

加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑细胞自噬相关蛋白表达的影响

陈维达^{1,2}, 宋婷², 赵鑫², 张琼瑜², 刘晓婷³, 陈泽涛^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011;
3. 潍坊市中医院, 潍坊 261041)

[摘要] **目的:** 探讨加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑细胞自噬相关蛋白表达的影响。**方法:** 采用可逆性脑中动脉闭塞线栓法栓塞右侧大脑中动脉, 构建脑缺血再灌注(CIR)损伤模型, 随机分为假手术组、模型组、加味涤痰汤高、低剂量组(0.768, 0.384 g·kg⁻¹)和吡拉西坦组(0.1 g·kg⁻¹)。假手术组和模型组灌胃生理盐水, 加味涤痰汤高、低剂量组灌胃加味涤痰汤, 吡拉西坦组灌胃吡拉西坦片, 灌胃 10 mL·kg⁻¹; 给药 7 d。给药 24 h 内, 处死后行组织病理学检查, 比较脑梗死体积、神经细胞凋亡和血清炎症因子水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定脑组织中自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链 3(LC3) II, Beclin1, B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 p62 的表达。**结果:** 模型组脑组织梗死灶内细胞和血管坏死, 神经元肿胀, 间质水肿; 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组脑组织少数神经细胞死亡, 水肿减轻, 神经细胞肿胀减轻。加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组脑梗死体积和神经细胞凋亡低于模型组($P < 0.05$), 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-2(IL-2)和白细胞介素-8(IL-8)水平降低($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组 LC3II, Bcl-2 和 Beclin1 蛋白及 mRNA 表达明显升高, p62 蛋白及 mRNA 表达明显下降; 与模型组比较, 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组 LC3II 和 Beclin1 蛋白及 mRNA 表达均明显降低, p62 蛋白及 mRNA 表达明显升高, 差异均具有明显性($P < 0.05$)。**结论:** 加味涤痰汤可改善 MCAO/R 脑组织损伤和自噬, 减轻炎症反应, 调节自噬活性, 可能与下调 LC3II, Beclin1 表达, 上调 p62 表达有关。

[关键词] 加味涤痰汤; 脑缺血再灌注损伤; 自噬; 机制

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0064-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191504

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190417.1342.007.html>

[网络出版时间] 2019-04-18 15:48

Effect of Modified Ditantang on Autophagy and Relevant Proteins in Brain Cells of Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

CHEN Wei-da^{1,2}, SONG Ting², ZHAO Xin², ZHANG Qiong-yu², LIU Xiao-ting³, CHEN Ze-tao^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;

2. Hospital Affiliated to Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China;

3. Weifang TCM Hospital, Weifang 261041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of modified Ditantang on autophagy and relevant proteins in brain cells of rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Method:** The cerebral ischemic reperfusion (CIR) injury model in rats was built by reversible middle cerebral artery occlusion artery suture of middle cerebral embolism method, and randomly divided into sham group, model group, high-dose modified Ditantang group

[收稿日期] 20181210(008)

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2015-076)

[第一作者] 陈维达, 在读博士, 主治医师, 从事常见中医老年病的治疗与研究, E-mail: chenweida_2000@126.com

[通信作者] 陈泽涛, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医老年病的防治研究, E-mail: zetaochen2007@126.com

(H-dose), low-dose modified Ditantang group (L-dose, $0.384 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and PLXT group ($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Sham and model groups were given normal saline by gastric perfusion, H-dose and L-dose groups were given modified Ditantang, and the PLXT group were given Piracetam tablets, intragastric volume $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$. The treatment lasted for 7 d. Within 24 hours after administration, the histopathological examination was performed, the volume of cerebral infarction, neuronal apoptosis and serum levels of inflammatory factors were compared, and the expressions of autophagy related microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) II, Beclin1, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and p62 in brain tissues were determined. **Result:** Cells and blood vessel necrosis, neuron swelling and interstitial edema were observed in model group, a few neurons died, edema was reduced, swelling of nerve cells was alleviated in H-dose, L-dose and PLXT groups. The volume of cerebral infarction and neuronal apoptosis in H-dose, L-dose and PLXT groups were lower than those in model group ($P < 0.05$). The levels of tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$, interleukin (IL) -2 and IL-8 in H-dose, L-dose and PLXT groups were lower than those in model group ($P < 0.05$). Compared with sham group, protein and mRNA expressions of LC3 II, Bcl-2 and Beclin1 in the ischemic brain tissue of model group were significantly increased, while protein and mRNA expressions of p62 in the ischemic brain tissue of model group were decreased significantly. Compared with the model group, protein and mRNA expressions of LC3 II and Beclin1 in H-dose, L-dose and PLXT groups were significantly decreased, while protein and mRNA expressions of p62 were significantly increased, with significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Ditantang can improve brain injury and interfere with autophagy after MCAO/R, alleviate inflammation, and regulate autophagic activity, which may be related to the down-regulation of expressions of LC3 II, Beclin1 and the up-regulation of expression of p62.

