

参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠海马 CA₁ 区细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

刘斌^{1*}, 马源源¹, 毛文静¹, 李建民¹, 张晋霞¹, 张爱国¹, 王瑞敏²

(1. 河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学实验中心, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的:**探讨参芎化瘀胶囊对血管性痴呆(vascular dementia, VD)模型大鼠海马 CA₁ 区细胞凋亡及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2), Bax 蛋白表达的影响。**方法:**采用反复夹闭、再通双侧颈总动脉同时 ip 硝普钠制备大鼠血管性痴呆模型,应用 Morris 水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力, TUNEL 法检测细胞凋亡,免疫组织化学 SABC 法检测 Bcl-2, Bax 蛋白表达。**结果:**①与正常组及假手术组相比,模型组大鼠海马 CA₁ 区凋亡细胞增多($P < 0.01$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA₁ 区凋亡细胞减少($P < 0.01$)。②与正常组及假手术组相比,模型组大鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2, Bax 阳性细胞均增多(均 $P < 0.01$), Bcl-2/Bax 降低($P < 0.01$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2 阳性细胞增多($P < 0.01$), Bax 阳性细胞减少($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 增加($P < 0.01$)。**结论:**参芎化瘀胶囊可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,减少细胞凋亡,从而改善血管性痴呆大鼠的学习记忆能力。

[关键词] 血管性痴呆;细胞凋亡;B 细胞淋巴瘤/白血病-2;Bax 蛋白;参芎化瘀胶囊

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0176-04

Effects of Shenxiong Huayu Capsule on Apoptosis and Expression of Bcl-2 and Bax Protein in CA₁ Area of Hippocampus in Vascular Dementia Rats

LIU Bin^{1*}, MA Yuan-yuan¹, MAO Wen-jing¹, LI Jian-min¹, ZHANG Jin-xia¹, ZHANG Ai-guo¹, WANG Rui-min²

(1. The Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. The Affiliated Hospital of Hebei Experimental Center, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Shenxiong Huayu Capsule on the apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax protein in CA₁ Area of hippocampus in vascular dementia rats. **Method:** The vascular dementia model of rat was established by repeated close and open of the common carotid arteries at both sides and intraperitoneal injection of sodium nitroprusside (SNP). The learning and memory abilities of rats were detected by Morris water maze. The cell apoptosis was detected by TUNEL staining and the expression of Bcl-2 and Bax protein were detected by immunohistochemical SABC staining. **Result:** ① The number of cell apoptosis in the CA₁ area of hippocampus was increased in the VD model group compared with that in the sham-operation group and blank control group ($P < 0.01$). The number of cell apoptosis in the CA₁ area of hippocampus was decreased in Shenxiong Huayu Capsule intervention group than in the VD model group ($P < 0.01$). ② The expression of Bcl-2, Bax in the CA₁ area of hippocampus was increased in the VD model group compared with that in the sham-operation group and blank control group (all $P < 0.01$), Bcl-2/Bax was decreased ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 in the CA₁ area of hippocampus was increased in Shenxiong Huayu Capsule intervention group compared with that in

[收稿日期] 20101007(005)
[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题(08410);河北省中医药管理局基金课题(2007010);唐山市卫生临床技术研究课题(10150204A-32)
[通讯作者] * 刘斌,主任医师,研究方向:脑血管病基础与临床, E-mail: liubin919tsh@sina.com

the VD model group ($P < 0.01$), Bax was decreased ($P < 0.01$) and Bcl-2/Bax was increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shenxiong Huayu Capsule can inhibit apoptosis by up-regulation of expression of Bcl-2 protein and down-regulation of Bax protein in CA₁ area of hippocampus in vascular dementia rats and improve the learning and memory abilities of for the vascular dementia rats.

