

补肾活血颗粒对帕金森病模型大鼠黑质纹状体 bcl-2、bax 表达的影响

徐睿鑫 李绍旦 刘毅 于磊 杨明会

【摘要】 目的 探讨补肾活血颗粒对帕金森病模型大鼠黑质纹状体中 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, bcl-2)、bax 表达的影响。**方法** 33 只雄性 SD 大鼠随机分为生理盐水正常组、6-羟基多巴胺模型组和补肾活血颗粒治疗组,应用免疫组织化学染色技术观察大鼠黑质纹状体中 bcl-2、bax 表达的变化情况。**结果** 模型组 bcl-2 在黑质和纹状体的细胞阳性表达率增殖指数(proliferation index, PI)分别为 0.43 ± 0.022 、 1.14 ± 0.057 ,均低于正常组(均 $P < 0.01$)和治疗组(均 $P < 0.01$)。模型组 bax 在黑质和纹状体的 PI 值分别为 2.07 ± 0.104 、 2.86 ± 0.143 ,均高于正常组(均 $P < 0.01$)和治疗组(均 $P < 0.01$)。**结论** 补肾活血颗粒治疗帕金森病的疗效机制可能与上调帕金森病大鼠黑质纹状体系统 bcl-2 蛋白表达及下调 bax 蛋白表达有关。

【关键词】 帕金森病; 补肾活血颗粒; B 淋巴细胞瘤-2; Bax 蛋白; 大鼠黑质纹状体

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.008

The effects of Bushen huoxue Granule on the expressions of bcl-2 and bax in substantia nigra and striatum in rats models with Parkinson's disease XU Rui-xin, LI Shao-dan, LIU Yi, et al. Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China

Corresponding author: YANG Ming-hui, E-mail: ymh9651@ sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Bushen Huoxue Granule(BSHXG) on the expressions of B-cell lymphoma-2(bcl-2) and bax in substantia nigra and striatum in rats model with Parkinson's disease (PD). **Methods** Thirty-three male SD rats were randomly divided into 6-OHDA-induced PD model group, BSHXG treatment group and normal control group. Changes in the expressions of bcl-2 and bax in substantia nigra and striatum in rats were observed by means of immunohistochemical staining. **Results** bcl-2's proliferation indexes of positive expression rates of the cells in the substantia nigra of the PD model group and the striatum of the PD model group were respectively 0.43 ± 0.022 , 1.14 ± 0.057 , both lower than the normal group (both $P < 0.01$) and treatment group (both $P < 0.01$) while bax's PI in the substantia nigra of the PD model group and the striatum of the PD model group were respectively 2.07 ± 0.104 , 2.86 ± 0.143 , both higher than the normal group (both $P < 0.01$) and treatment group (both $P < 0.01$). **Conclusion** The therapeutic effect of BSHXG on PD may be associated with up regulating the expression of bcl-2 protein and down regulating the expression of bax protein in substantia nigra and striatum in rats with Parkinson's disease.

【Key words】 Parkinson's disease; Bushen huoxue Granule; B-cell lymphoma-2; bax protein; Substantia nigra and striatum in rats

基金项目:国家自然科学基金(81273969)、北京市科技计划“十病十药”研发专项(Z131100002513015)

作者单位:100853 北京,解放军医学院[徐睿鑫(硕士研究生)、于磊(硕士研究生)];中国人民解放军总医院中医院(李绍旦、刘毅、杨明会)

作者简介:徐睿鑫(1986-),2012 级在读硕士研究生。研究方向:中西医结合临床研究。E-mail:rxrxrx@163.com

通讯作者:杨明会(1962-),博士,教授,主任医师,博士生导师。解放军中医药学会会长。研究方向:中医及中西医结合临床及基础研究。E-mail:ymh9651@ sina.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种中老年人常见的脑退行性疾病,其主要病理表现为黑质致密部的多巴胺神经元变性、缺失,但病因及发病机制尚未明确,目前仍无针对病因的特效治疗方法,而以左旋多巴替代疗法等为主的药物治疗,长期使用临床疗效逐渐下降或失效,且存在不同程度的毒副作用,部分患者甚至不能耐受^[1]。中医药在 PD 治疗上具有一定优势,补肾活血颗粒是经多年临

