

脉络宁对大鼠脑梗死 C-Fos 蛋白表达的影响

郭志力^{1△} 刘平² 陈泳宏² 商舰² 张留宝² 盛春宁² 骆云²

摘要 目的 探讨脉络宁对光化学诱发脑梗死后神经细胞保护作用的可能机制。方法 80 只 SD 大鼠分为 3 组, (1) 对照组 ($n=20$) ; (2) 脑梗死组 ($n=30$) ; (3) 脉络宁组 ($n=30$)。使用光化学诱发的大鼠局灶性脑缺血模型, 采用免疫组化、图像分析及透射电镜等方法, 观察脉络宁治疗前后 C-Fos 蛋白表达的变化。结果 C-Fos 阳性细胞位于坏死中心与正常皮层之间的半影区, 脑梗死 3h 即出现 C-Fos 蛋白表达, 6h 达到高峰。脉络宁组 C-Fos 表达与梗死组比较明显减少 ($P<0.01$)。结论 脉络宁可明显减少半影区神经细胞的损伤, 其对神经元的保护作用可能与抑制 C-Fos 蛋白的表达有关。

关键词 脉络宁; 脑梗死; C-Fos

Effect of Mailuoning on C-Fos Protein Expression in Rats with Cerebral Infarction GUO Zhi-li, LIU Ping, CHEN Yong-hong, et al Jinling Pharmaceutical Co., Ltd. Nanjing (210009)

Objective To investigate the protective effect of Mailuoning (MLN) on nerve cells after cerebral infarction induced by photochemistry. **Methods** Eighty SD rats were divided into three groups, the control group ($n=20$), the model group ($n=30$) and the MLN group ($n=30$). Focal cerebro-ischemia induced by photothrombosis in adult rat was used as a model. Changes of C-Fos protein expression before and after MLN treatment were observed using immunohistochemistry, computerized imaging technique and transmission electron microscopy (TEM). **Results** C-Fos positive cells located in the transitional zone between the necrotic core and normal cortex. C-Fos protein expression began to show 3 hrs after cerebral infarction, peaked at 6 hrs. As compared with the model group, C-Fos expression was significantly reduced in the MLN group ($P<0.01$). **Conclusion** MLN could markedly reduce the injury of nerve cell in the transitional zone, the protection may be related with its inhibition on C-Fos protein expression.

Key words Mailuoning; cerebral infarction; C-Fos

目前, 脉络宁治疗脑梗死缺血损伤的临床报道已不少见^[1,2], 但有关实验研究报道甚少。本研究采用大鼠光化学诱发局灶性脑梗死模型, 用免疫组化、图像分析及透射电镜等形态学方法, 观察脑梗死时立即早期基因 (C-Fos) 蛋白的表达及脉络宁对其影响, 以探讨脉络宁对脑梗死时神经元保护作用的可能机制。

材料与方法

1 动物 SD 雄性大鼠 80 只, 体重 300 ~ 350g (由江苏省实验动物中心提供), 自由饮食, $(20 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ 下饲养。

2 脑梗死模型的建立及分组处理 SD 雄性大鼠

80 只, 随机分为 3 组: 对照组 20 只, 脑梗死组 30 只, 脑梗死加脉络宁组 (脉络宁组) 30 只。脑梗死组和脉络宁组大鼠均采用 10% 水合氯醛 (375 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 常规皮肤消毒, 经左颞侧入路切开头皮, 细心分离颞肌以暴露颞弓和颞骨鳞部结合处。经右侧股静脉注射 3% 的玫瑰红液 25 mg/kg, 5 min 后用 LD 泵浦激光仪 (中国科学院长春激光所提供) 发生的 532 nm 绿色激光束 (光斑直径 2 mm, 功率 0.15 W) 距离 20 cm 持续照射 20 min, 造成局部皮层缺血梗死^[3], 照射完毕缝合头皮。脉络宁注射液 (金陵制药厂提供) 治疗组大鼠术后 3、6、9、12 和 24 h 经左侧股静脉注射脉络宁注射液原液 8 $\mu\text{g/kg}$ (0.3 ml)。对照组和脑梗死组均注射等量生理盐水, 对照组仅切开皮肤, 不做照射。

3 组织处理及尼氏染色 对照组和脑梗死组大鼠术后分别于 3、6、9、12 和 24h 及脉络宁组给药治疗存活 24h 后, 再次麻醉, 经升主动脉用生理盐水冲洗并剪开右心耳, 而后经 10% 甲醛全身灌注固定后取脑,

作者单位: 1. 金陵药业股份有限公司 (南京 210009) 2. 南京军医科学院组织胚胎学教研室

[△]博士

通信作者 刘平, Tel 025-80842459, E-mail lp2004@VIP.sina.

