

养血清脑颗粒对缺血/再灌注大鼠脑炎性因子表达和轴突再生的影响

陶 涛,秦新月,徐广会

(重庆医科大学附属第一医院神经内科、重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨养血清脑颗粒对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤后皮质核因子- κ Bp65(nuclear factor- κ Bp65,NF- κ Bp65)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、神经微丝蛋白-200(neurofilament protein-200,NF-200)的表达及神经功能的影响。**方法:**72只健康的成年雄性SD大鼠,随机分为假手术组(S组)、缺血/再灌注组(I/R组)、生理盐水对照组(I/R+C组)和养血清脑颗粒治疗组(I/R+YXQ组)。在缺血/再灌注后第2天及第2周,分别采用免疫组织化学法观察NF- κ Bp65,IL-6,NF-200的表达,Western blot法检测缺血脑组织NF- κ Bp65蛋白的表达,楼梯测试评估大鼠的神经功能。**结果:**缺血/再灌注后第2天,I/R组大鼠缺血侧皮质NF- κ Bp65,IL-6表达明显增高($P<0.001$),NF-200表达显著降低($P<0.001$),同I/R组相比,I/R+YXQ组NF- κ Bp65,IL-6表达降低($P<0.001$);缺血/再灌注后第2周,同I/R组相比,I/R+YXQ组NF-200表达增加($P<0.001$),神经功能评分无明显改善($P=0.178$)。**结论:**养血清脑颗粒可能通过减轻局灶性脑缺血/再灌注损伤后皮质神经元的炎症反应,从而促进轴突相关蛋白的表达,改善神经功能。

【关键词】养血清脑颗粒;脑缺血/再灌注;核因子- κ B;轴突再生;大鼠

【中国图书分类法分类号】R743.31

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-30

Effects of Yangxueqingnao granule on inflammatory factor expressions and axonal regeneration in rats with focal cerebral ischemia reperfusion

TAO Tao, QIN Xinyue, XU Guanghui

(Department of Neurology, Key Laboratory of Neurology in Chongqing,
The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of Yangxueqingnao granule on expressions of nuclear factor- κ Bp65(NF- κ Bp65), interleukin-6(IL-6) and neurofilament protein-200(NF-200) in cortex and neurological function after focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** Seventy-two SD rats were randomly divided into sham-operated group(S group), cerebral ischemia/reperfusion group(I/R group), normal saline control group(I/R+C group) and Yangxueqingnao granule treated group(I/R+YXQ group). Neurological function was measured using Montoya staircase test. Changes in expressions of NF- κ Bp65 and IL-6 were analyzed by immunohistochemistry and Western blot, respectively. NF-200 immunohistochemical staining was used to evaluate axonal regeneration. **Results:** At the 2nd d after ischemia reperfusion, expressions of NF- κ Bp65 and IL-6 in ischemic cortex were significantly increased($P<0.001$), while those of NF-200 were significantly decreased in I/R group($P<0.001$). Expressions of NF- κ Bp65 and IL-6 were lower in IR+YXQ group than in I/R group($P<0.001$). At the 2nd week after ischemia reperfusion, expressions of NF-200 positive cells in I/R+YXQ group were increased compared with those in the I/R group($P<0.001$) and behavioral tests showed no difference in neurological improvement($P=0.178$). **Conclusions:** Yangxueqingnao granule can improve neurological function recovery after focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats, which may be associated with the inhibition of inflammation reactions.

【Key words】Yangxueqingnao granule; cerebral ischemia/reperfusion; nuclear factor- κ B; axonal regeneration; rats

缺血性脑血管病是导致人类致残最主要的病因,中枢神经系统损伤后轴突再生及神经网络重组与神经功能恢复关系紧密,因此缺血性脑卒中后神经再生是目前神经科学研究的热点。养血清脑颗粒是一种现代中药复方制剂,其主要成分为当归、川芎、

熟地、细辛等,具有改善软脑膜微循环,增加脑血流量,缓解脑血管痉挛的药理基础,从而起到改善慢性脑缺血,保护神经元的作用^[1]。本实验采用大鼠大脑中动脉栓塞模型观察养血清脑颗粒对炎性因子核因子- κ Bp65(nuclear factor- κ Bp65,NF- κ Bp65)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、轴突相关蛋白的表达及神经功能恢复的影响,从而探讨其对脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用。

