

补阳还五汤及其有效部位组方对沙土鼠脑缺血再灌注后脑组织热休克蛋白 70 表达的影响^{*}

邓常青[△] 王 敏 贺福元

内容提要 目的:比较补阳还五汤及其有效部位组方对脑缺血后热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响。方法:采用沙土鼠双侧颈总动脉夹闭脑缺血模型,分别腹腔注射补阳还五汤及其有效部位组方,于缺血 15min 再灌注 48h 后,以 Northern blot 检测脑组织 HSP70mRNA 的表达,以 Western blot 检测其蛋白表达。结果:沙土鼠脑缺血再灌注后,脑组织 HSP70mRNA 和蛋白表达显著增加,补阳还五汤及其有效部位组方可使脑缺血再灌注后 HSP70mRNA 表达减少,补阳还五汤的抑制作用强于有效部位组方,但两者对脑缺血再灌注后 HSP70 蛋白表达的增加均无明显影响。结论:补阳还五汤及其有效部位组方可能通过抗缺血作用而抑制了缺血后 HSP70mRNA 的表达。

关键词 补阳还五汤 有效部位组方 脑缺血再灌注 沙土鼠 热休克蛋白 70

Effect of Buyang Huanwu Decoction and Its Active Regions Combination on Brain Heat Shock Protein 70 Expression in Gerbils after Cerebral Ischemia/Reperfusion DENG Chang-qing, WANG Min, HE Fu-yuan *Hunan College of TCM, Changsha 410007*

Objective: To compare the effects of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) and its active regions combination on brain heat shock protein 70 (HSP70) expression. **Methods:** Cerebral ischemia model gerbils produced by ligating bilateral common carotid artery were injected intraperitoneally by BYHWD and its active regions combination separately. HSP70 mRNA expression was determined by Northern blot test and protein expression determined by Western blot test 48 hrs after ischemia for 15 min and reperfusion. **Results:** The level of HSP70 mRNA and protein expression in ischemic/reperfusion brain tissue increased significantly. BYHWD and its active regions combination could decrease the HSP70 mRNA expression obviously, the inhibition effect of BYHWD was more significant than that of its active regions combination, but neither of them showed any effect on HSP70 protein expression. **Conclusion:** BYHWD and its active regions combination might down-regulate HSP70 mRNA expression in ischemic brain tissue through its anti-ischemic effect.

Key words Buyang Huanwu Decoction, active regions, brain ischemia/reperfusion, gerbil, heat shock protein 70

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组在应激状态下诱导产生的蛋白质,其中分子量为 70KDa 的 HSP70 与缺血性脑损伤具有密切的关系⁽¹⁾。应激状态下如脑缺血缺氧时,受损细胞内的变性蛋白可诱导 HSP70 的表达,增强神经元对缺血缺氧的耐受能力,以维持细胞的功能和生存⁽²⁾。目前认为 HSP70 是缺血性脑损伤较为敏感的指标之一,同时 HSP70 对缺血缺氧性神经元具有保护作用⁽³⁾。补阳还五汤为治疗缺血性脑血管病的有效方剂,我们曾有研究表明,补阳还五汤及其有效部位可防止脑缺血再灌注损伤,改善脑组织能量代谢,对抗兴奋性氨基酸的兴奋毒性^(4,5)。为进一步明确其作用机理,本研究该方及其有效部位组方对

沙土鼠脑缺血再灌注后脑组织 HSP70mRNA 和蛋白表达的影响。现将结果报告如下。

材料与方法

1 药物 补阳还五汤原方由黄芪 60g 赤芍 9g 川芎 6g 当归 9g 地龙 9g 桃仁 9g 红花 9g 组成。上述药物由本院药剂科一次性购齐并鉴定,各药按比例混合,由本院药学院按水煎醇沉法制备成注射剂,生药含量为 2g/ml,用时以生理盐水稀释成 0.4g/ml。另按该方组成比例提取各类有效成分部位,各有效成分部位含量为:总生物碱类相当于含川芎嗪 62.19mg/ml,总多糖类相当于含葡萄糖 62.09mg/ml,总甙元类相当于含阿魏酸 2.41mg/ml,总甙类相当于含黄芪甲甙 0.75mg/ml,挥发油类为 8.84mg/ml。有效部位组方中各有效成分部位的含量为:总生物碱 1.87mg/ml,总多