万方数据

观察梗死灶,而后经石蜡包埋切片,用尼氏染色组化方法显示梗死面积。

4 C-Fos 水平检测

4.1 免疫组化染色 经甲醛灌注固定脑组织,用 20%蔗糖脱水后,按照图谱 A6.0 连续冠状切片^[4],片厚 40 μm。脑组织标本用 ABC 法进行 C-Fos(北京中山生物制品有限公司提供)蛋白免疫组化漂浮染色^[5]。

4.2 图像分析 利用计算机图像分析系统(HPLAS-2000)在 20 倍镜下每张切片于皮质区和梗死边缘各随机选取 4 个视野,分别测量其阳性细胞相对面积比(阳性细胞面积总和占视场面积的百分比)和平均目标灰度值(所测阳性细胞的平均灰度),免疫反应的强弱与灰度值成反比关系。取各视野的平均值作为该标本的观测值。

4.3 常规透视电镜观察 大鼠断头后迅速切取梗死边缘区,4%戊二醛固定,按常规处理电镜标本,JEM-100X II 型电镜观察。

4.4 统计学处理 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Origin 统计软件进行处理,组间比较用 t 检验。

结 果

1 尼氏染色 脑梗死组与脉络宁组均有梗死区,梗死区与周围正常脑组织间有一明显的分界线(半影区)易于区分。半影区位于梗死中心区和正常脑组织之间,梗死中心区内几乎未见神经组织细胞。半影区梗死组神经元体积缩小,尼氏体聚集,而脉络宁组神经细胞形态相对完整(图 1,2)。

2 免疫组化 C-Fos 为核蛋白抗体,免疫染色阳性神经元核呈棕色,脑梗死早期 3h 在损伤侧纹状皮质(图 3),梗死边缘,海马,丘脑内侧背核中间部等处即有表达(图 4) 6h 在纹状皮质及梗死边缘表达达峰值(图 5)持续至 9 h,12 h 损伤侧皮质 C-Fos 表达减少,染色变浅,但在下丘脑室旁核和室周核出现 C-Fos 表达,双侧差别不大(图 6),损伤 24 h 仍有少量表达。脉络宁治疗组在 9 h 以后出现 C-Fos 表达,且阳性细胞核染色浅,数目较少。对照组未见 C-Fos 表达。

3 图像分析 见表 1。脉络宁治疗组与脑梗死组在纹状皮质、梗死边缘 C-Fos 蛋白阳性表达平均灰度值各时相点均存在显著差异($P < 0.01$),脑梗死组纹状皮质及梗死边缘 C-Fos 阳性表达相对面积比显著高于脉络宁治疗组($P < 0.01$)。

4 常规电镜观察 脑梗死组脑组织损伤随时程延长而加重,神经细胞内可见内质网扩张,3h 时线粒体肿胀,核染色质有趋边现象;24h 时线粒体空泡化

(图 7)。脉络宁组治疗 3h,线粒体嵴有所恢复,肿胀改善,神经胶质细胞结构正常(图 8)。治疗 24h,线粒体肿胀有所改善,但可见髓鞘松散现象。

表 1 各组 C-Fos 阳性细胞平均灰度值及相对面积比比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间(h)	平均灰度		相对面积	
		纹状皮质	梗死边缘	纹状皮质	梗死边缘
脑梗死	3	129.30±7.38	129.40±6.01	9.87±2.90	9.43±4.21
	6	101.60±11.47	79.90±8.32	11.90±3.89	14.32±6.79
	9	119.30±8.01	91.50±8.64	10.93±8.62	72.11±6.71
	12	128.10±5.87	132.40±6.72	10.01±4.21	9.06±6.71
	24	136.60±8.80	138.20±7.92	7.36±8.01	6.99±5.12
脉络宁	3	—	—	—	—
	6	—	—	—	—
	9	122.20±13.01 *	102.80±7.98 *	8.19±3.76 *	8.98±8.16 *
	12	—	138.90±9.21 *	—	6.12±4.26 *
	24	—	148.70±8.68 *	—	5.06±3.68 *

