

·基础研究·

活血通络组方对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能恢复及其抗凋亡机制研究*

李 花¹ 刘旺华^{2,3} 周小青² 何 倩²

摘要 目的:探讨活血通络组方对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能恢复及其抗凋亡机制研究。**方法:**大脑中动脉闭塞再通法建立脑缺血再灌注模型,采用神经行为学评分评价神经功能的恢复,跳台法测试大鼠学习和记忆成绩,原位末端标记法检测凋亡神经元,用免疫组化法检测 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)、凋亡蛋白酶(caspase-8、caspase-3)阳性细胞数。**结果:**与模型组比较,活血通络组的学习和记忆成绩均优于模型组,神经功能损伤评分亦有明显降低,神经元凋亡指数(AI)、FADD、caspase-8、caspase-3 阳性细胞数均显著减少。**结论:**FADD、caspase-8、caspase-3 在脑缺血再灌注后细胞凋亡过程中发挥重要作用,活血通络组方能减轻脑缺血再灌注后神经功能损伤,其机制可能与抑制细胞凋亡死亡受体通路有关。

关键词 脑缺血再灌注;神经功能;Fas 相关死亡结构域蛋白;凋亡蛋白酶;活血通络组方

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:

A study on the effects of huoxuetongluo recipe on neural function recovery after cerebral ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism of anti-apoptosis/LI Hua, LIU Wanghua, ZHOU Xiaoqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009,24():

Abstract Objective: To study the effects of huoxuetongluo recipe on neural function recovery after cerebral ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism of anti-apoptosis. **Method:** The model of cerebral ischemia reperfusion (I/R) was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) and recanalization. Terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method was used to detect the apoptotic neurocytes. The positive neurons of Fas associated with death domain protein(FADD),caspase-8 and caspase-3 were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with model group, the apoptotic index (AI) and the positive neurons of FADD, caspase-8, caspase-3 decreased markedly in huoxuetongluo group, the learning and memory abilities also increased, the scores of neural function impairment decreased significantly ($P<0.01—0.05$). **Conclusion:** FADD, caspase-8 and caspase-3 play important roles in the apoptosis after cerebral I/R injury. Huoxuetongluo recipe could improve the neural function, and the mechanism maybe concern with suppressing the pathway of apoptosis death receptors.

Author's address The Basic Subject of Clinic of TCM, School of Preclinical Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, 410007

Key words cerebral ischemia reperfusion; neural function; Fas-associated with death domain protein; caspase; huoxuetongluo recipe

缺血性脑血管病具有发病率高、致残率高、死亡率高的“三高”特点,是威胁人类尤其是中老年人健康的常见病、多发病,是引发血管性痴呆的主要原因,已经成为一个重大的公共卫生问题。采取措施促进卒中后损伤神经功能的重建是全世界神经科学工作者研究的热点和难点之一。卒中后缺血区的急性坏死和缺血半暗带神经元凋亡是导致神经功能下降的重要原因。以往的研究表明,活血通络组方治疗可降低脑缺血再灌注大鼠脑组织自由基浓度,减轻脑细胞内钙超载,提高学习记忆成绩^[1],而其保护神经功能是否与其抗凋亡机制有关尚不清楚。本文从细胞凋亡死亡受体通路研究活血通络组方对脑缺血再

灌注后神经元功能保护作用及对神经元凋亡的干预作用机制,为临床应用提供实验依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 药物

* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(07JJ6056);湖南省教育厅科研项目(07C475)

