

[文章编号] 1000- 4718(2005)04- 0669- 05

四逆汤对大鼠局灶性脑缺血后 *bax*、*bcl- 2* 表达的影响

颜建云¹, 吴伟康²△, 陆立鹤², 罗汉川²(¹广州医学院生理学教研室, 广东 广州 510182; ²中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 研究四逆汤对大鼠局部脑缺血后 *bax*、*bcl- 2* 表达的影响。方法: 采用大鼠大脑中动脉局部阻塞(MCAO)模型, 观察四逆汤对脑缺血大鼠的神经功能、丙二醛(MDA)和神经酰胺含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性以及 *bax*、*bcl- 2* 表达的影响。结果: 四逆汤组脑含水量、MDA含量、神经酰胺含量、*bax* 基因在转录和翻译水平的表达明显低于缺血模型组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 神经功能评分、SOD活性、*Bcl- 2* 蛋白的表达高于缺血模型组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结论: 四逆汤对局部脑缺血大鼠具有显著的保护作用, 其作用机制可能与四逆汤能对抗脑缺血引起的氧化损伤, 减少神经酰胺的生成量, 抑制 *bax* mRNA 的转录及其蛋白的表达、增加 *Bcl- 2* 蛋白的表达有关。

[关键词] 脑缺血; 细胞凋亡; 神经酰胺类; 四逆汤; 基因, *bax*; 基因, *bcl- 2*

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of sini decoction on the expression of *bax* and *bcl- 2* after focal cerebral ischemia in rats

YAN Jian- yun¹, WU Wei- kang², LU Li- he², LUO Han- chuan²(¹Department of Physiology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; ²Department of Pathophysiology, Zhong Shan Medical School, Sun Yat- sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of sini decoction (SND) a Chinese medicine on the expression of *bax* and *bcl- 2* following focal cerebral ischemia in rats. **METHODS:** Model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was performed in adult male Sprague- Dawley (SD) rats. SD rats were randomly divided into control, model and SND treatment groups. The neurological score, the brain water content, the activity of SOD, the concentration of MDA and ceramide were determined. The *bax* mRNA expression in brain tissue was measured by means of RT- PCR. *Bax* and *Bcl- 2* protein expression in brain tissue were observed by immunohistochemistry. **RESULTS:** The concentration of MDA, concentration of ceramide, brain water content, *bax* mRNA expression and *Bax* protein expression in SND treatment group were markedly lower than those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The neurological score, activity of SOD and *Bcl- 2* protein expression in SND treatment group were higher than those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION:** SND provides neuroprotection against focal cerebral ischemia in association with inhibition of neuron apoptosis through suppressing oxidative damage caused by focal cerebral ischemia, and reducing the concentration of ceramide which results in the down- regulation of *bax*, and the up- regulation of *bcl- 2* protein.

[KEY WORDS] Brain ischemia; Apoptosis; Ceramides; Sini decoction; Genes, *bax*; Genes, *bcl- 2*

脑缺血疾病具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高的特点, 正严重危害人类健康。尽管近几十年来对脑缺血进行了大量的研究, 但急性脑缺血的治疗仍较棘手, 其原因是由于脑缺血损伤的机制十分复杂, 缺血性脑损伤是一个多因素、多机制、多环节的恶性连续过程, 近年来的研究表明神经元

凋亡是脑缺血损伤的重要机制之一。*bax* 和 *bcl- 2* 是促进和抑制神经细胞凋亡的一对重要基因。本研究采用大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型观察四逆汤(sini decoction, SND)对局部脑缺血大鼠脑组织 *bax* 和 *bcl- 2* 基因表达的影响。

