

## 川芎嗪联合黄芪对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及 Fos 蛋白表达的影响

曲友直<sup>1</sup>, 赵燕玲<sup>2</sup>, 高国栋<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学唐都医院神经外科, 陕西 西安 710038; 2. 第四军医大学西京医院中医科, 陕西 西安 710032)

**【摘要】** 目的: 探讨活血中药川芎嗪联合益气中药黄芪对局灶性脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及 Fos 蛋白表达的影响。方法: 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组、生理盐水对照组、川芎嗪治疗组、黄芪治疗组及川芎嗪、黄芪合用组, 每组 12 只。采用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)及免疫组化法分别检测各组大鼠脑组织神经细胞凋亡及 Fos 蛋白的表达。结果: 与假手术组比较, 生理盐水对照组大鼠神经细胞凋亡数及 Fos 蛋白阳性细胞数增多, Fos 蛋白阳性细胞平均灰度值下降( $P$  均 $<0.01$ ); 与生理盐水对照组比较, 川芎嗪治疗组、黄芪治疗组及川芎嗪、黄芪合用组大鼠神经细胞凋亡数及 Fos 蛋白阳性细胞数减少, Fos 蛋白阳性细胞平均灰度值升高( $P$  均 $<0.01$ ); 与川芎嗪治疗组、黄芪治疗组比较, 川芎嗪、黄芪合用组作用最显著( $P$  均 $<0.01$ )。结论: 川芎嗪、黄芪及两药合用均可通过抑制脑缺血/再灌注后 Fos 蛋白表达从而减少神经细胞凋亡, 两药合用比单用川芎嗪或黄芪下调 Fos 蛋白表达、减少神经细胞凋亡效果更显著, 这可能是临床益气药及活血药联合应用治疗缺血性中风的机制之一。

**【关键词】** 川芎嗪; 黄芪; 缺血/再灌注损伤; 脑; 凋亡; Fos

中图分类号: R285.5; R277.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)02-0123-03

**Effects of combined use of tetramethylpyrazine and astragalus on neuronal apoptosis and expression of Fos protein following cerebral ischemia/reperfusion** QU You-zhi<sup>1</sup>, ZHAO Yan-ling<sup>2</sup>, GAO Guo-dong<sup>1</sup>.

1. Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, Shanxi, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effects of combined use of tetramethylpyrazine which is a drug for activating blood circulation and astragalus which is a drug for reinforcing Qi (益气) on neuronal apoptosis and the expression of Fos protein following cerebral ischemia/reperfusion. **Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into five groups: sham-operated group, normal saline control group, tetramethylpyrazine treatment group, astragalus treatment group, combined use of astragalus and tetramethylpyrazine treatment group. Neuronal apoptosis and the expression of Fos protein were respectively detected by terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemistry. **Results:** Compared with sham-operated group, the numbers of apoptotic neuron and Fos positive cells increased and mean grey level was lower in normal saline control group (all  $P < 0.01$ ). Compared with normal saline control group, the numbers of apoptotic neuron and Fos positive cells were less and mean grey level was higher in tetramethylpyrazine treatment group, astragalus treatment group and combined use of astragalus and tetramethylpyrazine treatment group (all  $P < 0.01$ ), and there was more significant effects in combined use of astragalus and tetramethylpyrazine treatment group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Tetramethylpyrazine and astragalus can decrease apoptosis neuron after cerebral ischemia/reperfusion by inhibiting the expression of Fos protein. The combined use of tetramethylpyrazine and astragalus has more significant effects. It may be one of the mechanisms of combined use of reinforcing Qi drug and activating blood circulation drug to treat ischemic stroke.

**【Key words】** tetramethylpyrazine; astragalus; cerebral ischemia/reperfusion; apoptosis; Fos

神经细胞凋亡是一种受相关基因调控的自主

作者简介: 曲友直(1972-), 男(汉族), 山东人, 医学博士, 主治医师, 讲师, 主要从事缺血性脑血管病的临床诊治及药物治疗研究, 已发表学术论文 10 余篇。

性、程序性细胞死亡过程, 脑缺血半暗带的细胞损伤主要通过细胞凋亡途径进行, 因此神经细胞凋亡是脑缺血/再灌注损伤的主要环节<sup>[1]</sup>。Fos 蛋白是凋亡相关基因 c-fos 的表达产物, 对缺血反应敏感<sup>[2]</sup>, 可

作为研究脑缺血后药物干预的指标<sup>[3]</sup>。中医学认为,缺血性脑卒中的主要病机是气虚血瘀,临床联合应用益气药及活血药进行治疗,有良好疗效,但其作用机制尚未阐明。本研究通过观察活血药川芎嗪及益气药黄芪合用对局灶性脑缺血/再灌注损伤后神经细胞凋亡及 Fos 蛋白表达的影响,探讨益气活血药对缺血性脑卒中起保护作用的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及模型制备:**健康成年雄性 SD 大鼠 60 只,体重 280~320 g,购自本校实验动物中心。随机分为假手术组、生理盐水对照组、川芎嗪治疗组、黄芪治疗组及川芎嗪、黄芪合用组,每组 12 只。每组中取 6 只大鼠,于缺血 2 h 再灌注 1 h 后检测脑组织 Fos 蛋白表达,另外 6 只于缺血 2 h 再灌注 22 h 后检测神经细胞凋亡情况。采用 Longa 等<sup>[4]</sup>介绍的颈外动脉栓线法制备局灶性脑缺血/再灌注模型。假手术组栓线仅插入颈总动脉 6 mm,不阻塞大脑中动脉起始部,其余步骤同生理盐水对照组。