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39770893)

湖南中医学院(长沙 410007)

[△] 现在广州中医药大学第一附属医院糖尿病研究所(广州 510405)

糖 15.09mg/ml, 总甾元 0.28mg/ml, 总甾 0.23mg/ml, 挥发油 2.69mg/ml。

2 动物 蒙古沙土鼠, 体重为 60~80g, 清洁级, 雌雄兼用, 由卫生部上海生物制品研究所动物中心提供, 合格证号为医动字第 02-21-8 号。

3 试剂与仪器 HSP70(可诱导型)cDNA 探针, 由湖南医科大学病理生理教研室提供, 来自于北京医科大学附属第一医院儿科; 抗 HSP70 多克隆抗体, Upwards Biosystems 产品(工作浓度 1:1000); 随机引物标记试剂盒, Promega 公司产品; Trizol 核酸提取液, Gibco 公司产品。图像分析仪(Stratagene eagle eye II), 美国产品。

4 实验分组与造模 沙土鼠随机分为假手术组、缺血再灌注模型组(简称模型组)、补阳还五汤原方组(简称原方组)、补阳还五汤有效部位方组(简称有效部位方组)。原方组腹腔注射原方 4.0g/kg, 有效部位方组腹腔注射有效部位方液 11ml/kg(各有效部位用量为: 总生物碱 20.55mg、总多糖 166.01mg、总甾元 3.07mg、总甾 2.53mg、挥发油 29.55mg)。假手术组和模型组均腹腔注射等量生理盐水, 次日于缺血实验前同前方法和剂量给药 1 次。给药后 30min, 各组动物均腹腔注射盐酸氯氨酮 60mg/kg(1.2ml/kg)麻醉, 按文献^[4]方法分离两侧颈总动脉。除假手术组外, 各组均以无创性小动脉夹夹闭两侧颈总动脉造成脑缺血。假手术组不夹闭颈总动脉, 其他操作与以上各组相同。在缺血 15min 后, 松开动脉夹行再灌注, 缝合皮肤, 继续饲养。各组均于再灌注后 12、24 和 36h 同前方法腹腔注射药物或生理盐水。在再灌注 48h 后, 各组取雌雄 2 只动物处死, 迅速取脑, 切取前脑皮质和海马, 迅速置液氮中速冻, 再移至 -86℃ 冰箱中保存待测。

5 脑组织 HSP70mRNA 检测 采用 Northern blot 分析进行检测。取脑组织, 以 Trizol 核酸提取液于冰浴下制备匀浆, 并按说明书提取总 RNA, 于 280nm 及 260nm 紫外光波下测定样品 RNA 的光密度并计算其浓度。取 20 μ g RNA 样品, 按文献^[6]于甲醛变性琼脂糖凝胶中进行电泳, 然后进行转膜、预杂交、杂交和洗膜。HSP70cDNA 探针标记采用随机引物标记法进行。经杂交及洗膜后的尼龙膜对 X 线胶片于 -80℃ 下曝光进行放射自显影。用亚甲蓝染色 28S 和 18S rRNA 作为点样对照。

6 脑组织 HSP70 蛋白检测 采用 Western blot 分析进行检测。取脑组织于冰浴下制备成匀浆, 4℃ 下 12 000g 离心 10min, 收获上清蛋白质, 取 20 μ g 样品蛋白点样于 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳分离后转移

至硝酸纤维素膜, 按文献^[6]方法分别用羊抗 HSP70 多克隆抗体(1:1000)及 HRP 标记的兔抗羊 IgG(1:2000)进行孵育, 用 DAB 进行显色。

7 结果分析 将 Northern blot 和 Western blot 结果用图像分析仪扫描信号密度, 以密度值对 HSP70mRNA 和蛋白进行半定量分析。

结 果

1 HSP70mRNA 表达结果分析 以 Northern blot 可在各组动物脑组织中检测到 HSP70mRNA 表达的特异性条带。缺血 15min 再灌注 48h, 模型组 HSP70mRNA 表达量较假手术组平均增加 24.0%; 有效部位方组 HSP70mRNA 表达量比模型组平均降低 8.1%, 但仍高于假手术组 14.0%; 原方组 HSP70 mRNA 表达量比模型组平均降低 36.3%, 且比假手术组平均降低 21.0%(见图 1、2)。

