

滋补脾阴方药对大鼠脊髓损伤后 低氧诱导因子-1 α 表达的影响

刘杨*, 苗宇船

(山西中医学院病理学教研室, 太原 030024)

[摘要] 目的:探讨滋补脾阴方药(Zibu Piyin Recipe, ZBPYR)对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗效果以及对低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 的表达的影响。方法:将清洁级 Wistar 大鼠 36 只随机分为假手术组、阳性对照组(喜得镇组, 0.6 mg·kg⁻¹)、SCI 组和 ZBPYR 低、中、高剂量组(分别为 7, 14, 21 g·kg⁻¹)。各组大鼠分别于伤后 72 h 处死,并用 Western-blot 和 RT-PCR 方法检测 HIF-1 α 和 HIF-1 α mRNA 的表达。结果:伤后 72 h, HIF-1 α 和 HIF-1 α mRNA 在 SCI 组的表达量显著高于假手术组、ZBPYR 低、中、高剂量组和阳性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$); HIF-1 α 和 HIF-1 α mRNA 的表达在 ZBPYR 低、中、高剂量组间的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:ZBPYR 可改善受损脊髓局部微环境的缺血缺氧程度来抑制 SCI 后继发性损伤的发生和发展,其作用效果具有浓度依赖性。

[关键词] 脊髓损伤; 滋补脾阴方药; 低氧诱导因子-1 α ; Western-blot; RT-PCR

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0264-03

Influence of Zibu Piyin Recipe on Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α after Spinal Cord Injury in Rats

LIU Yang*, MIAO Yu-chuan

(Pathological Staff Room Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Zibu Piyin Recipe (ZBPYR) on spinal cord injury and the influence on expression of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α . **Method:** Thirty-six adult Wistar rats were divided into six groups randomly: sham operated group, positive control group (hydergin, 0.6 mg·kg⁻¹), ZBPYR low, middle and high dose group (7, 14, 21 g·kg⁻¹), SCI group. The rats were killed at 72 h post-injury. The expression of HIF-1 α and HIF-1 α mRNA was detected with RT-PCR and Western-blot assay. **Result:** At 72 h post-injury, the expression of HIF-1 α and HIF-1 α mRNA in SCI group were higher than that in the other groups ($P < 0.05$), and the expression of HIF-1 α and HIF-1 α mRNA in ZBPYR high, middle and low dose group were different statistically ($P < 0.05$). **Conclusion:** The ZBPYR could improve the function of neurons though improving oxygen-deficiency in local spinal cord tissue after injury.

[Key words] spinal cord injury; Zibu Piyin Recipe; hypoxia inducible factor-1 α ; Western-blot; RT-PCR

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)包括原发性损伤和继发性损伤,继发性损伤,尤其是继发性缺血缺氧损伤在 SCI 的发生发展过程中起重要作用^[1-3]。低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 由 α

和 β 两个亚单位组成,其中 HIF-1 α 是一种主要在低氧条件下表达的真核细胞转录因子,可参与多种与低氧有关的病理生理反应^[4]。本实验旨在通过观察滋补脾阴方药(Zibu Piyin Recipe, ZBPYR)对 SCI 后神经元的 HIF-1 α 表达的影响,探讨 ZBPYR 对神经元的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 HIF-1 α 兔抗大鼠单克隆抗体(Santa Cruz, USA),羊抗兔 IgG(H + L)/HRP 和

[收稿日期] 20120314(019)

[通讯作者] * 刘杨, 博士, 讲师, 损伤病理学, Tel: 13703587447, 0351-2272323, E-mail: syfy2004@163.com

DAB 显色试剂盒(博士德公司,武汉),RNA 提取试剂盒(Invitrogen, USA),RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒和 HIF-1 α , β -actin 基因引物^[4](宝生物工程有限公,大连),滋补脾阴方药(由人参、丹参、山药、白芍、扁豆、茯神等组成^[5])(北京同仁堂股份有限公司,北京),喜得镇(华津制药厂,天津)。BIO-RAD 电泳仪(BIO-RAD, USA),VE-180 微型垂直电泳槽(天能公司,上海),ABI 7500 型 RT-PCR 仪(ABI, USA)。

1.2 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 36 只[山西医科大学实验动物中心提供,合格证号 Scxk(晋)2009-0001],体重 180~200 g,雌雄不拘,每日定量供给饲料和引水,分笼饲养 1 周(温度 20~25℃,湿度 40%~70%)后造模给药处理。