作者介绍:陶 涛,Email:congsheng1984@yahoo.com.cn,

研究方向:脑血管病的基础研究。

通信作者:秦新月,Email:qinxinyue@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:30770762)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 250~280 g, 购于第三军医大学大坪医院动物实验中心。养血清脑颗粒(天津天士力制药股份有限公司; 国药准字 Z10960082), 兔抗 NF- κ Bp65 单克隆抗体(美国 CST 公司), 兔抗 IL-6 多克隆抗体(武汉博土德公司), 小鼠抗 NF-200 多克隆抗体(北京博奥森公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大脑中动脉闭塞/再灌注模型的制作 参照本课题组前期的实验方法^[2], 经腹腔注射 3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g)麻醉大鼠后, 将其仰卧位固定在手术台上, 颈正中切口, 逐层分离肌肉和筋膜, 暴露右侧颈总动脉, 颈内与颈外动脉。烧断颈外动脉的分支甲状腺上动脉及颈内和颈外动脉之间的交通支。夹闭颈总动脉和颈内动脉, 用眼科剪在颈外动脉残端做一切口, 由此向颈内动脉缓慢插入预先肝素化的线栓(0.23~0.26 mm), 插入深度距离颈总动脉分叉处约 18 mm 时微感阻力即到大脑中动脉起始部, 用丝线结扎线栓并缝合伤口。缺血 2 h 后轻轻拔出线栓, 待栓头到达动脉分叉处停止, 实现再灌注。手术后用恒温毯使其肛温维持在 37 ℃。假手术组仅分离右侧颈总动脉、颈内和颈外动脉, 不插入线栓。

1.2.2 动物分组及给药 72 只 SD 大鼠随机分为假手术组(S 组)、缺血/再灌注组(I/R 组)、生理盐水对照组(I/R+C 组)和养血清脑颗粒治疗组(I/R+YXQ 组), 每组 18 只。养血清脑颗粒于再灌注的同时进行灌胃给药(2 g/kg), 每日 1 次。对照组以等量的生理盐水代替药物灌胃。

1.2.3 免疫组织化学 术后第 2 天及第 2 周各组大鼠进行神经功能评分后, 取 SD 大鼠缺血脑组织制作石蜡切片(片厚 4 μ m)。参照 SP 法试剂盒说明书, DAB 显色后在 Olympus 显微镜下观察并摄片。用 Image Pro-Plus 软件对所测图像进行定量分析, 采用平均吸光度值作为待测蛋白的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 NF- κ Bp65 蛋白表达 各组分别在术后第 2 天断头取脑, 按照凯基核蛋白提取试剂盒(南京凯基)操作方法提取核蛋白。以 30 μ g 蛋白/电泳道上样, 10% SDS-PAGE 电泳后转膜, 封闭, 抗 NF- κ Bp65(1:1 000), 抗 β -actin(1:1 000)4 ℃孵育过夜, 孵育二抗, Bio-Rad 凝胶扫描成像系统显影拍照。采用 Quantity One 图像分析软件测定各条带的吸光度值, NF- κ Bp65/ β -actin 的比值作为该蛋白表达的相对含量。

1.2.5 行为学评分 大鼠运动功能评价参照 Montoya 等^[3]设计的“楼梯测试”: 将大鼠放入用树脂玻璃制成的透明盒子, 盒子内两侧各有 7 层楼梯, 每个楼梯的圆形食槽放置 45 mg

食物小球, 每 5 min 添加 1 次, 将大鼠左前肢在 1 h 内抓取食物小球的个数作为其前肢运动功能的评分。大鼠在脑缺血/再灌注前 2 周进行左侧前肢的运动功能训练, 脑缺血/再灌注后 1、2 周进行左前肢运动功能的评估。

1.3 统计学分析

计量数据均表示为($\bar{x} \pm s$), 所有资料采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。方差齐性数据, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 并采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠缺血侧皮质 IL-6、NF- κ Bp65 蛋白的表达

免疫组化显示缺血/再灌注后第 2 天, I/R 组缺血侧皮质内 IL-6(0.414 $\pm$ 0.024)和 NF- κ Bp65(0.706 $\pm$ 0.085)的表达同 S 组(0.208 $\pm$ 0.019; 0.180 $\pm$ 0.014)相比明显增高($P < 0.001$), 主要表达在细胞质和细胞核。I/R+YXQ 组 IL-6(0.320 $\pm$ 0.023)和 NF- κ Bp65(0.392 $\pm$ 0.084)的表达明显低于 I/R 组($P < 0.001$)。缺血/再灌注后第 2 周, I/R 组 IL-6 和 NF- κ Bp65 的水平均显著下降恢复到正常水平, 同 I/R+YXQ 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2.2 大鼠缺血侧皮质轴突再生情况

