

三化汤对脑缺血再灌注大鼠脑组织胞质附着蛋白表达的影响

樊凯芳¹, 梁晓东², 李晓亮³, 唐迎雪^{2*}

(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 山东中医药大学, 济南 250355;
3. 山西中医学院附属医院, 太原 030024)

〔摘要〕 目的:观察三化汤对脑缺血再灌注大鼠脑组织胞质附着蛋白(ZO-1)表达的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组、模型组、三化汤低、高剂量组(7.2,14.4 g·kg⁻¹)、尼莫地平组(8.1 mg·kg⁻¹)。大鼠常规饲养 3 d 后灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d 后采用线栓法制备脑缺血再灌注大鼠模型。脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后,取脑组织采用免疫组织化学法检测各组大鼠 ZO-1 的表达。结果:与假手术组比,模型组脑组织 ZO-1 表达显著降低($P<0.01$);与模型组比,三化汤高剂量组脑组织 ZO-1 表达显著升高($P<0.01$),尼莫地平组脑组织 ZO-1 表达也明显升高($P<0.05$),三化汤低剂量组脑组织 ZO-1 表达升高不明显,无显著性差异;三化汤高剂量组升高脑组织 ZO-1 表达较尼莫地平组明显($P<0.05$)。结论:三化汤对大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

〔关键词〕 三化汤;脑缺血再灌注;脑组织 ZO-1

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)09-0216-04

The Effect of Sanhua Tang on Expression of ZO-1 in Brain
Tissues of Cerebral Ischemia-reperfusion Rat

FAN Kai-fang¹, LIANG Xiao-dong², LI Xiao-liang³, TANG Ying-xue^{2*}

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030024, China;
2. Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China;
3. The Affiliated Hospital of Shanxi College of TCM, Taiyuan 030024, China)

〔Abstract〕 Objective: To observe the effect of Sanhua Tang on expression of zona occludens-1 (ZO-1) in brain tissues of cerebral ischemia-reperfusion rat. Method: The rats were randomly divided into sham operation group, model group, low dose group of Sanhua Tang, large dose group of Sanhua Tang and nimodipine group. The middle cerebral artery was blocked with suture method to prepare cerebral ischemia reperfusion model. After

〔收稿日期〕 20111031(001)

〔基金项目〕 山东省教育厅资助课题(J06L18)

〔第一作者〕 樊凯芳,博士,主要从事中药及复方的理论和应用研究,Tel:18935153825,E-mail:fankaifang108@163.com

〔通讯作者〕 *唐迎雪,E-mail:doctoryxt@sina.com

73;790.

[3] 孟爱国,刘春艳,马红翠. Radicamine B 体外抑制小肠葡萄糖的吸收作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):217.

[4] Duplexw, Marie-Christine L, David D C, et al. α-Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of Term in alia superba (Combretaceae) [J]. Phytochemistry,2007, 68(15): 2096.

[5] 马会霞,柳月娟,李洁,等. 养精补肾胶囊对糖尿病大鼠肾脏损害的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):156.

[6] 余红,王志路,韩淑英,等. 荞麦种子提取物对 α-糖苷酶及餐后血糖影响的实验研究[J]. 四川中医,2010,28(5):60.

[7] 陈浙江,袁萍,叶晓平. 治疗糖尿病常用中药对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制活性研究[J]. 中成药,2008,30(11):1661.

[8] 滕俊英,邱继红,张月红,等. 苦荞提取物抑制 α-葡萄糖苷酶的作用[J]. 中国临床康复,2006,10(19):92.

〔责任编辑 聂淑琴〕

cerebral ischemia for two hours and reperfusion for twenty-fourth hours, the expression of ZO-1 was detected in every brain tissues by immunohistochemical technique. **Result:** Compared with sham operation group, in model group expression of ZO-1 in brain tissues of cerebral ischemia-reperfusion rat was significantly decreased ($P < 0.01$); compared with model group, expression of zo-1 in brain tissues was significantly increased in large dose group of Sanhua Tang ($P < 0.01$). In nimodipine group the expression of zo-1 was evidently increased ($P < 0.05$). there were no significant differences between model group and low dose of Sanhua Tang. Compared with nimodipine group, the expression of ZO-1 in brain tissues of cerebral ischemia-reperfusion rat was significantly increased in large dose group of Sanhua Tang ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sanhua Tang can protect against injure of cerebral ischemia-reperfusion in rat.