1 湖南中医药大学基础医学院临床基础学科,湖南长沙,410007

2 湖南中医药大学基础医学院病理生理实验室

3 通讯作者

作者简介:李花,女,讲师,博士

收稿日期:2008-12-13

活血通络方由丹参、三七、地龙、远志、淫羊藿等药组成,原药材购自湖南中医药大学附属一医院药房,经水煮醇提法浓缩制成浸膏粉备用。尼莫地平由正大青春宝药业生产。

1.2 主要试剂和仪器

原位细胞凋亡检测盒为中山生物工程有限公司产品;Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas associated with death domain protein, FADD)、凋亡蛋白酶(caspase-8,caspase-3)兔抗多克隆抗体系 Chemicon 公司产品,抗体效价 1:100;生物素化羊抗兔 IgG 系武汉博士德公司产品;多聚赖氨酸为武汉博士德生物有限公司产品;水合氯醛由中国白鹤化工厂生产。直径 0.26mm 单尼龙线为市售,使用前剪成 5cm 长的线段,筛选出前端光滑、钝圆、大小一致者,于 2cm 处做好标记,前段 3cm 浸入 0.1% 的多聚赖氨酸 5min,自然晾干,临用前在前端蘸取肝素;马头牌 GPS 型双极电凝器(上海医用激光仪器厂生产);彩色图像分析系统(Optimas,美国);跳台装置(湖南中医药大学病理生理实验室提供)。

1.3 动物分组及处理方式

清洁级 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重 280—300g,中南大学湘雅医学院动物学部提供(医动字第 20-010 号)。随机分为 4 组,即假手术组、模型组、活血通络组、尼莫地平组,每组各 18 只。模型组用大脑中动脉闭塞法(MCAO)造模;活血通络组为 MCAO,并给予活血通络药物;尼莫地平组为 MCAO,并给予尼莫地平药物;假手术组除不插线外,余操作过程同 MCAO。灌胃给药,1ml/kg 体重,从手术前 3d 开始给药,每天 1 次,再灌注 20h、40h 分别给药 1 次,活血通络组剂量为 4g/kg 体重,尼莫地平组剂量为 0.0108g/kg 体重,假手术组、模型组给予等体积蒸馏水。

1.4 模型制备

根据 Longa 等^[2]方法建立 MCAO 局灶性脑缺血再灌注模型。10%水合氯醛(0.35g/kg)麻醉,仰卧位固定。颈正中切口,分离暴露左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和翼颤动脉。结扎翼颤动脉,在距颈动脉叉 1cm 处结扎颈外动脉,并于结扎处远心端用电凝器灼断,游离颈外动脉。动脉夹夹闭颈总动脉,提起颈外动脉游离端使其与颈内动脉成一直线,于颈外动脉结扎处近心端约 0.5cm 处剪一切口,将线栓蘸取肝素后,由切口向颈内动脉插入至有轻微阻力感停止(18.0 ± 0.5 mm),固定线栓,阻闭 1h 后抽出尼龙线,扎紧动脉残端,缝合皮下组织和皮肤,再灌注 47h。术中用烤灯维持肛温 36.5—37℃,手术后恒温

(28℃)饲养,假手术组除不插线外,全过程同其他各组。以清醒后右侧前肢出现腕屈,肩内旋,前进时向右侧转圈、歪倒,并出现霍纳征为模型成功的判断标准,不成功者剔除。

1.5 跳台实验^[3]

塑料板被动回避反射箱,长 50cm、宽 10cm、高 35cm,平均分成 5 格,底板设有铜栅,可通交流电,电压 36V,铜栅的一角放置一个木制圆台,圆台高 4.5cm,直径 4.5cm,动物可停留在圆台上回避电击。术后第 1 天开始进行学习训练。训练前先将动物放入箱中自由活动 3min,熟悉环境,然后将动物置于圆台上,接通铜栅电源,记录动物 3min 内错误次数(动物跳下圆台次数)及受电击总时间,作为学习训练成绩。24h 后直接将动物置于圆台上,记录其放入至第 1 次下台受到电击的时间(潜伏期)、3min 内错误次数及受电击总时间,作为记忆测试成绩。

1.6 神经行为学评分

再灌注 47h 后采用盲法进行神经功能损害评分,评测方法见参考文献^[4]。

1.7 样本采集与处理

神经功能评分后在麻醉状态下断头取脑,快速于冰台上取左侧大脑半球,取视交叉后海马区于 4%甲醛固定 3—5d,常规石蜡包埋,做 5μm 厚连续冠状切片。由于动物死亡,各组样本数有所减少。

