

# 活血熄风方对局灶性脑缺血大鼠 神经细胞凋亡及基因蛋白蛋白表达的影响

高红莉<sup>1\*</sup>, 刘昭纯<sup>2</sup>, 曲晓兰<sup>1</sup>

(1. 泰山医学院药学院, 泰安 271016; 2. 山东中医药大学基础医学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 观察活血熄风方对局灶性脑缺血模型大鼠神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。方法: Wistar 雄性大鼠 40 只随机分为 5 组: 假手术组、模型组、活血熄风方治疗组(剂量分别为 20, 10, 5 g · kg<sup>-1</sup>)。用光化学法建立局灶性脑缺血大鼠模型, 造模前 ig 给药 7 d, 造模后 24 h 取材, 用 TUNEL 法检测神经细胞凋亡数目, 免疫荧光与激光共聚焦技术检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达。结果: 与模型组比较, 活血熄风方各剂量组 TUNEL 阳性细胞数明显减少, Bcl-2 蛋白表达升高, Bax 蛋白表达降低, Bcl-2/Bax 比值增高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论: 活血熄风方具有明显的抗凋亡作用, 其作用机制可能与增加 Bcl-2 蛋白表达, 降低 Bax 蛋白表达, 提高 Bcl-2/Bax 比值有关。

[关键词] 活血熄风方; 细胞凋亡; 基因蛋白; 局灶性脑缺血

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0074-03

## Effects of Huoxue Xifeng Recipe on Neuronal Apoptosis and the Expression of Bcl-2 and Bax Protein after Focal Cerebral Infarction in Rats

GAO Hong-li<sup>1\*</sup>, LIU Zhao-chun<sup>2</sup>, QU Xiao-lan<sup>1</sup>

(1. Pharmacy Department, Taishan Medical College, Taian 271016, China; 2. School of Basic Medical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the effects of Huoxue Xifeng recipe (HXR) on neuronal apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax protein in brain tissue after focal cerebral infarction (FCI) in rats. **Methods:** 40 Wistar male rats were randomly divided into five groups: sham group, model group, HXR group (20, 10, 5 g · kg<sup>-1</sup> as high, moderate and low dose respectively). The model of FCI was established based on the principle of photo-chemical initiation of thrombosis. Intra-gastric administration of HXR continued 7 days before modeling and stopped the administration 24 h after the modeling. TUNEL technique was used to examine neuronal apoptosis, immunohistochemical and confocal laser scanning microscope methods to examine the expression level of Bcl-2 and Bax protein in brain tissue. **Results:** Compared with the model group, the apoptosis of neural cells and the expression of Bax protein significantly decreased in the HXR groups. However, the expression of Bcl-2 protein and Bcl-2/Bax ratio increased significantly ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** HXR has a action of resisting neuronal apoptosis for FCI in rats, the mechanism of neuroprotection may be related to increase in Bcl-2 expression, decrease in Bax expression and increase in Bcl-2/Bax expression ratio.

**[Key words]** Huoxue Xifeng recipe (HXR); apoptosis; Bcl-2; Bax; focal cerebral infarction

[收稿日期] 2009-07-27

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(2008ZRBO1146)

[通讯作者] \* 高红莉, Tel: (0538) 6239751; E-mail: ghl007@163.com

近年来研究表明,神经细胞凋亡与脑缺血性损伤有着密切关系,细胞凋亡可能受相关凋亡基因调控。活血熄风方是治疗中风的新组方,经临床验证疗效满意。实验证实活血熄风方具有脑保护作用<sup>[3]</sup>。本实验采用 TUNEL 法来观察局灶性脑缺血大鼠神经细胞的凋亡情况,用免疫荧光法和激光共聚焦技术研究凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达及活血熄风方的干预作用,来探讨活血熄风方抗神经细胞凋亡的作用机制。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 200 ~250 g,山东鲁抗医药有限公司提供,合格证号:SCXK(鲁)20050017。

**1.2 药物与试剂** 活血熄风方,由当归、红花、川芎、水蛭等药物组成,蒸馏水浸泡 1 h,水煎 2 次,每次 30 min,两次煎液混匀,旋转蒸发仪分别浓缩至含生药 2, 1, 0.5 g · mL<sup>-1</sup>, 4 ℃ 保存备用。Bcl-2、Bax 兔多克隆抗体, FITC 标记羊抗兔 IgG(北京中杉), TUNEL 试剂盒(美国 Roche 公司);玫瑰红(美国 Sigma)。

**1.3 仪器** 主要仪器:激光共聚焦显微镜(Radiance 2100 型,美国 BIO-RAD 公司);冷冻切片机(Leica CM1900 型,德国 Leica 公司);IPP 图像采集分析系统(美国 Media Cybernetics 公司);立体定位仪(美国 Stoelting 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 大鼠随机分为 5 组:假手术组、模型组、活血熄风方高、中、低剂量组,每组 8 只。各组均手术造模,假手术组股静脉注射生理盐水,其余操作同模型组。各组造模前 ig 给药连续 7 d,活血熄风方高、中、低剂量组分别给予活血熄风方 20, 10, 5 生药 g · kg<sup>-1</sup>,假手术组和模型组给予等体积蒸馏水 ig。1 次/d,末次给药 1 h 后造模。

