

地黄饮子加减方对 MCAO 模型大鼠血清 HPA 轴及其脑组织细胞凋亡表达的干预效应研究

唐璐 孙塑伦 高颖 朱陵群

【摘要】 目的 探讨地黄饮子加减方对 MCAO 模型大鼠血清 HPA 轴含量及其脑组织细胞凋亡表达的干预效应。**方法** MCAO 法制作 SD 大鼠脑缺血模型,造模成功后第二天开始给予地黄饮子加减方浓缩煎剂灌胃,对照组灌胃等量的生理盐水,连续 7 天,于最后一次灌胃后 1 小时取材,放射免疫法检测血清 HPA 轴含量,TUNEL 免疫组化法检测脑组织细胞凋亡表达。**结果** 经地黄饮子治疗后:MCAO 模型大鼠血清 COR 含量明显低于正常组、模型组,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),ACTH、CRH 含量均明显高于模型组,差异有显著统计学意义($P < 0.05$),缺血侧脑组织细胞凋亡表达较模型组明显减少,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 地黄饮子加减方能够通过纠正 HPA 轴的紊乱状态、抑制脑组织细胞凋亡表达等作用机制在脑缺血急性期发挥减轻脑损伤、改善预后的作用。

【关键词】 地黄饮子; 补肾护脑; MCAO 模型大鼠; HPA 轴; 细胞凋亡

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.01.002

Research on Dihuang Yinzi Decoction's neuroprotection effects on MCAO rats from the HPA axis reaction and apoptosis aspects TANG Lu, SUN Su-lun, GAO Ying, et al. Department of Neurology, Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China
Corresponding author: GAO Ying, E-mail: gaoying973@126.com

【Abstract】 Objective To explore the Dihuang Yinzi Decoction's neuroprotection effects on MCAO rats from the HPA axis reaction and apoptosis aspects. **Methods** 30 SD rats were randomly divided into 3 groups: MCAO model group, herb formula group, and normal group, each group was 10. For drug treatment, herb formula group were given Dihuang Yinzi Decoction from 2 days to 8 days after ischemia by intragastric administration method, whereas the MCAO model group and normal group received equivalent volumes of distilled water. SD rats were killed 1h after the last intragastric administration. The expression levels of ACTH, CRH, COR were detected by radioimmunoassay. The apoptosis of neuron was detected by TUNEL Immunohistochemistry. **Results** The level of COR in herb formula group were significantly lower than that in normal group and MCAO model group ($P < 0.01$); The level of ACTH, CRH was significantly higher in herb formula group than in normal and MCAO model group ($P < 0.05$); The expression of apoptosis in neuron was significantly lower in herb formula group than in MCAO model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Dihuang Yinzi Decoction may exert neuroprotection mechanism and improve the prognosis through restoring the disturbed condition of HPA axis reaction and inhibiting apoptosis.

【Key words】 Dihuang Yinzi Decoction; Reinforcing kidney and protecting brain; MCAO model rat; HPA axis; Apoptosis

基金项目:国家科技重大专项“重大新药创制”(2009ZX09502-028);北京中医药大学科研基地建设项目(2011-JDJs-04);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-22)

作者单位:100700 北京中医药大学东直门医院神经内科(唐璐、孙塑伦、高颖),中医脑病研究室(朱陵群)

作者简介:唐璐(1983-),女,博士,主治医师。研究方向:中医药防治中风病研究。E-mail: tanglu0310@126.com

通讯作者:高颖(1963-),女,医学博士,教授,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治中风病研究、中风病临床诊疗标准研究。

E-mail: gaoying973@126.com

地黄饮子原方出自刘完素《宣明论方》:“治暗瘵,肾虚弱厥逆,语声不出,足软不用”,作为滋肾阴、补肾阳、化痰开窍的代表方剂,它被广泛运用于脑血管病、痴呆、神经系统变性病等的临床治疗。本实验通过观察地黄饮子加减方对大鼠中动脉线栓(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠血清 HPA 轴激素水平及其脑细胞凋亡表达的干预效应,探讨了缺血性中风急性期应用温阳补肾法对促进神经功能恢复,改善预后转归的作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

成年 SD 雄性大鼠 30 只(北京维通利华实验动物技术有限公司 SPF/VAF 级,合格证号: SCXK(京)2006-0009)。体重(280 ± 10)g。动物称重编号,用随机数字表法^[1]分为正常组、模型组、地黄饮子组,每组 10 只。

