

通心络对脑梗死大鼠的脑缺血耐受及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

罗方^{1a}, 吴锦晖^{1a}, 罗祖明^{1b}

[摘要] 目的 探讨 Bcl-2、Bax 蛋白对脑缺血耐受的作用及通心络的干预作用。方法 检测不同时程通心络组、全脑缺血-局灶性脑缺血再灌注组及单纯局灶性脑缺血组大鼠的神经行为评分、脑梗死体积、免疫组化法检测 Bcl-2、Bax 蛋白阳性细胞数、TUNEL 法检测神经细胞的凋亡。结果 通心络组的神经行为评分降低, 脑梗死体积减少, 脑缺血半暗带的 Bcl-2 蛋白表达增高而 Bax 蛋白表达减少, 神经细胞的凋亡减少。结论 通心络增加脑缺血半暗带 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制 Bax 蛋白的表达, 从而抑制神经细胞凋亡, 增强缺血预处理诱导的脑缺血耐受。

[关键词] 通心络; 缺血耐受; Bcl-2; Bax; 凋亡; 大鼠

Effects of Tongxinluo on Cerebral Ischemic Tolerance and Expression of Bcl-2 and Bax in Rats with Cerebral Infarction LUO Fang, WU Jin-hui, LUO Zu-ming. Department of Geriatrics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of Tongxinluo on cerebral ischemic tolerance and expression of Bcl-2 and Bax in rats with cerebral infarction. **Methods** The neurophysical assessment and the volume of the cerebral infarction in Tongxinluo group, middle cerebral artery occlusion (MCAO) group, preconditioning and MCAO (PG-MCAO) group were determined at different time point. The expression of Bcl-2 and Bax were measured with immunohistochemistry and the apoptosis of the nerve cells were detected with TUNEL. **Results** Among these groups in the corresponding time, the neurophysical marks of Tongxinluo group was the lowest and the cerebral infarction volume was the smallest at 24 h, 3 d and 5 d points. The Bcl-2 positive neurons were the highest, while the Bax positive neurons and the apoptosis rate of nerve cells were the lowest around the necrotic areas in Tongxinluo group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tongxinluo can improve the cerebral ischemic tolerance and increase the expression of Bcl-2 and decrease that of Bax around the necrotic area after cerebral ischemia in rats.

Key words: Tongxinluo; ischemic tolerance; Bcl-2; Bax; apoptosis; rats

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)03-0209-03

[本文著录格式] 罗方, 吴锦晖, 罗祖明. 通心络对脑梗死大鼠的脑缺血耐受及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(3): 209-211.

缺血性脑卒中因其患病率、致死率、致残率高而受到重视, 如何预防脑卒中复发及启动并增强脑组织对缺血性损伤的耐受力, 减轻急性脑缺血时神经元的损伤是亟待解决的问题。我们采用大鼠全脑-局灶性脑缺血再灌注模型, 观察通心络对 Bcl-2、Bax 蛋白表达和神经细胞凋亡的影响, 探讨通心络对脑的缺血耐受和神经功能康复的干预作用。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 通心络: 河北以岭药业股份有限公司, 主要由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等组成。兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗大鼠 Bax 单克隆抗体、TUNEL 试剂盒和免疫组化试剂盒: 北京中山生物技术有限公司。4% 红四氮蓝(TTC) 溶液、10% 水合氯醛、肝素钠、4% 多聚甲醛: 四川大学基础医学院临床药理基地动物实验室提供。

作者单位: 1. 四川大学华西医院, a. 老年科; b. 神经内科, 四川成都市 610041。作者简介: 罗方(1974-), 女, 四川邛崃市人, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 脑血管病。通讯作者: 罗祖明。

1.2 实验动物与分组 216 只 3 月龄健康 SD 雄性大鼠, 重 240 ~ 270 g (四川大学华西医学中心动物实验中心提供)。实验前在室温下(20℃ ~ 25℃) 保持昼/夜各 12 h, 环境适应性喂养 1 周, 给普通饲料, 自由饮水。随机将大鼠分为: 单纯局灶性脑缺血 2 h 后(MCAO 组) 再灌注 2 h、24 h、3 d、5 d 组, 全脑缺血后(PG-MCAO 组) 局灶性脑缺血 2 h 后再灌注 2 h、24 h、3 d、5 d 组, 全脑缺血后通心络灌胃(通心络组), 局灶性脑缺血 2 h 后再灌注 2 h、24 h、3 d、5 d 组。MCAO 组、PG-MCAO 组、通心络组的各时程组再分别分为脑梗死体积组、免疫组化组、TUNEL 组, 每组 6 只大鼠。