**2.2 局灶性脑缺血性大鼠模型的制备** 根据 Watson 等<sup>[4]</sup>的方法略加改动,具体操作如下:室温 25 ℃ 条件下,雄性 Wistar 大鼠 10% 水合氯醛(0.35 g · kg<sup>-1</sup>)麻醉,立体定位仪固定大鼠头部,常规消毒后,沿头正中切口分离至暴露完整的颅骨,以矢状缝右侧 3 mm,冠状缝后 3 mm 为中心用牙科平钻开直径约 6 mm 的骨窗,去除颅骨表层骨板,保留下层骨板及硬脑膜,经股静脉缓慢注入 5% 玫瑰红 80 mg · kg<sup>-1</sup>,时间为 1 min,注射结束 5 min 后用冷光源照射

骨窗 20 min。

**2.3 脑组织处理及切片** 大鼠造模后 24 h,麻醉后快速开胸经心脏灌注生理盐水,然后以 4% 多聚甲醛内固定,完整取脑,在 4% 多聚甲醛液中固定 6 h,蔗糖梯度脱水,0CT 包埋,液氮速冻后, -70 ℃ 保存备用。标本置冰冻切片机上作脑组织冠状连续切片,片厚为 6 μm。

**2.4 TUNEL 法原位检测神经细胞凋亡** 采用 TUNEL 法原位标记 DNA 片段检测凋亡细胞,具体步骤严格按试剂盒说明, DAB 显色。光镜下观察细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞,每张切片在高倍镜(40 ×10)下选取缺血周边区典型的不重叠的 10 个视野摄片,采用 IPP 图像采集分析系统计数阳性细胞数,取平均值。

**2.5 免疫荧光与激光共聚焦技术检测局灶性脑缺血大鼠脑组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达** 冰冻切片进行常规免疫荧光染色。应用激光扫描共聚焦显微镜操作系统的 Ar 通道激光系统,扫描 FITC 标记的阳性反应物,扫描选用的参数为:激发光波长为 488 nm,观测光为 518/30 nm,物镜为 60 倍,扫描方式为点扫描, Zoom 为 1.0。经 Lasersharp2000 软件(4.5.3)摄像分析。每组切片在高倍油镜(60 ×10)下选取缺血周边区典型的不重叠的 10 个视野摄像,计数阳性细胞数及测量荧光强度,进行统计分析。

**2.6 统计学处理** 所有数据均以(̄x±s)表示,应用 SPSS13.0 软件进行处理。各组间比较采用单因素方差分析,以 P<0.05 为具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 TUNEL 染色结果** 假手术组几乎没有 TUNEL 阳性细胞出现;模型组则在脑梗死皮层发现大量的 TUNEL 阳性细胞,主要集中于半暗带区,呈半球状向四周放射样扩展,其数目明显高于假手术组(P<0.01)。而活血熄风方各剂量组的阳性细胞数与模型组比较则有明显下降(P<0.01)。见表 1。

表 1 对局灶性脑缺血大鼠脑神经细胞 TUNEL 表达的影响(̄x±s, n=8)

| 组别    | 剂量/(g · kg <sup>-1</sup> ) | TUNEL 细胞数                 |
|-------|----------------------------|---------------------------|
| 假手术组  | —                          | 1.67 ±0.42 <sup>2)</sup>  |
| 模型组   | —                          | 62.83 ±3.60               |
| 活血熄风方 | 20                         | 26.27 ±2.82 <sup>2)</sup> |
|       | 10                         | 33.83 ±2.64 <sup>2)</sup> |
|       | 5                          | 37.50 ±1.94 <sup>2)</sup> |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P<0.05, <sup>2)</sup> P<0.01(下同)

**3.2 对局灶性脑缺血大鼠脑神经细胞 Bcl-2、Bax 蛋**

白表达的影响 与假手术组比较,模型组 Bcl-2、Bax 的阳性细胞数及荧光强度显著升高 ( $P < 0.01$ ), 阳性细胞主要分布于大脑皮层梗塞区周围及海马,在胞浆及胞膜表达。与模型组比较,活血熄风方各剂