[**Key words**] vascular dementia; apoptosis; Bcl-2; Bax; Shenxiong Huayu Capsule

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指脑血管疾病导致的严重认知功能障碍临床综合征^[1]。脑血管病患者常并发认知功能障碍,甚至发生痴呆^[2]。随着社会人口老龄化和脑卒中治疗存活率的提高,VD的发病率逐年升高,仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD),是第二位常见的老年期痴呆,已成为严重影响人类生活质量的疾病之一。目前,临床治疗 VD 尚缺乏理想的药物。参芎化瘀胶囊具有养血益气、化瘀通络等功效,能改善 VD 大鼠的认知功能^[3],但具体作用机制还有待进一步研究。本研究采用反复夹闭、再通双侧颈总动脉同时 ip 硝普钠法制备 VD 大鼠模型,观察参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA₁区细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响,以探讨参芎化瘀胶囊对 VD 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,由中国医学科学院实验动物研究所供给,合格证号 SCXK(京)2005-0013。

1.2 试剂与仪器 参芎化瘀胶囊,由河北联合大学附属医院药剂科提供,批号冀药制字 Z20051586,规格 0.40 g/粒,实验时用生理盐水配制成 48 g·L⁻¹的药液备用。硝普钠粉针剂,北京双鹤生产,批号 0302162,用双蒸水配制成 0.25 g·L⁻¹的药液,黑纸包裹避光备用。TUNEL 检测试剂盒,购自天津灏阳生物技术有限公司, Bcl-2, Bax 免疫组织化学试剂盒,购自武汉博士德生物工程公司。Morris 水迷宫由淮北正华生物仪器设备有限公司提供。

2 方法

2.1 动物分组 实验动物随机分为 4 组:正常对照组、假手术组、模型组和参芎化瘀胶囊治疗组,每组各 10 只大鼠。

2.2 动物模型制备 采用反复夹闭、再通双侧颈总动脉同时 ip 硝普钠法制备 VD 大鼠模型。大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水,用 10% 水合氯醛(300 mg·kg⁻¹) ip 麻醉,仰卧固定在手术台上,常规消

毒,颈部正中切口,分离双侧颈总动脉(CCA),模型组及 2 个药物治疗组在夹闭双侧颈总动脉(CCA)之前,ip 硝普钠(2.5 mg·kg⁻¹,用双蒸馏水溶解),随即用无创动脉夹夹闭双侧 CCA,10 min 后,再通 10 min,再夹闭 10 min,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组仅分离双侧颈总动脉,但不夹闭双侧 CCA 及注射硝普钠。术中大鼠肛温保持在 36.5 ~ 37.5 ℃,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。术后连续 3 d 庆大霉素,预防感染。

2.3 给药方法 治疗组灌胃(ig)给药,每日 1 次,术前预防给药 7 d,术后继续给药 28 d。参芎化瘀胶囊治疗组:参芎化瘀胶囊(0.048 g·mL⁻¹) ig 10 mL·kg⁻¹(0.48 g·kg⁻¹,相当于成人用量的 12 倍)。正常对照组、假手术组和模型组:生理盐水 ig, 10 mL·kg⁻¹。

2.4 学习记忆能力测试 术后第 29 天,采用 Morris 水迷宫实验测试学习记忆能力。试验包括定位航行试验和空间探索试验。

2.5 脑组织标本制备 各组大鼠在进行行为学测试结束后,立即以致死量 100 g·L⁻¹水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)腹腔麻醉后,仰卧位固定于手术台上,剪开胸腔,暴露心脏,从心尖插入灌注针至左心室,同时剪开右心耳,快速滴入 37 ℃生理盐水 300 mL,无血污后改为滴入固定液 4 ℃的多聚甲醛 400 mL。待大鼠尾巴完全僵直时迅速断头,取出脑组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中 12 ~ 24 h,进行脱水透明及石蜡包埋。冠状面连续切片,厚度约 3 μm,用经多聚赖氨酸处理过的载玻片捞片,晾干后至于 60 ℃的烤箱中烘烤备用。

