

·方药研究·

## 丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠半暗带区神经细胞凋亡与即早基因表达的影响

曹泽标<sup>1,2,4</sup>, 陈昱文<sup>1,2</sup>, 刘旺华<sup>1,2,3</sup>, 周小青<sup>1,2,3\*</sup>, 陈婷婷<sup>1,2,4</sup>, 李 花<sup>1,2,3</sup>

(湖南中医药大学 1. 中医诊断学科, 2. 中医诊断学湖南省重点实验室, 3. 数字中医药协同创新中心, 湖南 长沙 410208;  
4. 第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

**[摘要]** **目的** 探讨丹龙醒脑方对局灶性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质半暗带(ischemic penumbra, IP)区神经细胞凋亡与即早基因 c-fos、c-jun、c-myc 表达的关系。**方法** 将 48 只雄性 SD 大鼠随机均分为假手术组, 脑缺血再灌注(模型)组, 尼莫地平组及丹龙醒脑方小、中、大剂量组(丹小组、丹中组、丹大组)。后五组用线栓法制备大鼠中动脉栓塞再灌注(MCAO/R)模型, 再灌注 24 h 进行神经功能缺损评分后, 取缺血侧大脑皮质, 采用原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡的神经细胞, 免疫组化法分别检测 c-fos、c-jun、c-myc 蛋白。**结果** 与假手术组比较, 其余各组的神经功能缺损评分、神经细胞凋亡指数(AI)及 c-fos、c-jun、c-myc 蛋白的积分光密度(IOD)值均升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 尼莫地平组和丹龙醒脑方各剂量组的神经功能缺损评分、神经细胞 AI 及 c-fos、c-jun、c-myc 蛋白的 IOD 值均减小, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 尼莫地平组、丹龙醒脑方各剂量组间比较, 各指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 丹龙醒脑方能显著降低脑缺血后神经功能缺损和减少神经细胞凋亡, 其机制可能与下调即早基因 c-fos、c-jun 和 c-myc 的表达有关。

**[关键词]** 丹龙醒脑方; 脑缺血再灌注; 神经细胞凋亡; 即早基因

**[中图分类号]**R285.5 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.001

### Effects of Danlong Xingnao Prescription on Neural Cell Apoptosis and Expression of Immediate Early Gene in Schemic Penumbra of Rats with Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

CAO Zebiao<sup>1,2,4</sup>, CHEN Yuwen<sup>1,2</sup>, LIU Wanghua<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Xiaoqing<sup>1,2,3</sup>, CHEN Pingting<sup>1,2,4</sup>, LI Hua<sup>1,2,3</sup>

(1. Institute of Diagnostics in Chinese Medicine, 2. Provincial Key Laboratory of Diagnostics in Chinese Medicine, 3. Collaborative Center for Research and Innovation of Digital Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China. 4. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship of Danlong Xingnao Prescription (DLXNP) on neural cell apoptosis and expression of c-fos, c-jun and c-myc in ischemic penumbra of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (MCAO/R). **Methods** 48 male SD rats were randomly divided into the sham-operation group, cerebral ischemia-reperfusion injury (model) group, nimodipine group, small, medium, high dose of DLXNP groups. The middle cerebral artery occlusion/reperfusion models were prepared by suture method. The neural function defect scale was evaluated after 24 hours of reperfusion, researchers carried out, and the ischemic side of brain cortex was taken out. The nerve cells of apoptosis were detected by using terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) method, and the expression of c-fos, c-jun and c-myc was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the operation group, the neural function defect scale, apoptotic index (AI) and integrated optical density (IOD) of c-fos, c-jun, c-myc were increased, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with model group, the neural function defect scale, AI and IOD of c-fos, c-jun, c-myc in nimodipine group and DLXNP groups were reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); The differences between nimodipine group

**[收稿日期]**2015-11-17

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373702, 81473567, 81202632); 教育部博士点基金项目(20124323120003); 湖南省自然科学基金(13JJ3097); 湖南省教育厅科研项目(14B134, 15K092); 湖南中医药大学“一方”研究生创新项目(2015YF02)。

**[作者简介]** 曹泽标, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为脑血管病的中医诊治。

**[通讯作者]**\* 周小青, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: zxq5381@sohu.com。

and different doses of DLXNP groups were not statistically significant in all indicators ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Danlong Xingnao pecipe can lower the neural function defect and reduced neural cell apoptosis, which may relate to the down-regulated expression of c-fos, c-jun and c-myc.