1.2 MCAO 模型制备

模型组与地黄饮子组大鼠以大脑中动脉线栓法造模。以 10%水合氯醛($0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)将大鼠麻醉后仰卧固定,常规备皮,沿颈部正中中线切开皮肤 1.5 cm 左右,钝性分离颈部肌群,以开睑器充分暴露手术野,分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),结扎 ECA 及 CCA 近心端,CCA 远心端穿线备用。动脉夹夹闭 ECA 分叉处。于 CCA 剪开一个小口,插入头端直径为 0.28 mm 的栓线。轻轻结扎固定栓线于 CCA 内,开放动脉夹,将栓线插入颈内动脉(internal carotid artery, ICA),使其头端到达大脑中动脉起始处。扎紧固定线,缝合皮肤。术中用 100 W 灯泡照射,严格控制室温。缝合伤口,清理血迹,将术后大鼠置于电热毯保持体温,直至苏醒。

1.3 药物制备及灌胃方法

地黄饮子加减方配伍及剂量:熟附片 4 g、巴戟天 10 g、山萸肉 10 g、熟地 12 g、石斛 10 g、肉苁蓉 12 g、五味子 6 g、麦冬 15 g。按人与动物体型系数折算,等效比例为 7,总生药量 316 g。将所有药物用 10 倍量和 8 倍量的水煎煮 2 次,每次 1 小时,合并水煎液,用旋转蒸发仪浓缩,制成含生药 $1.0 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的药液备用, pH 值 7.0。每日称重,按 1 ml/100 g 的量连续灌胃 7 天,其中地黄饮子组灌胃中药药液,模型组和正常组灌胃等量的生理盐水,于最后一次灌胃后 1 小时取材。至取材时模型组大鼠死亡 2

只,原因为术后腹腔感染、灌胃失误,剩余 8 只;地黄饮子组大鼠死亡 1 只,原因为灌胃失误,剩余 9 只。

1.4 主要试剂

促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)放射免疫试剂盒;促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)放射免疫试剂盒;皮质醇(cortisol, COR)放射免疫试剂盒;由解放军总医院科技开发中心放免所提供。细胞凋亡原位检测试剂盒(TUNEL):美国罗氏公司进口分装。DAB 显色试剂盒:北京中杉金桥生物有限公司。

1.5 指标检测

1.5.1 血清下丘脑—垂体—肾上腺轴(hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA)轴 大鼠麻醉后经腹主动脉取血 4 ml,注入含 30 μl EDTA、40 μl 抑肽酶的试管中静置,4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 转/分离心 15 分钟,取上清存-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。通过上海核所日环光电仪器有限公司 Sn-695B 型免疫计数器测定放射强度,记录数值结果。

1.5.2 细胞凋亡表达(TUNEL 免疫组化法)

TUNEL 免疫组化法检测细胞凋亡表达,阳性细胞为细胞核着棕黄色,阴性为细胞核着蓝色。通过安装在 Olympus BX60 显微镜上的 SPO-II 数码成相软件系统以及 Metamorph 图像分析软件对 TUNEL 免疫组化染色结果进行拍照分析。以统一的灰度值阈值作为度量标准界定阳性染色部位,采用阳性面积作为测量指标,每只大鼠选 5 张切片,在 20×10 , 40×10 的倍数下,于脑梗死中心区,梗死周边区,对侧正常区随机选取 5 个视野进行拍照、测量,测定阳性信号平均光密度值,读取数据进行统计分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件,结果以($\bar{x} \pm s$)表示。正态分布定量数据多组间均值比较采用单因素方差分析,多组间比较用 LSD 法,非正态分布定量数据多组间比较采用 Dunnett's T3 检验,方差齐性检验采用 Levene 法。在双变量相关分析中,对正态分布数据,可选择 Pearson 相关系数,对非正态分布数据,选择 Spearman 相关系数。

2 结果

2.1 地黄饮子加减方对 MCAO 模型大鼠血清 HPA 轴的干预作用

正常组、地黄饮子组、模型组的 ACTH、CRH、

COR 各组数据经 K-S 检验提示均符合正态分布, 各组数据经 ANOVA 方差分析提示总体有差异, 以 LSD 法进行多组间比较, 结果如表 1 所示, 在脑缺血发生后 7 天, 模型组的 ACTH、CRH 含量均明显低于正常组, COR 含量明显高于正常组, 差异有显著统计学意义; 地黄饮子组的 COR 明显低于正常组、模型组, 差异有显著统计学意义; 地黄饮子组 ACTH、CRH 含量均明显高于模型组, 差异有显著统计学意义; ACTH、CRH 含量略低于正常组, 差异无统计学意义。