2.6 细胞凋亡和 Bcl-2, Bax 检测 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡,免疫组化 SABC 法检测 Bcl-2, Bax 表达,严格按照试剂说明书操作要求进行检测。细胞凋亡阳性标准:TUNEL 阳性细胞胞核中有棕黄色颗粒。Bcl-2 和 Bax 阳性标准:光镜下观察, Bcl-2 蛋白染色呈棕黄色颗粒,位于核膜或胞浆内; Bax 蛋白染

色呈棕黄色颗粒,位于胞浆内。高倍镜下随机分别观察皮质缺血半暗带区不重叠的 10 个视野,进行凋亡阳性细胞计数和 Bcl-2, Bax 蛋白阳性细胞计数,计算阳性细胞平均数。

2.7 统计学方法 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 Excel 数据库整理后用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两组之间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠学习、记忆的影响 Morris 水迷宫成绩显示:与正常对照组、假手

术组比较,模型组大鼠学习、记忆能力明显下降;与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠学习、记忆能力明显改善。结果见我们的先前报道^[3]。

3.2 血管性痴呆大鼠海马 CA₁ 区细胞凋亡结果 正常对照组与假手术组大鼠海马 CA₁ 区,可见少量凋亡细胞表达,模型组大鼠海马 CA₁ 区凋亡细胞表达数高于正常对照组与假手术组,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA₁ 区凋亡细胞数低于模型组。表 1 显示,与正常对照组及假手术组相比,模型组海马区凋亡细胞增多 ($P < 0.01$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组海马区凋亡细胞减少 ($P < 0.01$)。

表 1 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA₁ 区凋亡细胞数及 Bcl-2, Bax 表达阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	细胞凋亡数/个	Bcl-2 阳性细胞数/个	Bax 阳性细胞数/个	Bcl-2/Bax
正常对照	-	2.67 ± 1.37 ²⁾	3.17 ± 1.17 ²⁾	3.17 ± 0.75 ²⁾	1.01 ± 0.33 ²⁾
假手术	-	3.17 ± 2.14 ²⁾	3.67 ± 1.51 ²⁾	3.83 ± 1.47 ²⁾	0.99 ± 0.31 ²⁾
模型	-	28.50 ± 5.54 ¹⁾	15.33 ± 1.63 ¹⁾	35.17 ± 3.66 ¹⁾	0.44 ± 0.08 ¹⁾
参芎化瘀胶囊	480	15.83 ± 2.04 ²⁾	25.17 ± 2.64 ²⁾	17.67 ± 1.75 ²⁾	1.43 ± 0.13 ²⁾

注:与正常对照组及假手术组比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 血管性痴呆大鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2, Bax 免疫组化结果 正常对照组与假手术组大鼠海马 CA₁ 区,可见少量 Bcl-2, Bax 阳性细胞表达,模型组 Bcl-2, Bax 阳性细胞染色加深,数量明显增加,其中 Bax 变化更为显著,Bcl-2/Bax 较正常对照组与假手术组显著降低 ($P < 0.01$)。模型组大鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2, Bax 阳性细胞表达数高于正常对照组与假手术组,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2 阳性细胞表达数高于模型组, Bax 阳性细胞表达数低于模型组。表 1 显示,与正常对照组及假手术组相比,模型组海马区 Bcl-2, Bax 阳性细胞均增多 (均 $P < 0.01$), Bcl-2/Bax 较假手术组显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组海马区 Bcl-2 阳性细胞增多 ($P < 0.01$), Bax 阳性细胞减少 ($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 较假手术组显著增加 ($P < 0.01$)。

4 讨论

本实验采用反复夹闭、再通双侧颈总动脉伴低血压法制备大鼠血管性痴呆模型,很好地模拟了人类血管性痴呆的发病过程,最终导致神经细胞功能下降,学习记忆功能障碍,是较理想的 VD 动物模型。本实验结果显示,与正常对照组及假手术组相比,模型组海马区凋亡细胞增多 ($P < 0.01$);与模型