免疫组化染色显示 S 组可见大量 NF-200 反应阳性细胞, NF-200 主要位于细胞膜和轴突膜上。I/R 组在缺血后第 2 天时 NF-200 反应阳性细胞显著减少, 阳性纤维结构紊乱, 长度缩短。缺血后第 2 周, I/R 组缺血侧皮质神经元 NF-200 阳性细胞有所增加, 结构仍较紊乱。I/R+YXQ 组在缺血后第 2 周时 NF-200 蛋白表达相对值为(0.166 $\pm$ 0.014)较 I/R 组(0.139 $\pm$ 0.010)有所增加, 排列较规则, 差异有统计学意义($P = 0.003$), 但在手术后第 2 天时其表达同 I/R 组表达无明显差异($P > 0.05$)(图 1)。

2.3 大鼠缺血侧皮质神经元核抽提物中 NF- κ Bp65 蛋白的含量

Western blot 检测结果显示 I/R 组(1.078 $\pm$ 0.206)和 I/R+C 组(0.923 $\pm$ 0.053)在缺血/再灌注后第 2 天 NF- κ Bp65 蛋白表达均明显高于 S 组(0.152 $\pm$ 0.062), 差异有统计学意义($P < 0.001$), 与 I/R 组比较, I/R+YXQ 组 NF- κ Bp65 蛋白(0.553 $\pm$ 0.085)的增加明显受到抑制($P < 0.001$)(图 2)。缺血/再灌注后第 2 周, I/R 组和 I/R+C 组 NF- κ Bp65 蛋白恢复到 S 组水平($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠 IL-6 和 NF- κ Bp65 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of IL-6 and NF- κ Bp65 expressions in rats between four groups($\bar{x} \pm s$)

分组	例数(<i>n</i>)	第 2 天		第 2 周	
		IL-6	NF- κ Bp65	IL-6	NF- κ Bp65
S 组	6	0.208 $\pm$ 0.019	0.180 $\pm$ 0.014	0.212 $\pm$ 0.012	0.212 $\pm$ 0.034
I/R 组	6	0.414 $\pm$ 0.024	0.706 $\pm$ 0.085	0.220 $\pm$ 0.016	0.229 $\pm$ 0.044
I/R+C 组	6	0.401 $\pm$ 0.019	0.694 $\pm$ 0.088	0.226 $\pm$ 0.010	0.210 $\pm$ 0.026
I/R+YXQ 组	6	0.320 $\pm$ 0.023	0.392 $\pm$ 0.084	0.214 $\pm$ 0.022	0.206 $\pm$ 0.031
<i>F</i> 值		120.763	69.747	1.030	0.501
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.400	0.686

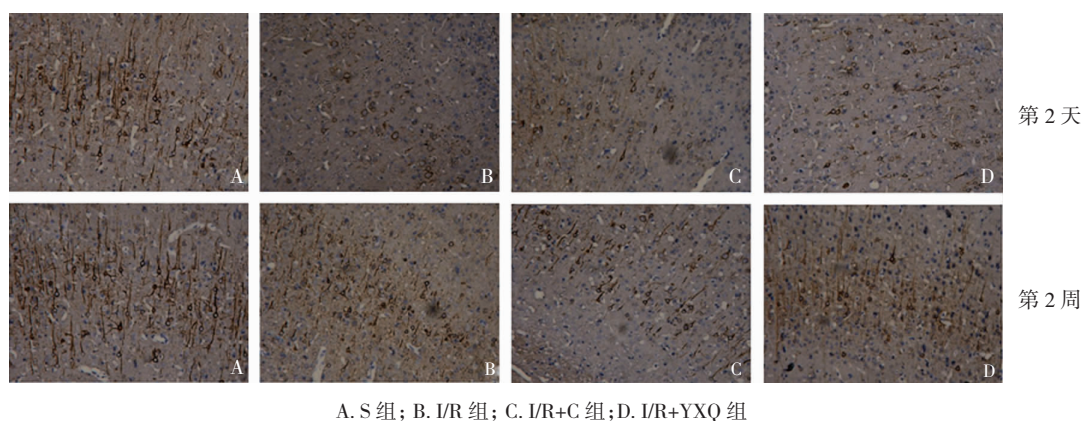


图 1 大鼠缺血/再灌注后第 2 天及第 2 周后缺血侧皮质 NF-200 免疫组化染色 (100 ×)