床实践证实治疗 PD 确有疗效的中药复方颗粒^[2-7], 本研究通过制备帕金森大鼠动物模型, 给予补肾活血颗粒干预, 观察帕金森大鼠黑质纹状体系统 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (B-cell lymphoma-2, bcl-2)、bax 蛋白表达的变化情况, 探讨补肾活血颗粒治疗帕金森病可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物与试剂

补肾活血颗粒由山茱萸 20 g、肉苁蓉 10 g、何首乌 15 g、川芎 10 g、当归 10 g、丹参 15 g、蜈蚣 2 条等组成, 由解放军总医院、全军中医研究所统一制成中药配方颗粒, 规格为每袋 8 g, 产品批号 100101, 每两袋溶于 40 mL 蒸馏水中, 浓度为 0.4 g/mL。6% 水合氯醛 (北京化学试剂公司), 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) (美国 Sigma 公司), 阿扑吗啡 (沈阳第一制药厂), 4% 多聚甲醛 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司), bax 兔源性多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), bcl-2 兔源性多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), DAB 显色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 仪器

大鼠脑立体定位仪 (美国 KOPF 公司), 帕金森动物旋转检测仪 (美国 columbus instruments 公司), 微量注射泵, 牙科钻, 外科手术器械, 电子天平, SN-697B 型超净工作台 (北京长城空气净化工程公司), EPS-2001 型电子称 (长沙湘平科技发展有限公司), RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司), CH-2 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司), SSC-DC18P 型彩色病理图像分析系统 (日本 Sony 公司), H-7650 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司)。

1.4 模型制备

SD 大鼠统一饲养于解放军总医院实验动物中心, 60 只大鼠按每笼 5 只饲养于独立通气笼具系统内。饲养条件: 温度 (22 ± 1) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 每天明暗交替 12 小时, 添加饲料、换水等由专人负责。饲养 2 周后随机分为 2 组, 模型制备组 50 只, 正常组 10 只, 模型制备组随机分为造模组 44 只, 假手术组 6 只, 行为学测试无旋转行为后造模。造模前

12 小时禁食不禁水, 称重, 6% 水合氯醛腹腔注射 (350 mg/kg) 麻醉后, 头顶部去毛, 俯卧位固定于大鼠脑立体定位仪上, 碘酒、酒精消毒, 沿正中矢状线暴露颅骨, 调整门齿杆, 使前后囟位于同一水平面上, 依据大鼠脑立体定位图谱^[8] 确定右侧前脑内侧束 (medial forebrain bundle, MFB) 位置, 选取 MFB 坐标: 前囟后 4.3 mm, 矢状线右旁开 1.5 mm, 进针深度 7.7 mm, 用牙科钻小心钻透颅骨, 微量注射泵吸取 6-OHDA $8 \mu\text{L}$, 以 $1 \mu\text{L/min}$ 的速度缓慢注射, 注射后留针 5 分钟, 缓慢出针, 局部消毒缝合头皮。假手术组注射等量生理盐水, 其余条件同造模手术, 正常组暂不做处理。

术后 2 周进行旋转行为测试, 用 0.01% 阿扑吗啡腹腔注射 (0.5 mg/kg), 给大鼠穿上束缚套后置于旋转检测仪中, 5 分钟后由旋转检测仪统一记录旋转次数, 记录时间为 30 分钟。以恒定转向左侧且旋转数 >210 转/30 分者为成功的帕金森大鼠模型。

1.5 模型分组与给药

造模成功的 23 只帕金森大鼠随机分为治疗组 (补肾活血颗粒) 13 只、模型组 10 只, 并设正常组 10 只, 治疗组予补肾活血颗粒 2.7 g/kg (根据大鼠与人的药物剂量换算公式折算, 按临床用量的 10 倍/kg 体重给药^[9]), 每天 1 次灌胃法给药, 给药时间上午 10:00, 每天 1 次, 每周称重 1 次, 调整给药量, 连续 8 周, 正常组、模型组给予等量生理盐水灌胃。