表 1 各组大鼠灌胃 7 天后血浆 HPA 轴含量变化

| 组别 | n | ACTH(pg/ml) | CRH(pg/ml) | COR(ng/ml) |
|-------|----|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 10 | 22.44±10.00 | 41.64±14.31 | 16.60±1.12 |
| 模型组 | 8 | 11.29±4.21 ^a | 23.85±7.05 ^a | 25.83±11.34 ^a |
| 地黄饮子组 | 9 | 21.75±5.27 ^b | 37.21±12.43 ^b | 13.19±6.41 ^{abc} |

注: 与正常组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$

2.2 地黄饮子对 MCAO 大鼠缺血后脑组织细胞凋亡表达的干预效应

如图 1~3 所示, 模型组、地黄饮子组梗死侧大脑皮层区均可见凋亡阳性细胞表达, 胞核呈棕褐色, 胞体缩小, 染色不均, 多集中于核膜下, 可见核固缩和核碎裂。与模型组比较, 经地黄饮子加减方灌胃的大鼠脑组织细胞凋亡表达明显减少。

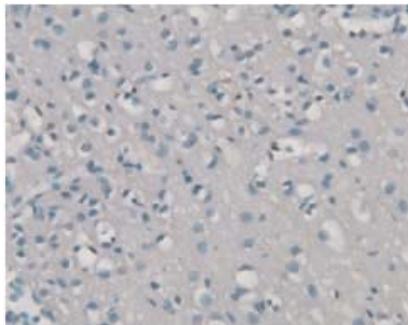


图 1 正常组大鼠脑组织细胞凋亡表达 (TUNEL 染色, ×400)

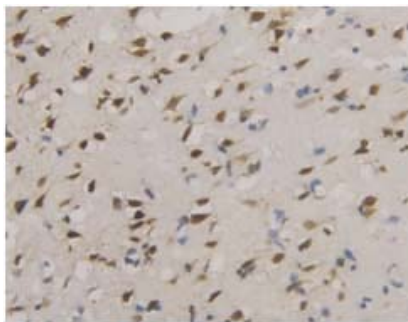


图 2 模型组大鼠脑组织细胞凋亡表达 (TUNEL 染色, ×400)

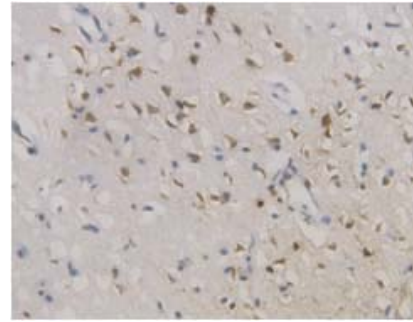


图 3 地黄饮子组大鼠脑组织细胞凋亡表达 (TUNEL 染色, ×400)

正常组、地黄饮子组、模型组的脑组织细胞凋亡表达数据经 K-S 检验提示均符合正态分布, 各组数据经 ANOVA 方差分析提示总体有差异, 以 LSD 法进行多组间比较, 结果如表 2 所示, 正常组为阴性, 模型组、地黄饮子组脑组织与正常组相比均可见细胞凋亡表达, 差异有显著统计学意义 ($P<0.01$); 模型组脑组织细胞凋亡表达较地黄饮子组明显, 差异有显著统计学意义 ($P<0.01$)。

表 2 地黄饮子对 MCAO 模型大鼠缺血后脑组织细胞凋亡表达的干预效应 ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | 脑组织细胞凋亡表达 | 95% CI |
|-------|----|---------------------------|--------------|
| 正常组 | 10 | 0.00±0.00 | (0.00, 0.00) |
| 模型组 | 8 | 0.35±0.03 ^{ab} | (0.33, 0.38) |
| 地黄饮子组 | 9 | 0.24±0.04 ^{abcd} | (0.22, 0.27) |

注: 与正常组比较^a $P<0.05$; 与正常组比较^b $P<0.01$; 与模型组比较^c $P<0.05$; 与模型组比较^d $P<0.01$;

2.3 MCAO 大鼠缺血后血清 HPA 轴与脑组织细胞凋亡表达的相关性分析

地黄饮子组、模型组的脑组织细胞凋亡表达各组数据经 K-S 检验提示均符合正态分布, 以双变量相关分析 MCAO 大鼠血清 HPA 轴含量与脑组织细胞凋亡表达的相关性, 如表 3 所示, 模型组血清 ACTH 含量与脑组织细胞凋亡表达存在显著负相关性, 但 CRH、COR 则与凋亡表达无明显相关性, 地黄饮子组血清 ACTH、CRH、COR 含量与脑组织细胞凋亡表达均无明显相关性。

