

● 实验研究 ●

补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 神经干细胞移植后凋亡相关基因表达的影响

廖亮英¹, 蔡光先², 周赛男²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007;

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后凋亡相关基因 Bag-1、Bcl-2 表达的影响。方法:选取 SD 大鼠,复制局灶性脑缺血大鼠模型,按神经功能缺损评分进行分层,随机分为模型组、空白移植组、移植组、补阳传统饮片组、补阳超微饮片组,每组 15 只,分别于细胞移植后 7、14、28d 观察神经功能评分,采用补阳还五汤超微饮片与传统饮片予以干预,于相应时间点处死大鼠后采用免疫组化法检测凋亡基因 Bag-1、Bcl-2 的表达。结果:补阳传统饮片组、补阳超微饮片组大鼠神经功能得到明显恢复,Bag-1、Bcl-2 蛋白表达上升显著,在各时间点(7、14、28d)与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);补阳超微饮片组促神经功能积分的恢复及上调 Bcl-2、Bag-1 蛋白表达作用优于补阳传统饮片组,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:补阳还五汤可促进神经功能的恢复,上调 Bag-1、Bcl-2 蛋白表达,且超微饮片的作用较传统饮片更加显著。

[关键词] 局灶性脑缺血;神经干细胞;细胞移植;补阳还五汤;Bag-1;Bcl-2;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.064

Effect of Buyang Huanwu decoction on the expression of apoptosis-related genes after neural stem cell transplantation in rats with focal cerebral ischemia

LIAO Liang-ying¹, CAI Guang-xian², ZHOU Sai-nan²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Buyang Huanwu decoction on the expression of apoptosis-related genes Bag-1 and Bcl-2 after neural stem cell transplantation in rats with focal cerebral ischemia. Methods: Sprague-Dawley rats were selected to establish a rat model of focal cerebral ischemia, and according to the neurologic impairment score, the rats were randomly divided into model group, blank transplantation group, transplantation group, conventional Buyang decoction piece group, and ultrafine Buyang decoction piece group, with 15 rats in each group. Neurological score was determined at 7, 14, and 28 days after transplantation, and the ultrafine and conventional decoction pieces of Buyang Huanwu decoction were used for intervention. The rats were sacrificed at these time points, and then immunohistochemistry was performed to measure the expression of apoptosis-related genes Bag-1 and Bcl-2. Results: The conventional Buyang decoction piece group and the ultrafine Buyang decoction piece group had a significant improvement in neurological function and significant increases in the expression of Bag-1 and Bcl-2, and there were significant differences between these two groups and the model group at each time point (at 7, 14, and 28 days after transplantation) ($P > 0.01$ or $P > 0.05$). Compared with the conventional Buyang decoction piece group, the ultrafine Buyang decoction piece group had a significantly better improvement in neurological score and significantly greater increases in the expression of Bcl-2 and Bag-1 ($P > 0.01$ or $P > 0.05$). Conclusion: Buyang Huanwu decoction can promote the recovery of neurological function and upregulate the expression of Bag-1 and Bcl-2 and has a significantly better effect than conventional decoction pieces.

Key words: focal cerebral ischemia; neural stem cell; cell transplantation; Buyang Huanwu decoction; Bag-1; Bcl-2; experimental study

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81302953);湖南省中医药科研计划项目(编号:2014136);湖南省教育厅科研计划项目(编号:15C1050);中药药体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(编号:ZYFT201510)

第一作者:廖亮英,女,医学硕士,助理研究员,研究方向:心脑血管疾病的防治

通讯作者:蔡光先,男,研究员,博士研究生导师,研究方向:心脑血管疾病的防治, E-mail: lly_4448@163.com

缺血性脑损伤是一种发病率、致死率、致残率均极高的脑血管疾病,目前尚无有效治疗手段。补阳还五汤是清代王清任治疗脑缺血的代表方剂,临床常用于治疗期中风后遗症,疗效确切^[1]。研究表明,中风恢复期神经功能重建的可能机制与影响神经干细胞凋亡的相关调控基因有关,Bag-1、Bcl-2 基因是目前较为肯定的细胞凋亡调控基因^[2]。本实验拟通过观察补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后凋亡基因 Bag-1、Bcl-2 的影响,探讨其作用特点,以便更好地应用于临床。