1.8 指标检测

1.8.1 海马区凋亡细胞检测:采用原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡神经元。凋亡细胞以细胞核呈棕黄色着色并符合形态学上的特征改变,如染色体浓缩、核碎裂、核周有染色体聚集等为阳性细胞,经图像分析仪每个切片随机选择 5 个视野,检测阳性细胞数,用公式(阳性细胞数/全部细胞数)×100%计算细胞凋亡指数(AI),取其平均数。

1.8.2 免疫组织化学染色:采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法,染色步骤按试剂盒说明书进行。每张切片在 400 倍视野下随机选取不重叠的 5 个视野,采用彩色图像分析系统对切片进行图像分析,计数各视野中 FADD、caspase-8、caspase-3 阳性细胞数(胞浆黄色,胞膜为黄色点状),分别以平均值表示 FADD、caspase-8、caspase-3 阳性细胞数。

1.9 统计学分析

数据以均数±标准差表示,用 SPSS14.0 版统计软件进行统计,多组间比较用单因素方差分析,两两比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 跳台法实验成绩

与假手术组比较,模型组大鼠的错误次数及受电击时间显著增多($P<0.01$),潜伏期明显缩短($P<0.01$);与模型组比较,活血通络组和尼莫地平组错误次数、受电击时间均明显减少($P<0.05-0.01$),潜伏期明显延长($P<0.05$);与尼莫地平组比较,活血通络组记忆测试受电击时间略有增加($P<0.05$),其余差异无显著性意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 海马区神经元凋亡指数和神经功能损害评分

与假手术组比较,模型组凋亡指数(AI)及神经功能损害评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,活

血通络组和尼莫地平组凋亡指数及神经功能损害评分显著降低($P<0.05-0.01$),活血通络组和尼莫地平组差异无显著性意义($P>0.05$)。见表2。

2.3 海马区 FADD、caspase-3 和 caspase-8 阳性细胞数

与假手术组比较,模型组的 FADD、caspase-8 和 caspase-3 的阳性细胞数明显增多($P<0.01$);与模型组比较,活血通络组和尼莫地平组的 FADD、caspase-8 和 caspase-3 的阳性细胞数明显减少($P<0.05-0.01$),活血通络组和尼莫地平组上述指标差异无显著性意义($P>0.05$),见表3。

表1 各组大鼠学习训练和记忆测试成绩

($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数	学习训练成绩		记忆测试成绩	
			错误次数(次/3min)	受电击时间(s)	潜伏期(s)	错误次数(次/3min)
假手术组	蒸溜水 1ml/kg	12	4.3±1.5	26.66±8.45	119.71±36.83	2.4±0.8
模型组	蒸溜水 1ml/kg	11	8.5±2.6 ^①	51.27±15.73 ^①	69.70±30.37 ^①	4.7±1.4 ^①
活血通络组	4.0	12	6.3±2.0 ^②	35.00±12.09 ^②	104.26±43.17 ^②	3.2±1.1 ^③
尼莫地平组	0.0108	12	4.9±1.8 ^③	28.19±10.95 ^②	109.19±40.55 ^②	2.9±1.0 ^③

注:与假手术组比较,^① $P<0.01$;与模型组比较,^② $P<0.05$,^③ $P<0.01$;与尼莫地平组比较,^④ $P<0.05$

表2 各组大鼠海马区细胞凋亡指数(AI)和神经功能损害评分比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数	神经功能损害评分	
			AI(%)	评分
假手术组	蒸溜水 1ml/kg	12	4.48±1.32	0.0±0.0
模型组	蒸溜水 1ml/kg	11	39.61±16.02 ^①	8.20±1.23 ^①
活血通络组	4.0	12	23.19±8.42 ^②	6.00±1.33 ^②
尼莫地平组	0.0108	12	20.57±10.26 ^②	6.08±1.38 ^②