1.6 取材及处理

对各组大鼠进行行为学检测后, 用 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 将剪除针尖的灌注针由左心室推入升主动脉固定, 夹闭胸主动脉, 灌注等渗盐水 (37°C), 剪开右心耳, 当流出液体清亮时, 用 4% 多聚甲醛 (4°C) 进行固定, 先快速灌注 50 mL, 再缓慢灌注 50 mL, 颈部僵硬后完成固定^[10]。随即迅速断头取脑, 将脑组织置于 4% 多聚甲醛中, 放 4°C 冰箱固定 4 小时, 取中脑及纹状体部进行常规石蜡包埋, 应用石蜡切片机对蜡块进行冠状位连续切片, 每个蜡块 5 张, 石蜡切片厚度 $5 \mu\text{m}$ 。进行 bcl-2、bax 免疫组织化学染色 (染色步骤按试剂盒说明书进行)。

1.7 观测指标

bcl-2、bax 表达: 计算细胞阳性表达率增殖指数 (proliferation index, PI), 细胞浆染成棕褐色为蛋白阳性表达。在显微镜 200 倍视野下采集标本图像, 应用 SSC-DC18P 型彩色病理图像分析系统对采集的图像进行分析, 在每张切片中随机选取 6 个视野,

用上述软件分析 bcl-2、bax 阳性表达率(PI = 阳性细胞数/视野中所有细胞总数×100%)。

1.8 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件包。计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黑质 bcl-2、bax 表达

与正常组相比,模型组 bcl-2 表达明显减弱($P < 0.01$),治疗组与模型组相比 bcl-2 表达显著增强($P < 0.01$);与正常组相比,模型组 bax 表达明显增强($P < 0.01$),治疗组与模型组相比 bax 表达显著减弱($P < 0.01$)。见表 1,图 1、2。

表 1 大鼠脑黑质 bcl-2、bax 蛋白表达的 PI 值比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | bcl-2 | bax |
|-----|----|---------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 10 | 2.04 ± 0.102 ^a | 0.37 ± 0.019 ^a |
| 模型组 | 10 | 0.43 ± 0.022 | 2.07 ± 0.104 |
| 治疗组 | 13 | 1.82 ± 0.091 ^a | 1.52 ± 0.126 ^a |

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$

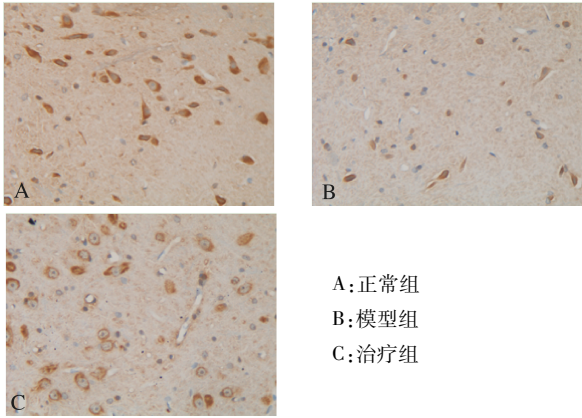


图 1 各组大鼠脑黑质 bcl-2 表达(×200)

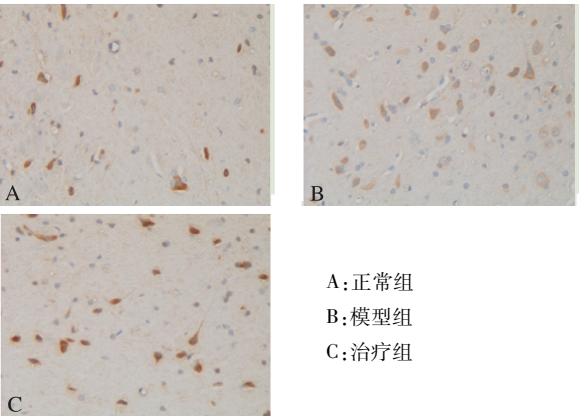


图 2 各组大鼠脑黑质 bax 表达(×200)