1 实验材料

1.1 动物 SD 大鼠 80 只,SPF 级,体质量(280±20)g,雌雄各半,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。实验动物生产许可证为 SCXK(沪)2003-0002。

1.2 药物 补阳还五汤超微饮片与其传统饮片均由湖南省中药超微工程技术研究中心提供,实验前用开水保温浸泡 20min;补阳还五汤传统饮片按常规方法煎煮,浸泡液与煎煮液按要求配至所需浓度,成人临床日用量为 180g 生药。

1.3 试剂与仪器 DMEM/F12 粉(Hyclon 公司);bFGF(R&D 公司);B27 添加物、EGF(GLBCO 公司);胰酶、EDTA、Qtracker Cell Labeling Kit Protocol、Rabbit Anti-Bag-1 抗体、Rabbit Anti-Bcl-2 抗体(武汉博士德生物工程公司);细胞凋亡检测试剂盒(长沙丽欣生物公司);水合氯醛、0.01MPBS、triton-X100、双氧水、甲醇、无水甘油(长沙丽欣生物公司);SABC 试剂盒、AEC 显色剂、多聚赖氨酸包埋玻片、水溶性封片剂(北京中杉生物公司)。BX51 光学显微镜、图像分析系统、倒置显微镜、CCD 摄像头(日本 Olympus 公司);CO₂ 培养箱(shell lab 公司);鼠脑立体定位仪(四川);台式离心机(湘仪);MilliQ 超纯水仪(Millogpor 公司);E60 冰冻切片机(英国 shamton 公司);贝利粉碎机(济南贝利公司)。

2 实验方法

2.1 细胞 (1)神经干细胞的分离、培养、传代。参考本研究团队建立的方法^[3]从新生 3~5d SD 大鼠脑内分离纯化。(2)模型制备。采用大脑中动脉线栓法复制局灶性脑缺血大鼠模型。待动物清醒 24h 后,采用 Zea Longa 神经功能缺失评分标准初步评价动物造模情况。(3)细胞标记。参考文献^[4]采用量子点的标记方法。(4)细胞移植。参考文献^[5]采用侧脑室细胞移植的方法。

2.2 分组与给药 将造模后的 SD 大鼠按神经功能缺损评分进行分层,随机分为 5 组:模型组(A 组)、M+空白移植组(B 组)、M+移植组(C 组)、M+移植+补阳传统饮片组(4.57g/kg,D 组)、M+移植+补阳超微饮片组(1.52g/kg,E 组),每组各 15 只。动物手术后分别观察存活 7、14 和 28d,每组每个时间点各 5 只。各组分别灌胃给药,A 组和 B 组给予等体积 0.9%氯化钠注射液,给药体积均为 10mL/kg,每天 1 次。

2.3 指标采集与检测 (1)动物处理。动物注射细胞后分别存活 7、14、28d。经 10%水合氯醛(1mL/250g)麻醉后,沿胸骨左缘剪开胸腔,按文献进行处理,剥离心包,暴露心脏,

6 号针从心尖插入主动脉,固定针头,剪开右心耳,快速用预冷 0.9%氯化钠注射液(10mL/min),无血污后改滴入 4%冷多聚甲醛(5~10mL/min),先快后慢,约 100mL。开颅取脑,去额极,小脑,4%多聚甲醛后固定 1h,依次放入 15%、20%、30%蔗糖-多聚甲醛液沉底 24h。OTC 包埋,冰冻切片机冠状连续切片,15μm 厚,每隔 20 张取 4 张切片。(2)神经功能评价。参照文献^[3]分别于处死前进行神经功能评分。(3)免疫组织化学方法。严格按照试剂的说明书完成,用此方法检测凋亡相关因子 Bcl-2、Bag-1。阳性细胞计数:AEC 显色为红色。单标免疫组化时,细胞呈胞核染色显红色为阳性细胞。单标每个脑片在 10×10 视野下随机取 4 个视野,分别计数免疫阳性细胞数。

