

补阳还五汤对大鼠脑缺血后蛋白激酶 B1 和 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 表达的影响

刘芳¹, 尹天雷², 戴飞跃¹, 廖亮英¹, 蔡光先³

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007;

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013; 3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410128)

【摘要】目的 探讨补阳还五汤对脑缺血后大鼠蛋白激酶 B1 (AKT1) 和 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (JNK1/2) 的影响。**方法** 将 48 只 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组、补阳还五汤组, 每组 12 只。采用大脑中动脉闭塞法 (MCAO) 建立右侧局灶性脑缺血大鼠模型。补阳还五汤组大鼠于术后 2 h 起灌服补阳还五汤 (主要由生黄芪 120 g、当归 6 g、赤芍 4.5 g、川芎 3 g、西红花 3 g、桃仁 3 g、地龙 3 g 组成) 14.2 g/kg, 每日 1 次, 连续 7 d。其他各组动物均给予等体积生理盐水。于第 7 日处死大鼠, 取脑组织, 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 AKT1 mRNA 表达, 采用免疫组化法检测 JNK1/2 蛋白表达。**结果** 与正常对照组和假手术组比较, 模型组 AKT1 mRNA 表达量 [吸光度 (A) 值] 明显降低 (0.48 ± 0.08 比 0.63 ± 0.11 、 0.61 ± 0.09 , 均 $P < 0.05$), JNK1/2 阳性细胞数 (个/mm²) 明显增多 (34.13 ± 4.57 比 16.15 ± 1.09 、 16.23 ± 2.05 , 均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤组脑组织中 AKT1 mRNA 表达 (0.93 ± 0.11) 和 JNK1/2 阳性细胞数 (45.04 ± 5.68) 明显增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 补阳还五汤可上调缺血脑组织 AKT1 mRNA 和 JNK1/2 阳性细胞数表达, 是其脑保护作用机制之一。

【关键词】 补阳还五汤; 脑缺血; 蛋白激酶 B1; c-Jun 氨基末端激酶 1/2

Effects of Buyang Huanwu decoction on protein kinase B1 and c-Jun amino terminal kinase 1/2 in rats after focal cerebral ischemia LIU Fang*, YIN Tian-lei, DAI Fei-yue, LIAO Liang-ying, CAI Guang-xian. *The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: CAI Guang-xian, Email: lby1203@sina.com

【Abstract】Objective To explore the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) on protein kinase B1 (AKT1) and c-Jun amino terminal kinase 1/2 (JNK1/2) in rats after focal cerebral ischemia. **Methods** According to the random number table method, 48 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly allocated to four groups: normal control group, sham-operated group, model group, traditional BYHWD group (each $n=12$). The rat model of right focal cerebral ischemia was established by the method of middle cerebral artery occlusion (MCAO). The rats in BYHWD group were ingested with the decoction of BYHWD 14.2 g/kg after 2 hours of the operation (the main ingredients of BYHWD including astragalus mongholicus 120 g, Chinese angelica 6 g, radix paeoniae rubra 4.5 g, rhizoma ligustici wallichii 3 g, safflower 3 g, peach kernel 3 g, earthworm 3 g), once a day for 7 days. Other groups of animals were given the same amount of normal saline orally. After operation, on the 7th day, the animals were killed, and their brains were taken out. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to detect AKT1 mRNA expression, and immunohistochemical method was applied to measure JNK1/2 protein expression. **Results** Compared with normal control and sham-operated groups, the level of AKT1 mRNA expression [absorbance (A)] was decreased obviously (0.48 ± 0.08 vs. 0.63 ± 0.11 , 0.61 ± 0.09 , both $P < 0.05$), and the number of JNK1/2 positive cells (cell/mm²) was increased significantly (34.13 ± 4.57 vs. 16.15 ± 1.09 , 16.23 ± 2.05 , both $P < 0.05$) in model group; compared with model group, the AKT1 mRNA expression in brain tissue (0.93 ± 0.11) and the number of JNK1/2 positive cells (45.04 ± 5.68) was increased significantly in BYHWD group, the differences being statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** BYHWD can up-regulate expressions of AKT1 mRNA and JNK1/2 positive cells in ischemic brain tissue that is one of the mechanisms in the protection of brain.