[收稿日期] 2004- 05- 19 [修回日期] 2004- 08- 04

△通讯作者 Tel: 020- 87331779; E- mail: pwlaet@gzsums.edu.cn

材 料 和 方 法

1 材料

SD 雄性大鼠, 体重为 260–310 g, 由中山大学中山医学院动物实验中心提供。TTC, Sigma 公司。Bcl-2、Bax 免疫组化试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司。Trizol Reagent, Gibco-BRL 公司。DNA marker, 上海生物工程有限公司。PCR 引物合成, 上海生物工程有限公司。Taq DNA 聚合酶, Gibco-BRL 公司。MMLV 逆转录酶, promegan 公司。RNasin, 上海生物工程有限公司。全自动图像分析系统, 德国 KONTRON IBAS 2.5。彩色图像摄录输入仪, JVC ky-F30B 3-CCD。Progene 基因扩增仪, TECHNE 公司。DY-WZ 型电泳仪, 北京生化仪器厂。DU640 nucleic acid and protein analyzer, Beckman COULTER。R-100 型低速冷冻离心机, 日本 TOMY SEIKO 公司。

2 方法

2.1 动物模型复制 SD 雄性大鼠随机分为正常对照组(control group)、缺血模型组(model group)、四逆汤组(SND group), 每组 8 只。正常对照组和缺血模型组灌蒸馏水, 四逆汤组灌四逆汤, 灌胃剂量 3.5 g/kg BW, 连续灌胃 5 d, 每天 1 次, 末次灌胃 1 h 后, 正常对照组假手术处理, 缺血模型组和四逆汤组复制脑缺血模型。模型复制参照 Longa 等^[1]方法, 具体操作: 用 0.3% 戊巴比妥钠(45 mg/kg BW) 腹腔内注射, 左侧股动脉插管, 连续监测动脉血压。使室温保持为 25 °C, 手术台上用日光灯照射, 使动物体温保持 37 °C。颈部正中切口, 暴露迷走神经和颈总动脉。离颈总动脉分叉(CCA) 约 3–4 mm 处, 在左侧颈外动脉(ECA) 深面穿 2 条线, 近侧打一活结, 推向 ECA 根部, 远端结扎, 并结扎 ECA。分离左侧颈内动脉(ICA) 及其分支翼腭动脉, 用动脉夹夹闭 ICA 和 CCA。在 CCA 分叉处剪一小口(D=0.2 mm), 将栓线从切口插入约为(1.8±0.2) cm, 若遇阻力则停止, 以避免刺破血管。结扎切口, 连续缝合手术切口, 注意动物保暖, 待其清醒后观察其行为和症状。缺血 2 h 后将线拔出再灌注 22 h。术后处死动物取大脑组织备测, 处死大鼠前对其用盲法进行神经行为学评分。

2.2 生理指标 复制 MCAO 模型前, 先利用 Bio-lap98 智能型生物信号处理系统测定大鼠的基础血压, 实验过程中连续监测大鼠的血压。手术室内温度控制在 25 °C, 同时用日光灯照射动物的头部, 维持大鼠头部温度的恒定。

2.3 神经功能评分 大鼠麻醉苏醒后, 将其放回鼠笼, 自由饮食。手术后第 24 h 对实验动物用盲法进行神经行为学评分。具体方法参照 Garcia 等^[2]评分法, 按照 Garcia 等的 6 项实验进行大鼠的神经功能行为学评分, 6 项评分相加为总积分, 最高分为 18 分, 最低分为 3 分。

2.4 脑含水量的测定 术后断头取脑组织, 称量脑湿重, 后置于 110 °C 烤箱烘烤 48 h, 将组织块烤至恒重并测干重, 计算脑含水量。公式: 脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

2.5 MDA SOD、神经酰胺水平的测定 取大鼠脑组织, SOD 活性的测定用邻苯三酚自氧化法, MDA 含量用硫代巴比妥酸法测定。神经酰胺含量的测定用高效薄层层析法, 具体方法: 各组脑组织加 2 mL 氯仿: 甲醇(2:1) 匀浆 5 min, 加氯仿: 甲醇(2:1) 至 4 g 脑组织/L, 超声处理 20 min, 过滤, 滤液加水(1/5 滤液体积), 搅拌, 用少量洗脱下层液冲洗玻璃棒, 静置过夜, 吸掉上层液, 用洗脱上层液洗 3 次, 蒸干, 定量。取神经酰胺对照品定量, 加氯仿溶解成 1 g/L 液体, 分别在高效薄层板上点样 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 μL, 用氯仿-甲醇(50:10) 作为展开剂展开 8.5 cm (约 30–40 min), 取出晾干, 喷洒二氯荧光素溶液显色, 于 λ=315 nm 紫外灯下观察结果, 扫描定量, 并制备标准曲线。取样品溶液, 分别点于同一高效薄层板上, 在上述色谱条件下展开, 显色, 扫描定量, 用标准曲线计算样品中神经酰胺的量。

