

益气活血方对脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡 及 HSP70 蛋白表达的影响

胡建鹏, 王 键, 李 净
(安徽中医学院, 安徽合肥 230038)

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0072-02

益气活血方脑络欣通主要由黄芪、三七、川芎、蜈蚣等组成, 具有益气活血功效。以往的研究证实, 脑络欣通能改善脑供血, 降低脑水肿, 改善血液流变学, 调整血栓素 A₂(TAX₂) 及前列腺素 I₂(PGI₂) 等的动态平衡, 调节神经递质及细胞因子, 对脑缺血损伤具有保护作用^[1,2]。热休克蛋白 70(HSP70) 作为分子伴侣参与维持蛋白质分子恰当构型及自身稳定性, 并帮助那些可复性损伤的蛋白质修复, HSP70 还能提高细胞对应激原的耐受性, 在免疫方面也发挥着重要作用。HSP70 具有神经保护作用, 近年的研究还发现 HSP70 可能参与抑制细胞凋亡^[3]。在局灶性脑缺血时存在大量的神经细胞凋亡, 尤其在缺血半暗带区, 细胞凋亡具有主动性、选择性、可逆性的特点, 因此, 阻断缺血半暗带神经细胞凋亡, 对于减少脑梗塞体积, 促进中风患者的预后具有重要意义。本实验选用气虚血瘀证局灶性脑缺血再灌注模型鼠, 观察益气活血方对脑缺血半暗带神经细胞凋亡及热休克蛋白 70(HSP70) 表达的影响, 探讨益气活血方抗神经细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方

1.1 动物与分组 健康 wistar 大鼠 60 只(河南省实验动物中心提供, 合格证号为医动字第 01 号), 雌雄各半, 月龄 8 个月, 体重 280~340g, 随机分为假手术组、模型组、益气活血方组。

1.2 气虚血瘀证模型和局灶性脑缺血再灌注模型制作^[4]

1.3 药物 益气活血方脑络欣通, 由安徽中医学院中药制剂室制备, 分别相当于原生药 6g/mL, 按 8.54g/kg 体重, 供每天灌胃使用。脂肪乳剂配方: 每 100mL 由猪油 20g、胆固醇 10g、胆盐 2g、吐温-80 20mL、1, 2-丙二醇 20mL, 加蒸馏水适量配制而成, 供每天灌胃使用。

1.4 给药 益气活血方组在气虚血瘀证模型制作成功后, 制作局灶性脑缺血模型前 30min 给予第一次灌胃, 以后每天灌胃二次。假手术组, 模型组按同样方法予以等量生理盐水灌胃, 给药时间分别为 1d、3d。

1.5 组织处理 分别于脑缺血再灌注 1d、3d, 麻醉大鼠, 打开胸腔, 于右心耳部剪一小口, 从左心室插入导管至主动脉, 向内缓慢注入 37℃肝素化生理盐水 200mL, 至右心耳流出液

变清亮, 然后注入 4% 的多聚甲醛磷酸盐缓冲液 350mL, 灌注固定 30min 后断头取脑, 除去小脑和脑干, 放入相同的固定液中固定 1 周, 脱水、透明、浸蜡, 制作脑部冠状切片。载玻片经 APES 处理。

1.6 凋亡细胞检测 采用 TUNEL 法原位标记 DNA 片段检测凋亡。试剂由武汉博士德公司购得, 按说明书操作。

1.7 HSP70 免疫组化染色 兔抗鼠 HSP70 抗体及生物素化兔 IgG 及 DAB 显色剂均购于北京中山生物技术有限公司。采用 S-P 法染色, 按试剂盒说明书操作。

1.8 观察与统计方法 根据大鼠脑缺血半暗带的定位方法^[5], 将大脑中动脉阻塞的同侧额顶叶皮质上部界定为半暗带的等值区。采用 Nikon ECLIPSE E600 全自动图像分析系统, 在相同的视野下部界定为半暗带的等值区。采用 Nikon ECLIPSE E600 全自动图像分析系统, 在相同的视野下, 分别对相邻切片的凋亡细胞和 HSP70 免疫反应阳性细胞的面积及平均光密度进行分析。所得数据经 SPSS11.0 系统处理。

2 结果

2.1 益气活血方对模型鼠缺血半暗带神经细胞凋亡的影响 (见表 1) 结果显示, 假手术组有少量凋亡细胞存在, 缺血再灌注时可见较多的凋亡细胞, 其阳性细胞的面积及平均光密度显著增加, 与假手术组相比较有显著差异。益气活血方治疗后其阳性细胞的面积及平均光密度显著降低, 与模型组比较有显著差异。

2.2 益气活血方对脑缺血再灌注模型鼠缺血半暗带 HSP70 蛋白表达的影响 (见表 2) 结果显示: 假手术组见少量 HSP70 表达, 缺血 2h 再灌注 1d、3d, 缺血半暗带 HSP70 表达显著增加, 与假手术组相比较 HSP70 免疫反应阳性细胞的面积及平均光密度显著增加, 益气活血方治疗后其阳性细胞的面积及平均光密度进一步增高, 与模型组比较有显著差异。