2.4 统计学方法 所有数据应用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析,数据分析采用单因素方差分析及组间 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 细胞标记情况 在神经干细胞液中加入量子点标记液后,绝大多数神经干细胞被标记,而且由其传代分化的细胞亦被标记。(见图 1)

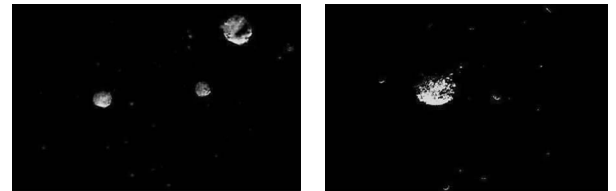


图 1 量子点标记物标记后神经干细胞

3.2 补阳还五汤对大鼠神经功能积分的影响 各组动物脑缺血后都存在有一定程度神经功能缺损,但随着缺血时间的逐渐延长,各组动物神经功能积分有所上升,说明各组动物的神经功能在逐步恢复。实验结果表明,脑缺血后 E 组促神经功能恢复的作用优于 D 组。

3.3 补阳还五汤对大鼠 Bag-1 蛋白表达的影响 Bag-1 蛋白在正常脑组织中有低水平表达,在脑缺血后表达水平增加,C 组 Bag-1 蛋白的表达水平较 A 组增加,D 组、E 组 Bag-1 蛋白表达水平较 C 组增加,E 组上调 Bag-1 蛋白表达较 D 组明显,组间比较差异有统计学意义。3 组在 7、14、28d 比较差异有统计学意义。(见表 1、图 2)。

表 1 补阳还五汤对大鼠 Bag-1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (g/kg)	Bag-1 基因水平		
			7d	14d	28d
A 组	15	-	1.15±1.09	1.30±1.17	1.70±1.56
B 组	15	-	1.45±1.47	1.65±1.35	1.50±1.36
C 组	15	-	4.65±2.63 ^{ab}	356.70±177.88 ^{abf}	300.00±166.55 ^{abf}
D 组	15	4.57	7.55±2.01 ^{abd}	572.25±202.17 ^{abcf}	447.22±127.28 ^{abcf}
E 组	15	1.52	9.65±2.34 ^{abde}	789.35±244.74 ^{abdef}	573.55±120.30 ^{abdefg}

注:与 A 组比较,^a*P*<0.01;与 B 组比较,^b*P*<0.01;与 C 组比较,^c*P*<0.05,^d*P*<0.01;与 D 组比较,^e*P*<0.05;与 7d 比较,^f*P*<0.01;与 14d 比较,^g*P*<0.01。