[Key words] modified Ditantang; cerebral ischemia reperfusion injury; autophagy; mechanism

缺血性脑卒中,是脑血管病最常见的一种类型,约占全部脑卒中的 60% ~ 80%^[1],中医方面又称“中风”。其导致的神经功能障碍常对患者的生活质量造成严重的影响,且发病率、致残率、复发率极高。缺血性脑卒中与动脉脑血流的突然中断有关,血栓是缺血性卒中的主要原因,其发病机制较为复杂,与氮化应激损伤、神经炎症、神经递质释放、细胞内钙离子累积等有关,西医治疗静脉溶栓治疗和血管内机械取栓治疗为主,预后不甚理想^[2]。近年来研究发现中医药具有较好的临床疗效,如王天磊等^[3]发现采用加味补阳还五汤内服联合头针治疗脑卒中后 USN,可有效的减轻病情程度,改善认知功能和血液流变性,减轻抑郁程度,提高患者的运动、生活自理能力和生活质量。王彦华等^[4]发现涤痰汤加减可有效改善中青年急性缺血性脑卒中合并 OSAHS 痰瘀互结证患者的临床症状,且可降低吡拉西坦片的不良反应。涤痰汤出自《济生方》,有益气祛痰、化浊开窍的功能,是治疗急性期缺血性脑卒中的有效方剂。卢巧喜等^[5]研究发现涤痰汤可以明显提高中风急性期患者的临床疗效,减轻脑出血后脑水肿的体积,促进脑血肿的吸收,改善神经损伤,抑制体内炎症反应。但其并未详细探讨涤痰汤对缺血再灌注损伤的关于自噬方面的具体机制。目前已

有研究表明,自噬在脑缺血再灌注损伤中具有重要的作用。自噬不仅参与细胞死亡,同时也是细胞在恶劣环境中维持自我内环境稳定的一种保护机制^[6]。但加味涤痰汤对缺血性脑卒中的自噬作用尚不明确。因此,笔者通过对大鼠进行右侧大脑中动脉栓塞(MCAO)构建大脑缺血损伤模型,探讨加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑细胞自噬相关蛋白表达的影响。

1 材料,

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只,体质量 140 ~ 160 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0011。本实验动物及条件符合实验动物伦理委员会要求。

1.2 药物及试剂 加味涤痰汤由胆南星 12 g,石菖蒲 10 g,橘红 10 g,栀子 10 g,枳实 10 g,炙半夏 9 g,水蛭 6 g,生大黄 6 g 组成,所有药材经山东中医药大学李峰教授鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范,采用北京康仁堂药业全成分中药配方颗粒,每剂 21.3 g;吡拉西坦片(山东仁和堂药业有限公司,批号 20160122);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-8(IL-8)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 170122,161104,160916);微管相关

蛋白轻链 3 (LC3) II, Beclin1 和 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 引物由生工生物工程(上海)股份公司合成。BCA 蛋白定量试剂盒, DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 20170316, 20170412); 苏木素和伊红染色液(美国 Sigma 公司, 批号分别为 070122, 061207); 红四氮唑 (TTC, 美国 Sigma 公司, 批号 061125); 原位末端标记 (TUNEL) 试剂盒(美国罗氏公司, 批号 J170229); trizol(上海捷瑞生物工程有限公司, 批号 20170311); LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 J171026, J160607, J160926, J161112); 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig) G 二抗(德国 Proteintech 三鹰公司, 批号 J170511)。