【Key words】 Buyang Huanwu decoction; Cerebral ischemia; Protein kinase B1; c-Jun amino terminal kinase 1/2

缺血性脑血管疾病是一种高致残率、高致死性的常见疾病。补阳还五汤是益气活血的经典名方, 临床上发现其有改善脑血管疾病患者生活质量, 促进神经功能康复的作用^[1], 并能提高患者的临床神

经功能缺损程度评分 (NDS) 和生活质量评分, 临床疗效和中医证候疗效也较传统组明显提高^[2], 补阳还五汤还能降低患者的脑水肿体积、脑水肿扰动系数及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 水平^[3]。本课题组前期研究发现其能促进脑组织碱性成纤维生长因子 (bFGF) 蛋白表达^[4], 减轻大鼠脑缺血损伤^[5-6], 具有脑保护作用。目前的研究认

为,蛋白激酶 B (AKT) 信号转导途径是重要的细胞激活信号通路,对脑缺血神经细胞凋亡起重要的调控作用^[7]。本实验拟通过观察补阳还五汤对缺血后脑组织 AKT1 和 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (JNK1/2) 表达的影响,探讨其脑保护作用的机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器: JNK1/2 单克隆抗体(武汉博士德公司),焦碳酸二乙酯(DEPC), TRIzol (美国 Invitrogen 公司),聚合酶链反应(PCR)试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)。主要仪器:FA 型电子天平(上海台之衡电子衡器有限公司),DY89-1 型电动匀浆机(宁波新芝科器研究所),显微镜(日本奥林巴斯公司),基因扩增仪(美国 BIO-RAD 公司),凝胶成像分析系统(上海天能科技公司),琼脂糖水平电泳槽(北京六一公司),冰冻切片机(英国 Thermo 公司)。

1.2 动物及分组及模型制备: 48 只体重 220~250 g 的雄性 SD 大鼠,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号: SCXK(湘)2009-0004。用随机数字表法将动物分为正常对照组、假手术组、模型组、补阳还五汤组,每组 12 只。

采用大脑中动脉闭塞法(MCAO)复制局灶性脑缺血大鼠模型^[8],待动物清醒 2 h 后参照文献^[9]介绍的 5 级评分标准进行神经功能评分,将第 1、2、3 级(1~3 分)大鼠确定为成功模型分入各组。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 给药方法: 动物制模后补阳还五汤组给予补阳还五汤(生黄芪 120 g,当归 6 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,西红花 3 g,桃仁 3 g,广地龙 3 g。所用中药材均购自湖南中医药大学第一附属医院),用 5 倍于药材体积的蒸馏水浸泡原药 30 min,煎煮 30 min 取汁,连续煎两次,两煎混合,浓缩至含生药 2 g/mL。以 14.2 g·kg⁻¹·d⁻¹ 药液量灌胃,每日 1 次,连续 7 d;其他各组均给予等体积生理盐水。

1.4 检测指标及方法: 于给药后 7 d 每组取 6 只大鼠断头处死后,

在冰上取大脑,用生理盐水清洗后保存于液氮中,用于 PCR;其余大鼠麻醉后取脑组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定,20%、30% 蔗糖溶液依次进行梯度脱水 24 h 用于免疫组化。

1.4.1 脑缺血大鼠脑组织 AKT1 mRNA 表达的检测^[7]: 以 TRIzol 法提取总 RNA,分别取组织 50 mg 与 TRIzol 1 mL。逆转录反应体系见表 1,总体积 10 μL。PCR 引物设计,首先在 Pubmed 基因库搜索目标基因 AKT1 和 β 肌动蛋白(β-actin)基因序列,然后采用 Primer 5 软件自行设计,使用 Pubmed Blast 功能检测其特异性,由上海捷瑞生物工程公司合成。PCR 反应体系(表 1)为 50 μL;引物序列、反应条件、扩增目的片段大小见表 2。

取 3 μL 扩增产物,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,采用凝胶图像分析仪进行吸光度(A)值扫描,应用 GIS-1000 数码凝胶图像分析系统观察条带的灰度强弱,结果以 AKT1 与 β-actin PCR 产物的电泳条带 A 值比值表示。

1.4.2 脑缺血大鼠脑组织 JNK1/2 阳性细胞表达的检测: 采用免疫组化法检测 JNK1/2 阳性细胞表达,操作按试剂盒说明书进行。JNK1/2 抗体浓度分别为 1:200,同时用正常山羊血清和磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作空白对照以检查免疫反应的特异性。每只动物取海马部位切片 5 张,置于 100 倍物镜下,每张切片随机选取缺血周围区 10 个视野,用奥林巴斯微图像 4.0 处理系统自动计数免疫阳性细胞数,计算其平均值。