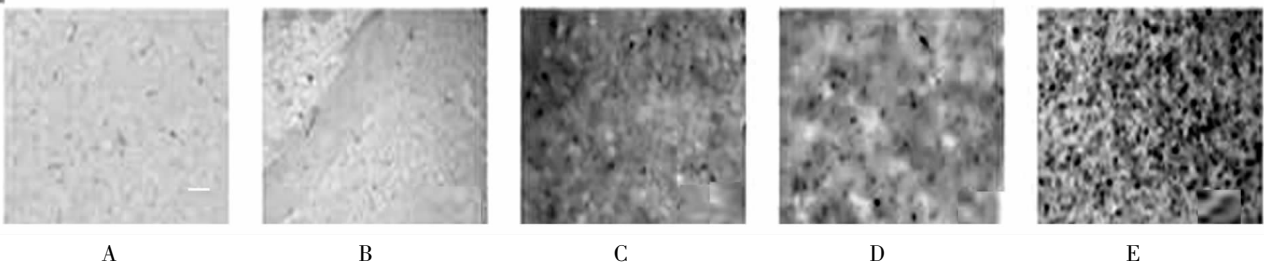


图 2-1 术后 7d

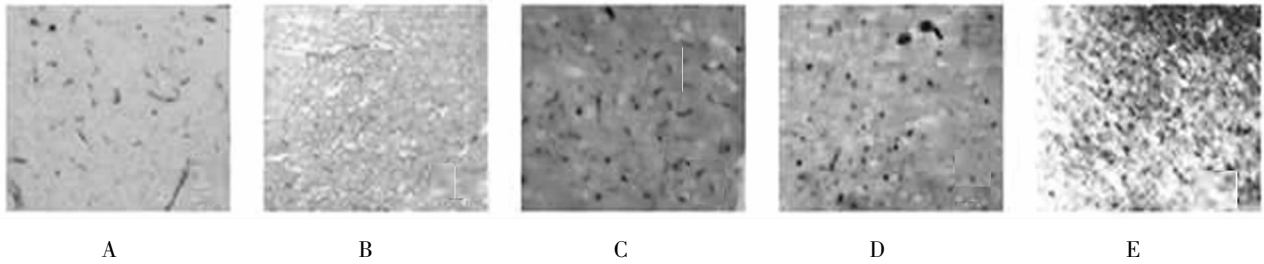


图 2-2 术后 14d

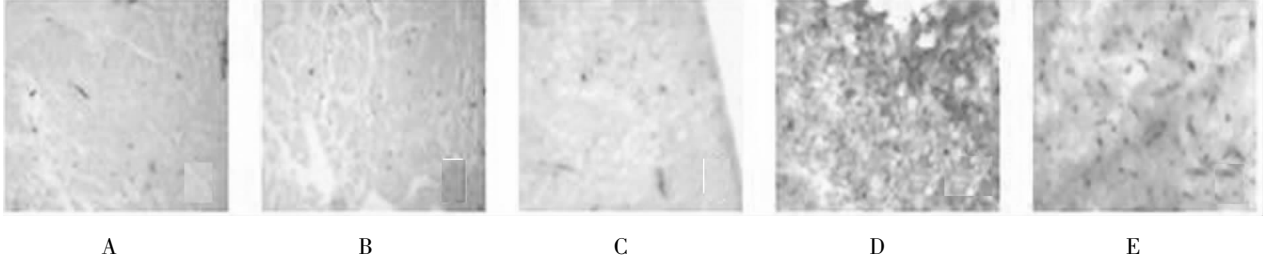


图 2-3 术后 28d

图 2 补阳还五汤对大鼠 Bag-1 蛋白表达的影响

3.4 补阳还五汤对大鼠 Bcl-2 蛋白表达的影响 各组 Bcl-2 基因表达与 Bag-1 基因表达规律相似,但 Bag-1 表达更为明显。C 组 Bcl-2 蛋白的表达水平较 A 组、B 组有所增加,D 组、E 组 Bcl-2 蛋白表达水平较 C 组增加,E 组上调 Bcl-2 蛋白表达较 D 组明显,组间比较差异有统计学意义。3 组在 7、14、28d 比较,差异有统计学意义。(见表 2、图 3)。

表 2 补阳还五汤对大鼠 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	7d	14d	28d
A 组	15	5.60 ± 2.06	11.35 ± 3.38	11.75 ± 4.59
B 组	15	8.45 ± 3.83	11.60 ± 2.64	12.60 ± 2.78
C 组	15	12.40 ± 3.63 ^{ac}	24.90 ± 8.82 ^{abh}	20.25 ± 7.97 ^{abh}
D 组	15	19.55 ± 9.63 ^{abc}	55.20 ± 17.04 ^{abdh}	38.05 ± 14.58 ^{abdh}
E 组	15	29.70 ± 5.97 ^{ahdf}	71.4 ± 17.03 ^{ahdgh}	52.45 ± 15.70 ^{abdlghi}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.01$;与 B 组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$;与 C 组比较,^d $P < 0.01$,^e $P < 0.05$;与 D 组比较,^f $P < 0.01$,^g $P < 0.05$;与 7d 比较,^h $P < 0.01$;与 14d 比较,ⁱ $P < 0.01$ 。