1.3 脊髓损伤模型建立 按文献[4]的方法制作 SCI 模型。术后腹腔注射青霉素(100 U·d⁻¹)抗感染,室温控制在 20~25℃,每日按摩膀胱 2 次至大鼠出现自主排尿为止。

1.4 动物分组 大鼠随机分为 6 组:假手术组(仅行椎板切除术,未进行打击)、阳性对照组(喜得镇,0.6 mg·kg⁻¹)、SCI 组和 ZBPYR 低、中、高剂量组^[6](设定为 7,14,21 g·kg⁻¹),每组 6 只。

1.5 给药和取材 参照文献[6]及预实验结果,ZBPYR 低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠分别于伤后即刻,7,23,35,47,59,71 h 灌胃,SCI 组和假手术组大鼠分别于相同时间等量生理盐水灌胃。各组大鼠分别于伤后 72 h 处死,无菌条件下取损伤节段脊髓组织约 2 cm,液氮保存。

1.6 HIF-1 α mRNA 的 RT-PCR 检测 RNA 提取及 RT-PCR 实验条件设定参见文献[4]。凝胶成像系统扫描图像,BI2000 图像分析系统计算目的条带和内参 β -actin 的积分吸光度,并以二者的比值作为 HIF-1 α mRNA 的相对表达量。

1.7 HIF-1 α 的 Western-blot 检测 常规方法提取总蛋白。12% 分离胶和 5% 浓缩胶恒压电泳,全湿式电转法转移蛋白质,硝酸纤维素膜(NC 膜)经 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 4 h 后,置于 HIF-1 α 兔抗大鼠单克隆抗体溶液(1:1 000 稀释)4℃ 孵育过夜, TBST 溶液洗 3 min×5 次后,NC 膜再于羊抗兔 IgG (H+L)/HRP 溶液(1:1 000 稀释)中孵 4℃ 育 1 h,用 TBST 溶液洗膜 3 min×5 次。以上步骤均在摇床上进行。后进行 DAB 显色,蒸馏水漂洗中止显色反应。采用 BI2000 图像分析系统检测目的条带及内参 β -actin 的吸光度值,并计算其比值作为 HIF-1 α

的相对表达量。

1.8 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件对所得数据进行方差分析和 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α mRNA 的 RT-PCR 检测结果 伤后 72 h,SCI 组 HIF-1 α mRNA 的表达量显著高于假手术组,ZBPYR 低、中、高剂量组和阳性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);HIF-1 α mRNA 的表达在 ZBPYR 低、中、高剂量组间的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 ZBPYR 对 SCI 后大鼠脊髓 HIF-1 α mRNA 和 HIF-1 α 的相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分别	剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1 α mRNA 的 相对表达量	HIF-1 α 的 相对表达量
假手术	-	0.147 ± 0.013 ^{1,2)}	0.247 ± 0.014 ^{1,2)}
喜得镇	0.6 mg·kg ⁻¹	0.202 ± 0.040 ^{1,2)}	0.263 ± 0.049 ^{1,2)}
ZBPYR	21	0.242 ± 0.014 ^{1,2)}	0.352 ± 0.049 ^{1,2)}
	14	0.358 ± 0.024 ¹⁾	0.458 ± 0.047 ¹⁾
	7	0.451 ± 0.049 ^{1,2)}	0.635 ± 0.049 ^{1,2)}
SCI	-	0.553 ± 0.021 ²⁾	0.720 ± 0.036 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$;与 ZBPYR 中剂量组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 HIF-1 α 的 Western-blot 检测结果 伤后 72 h,SCI 组大鼠脊髓中 HIF-1 α 的表达量明显升高,与假手术组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);而 ZBPYR 低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠脊髓中 HIF-1 α 的表达量显著低于 SCI 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中,HIF-1 α 的表达在 ZBPYR 低、中、高剂量组间的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

3 讨论

HIF-1 α 是一种重要的缺氧应答调控因子,能与缺氧反应元件上的特定位点结合,从而启动靶基因的转录,使机体对缺氧产生一系列适应性反应^[7]。在常氧条件下,哺乳动物的心、肺、胎盘、骨骼肌、肾和中枢神经系统等组织内均有 HIF-1 α 的表达,但水平很低,泛素-蛋白酶体系统控制其常氧降解^[8]。低氧时则上述组织中的 HIF-1 α 呈指数式地大量增加^[9]。而在脊髓组织内,前期研究发现,SCI 后,HIF-1 α 及 HIF-1 α mRNA 表达开始升高,其阳性产物可见于脊髓组织中的多种细胞(神经元、胶质细胞、室管膜细胞及间质内的血管内皮细胞),表明

