

柴胡疏肝散对卒中后抑郁大鼠海马组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

樊蔚虹^{*}, 姚建平, 赵文景
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察卒中后抑郁症(PSD)模型大鼠海马神经元凋亡相关基因表达的变化及柴胡疏肝散的干预作用, 从细胞分子水平探索柴胡疏肝散治疗机制。方法: 健康雄性 SD 大鼠 100 只, 随机分为 3 组, 即柴胡疏肝散治疗组、PSD 模型组和正常组。除正常组外, 其余 2 组首先线栓法制备局灶性脑缺血大鼠(MCAO)模型, 并按 longa 评分标准进行评分, 手术 1 周后开始复合制备 PSD 大鼠模型, 同时柴胡疏肝散组($7.875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), ig 21 d, 模型组蒸馏水 ig。免疫组化法检测大鼠海马组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组 Bax 蛋白阳性表达升高, Bcl-2 蛋白表达下降($P < 0.01$); 柴胡疏肝散组与模型组比较, 则明显下调 Bax 蛋白表达($P < 0.01$), 上调 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.01$)。结论: 柴胡疏肝散可通过下调 Bax、上调 Bcl-2 蛋白的表达而抑制神经细胞凋亡, 从而发挥对 PSD 的治疗作用。

[关键词] 柴胡疏肝散; 卒中后抑郁; 海马神经元; 基因表达

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0181-04

Influence of Bupleurum Liver-Coursing Powder on Expression of Bax and Bcl-2 Proteins in Rats with Post-stroke Depression

FAN Wei-hong^{*}, YAO Jian-ping, ZHAO Wen-jing

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: To observe the post-stroke depression(PSD) model of rat and hippocampal neuronal apoptosis related gene expression changes, and the intervention of Bupleurum Liver-Coursing Powder on for PSD and the molecular mechanism. **Method:** One hundred male SD rats were randomly divided into the following 3 groups: Bupleurum Liver-Coursing Powder group, PSD model control group and normal control group. Except the normal control group, at first the other two groups were set up middle cerebral artery occlusion(MCAO) rat model, neurological recovery of stroke rat was assessed by Longa grades standard test. A week after surgery, we re-establish PSD composite rat model, while Bupleurum Liver-Coursing Powder group ($7.875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was fed 21 days with the drugs, PSD model control group was fed distilled water. Immunohistochemical staining detect Bcl-2 and Bax protein expression in hippocampus. **Result:** Compared with the normal control group, Bax protein expression in PSD model group was increased, but Bcl-2 protein decreased($P < 0.01$); Compared with the PSD model group, Bupleurum Liver-Coursing powder group was significantly reduced in Bax protein expression ($P < 0.01$) and increased in Bcl-2 protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bupleurum Liver-Coursing Powder may play a role in the treatment of PSD through inhibiting the apoptosis by means of intervention with reduced Bax protein expression and increased the expression of Bcl-2 gene.

[Key words] Bupleurum Liver-Coursing Powder; post-stroke depression; hippocampal neurons; gene expression

[收稿日期] 2010-09-08

[基金项目] 河南省中医管理局继承与创新专项(HNZY0702-1); 郑州市科技攻关项目(10PTGS485-5)

[通讯作者] * 樊蔚虹, 教授, 研究方向: 常见证候规范化研究, Tel: 0371-65949704, E-mail: fwHong111@126.com

卒中后抑郁症 (post-stroke depression, PSD) 是一种常见的卒中后并发症。本研究以大鼠 PSD 为模型,探索大鼠海马凋亡相关基因表达变化及柴胡疏肝散治疗抑郁症的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 雄性大鼠, 5~6 月龄, 体重 (300 ± 20) g, 100 只。由河南省实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(豫) 2005-0001。普通饮食、饮水, 室温 18~25℃, 相对湿度 60%~70%, 自然昼夜光照。

1.2 药物和试剂 柴胡疏肝散参照中国中医药出版社第 7 版《中医方剂学》教材, 柴胡 6 g, 陈皮 6 g, 川芎 4.5 g, 香附 4.5 g, 枳壳 4.5 g, 芍药 4.5 g, 炙甘草 1.5 g, 按原方比例制成浸膏(由河南中医学院一附院制剂室制备, 批号 20090321), 用蒸馏水稀释为含生药 1 g·mL⁻¹, 大鼠按生药量 7.875 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig(相当于 60 kg 成人剂量的 15 倍); 注射用青霉素钠, 华北制药股份有限公司, 批号 S0903307; 兔抗大鼠 Bax 抗体 (1:100 兔多克隆, 美国 Santa Cruz); 兔抗大鼠 Bcl-2 抗体 (1:100 兔多克隆, 美国 Santa Cruz); 山羊血清封闭液、ABC 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 AR0009, 572054A); DAB 显色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 375230A)。