组比较,参芎化瘀胶囊治疗组海马区凋亡细胞减少 ($P < 0.01$)。说明参芎化瘀胶囊能减少血管性痴呆大鼠海马 CA₁ 区细胞凋亡,减轻脑组织损害,起到神经保护作用。

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡的过程^[4],而在参与调控神经元凋亡的基因和蛋白质产物中,Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡过程中发挥着至关重要的作用^[5]。Bcl-2 家族可以分为两类:一类是抗细胞凋亡基因,代表基因是 Bcl-2 基因;另一类是促细胞凋亡基因,代表基因是 Bax 基因^[6]。Bcl-2 与 Bax 二者表达水平的高低与凋亡调控及凋亡的严重性直接相关,Bcl-2 升高,抑制细胞凋亡, Bax 增高,促进细胞凋亡^[7]。有证据^[8]支持 Bcl-2 可作为内源性神经保护物质,Bcl-2 的高表达可阻止多种凋亡因子所致的细胞死亡,延长细胞寿命。Bax 可通过其自身形成的同源二聚体发挥作用,促进细胞凋亡^[9]。此外,研究表明, Bcl-2 和 Bax 的比例决定细胞凋亡的趋势,当 Bax 表达占优势时, Bcl-2/Bax 下降,细胞趋于凋亡;当 Bcl-2 表达占优势时, Bcl-2/Bax 增加,细胞凋亡受到抑制^[10]。在本实验中,模型组大鼠海马 CA₁ 区 Bcl-2, Bax 阳性细胞染色加深,数量明显增加,其中 Bax 变化更为显著,Bcl-2/Bax 较假手术组显著降低 ($P < 0.01$)。参芎化瘀胶囊治疗组 Bcl-2,

Bax 阳性细胞数量也有增加,染色加深,但以 Bcl-2 变化显著,Bcl-2/Bax 较模型组显著增高 ($P < 0.01$)。结果提示,参芎化瘀胶囊可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,减少细胞凋亡,从而改善血管性痴呆大鼠的认知能力。

目前,治疗血管性痴呆的有效药物较少,且价格昂贵。很多关于中药对影响神经细胞凋亡相关因素的干预研究使中药在抗脑缺血后神经细胞凋亡方面展示出了良好前景。本实验选择中药参芎化瘀胶囊治疗血管性痴呆,并探讨其抗细胞凋亡作用机制,为临床应用参芎化瘀胶囊治疗血管性痴呆提供实验室依据。有关参芎化瘀胶囊治疗血管性痴呆更多方面的作用机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 贾建平. 神经病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:205.
- [2] 刘斌,姜敏,张晋霞. 急性脑梗死患者认知障碍的临床特征分析[J]. 山东医药,2009,49(33):5.
- [3] 刘斌,毛文静,李爱春,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA₁ 区 p38 丝裂原活化蛋白激酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010, 16 (8): 161.
- [4] 张运克. 补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠

模型细胞凋亡及 Bcl-2,Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2007,22(6):404.

- [5] Lock R M. Murphy Immunodetecting members of the bcl-2 family of proteins [J]. Methods Mol Med, 2005, 111:83.
- [6] 蔺心敬,李吕力,杨德刚,等. 血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡和蛋白表达实验研究[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(19):2326.
- [7] Amemiya S,Kamiya T,Nito C, et al. Anti-apoptotic and neuro-protective effect of edaivone following transient focal ischemia in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 516 (2):125.
- [8] Solaroglu I,Tsubokawa T,Cahill J, et al. Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Neuroscience,2006,143 (4):965.
- [9] 杨发明,董联玲,曹娟,等. 红景天对血管性痴呆大鼠行为学及海马 CA₁ 区 Bcl-2 及 Bax 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(6):39.
- [10] 刘楠,杜厚伟,陈荣华,等. 白介素 10 对大鼠缺血梗死灶周围脑组织 Bcl-2 和 Bax 表达的作用研究[J]. 免疫学杂志,2007,23(5):549.

[责任编辑 聂淑琴]

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110127.1112.006.html>