

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0885-04

• 实验研究 •

黄芪和红花对脑缺血再灌注后大鼠神经细胞 凋亡和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 的影响

赖真¹, 李丽珊¹, 程少冰²

(1 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院, 广东省深圳市 518020; 2 暨南大学中医系, 广东省广州市 510632)

[关键词] 神经病学; 脑缺血再灌注; 神经细胞; 凋亡; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8; 黄芪; 红花; 大鼠

[摘要] **目的** 研究黄芪和红花对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 的影响。**方法** 采用局灶性脑缺血再灌注模型, 分假手术组、模型组、黄芪加红花组、黄芪组和红花组。术后分为 12 h、24 h 和 48 h 3 个时间点, 行神经功能评分; 缺口末端标记法观察凋亡的情况; 免疫组织化学观察缺血周围区神经细胞天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 表达强度。**结果** 黄芪和红花均能改善大鼠脑缺血再灌注后的神经功能评分。缺血再灌注 24 h 的凋亡阳性细胞数与模型组比较, 各治疗组差异均有显著性 ($P < 0.05$); 在治疗组中, 黄芪加红花组与红花组和黄芪组凋亡阳性细胞数比较差异均有显著性 ($P < 0.05$)。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 阳性表达水平: 缺血再灌注 12 h 黄芪组、黄芪加红花组与模型组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.05$); 红花组与黄芪加红花组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。缺血再灌注 24 h 和缺血再灌注 48 h 各组之间差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芪加红花可减轻大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡, 其机制可能与下调凋亡通路中的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 的表达有关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Effect of Radix Astragali and Safflower Injection on Neuron Apoptosis and Caspase-8 After Local Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats

LAI Zhen¹, LI Lishan¹, and CHENG Shao-Bing²

(1 Shenzhen People's Hospital, The Second Clinical Medical College, Jinan University, Shenzhen 518020, China; 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia Reperfusion; Neuronal Cells; Apoptosis; Caspase-8; Radix Astragali; Safflor; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of radix astragali (RA) and safflor injection on neuron apoptosis and caspase-8 following local cerebral ischemia/reperfusion. **Methods** Male adult rats were randomly divided into three groups: the sham-operated group, the model group, the RA group, the safflor group and the RA + safflor group. The model of middle cerebral artery occlusion was established by thread ligation method. Neurological system symptoms were evaluated after 12 h, 24 h, 48 h of ischemia/reperfusion. Then rats were decapitated at 12 h, 24 h, and 48 h after reperfusion, and brains were taken for TUNEL and immunohistochemistry examinations. Positive reacted cells of apoptosis and Caspase-8 are counted under light microscope at different time points of ischemia/reperfusion. **Results** RA and safflor can significantly alleviate neurological system damage. Apoptosis examination showed that positive reacted cell amount in the RA group, the safflor group and the RA + safflor group was significantly milder than that in the model group ($P < 0.05$). And then, as compared with the RA group and the safflor group, amount was declined in RA + safflor group ($P < 0.05$). Immune examination of Caspase-8 showed that positive reacted cell amount in the RA group, the safflor group and the RA + safflor group was significantly milder than that in the model group ($P < 0.05$). And then, as compared with the RA group and the safflor group, amount was declined in RA + safflor group ($P < 0.05$). **Conclusions** The protective effects of the RA and safflor against cerebral ischemia/reperfusion injury might be associated with downing regulation of the Caspase-8 expression.

[收稿日期] 2008-08-01 [修回日期] 2008-10-25

[作者简介] 赖真, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合脑血管病研究, 联系电话为 0755-26254928, 0755-25533018 转 2359。李丽珊, 硕士研究生, 从事中西医结合临床专业, 联系电话为 15815507782, Email 为 lls801225@163.com。程少冰, 学士, 实验师, 从事脑病的机理研究, 联系电话为 13650885207, Email 为 Chengsl@jnu.edu.cn。

黄芪和红花是中医治疗缺血性脑血管病的常用药物, 疗效良好, 但其作用机制尚未完全阐明。现代药理研究证实黄芪和红花具有降低血液粘度、扩张血管、改善脑血流、降低血脂、改善微循环等作用^[1]。近年来随着生物技术进展, 更多证据表明脑

缺血后神经元死亡由凋亡和坏死共同引起^[2]。神经细胞凋亡是一种受基因调控的自主性、程序性细胞死亡过程,是脑缺血再灌注损伤的主要环节,其中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8(Caspase-8)的表达与细胞凋亡关系尤为密切。本研究通过观察黄芪注射液和红花注射液对局灶性脑缺血再灌注后脑组织神经细胞凋亡及凋亡相关 Caspase-8 蛋白表达的影响,探讨其脑保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