1.3 仪器 BX60 型显微镜(日本 Olympus 公司); RM2125 型切片机, TPHZO 型全自动封闭式组织脱水机(德国徕卡公司); Y6-6LF 型生物组织包埋机(湖北亚光易用电子技术有限公司); ELx800 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); Image-Pro Plus 6.0, 数码医学图像分析系统(麦克奥迪实业集团有限公司); XDS-500D 型荧光显微镜(苏州景通仪器有限公司); LightCycler® 96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(瑞士 Roche 公司); DYCP-31CN 型电泳仪, DY CZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 大鼠术前禁食、禁水 6 h。以 10% 水合氯醛麻醉大鼠, $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 麻醉满意后, 参照 Sehara 等^[7]的方法, 对大鼠进行可逆性脑中动脉闭塞线栓法栓塞右侧大脑中动脉, 缝合皮肤切口。术中以加热板保持大鼠肛温在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右。假手术组除不插入线栓外余手术过程相同。缺血 90 min 后拔出线栓进行再灌注, 再灌注 90 min 后参照徐振宇等^[8]制定的标准对大鼠进行神经功能障碍评分。本实验选用神经功能评分为 1~3 分的进行右侧大脑中动脉栓塞成功的大鼠和 0 分的假手术大鼠。

2.2 分组与给药 大鼠共分为 5 组, 分别为假手术组随机纳入 0 分的假手术大鼠 5 只; 模型组、加味涤痰汤高、低剂量组, 西药组各随机纳入造模成功的脑缺血再灌注损伤的大鼠各 5 只。各给药组大鼠按人鼠剂量换算公式给药, 给药剂量 = 人的给药剂量 × 换算系数(0.018)/大鼠体质量。于造模成功后 24 h 给药, 每日 1 次, 连续给药 7 d, 加味涤痰汤高剂量组给予加味涤痰汤 $0.768 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 加味涤痰汤低剂量组给予加味涤痰汤 $0.384 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 吡拉西坦组给予

吡拉西坦片 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 假手术组与模型组给予等量的生理盐水, 灌胃容积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.3 指标检测

2.3.1 苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织病理学变化 于给药周期结束 24 h 内, 眼球取血处死动物, 取脑组织, 生理盐水清洗后, 固定 48 h 后, 二甲苯脱脂, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片, 染色, 显微镜下观察。

2.3.2 TTC 染色法测定脑梗死面积 脑片平铺于 2% TTC 染色液中, 避光孵育 0.5 h, 脑片 10% 甲醛固定, 梗死组织而呈白色, 正常脑组织呈红色, 通过 Image-Pro Plus 6.0 测量脑梗死面积。梗死体积 = 梗死体积/对侧大脑半球体积。

2.3.3 TUNEL 法检测神经细胞凋亡 切片脱蜡脱水, TUNEL 试剂盒反应液和复合液, DAB 显色, 苏木素复染并封片, 阴性对照用蒸馏水代替荧光素标记酶, 观察神经细胞凋亡情况, 荧光显微镜下绿色标记且与细胞核共定位的为凋亡细胞, 选取 5 个高倍视野分别计数凋亡细胞数目。

2.3.4 ELISA 测定外周血 TNF- α , IL-2 和 IL-8 水平 采集外周血, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清采用 ELISA 法测定外周血 TNF- α , IL-2 和 IL-8 水平, 严格按照试剂盒说明书操作。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定脑组织中自噬相关蛋白 LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 的表达 石蜡切片脱蜡脱水后, 过氧化氢-甲醇液浸泡, 加热进行抗原修复, 滴加 50 μL 一抗(1:100), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 滴加二抗(1:100), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育, PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明后中性树胶封片, 显微镜下观察, Image-Pro Plus 6.0 图象分析系统选 5 个视野, 计算平均灰度值。

2.3.6 Real-time PCR 检测 LC3 II, Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 的表达 取脑组织 50 mg, 采用 trizol 法提总 RNA, 检测 RNA 浓度及纯度, 采用 Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒逆转录生成 cDNA, 选用 Super Real 荧光定量预混试剂盒进行 40 个循环, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min, 荧光信号检测, 取 C_t 平均值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