注 与脑梗死组同期比较, * $P < 0.01$

讨 论

脑梗死是一种发病率、致残率和死亡率很高的疾病,复发后恢复较差。脑梗死的病理改变由梗死中心区和处于低灌流状态的边缘区即缺血性半影区(is-chemic penumbra)组成。中心区的脑组织在短时间内即发生不可逆性损伤,导致细胞坏死,而半影区的脑细胞由于仍保留了正常血供的 20%~50%^[6],损伤相对较轻,可继续维持数小时,如能及时恢复血流或采用药物治疗,则可能被挽救,否则转变为不可逆性损伤,使梗死灶扩大。在本实验中,尼氏染色和电镜观察可见,脑梗死组动物半影区神经细胞有明显损伤,并随时程延续而加重。

C-Fos 为原癌基因,正常生理状态下,在神经细胞中仅呈极低水平表达,许多研究证实 C-Fos 的表达与脑缺血后神经细胞中信息的传递及其生存或死亡有密切关系。其作用机制是 C-Fos 蛋白与 C-Jun 等结合成异二聚体后,结合到靶基因激动蛋白-1(activator protein,AP-1)或 CRE 位点,激活靶基因表达,从而启动神经元的内源性抗损伤或损伤机制。本实验免疫组化和图像分析结果表明脑梗死大鼠纹状皮质及半影区 C-Fos 蛋白 3h 即出现明显表达,6h 达峰值,随后下降并持续至 24h,与有关文献报道一致^[7]。这可能是因脑组织缺血,C-Fos 蛋白表达参与脑梗死的病理过程。

脉络宁注射液是在著名医方“四妙勇安汤”临床应用的基础上研究开发出的一种中药复方注射液,由玄参、牛膝、穿山甲等活血化瘀、养阴通络的中药组成。临床研究表明,脉络宁具有扩张血管,改善微循环,增加血流量及溶栓作用^[8],刘筱蕙等^[9]认为脉络宁可通过清除自由基,降低脑组织 Ca^{2+} 超载,降低花生四烯酸代谢,抑制兴奋性氨基酸的释放,以及抑制 C-Fos 蛋