1.5 统计学处理: 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 F 检验或 q 检验。应用 SPSS 20.0

表 1 cDNA 的合成逆转录反应体系及 PCR 反应体系

试剂	体积(μL)	反应条件	试剂	体积(μL)
去核酸酶去离子水	3.75	30 ℃ 10 min 45 ℃ 30 min 99 ℃ 5 min 5 ℃ 5 min 1 个周期	逆转录产物	10.00
DNA 聚合酶底物	1.00		10 pmol/μL 的上游引物	0.50
核糖核酸酶抑制剂	0.25		10 pmol/μL 的下游引物	0.50
反转录酶	0.50		5×PCR 缓冲液	10.00
T 重复寡核苷酸适配引物	0.50		灭菌双蒸水	28.75
			聚合酶	0.25

表 2 PCR 引物序列、反应条件及扩增目的片段大小

基因	基因位置	引物序列	PCR 反应条件	目的片段大小
Akt 1	NM_033230.2	上游: 5'-TTTATTGGCTACAAGGAACG-3'	94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 50 s 35 个循环	213 bp
		下游: 5'-AGTCTGAATGGCGGTGGT-3'		
β-actin	NM_031144.2	上游: 5'-AGGGAAATCGTCGCTGAC-3'	94 ℃ 45 s, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 50 s 35 个循环	443 bp
		下游: 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAGG-3'		

统计软件处理数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

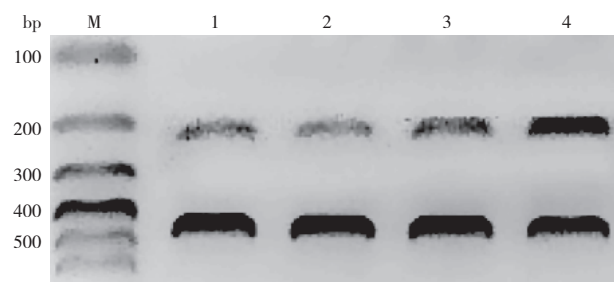
2 结果

2.1 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 AKT1 mRNA 表达的影响 (表 3; 图 1): 正常对照组和假手术组大鼠脑内有相对高水平 AKT1 mRNA 表达, 模型组表达较正常对照组和假手术组明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 补阳还五汤组较模型组明显升高 ($P < 0.05$); 提示补阳还五汤可促进脑缺血后脑组织 AKT1 mRNA 表达。

表 3 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 AKT1 mRNA 及 JNK1/2 阳性细胞表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	AKT1 mRNA	JNK1/2 阳性细胞数 (个/mm ²)
正常对照组	12	0.63 ± 0.11	16.15 ± 1.09
假手术组	12	0.61 ± 0.09	16.23 ± 2.05
模型组	12	0.48 ± 0.08^{ac}	34.13 ± 4.57^{ac}
补阳还五汤组	12	0.93 ± 0.11^{bde}	45.04 ± 5.68^{bdf}

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与假手术组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与模型组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$



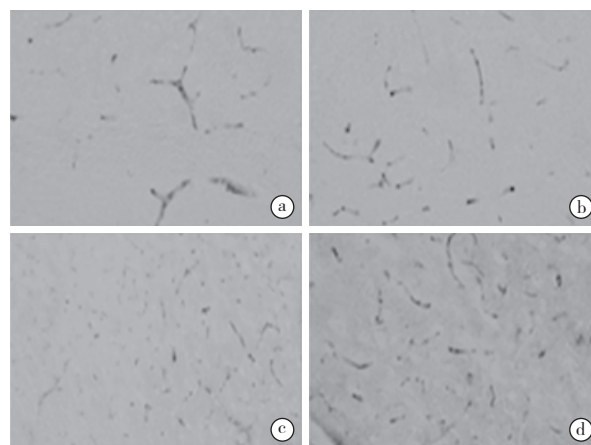
M: Marker; 1: 正常对照组; 2: 假手术组; 3: 模型组; 4: 补阳还五汤组

图 1 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 AKT1 mRNA 表达的影响

2.2 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 JNK1/2 阳性细胞数的影响 (表 3; 图 2): JNK1/2 在脑组织的阳性表达呈胞质红褐色染色, 形态多样, 以梭形、多角形多见, 主要表达于海马和室旁区。在正常对照组和假手术组有相对高水平的 JNK1/2 阳性细胞表达, 模型组明显上升, 与正常对照组和假手术组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 补阳还五汤组较模型组明显升高 ($P < 0.01$); 提示补阳还五汤可以促进脑缺血后脑组织 JNK1/2 阳性细胞表达。

