

地黄饮子加减方对 MCAO 模型大鼠血浆 HPA 轴及脑组织 HSP70 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大鼠中动脉线栓(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠血浆下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA 轴)含量及其脑组织热休克蛋白 70(heat-shock protein 70, HSP70)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,放射免疫法检测血浆 HPA 轴含量,免疫组化法检测脑组织 HSP70 表达。**结果** 经地黄饮子治疗后:MCAO 模型大鼠血浆皮质醇(COR)含量明显低于正常组、模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),促肾上腺皮质激素(ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)含量均明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);地黄饮子组较模型组脑组织的 HSP70 表达更为明显,差异有统计学意义($P < 0.01$);模型组 COR 含量与脑组织 HSP70 表达存在显著的正相关关系,CRH、ACTH 含量则与 HSP70 表达无明显相关性,地黄饮子组 HPA 轴各指标与脑组织 HSP70 表达无明显相关性。**结论** 地黄饮子加减方可能通过纠正 HPA 轴的紊乱状态、提高大鼠脑组织 HSP70 表达等途径在脑缺血急性期发挥神经保护作用。

【关键词】 地黄饮子; 补肾护脑; MCAO 模型大鼠; 下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA 轴); 热休克蛋白 70(HSP70)

【中图分类号】 R 285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.07.001

Research on Dihuang Yinzi Decoction's neuroprotection effects on MCAO rats from the reaction of the HPA axis in plasma and the expression level of brain HSP70 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 The aim of this study is to explore the Dihuang Yinzi Decoction's neuroprotection effects on MCAO rats from the reaction of the HPA axis in plasma and the expression level of brain HSP70. **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 expression level of brain HSP70 was detected by Immunohistochemistry. **Results**

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,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

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 level of brain HSP70 was significantly enhanced in herb formula group than in MCAO model group ($P < 0.01$); There was strong positive correlation between the level of COR and the expression level of brain HSP70 in MCAO model group, There were no significant negative relationships between the level of ACTH, CRH and the expression level of brain HSP70 in MCAO model group; There were no significant negative relationships between the HPA axis reaction and the expression level of brain HSP70 in herb formula group. **Conclusion** Dihuang Yinzi Decoction may exert neuroprotection mechanism through restoring the disturbed condition of HPA axis reaction and promoting the expression level of brain HSP70.

【Key words】 Dihuang Yinzi Decoction; Reinforcing kidney and protecting brain; MCAO model rat; HPA axis; HSP70

地黄饮子是滋肾阴、补肾阳、化痰开窍的代表方剂,“治暗瘵,肾虚弱厥逆,语声不出,足软不用”。本实验中运用的地黄饮子加减方是导师孙塑伦教授从中风病的病机出发,立足肾虚为本,以温补肾阳为主要治法化裁而成,通过观察地黄饮子加减方对大鼠中动脉线栓(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠血浆下丘脑—垂体—肾上腺轴(hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA)激素水平及其脑组织热休克蛋白 70(heat-shock protein 70, HSP70)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($0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)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、熟地黄 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 g/ml 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 3 只,原因为术后腹腔感染、灌胃失误,剩余 7 只;地黄饮子组大鼠死亡 3 只,原因为术后腹腔感染、麻醉过量、灌胃失误,剩余 7 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)放射免疫试剂盒均由解放军总医院科技开发中心放免所提供。多克隆小鼠抗动物 HSP70 试剂盒, SABC、DAB 显色试剂盒均由博奥森生物技术有限公司提供。

1.5 指标检测

1.5.1 血浆 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℃ 3000 转/分离心 15 分钟,取上清液,存 -80℃ 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 脑组织 HSP70 表达 免疫组化 SABC 法检测大鼠脑组织 HSP70 的表达,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 OlympusBX60 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 HSP70 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 SPSS 13.0 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 模型大鼠血浆 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,结果显示,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,差异有统计学意义;ACTH、CRH 含量略低于正常组,差异无统计学意义。见表 1。

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	7	11.29 ± 4.21 ^a	23.85 ± 7.05 ^a	25.83 ± 11.34 ^a
地黄饮子组	7	21.75 ± 5.27 ^b	37.21 ± 12.43 ^b	13.19 ± 6.41 ^{ac}

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 模型大鼠脑组织 HSP70 表达的干预效应

HSP70 阳性细胞主要出现在梗塞周边区的皮

层,主要为神经细胞,也可见少量的胶质细胞和毛细血管内皮细胞。阳性表达主要在胞质,DAB 显色呈棕黄色者即为阳性细胞。模型组仅有少量表达,与模型组比较,地黄饮子组表达显著增加,见图 1、图 2。

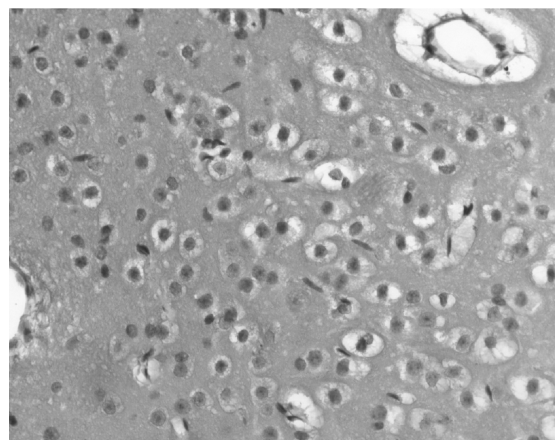


图 1 模型组大鼠脑组织 HSP70 表达
(免疫组化 SABC 法染色, $\times 400$)