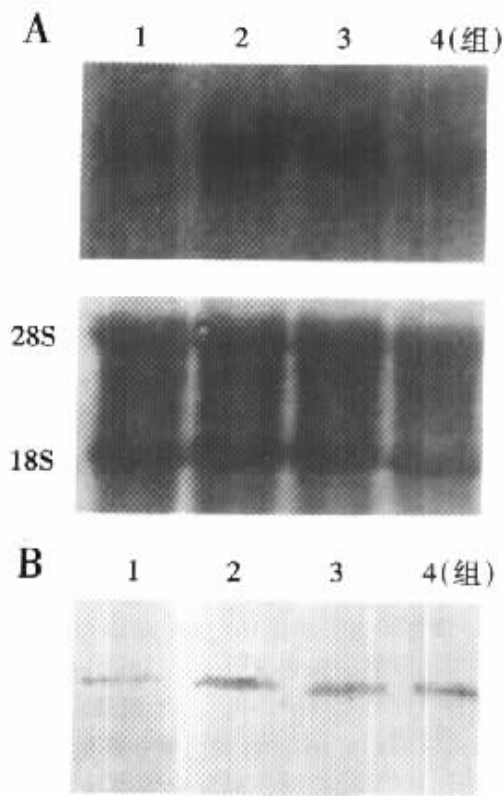


图 1 HSP70 Northern blot (A) 和 Western blot (B) 分析
1 为假手术组 2 为模型组 3 为原方组 4 为有效部位方组; 图 2 同

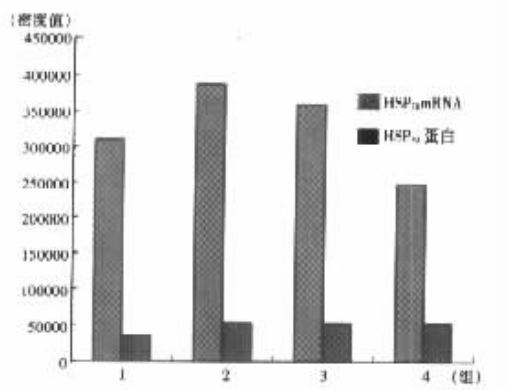


图2 HSP70 mRNA 和 HSP70 蛋白定量分析图

2 HSP70 蛋白表达结果分析 以 Western blot 可在各组动物脑组织中检测到 HSP70 蛋白的表达。缺血 15min 再灌注 48h 后,模型组 HSP70 蛋白表达量比假手术组平均增加 58.0%;有效部位方组 HSP70 蛋白表达量较模型组平均升高 1.3%,比假手术组平均升高 60.0%;原方组 HSP70 蛋白表达量与模型组比较,仅降低 1.9%,但仍比假手术组平均升高 55.0%(见图 1、2)。

讨 论

在中枢神经系统中,HSP70 主要在神经细胞上产生,但也能在胶质细胞和血管内皮细胞上产生。正常情况下,HSP70 mRNA 在细胞内有稳定的表达,但很快被降解,故其含量极低,HSP70 蛋白水平也很低,当细胞受热或化学应激时,HSP70 表达增加。在大鼠局灶性脑缺血 2h 再灌注模型,再灌注后 1 天和 2 天 HSP70 mRNA 表达增加,且与缺血早期(缺血 2h)脑血流减少程度和后期(3 天)组织病理改变相关,提示 HSP70 mRNA 表达是细胞损伤的标志,能较敏感地反应神经元的受损程度^[7,8]。但是,只有 HSP70 基因转录并翻译成蛋白质才能对神经元起保护作用。缺血诱导脑细胞合成 HSP70 蛋白质,同时也获得对随后损伤的抵抗^[9]。在沙土鼠脑缺血模型,HSP70 蛋白主要在海马区内结构完整的可逆性损伤的神经元内表达增加,提示 HSP70 蛋白表达增加可保护神经元免受继发性损伤^[10]。Nowak 等在全脑缺血模型发现海马 CA₁ 区 HSP70 mRNA 表达最显著时 HSP70 蛋白活性却不高,正常情况下蛋白合成需要 ATP 参与,当神经元和胶质细胞因能量衰竭时 HSP70 mRNA 不能翻译,蛋白也不能表达^[11]。HSP70 通过发挥分子伴侣的作用,修饰和调节其他蛋白的功能,通常参与新合成蛋白的折叠,并影响蛋白的细胞内易位,有助于蛋白质生物合成的合适状态,从而发挥细胞保护作用^[12]。