2.2 纹状体 bcl-2、bax 表达

与正常组相比,模型组 bcl-2 表达明显减弱($P < 0.01$),治疗组与模型组相比 bcl-2 表达显著增强($P < 0.01$);与正常组相比,模型组 bax 表达明显增强($P < 0.01$),治疗组与模型组相比 bax 表达显著减弱($P < 0.01$)。见表 2,图 3、4。

表 2 大鼠脑纹状体 bcl-2、bax 蛋白表达的 PI 值比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | bcl-2 | bax |
|-----|----|---------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 10 | 3.28 ± 0.164 ^a | 0.98 ± 0.049 ^a |
| 模型组 | 10 | 1.14 ± 0.057 | 2.86 ± 0.143 |
| 治疗组 | 13 | 3.73 ± 0.187 ^a | 1.88 ± 0.094 ^a |

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$

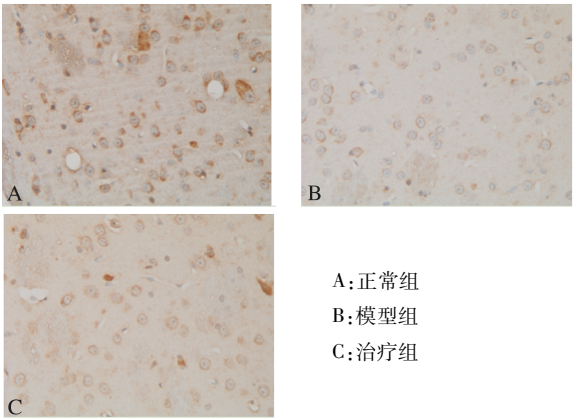


图 3 各组大鼠脑纹状体 bcl-2 表达(×200)

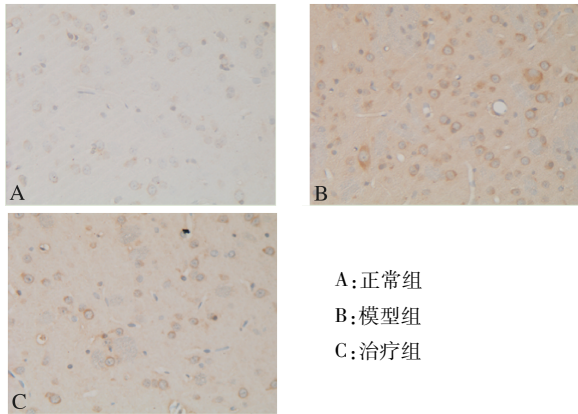


图 4 各组大鼠脑纹状体 bax 表达(×200)

3 讨论

PD 的主要病变特征是累及黑质纹状体系统。研究显示,6-OHDA 是一种可以诱发 SD 大鼠黑质纹状体系统多巴胺能神经元变性死亡的神经毒素,由于结构与多巴胺(dopamine, DA)类似,常被 DA 神经元末梢或胞体的膜 DA 转运体主动摄取入细胞

内,其可形成羟自由基和抑制线粒体氧化呼吸链复合物 I 和 IV,从而干扰 ATP 合成,使 DA 神经元变性死亡,导致大鼠出现与人类 PD 类似的症状^[11],应用 6-OHDA 损毁法(将 6-OHDA 注射到黑质或纹状体等部位)制备 SD 大鼠模型是目前国内外公认的 PD 模型之一,在 PD 发病机制和治疗的研究中多有应用^[12]。

PD 是一种中老年人常见的神经系统退行性疾病,目前病因尚未明确,其主要病理改变为黑质纹状体系统 DA 能神经元进行性变性、坏死、脱失以及胶质细胞增生、路易氏小体形成^[1]。其发病机制可能与遗传和环境因素作用、氧化应激、兴奋性神经毒作用、免疫炎症反应等有关,近年来,越来越多的研究者开始重视细胞凋亡学说在 PD 的发病机制中所起的作用^[13]。