与假手术组比较,^① $P<0.01$;与模型组比较,^② $P<0.05$

3 讨论

据卫生部卫生统计信息中心《2006年中国卫生事业发展情况统计公报》公布:脑血管病的死亡率为105.5/10万,居死亡原因第二位。我国脑血管病患者约700万,每年新发病200万,死亡120万人^[5]。随着我国人口老龄化的不断发展,该病将给社会和家庭带来沉重负担,所以日益受到政府和医学界的重视。缺

表3 各组大鼠海马区 FADD、caspase-8、caspase-3 阳性细胞数比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数	FADD	caspase-8	caspase-3
假手术组	蒸溜水 1ml/kg	12	3.25±1.54	5.08±2.11	5.33±2.18
模型组	蒸溜水 1ml/kg	11	26.18±7.10 ^①	40.00±10.60 ^①	38.54±10.46 ^①
活血通络组	4.0	12	15.25±5.28 ^③	23.67±8.62 ^③	23.92±8.06 ^③
尼莫地平组	0.0108	12	18.42±4.62 ^②	27.83±6.98 ^②	26.75±7.79 ^②

与假手术组比较,^① $P<0.01$;与模型组比较,^② $P<0.05$,^③ $P<0.01$

血性脑损伤多会影响患侧的初级运动皮质,其邻近的运动皮质也会受损。再灌注后,进一步破坏幸存的神经细胞,最终损害脑的正常功能,从而不可避免导致学习记忆功能障碍^[6]。缺血梗死区半暗带神经元凋亡是脑血管疾病神经功能缺失的重要原因,近年来挽救脑缺血神经元凋亡成为改善患者神经功能研究的焦点。

细胞凋亡死亡受体通路是缺血诱导细胞凋亡的重要途径之一,其中 FADD、caspase-8、caspase-3 在 Fas、肿瘤坏死因子受体(TNFR)1 等死亡受体介导的细胞凋亡中起着极为重要作用^[7]。FADD 是存在于胞浆中的一种含死亡结构域的胞浆连接蛋白,是死亡受体介导的凋亡途径的关键启动因子,可将膜表面受体与胞浆中细胞凋亡的终末酶连接起来,从而向

胞内传递凋亡信号,介导细胞凋亡^[8]。FADD 不具有酶的活性,但有两个结构域,即羧基端的死亡结构域(death domain,DD)和氨基端的死亡效应结构域(death effected domain,DED)。FADD 的 DD 结构域与 Fas 及 TNF 受体家族中的其他受体分子胞浆段内的 DD 结构域结合,接受凋亡信号,介导死亡受体通路(Fas/FasL)诱导的细胞凋亡。当细胞受 Fas 系统作用后,胞质中的 FADD 蛋白移位至质膜,FADD 的 DD 与 Fas 的 DD 结合,其 DED 结构域则招募并连接 pro-caspase-8 的 DED 部分,形成由 caspase-8、caspase-10 和 C-Flip 构成的死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex,DISC),caspase-8 前体经过加工,以活性形式从 DISC 中释放出来,进而使其他 caspase(caspase-3、caspase-6 和 caspase-7

等)前体裂解为活性亚单位,激活 caspases 级联反应,最终导致细胞凋亡^[9]。在肿瘤坏死因子(TNF)通路中,TNF受体相关死亡域蛋白(TRADD)能通过 DD 区间的相互作用与 TNFR1 的 DD 区发生直接结合,形成 TNFR1–TRADD 复合物,进一步与 FADD 结合,形成 TNFR1–TRADD–FADD 信号复合物。该复合物可通过 caspase–8 活化 caspase–3,启动半胱氨酸蛋白酶的级联过程,最终诱发细胞凋亡^[10]。