量组的 Bax 阳性细胞数及荧光强度均有不同程度的下降 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 阳性细胞数及荧光强度则有不同程度的升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), Bcl-2/Bax 比值明显升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 对局灶性脑缺血大鼠脑神经细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 (均  $\pm s$ ,  $n = 8$ )

| 组别    | 剂量<br>( $g \cdot kg^{-1}$ ) | Bcl-2 阳性细胞数                    | Bcl-2 荧光强度                     | Bax 阳性细胞数                      | Bax 荧光强度                       | Bcl-2/Bax                     |
|-------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 假手术组  | —                           | 2.01 $\pm$ 0.41 <sup>2)</sup>  | 9.49 $\pm$ 2.19 <sup>2)</sup>  | 4.67 $\pm$ 1.03 <sup>2)</sup>  | 10.68 $\pm$ 1.65 <sup>2)</sup> | 0.67 $\pm$ 0.22               |
| 模型组   | —                           | 24.50 $\pm$ 4.05               | 16.38 $\pm$ 2.79               | 47.17 $\pm$ 3.43               | 29.92 $\pm$ 4.06               | 0.52 $\pm$ 0.39               |
| 活血熄风方 | 20                          | 37.83 $\pm$ 2.72 <sup>2)</sup> | 28.72 $\pm$ 3.51 <sup>2)</sup> | 22.33 $\pm$ 3.75 <sup>2)</sup> | 18.08 $\pm$ 3.03 <sup>2)</sup> | 1.70 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup> |
|       | 10                          | 30.17 $\pm$ 2.13 <sup>2)</sup> | 25.54 $\pm$ 3.13 <sup>2)</sup> | 32.01 $\pm$ 3.09 <sup>2)</sup> | 20.52 $\pm$ 3.86 <sup>2)</sup> | 0.95 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup> |
|       | 5                           | 27.15 $\pm$ 3.42 <sup>1)</sup> | 23.02 $\pm$ 3.48 <sup>2)</sup> | 36.67 $\pm$ 4.63 <sup>2)</sup> | 20.94 $\pm$ 2.44 <sup>2)</sup> | 0.79 $\pm$ 0.57 <sup>1)</sup> |

#### 4 讨论

脑缺血后神经元死亡是一个极其复杂的病理过程,主要表现为坏死和凋亡两种形式。在脑缺血急性期,神经元坏死与凋亡并存,细胞坏死位于缺血中心区,细胞凋亡主要出现在缺血半暗带,而凋亡最终决定了脑梗死体积。细胞凋亡可能受到多种相关基因的调控,其中 Bcl-2 和 Bax 被认为是抑制和促进细胞凋亡最重要的两个基因<sup>[1,5]</sup>。Bcl-2 是抑凋亡基因, Bax 是促凋亡基因。Bcl-2/Bax 的比例对决定细胞凋亡的敏感性起重要作用,最终决定细胞的生存或死亡<sup>[6]</sup>。

本实验研究显示,模型组在缺血周边区可见大量凋亡细胞,说明急性脑缺血后,神经细胞凋亡过程即开始启动,而活血熄风方各治疗组均能不同程度地减少缺血周边区凋亡细胞数目 ( $P < 0.01$ ),表明活血熄风方对神经细胞凋亡有良好的抑制作用。实验同时观察到模型组 Bcl-2 蛋白出现表达,说明急性脑缺血后, Bcl-2 即参与抗凋亡作用,而活血熄风方治疗组 Bcl-2 蛋白的表达明显高于模型组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),表明活血熄风方可能通过上调 Bcl-2 蛋白的表达对脑缺血损伤起到一定的保护作用。实验显示模型组大鼠 Bax 蛋白表达明显增加,而活血熄风方高、中、低剂量组 Bax 蛋白表达均明显低于模型组 ( $P < 0.01$ ),表明活血熄风方可能通过下调 Bax 蛋白的表达从而对脑缺血损伤起到一定的保护作用。而 Bcl-2/Bax 比值的增加,表明活血熄风方可能通过上调 Bcl-2/Bax 比值而对脑缺血损伤起到一定的保护作用。与中、低剂量组比较,高剂量组神经细胞凋亡数明显减少,调节 Bcl-2/Bax 比值更显著。

局灶性脑缺血属于中医“中风”范畴,而中风属

于“内风”证之一,本课题组研究认为,内风证的发生多与瘀血相关,在此基础上提出了“瘀血生风”假说并开展了部分研究<sup>[2]</sup>,活血熄风方即是在此基础上提出的治疗中风的组方。全方以活血化瘀的当归、红花、川芎、水蛭等药物组成,通过活血化瘀而达到逐瘀熄风治疗中风的目的。本实验结果表明,活血熄风方具有抗神经细胞凋亡的作用,并可增加 Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达,提高 Bcl-2/Bax 比值,这可能是活血熄风方治疗中风的内在机制之一,其详细的作用机制,还有待进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Chen J, Graham SH, Nakayama M, *et al.* Apoptosis repressor gene Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(1): 2.
- [2] 刘昭纯, 马月香, 刘红杰, 等. “瘀血生风”假说的形成及意义 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2005, 11(3): 88.
- [3] 高红莉, 刘昭纯. 活血熄风方对局灶性脑缺血模型大鼠的保护作用 [J]. *新中医*, 2008, 40(2): 100.
- [4] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, *et al.* Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis [J]. *Ann Neurol*, 1985, 17(5): 497.
- [5] Dorota S, Julita CB, Matylda M, *et al.* Bcl-2 and Bax protein are increased in neocortical but not in thalamic apoptosis following devascularizing lesion of the cerebral cortex in the rat: an immunohistochemical study [J]. *Brain Research* 2004, 15(1): 133.
- [6] 王卫东, 陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运” [J]. *肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(4): 393.