2.4 统计学方法 数据采用 SPSS 20.0 统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经正态分布检验和方差齐性检验后, 两个样本比较采用单因素方差分析, 多个样本均数之间的两两比较采用 LSD 法, 以 $\alpha =$

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

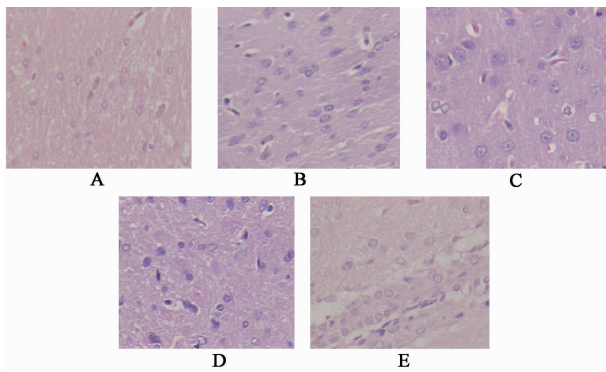
引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 CTCCATCATGAAGTGTGACGTT	268
	下游 ATCTCCTTCTGCATCCTGTACG	
LC3 II	上游 TACGAGCAGGAGAAAGACGAGG	226
	下游 GGCAGAGTAGGTGGGTTGCTG	
Beclin1	上游 CTGAGGGATGGAAGGGTCTA	372
	下游 CCTGGGCTGTGTAAGTAATG	
Bcl-2	上游 GGATGTGGCCTTCTTGAG	233
	下游 CCAAAGTGCAGAGAGTCT	
p62	上游 AGCGGGTACTGATCCCTGTC	159
	下游 TCTTCCTCCTTGGCTTGTGTC	

0.05 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理学影响

假手术组脑组织正常, 脑细胞排列有序, 胞质均质红染, 形态正常, 未见异常; 模型组梗死灶内细胞和血管坏死, 脑组织疏松, 细胞形态改, 核染色质不均匀, 变神经元肿胀, 间质水肿, 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组脑组织损伤均减轻, 细胞稍显疏松, 少数神经细胞死亡, 水肿减轻, 神经细胞肿胀减轻。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 加味涤痰汤低剂量组; D. 加味涤痰汤高剂量组; E. 吡拉西坦组(图 2 同)

图 1 加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理学影响(HE, $\times 200$)

Fig.1 Effect of modified Ditantang on brain histopathology of rats with cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) (HE, $\times 200$)

3.2 对脑缺血再灌注损伤大鼠微血管密度、脑梗死

体积和神经细胞凋亡的影响 与假手术组比较, 模型组的脑梗死体积和神经细胞凋亡明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组脑梗死体积和神经细胞凋亡明显降低

($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠微血管密度、脑梗死体积和神经细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of modified Ditantang on microvessel density, cerebral infarction volume and neuronal apoptosis of rats with CIRI ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	脑梗死体积/%	神经细胞凋亡/个
假手术	-	0	12.34 \pm 2.67
模型	-	26.78 \pm 2.62 ¹⁾	61.27 \pm 6.81 ¹⁾
加味涤痰汤	0.384	21.14 \pm 2.21 ²⁾	50.17 \pm 7.23 ²⁾
	0.768	18.12 \pm 1.89 ²⁾	31.51 \pm 5.47 ²⁾
吡拉西坦	0.1	17.90 \pm 2.05 ²⁾	32.64 \pm 5.31 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.3 对脑缺血再灌注损伤大鼠血清炎症因子的影响

与假手术组比较, 模型组血清 TNF- α , IL-2 和 IL-8 水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组血清 TNF- α , IL-2 和 IL-8 水平明显降低($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血清炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of modified Ditantang on serum inflammatory factors of rats with CIRI ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu g \cdot L^{-1}$