3 讨论

根据本实验结果, 地黄饮子能够改善脑缺血大鼠 HPA 轴的紊乱状态, 通过提高 CRH 含量抑制了大鼠体内 COR 的释放。这一结果支持了钟历勇、沈

表 3 模型组、地黄饮子组大鼠脑组织细胞凋亡表达与 HPA 轴含量的相关性分析

| 分组 | CRH | | ACTH | | COR | |
|-------|--------|-------|---------------------|-------|-------|-------|
| | 相关系数 | P 值 | 相关系数 | P 值 | 相关系数 | P 值 |
| 模型组 | -0.467 | 0.243 | -0.721 ^a | 0.043 | 0.374 | 0.362 |
| 地黄饮子组 | 0.257 | 0.504 | -0.042 | 0.914 | 0.113 | 0.771 |

注:^a $P<0.05$,说明两指标相关

自尹等^[2]提出的补肾药可通过上调下丘脑 CRF mRNA 表达来保护 HPA 轴免受外源性皮质醇的抑制,补肾药对肾虚证的主要调节点定位于下丘脑的观点。

模型组、中药组的梗死侧大脑皮层区域均可见有凋亡阳性细胞的表达,经地黄饮子加减方灌胃的中药组大鼠脑组织细胞凋亡表达明显减少。说明地黄饮子可明显抑制脑组织细胞凋亡的表达。王利军^[3]曾通过实验证实,地黄饮子可能通过调节神经生长因子 BDNF 及凋亡相关基因 Bcl-2 和 BAX 的表达来发挥抑制细胞凋亡、对抗脑缺血的作用。另有实验证实,加减地黄饮子可显著提高缺血脑组织内相关酶的活性,通过抗自由基损伤来实现对凋亡表达的抑制。脑组织缺血缺氧后的损伤机制较为复杂,抗损伤的途径也并不唯一,需进一步研究。

模型组 ACTH 含量与脑组织细胞凋亡表达存在显著的负相关关系,CRH、COR 与凋亡表达无明显相关性,说明模型组血清 ACTH 含量低于中药组,细胞凋亡表达较之更为明显,而其余指标之间无明显相关性的原因可能与样本量偏少有一定的关系。提示地黄饮子加减方抑制细胞凋亡,发挥脑保护作用的功效可能是通过改善 HPA 轴的紊乱状态这一机制来实现的。

现代医学研究认为,肾阳虚证与神经内分泌免疫系统 (NEIS) 有关,肾阳虚证在下丘脑—垂体—靶腺 (肾上腺皮质、甲状腺、性腺和胸腺) 轴不同环节、不同程度的功能紊乱,且主要发病环节在下丘脑 (或更高级) 的调节功能紊乱^[4]。HPA 轴在机体接受应激刺激后被激活,参与调控机体对应激的急性反应,介导一系列的代谢和心血管的代偿机制以克

服应激原对机体的威胁或对内环境的扰乱作用,具有一定的积极意义。但过于剧烈的应激反应同时会促进和加剧炎症的发生,对免疫机制也有显著的抑制效应,通过 NEIS 对机体产生应激损伤。本实验结果说明在脑缺血发生后早期使用中药地黄饮子加减方,能够稳定下丘脑—垂体—肾上腺系统的功能状态,使应激刺激和炎症反应的发生不至于过度剧烈,通过补肾的方法达到护脑的目的,在脑缺血急性期发挥了扶正的作用,对改善整体状态,缩短急性期病程,改善预后,都具有重要的临床参考价值。

中风病的病位在脑,脑与肾密切相关。肾虚既是其发病基础,又是病情发展过程中影响预后和病情轻重的关键因素。鉴于肾与脑的密切关系及肾虚在中风病因病机中的重要作用,在治疗时对急性期患者早期通过补肾的方法扶助正气,对帮助患者脑功能的恢复,减轻脑功能损害具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 苗明三. 实验动物和动物实验技术 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 142.
- [2] Tsigos C, Chrousos GP. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1994, 23(3): 451-466.
- [3] 王利军. 地黄饮子对大鼠脑缺血后脑内相关因子的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2003.
- [4] 蔡定芳, 沈自尹, 陈晓红, 等. 乌头碱对大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素含量的影响 [J]. 中西医结合杂志, 1996, 16(9): 544.

(收稿日期: 2012-11-09)

(本文编辑: 刘群)