4 讨 论

缺血性脑损伤是目前严重危害人类健康的常见病之一,其易造成患者中枢神经系统大量神经细胞的缺失和神经网络受损,导致患者神经功能发生障碍。因此,如何更好

地改善患者受损的各种神经元功能是一个全球性的治疗难题。神经干细胞是一类具有自我更新、自我增殖和多向分化能力的细胞,可被定向诱导分化为成熟的脑细胞、神经元、星形胶质细胞等^[6-7]。近年来,越来越多的文献报道了神经干细胞移植用于脑缺血性损伤的治疗^[8],其能够抑制神经细胞的凋亡,改善脑缺血损伤的神经功能缺失^[9]。凋亡是一个受多基因控制的过程,Bcl-2 是目前公认的抗凋亡基因,而 Bcl-2 在细胞凋亡的调控中起着至关重要的作用,主要通过调节线粒体的功能来调节凋亡^[10]。Bag-1 基因是一种多功能结合蛋白,不仅有独立的抗凋亡作用,亦可上调 Bcl-2 功能,与 Bcl-2 形成复合物增强细胞抗凋亡能力^[11],其作用机制可能与影响蛋白质的稳定性有关^[12]。

补阳还五汤为补气活血经方,方中重用黄芪大补元气以治本,使气能帅血,更用大量活血化瘀之品(当归、桃仁、红花、赤芍、地龙等)生新以治标,全方补气活血化瘀,标本兼顾。本研究团队及国内其他实验室研究结果表明补阳还五汤能促进缺血后脑内神经干细胞增殖、迁移、分化^[13],可以阻断细胞凋亡途径,提高新生神经元的数量^[14],通过调节 Bcl-2/Bax、Caspase,减少缺血再灌注损伤神经元的凋亡等凋亡因子的表达,这可能是其促进缺血后神经功能恢复机制之一^[15]。

