤对急性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护机制可能与下调PTEN基因过表达及抑制CD62P表达有关。

[关键词] 第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因;补阳还五汤;脑缺血;血小板活化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0135-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230135

Effect of Buyang Huanwu Tang on Expression of PTEN mRNA in Rat Model with Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

ZHU Yuan¹, CAI Jun², XU Yu-lin², ZHU He³, YAO Hui⁴, QIN Sha-sha³, ZHENG Li-xian¹, ZHANG Ji-ping^{1,4*} (1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. College of pharmacy, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 3. College of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 4. The Second People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on the expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) mRNA and platelet activation in rat models with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Method:** Sixty specific pathogen free (SPF) Sprague-Dawley rats (weighing 250-300 g) were randomly divided into 5 groups as following: sham-operated group, clopidogrel group, high-dose BYHWT group, low-dose BYHWT group, and model group, 12 rats in each group. The high-dose BYHWT group and the low-dose BYHWT group were *ig* administered with 26, 6.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹ BYHWT respectively while the clopidogrel group was *ig* administered with 6.8 mg · kg⁻¹ · d⁻¹. Another two groups were *ig* administered with normal saline. After treatment of the animals for 14 days, middle cerebral artery occlusion method was used to establish models of transient focal cerebral ischemia and reperfusion, and corresponding *ig* treatment was provided 2 h before modeling. The plugging wire was removed after modeling for 60 min and

[收稿日期] 20150325(014)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2013010012284);广东省中药局中医药强省资助项目(20132029);佛山市科技发展专项资金项目(2012AA100111);佛山市医学类科技攻关项目(201208079);佛山市产学研专项资金项目(2011BC100011);佛山市科技创新专项资金项目(2013AG10012)

[第一作者] 朱原,在读硕士,从事中西医结合临床研究,Tel:18170752501,E-mail:zhuyuan0719@163.com

[通讯作者] *张继平,硕士,硕士生导师,研究员,主任中药师,从事中药复方药理研究,Tel:0757-88032005,E-mail:fszjping@163.com

reperfusion for 12 h before samples collection for determination of the content of P-selection (CD62P) in plasma and expression of PTEN mRNA in hippocampus. **Result:** The neurological score in model group was significantly higher than that in sham-operated group, and the neurological scores in various treatment groups were significantly lower than that in model group. The expression of CD62P in the model group was significantly higher than that in sham-operated group ($P < 0.05$). BYHWT groups and clopidogrel group can significantly inhibit the expression of CD62P ($P < 0.05$), but without significant difference between BYHWT groups and clopidogrel group. PTEN mRNA expression in model group was significantly higher than that in sham-operated group. PTEN mRNA expression in various treatment groups were significantly lower than that in model group ($P < 0.05$), mostly significant in BYHWT high dose group. **Conclusion:** The neuroprotective mechanism of BYHWT on acute cerebral ischemia model may relate with down-regulating the expression of PTEN gene over-expression and inhibiting expression of CD62P.

[**Key words**] phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; Buyang Huanwu Tang; cerebral ischemia; platelet activation

缺血性脑疾病主要是由于脑血供障碍,脑细胞功能丧失而引起的一系列神经系统功能障碍性疾病。在脑中风事件中,有 80% 由脑缺血造成中风后神经功能缺失及死亡^[1];在我国,心脑血管病发病率居世界第二,其患病率、死亡率、致残率居高不下^[2],严重影响着人们的生活质量和生活水平。补阳还五汤是目前治疗脑卒中中等血栓性疾病应用频率最高的方剂^[3],广泛应用于防治缺血性脑血管病、冠心病、心肌梗死及其他血栓栓塞性疾病。补阳还五汤治疗缺血性脑疾病疗效确切,但其分子机制仍待进一步研究;课题组前期研究发现补阳还五汤具有抗血小板的作用,同时,最新指南^[4]推荐在缺血性脑卒中的防治中应用抗血小板药物,而第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(PTEN)与 P-选择素(CD62P)与血小板活化密切相关^[5-6]。因此,本文使用补阳还五汤预处理 2 周后的 SD 大鼠复制局灶性脑缺血再灌注模型,测定血浆中血小板活化标记物 CD62P 含量及海马组织中 PTEN mRNA 表达情况,探讨补阳还五汤对抗脑缺血再灌注损伤的分子机制与血小板活化的关系。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体重 250 ~ 300 g,广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。