1.3 仪器 光学显微镜, HM4440E (Walldorf, Germany); Lecia 显微照像系统 (德国); 病理图像分析系统, Biosens Digital Imaging System v1.6 (上海山富科学仪器有限公司); 自动切片机, LEICARM2145 (德国); 电热恒温干燥箱, DHG-9031 (上海); BS224S 电子天平, (220 g/0.1 mg 德国)。

2 方法

2.1 分组、造模、给药 大鼠适应性喂养 1 周, 随机分为 3 组: 柴胡疏肝散组、PSD 模型组各 40 只, 正常对照组 20 只。

大鼠局灶性脑缺血 (MCAO) 模型的制备 手术参照谢婷方法^[1]改进, 所有手术 2 d 内完成。

PSD 大鼠模型的复合制备 MCAO 大鼠在清醒后移入小鼠笼内进行 28 d 孤养, 在卒中后第 8 天 (神经功能缺损已基本恢复) 相继给予共 21 d 的中度不可预测应激刺激处理。柴胡疏肝散组在应激开始同时 ig, 1 次/d, PSD 组蒸馏水 ig, 共 21 d。应激刺激参考文献[2]改进, 电击足底、冰水游泳、热应激、摇晃、夹尾、禁水、禁食及昼夜颠倒, 共 8 种刺激, 每

日随机安排 1 种刺激方式, 整个刺激实验期间每种刺激给予 1~3 次。

2.2 指标检测

2.2.1 取材及制片 造模、治疗结束后, 10% 水合氯醛 350 mg·kg⁻¹ ip 麻醉大鼠, 仰卧固定, “V”字形迅速开胸, 充分暴露心脏, 将灌注针头从左心尖部插入升主动脉, 同时迅速剪开右心耳, 以 37℃ 生理盐水 250~400 mL 左心室加压灌注, 待从右心耳流出液变为无色后, 继续以 4℃ 预冷的 4% 的多聚甲醛溶液 200~250 mL 左心室加压灌注, 至大鼠四肢肌肉抽搐停止, 改为缓慢滴灌, 整个灌注时间约 20 min。然后断头取脑, 脑组织在 4℃ 4% 的多聚甲醛溶液固定 24 h。取右侧海马, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明浸蜡、包埋、切片, 片厚 5 μm。切片贴于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 置 37℃ 烤箱 48 h, 4℃ 保存备用。

2.2.2 免疫组化流程 将切片置于二甲苯 2 次, 20 min/次; 100% 乙醇 10 min; 95% 乙醇 5 min; 90% 乙醇 5 min; 80% 乙醇 5 min; 70% 乙醇 5 min; 蒸馏水冲洗 2~3 次; PBS (0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4, 下同) 漂洗 3 次, 每次 5 min; 3% 过氧化氢 (甲醇稀释), 常温下孵育 20 min; 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 5 min; PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 0.1 mol·L⁻¹ 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 微波修复 10 min, 自然冷却; 滴加 A 液 50 μL, 湿盒内 37℃ 温箱孵育 20 min; 甩除羊血清, 不冲洗; 分别加入兔抗大鼠 Bax 抗体 (1:100)、兔抗大鼠 Bcl-2 抗体 (1:100) 50 μL, 4℃ 冰箱孵育过夜; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 B 液 50 μL 于对应的切片上, 湿盒内 37℃ 温箱孵育 30 min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 C 液 50 μL, 湿盒内 37℃ 温箱孵育 30 min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 用 0.05% DAB-0.01 过氧化氢显色 2 min; 自来水终止显色; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明 3 次, 10 min/次; 中性树脂胶封片, 光镜观察。对照组用 PBS 代替 Bcl-2, Bax 等抗蛋白血清, 其余步骤相同。

2.2.3 阳性结果观测 经 DAB 显色后, 细胞中出现棕黄色反应产物者为 Bcl-2, Bax 免疫阳性。每组取 6 张片, 用显微照像系统对海马脑组织切片进行观察、照相, 每张片取 5 个视野 (×400), 图像分析系统计算阳性面积 (%) 和吸光度 (A)。

2.3 统计学方法 数据处理采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 柴胡疏肝散对 PSD 大鼠海马 Bax 蛋白表达的影响 各组 Bax 蛋白均有阳性表达。模型组呈强阳性表达, 柴胡疏肝散组次之, 正常组表达最弱, 3 组两两比较, 其 Bax 蛋白表达均有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 1 柴胡疏肝散对 PSD 大鼠海马 Bax 表达的影响 (柳±s, n=6)