本研究表明,假手术组脑组织可见到 HSP70 mRNA 和蛋白的表达,可能系手术应激所致。模型组脑组织 HSP70 mRNA 和蛋白表达均显著增加,表明在缺血损伤后脑组织表达 HSP70 增加。有研究表明,轻度脑缺血损伤可诱导 HSP70 基因的表达和翻译,中度缺血可诱导其基因的表达但无翻译,重度缺血则基因和蛋白均不表达。由于本模型系短暂性脑缺血,缺血程度相对较轻,故 HSP70 mRNA 和蛋白表达同时增加。补阳还五汤原方和有效部位组方均可抑制脑缺血后 HSP70 mRNA 的表达,以补阳还五汤原方的抑制作用较强,但原方和有效部位组方对 HSP70 蛋白表达均无明显影响。HSP70 mRNA 的表达反映了缺血神经元的受损程度,补阳还五汤及其有效部位可改善沙土鼠脑缺血后脑组织的能量代谢,拮抗兴奋性氨基酸的兴奋毒性^[4,5],故推测补阳还五汤及其有效部位通过上述途径,减轻了脑缺血性应激刺激,从而使 HSP70 mRNA 表达减少。而 HSP70 蛋白对神经元具有保护作用,补阳还五汤及其有效部位组方并不影响脑缺血后 HSP70 蛋白的表达,这对于缺血后神经元的修复可能是有益的。

(湖南医科大学病理生理教研室肖献忠教授指导并协助 HSP70 表达的测定,特此致谢)

参 考 文 献

1. 尚伟. 热休克蛋白与神经系统. 国外医学生理病理科学与临床分册 1999;19(6):458—461.
2. States BA, Honkaniemi J, Werstein PR, et al. DNA fragmentation and HSP protein induction in hippocampus and cortex occurs in separate neurons following permanent middle cerebral artery occlusions. J Cereb Blood Flow Metab 1996;16:1165—1175.
3. Liu Y, Kato H, Nakata N, et al. Correlation between induction of ischemic tolerance and expression of heat shock protein-70 in the rat hippocampus. J Gastroenterol 1996;31(1):143—147.
4. 邓常青, 邓奕晖, 向华林, 等. 补阳还五汤及其有效部位对沙鼠脑缺血后 DND 脑能量代谢、NO 和 NOS 的影响. 中药药理与临床 1999;15(5):3—6.
5. 邓常青, 唐映红, 邓奕晖, 等. 补阳还五汤及其有效部位组方对沙鼠脑缺血再灌注后兴奋性氨基酸和超微结构的影响. 湖南中医学院学报 2000;20(4):11—14.
6. J 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995:346—371, 888—897.
7. Schmidt KR, Zhao W, Truettner J, et al. Pixel-based image

(下转 210 页)

表 2 两组离体大鼠肝脏功能的变化及灌流液中 TNF α 和 IL-8 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n		胆汁流出速率	AST	ALT	LDH	灌流液中 TNF α	灌流液中 IL-8
			($\mu\text{l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		(U/L)		(OD 值)	
对照	10	30min	0.14 $\pm$ 0.01	71.3 $\pm$ 8.2	67.1 $\pm$ 6.3	100.3 $\pm$ 8.1	0.68 $\pm$ 0.09	1.69 $\pm$ 0.31
		60min	0.08 $\pm$ 0.01	87.5 $\pm$ 7.3	83.9 $\pm$ 6.4	810.5 $\pm$ 98.3	0.85 $\pm$ 0.17	1.94 $\pm$ 0.38
MP-1	10	30min	0.19 $\pm$ 0.03	29.4 $\pm$ 3.6 *	39.8 $\pm$ 7.2 *	41.7 $\pm$ 5.6 **	0.42 $\pm$ 0.05 *	1.13 $\pm$ 0.16 *
		60min	0.15 $\pm$ 0.02 *	48.7 $\pm$ 6.2 *	41.8 $\pm$ 5.6 *	393.6 $\pm$ 76.9 **	0.51 $\pm$ 0.09 **	1.32 $\pm$ 0.21 *