健康成年雄性 SD 大鼠 78 只(模型成功率为 75%,死亡之后补充动物),体重 200~250 g 由广东省实验动物中心提供(合格证号为 0022763 和 0022496)。黄芪注射液采用成都地奥制药公司生产的黄芪注射液,20 mL/支,批号 013433 相当于原生药 2 g/mL。红花注射液采用山西恒大药业公司生产的红花注射液,10 mL/支,批号 040802 相当于原生药 0.5 g/mL。TUNEL 凋亡检测试剂盒(MK1020)、Caspase-8 兔多抗、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物有限公司;即用型非生物素免疫组织化学 ELIVision™ plus 检测试剂盒购自福建迈新生物技术开发有限公司。

1.2 动物实验

实验动物随机分为 5 组,假手术组($n=6$)、模型组($n=18$)、黄芪加红花组($n=18$)、黄芪组($n=18$)和红花组($n=18$)。各组根据缺血再灌注时间分为 12 h、24 h、48 h 3 个亚组。手术前一晚给大鼠禁食,但不禁水,并于手术前 12 h 与术前 30 min 各组注射相应药物一次,手术后每隔 12 h 再注射一次药物,直到 48 h 后最后一批大鼠处死。假手术组与模型组腹腔注射等量生理盐水。标本获取分别于脑缺血 3 h 再灌注 12 h、24 h 和 48 h 各时间点用 10% 水合氯醛麻醉(0.35 mL/100 g)大鼠。4% 的多聚甲醛灌注固定后断头取脑,进行 24 h 外固定,自视交叉向前后 2 mm 切取冠状脑片,取第 3 片脑片行石蜡包埋,连续切片。

1.3 动物模型制作方法

线栓直径为 0.22~0.25 mm 的钓鱼线,将线的一端轻轻沾上硅胶做成线栓头,直径为 0.28~0.30 mm。阴干后用刻度尺测量距线栓头 18 mm 及 20 mm 处用记号笔标记记号,将线栓置于 75% 酒精中备用。参考文献[3]制作模型。大鼠用 10% 水合氯醛(350 mg/kg,腹腔注射)麻醉后,分离左侧颈总动

脉、颈外动脉、颈内动脉和翼腭动脉。结扎翼腭动脉,然后在距颈总动脉分叉 1 cm 处结扎颈外动脉,并于距结扎处近端约 0.5 cm 处远心端用电凝器灼断之。动脉夹夹闭左颈总动脉,在颈外动脉剪一切口,将长 5 cm、直径 0.26 mm 尼龙线经左侧颈外动脉主干切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进,以颈总动脉分叉处为标记,推进 18~20 mm 感到轻微阻力时,即阻断大脑中动脉,将线拴系紧防止滑出。阻断 3 h 后,拔出尼龙线至有轻微阻力时止,此时血流灌注成功,完成脑缺血再灌注损伤模型。假手术组除不插线外,全过程同其它各组。

1.4 神经功能学评分

大鼠脑缺血 3 h 后,拔取线栓,形成再灌注后进行评分,1~4 分为有效模型。剔除症状不明显和死亡大鼠。按照文献[2]的 5 分法评分标准,无神经缺损损伤症为 0 分;提尾时左前肢内收,不能完全伸直为 1 分;行走向左倾倒为 2 分;向左旋转为 3 分;不能行走为 4 分。

1.5 TUNEL 检测凋亡

石蜡切片常规脱蜡入水。标本片加新鲜稀释 Proteinase K 37℃ 消化 15 min。按每张切片取 TdT 和 DIG-dUTP 各 1 μL,加入 18 μL 标记缓冲液中,混匀。加标记液,20 μL/片。置样品于湿盒中,37℃ 标记 2 h。加封闭液 50 μL/片,室温 30 min。用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体,混匀后 50 μL/片加至标本片上。置样品于湿盒中,37℃ 反应 30 min。SABC 稀释混匀后 50 μL/片加至切片。37℃ 反应 30 min。DAB 显色,显色 10 min 左右。脱水,透明,封片。显微镜观察。结果判断以细胞核呈棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.6 免疫组织化学测定

石蜡切片脱蜡水化。用柠檬酸缓冲液(pH 6.0)微波修复 20 min。滴加 50 μL 的 Caspase-8 兔多抗(1:50),置湿盒内 4℃ 过夜;冲洗后滴加 50 μL 聚合物增强剂,室温下孵育 20 min。冲洗后滴加 50 μL 酶标抗兔聚合物,室温下孵育 50 min。冲洗后 DAB 镜下显色 2~3 min。阴性对照:用 PBS 代替兔多抗,其余步骤同前。阳性对照:应用肺腺癌石蜡切片制作阳性对照片,其余步骤同前。结果判断以细胞浆或核呈棕黄色颗粒状为阳性结果。在 20×10 的显微镜下,自上而下,自左而右取四个互不重叠的视野。用 Leica Qwin Plus 图像分析系统进行阳性细胞计数,计算出该切片的平均阳性细胞数。