	剂量 /g·kg ⁻¹	阳性面积 /%	A
正常	-	5.32 ±2.05 ¹⁾	94.89 ±2.79 ¹⁾
模型	-	47.92 ±9.35	137.89 ±11.37
柴胡疏肝散	7.875	26.58 ±6.24 ¹⁾	112.84 ±7.09 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 柴胡疏肝散对 PSD 大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达的影响 各组 Bcl-2 蛋白均有阳性表达。模型组表达最弱, 柴胡疏肝散组呈强阳性表达, 已接近正常组水平, 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 柴胡疏肝散对 PSD 大鼠海马 Bcl-2 表达的影响 (柳±s, n=6)

	剂量 /g·kg ⁻¹	阳性面积 /%	A
正常	-	18.55 ±4.20 ¹⁾	118.24 ±4.18 ¹⁾
模型	-	11.26 ±5.72	101.40 ±4.20
柴胡疏肝散	7.875	16.85 ±7.43 ¹⁾	111.86 ±9.55 ¹⁾

4 讨论

新近的观点认为抑郁症的发生与海马神经细胞的萎缩、丢失及再生障碍有密切的关联。慢性应激可选择性损害海马, 导致海马神经元细胞的丢失、树突萎缩等^[3]。细胞凋亡是一种程序性的细胞死亡过程, 是多细胞生物体重要的生理机制, 对维持机体正常发育和内环境稳定起重要作用。Lucassen 等^[4]研究发现, 慢性心理社会应激可导致海马不同区域神经细胞凋亡。动物实验、临床和流行病学资料提示, 慢性应激与抑郁症的发病密切相关^[5-6], 其中, 海马神经元的损伤可能是诱发抑郁症的器质性基础^[7]。持续时间长、危害大的有害因素可加速细胞凋亡, 导致各种疾病的发生。因此, 推测海马神经元凋亡可能是慢性应激长期损伤海马的作用机制之一。

Bcl-2 和 Bax 是两个重要的凋亡相关基因, 前者抑制细胞凋亡, 而后者促进细胞凋亡, 并且 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的比例是决定细胞凋亡与否的关键^[8]。Bcl-2 本身的活性受相关蛋白 Bax 的调节, Bax 增高, 促进细胞凋亡; Bcl-2 增高, 抑制细胞凋亡。Bax 不仅能和 Bcl-2 形成二聚体 (Bcl-2-Bax) 抑

制凋亡, 而且其自身还能形成二聚体 (Bax-Bax) 诱导凋亡。Bax/Bcl-2 的比例决定了细胞对凋亡刺激的敏感性, 最终决定了细胞的生存和死亡。在慢性应激过程中, 多种神经元保护机制缺失, 神经元细胞凋亡的活跃, 造成脑损害, 进而导致抑郁症的产生^[9]。

本实验结果表明, 与正常组对比, PSD 模型组大鼠海马 Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与 PSD 模型组相比, 柴胡疏肝散组大鼠海马 Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。说明慢性应激引起的大鼠海马细胞凋亡基因 Bax, Bcl-2 蛋白表达变化可能是导致大鼠抑郁症发生的机制之一, 而柴胡疏肝散对大鼠海马 Bax, Bcl-2 蛋白表达的调节可能有助于改善大鼠抑郁状态。

[参考文献]

- [1] 谢婷, 赵琰, 屈会化, 等. 一种新的线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血模型方法 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(2): 80.
- [2] Katz R J, Roth K A. Acute and chronic stress effects on open-field activity in the rat: Implications for a model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 247.
- [3] Magarinos A M, McEwen B S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: comparison of stressors [J]. Neuroscience, 1995, 69(1): 83.
- [4] Lucassen P J, Volmann-Honsdorf G K, Gleisberg M, et al. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew [J]. Eur J Neuroscience, 2001, 14(1): 161.
- [5] Lopez J F, Akil H, Watson S J. Neural circuits mediating stress [J]. Bio Psychiatry, 1999, 46(11): 1461.
- [6] McEwen B S. Stress and hippocampal plasticity [J]. Annu Rev Neurosci, 1999, 22: 105.
- [7] Hayley S, Poulter M O. The pathogenesis of clinical depression: stressor and cytokine induced alterations of neuroplasticity [J]. Neuroscience, 2005, 135(3): 659.
- [8] Green D R, Reed J C. Mitochondrial and apoptosis [J]. Science, 1998, 281: 1309.
- [9] 叶静, 刘协和, 邓红, 等. -淀粉样多肽诱导神经元凋亡和 caspase-3 蛋白表达的研究 [J]. 中国神经精神病杂志, 2003, 29(6): 465.