3 讨论

脑缺血引起的细胞凋亡可引起神经元死亡^[10], 其凋亡过程是受基因调控的^[11]。目前的研究表明, AKT/JNK 通路对细胞增殖机制有调控作用。AKT 是磷脂酰肌醇激酶-3 (PI3K) 的下游分子, 可以通过使 Bad 等致凋亡蛋白失活以及活化核转录因



(a): 正常对照组; (b): 假手术组; (c): 模型组; (d): 补阳还五汤组

图 2 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 JNK1/2 阳性细胞表达的影响

子- κ B (NF- κ B) 等抗凋亡蛋白发挥抑制凋亡的作用^[12]。与此相反, JNK 信号通路是由多条调控细胞增殖和诱导细胞凋亡的途径构成的复杂网络, 可与多种炎症因子和细胞因子受体结合而活化, JNK 活化后, 可通过激活细胞转录因子细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 促进细胞周期 G0/G1 期的转换, 达到促进细胞增殖的作用^[13]。

补阳还五汤是治疗缺血性中风的经典名方, 研究证实其能抑制脑内炎症因子的表达, 促进脑内生长因子表达, 促进神经干细胞增殖分化、抑制神经细胞凋亡和调节神经递质或神经肽紊乱等多方面作用^[14-16]。但尚未见补阳还五汤对 AKT1、JNK1/2 影响的系统研究。

本实验研究发现, 补阳还五汤能上调缺血脑内 AKT1 mRNA 表达和 JNK1/2 蛋白水平, 结合我们既往研究认为, 补阳还五汤可能是通过调控 AKT1 和 JNK1/2 的表达来减少脑缺血后梗死面积, 减轻脑组织的水肿, 从而达到脑保护的作用^[4,17]。

参考文献

- [1] 郭志平, 王玉玲, 刘秀金. 补阳还五汤加减治疗脑梗死后遗症的临床观察. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14 (6): 380.
- [2] 蔡光先, 刘柏炎. 超微补阳还五汤对脑梗死恢复期患者神经功能 / 生活质量及血清血管内皮生长因子的影响. 中国危重病急救医学, 2010, 22 (10): 591-594.
- [3] 贾小庆, 刘军明, 王新芳, 等. 补阳还五汤对脑梗死患者天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 影响的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (4): 209-221.
- [4] 刘芳, 白雪松, 刘柏炎, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (1): 9-12.
- [5] 王宗仁, 赵燕玲, 曲友直, 等. 益气活血方对脑缺血 / 再灌注后神经细胞凋亡及相关基因表达的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (6): 335-337.
- [6] 易健, 黄昕, 谢勇, 等. 脑得健方对大鼠局灶性脑缺血后神经功能及梗死面积的影响. 湖南中医药大学学报, 2010, 30 (1):

- 7-11.
- [7] 韩彩萍, 胡长林. PI3K/AKT 信号通路及脑缺血神经细胞凋亡. 国际神经病学神经外科学杂志, 2006, 33 (1): 88-91.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91.
- [9] 田兆华, 刘柏炎. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (3): 193-198.
- [10] 李建生, 任小巧, 刘轲, 等. 老龄大鼠脑缺血/再灌注神经细胞凋亡变化规律研究. 中国危重病急救医学, 2004, 16 (3): 151-154.
- [11] 赵燕玲, 曲友直, 王宗仁. 黄芩对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12 (6): 341-343.
- [12] Lee JH, Kim KY, Lee YK, et al. Cilostazol prevents focal cerebral ischemic injury by enhancing casein kinase 2 phosphorylation and suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation in rats. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308 (3): 896-903.
- [13] Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290 (4): G583-589.
- [14] 刘柏炎, 赖鼎元, 谢勇, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (1): 22-25.
- [15] 徐晶, 辛随成, 张青川. 补阳还五汤治疗缺血性脑血管病的研究进展. 山西中医学院学报, 2009, 10 (4): 73-76.
- [16] 易健, 黄昕, 俞悦, 等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血后白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响. 中国危重病急救医学, 2010, 22 (10): 599-601.
- [17] 刘柏炎, 蔡光先, 陈雪梅, 等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经元再生的影响. 中华神经医学杂志, 2007, 6 (8): 762-765.