2.6 Bcl-2、Bax 免疫组织化学染色 新鲜脑组织置于 10% 甲醛液固定 4 h。常规脱水, 石蜡包埋切片。常规脱蜡水化后, 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波抗原修复, 加热至沸 10 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。3% H₂O₂ 处理 10 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。正常山羊血清室温孵育 10 min。甩弃血清, 滴加 1 抗, 每张切片 60 μL, 37 °C 孵育 30 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。滴加 2 抗, 37 °C 孵育 20 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。滴加 3 抗, 37 °C 孵育 20 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。DAB 显色, 镜下控制。苏木素复染, 中性树胶封片。随机选取视野进行图像分析, 计算阳性单位(PU)。

2.7 RT-PCR 半定量检测 bax 水平 取脑组织 100 mg, 用 Gibco-BRL 公司的 Trizol 试剂抽提 RNA, 紫外分光光度计测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀, 要求 A₂₆₀/A₂₈₀=1.8–2.0, -20 °C 保存备用。取总 RNA 2 μg 进行反转录, 随机引物 0.5 μg, 70 °C 5 min, 加 MMLV 5 × reaction

buffer 5 μL, dNTP mixture(10 mmol/L) 1.25 μL, RNasin 0.625 μL, MMLV 逆转录酶 1 μL, 加水至 25 μL, 轻柔混匀, 37 °C 孵育 60 min, 然后 70 °C 孵育 15 min 终止反应, -20 °C 保存备测。bax, 上游引物: 5' - GGATCGAGCAGAGAGGATGG - 3', 下游引物: 5' - TGGTGACTGAGCCAGTGG - 3', 产物长度: 464 bp。β-actin, 上游引物: 5' - ACGTTATGGATGATGATATCGC - 3', 下游引物: 5' - CTTAATGTCACGACACGATTTCC - 3', 产物长度: 644 bp。bax 的 PCR 循环参数: 94 °C 45 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环。反应完毕, 取 10 μL PCR 产物进行 1.9% 琼脂糖凝胶电泳。电泳完毕, 在紫外灯下观察, 测定各组目的带的吸光度值, 同时摄片, 最后对各组动物的定量指标作统计学分析。

3 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组计量资料比较采用 *t* 检验, 多组计量资料比较用方差分析进行统计, 统计软件为 SPSS 11.0 for windows。

结 果

1 动脉血压的变化

结果显示, 缺血前各组间的血压比较无明显差异, 术后正常对照组和缺血模型组的血压明显高于术前组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 而四逆汤组术后血压升高不明显, 见表 1。

表 1 大鼠缺血前后血压的改变

Tab 1 Effect of ischemia on mean arterial blood pressure ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Mean arterial blood pressure (mmHg)		
	Pre- operation	Post- operation	30 min
Control	109.35 ± 3.66	122.08 ± 7.18*	112.56 ± 4.12
Model	112.88 ± 14.68	144.66 ± 5.18**	148.76 ± 4.93**
SND	117.58 ± 14.45	127.22 ± 13.23	131.00 ± 8.77**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pre- operation group.

2 四逆汤对局部脑缺血大鼠神经功能评分和脑含水量的影响

与正常对照组比较, 缺血模型组神经功能评分明显下降 ($P < 0.01$), 脑含水量增高 ($P < 0.01$); 而四逆汤组大鼠的神经功能评分高于缺血模型组 ($P < 0.05$), 脑含水量低于缺血模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 四逆汤对局部脑缺血大鼠脑组织氧化损伤和神经酰胺含量的影响

缺血模型组脑组织 MDA 和神经酰胺含量高于

正常对照组 ($P < 0.01$); 四逆汤组 SOD 的活性高于缺血模型组 ($P < 0.05$), MDA 和神经酰胺含量低于缺血模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 四逆汤对局部脑缺血大鼠的神经保护作用