1.2 药物与制剂 硫酸氢氯吡格雷片(赛诺菲制药有限公司,批号 2A782),补阳还五汤颗粒剂水溶液按照《医林改错》所载的药味用量进行制备。处方为:生黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 4.5 g,地龙、桃仁、红花、川芎各 3 g,(黄芪颗粒剂,批号 311001T;当归颗粒剂,批号 1307117;赤芍颗粒剂,批号

309081T;地龙颗粒剂,批号 1308206;川芎颗粒剂,批号 1308137;桃仁颗粒剂,批号 309127T;红花颗粒剂,批号 1307190),取相当于饮片等量的各味药颗粒剂(由广东一方制药有限公司提供)混合后,用 100 °C 蒸馏水配制成补阳还五汤水溶液备用。

1.3 仪器与试剂 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),Hema9600 型基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司),1524R 型低温冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),JS-power300 型电泳仪与培清 JS-780 型全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司),K2800 型紫外核酸分析仪(北京凯奥科技有限公司)。CD62P 试剂盒(华美生物公司,批号 CSB-E07399r),SYBR® Premix Ex Taq™(日本 TAKARA 公司,批号 DRR420A),Reverse Transcriptase M-MLV 试剂盒(日本 TAKARA 公司,批号 D2639A),Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 10296-010),CTAB(美国 BBI,批号 CB0108),DEPC(美国 Sigma 公司,批号 472565),琼脂糖(Hydragene,批号 R9012TAB),其余所需试剂由广州化学制剂总厂提供。

2 方法

2.1 动物分组 使用随机数字表法将 60 只雄性 SD 大鼠随机分成 5 组,每组 12 只。即假手术组(生理盐水 *ig*)、模型组(生理盐水 *ig*)、氢氯吡格雷组($6.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),补阳还五汤高、低剂量组($26, 6.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),以上各组所用剂量均参照课题组前期实验^[7];适应性饲养 1 周后,再按照相应的药物 *ig* 给药,每天 2 次,连续 2 周。

2.2 局灶性脑缺血再灌注模型制作 大鼠造模参照文献[8]的方法,采用大鼠大脑中动脉线栓法

(MCAO)复制局灶性脑缺血模型,并在造模前 2 h 给予相应药物 *ig*。大鼠 10% 水合氯醛(1.0 g·kg⁻¹) *ip* 麻醉后,将大鼠固定于手术操作台上,消毒后其余步骤参照文献[5]进行。假性手术组仅作皮肤切开和血管剥离,不做栓线处理,其余操作同其他组。造模完成后 60 min 拔除栓线,待动物清醒后 2 h 进行神经功能评分。

2.3 观察指标

2.3.1 神经行为评分 动物于清醒后 2 h 参照文献[9]进行神经行为评分。评分标准如下:0 分无神经损伤症状;1 分不能完全伸展对侧前爪;2 分向对侧转圈;3 分向对侧倾倒;4 分不能自发行走,意识丧失。

2.3.2 检测血浆 CD62P 含量 拔除栓线再灌注 12 h 后大鼠经 10% 水合氯醛 *ip* 麻醉(1.0 g·kg⁻¹),眼眶取血约 2 mL 置于真空肝素钠抗凝管中,4 ℃,3 000 r·min⁻¹,离心 30 min,吸取血浆,放置

表 1 PTEN 与内参基因引物序列

Table 1 Primer sequences of PTEN and GADPH

引物	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
PTEN	GGAAAGGACGGACTGGTGTA	AAAAATCCAGGGCCTCTTGT
GADPH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	TGATGGCAACAATGTCCACT

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,等级资料比较采用 Kruskal-Wallis 检验,计量资料比较采用单因素方差分析检验和方差齐性检验,组间数据采用 LSD-*t* 检验或者 Nemenyi 检验(非参数检验两两比较),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对神经行为评分的影响 与假手术组比较,模型组的神经行为评分显著升高;与模型组比较,补阳还五汤与氢氯吡格雷均能明显降低大鼠神经行为评分($P < 0.01$),见表 2。