注 :与对照组同期比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

微血管内皮细胞有一定的组织特异性 ,以往用脐静脉内皮细胞来笼统地替代各种组织的内皮细胞进行研究缺乏特异性 ,因此利用特定的微血管内皮细胞来研究特定组织或器官的病变有独特的优势。

肝脏的枯否氏细胞是 TNF α 产生的主要来源 ,但缺血再灌注损伤可以诱导内皮细胞释放 TNF α ,TNF α 一方面通过受体直接介导细胞的损伤 ,另一方面会进一步诱导内皮细胞表达 IL-8 和多种粘附分子 ,从而有利于白细胞与内皮细胞的粘附和跨膜游走。IL-8 作为重要的趋化因子 ,它几乎可以趋化任何可游走的免疫细胞。

中性粒细胞表面经常表达一定数量的选择素 ,借助这些分子 ,中性粒细胞随血液流动时可以和活化的内皮细胞粘附 ,但由于结合松弛和血流的冲击 ,粒细胞边滚动边移行 ,在缺血再灌注期间 ,活化的内皮细胞通过受体与 IL-8 结合 ,中性粒细胞与结合 IL-8 的内皮细胞接触 ,进一步表达淋巴细胞功能抗原和巨噬细胞表面抗原等粘附分子 ,这些粘附分子与相应的配体细胞间粘附分子 1 牢固结合 ,使中性粒细胞停止滚动 ,这时在趋化因子的作用下 ,粒细胞便可穿过内皮细胞进入趋化因子表达区域。本灌注实验中虽然没有中性粒细胞的参与 ,但在实际肝脏移植过程中 ,就很可能因为 IL-8 的趋化作用使粒细胞游走到相应部位 ,并在局部

释放基质蛋白酶和丝氨酸蛋白酶以及自由基而加重肝组织的损伤。

本实验结果显示 :TNF α 和 IL-8 释放是肝脏缺血再灌注损伤的重要因素 ,加入 TNF α 的单克隆抗体 ,可见内皮细胞死亡率明显地下降 ,而重组人 TNF α 可促使内皮细胞死亡 ,说明 TNF α 是导致缺血再灌注损伤的直接原因之一。抑制 TNF α 和 IL-8 的表达或释放将成为减轻肝脏缺血再灌注损伤的重要靶点。水溶性丹参单体 MP-1 通过抑制 TNF α 和 IL-8 的释放来减轻肝脏缺血再灌注损伤。

(致谢 :感谢姜晋宁博士提供的人肝窦内皮细胞系及刘杰文研究员的鼎立相助)

参 考 文 献

1.Chavien PA , Harvey PR , Strasherg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. Transplantation 1992 53(5):957—978.
2.Lou J , Buhler L , Deng S , et al Inhibition of leukocyte adherence and transendothelial migration in cultured human liver vascular endothelial cells by prostaglandin E $_1$. Hepatology 1998 ;27(3):822—828.
3.Rodriguez JV , Guibert EE , Quintana A , et al. Role of sodium nitroprusside in the improvement of rat liver preservation in University of Wisconsin solution : A study in the isolated perfused liver model. J Surg Res 1999 87(2):201—208.

(收稿 2001 - 09 - 12 修回 2001 - 12 - 14)

(上接 195 页)

ter focal cerebral ischemia : hemodynamic and histological correlates. Brain Res Mol Brain Res 1998 53(1):79—97.
8.Nowak TR , Jacewicz M. The heat shock stress response in focal cerebral ischemia. Brain Pathol 1994 4:67—76.
9.Sharp FR , Kinouchi M , Jacewicz M , et al. HSP70 heat shock gene regulation during ischemia. Stroke 1993 24:172—175.
10.Tomimoto H , Takemoto O , Akiguchi I , et al. Immunoelectron microscopic study of c-fos , c-jun and heat shock protein after transient cerebral ischemia in gerbils. Acta Neuropathol 1999 ;97(1):

22—30.
11.Nowak TR , Junichi I , Nakajima T. 70KDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. Stroke 1990 ;21 (Suppl 11):107—111.
12.Lee TS , Kato H , Chen ST , et al. Expression of nerve growth factor and trk A after transient focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1998 29:1687—1697.

(收稿 2001 - 03 - 10 修回 2001 - 10 - 23)