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TNF- α	IL-2	IL-8
假手术	-	34.17 \pm 4.91	3.51 \pm 0.21	1.83 \pm 0.11
模型	-	65.42 \pm 6.42 ¹⁾	5.84 \pm 0.42 ¹⁾	4.57 \pm 0.27 ¹⁾
加味涤痰汤	0.384	54.39 \pm 6.17 ²⁾	5.04 \pm 0.38 ²⁾	3.98 \pm 0.32 ²⁾
	0.768	46.38 \pm 5.33 ²⁾	4.21 \pm 0.29 ²⁾	3.24 \pm 0.15 ²⁾
吡拉西坦	0.1	45.13 \pm 5.41 ²⁾	4.16 \pm 0.22 ²⁾	3.13 \pm 0.12 ²⁾

3.4 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠缺血脑组织中 LC3 II, Bcl-2 和 Beclin1 蛋白表达明显升高, p62 蛋白明显下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组 LC3 II, Bcl-2 和 Beclin1 蛋白表达均明显降低, p62 蛋白明显上升($P < 0.05$)。见图 2, 表 4。

3.5 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 mRNA 表达影响

与假手术组比较, 模型组大鼠缺血脑组织中 LC3 II, Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 的表达明显升高, p62 mRNA 的表达明显下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味涤痰汤高、

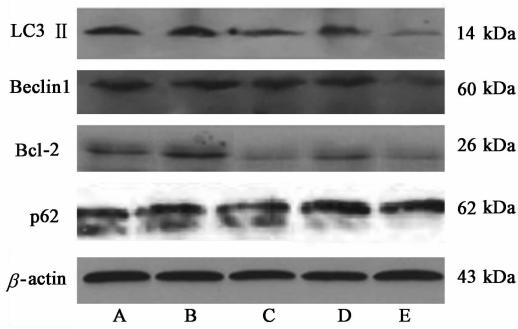


图 2 大鼠脑组织 LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of LC3 II, Beclin1, Bcl-2 and p62 protein expression

表 4 加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of modified Ditantang on expression of LC3 II, Beclin1, Bcl-2 and p62 protein of rats with CIRI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LC3 II/ β -actin	Beclin1/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	p62/ β -actin
假手术	-	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.94 ± 0.05
模型	-	0.79 ± 0.07 ¹⁾	0.62 ± 0.04 ¹⁾	0.61 ± 0.03 ¹⁾	0.39 ± 0.04 ¹⁾
加味涤痰汤	0.384	0.61 ± 0.05 ²⁾	0.55 ± 0.03 ²⁾	0.51 ± 0.03 ²⁾	0.71 ± 0.08 ²⁾
	0.768	0.58 ± 0.06 ²⁾	0.52 ± 0.03 ²⁾	0.47 ± 0.04 ²⁾	0.69 ± 0.09 ²⁾
吡拉西坦	0.1	0.54 ± 0.07 ²⁾	0.49 ± 0.04 ²⁾	0.46 ± 0.03 ²⁾	0.67 ± 0.07 ²⁾

表 5 加味涤痰汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 LC3 II, Beclin1, Bcl-2 和 p62 mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of modified Ditantang on expression of LC3 II, Beclin1, Bcl-2 and p62 mRNA of rats with CIRI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LC3 II	Beclin1	Bcl-2	p62
假手术	-	1.00 ± 0.03	0.96 ± 0.02	1.03 ± 0.04	5.12 ± 0.61
模型	-	3.12 ± 0.34 ¹⁾	2.67 ± 0.25 ¹⁾	2.54 ± 0.24 ¹⁾	0.89 ± 0.07 ¹⁾
加味涤痰汤	0.384	2.41 ± 0.23 ²⁾	2.18 ± 0.19 ²⁾	2.07 ± 0.21 ²⁾	2.58 ± 0.43 ²⁾
	0.768	1.37 ± 0.28 ²⁾	1.29 ± 0.22 ²⁾	1.42 ± 0.25 ²⁾	2.75 ± 0.42 ²⁾
吡拉西坦	0.1	1.25 ± 0.21 ²⁾	1.34 ± 0.16 ²⁾	1.46 ± 0.13 ²⁾	2.86 ± 0.37 ²⁾

术后 72 h 涤痰汤组缺血侧脑组织细胞凋亡率明显降低,表明涤痰汤的神经保护作用可能与抑制缺血后细胞凋亡有关。本研究所采用的加味涤痰汤是在涤痰汤基础上化裁而来,治疗中风急性期痰瘀互结、化热动风者。