(收稿日期: 2012-12-20) (本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

急性有机磷农药中毒 24 例急救及护理体会

黄桂梅, 兰俊

(湖北省十堰市中西医结合医院, 湖北 十堰 442011)

成功抢救急性有机磷农药中毒 (AOPP) 患者 24 例, 现将临床急救及护理体会报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 24 例 AOPP 患者中, 男性 8 例, 女性 14 例; 年龄 19~57 岁, 平均 (39.2+3.6) 岁。中毒农药种类: 敌敌畏 9 例, 乐果 7 例, 对硫磷 (1605) 5 例, 甲胺磷 2 例, 敌百虫 1 例。其中经口服中毒 22 例 (剂量约 10~250 ml), 经皮肤接触中毒 2 例。就诊时间为毒物接触后 0.5~3 h。根据临床表现和胆碱酯酶 (ChE) 活力指标评估, 轻度中毒 8 例, 中度中毒 11 例, 重度中毒 5 例。

1.2 急救措施: ①清除毒物: 经口服中毒的患者, 予以大量温水反复洗胃, 当明确毒物种类和性质后, 选择相应的洗胃液, 如乐果、敌敌畏中毒者应选用 1%~2% 碳酸氢钠。经皮肤接触中毒患者应用肥皂水 (敌百虫除外) 清洗皮肤和毛发, 直至无残余农药气味为止。②应用特效解毒剂。③早期输入浓缩红细胞。④防治并发症。⑤补液。⑥纠正电解质紊乱和酸碱失衡, 控制感染, 保证生命体征平稳。

1.3 结果: 入院后 1 h 内达阿托品化 18 例, 3 h 内达阿托品化 3 例, 未达阿托品化 3 例。痊愈出院 19 例 (79.2%), 转院 2 例 (8.3%), 死亡 3 例 (12.5%)。并发症: 肺部感染 5 例 (20.8%), 反跳 3 例 (12.5%), 中间综合征 (IMS) 2 例 (8.3%), 阿托品中毒 2 例 (8.3%)。

2 护理体会

2.1 尽快清除毒物: 尽快清除消化道或皮肤、毛发的毒物, 防止继续吸收是抢救成功的关键^[1]。

2.2 及时足量使用抗胆碱药: 阿托品为毒蕈碱样受体阻断剂, 能有效阻滞乙酰胆碱的作用, 对抗 AOPP 所致的呼吸中

枢抑制、肺水肿和循环衰竭。临床使用时应早期、足量、快速给予阿托品, 尽早达到阿托品化。

2.3 早期使用复能剂: 氯磷定性质稳定, 水溶性高, 作用强度明显大于碘解磷定, 为抢救有机磷中毒的首选药物^[2]。

2.4 IMS 的处理: IMS 发生后, 应立即建立人工气道通气, 呼吸机辅助呼吸, 为有效解毒药物的应用赢得了时间, 早期使用足量的复能剂是逆转呼吸肌麻痹的关键^[3]。于笑霞等^[4]报道, 使用血液灌流在减少阿托品用量、促醒、缩短病程、降低死亡和缩短 ChE 活性恢复时间方面均优于对照组, 且能有效预防和治疗呼吸肌麻痹。早期输入浓缩红细胞、补充外源性 ChE 也是防治 IMS 发生的有效措施之一^[5]。

2.5 护理: 做好病情观察与护理, 加强基础护理和饮食护理, 同时应做好心理护理。

总之, 尽早、快速、反复彻底洗胃是抢救成功的前提; 正确、足量使用阿托品或新型的抗胆碱药长托宁及胆碱酯酶复能剂是抢救成功的关键; 积极防治并发症, 加强护理则是抢救成功的安全保障。

参考文献

- [1] 林国棟, 杨贵美, 吴爱英. 急性有机磷农药中毒的治疗体会. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (5): 316.
- [2] 陈清启, 陈纪君. 急性有机磷中毒解毒药物治疗进展. 内科急危重症杂志, 1997, 3 (4): 176-180.
- [3] 罗庆一, 孙宏伟. 抢救有机磷农药中毒呼吸肌麻痹的 3 个关键环节. 中国危重病急救医学, 2004, 16 (10): 602.
- [4] 于笑霞, 韩和平, 李培新. 血液灌流治疗急性有机磷农药中毒中间综合征的疗效研究. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (1): 54-55.
- [5] 张守林, 赵维勇, 刘静. 早期输入浓缩红细胞防治急性有机磷农药中毒中间综合征的疗效观察. 中国危重病急救医学, 2005, 17 (11): 693.

(收稿日期: 2013-06-19)

(本文编辑: 邸美仙)