3.2 对血浆 CD62P 含量的影响 与假手术组比较,模型组血浆中 CD62P 表达显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,补阳还五汤高剂量组与氢氯吡格雷组均能显著抑制血浆中 CD62P 表达($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对海马组织中 PTEN mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组海马组织中 PTEN mRNA 表达显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,补阳还五汤与氢氯吡格雷均能下调海马组织 PTEN mRNA 的病理性过表达($P < 0.05$),见表 2。

于 -20 ℃ 冰箱,备测。采用酶联免疫定量检测技术检测大鼠血浆 CD62P 的含量;操作过程均严格按照试剂说明书进行。

2.3.3 测定海马组织 PTEN mRNA 表达 拔除栓线再灌注 12 h 后大鼠经 10% 水合氯醛 *ip* 麻醉(1.0 g·kg⁻¹),生理盐水灌洗,4% 多聚甲醛固定后迅速取脑组织,分离海马,用 RNA later 溶液预处理海马组织。Trizol 法进行总 RNA 提取海马组织总 RNA,并进行纯度分析。引物设计与合成由广州贝奥吉因生物科技有限公司完成,PTEN 与内参基因引物序列详见表 1。RNA 反转录与扩增严格按照试剂盒说明进行;反应结束后,确认 Real-Time PCR 的扩增曲线和溶解曲线,由电脑自动分析并计算出反应体系中待测样本 cDNA 达到设定阈值的循环数(cycle count, C_t)。实验中各个样本均做 2 个复孔。以假手术组做对照,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算 mRNA 相对表达情况。

表 2 不同处理对神经行为评分,CD62P,PTEN mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Influence on neurological deficits score, CD62P and PTEN mRNA with different treatment($\bar{x} \pm s$)

	剂量 /g·kg ⁻¹	神经行为评分 <i>n</i> /分	CD62P /μg·L ⁻¹	PTEN mRNA /2 ^{-ΔΔC_t}
假手术	-	4 0 ²⁾	0.12 ± 0.04 ²⁾	1.01 ± 0.20 ²⁾
模型	-	5 2.8 ± 0.7 ¹⁾	0.17 ± 0.06 ¹⁾	9.07 ± 2.06 ¹⁾
氢氯吡格雷	6.8 × 10 ⁻³	5 2.0 ± 0.6 ²⁾	0.12 ± 0.05 ²⁾	6.69 ± 1.45 ²⁾
补阳还五汤	6.5	5 2.3 ± 0.8 ²⁾	0.16 ± 0.03	3.71 ± 0.50 ²⁾
	26	5 1.3 ± 0.5 ²⁾	0.11 ± 0.03 ²⁾	1.65 ± 0.54 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

脑血管疾病为临床常见病,由于其病死率高,国内外在临床治疗上仍主要推荐以阿司匹林预防为主^[10],但 10 年前有学者发现阿司匹林与氢氯吡格雷在脑缺血疾病防治中出现了无应答状况^[11-12],因此,寻找类似抗血小板药物迫在眉睫。近年研究发现补阳还五汤具有抗血小板活化、神经保护、抗氧化、抗炎等作用,在临床抗脑缺血治疗中应用广泛^[13-14];尹天雷通过原位杂交实验发现补阳还五汤能上调磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(P13K/AKT)

阳性细胞表达,其抗脑缺血作用与调节 PI3K/AKT 信号转导表达有关^[15]。PTEN 基因是具有蛋白酯酶与磷酸酶双重生物活性的抑癌基因,能够使 PI3K 产生的第二信使去磷酸化,进而调节 PI3K/AKT 信号通路,干预细胞凋亡过程进而起到神经保护作用^[6,16]。本文研究亦发现在缺血预处理中,补阳还五汤神经保护作用与下调 PTEN 基因有关。