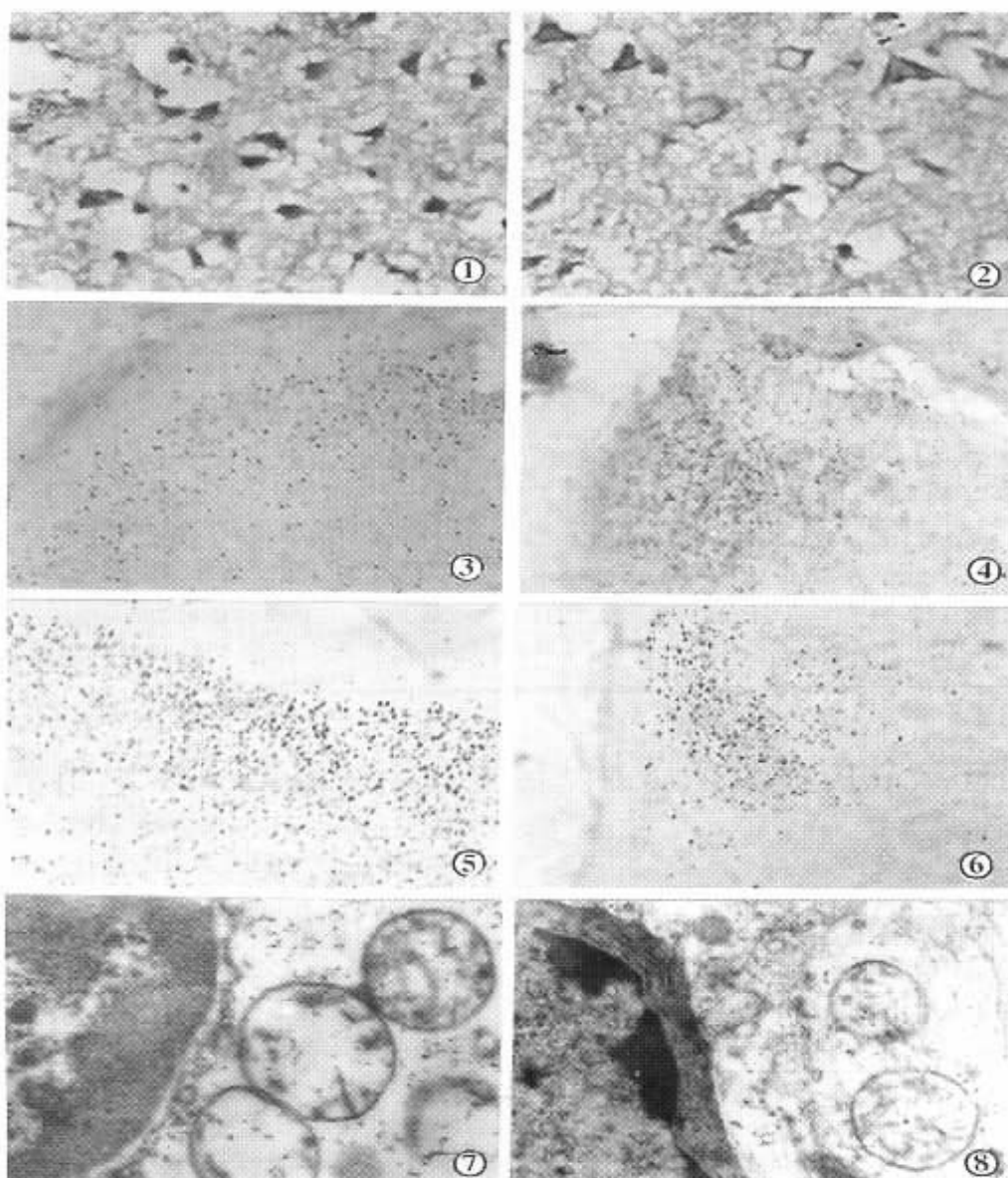


图 1 脑梗死 3h 神经元体积缩小(尼氏染色, $\times 400$); 图 2 脉络宁治疗 3h 神经元形态相对完整(尼氏染色, $\times 400$); 图 3 脑梗死 3h 损伤侧纹状皮质 C-Fos 蛋白表达($\times 400$); 图 4 脑梗死 3h 丘脑内侧背核 C-Fos 蛋白表达($\times 400$); 图 5 脑梗死 6h 损伤侧纹状皮质 C-Fos 蛋白表达增多($\times 400$); 图 6 脑梗死 12h 下丘脑旁核 C-Fos 蛋白表达($\times 400$); 图 7 脑梗死 24h 染色质趋边, 线粒体空泡化($\times 38\ 000$); 图 8 脉络宁治疗 3h 线粒体肿胀有所改善, 神经胶质细胞正常($\times 30\ 000$)

白表达,具有预防脑缺血再灌注损伤的作用。本实验观察到 脑梗死经脉络宁干预治疗后,可明显下调 C-Fos 蛋白表达,表现为脑梗死 3~6h C-Fos 蛋白表达被明显抑制,仅在 9h 后略有表达,尼氏染色和电镜观察到半影区神经元结构较脑梗死组完整。这提示脉络宁对脑梗死神经元具有保护作用,其机制可能与增加局部血流及抑制 C-Fos 蛋白表达有关。本研究结果提示 在脑梗死发生 24h 尤其 6h 内进行脉络宁干预,可明显抑制 C-Fos 蛋白表达,减少神经元损伤,从而起到脑保护作用,这为临床上脉络宁超早期治疗脑梗死时

机和方法提供了理论依据。至于脉络宁保护脑梗死后神经元的详细机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 易玉新,何翠娥,杨 宇,等. 脉络宁对老年脑梗死血液流变学和血流动力学影响及临床疗效观察. 中华医学杂志 2002; 26(3):128—129.
Yi YX, He CE, Yang Y, et al. Effects of Mailuoning on blood rheology and dynamics of elder brain infarction and its clinical effectiveness. National Med J China 2002; 26(3):128—129.
- 2 东 伟,张福刚. 脉络宁治疗脑梗塞临床疗效观察. 中华临

床医药 2000 1(2):35—36.

Dong W, Zhang FG. Clinical observation on therapeutic effect of Mailuoning injection on cerebral infarction. Chin J Clin Med 2000 1(2):35—36.

3 Schwartz-Bloom RD, McDonough KJ, Chase PJ, et al. Long-term neuroprotection by benzodiazepine full versus partial agonists after transient cerebral ischemia in the gerbil. J Cereb Blood Flow Metab 1998 18(5):548—558.

4 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991:40—49.

Bao XM, Shu SY. The stereotaxic atlas of the rat brain. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991:40—49.

5 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术. 北京: 人民军医出版社, 2003:99—147.