[责任编辑 何伟]

蒙药忠伦阿汤的抗炎镇痛作用及对胶原诱导关节炎大鼠足肿胀的影响

李林¹, 高自立², 屈爱桃², 董秋梅^{1*}

(1. 内蒙古医学院中医学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医学院, 呼和浩特 010110)

[摘要] 目的: 研究蒙药忠伦阿汤的抗炎镇痛作用及对胶原诱导关节炎大鼠模型足肿胀的影响, 为进一步的临床推广应用提供依据。方法: 以蒙药忠伦阿汤 1.4, 0.7, 0.35 g·kg⁻¹ ig 小鼠, 观察动物对二甲苯致耳肿胀、热板试验和扭体试验的反应, 证实其抗炎镇痛作用; 建立 Ⅰ型胶原诱导关节炎(Collagen induced arthritis CIA)大鼠模型, 观察忠伦阿汤 1.8, 0.9, 0.45 g·kg⁻¹ ig, 60 d 对模型大鼠足肿胀的影响。结果: 不同剂量的忠伦阿汤对小鼠耳廓肿胀、热板试验和扭体试验均有明显的抑制作用; 对 Ⅰ型胶原诱导关节炎大鼠的足肿胀有显著的改善。结论: 蒙药忠伦阿汤有明确的抗炎镇痛作用, 并能抑制胶原诱导关节炎大鼠的足肿胀, 具有较好的抑制免疫炎症的作用。

[关键词] 忠伦阿汤; 抗炎; 镇痛; 药理作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)03-0184-03

蒙药忠伦阿汤, 别名合日呼-5 汤, 忠伦 5 汤, 五味润僵汤。是蒙医验方三子汤加上苦参、地格达(或当药)组成, 最早记载于蒙医《四部医典》-《秘诀部》, 距今有 1 000 多年的历史。具有清热、凉血、舒筋、止痛的功能, 用于蒙医常见的热性黄水病, 游痛证, 痛风, 陈旧热, 内热等, 其症状和病程相当于现代医学的类风湿关节炎(RA)。国内已有报道, 临床应用忠伦阿汤加减的类方在治疗 RA 等风湿病方面具有一定疗效^[1]。本课题观察了忠伦阿汤的抗炎镇痛作用及对胶原诱导关节炎大鼠的足肿胀的影响。

1 材料

1.1 药物 忠伦阿汤散, 内蒙古中蒙医院制剂室提供(批号 Z20081216); 雷公藤多苷片, 黄石飞云制药有限公司, (批号 Z42021212); 二甲苯, 天津科盟化工工贸有限公司; 36% 冰醋酸, 天津风船化学制剂有限公司; 牛源性 Ⅰ型胶原, 10 mg/支, Sigma 公司。

1.2 仪器 电子天平, 内蒙古医学院教学专用设备; RB-200 智能热板仪, 成都泰盟科技有限公司。

1.3 动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重(20 ±5) g, 清洁级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重(150 ±20) g, 由内蒙古大学动物试验中心提供, 适应性饲养 1 周后用于试验。

2 方法

2.1 抗炎试验 二甲苯致小鼠耳廓肿胀试验 取体重(25 ±5) g 小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 即空白(生理盐水)组; 忠伦阿汤高剂量(1.4 g·kg⁻¹)组; 忠伦阿汤中剂量(0.7 g·kg⁻¹)组; 忠伦阿汤低剂量(0.35 g·kg⁻¹)组; 雷公藤片(0.98 g·kg⁻¹)组。每组 10 只。均 ig, 1 次/d, 共 7 d。末次药后 30 min, 取 0.1 mL 二甲苯涂于各组鼠右耳前后两面致炎。1 h 后, 将小鼠颈椎脱臼处死, 剪下两耳, 用直径 8 mm 的打孔器分别在两耳同一部位打下圆耳片, 迅速称质量, 每鼠右耳片减去左耳片质量即为耳片炎症肿胀度。

2.2 镇痛试验

2.2.1 扭体试验 取体重(25 ±5) g 小鼠 50 只, 雌雄各半, 按体重均分为 5 组, 分组、给药剂量、时间同 2.1。末次给药 30 min 后, ip 0.7% 醋酸溶液 0.2 mL/只, 观察并记录 40 min 内各小鼠的扭体次数。

2.2.2 热板试验 取体重(25 ±5) g 小鼠 50 只, 雌雄各半, 基础痛阈在 30 s 内的小鼠, 按体重分为 5 组, 分组、给药剂量和时间同 2.1。末次药后 30, 60, 90, 120 min 测定各鼠痛阈, 60 s 仍不舔后足者, 立即

[收稿日期] 2010-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860383)

[第一作者] 李林, 教授, 研究方向: 风湿病, Tel: 13947185566, E-mail: lilin5566888@163.com

[通讯作者] * 董秋梅, 教授, 研究方向: 风湿病, Tel: 0471-6657605, E-mail: d. qium@163.com