自噬是真核细胞利用溶酶体对衰老、过剩的生物大分子(如蛋白质)及受损的细胞器进行分解代谢的过程^[11]。既往的研究证明,缺血缺氧是自噬激活的重要诱因之一^[12]。自噬过程由一系列自噬相关蛋白(Atg 蛋白)介导完成,LC3 是自噬体膜上的标记蛋白。LC3 II 被用来作为自噬体的标记,其水平在某种程度上反映了自噬体的数量^[13]。本研究在给药周期结束后,对各组大鼠局麻处死后切取缺血侧额叶皮层组织行 Western blot 测定,发现模型组 LC3 II 的表达较假手术组明显升高,这表明在缺血再灌注发生发展的病理过程中自噬机制参与其中,且自噬是被激活的,这与既往的研究结果相同。用

低剂量组及吡拉西坦组 LC3 II, Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 的表达均明显降低, p62 mRNA 的表达明显升高($P < 0.05$)。见表 5。

4 讨论

涤痰汤是中风急性期治疗的传统方剂,具有涤痰开窍之功效。近年来,在缺血再灌注动物模型与体外细胞培养等方面的研究进一步明确了涤痰汤药理作用的机制。刘晓婷等^[9]将脑缺血再灌注损伤大鼠随机分组,结果显示术后 72 h 涤痰汤组较模型组神经功能缺损程度明显改善,脑组织受损程度明显减轻。彭静等^[10]用同样的方法进行研究,发现

药后加味涤痰汤加味涤痰汤高、低剂量组及吡拉西坦组与模型组比较,LC3 II 表达均明显降低,LC3 II 表达的降低反映出自噬受到抑制。因此,本研究发现缺血再灌注发生后自噬加剧缺血后的脑损伤;加味涤痰汤能减轻缺血再灌注后的脑损伤,其机制与抑制缺血再灌注后发生的自噬有关。

Beclin1 基因是哺乳动物参与自噬的特异性基因。Beclin1 是形成自噬体的必需分子,在一定程度上可代表自噬的活性,能够调节自噬体膜合成和物质转运。Bcl-2 家族,是一组结构域的高度同源蛋白系列,在细胞凋亡中起着重要的调节作用。Bcl-2 作为经典的抗凋亡蛋白,在调控细胞自噬的过程中也有重要作用。此外, Bcl-2 还能通过多种机制调控氧化应激,而氧化应激在诱导自噬和凋亡中均发挥了作用^[14]。当细胞发生饥饿或者应用自噬诱导剂使自噬增强时,继而发生 Beclin1 与 Bcl-2 的解聚^[15],使 Beclin1 依赖的自噬增加,提示了 Bcl-2 对自噬起

着抑制作用。由此可见,自噬与凋亡之间存在复杂的调控关系,而 Beclin1 与 Bcl-2 的平衡状态则是调控自噬与凋亡互反馈作用的关键因素^[16]。p62 为带有结构性模体的结构域,通过与被泛素化的自噬底物蛋白作用,标记多聚泛素链,介导线粒体聚合并降解,p62 水平与自噬水平是负相关,研究发现缺血再灌注损伤时,机体会上调自噬水平,自噬发生时,p62 水平下降^[17]。

本研究发现,发生缺血再灌注后模型组脑组织梗死灶内细胞和血管坏死,神经元肿胀,间质水肿;各剂量组和吡拉西坦组脑组织少数神经细胞死亡,水肿减轻,神经细胞肿胀减轻。各剂量组和吡拉西坦组脑梗死体积,神经细胞凋亡,TNF- α , IL-2 和 IL-8 水平低于模型组。模型组 LC3 II, Beclin1 蛋白及 mRNA 表达较假手术组明显升高, p62 蛋白及 mRNA 表达明显下降,说明在缺血缺氧的条件下,机体通过上调 Beclin1 的表达来诱导自噬的激活,抗凋亡作用的增强。目前普遍认为自噬和凋亡在特定情况下可以相互转化,共同促进细胞死亡。自噬抑制凋亡的主要机制是线粒体自噬,线粒体受损时细胞内的自噬激活因子会被激活,使细胞启动自噬来挽救细胞,自噬就会对受损的线粒体进行捕捉并将其降解消除,以防止细胞发生凋亡^[14]。研究中缺血再灌注发生后,模型组 LC3 II, Beclin1 蛋白及 mRNA 表达明显升高, p62 蛋白及 mRNA 表达明显下降,表明自噬被激活; Bcl-2, LC3 II 和 Beclin1 蛋白及 mRNA 表达升高, p62 蛋白及 mRNA 表达升高,表明抗凋亡的作用增强。用药后加味涤痰汤高剂量组、吡拉西坦组 Beclin1 的表达均明显降低,与模型组比较差异具有明显性,表明加味涤痰汤高剂量组能有有效的抑制自噬;且高剂量组优于低剂量组,表明存在量效关系,高剂量能更有效的抑制自噬的发生。