1.3 大鼠模型的制作 采用 Simon 等制作全脑缺血模型的方法^[1], 微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 3 min, 大鼠瞳孔散大, 翻正反射消失表明产生全脑缺血; 否则为未产生全脑缺血, 予以剔除。术后清醒, 提尾无前肢内收屈曲, 爬行时无转圈, 否则予以剔除。

采用稍加改良的 Zealanga 线栓法^[2]制作大鼠局灶性脑缺血再灌注(MCAO) 模型, 单沙尼龙线, 直径 0.285 mm, 加热将一端烤制光滑, 直径 0.25 ~ 0.28

mm。经左颈总动脉的切口插入约 18~20 mm 至大脑中动脉近端,阻断大脑中动脉的血供。阻闭 2 h 后抽出尼龙线。术后提尾右前肢内收屈曲,爬行时向右转圈为成功标志。术中用烤灯维持环境温度 37℃~37.5℃。

MCAO 组单纯行 MCAO;PG-MCAO 组于全脑缺血 3 min 再灌注 5 d 后行 MCAO;通心络组于全脑缺血 3 min,再灌注当天予通心络 1 g/kg·d 用蒸馏水配至 1 ml,1 次/d 灌胃,5 d 后行 MCAO。各组均于 MCAO 再灌注后 2 h 24 h 3 d 5 d 后取材。

1.4 神经行为学评分 采用 Zealunga 评分法^[2]:0 分:无神经功能缺失症状,活动正常者;1 分:不能完全伸展对侧前爪者;2 分:爬行时出现向右转圈者;3 分:行走时,身体向偏瘫侧倾倒者;4 分:不能自发行走,意识丧失者;5 分:死亡。评分 0 分和 5 分被剔除,随机补充,保证每组 6 只大鼠。

1.5 脑梗死体积测定 各组大鼠在规定时间内用 10%水合氯醛 350 mg/kg 腹腔内注射麻醉,血管内灌注 4% TTC 溶液 200 ml。开颅取脑,作脑组织冠状面切片,片厚 1 mm,以数码相机逐一拍照。应用病理图像分析仪测定脑梗死面积,计算梗死体积。

1.6 免疫组化染色 各组大鼠在规定时间内用 10%水合氯醛 350 mg/kg 腹腔内注射麻醉。开胸,经左心室灌注 37℃肝素钠生理盐水 100 ml 冲净血液,灌注 4℃4%多聚甲醛 200 ml。开颅取脑,置于 4%多聚甲醛中保存 24~48 h。取视交叉前后 2 mm 的左侧大脑组织,固定,脱水,石蜡包埋,连续切片,片厚 4 μm,60℃烤片 2 h 备用。

免疫组化染色采用链亲和素-生物素-过氧化物酶法:切片脱蜡,入水后加入 3% H₂O₂ 甲醇溶液,室温下 10 min;加入正常山羊血清,室温下 20 min;加入兔抗 Bcl-2 单克隆抗体(1:100)置 40℃湿盒过夜;加入生物素标记的二抗,室温下 10 min;加入链酶亲和素-过

氧化物酶溶液,室温下 10 min;滴加新鲜配置的 DAB-H₂O₂ 显色液,室温下显色 5~10 min;自来水冲洗,脱水、透明、中性树脂封片,光镜下观察。Bax 免疫组化染色一抗加入兔抗 Bax 单克隆抗体(1:100),其余步骤同上。Bcl-2、Bax 阳性染色为细胞膜和细胞浆呈棕色。随机选取 10×40 视野 10 个,分别测定每个视野的阳性染色细胞数,取其平均值。

1.7 TUNEL 检测 按 TUNEL 检测试剂盒说明操作。在显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞,随机选取 10×40 视野 10 个,分别测定每个视野的 TUNEL 阳性细胞数,取其平均值。