[**Key words**] Sanhua Tang; cerebral ischemia-reperfusion; zona occludens-1 in brain tissues

脑缺血再灌注后引起脑损伤的病理涉及多个方面,其中血脑屏障(BBB)损伤是脑缺血再灌注脑损伤的重要病理生理基础^[1]。而紧密连接(tight junction, TJ)是构成血脑屏障的结构基础,主要由跨膜蛋白、胞质附着蛋白、细胞骨架蛋白组成,其中胞质附着蛋白(ZO-1等)是TJ支持结构的基础,在紧密连接的组成中居于核心地位,其中ZO-1在连接跨膜蛋白与细胞骨架蛋白之间起着重要的中心作用,其水平的下降和活性降低均将影响细胞间紧密连接结构的稳定和细胞功能的完整性。因此,常将脑组织ZO-1蛋白水平作为反应血脑屏障破坏和脑损伤的检测指标。

三化汤出自《素问病机气宜保命集·中风论第十》,为金元医家刘完素所创,方由大黄、枳实、厚朴、羌活组成,是调气开通玄府法治疗中风病之名方,具有宣行气血、通腑开结、调畅气机、开通玄府的作用,临床用于治疗急性中风病取得良好疗效,但其产生作用的具体机制尚不清楚,尤其对脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的保护作用,尚缺乏有效的科学依据。为此,作者通过实验观察三化汤对大鼠脑缺血再灌注后脑组织ZO-1表达的影响,探讨三化汤治疗缺血性脑血管病的作用机制,研究其对血脑屏障的保护作用,为临床应用三化汤及调气开通玄府法治疗急性中风病提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 50只SD雄性大鼠,体重250~300g,由山东中医药大学动物实验中心提供,符合普通实验动物质量标准。生产许可证号SCXK(鲁)20050015。使用许可证号SYXK(鲁)20050043。

1.2 药物

1.2.1 中药 三化汤由大黄、枳实、厚朴、羌活各等分组成。各药均购于山东中医药大学门诊部,经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰老师鉴定,符

合《中国药典》2005年版标准。使用前按传统方法做成水煎液,并浓缩至含生药0.72, 1.44 g·mL⁻¹。

1.2.2 西药对照药 尼莫地平(山东健康药业有限公司,生产批号0501068),使用前用生理盐水溶解成0.81 g·L⁻¹的混悬液。

1.3 仪器 AO切片机(美国光学仪器公司),免疫组化反应盒(福州迈新生物技术开发公司),GZY-DH电热恒温干燥箱(宁波医疗器械二厂),显微镜(美国光学仪器公司),Image Pro Plus图像处理系统(美国Edcybernetic公司),光学显微照相系统(日本Olympus公司)。

1.4 试剂 兔抗大鼠ZO-1多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),生物素化山羊抗兔二抗IgG(北京博奥森生物技术有限公司),DAB显色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),多聚赖氨酸(武汉博士德生物工程有限公司),多聚甲醛(上海太平洋化工集团公司溶剂厂),PBS缓冲液(北京中山生物试剂公司),二甲苯(天津市博迪化工有限公司),中性树胶(上海标本模型厂),苏木素(武汉博士德生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 分组 实验动物按随机数字表分为假手术组、模型组、三化汤低、高剂量组、尼莫地平组,每组10只。

2.2 给药方法 动物常规饲养3d后进行预防性给药,药物剂量按人鼠体表面积折算等效比率计量表^[2],计算出大鼠的等效剂量。三化汤低、高剂量组(7.2, 14.4 g·kg⁻¹)ig;尼莫地平组给予等效剂量8.1 mg·kg⁻¹ig;各给药组ig体积均为10 mL·kg⁻¹,假手术组、模型组大鼠给予10 mL·kg⁻¹ig生理盐水。各组均为每日1次,连续7d。于末次给药后24h进行大鼠脑缺血再灌注模型的建立。