1.7 统计学处理

有关变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用双因素的析因方差

分析,整体上考察药物处理因素与时间因素对结果的影响有无交叉,再通过单因素方差分析对结果进行分析。单因素方差分析两两比较,如果尚不能确认方差不齐,则采用 Bonferroni 检验,如果已经确定方差不齐,则采用 Tamhane's T2 检验。应用 SPSS 13.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 缺血 3 小时再灌注后神经功能评分

采用双因素的析因方差分析表明神经学症状评分时间因素与药物分组因素之间不存在交互作用。采用单因素方差分析模型组、红花组、黄芪组、黄芪加红花组各组大鼠脑缺血再灌注药物主效应(即各组所有动物的总体评分结果),运用两两比较的 Bonferroni 检验(因经方差齐性检验尚不能认为方差不齐),黄芪组、黄芪加红花组与模型组比较,差异均有显著性($P < 0.05$);红花组、黄芪组、黄芪加红花组相互之间比较差异无显著性(表 1)。

表 1 各组神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	再灌注 12 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h	药物主效应
假手术组	6	0	0	0	0
模型组	18	3.17 ± 0.75	2.83 ± 0.75	2.67 ± 0.52	2.89 ± 0.68
黄芪加红花组	18	2.50 ± 0.55	2.00 ± 0.63	1.50 ± 0.55	2.00 ± 0.69 ^a
红花组	18	2.67 ± 0.82	2.33 ± 0.52	2.17 ± 0.41	2.38 ± 0.61
黄芪组	18	2.50 ± 0.84	2.17 ± 0.75	1.83 ± 0.75	2.16 ± 0.79 ^a

a为 $P < 0.05$ 与模型组比较。

2.2 各组缺血再灌注 24 小时凋亡神经细胞数比较

神经细胞凋亡主要出现于大鼠缺血侧脑组织中,非缺血侧几乎无凋亡细胞出现,假手术组中仅有零星分布,模型组和各治疗组缺血侧脑部均有凋亡细胞,主要分布于皮质和纹状体缺血周边区,在缺血中心区较少。各治疗组与模型组比较,差异均有显著性($P < 0.01$);在治疗组中,黄芪加红花组和红花组、黄芪组比较,差异均有显著性($P < 0.01$, $P < 0.05$ 表 2)。

2.3 各组天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 阳性表达水平比较

采用双因素的析因方差分析结果表明: Caspase-8 阳性表达水平时间因素与药物分组因素之间存在交互作用。采用单因素方差分析各组脑缺血再灌注各时间点的主效应:缺血再灌注 12 h 各治疗组和模型组比较,差异均有显著性($P < 0.01$);红花组、黄芪组和黄芪加红花组比较,差异有显著性($P <$

0.01)。缺血再灌注 24 h 和缺血再灌注 48 h 各组之间差异均有显著性($P < 0.05$ 表 3)。

表 2 各组凋亡神经细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	再灌注 24 h
假手术组	3	2.34 ± 1.22
模型组	6	41.8 ± 6.31
黄芪加红花	6	13.83 ± 1.64 ^a
红花组	6	25.67 ± 2.81 ^{ab}
黄芪组	6	19.17 ± 3.79 ^{ac}

a为 $P < 0.01$ 与模型组比较; b为 $P < 0.01$, c为 $P < 0.05$ 与黄芪加红花组比较。

表 3 各组不同时间点天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 阳性表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	再灌注 12 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
假手术组	3.43 ± 1.21	2.21 ± 1.51	2.42 ± 1.34
模型组	29.33 ± 3.33	25.83 ± 3.00	20.00 ± 1.33
黄芪加红花组	18.50 ± 1.42 ^a	13.00 ± 2.65 ^a	10.50 ± 1.76 ^a
红花组	23.22 ± 3.19 ^b	20.83 ± 1.82 ^{ab}	17.17 ± 2.01 ^b
黄芪组	21.83 ± 2.33 ^a	16.67 ± 2.03 ^{ab}	14.17 ± 2.33 ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与模型组比较; b为 $P < 0.01$, 与黄芪加红花组比较。