**1.2 给药方法:**假手术组和生理盐水对照组大鼠于缺血前 30 min 经腹腔注射等体积生理盐水;川芎嗪治疗组大鼠于缺血前 30 min 经腹腔注射川芎嗪注射液 33 mg/kg;黄芪治疗组大鼠于缺血前 30 min 经腹腔注射黄芪注射液 4.5 g/kg;川芎嗪、黄芪合用组大鼠于缺血前 30 min 经腹腔注射川芎嗪注射液 16.5 mg/kg 和黄芪注射液 2.25 g/kg。

**1.3 组织切片制备:**再灌注结束后深麻醉,体积分数为 4% 的多聚甲醛(4 °C, pH 7.4) 500 ml 灌注固定 2 h,断头取脑,自额极至枕叶从前至后分为 A、B、C、D、E 5 等份,取 C 脑片石蜡包埋,制备 4 μm 厚的连续切片。

**1.4 Fos 蛋白免疫组化染色及神经细胞凋亡检测:**采用抗生物素-生物素-过氧化物酶复合法进行免疫组化染色,染色步骤参照免疫组化试剂盒说明书。兔抗鼠 Fos 抗体购自武汉博士德公司,效价 1:50,生物素化羊抗兔 IgG 购自 DAKO 公司。采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end labelling, TUNEL) 检测凋亡神经细胞(试剂盒购自武汉博士德公司),具体操作步骤按说明书进行。

**1.5 观察及统计方法:**在每只大鼠缺血侧大脑皮质切片中随机采集 5 个高倍视野,输入医学图像分析系统进行图像处理,检测神经细胞凋亡数 Fos 蛋白阳性细胞数及 Fos 蛋白阳性细胞灰度值。所有数据

以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析及 *t* 检验进行统计学处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

表 1 结果显示:与假手术组比较,生理盐水对照组大鼠脑组织神经细胞凋亡数及 Fos 蛋白阳性细胞数增多, Fos 蛋白阳性细胞平均灰度值下降( $P$  均  $< 0.01$ );与生理盐水对照组比较,3 个治疗组大鼠神经细胞凋亡数及 Fos 蛋白阳性细胞数减少, Fos 蛋白阳性细胞平均灰度值升高( $P$  均  $< 0.01$ );与川芎嗪治疗组和黄芪治疗组比较,川芎嗪、黄芪合用组大鼠神经细胞凋亡数及 Fos 蛋白阳性细胞数显著减少, Fos 蛋白阳性细胞平均灰度值明显升高( $P$  均  $< 0.01$ )。在图像分析中,平均灰度用来表示图像的透光率(分为 256 级,最黑为 0 级,最亮为 256 级),所以 Fos 蛋白阳性细胞平均灰度值越高,说明其免疫组化染色越浅,即细胞内 Fos 蛋白含量越低。

表 1 川芎嗪、黄芪合用对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及 Fos 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effects of combined use of tetramethylpyrazine and astragalus on neural apoptosis and the expression of Fos protein following cerebral ischemia/reperfusion( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	神经细胞凋亡数 (个/高倍视野)	Fos 蛋白阳性细胞 数(个/高倍视野)	Fos 蛋白阳性细胞 平均灰度值
假手术组	1.1±0.5	13.5±3.1	206.4±10.8
生理盐水对照组	43.8±5.9 <sup>△</sup>	60.2±7.2 <sup>△</sup>	133.5±14.5 <sup>△</sup>
川芎嗪治疗组	25.4±5.7 <sup>☆□</sup>	42.7±5.4 <sup>☆□</sup>	161.9±12.1 <sup>☆□</sup>
黄芪治疗组	27.6±6.0 <sup>☆□</sup>	46.3±4.9 <sup>☆□</sup>	163.2±10.9 <sup>☆□</sup>
川芎嗪、黄芪合用组	18.1±3.9 <sup>☆</sup>	22.6±5.5 <sup>☆</sup>	184.6±11.2 <sup>☆</sup>