1.8 统计学方法 实验结果以($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 神经行为评分 通心络 2 h 组的神经功能评分与对应时间点的 PG-MCAO 组、MCAO 组无显著性差异($P>0.05$);24 h 组与对应时间点的 PG-MCAO 组无显著性差异($P>0.05$),但低于 MCAO 组($P<0.05$);3 d 5 d 组低于对应时间点的 PG-MCAO 组和 MCAO 组($P<0.05$)。见表 1。

2.2 脑梗死体积 通心络 2 h 组脑梗死体积与 PG-MCAO 组、MCAO 组均无显著性差异($P>0.05$)。通心络 24 h 3 d 5 d 组的脑梗死体积均低于对应时间点的 PG-MCAO 组和 MCAO 组($P<0.05$)。见表 2。

2.3 Bcl-2、Bax 蛋白免疫组化染色 通心络 2 h 组的 Bcl-2 阳性细胞数与 PG-MCAO 2 h 组无显著性差异($P>0.05$),通心络 24 h 3 d 5 d 组的 Bcl-2 阳性细胞数高于对应时间点 PG-MCAO 组和 MCAO 组($P<0.05$),Bax 阳性细胞数低于 PG-MCAO 组和 MCAO 组($P<0.05$)。见表 3、表 4。

2.4 TUNEL 检测 各时间点通心络组的 TUNEL 阳性细胞数低于 PG-MCAO 组和 MCAO 组($P<0.05$)。见表 5。

表 1 各组大鼠不同时间神经行为评分

组别	n	2 h	24 h	3 d	5 d
MCAO 组	18	1.86±0.39	3.32±0.42	4.27±0.39	4.63±0.31
PG-MCAO 组	18	1.88±0.34	2.92±0.58	3.58±0.40 ^a	3.54±0.37 ^a
通心络组	18	1.91±0.46	2.18±0.52 ^a	2.54±0.66 ^{a,b}	2.58±0.48 ^{a,b}

注:a:与 MCAO 组比较, $P<0.05$;b:与 PG-MCAO 组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠不同时间脑梗死体积(mm³)

组别	n	2 h	24 h	3 d	5 d
MCAO 组	6	2.48±0.40	16.79±2.35	27.57±2.93	30.72±2.41
PG-MCAO 组	6	2.50±0.36	11.62±2.19 ^a	16.58±2.47 ^a	21.19±2.61 ^a
通心络组	6	2.44±0.37	7.83±1.04 ^{a,b}	9.75±1.59 ^{a,b}	12.47±2.23 ^{a,b}

注:a:与 MCAO 组比较, $P<0.05$;b:与 PG-MCAO 组比较, $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠不同时间 Bcl-2 阳性细胞数 (/ HD)

组别	n	2 h	24 h	3 d	5 d
MCAO 组	6	9.67±1.52	12.53±4.19	11.80±3.95	10.28±3.15
PC-MCAO 组	6	18.47±1.94 ^a	36.30±2.18 ^a	43.58±3.71 ^a	50.11±4.27 ^a
通心络组	6	21.46±2.14 ^a	53.57±3.68 ^{a,b}	62.66±3.81 ^{a,b}	70.13±6.42 ^{a,b}

注 :a:与 MCAO 组比较 , $P<0.05$;b:与 PC-MCAO 组比较 , $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠不同时间 Bax 阳性细胞数 (/ HD)

组别	n	2 h	24 h	3 d	5 d
MCAO 组	6	29.37±3.28	36.94±4.85	50.17±4.04	61.46±4.11
PC-MCAO 组	6	16.85±2.67 ^a	26.17±3.11 ^a	33.70±3.48 ^a	39.44±2.97 ^a
通心络组	6	8.71±1.05 ^{a,b}	16.97±2.25 ^{a,b}	25.18±3.67 ^{a,b}	28.97±3.02 ^{a,b}

注 :a:与 MCAO 组比较 , $P<0.05$;b:与 PC-MCAO 组比较 , $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠不同时间 TUNEL 阳性细胞数 (/ HD)

组别	n	2 h	24 h	3 d	5 d
MCAO 组	6	37.4±3.71	51.5±5.28	68.2±5.33	72.5±5.93
PC-MCAO 组	6	22.6±2.83 ^a	32.7±4.20 ^a	47.1±4.62 ^a	50.4±4.87 ^a
通心络组	6	13.6±2.31 ^{a,b}	21.5±3.62 ^{a,b}	30.1±3.79 ^{a,b}	38.4±3.78 ^{a,b}