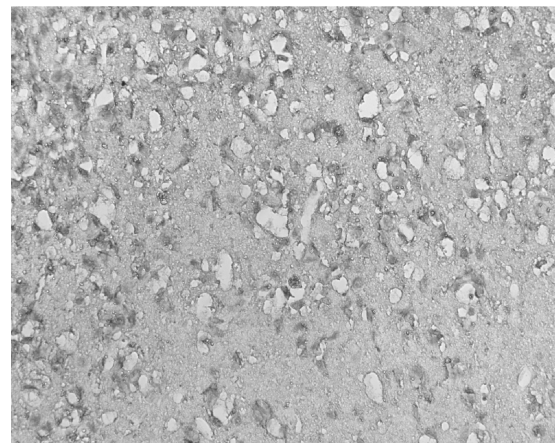


图 2 地黄饮子组大鼠脑组织 HSP70 表达
(免疫组化 SABC 法染色, $\times 400$)

正常组、地黄饮子组、模型组脑组织 HSP70 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,结果显示,正常组为阴性,模型组、地黄饮子组脑组织与正常组比较均可见 HSP70 表达,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);同模型组相比,地黄饮子组脑组织的 HSP70 表达更为明显,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)提示地黄饮子加减方可提高 SD 大鼠脑组织 HSP70 的表达,在脑缺血急性期发挥脑保护作用,见表 2。

表 2 地黄饮子对 MCAO 模型大鼠脑组织 HSP70 表达的干预效应($\bar{x} \pm s$)

分组	n	HSP70	95% CI
正常组	10	0.00 ± 0.00	(0.00, 0.00)
模型组	7	0.03 ± 0.01 ^a	(0.23, 0.29)
地黄饮子组	7	0.04 ± 0.01 ^{ab}	(0.32, 0.40)

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

2.3 MCAO 大鼠缺血后 HPA 轴与脑组织 HSP70 表达的相关性分析

模型组 COR 含量与脑组织 HSP70 表达存在正相关关系,但 CRH、ACTH 则与 HSP70 表达无明显相关性,见表 3。地黄饮子组 HPA 轴各指标与脑组织 HSP70 表达无明显相关性,见表 4。

表 3 模型组 ACTH、CRH、COR 含量与 HSP70 表达的相关性分析

统计值	CRH	ACTH	COR
相关系数	0.336	-0.170	0.908 ^a
P 值	0.416	0.687	0.002

注:^a $P < 0.01$,两个指标显著相关

表 4 地黄饮子组 ACTH、CRH、COR 含量与 HSP70 表达的相关性分析

统计值	CRH	ACTH	COR
相关系数	0.433	0.642	0.072
P 值	0.284	0.086	0.866

3 讨论

根据本实验结果,地黄饮子灌胃能够改善脑缺血大鼠血浆 HPA 轴的紊乱状态,通过提高 CRH 含量抑制大鼠体内 COR 的释放。这一结果支持了钟历勇、沈自尹等^[2-3]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,补肾药对肾阳虚证的主要调节点定位于下丘脑的观点。

热休克蛋白 70 (HSP70) 是一种极敏感和可靠的脑缺血的标志,它是 HSP 家族中的一种,主要功能是保护各种应激所致的细胞损伤。HSP70 对大

脑缺血性损伤有保护作用,已有的研究结果证实,它的保护作用机制为:作为分子伴侣,有助于蛋白质的正确折叠;通过直接抑制促细胞凋亡蛋白的功能及间接提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平而抑制细胞凋亡等^[4]。另有研究证明,地黄饮子繁育骨髓间充质干细胞移植能够促进大鼠脑梗塞 HSP70 和神经生长因子 VEGF 的表达,通过此作用途径发挥脑保护作用^[5]。本实验结果说明地黄饮子加减方能够通过促进 MCAO 大鼠梗死区大脑皮层的 HSP70 表达,在脑缺血后发挥对机体的保护作用。

有研究者认为梗死后的高糖皮质激素水平是加重病情的一个原因,另有研究发现,MCAO 模型大鼠脑组织内 HSP70 主要位于缺血的半暗带区^[6]。HSP70 是机体在遭受应激刺激后诱导产生的一组应激蛋白,正常脑内不存在,但可被脑缺血、缺氧等各种损伤迅速诱导产生。模型组血浆 COR 含量平增高的情况下可加速诱导缺血区 HSP70 的表达。本研究结果说明,MCAO 大鼠经地黄饮子灌胃后,改善了 HPA 轴的紊乱状态,降低了血浆内 COR 的含量,提高了脑组织 HSP70 的表达,通过多途径作用于机体发挥着缺血急性期的脑保护作用。

参 考 文 献

- [1] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 第一版. 北京:中国中医药出版社,1997:142.
- [2] 钟历勇,沈自尹,郑仲承,等. 下丘脑-垂体-肾上腺轴大鼠下丘脑 CRHmRNA 表达[J]. 上海铁道大学学报,1998,19(增刊):8.
- [3] 钟历勇,沈自尹,蔡定芳,等. 补脾健身活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及 CRF 基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(1):39.
- [4] Giffard RG, Yenari MA. Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia[J]. J Neurosurg Anesthesio, 2004, 16(1):53.
- [5] 程小丽,张熙,刘永琦,等. 地黄饮子繁育 BMSCs 移植对大鼠脑梗塞 HSP70 和 VEGF 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2858-2859.
- [6] 牛敬忠,王贤军,夏青,等. 大鼠局灶性脑梗死后细胞凋亡及热休克蛋白 70 表达的变化[J]. 中国微循环,2005,9(3):179-181.

(收稿日期:2013-04-16)

(本文编辑:刘群)