SCI 后受损脊髓组织局部会出现继发性的缺氧损害, HIF-1 α 在脊髓组织多种细胞表达的升高可以起到低氧保护作用^[4]。

祖国医学将因 SCI 所致的外伤性截瘫归属于“体惰”和“痿证”的范畴, 认为治疗 SCI 要以活血化瘀和益气、增加活血为基础, 补肾填精是关键^[10]。肾主骨生精髓, 精髓伤则肾伤, 精血互生, 且肾所生精髓需靠后天之本、气血化生之源的脾胃源源不断地充盈。ZBPYR 由人参、丹参、山药、白芍、扁豆、茯神等药物组成, 具有益气活血、补肾填精、充盈脾胃等功效, 并且已有研究证实, ZBPYR 具有显著的脑神经元保护作用^[11]。本次实验结果显示, SCI 后, 大鼠经 ZBPYR 和阳性药物治疗后, 脊髓组织中 HIF-1 α mRNA 和 HIF-1 α 的表达量均明显低于 SCI 组 ($P < 0.05$), 表明 ZBPYR 可以改善受损脊髓的局部微环境, 增加缺血组织血流灌注和供氧量, 加快受损脊髓局部缺氧的恢复。ZBPYR 对 SCI 后因缺血缺氧所引起的继发性损伤具有保护作用的机制在于其药理学基础, 从其成分构成分析, 人参中的人参皂苷、丹参中的丹参素均具有改善微循环的作用, 能提高组织的抗缺氧和抗凋亡的能力; 而山药、白芍、扁豆、茯神等药物具有益气活血、补肾填精、充盈脾胃等作用, 因此, ZBPYR 可以通过改善受伤脊髓局部血液循环, 降低局部组织由于缺血缺氧而引发的继发性损伤。同时实验结果还显示, 高浓度 ZBPYR 对 HIF-1 α mRNA 和 HIF-1 α 表达的下调作用强于中、低浓度组, 提示 ZBPYR 对 SCI 后脊髓组织缺氧损害的改善效果可能具有浓度依赖性, 因此, ZBPYR 改善 SCI 后局部血液循环的最佳浓度还有待于进一步探讨。

综上, HIF-1 α 在 SCI 后表达开始升高, 并受细胞内氧分压的精确调控。大鼠 SCI 后给予 ZBPYR 灌胃, HIF-1 α mRNA 和 HIF-1 α 表达均下调, 证实 ZBPYR 可以有效地改善 SCI 后脊髓组织微环境的缺血缺氧程度, 从而有效地抑制 SCI 继发性损伤的发生发展, 可以作为 SCI 治疗的一条思路。但 ZBPYR 对脊髓组织缺氧损害的改善效果具有浓度

依赖性, 其最佳效应浓度还有待于进一步探索。

[参考文献]

- [1] Hawryluk G W, Rowland J, Kwon B K, et al. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury [J]. *Neurosurg Focus*, 2008, 25(5): E14.
- [2] 邓凤君, 杨迎暴, 徐江平, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脊髓损伤大鼠炎症因子释放及神经营养因子表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(5): 195.
- [3] Sinescu C, Popa F, Grigorean V T, et al. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury [J]. *J Med Life*, 2010, 3(3): 254.
- [4] 刘杨, 韩艳玲, 刘季, 等. 大鼠脊髓损伤后 HIF- α 基因的表达 [J]. *中国法医学杂志*, 2008, 23(1): 4.
- [5] 战丽彬, 钟军华, 路小光, 等. 滋补脾阴方药含药血清对内质网应激神经元损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(4): 445.
- [6] 王鸿飞, 战丽斌, 郑连杰, 等. 滋补脾阴方药对大鼠脊髓损伤后 IL-1, Caspase-3 表达及细胞凋亡的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(7): 511.
- [7] 刘艳玲, 郑巧楠, 袁明殿. 疏肝活血方促进缺血组织 HIF- α , HGF, VEGF mRNA 表达的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 123.
- [8] Soitamo A J, Rabergh C M, Gassmann M, et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 19699.
- [9] Semenza G L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease [J]. *Respir Res*, 2000, 1(3): 159.
- [10] 任志红, 韦贵康. 中药治疗脊髓损伤的实验研究进展 [J]. *山西中医*, 2003, 19(1): 56.
- [11] 曲明阳, 战丽彬. 滋补脾阴方药对衰老大鼠学习记忆能力的影响及脑内机制 [J]. *中药药理与临床*, 2002, 187(6): 32.

[责任编辑 邹晓翠]