Fig.1 NF-200 protein immunohistochemical staining in ischemic cortex of rats at the 2nd day and the 2nd week after ischemia/reperfusion (100 ×)

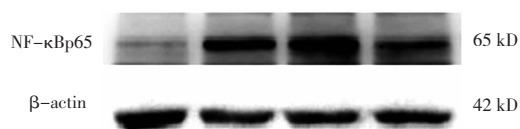


图 2 Western blot 检测大鼠缺血/再灌注后第 2 天缺血侧皮质 NF-κBp65 蛋白的表达

Fig.2 Expressions of NF-κBp65 in ischemic cortex of rats at the 2nd day after ischemia/reperfusion detected by Western blot

2.4 大鼠行为学评分

造模前各组大鼠楼梯测试左前肢运动功能无明显差异 ($P>0.05$), 同 S 组 (69.33 ± 1.37) 比较, I/R 组 (21.33 ± 1.63) 和 I/R+YXQ 组 (22.67 ± 1.63) 在缺血/再灌注后第 2 周时左前肢抓取能力明显降低 ($P<0.001$), 但 2 组之间比较差异无统计学意义 ($P=0.178$)。

3 讨论

脑卒中是我国第一大致死及成人致残性疾病。缺血性卒中患者的康复是目前研究的热点, 中枢神经的再生是神经康复的关键所在, 通过促进缺血性脑损伤后神经元轴突的生长, 增强其与周围脑组织重新建立神经网络有助于神经功能的恢复。NF-200 是神经元特有的结构蛋白, 在促进轴突再生、维持轴浆运输及细胞间信号传递方面起到重要作用^[4]。因此本实验将 NF-200 的免疫染色评价神经元轴突的形态及轴突生长。

目前已证实, 养血清脑颗粒具有抗氧化、缓解血管痉挛、增加脑血流量等药理作用^[1]。Xiong 等^[5]研究表明养血清脑颗粒具有抗氧化, 增强胆碱乙酰转移酶的活性, 抑制海马神经元的凋亡等作用, 从而促进慢性脑缺血大鼠认知功能改善。养血清脑颗粒的神经保护作用同时与维持神经元突触结构完整

性有关^[6]。本研究发现, 养血清脑颗粒能抑制脑缺血/再灌注损伤急性期的炎症反应, 缺血/再灌注后第 2 周时, 可提高缺血侧皮质 NF-200 蛋白的表达, 使大鼠的神经功能评分增加。

综上所述, 养血清脑颗粒对大鼠脑缺血/再灌注损伤具有神经保护作用, 其机制可能与抑制脑缺血急性期炎症因子的活化, 上调缺血侧皮质轴突蛋白的表达, 促进大鼠神经功能的恢复有关。

参 考 文 献

- [1] 张玲, 褚扬, 马晓慧, 等. 养血清脑颗粒的药理作用研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(5): 769-771.
Zhang L, Chu Y, Ma X H, et al. Advances in research on the pharmacological effects of Yangxue Qingnao granule [J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(5): 769-771.
- [2] Zhang G, Zhang J H, Feng J, et al. Electrical stimulation of olfactory bulb downregulates RGMa expression after ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Brain Res Bull, 2011, 86(3-4): 254-261.
- [3] Montoya C P, Campbell-Hope L J, Pemberton K D, et al. The 'staircase test': a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats [J]. J Neurosci Methods, 1991, 36: 219-228.
- [4] Gu X X, Cai D F, Yang Y K, et al. Study on Yangxue Qingnao granule in treating chronic cerebrovascular insufficiency [J]. Chin J Integr Med, 2005, 11(1): 22-26.
- [5] Xiong L, Zhang J J, Sun D, et al. Therapeutic benefit of Yangxue Qingnao granule on cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(2): 134-140.
- [6] 吴导琦, 曾丽莉, 陈生弟. 养血清脑颗粒对大鼠慢性脑缺血细胞凋亡及神经细胞突触结构的影响 [J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2006, 3(4): 227-229.
Wu D Q, Zeng L L, Cheng S D. Effects of nourishing blood and cleaning brain granule on neuronal apoptosis and synaptic structure in rats with chronic cerebral ischemia [J]. J Neurology and Neurorehabil, 2006, 3(4): 227-229.

(责任编辑: 关蕴良)