Tab 2 Neuroprotective effect of SND after MCAO ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Neurological score	Brain water content (%)
Control	17.63 ± 0.52	78.2048 ± 1.2310
Model	13.75 ± 1.04*	80.6580 ± 1.3400*
SND	15.12 ± 1.46*#	79.2526 ± 1.0560#

* $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

4 四逆汤对局部脑缺血大鼠脑组织的 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Bax 和 Bcl-2 免疫组织化学染色, 阳性反应物质主要分布在胞浆, 显色为棕黄色。图像分析结果显示, 缺血模型组脑组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 之值低于正常对照组 ($P < 0.05$); 四逆汤组脑组织 Bax 蛋白的表达明显少于缺血模型组 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白的表达和 Bcl-2/Bax 之值明显高于缺血模型组 ($P < 0.01$)。见表 4 及图 1。

表 3 四逆汤对局部脑缺血大鼠脑组织 SOD 活性和 MDA、神经酰胺含量的影响

Tab 3 Effect of SND on SOD, MDA and ceramide ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	SOD	MDA	Ceramide
	(10 U/g)	(10 nmol/g)	(mg/g)
Control	50.17 ± 4.81	35.96 ± 3.43	2.008 ± 0.334
Model	48.29 ± 4.60	46.61 ± 9.52*	3.046 ± 0.432*
SND	63.55 ± 4.34*#	37.78 ± 6.39#	1.975 ± 0.478#

* $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

表 4 四逆汤对脑缺血大鼠脑组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Tab 4 Effect of SND on protein expression of Bcl-2 and bax ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
Control	5.634 ± 1.091	4.492 ± 0.366	0.823 ± 0.167
Model	13.684 ± 1.997*	7.283 ± 1.441*	0.546 ± 0.152*
SND	9.552 ± 1.066#	13.749 ± 1.406#	1.466 ± 0.292#

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.01$ vs model group.

5 四逆汤对局部脑缺血大鼠脑组织的 bax mRNA 转录的影响

缺血模型组脑组织 bax mRNA 的扩增产物明显多于正常对照组 ($P < 0.05$); 四逆汤组脑组织 bax mRNA 的扩增产物明显少于缺血模型组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 2。