细胞的凋亡反应是由内部凋亡通路和外部凋亡通路诱导完成的。其中内部凋亡通路又称线粒体通路,线粒体通路的凋亡是由一系列促凋亡和抗凋亡的分子调控的,其中最为重要的是 bcl-2 家族^[14],bcl-2 家族成员众多,并分别具有促进凋亡和抗凋亡的作用。bcl-2 为凋亡抑制基因,在线粒体参与的凋亡过程中起调控作用,其通过组织线粒体细胞色素 C 的释放而发挥抗凋亡作用。此外,bcl-2 还具有保护细胞的功能,bcl-2 过度表达可引起细胞核谷胱甘肽的积聚,降低 Caspase 的活性发挥保护细胞的功能^[15]。bax 是 bcl-2 家族中极其重要的促凋亡成员^[16],研究发现 bax 蛋白水平与凋亡调控直接相关,bax 蛋白高表达决定细胞在受到凋亡刺激信号后趋向于凋亡^[17]。其从细胞质迁移到线粒体和核膜对抗 bcl-2 蛋白从而发挥诱导凋亡的作用。研究表明^[13]细胞凋亡可能在帕金森病的黑质多巴胺能神经元死亡中起重要作用,在治疗过程中要采用抗细胞凋亡的方法。

本实验采用免疫组织化学染色法检测大鼠脑黑质及纹状体 bcl-2、bax 表达情况,与正常组相比,模型组 bcl-2 表达明显减弱,治疗组与模型组相比 bcl-2 表达显著增强;与正常组相比,模型组 bax 表达明显增强,治疗组与模型组相比 bax 表达显著减弱,结果表明补肾活血颗粒干预后帕金森大鼠脑黑质及纹状体中 bax 表达减弱而 bcl-2 表达增强,提示补肾活血颗粒治疗帕金森病的作用机制之一可能是通过上调 PD 大鼠黑质 bcl-2 蛋白表达和下调 bax 蛋白表达而抑制细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] 杨明会,李军艳,刘毅. 系统论引领帕金森病治疗思路[J]. 医学与哲学,2009,30(2):3-5.
- [2] 杨明会,窦永起,刘毅,等. 抑颤汤治疗帕金森病临床对照观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(5):256-257.
- [3] 李军艳,杨明会,窦永起,等. 补肾活血饮治疗原发性帕金森病的疗效观察[J]. 解放军医学杂志,2011,36(3):273-276.
- [4] 杨明会,李敏,窦永起,等. 补肾活血颗粒对帕金森病患者运动功能的影响:多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究[J]. 中西医结合学报,2010,8(3):231-237.
- [5] 李敏,杨明会,窦永起,等. 补肾活血颗粒对帕金森病患者肱二头肌肌张力的影响[J]. 中药材,2011,34(3):490-493.
- [6] 李敏,杨明会,刘毅,等. 补肾活血颗粒对帕金森病患者四肢肌张力的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(3):599-601.
- [7] 李敏,杨明会,刘毅,等. 补肾活血颗粒治疗帕金森病运动并发症临床研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(6):1296-1299.
- [8] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:49-59.
- [9] 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:11.
- [10] 卢文朋,栗世方. 大鼠脑组织灌注固定方法的改进[J]. 医学研究生学报,2014,27(6):627-629.
- [11] Blum D, Torch S, Lambeng N, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease[J]. Prog Neurobiol, 2001,65(2):135.
- [12] Deumens R, Blokland A, Priekaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: a evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway[J]. Exp Neurol,2002,175(2):303-317.
- [13] Vermes I,Steur EN,Reutrlingsperger C, et al. Decreased concentration of annexin in parkinsonian cerebrospinal fluid: speculation on the underlying cause [J]. Mov Disord, 1999, 14(6):1008-1010.
- [14] Babu P P,Suzuki G,Ono Y, et al. Attenuation of ischemia and/or reperfusion injury during myocardial infarction using mild hypothermia in rats: an immunohistochemical study of bcl-2, bax, Bak and TUNEL[J]. Pathol Int,2004,54(12):896-903.
- [15] 屈二军,胡建业,陈兰英. 细胞凋亡的机理与调节研究进展[J]. 现代医药卫生,2008,24(13):1995-1997.
- [16] Duan X X, Ou J S, Li Y, et al. Dynamic expression of apoptosis related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis [J]. World J Gastroenterol, 2005,11(30):4740-4744.
- [17] Martin L J. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2001,7(5):455.

(收稿日期:2015-02-03)

(本文编辑:蒲晓田)