3 讨论

局灶性脑缺血再灌注后神经细胞死亡存在坏死和凋亡两种方式,在梗死中心以坏死为主,在半暗带以细胞凋亡为主。研究局灶性脑缺血再灌注后半暗带细胞凋亡及各种保护措施的机制有重要的临床意义。在细胞凋亡的中心控制和效应阶段,最重要的事件是发生 Caspase 的活化。其中 Caspase-8 启动后可直接激活效应 Caspase 的级联反应,诱导细胞 Caspase-3、Caspase-6 的活化,也可以诱导线粒体膜电位的丧失和细胞色素 C 的释放,启动线粒体下游 Caspase 效应酶的激活,最终诱导细胞凋亡^[4]。重组 Caspase-8 能激活几乎所有的 Caspase,表明它位于凋亡级联反应的顶点。

脑缺血再灌注属中医“中风”范畴。中医理论认为气血是脑生长发育和产生各种功能的物质基础,气血失常也是脑病发病的主要病机,而益气活血是治疗中风的基本原则。清代医家王清任综合历代医家的观点,认为“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”,因而提出气虚血瘀论,强调在活血化瘀药的基础上配合补气药以促进气血运行。黄芪作为中药当中的一味经典补气药,生用有益气固表、利水消肿、托毒生肌功效。红花作为一种

应用普遍的活血药,具有活血通经,祛瘀止痛之功效。现代研究表明,黄芪提取物能改善大鼠局灶性脑缺血再灌注的神经功能学评分,减轻脑组织的含水量,减小梗死体积,改善脑组织的病理变化^[5]。曲友直等^[6]证明黄芪可上调 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (B cell Lymphoma/Leukemia-2 Bcl-2) 蛋白的表达,从而降低脑缺血再灌注后神经细胞凋亡。陈亭亭等^[7]研究发现红花的有效成分可抑制脑缺血后促炎因子的表达。曲友直等^[8]应用川芎嗪、黄芪合用,发现其可通过抑制脑缺血再灌注后原癌基因蛋白表达从而减少神经细胞凋亡作用。王新高等^[9]运用益气活血的补阳还五汤,其可能通过抑制基质金属蛋白酶 9 起到保护脑缺血再灌注后的血脑屏障,减轻脑水肿的作用。在此基础上,本文运用黄芪注射液和红花注射液研究益气活血法对脑缺血再灌注的影响。

在本实验中,假手术组神经功能未见损伤,神经细胞凋亡和 Caspase-8 阳性表达极少,而模型组 Caspase-8 阳性表达明显,而且其空间分布与神经细胞凋亡基本一致,这说明 Caspase-8 参与了脑缺血再灌注后的神经细胞凋亡的调控。在改善神经功能方面,红花组、黄芪组、黄芪加红花组均优于模型组,但药物干预的三组之间差异不明显。在神经细胞凋亡方面,主要是出现在半暗带,模型组表达明显,表明造模方法能够达到预期效果;黄芪加红花组优于黄芪组和红花组,表明益气活血法优于单独的益气或活血。在 Caspase-8 阳性表达方面,随着再灌注时间

的延长,其表达下降,考虑与缺血耐受现象有关^[10]。而红花组、黄芪组、黄芪加红花组均能减少其表达,表明干预药物可能通过下调 Caspase-8 的表达,阻滞死亡受体诱导的 Caspase 级联反应,从而抑制凋亡,达到脑保护的作用。而黄芪加红花组较黄芪组和红花组下降更为明显,表明益气活血法比单纯的益气法或活血法具有更好的治疗缺血性脑中风的作用。

[参考文献]

- [1] 赵国平. 中药大辞典(第二版)[M]. 上海:科学技术出版社, 2006 1 376 2 811
- [2] Kametsu Y, Osuga S, Hakin AM. Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat [J]. *Cereb Blood Flow Metab* 2003 23 (4): 416-422
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rat [J]. *Stroke* 1989 20 (1): 84-91
- [4] Henshall DC, Bonislawski DP, Skradski SL, et al. Cleavage of bid may amplify Caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures [J]. *Neurobiol Dis* 2001 8 (4): 568-580
- [5] 曹曦,李卫平,王绍斌,等. 黄芪提取物对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2005 40 (5): 408-411
- [6] 曲友直,赵燕玲,秦怀洲,等. 黄芪对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J]. 神经疾病与精神卫生, 2007, 7 (1): 13-15
- [7] 陈亭亭,杜玉娟,刘晓雷,等. 羟基红花黄色素 A 对脑缺血大鼠皮质炎症信号转导途径相关因子的抑制作用[J]. 药学学报, 2008 43 (6): 570-575
- [8] 曲友直,赵燕玲,高国栋. 川芎嗪联合黄芪对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Fos 蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006 13 (2): 123-125
- [9] 王新高,童萼塘,孙圣刚. 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005 13 (5): 579-582
- [10] 方芳,方云祥. 缺血耐受的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007 15 (2): 158-160

(此文编辑 李小玲)