综上所述,加味涤痰汤能通过干预脑缺血再灌注损伤后的自噬,可改善 MCAO/R 脑组织损伤,降低炎症因子水平,调节自噬的活性,下调 LC3 II, Beclin1 的表达,上调 p62 的表达,有效的下调自噬,起到缺血再灌注后神经保护的作用。但自噬发生的机制及调节通路十分复杂,笔者仅就加味涤痰汤对自噬的影响做了研究,至于其发挥神经保护的分子机制、确切的调节通路,以及如何调控自噬与凋亡的发生等问题,有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 吴志元,曹柱,黄金凤,等. 青年缺血性脑卒中与老年

缺血性脑卒中的危险因素研究[J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(6): 983-985.

[2] 樊文香. 缺血性脑卒中的机制研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(6): 751-759.

[3] 王天磊,刘建浩,郑杨杨,等. 加味补阳还五汤联合头针对气虚血瘀证卒中后单侧空间忽略的疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 196-201.

[4] 王彦华,路永坤,张燕平,等. 涤痰汤加减治疗中青年急性缺血性脑卒中合并 OSAHS 痰瘀互结证的疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 204-209.

[5] 卢巧喜,杨云华,李欣,等. 涤痰汤对中风急性期患者脑损伤及炎症因子的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(3): 490-492.

[6] 仇志富,吴晓光. SDF-1/CXCR4 生物学自噬轴与脑缺血损伤研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(9): 2295-2298.

[7] Sehara Y, Inaba T, Urabe T, et al. Survivin overexpression via adeno-associated virus vector Rh10 ameliorates ischemic damage after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Eur J Neurosci, 2018, 48(12): 3466-3476.

[8] 徐振宇,陆斌,李广平,等. 高压氧治疗模型大鼠颅脑损伤性神经功能障碍的研究[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(4): 504-508.

[9] 刘晓婷,陈维达,陈泽涛,等. 加味涤痰汤灌胃对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(41): 36-38.

[10] 彭静,刘玲,陈钢,等. 涤痰汤改善痰浊型老龄认知障碍大鼠空间认知能力及海马神经元突触可塑性[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2017, 46(2): 175-179.

[11] 魏砚明,任晋宏,栾智华,等. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物 LC3 II 及 p62 表达的影响[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3): 341-347.

[12] 李建荣,蒋晓帆,张磊,等. 脑缺血模型中皮层 Sirt3 与自噬蛋白 LC3 表达的相关性[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2018, 17(5): 387-390.

[13] 李丹丹,肖学进,秦书俭,等. 脑缺血再灌注损伤程度与自噬相关基因 LC3、mTOR 表达的相关性研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2018, 36(2): 182-186.

[14] 谭成富,王超,杜琳,等. 电针、艾灸预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌自噬相关蛋白 LC3、Beclin1 表达的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(1): 1-7.

[15] 孔凡奇,赵书杰,凡进,等. Beclin-1 的泛素化在自噬中的研究进展[J]. 江苏医药, 2018, 44(10): 1189-1192.

[16] 张丽颖,胡昔权,郑海清,等. 运动训练对脑梗死大鼠梗死边缘区神经细胞自噬及凋亡的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(8): 863-868.

[17] 李春明,舒适,钱小路,等. 电针水沟穴对脑缺血再灌注大鼠自噬相关蛋白 p62 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(11): 2439-2441.

[责任编辑 周冰冰]