本实验以活血通络组方进行预给药,然后采用 MCAO 模型,用跳台实验及神经功能损害评分法评估神经功能,结果显示,活血通络组方能显著改善跳台试验学习训练和记忆测试成绩($P<0.05–0.01$),降低神经功能损害评分($P<0.05$)。再灌注 47h 后,用 TUNEL 法对鼠大脑海马区的细胞凋亡情况进行检测,结果表明,活血通络组方能显著降低缺血再灌注后海马区神经细胞凋亡指数,与缺血再灌注组比较,差异有显著性意义($P<0.05$)。推测活血通络组方改善神经功能损害评分可能与减轻缺血再灌注诱导的神经元凋亡有关。进一步研究发现,脑缺血再灌注 47h 后,FADD、caspase–8 和 caspase–3 阳性细胞显著增多,与文献报道一致^[11],而假手术组仅见单个 FADD、caspase–8 和 caspase–3,提示 FADD、caspase–8 和 caspase–3 可能在脑缺血再灌注所致神经元凋亡中发挥重要作用。活血通络组海马区细胞 FADD、caspase–8 和 caspase–3 阳性细胞明显低于模型组($P<0.05–0.01$)。提示活血通络组方抑制神经元凋亡可能与抑制死亡受体通路 FADD、caspase–8 和 caspase–3 活化有关,因此活血通络组方改善脑缺血再灌注诱导的大鼠学习记忆障碍、降低神经功能损害评分,其机制可能与抑制 FADD、caspase–8 和 caspase–3 蛋白表达有关。抑制神经元凋亡死亡受体通路可能是活血通络组方抗脑缺血损伤的机制之一。该方以丹参为君药,三七为臣药,药理学研究表明丹参酮 II A 能减小脑缺血再灌注诱导的脑梗死体积,降低凋亡相关基因 Bcl–2 和 caspase–3 表达^[12];丹参素能抑制神经细胞凋亡的发生^[13];三七皂苷能减轻脑组织的缺血再灌注诱导的大鼠神经功能缺失^[14],三七皂甙单体 Rb1 通过抑制胞浆型磷脂酶 A2 及相关蛋白表达,减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后脑细胞凋亡,对大脑中动脉缺血再灌注脑损伤

有良好的保护作用^[15],这可能是活血通络组方抗凋亡的物质基础之一。

参考文献

- [1] 周小青,刘旺华,李花,等.丹龙醒脑片对血管性痴呆大鼠学习记忆及脑组织脂质过氧化和钙超载的影响[J].湖南中医药学院学报,2002,22(3):1–4.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84–91.
- [3] 李仪奎主编. 中药药理实验方法学[M]. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.173.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法[M].第3版.北京:人民卫生出版社, 2002.1067—1068.
- [5] 樊东升.北京大学卒中论坛成立暨第一次学术会议在京召开[J].中华医学信息导报,2008,23(9):14.
- [6] 尹明华,洪森荣.脑缺血再灌注对小鼠学习记忆的损伤及山茶花提取物的保护作用[J].中国康复医学杂志,2008,23(3):245—247.
- [7] Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling [J]. J Cell Sci, 2005, 118(pt2): 265–267.
- [8] Harper N, Hughes M, MacFarlane M, et al. Fas-associated death domain protein and caspase–8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor–induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (28):25534—25541.
- [9] Boatright KM, Deis C, Denault JB, et al. Activation of caspase–8 and –10 by FLIP(L)[J]. J Biochem, 2004, 382(pt2): 651—657.
- [10] Poulaki V, Mitsiades CS, McMullan C, et al. Human retinoblastoma cells are resistant to apoptosis induced by death receptors: role of caspase–8 gene silencing [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(1):358—366.
- [11] 胡跃强,肖波,毕方方,等.依达拉奉对脑缺血再灌注后 FADD、caspase–8 表达的影响[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2007,14(1):21—22.
- [12] 李浩,刘开祥,俸军林,等.丹参酮 II A 对鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl–2 和 caspase–3 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,15 (6):442.
- [13] 庞鹤,朱陵群,张文生,等.丹参素对缺氧/缺糖损伤的神经细胞线粒体膜电位和凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志,2006,21(6): 329—331.
- [14] 陈明,王凯华,曾祥发,等.三七总皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤后 p53 蛋白表达的影响[J].首都医药,2007,14(11X):45—46.
- [15] 王东吉,武凡.三七皂甙单体 Rb1 对大鼠脑缺血再灌注时脑细胞凋亡及 cPLA2 蛋白表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007,22(5):414—417.