Cai WQ. Modern practical cellular and molecular biological experimental techniques. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2003:99—147.

6 Siesjo BLC. Pathophysiology and treatment of focal cerebral is-

chemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. J Neurosurg 1992 77:337—354.

7 Hata R, Maeda K, Hermann D, et al. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. J Cereb Blood Flow Metab 2000 20(2):306—315.

8 王殿俊, 赖尧基. “脉络宁”的药理和临床研究进展. 中国微循环 1997 8(1):48—50.

Wang DJ, Lai YJ. Development of Mailuoning on clinical and pharmacological researches. J Chin Microcirc 1997 8(1):48—50.

9 刘筱蔼, 吴伟康. 中药防治脑缺血再灌注损伤的研究. 中国中西医结合杂志 2001 21(10):794—798.

Liu XA, Wu WK. Researches on prevention and treatment of reperfusion injury in cerebral ischemia by Chinese herbal medicine. Chin J Integr Tradit West Med 2001 21(10):794—798.

(收稿 2004-01-14 修回 2004-06-28)

藿香正气软胶囊治疗动力障碍型功能性消化不良 30 例观察

陈 静

2003 年 1—9 月笔者采用藿香正气软胶囊治疗动力障碍型功能性消化不良 30 例, 取得良好的疗效。现报告如下。

临床资料 按 1999 年制定的罗马 II 标准[中华医学会消化疾病分会胃肠动力学组. 我国消化不良的诊治流程和指南. 中华内科杂志 2000 10(39):717—718]诊断功能性消化不良动力障碍型。选用本院门诊患者 60 例, 随机分为两组, 治疗组 30 例, 男 16 例, 女 14 例, 年龄 24~45 岁, 平均 (25.62 ± 5.78) 岁, 病程 6~46 个月, 平均 (10.9 ± 15.3) 个月。对照组 30 例, 男 15 例, 女 15 例, 年龄 23~44 岁, 平均 (25.36 ± 5.27) 岁, 病程 6~48 个月, 平均 (11.6 ± 14.3) 个月。两组资料比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

治疗方法 治疗组采用藿香正气软胶囊(由天津达仁堂药厂生产, 每粒 450mg), 每次 2 粒, 每天 2 次口服。对照组采用藿香正气滴丸(由天津天士力药厂生产, 每袋 2 500mg), 每次 1 袋, 每天 2 次口服。所有患者 14 天为 1 个疗程, 治疗期间两组均停用任何其他治疗本病的中西药物。观察治疗后 14 天主要症状改善情况。统计学方法采用 χ^2 检验。

结 果

1 疗效判定标准 治愈: 主要症状消失 好转: 主要症状

减轻 无效: 主要症状未变甚至加重。

2 两组疗效比较 治疗组 30 例, 治愈 10 例, 好转 17 例, 无效 3 例, 总有效率 90%。对照组 30 例, 治愈 5 例, 好转 3 例, 无效 6 例, 其余 16 例因无法耐受其强烈气味而中止治疗, 总有效率 26.67%。两组疗效比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。

讨 论 功能性消化不良是临床一种常见病, 包括上腹部疼痛、饱胀、嗝气、早饱、食欲不振、呕吐等临床症状, 属中医学胃痛、胃痛、呕吐等范畴。中医学认为上述诸症的病理机制多为脾气虚弱、水湿不化、胃失和降, 即脾胃运化功能减退。现代医学认为其发病机制复杂, 尚不能完全阐明, 但认为胃肠道运动障碍是引起功能性消化不良的主要原因, 胃电图检测显示动力障碍型功能性消化不良胃电缓慢节律或快速节律紊乱, 藿香正气软胶囊可以通过增强胃张力, 调整胃动力节律等多靶点药效作用, 改善胃蠕动, 而减轻诸症。该方源自宋代《太平惠民和剂局方》“藿香正气散”。方中藿香芳香化湿、调和脾胃, 紫苏醒脾胃化湿滞, 白芷下行肠胃除湿浊, 厚朴健脾燥湿, 宽中化滞, 大腹皮行气导滞、宽中除胀祛湿浊, 半夏、陈皮和胃, 降逆除恶心呕吐, 茯苓健脾和胃, 化湿利水, 以助脾胃的运化机能, 诸药协同, 共奏脾胃运化之功。

(收稿 2004-01-18 修回 2004-03-03)

作者单位 江苏省中医院(南京 210005)