注 :a:与 MCAO 组比较 , $P<0.05$;b:与 PC-MCAO 组比较 , $P<0.05$ 。

3 讨论

1990 年 Kitagawa 等发现 ,对沙土鼠前脑预先行短暂缺血可以减轻随后发生的脑缺血性损伤 ,提出了脑的缺血耐受^[3]。随着研究的深入 ,发现凋亡调控基因 bcl-2 和 bax 可能在其中起着重要作用^[4]。

bcl-2 是一类凋亡抑制基因 ,Bcl-2 蛋白能够控制细胞内 Ca²⁺ 和自由基的堆积以及兴奋性氨基酸的毒性作用所致的神经细胞死亡 ,抑制线粒体释放促凋亡蛋白和细胞色素 C ,促进脑缺血时蛋白质合成的早期恢复 ,使保护性基因的转录和翻译少受影响^[5]。Shimizu 等的在体实验发现 ,Bcl-2 蛋白在耐受组织中表达增加的时间过程和耐受持续的时间一致^[6]。脑的缺血耐受可能是通过增加 Bcl-2 蛋白的表达 ,抑制细胞凋亡 ,挽救神经细胞 ,避免发生选择性迟发性神经细胞死亡。

bcl-2 家族成员之一的 bax 作为凋亡诱导基因能够阻止 Bcl-2 抑制凋亡的作用。bax 能够不依赖外来的刺激就引起细胞死亡 ,被认为是最重要的凋亡诱导基因^[7]。Bcl-2 与 Bax 两者之间蛋白表达水平的高低与凋亡的调控及凋亡的严重性直接相关 :Bcl-2 蛋白表达增高 ,抑制细胞凋亡 ;Bax 蛋白表达增高 ,促进细胞凋亡^[8]。

通心络胶囊能够抑制血小板聚集和血栓形成 ,保护和促进修复内皮细胞 ,抑制血管平滑肌细胞增殖和血浆内皮素水平 ,增加血管内皮细胞一氧化氮含量。本研究结果显示 ,通心络组大鼠减轻脑缺血性损伤的效果较单纯的预缺血更明显。Bcl-2、Bax 蛋白主要表达于脑缺血半影区的皮质、皮层下、海马区的神经细胞的细胞浆和细胞膜。给予通心络干预后 ,Bcl-2 蛋白表达增高、Bax 蛋白表达降低和 TUNEL 阳性细胞数减少更明显 ,提示通心络与缺血预处理对诱导 Bcl-2 蛋白

表达、抑制 Bax 蛋白表达有叠加作用 ,通心络能够增强缺血预处理诱导的脑缺血耐受。

本研究观察了 Bcl-2、Bax 蛋白在脑缺血再灌注后的变化 ,它们参与脑缺血后神经细胞的凋亡以及脑的缺血耐受 ;而通心络诱导机体产生内源性保护机制 ,增进由预缺血诱导的脑缺血耐受 ,减轻局灶性脑缺血所致的脑组织损伤 ,促进神经功能康复。

[参考文献]

[1] Simon RP, Nitro M, Gwinn R. Prior ischemic stress protects against experimental stroke[J]. Neurosci Lett, 1993, 163:135.

[2] Zealanga E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20:83-91.

[3] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain[J]. Brain Res, 1990, 528:21.

[4] Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, et al. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss[J]. Mol Br Res, 1995, 29:1-14.

[5] Williams AJ, Ling G, Berti R, et al. Treatment with the snail peptide CGX-1007 reduces DNA damage and alters gene expression of c-fos and bcl-2 following focal ischemic brain injury in rats[J]. Exp Brain Res, 2003, 153(1):16-26.

[6] Shimizu S, Nagayama T, Jin KL, et al. bcl-2 antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemic in the rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(3):233-243.

[7] Eberspacher E, Werner C, Engelhard K, et al. The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2003, 15(3):200-208.

[8] Wu C, Fujihara H, Yao J, et al. Different expression patterns of Bcl-2, Bcl-x1, and Bax proteins after sublethal forebrain ischemia in C57Black/ Crj6 mouse striatum[J]. Stroke, 2003, 34(7):1803-1808.

(收稿日期:2007-12-18)