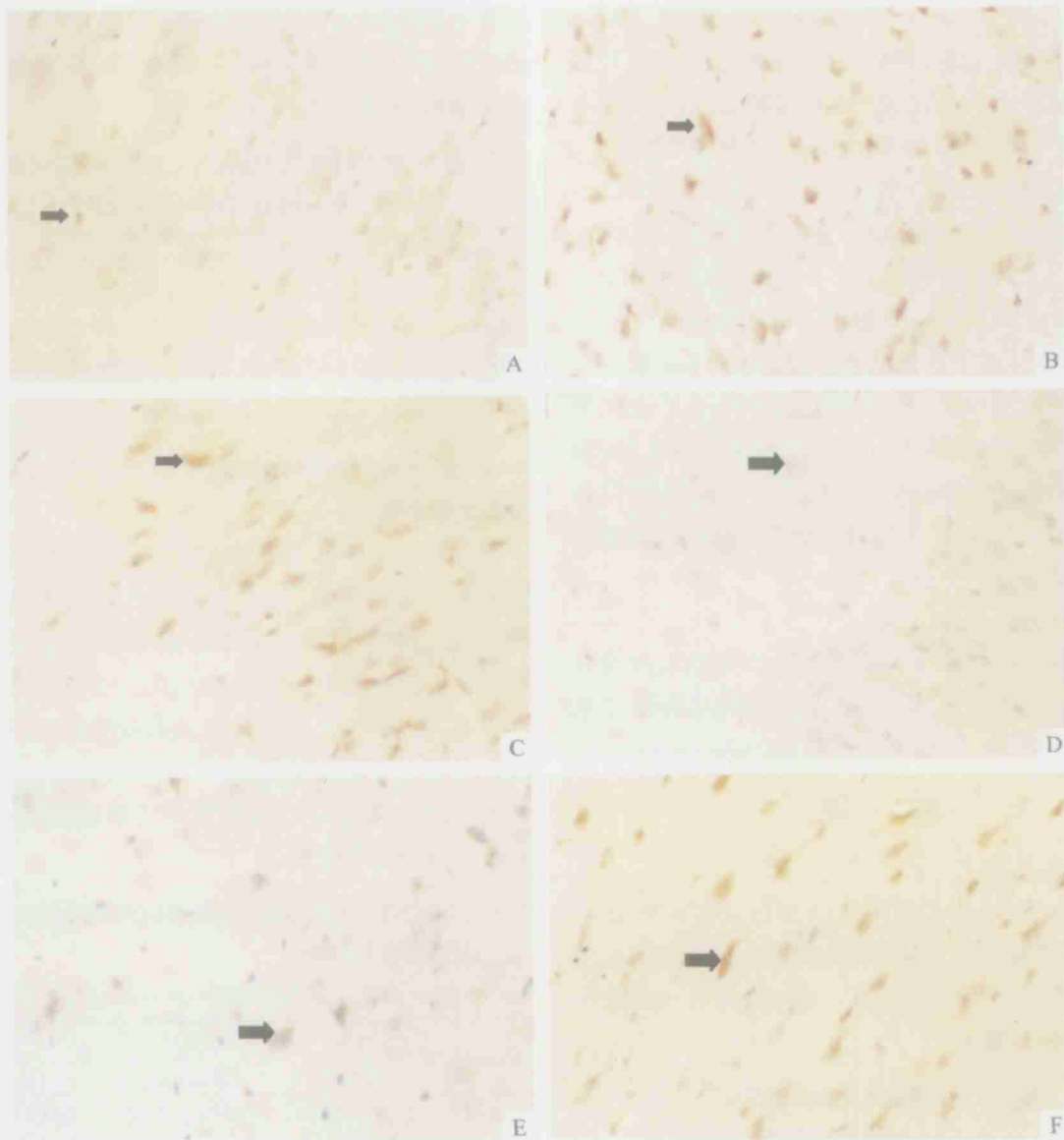


Fig 1 The outcome of immunohistochemistry in rats (×200).

A: Bax in control group; B: Bax in model group; C: Bax in SND group; D: Bcl-2 in control group; E: Bcl-2 in model group; F: Bcl-2 in SND group.

图 1 Bax 和 Bcl-2 的免疫组化结果

表 5 四逆汤对脑缺血大鼠脑组织 *bax* mRNA 表达的影响

Tab 5 Effect of SND on *bax* mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	<i>bax</i> / β -actin
Control	0.3521 ± 0.0746
Model	0.4926 ± 0.1359*
SND	0.3643 ± 0.1163#

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

讨 论

神经酰胺 (ceramide, CM) 是一个重要的第二信使分子,能介导细胞凋亡和其它生物学效应^[3]。最近的研究表明,神经鞘磷脂信号转导途径是介导多种细胞膜受体和环境应激因子引起凋亡的上游机

制^[4,5]。脑缺血后机体能量合成障碍,线粒体功能受损,产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS),同时 TNF α 大量表达激活 SMase,增加 CM 的含量,线粒体内 Ca²⁺ 浓度增加,促凋亡基因 *bax* 表达增加,抑凋亡基因 *bcl-2* 表达降低, *bcl-2* / *bax* 比值下降, *bax* 由胞浆转向线粒体,细胞色素 C (CytC) 从线粒体释放到胞浆,激活 caspase-9 和 caspase-3,促使细胞凋亡^[6,7]。

在脑缺血过程中,神经元能表达环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, Cox2) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS),激活小胶质细胞产生 ROS。短暂的脑缺血可导致 aSMase 和 CM 的含量升高。体外实验也发现外源性的 CM 和 SMase 都能诱发神经细胞凋亡^[8]。此外,

bcl-2/bax 比值决定细胞对各种引起凋亡刺激的敏感性及细胞的生存与死亡^[9]。当 bcl-2/bax 比值降低,细胞趋于凋亡;bcl-2 与 bax 之比增大,细胞趋于存活。Bcl-2 家族中抗凋亡成员和促凋亡成员的表达比值在决定脑缺血损伤过程中神经细胞是否凋亡起关键作用^[10]。而 CM 能上调 bax 的表达,降低 bcl-2/bax 的比值,促进 CytC 的释放,激活 caspase-9 和 caspase-3,最终导致细胞凋亡^[11]。可见,CM 在脑缺血损伤过程中发挥了十分关键的作用,通过调节 bcl-2/bax 的表达,决定神经细胞是否凋亡。