注:与假手术组比较,△ $P < 0.01$ ;与生理盐水对照组比较:  
☆ $P < 0.01$ ;与川芎嗪、黄芪合用组比较:□ $P < 0.01$

## 3 讨论

本研究结果显示,局灶性脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡数增多,脑组织 Fos 蛋白阳性细胞数增多、平均灰度值降低,表明缺血/再灌注可诱发脑组织 Fos 蛋白高表达,并引起神经细胞凋亡。细胞凋亡是脑缺血/再灌注后迟发性神经细胞死亡的主要形式<sup>[5]</sup>,其特点是细胞皱缩、胞核凝聚以及在核小体间被活化的核酸内切酶切断形成了 180~200 bp 的等倍体 DNA 片段。TUNEL 法可利用分子生物学技术特异性标记 DNA 片段,原位检测凋亡细胞。脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡发生机制与兴奋性氨基酸、钙超载、自由基增多等有关<sup>[6]</sup>,但更重要、更直接的是凋亡细胞内活跃的基因表达。原癌基因 *c-fos* 的表达产物 Fos 蛋白属即早基因蛋白(immediate-early genes, IEGS),在转导耦联信息传递过程中起

着核内“第三信使”的重要作用<sup>[7]</sup>。脑缺血/再灌注后 Fos 蛋白具有促凋亡作用,其促凋亡机制是 Fos 蛋白与 Jun 蛋白可通过亮氨酸拉链形成异源二聚体 AP-1 复合物,AP-1 的 DNA 结合区域有 TPA 反应元件,可通过各自的碱性氨基酸区域与 DNA 结合,调节 DNA 的复制和转录,诱导其他多种含 TPA 反应元件的基因表达,并作为基因调节蛋白调节靶基因或晚发基因的转录,进而诱导细胞发生凋亡<sup>[8]</sup>。

本研究表明,川芎嗪、黄芪均可减少脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡,抑制早期 Fos 蛋白表达。川芎嗪是活血化瘀类药物川芎的主要有效成分之一,化学结构为四甲基吡嗪。研究显示,川芎嗪具有扩张血管、抑制血小板聚集、改善微循环、抗脂质氧化、抑制缺血区血管内皮细胞与白细胞的黏附等作用<sup>[9]</sup>。黄芪属益气类中药,研究表明,黄芪具有抗自由基、减少缺血后脑水肿、保护血脑屏障等作用<sup>[6,10]</sup>。由于川芎嗪及黄芪对缺血/再灌注后脑组织具有多种保护作用,考虑其作用可能通过缓解缺血导致的兴奋性氨基酸(EAA)释放增多及脑组织  $Ca^{2+}$  增多等作用下调脑缺血/再灌注诱导的 Fos 蛋白高表达,从而减少神经细胞凋亡。本研究显示,活血药川芎嗪及益气药黄芪合用可显著抑制脑缺血/再灌注后 Fos 蛋白高表达,明显减少神经细胞凋亡,其作用明显优于单用活血药川芎嗪或单用益气药黄芪,证明两药具有协同作用,这与中医认为缺血性脑卒中病机为气虚血瘀的理论及中医治疗缺血性脑卒中常采用益气活血药物配伍并用的治则相符,这可能是益气活血药

物配伍并用治疗缺血性脑卒中的分子机制之一。

#### 参考文献:

- [1] Sen S. Programmed cell death: concept, mechanism and control [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 1992, 67: 287-319.
- [2] 王华, 韩玉昆, 吴保敏. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤蛋白激酶 C 与 c-fos 基因表达关系的探讨 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 621-624.
- [3] Bokesch P M, Marchand J E, Connolly C S, et al. Dextromethorphan inhibits ischemia-induced c-fos expression and delayed neuronal death in hippocampal neurons [J]. Anesthesiology, 1994, 81: 470-477.
- [4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [5] Beilharz E J, Williams C E, Dragunow M, et al. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemia injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss [J]. Mol Br Res, 1995, 29: 1-14.
- [6] 任成山, 钱桂生. 细胞凋亡和胀亡及其与多器官功能障碍综合征关系的研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 247-250.
- [7] Takemoto O, Toyato W, Turkeya D, et al. Induction of c-fos and c-jun gene products and heat shock protein after brief and prolonged cerebral ischemia in gerbils [J]. Stroke, 1995, 26: 1639-1648.
- [8] 周珂, 李庚山, 余绍祖. 脑缺血再灌注损伤时 c-fos、c-jun 的表达和细胞凋亡 [J]. 卒中与神经疾病, 2003, 10: 3-6.
- [9] 高长越, 周华东, 邓娟, 等. 川芎嗪对脑缺血/再灌注损伤后细胞间黏附作用的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9: 135-136.
- [10] 曲友直, 高国栋, 赵燕玲. 丹参、黄芪合用对脑缺血再灌注后脑组织 Fos、Jun 蛋白表达的影响 [J]. 中国临床康复, 2003, 7: 840-841.

(收稿日期: 2005-12-19)

(本文编辑: 李银平)

#### • 读者 • 作者 • 编者 •

### 欢迎订阅 2006 年《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志,是我国急救医学界权威性学术期刊,为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊,每月 10 日出版,国际通用 16 开大版本,内文用 80 克铜版纸印刷,内容丰富,且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2006 年的订阅手续。邮发代号: 6-58; 定价: 7.8 元/期,全年 93.6 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国 NLM《MEDLINE》、美国《化学文摘》(CA)、荷兰医学文摘、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”和“em120.com 危重病急救在线”。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。本刊设有各种栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。

地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内; 邮编: 300050。

(期刊编辑部)