[**Keywords**] Danlong Xingnao prescription; cerebral ischemia reperfusion; neural cell apoptosis; immediate early genes

缺血性脑卒中是威胁中老年人健康的常见疾病,给患者、家庭和社会带来了沉重的负担,已经成为我国重大的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。脑卒中后神经细胞损伤主要表现为坏死和凋亡,而凋亡引起的损害更严重、更持久。因此,阻断神经细胞凋亡的病理生理过程,减少神经细胞凋亡,已成为目前研究缺血性脑卒中治疗的热点。课题组前期研究表明丹龙醒脑方可通过抑制死亡受体通路和线粒体通路以减少神经细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>。国内外研究显示,即早基因(immediate early genes, IEGs)在脑缺血后神经细胞凋亡的调控中具有重要作用<sup>[4-5]</sup>。本研究即在前期基础上,从该方对即早基因 c-fos、c-jun、c-myc 表达的影响,进一步探讨丹龙醒脑方抑制神经细胞凋亡的机制。

## 1 材料与方

### 1.1 药物、试剂及主要仪器

丹龙醒脑方由丹参 15 g,三七 12 g,地龙 6 g,远志 15 g,石菖蒲 12 g,淫羊藿 10 g,菟丝子 12 g 等药物组成,购自湖南中医药大学第一附属医院,并经药剂科鉴定为道地药材。饮片浸泡半小时,首煎加 6 倍水,水沸后文火煎 60 min;第二煎加 3 倍水,水沸后文火煎 30 min,两次药汁混合。滤过,于水浴锅内蒸发浓缩至含生药 1.6 g/mL,灭菌分装,4 ℃冰箱冷藏。尼莫地平胶囊,海南普利制药股份有限公司生产,批号:131261。

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (Roche, 11684817910);免疫组化试剂盒 (DAKO, K5007);BSA (Sigma, A7030);c-fos 兔源性多克隆抗体 (ab7963), c-jun 兔源性多克隆抗体 (ab106844), c-myc 兔源性多克隆抗体 (ab75233),均购自 abcam 公司;HRP 标记山羊抗兔抗体 (Goodbio, G1210-2-A);普通光学显微镜及成像系统 (Nikon, Nikon DS-U3),Image-Pro Plus6.0 图像分析处理软件 (Media Cybernetics, 美国),线身直径为 0.28 mm 成品 MCAO 线栓若干 (北京西浓科技有限公司生产),酒精擦拭后置于肝素生理盐水中备用。马头牌 GPS 型双极电凝器 (上海医用激光仪器厂生产)。

### 1.2 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量 250~280 g,由湖南斯莱克景达动物实验公司提供,许可证号:SCXK (湘)2013-0005,动物合格证号:43004700013639。动

物饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2009-0001。饲养环境为多层层流架,恒温 20~26 ℃,湿度控制在 40%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗,以标准饲料喂养并自由饮用三级过滤纯净水,适应性喂养 7 d 后开始造模。

### 1.3 分组及给药

造模前称重,取体质量为 (280±20) g 的健康大鼠 48 只,被毛染色法编号。运用随机数字表法将大鼠均分为假手术组、模型组、尼莫地平组、丹小组、丹中组和丹大组,每组 8 只。六组大鼠均于造模前 3 d 开始给药,1 次/d,并于第 4 次给药 20 min 后造模,造模成功后于再灌注 6、12、18 h 各给药 1 次。丹中组每日给药剂量根据 70 Kg 成人每日服用 82 g 生药剂量进行换算<sup>[6]</sup>,得出大鼠每日生药剂量约为 7.4 g/Kg,丹小组剂量为 3.7 g/Kg,丹大组为 14.8 g/Kg。尼莫地平组每日给药剂量为 10.8 mg/Kg,临用前将尼莫地平胶囊去壳,内容物用蒸馏水配成适当浓度混悬液,以保证给药体积与丹龙醒脑方各剂量组相同;假手术组和模型组予等体积蒸馏水灌胃。

### 1.4 造模及模型评价

参考 Longa 等<sup>[7]</sup>建立大脑中动脉栓塞再灌注 (middle cerebral artery occlusion/ reperfusion, MCAO/R) 模型。用 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg) 腹腔注射麻醉后,仰卧位固定。颈正中切口,分离暴露左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和翼颞动脉。结扎翼颞动脉,在距颈动脉叉 1 cm 处结扎颈外动脉,并于结扎处远心端用电凝器灼断,游离颈外动脉。动脉夹夹闭颈总动脉,提起颈外动脉游离端使其与颈内动脉成一直线,于颈外动脉结扎处近心端约 0.5 cm 处剪一切口,将线栓蘸取肝素后,由切口向颈内动脉插入至有轻微阻力感停止 (18.0±0.5) mm,固定线栓,造模过程中注意记录插线时间,2 h 后拔线实现再灌注。大鼠清醒后自由进食、进水。假手术组除不插线外,全过程同其它各组。待再灌注 2 h 大鼠完全清醒后,采用盲法对其神经功能缺损进行评分并记录。神经功能评分参照 Longa 等<sup>[7]</sup>的 5 分制评分标准进行:0 分无神经缺损症状;1 分右前肢不能完全伸直;2 分向右旋转;3 分向右侧倾倒;4 分不能行走或昏迷。分值越高,说明动物行为障碍越严重,1~3 分者为成功模型,余剔除。剔除后致大鼠数目不能满足实验要求则及时补充,保证每组 8 只。