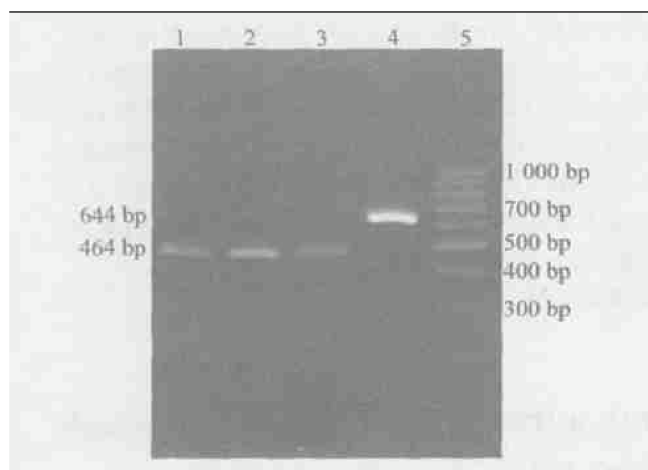


Fig 2 RT-PCR analysis of *bax* mRNA expression. Lane 1: control group; Lane 2: model group; Lane 3: SND group; Lane 4: β -actin; Lane 5: marker.

图 2 *bax* 基因表达的 RT-PCR 分析

本实验结果显示: SND 能明显减少脑缺血大鼠的脑含水量,改善大鼠的神经功能,提示 SND 能减轻脑缺血损伤,对缺血脑组织具有保护作用。SND 能降低脑组织 MDA 的含量,提高 SOD 的活性,表明 SND 具有抗氧化损伤的作用,这与我们既往的研究报道相一致^[12,13]。此外,研究发现 SND 能减少局部脑缺血大鼠的脑组织神经酰胺含量,抑制 *bax* 基因在转录水平和翻译水平的表达,对抗促细胞凋亡的因素。而缺血过程中脑组织 Bcl-2 蛋白表达明显增加,可能是脑组织在缺血应激过程中对缺血损伤的代偿性反应,且 SND 能明显增加 Bcl-2 蛋白的表达,上调 Bcl-2/Bax 之值,促进神经细胞存活,从而减轻脑缺血损伤。

[参 考 文 献]

[1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[2] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-634.

[3] Okazaki T, Bielawska A, Bell RM, et al. Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation [J]. J Biol Chem, 1990, 265(26): 15823-15831.

[4] Verheij M, Bose R, Lin XH, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis [J]. Nature, 1996, 380(6569): 75-79.

[5] Andrieu-Abadie N, Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585(2-3): 126-134.

[6] Colomboaioni L, Frago LM, Varela-Nieto I, et al. Serum deprivation increases ceramide levels and induces apoptosis in undifferentiated HN9.10e cells [J]. Neurochem Int, 2002, 40(4): 327-336.

[7] Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, et al. Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299(2): 201-207.

[8] Toman RE, Movsesyan V, Murthy SK, et al. Ceramide-induced cell death in primary neuronal cultures: upregulation of ceramide levels during neuronal apoptosis [J]. J Neurosci Res, 2002, 168(3): 323-330.

[9] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

[10] Yu AC, Yung HW, Hui MH, et al. Cycloheximide and actinomycin D delay death and affect bcl-2, bax, and Ice gene expression in astrocytes under *in vitro* ischemia [J]. J Neurosci Res, 2003, 74(2): 318-325.

[11] Von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, et al. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a bax-dependent pathway in human carcinoma cells [J]. Oncogene, 2002, 21(25): 4009-4019.

[12] 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 等. 四逆汤改善缺血心肌能量代谢的作用及其机制探讨 [J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(6): 634-636.

[13] 罗汉川, 黄河清, 刘晓霞, 等. 四逆汤抗犬急性心肌梗死的实验研究 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(11): 994-996.