另外,Weng Z 等^[6]研究发现 PTEN 基因缺失会导致血小板数目增多、出血时间缩短,患者易于栓塞,即 PTEN 基因参与了血小板激活过程^[17];不仅如此,PTEN 基因还可通过调节 PI3K/AKT 信号通路调节细胞炎症通路进而减轻脑组织炎症反应^[18]。此外,CD62P 亦可通过与白细胞相互作用参与炎症反应等过程^[19]。因此,本文选用血小板活化标记物 CD62P 检测血小板活化情况,并在神经功能评分基础上检测了 PTEN mRNA 表达情况,探讨补阳还五汤对抗脑缺血再灌注损伤与血小板活化的内在关系,结果发现补阳还五汤预处理能抑制血小板活化并显著降低模型大鼠的神经功能评分,其作用效果与氯匹格雷相似,提示补阳还五汤预处理的神经保护作用可能与其抑制血小板活化有关;另外还发现脑缺血后血小板大量激活,PTEN 基因过度表达,易于出现脑梗后再出血并发症,而补阳还五汤能通过下调过表达的 PTEN 基因而干预 PI3K/AKT 信号通路,进而在调节细胞凋亡与血小板活化的同时,减轻炎症反应造成的组织损伤,表明补阳还五汤神经保护机制可能与下调 PTEN 基因过表达及抑制 CD62P 表达有关,而其主要机制可能通过调节 PI3K/AKT 信号通路,未来笔者将进一步研究补阳还五汤对 PI3K/AKT 信号通路的其他靶点基因的影响。

[参考文献]

[1] Zhang S, Zis O, Ly P T, et al. Down-regulation of MIF by NF kappa B under hypoxia accelerated neuronal loss during stroke[J]. FASEB J,2014,28(10):4394-4407.

[2] Chen Z Y, Cao L, Wang L M, et al. Development of neurotrophic molecules for treatment of neurodegeneration [J]. Curr Protein Pept Sci,2001,2(3):261-276.

[3] 张继平,宫丽,李齐欢,等. 补阳还五汤家兔含药血清对家兔血小板 PAF 受体活性的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(8):688-690.

[4] 高旭光. 2011 版美国心脏协会/美国卒中学会卒中预防指南解读[J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2011,3(3):78-80.

[5] Schattner M. Platelets and galectins [J]. Ann Transl

Med, 2014,2(9):85.

[6] Weng Z, Li D, Zhang L, et al. PTEN regulates collagen-induced platelet activation [J]. Blood,2010,116(14):2579-2581.

[7] 蔡俊,张继平,姚晖,等. 补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):122-126

[8] 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.

[9] 周赛男,蔺晓源,易健,等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):251-254.

[10] 霍勇,陆菊明. 国内外指南推荐阿司匹林用于心脑血管疾病一级预防 [J]. 中华内科杂志,2013,52(10):882-885.

[11] Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, et al. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks [J]. J Neurol,2003,250(1):63-66.

[12] Gurbel P A, Bliden K P, Hiatt B L, et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity [J]. Circulation,2003,107(23):2908-2913.

[13] Mu Q, Liu P, Hu X, et al. Neuroprotective effects of Buyang Huanwu decoction on cerebral ischemia-induced neuronal damage [J]. Neural Regen Res,2014,9(17):1621-1627.

[14] Fan X H, Shi W Z, Cheng Y X, et al. Effects of Buyang Huanwu Decoction on antioxidant and drug-metabolizing enzymes in rat liver [J]. Chin J Nat Med, 2014,12(6):449-454.

[15] 尹天雷,蔡光先,李勇敏,等. 补阳还五汤对脑缺血模型大鼠脑组织 NGF 及 PI3K/AKT 信号转导途径的影响 [J]. 中国中医药科技,2008,15(1):24-25.

[16] 王江友,李浪. PTEN 在心肌缺血/再灌注损伤中的研究进展 [J]. 中国老年学杂志,2013,33(17):4367-4369.

[17] Laurent P A, Severin S, Gratacap M P, et al. Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1 [J]. Adv Biol Regul,2014,54:162-174.

[18] 苏强,李浪. PTEN 与炎症关系的研究进展 [J]. 重庆医学,2014,43(4):494-497.

[19] 曲娟,朱晓东,胡进. 丹红注射液对短暂性脑缺血发作患者 CD62P、CD63 的影响 [J]. 浙江中医杂志,2014,49(9):636-637.

[责任编辑 聂淑琴]