### 1.5 取材

大鼠于再灌注 24 h 进行神经功能评分后灌流取材。具体方法:打开胸腔,将灌流针从左心室插入至升主动脉并固定,在右心耳剪一小口放血。迅速注入肝素化生理盐水约 200 mL,当从右心耳流出的液体变清亮后,缓慢注入 4%多聚甲醛,灌流固定至肝脏变硬后,取全脑放入 4%多聚甲醛固定液中固定 24 h,取脑缺血区冠状切面 2~3 mm,脱水、透明、浸蜡、包埋。制作脑部冠状切片,切片厚度为 4  $\mu\text{m}$ ,隔 4 片取 1 切片行 TUNEL 法及免疫组化法检测。

### 1.6 指标检测

**1.6.1 神经功能缺损评分** 各组于再灌注 24 h 取材前采用盲法进行神经功能缺损评分,依据改良大鼠神经功能缺损评分 (masao-neurological severity scores, m-NSS)法<sup>[8]</sup>,从运动、感觉、平衡能力及生理反射对大鼠各项生理功能进行等级评分,正常计 0 分,异常者根据量表及严重程度计 1~6 分,各项累加,总分最高 18 分,分值越高表示神经功能损害越严重。

**1.6.2 大脑皮质缺血半暗带区 (ischemic penumbra, IP)区神经细胞凋亡检测** 采用 TUNEL 法。切片脱蜡至水,蛋白酶 K 室温孵育 15 min;破膜液破膜 10 min;TdT 和 dUTP 按 1:9 混合加在切片上 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅孵育 60 min;3%过氧化氢避光孵育 20 min,阻断内源性过氧化物酶;加适量 converter-POD 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅孵育 30 min;DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。同时设立阳性(加 DNaseI,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和阴性对照(不加 TdT)。在显微镜高倍视野( $\times 400$ )下观察,经图像分析系统每个切片随机选择 5 个视野,计数阳性细胞数,以细胞核呈棕黄色着色并符合形态学上的特征改变,如染色体浓缩、核碎裂、核周有染色体聚集等为阳性细胞,并用凋亡指数 (apoptotic index, AI)表示。AI=阳性细胞数/全部细胞数 $\times 100\%$ ,取其平均值。

**1.6.3 大脑皮质 IP 区即早基因表达产物 c-fos、c-jun、c-myc 蛋白检测** 采用免疫组化法。切片脱蜡入水,0.1 mol/L 的 EDTA 抗原修复液进行微波修复;3%过氧化氢室温处理 20 min 以灭活内源性过氧化物酶;每片滴加稀释到相应溶度的一抗 50  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,每片滴加二抗 50  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, DAB 显色,蒸馏水终止显色,脱水,二甲苯透明后中性树脂封片。阴性对照实验中采用磷酸盐缓冲液代替一抗,其他步骤如上。每组内每张切片随机挑选 5 个 200 倍视野进行拍照。拍照时尽量让组织充满整

个视野,保证每张照片的背景光一致。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准,对每张照片进行分析得出每张照片阳性细胞的积分光密度值 (integrated optical density, IOD),IOD 值越大,阳性表达越强。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时选用最小显著差数 (LSD)法,方差不齐时采用 Tamhane's  $T_2$  检验法。所有统计检验采用双侧检验,检验水准( $\alpha$ )定为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 各组神经功能缺损评分比较

与假手术组比较,其余各组的神经功能缺损评分均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,尼莫地平组、丹龙醒脑方各剂量组的评分均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );尼莫地平组、丹龙醒脑方各剂量组组间比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 各组皮质 IP 区神经细胞凋亡的比较

与假手术组比较,其余各组 AI 明显增大,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,尼莫地平组、丹龙醒脑方各剂量组的 AI 均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ );尼莫地平组、丹龙醒脑方各剂量组组间比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1、图 1。