2.3 大鼠脑缺血再灌注模型建立与评估

2.3.1 模型建立方法 参照 ZeaLonga 等^[3] 人的线栓法。将直径约 0.22 ~ 0.28 mm 的渔线沿右侧颈总动脉(CCA)分叉处插入颈内动脉(ICA)约 17 ~ 18 mm,阻断大鼠大脑中动脉(MCA),形成 MCA 供血中断,缺血 2 h 后拔出线栓约 15 mm 形成大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型(简称 MCAO),再灌注 24 h 后处死动物进行观察。假手术组渔线插入 CCA 深度为 5 mm,其余操作均同手术组。

2.3.2 模型评估 采用神经功能行为学和组织学进行评估。神经功能行为学按照 Zealonga 5 级法对大鼠的神经功能行为进行评分^[3]。0 分:无神经系统损伤症状;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。组织学采用 TTC 染色法:将脑组织从额极至枕叶连续冠状切面,厚约 3 mm,共 5 层,将厚脑片置于 2% TTC 溶液中染色,37 ℃ 孵育 30 ~ 60 min,然后置于 4% 多聚甲醛溶液,4 ℃ 固定。TTC 染色的检测标准:红色区域为正常脑组织,白色区域为缺血脑组织。

2.4 标本采集与实验步骤

2.4.1 标本采集 缺血 2 h 再灌注 24 h 后,各组大鼠用 10% 水合氯醛过量麻醉,迅速断头取脑后置于 4% 多聚甲醛内固定,以备切片使用做免疫组化染色。

2.4.2 免疫组织化学法检测各组大鼠脑组织 ZO-1 的表达 从 4% 多聚甲醛中取出脑组织至水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋操作。用病理组织切片机将鼠脑标本切成 5 μm 厚薄片,经防脱片处理过的载玻片捞片,60 ℃ 烘片 1 ~ 2 h。常规脱蜡,水化。3% H₂O₂ 孵育 5 ~ 10 min,消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗,3 min × 3 次。抗原修复:将切片浸 0.01 mol·L⁻¹枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),置于高压锅中加热沸腾 5 ~ 10 min 后,自然冷却至室温,反复 2 次。PBS 缓冲液冲洗,2 min × 3 次。滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗。滴加适

当比例稀释的兔抗大鼠 ZO-1 多克隆抗体,4 ℃ 过夜。PBS 缓冲液冲洗,2 min × 3 次。滴加生物素化山羊抗兔二抗 IgG,室温孵育 20 min。PBS 缓冲液冲洗,2 min × 3 次。滴加试剂 SABC,室温孵育 20 min。PBS 缓冲液冲洗,5 min × 4 次。DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A,B,试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,自来水及时终止反应。苏木素轻度复染,自来水冲洗,盐酸乙醇分化,自来水冲洗。中性树胶封片。

2.4.3 观察指标 光学显微镜下选择大鼠缺血侧皮层,以细胞浆内出现棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性细胞,每张切片高倍镜下随机观察 5 个不同的视野,计算阳性细胞数,取平均值。再应用 Image Pro Plus 图像分析仪测量阳性细胞表达的积分吸光度(IA)。IA 为所测结构范围内各像素吸光度之和,可反映所测结构的吸光度与面积的综合变化。

2.5 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对神经功能缺损评分的影响 假手术组大鼠术后无神经缺损体征出现,神经功能缺损评分均为 0 分。模型组大鼠均出现较严重的神经缺损症状;与模型组比较,各用药组均明显降低大鼠神经功能缺损症状($P < 0.05$),各用药组之间无显著性差异。见表 1。

3.2 对脑组织 ZO-1 表达的影响 与假手术组比,模型组脑组织 ZO-1 表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比,三化汤高剂量组脑组织 ZO-1 表达显著升高($P < 0.01$),尼莫地平组脑组织 ZO-1 表达也明显升高($P < 0.05$),三化汤低剂量组脑组织 ZO-1 表达升高不明显,无显著性差异;三化汤高剂量组升高脑组织 ZO-1 表达较尼莫地平组明显($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三化汤对大鼠神经功能缺损评分及脑组织 ZO-1 表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	神经功能缺损评分	ZO-1 阳性细胞数/个	积分吸光度/×10 ³
假手术	-	0 ¹⁾	40.17 ± 2.98 ¹⁾	69.06 ± 2.41 ¹⁾
模型	-	2.67 ± 0.97	21.85 ± 2.84	4.76 ± 0.27
三化汤	7.2	1.67 ± 0.69 ³⁾	24.44 ± 2.05 ³⁾	5.08 ± 0.34 ³⁾
	14.4	1.61 ± 0.78 ³⁾	33.69 ± 3.85 ¹⁾	33.45 ± 12.56 ¹⁾
尼莫地平	0.008 1	1.50 ± 0.86 ¹⁾	25.44 ± 3.53 ^{2,3)}	13.19 ± 0.61 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与三化汤高剂量组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