表 1 益气活血方对脑缺血再灌注模型鼠缺血半暗带神经细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	阳性面积		平均光密度	
	1d	3d	1d	3d
假手术组	3.12 ± 1.05	3.03 ± 1.15	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
模型组	21.11 ± 1.36 ²⁾	15.16 ± 1.31 ^{2,5)}	0.22 ± 0.01 ³⁾	0.20 ± 0.02 ²⁾
益气活血方	17.25 ± 1.36 ⁴⁾	10.50 ± 1.51 ^{4,5)}	0.17 ± 0.01 ⁴⁾	0.16 ± 0.01 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01; 与缺血再灌注 1d、3d 相比较⁵⁾ P < 0.05。下同

收稿日期: 2003-10-09

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(00044116)

通讯作者: 王键, Tel: (0551) 2813776, E-mail: wjian@mail.hf.ah.cn

表 2 益气活血方对脑缺血再灌注模型鼠缺血半暗带 HSP70 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	阳性面积		平均光密度	
	1d	3d	1d	3d
假手术组	2.53 ± 0.74	1.86 ± 0.52	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01
模型组	13.68 ± 3.21 ²⁾	9.35 ± 3.45 ^{2,5)}	0.16 ± 0.03 ¹⁾	0.15 ± 0.04 ¹⁾
益气活血方组	20.47 ± 4.26 ⁴⁾	15.73 ± 5.31 ^{4,5)}	0.19 ± 0.07 ²⁾	0.18 ± 0.05 ²⁾

5 讨论

“气虚血瘀”为缺血性脑血管病主要病机^[6] 细胞凋亡是一种由基因控制的细胞自主性死亡,即程序性细胞死亡,具有主动性、选择性、可逆性的特点,是脑缺血损伤的主要病理生理机制之一,而细胞凋亡主要发生在缺血半暗带区。本实验结果发现,凋亡细胞 HSP70 表达主要在缺血半暗带区。有报道脑缺血后 HSP70 mRNA 主要在缺血半暗带区神经元产生,缺血中心区的 HSP70 mRNA 表达量则很少^[7]。脑缺血再灌注 1d 3d,模型组与假手术组相比较凋亡细胞阳性面积及平均光密度显著增加,益气活血方治疗后其阳性细胞面积及平均光密度显著下降,与模型组比较有显著差异,凋亡细胞于再灌注 1d 尤为显著,3d 后显著降低,凋亡细胞阳性面积在 1d 和 3d 有显著差异。脑缺血再灌注 1d 3d,模型组与假手术组相比较 HSP70 免疫反应阳性细胞的面积及平均光密度显著增加,益气活血方治疗后其阳性细胞的面积及平均光密度进一步增高,与模型组比较有显著差异,再灌注 1d 尤为显著,3d 后显著降低,HSP70 表达阳性细胞的面积 1d 和 3d 有显著差异。本实验还发现 HSP70 表达的时间与细胞凋亡的时序基本吻合,提示 HSP70 参与细胞凋亡。有人曾用 HSP70 单克隆抗体定位来确定脑缺血后 HSP70 蛋白表达的作用,发现在短暂脑缺血后死亡的海马 CA1 区锥体细胞中 HSP70 蓄积甚少,而存活的海马 CA1 区锥体细胞中有明显的 HSP70 蓄积^[8],表明 HSP70 蓄积具有神经保护作用,证明脑缺血后 HSP70 表

达对神经元有保护作用,是细胞存活的原因之一。脑缺血后 HSP70 对神经元的保护作用与钙离子、自由基及兴奋性氨基酸有关^[9]。因此益气活血方可能通过促进 HSP70 的表达,而发挥对缺血半暗带细胞凋亡的抑制作用。

参考文献:

- [1] 王键,许冠荪,胡容峰,等.脑络欣通对大鼠急性脑缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1997,3(5):34-35.
- [2] 王键,许冠荪,李玉梅,等.脑络欣通对脑缺血损伤防治作用的实验观察[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(2):22-23.
- [3] He L, Fox MH, Variation of heat shock protein 70 through the cell cycle in HL-60 cells and its relationship to apoptosis[J]. Exp cell Res, 1997, 232: 64.
- [4] 李净,王键.益气活血法改善气虚血瘀证局灶性脑缺血再灌注模型鼠生物学特征的有效性评价[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(4):22-25.
- [5] 刘士民.凋亡与缺血性神经元损伤[J].国外医学.脑血管疾病分册,1997,5(2):70.
- [6] 胡建鹏,王键.缺血性中风气虚血瘀病机学说的形成及其理论与实践意义[J].中华中医药杂志,2003,5:6-9.
- [7] Kinouchi H, Sharp FR, Koistinabo J, et al. Induction of heat shock HSP70 mRNA and HSP70 Kda protein in neurons in the penumbra following focal cerebral ischemia in the rats[J]. Brain Res, 1993, 619: 334.
- [8] Vass K, Welch NJ, Nowak TS, Jr, et al. Localization of 70-Kda stress protein induction in gerbil brain after ischemia[J]. Acta Neuropathol Berl, 1998, 77: 128.
- [9] Koroshetz WJ, Bonventre JV. Heat shock responst in the central nervous system[J]. Exprientia, 1994, 50: 1085.