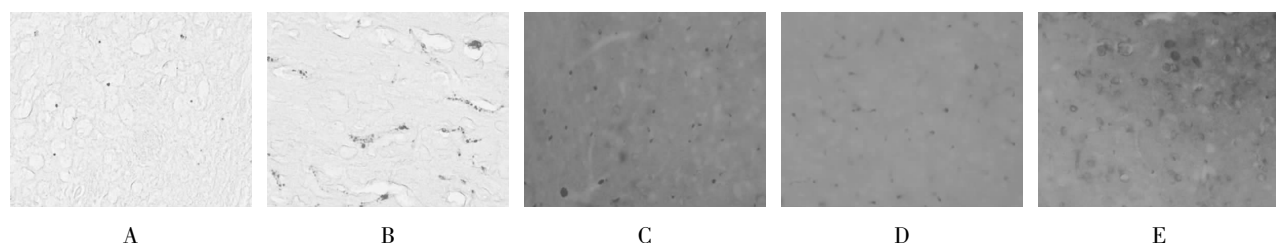


图3-1 术后7d

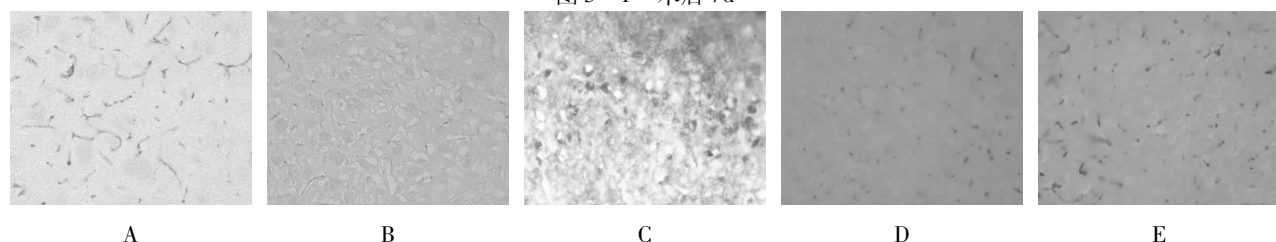


图3-2 术后14d

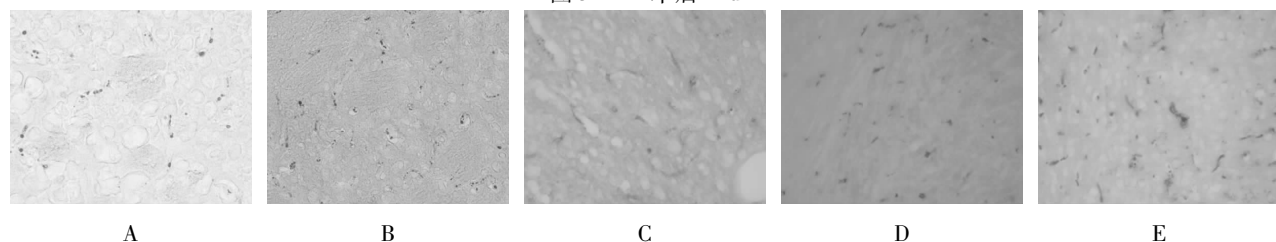


图3-3 术后28d

图3 补阳还五汤对大鼠 Bcl-2 蛋白表达的影响

本实验研究结果表明,神经干细胞能绝大多数被量子点标记,正常脑内存在一定量的 Bag-1、Bcl-2 蛋白的表达,补阳还五汤能促进神经功能恢复,上调脑缺血损伤后 Bag-1、Bcl-2 蛋白的表达,且超微饮片组的作用较传统饮片组更加显著。

参考文献

- [1] 冯玉华. 补阳还五汤治疗气虚血瘀型中风后遗症的临床分析[J]. 中国保健营养,2013,23(3):1496-1497.
- [2] 吴曙辉,江孝清,陈翔,等. 多功能蛋白 BAG-1 的研究进展[J]. 医学综述,2014,20(7):1183-1185.
- [3] 蔡光先,刘柏炎,赖鼎元,等. 神经干细胞移植对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(24):2971-2973.
- [4] 吕晓菁,隋龙臻,何子剑,等. 量子点对神经干细胞标记研究[J]. 分析化学,2009,37(21):F014.
- [5] 刘柏炎,赖鼎元,谢勇,等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠经侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):22-25.
- [6] Song M, Kim YJ, Kim YH, et al. Long-term effects of magnetically targeted ferumoxide-labeled human neural stem cells in focal cerebral ischemia[J]. Cell Transplant,2015,24(2):183-190.
- [7] Wang J, Xia J, Zhang F, et al. Galectin-1-secreting neural stem cells elicit long-term neuroprotection against ischemic brain injury[J]. Sci Rep,2015(5):9621.
- [8] 刘一民,赵艳艳,陈红兵. 神经干细胞移植脑缺血模型大鼠神经细胞凋亡、分化及神经行为学的变化[J]. 中国组织工程研究,2017,21(13):2029-2035.
- [9] Yao Y, Zheng XR, Zhang SS, et al. Transplantation of vascular endothelial growth factor-modified neural stem/progenitor cells promotes the recovery of neurological function following hypoxic-ischemic brain damage[J]. Neural Regen Res,2016,11(9):1456-1463.
- [10] 王鹤令,周品一,陈安杰,等. Bcl-2 和 Bag-1 在肝外胆管癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(11):2663-2666.
- [11] Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, et al. BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival[J]. Biochim Biophys Acta,2003(1603):83-98.
- [12] Takahashi N, Yanagihara M, Ogawa Y, et al. Down-regulation of Bcl-2 interacting protein BAG-1 confers resistance to anti-cancer drugs[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,301(3):798-803.
- [13] 储利胜,俞天虹,刘志婷,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后海马齿状回神经干细胞增殖和存活的影响[J]. 浙江中医药大学学报,2011,35(3):335.
- [14] 宋含平,刘志龙,邓常青. 补阳还五汤对沙鼠脑缺血后海马 CA1 区细胞形态结构与细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2004(8):682.
- [15] 周赛男,蔺晓源,易健,等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):251-254.

(收稿日期:2018-01-02)