脑缺血再灌注引起脑损伤的病理涉及多个方面,其中血脑屏障(BBB)损伤是脑缺血再灌注脑损伤的重要病理生理基础。研究显示,缺血性脑损害时血脑屏障的结构和功能发生相应的变化,血脑屏障的破坏反过来又影响脑缺血的病理生理过程,两者密切相关。减轻脑缺血再灌注后血脑屏障的损伤,可能是防治脑卒中后继发性再灌注脑损伤的重要手段。BBB是存在于脑组织和血液之间的一个复杂的细胞系统,它能控制血循环中的某些物质向中枢神经组织转运,也能将中枢神经组织内有害或过剩物质排出脑外,从而保证中枢神经组织内环境的稳定,其基本结构包括:脑毛细血管内皮细胞及其间的紧密连接,毛细血管基底膜及嵌入其中的周细胞和星形胶质细胞终足形成的胶质膜。紧密连接是构成血脑屏障的结构基础,主要起屏障和粘连作用,组成血脑间物质交换的第一道屏障。它由数种蛋白质组成:occludin, claudins, junctional adherence molecules(JAM),zonula occludin-1(ZO-1),前3者是跨膜蛋白,通过ZO-1将它们连接于细胞骨架上,所以ZO-1在紧密连接的组成中居于核心地位^[4]。石向群等^[5]发现ZO-1水平在脑缺血再灌注损伤后6h即发生明显的降低,随后急速降低,表明毛细血管内皮细胞紧密连接完整性在再灌注损伤早期即受到破坏,提示ZO-1蛋白水平的变化可作为血脑屏障破坏的标志。而在高温条件下,体外血脑屏障模型中的紧密连接结构蛋白ZO-1大量减少,使得内皮细胞间不能形成紧密连接复合体,血脑屏障紧密连接性受到破坏^[6]。因此,脑缺血再灌注后ZO-1蛋白水平可反应血脑屏障的通透性。本实验通过免疫组化法检测脑组织ZO-1的表达,结果显示:模型组脑组织zo-1表达较假手术组显著降低;三化汤高剂量组脑组织zo-1表达较模型组显著升高,尼莫地平组脑

组织zo-1表达也明显升高,三化汤低剂量组脑组织zo-1表达升高不明显;三化汤高剂量组升高脑组织zo-1表达较尼莫地平组明显。说明脑缺血再灌注引起的BBB损伤可能与构成BBB紧密连接结构的胞质附着蛋白ZO-1的表达减少有关,而三化汤高剂量可通过增强ZO-1蛋白的表达而减轻对BBB的结构损伤,从而对脑缺血再灌注脑损伤起到一定的保护作用,为临床应用三化汤和调气开通玄府法治疗急性中风病提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] Fu Jimura M, Gache Y, Moritar Fu Jimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion[J]. Brain Res, 1999, 842(1):92.
- [2] 陈奇,王建华. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:33.
- [3] 孟宜良. 线栓法大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型研究现状[J]. 国外医学:神经病学神经外科学分册, 2002,2(29):113.
- [4] Antonetti D A, Barber A J, Hollinger L A, et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occluding and zonula occluden-1. A potential mechanism for vesicular permeability in diabetic retinopathy and tumors[J]. J Biol Chem, 1999, 274(33):23463.
- [5] 石向群,杨金升,石莉,等. 伊文思蓝、ZO-1评估血脑屏障损伤的应用研究[J]. 西北国防医学杂志, 2004, 25(5):329.
- [6] 陈伟招,徐如祥,黄柒金,等. 高温对血脑屏障内皮细胞的影响[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1):21.

[责任编辑 聂淑琴]