表 1 各组神经功能缺损评分及 AI 比较 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

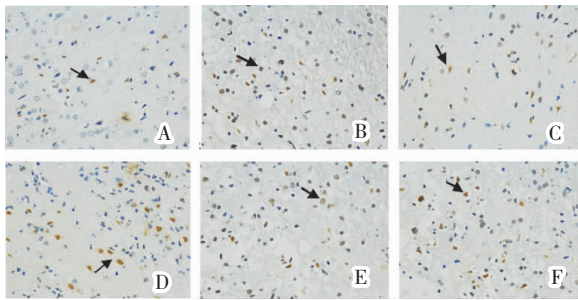
| 组别       | 剂量(g/Kg)              | 神经功能缺损评分(分)                    | AI(%)                             |
|----------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 假手术组     | -                     | 0.0 $\pm$ 0.0                  | 4.65 $\pm$ 2.33                   |
| 模型组      | -                     | 11.7 $\pm$ 2.5**               | 40.46 $\pm$ 5.87**                |
| 尼莫地平组    | 10.8 $\times 10^{-3}$ | 7.0 $\pm$ 1.6** $\Delta\Delta$ | 24.03 $\pm$ 6.52** $\Delta\Delta$ |
| 丹小组      | 3.7                   | 7.5 $\pm$ 2.1** $\Delta\Delta$ | 29.63 $\pm$ 4.08** $\Delta$       |
| 丹中组      | 7.4                   | 6.8 $\pm$ 1.7** $\Delta\Delta$ | 25.46 $\pm$ 4.43** $\Delta\Delta$ |
| 丹大组      | 14.8                  | 6.0 $\pm$ 1.6** $\Delta\Delta$ | 22.37 $\pm$ 6.25** $\Delta\Delta$ |
| <i>F</i> |                       | 41.53                          | 140.09                            |
| <i>P</i> |                       | 0.00                           | 0.00                              |

注:与假手术组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ 。

### 2.3 各组 c-fos、c-jun、c-myc 蛋白表达的比较

与假手术组比较,其余各组的 c-fos、c-jun 及 c-myc 蛋白的 IOD 值均增大,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,尼莫地





注:A、B、C、D、E、F 分别代表假手术组、模型组、尼莫地平组、丹小组、丹中组、丹大组。

图1 各组大鼠 IP 区神经细胞凋亡的比较(TUNEL 法, 10×40, 棕色为阳性细胞)

平组、丹龙醒脑方各剂量组的 *c-fos*、*c-jun* 及 *c-myc* 蛋白的 IOD 值均明显减小, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 尼莫地平组、丹龙醒脑方各剂量组组间比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

### 3 讨论

细胞凋亡的概念最早是由 Kerr 等<sup>[9]</sup>于 1972 年首次提出, 是指生物体内绝大多数细胞在一定的发育阶段发生的由基因调控的、自主的、有序的死亡过程。在局灶性脑梗死病灶中, 包绕在梗死灶周围的是

表 2 各组 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 蛋白的 IOD 值比较

( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别       | 剂量(g/Kg)              | <i>c-fos</i>    | <i>c-jun</i>   | <i>c-myc</i>        |
|----------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| 假手术组     | -                     | 394.6±88.0      | 38.0±18.5      | 560.9±251.7         |
| 模型组      | -                     | 1 670.2±192.2** | 583.4±60.2**   | 6 946.5±1 135.2**   |
| 尼莫地平组    | 10.8×10 <sup>-3</sup> | 849.3±182.1**△△ | 324.5±39.5**△△ | 2 941.0±977.7**△△   |
| 丹小组      | 3.7                   | 874.6±98.7**△△  | 346.1±53.9**△△ | 2 995.8±1 069.5**△△ |
| 丹中组      | 7.4                   | 853.9±106.8**△△ | 317.8±51.9**△△ | 2 830.2±1 074.8**△△ |
| 丹大组      | 14.8                  | 683.2±109.2**△△ | 290.1±58.7**△△ | 2 608.5±803.9**△△   |
| <i>F</i> |                       | 30.44           | 36.46          | 14.47               |
| <i>P</i> |                       | 0.00            | 0.00           | 0.00                |

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,△△ $P < 0.01$ 。

IP, IP 区细胞损害以凋亡为主要特征, 但缺血半暗带由于存在侧支循环, 缺血超早期尚有大量存活神经元, 如果能在短时间内, 迅速恢复血流, 则该区脑组织的损伤可逆, 神经细胞可存活并恢复功能。因此, 及时挽救或减少 IP 区神经细胞凋亡已成为治疗缺血性脑卒中的关键<sup>[10]</sup>。

IEGs 是细胞接受刺激后短时间内表达的一族基因, 在脑缺血后神经细胞凋亡的基因调控中具有重要作用。IEGs 家族主要包括 *fos*、*jun*、*myc* 和 *erg* 家族, 被第二信使介导的相关过程激活后, 数分钟内即可表达, 并具有一定的时相性<sup>[11]</sup>。即早基因的表达产物主要为 *c-fos*、*c-jun*、*c-myc* 蛋白, 它们具有 DNA 结合活性, 充当第三信使, 直接或间接地激发其它一些持续存在时间较长的被称为“晚效应基因”的表达, 从而发挥对神经细胞凋亡的调控作用。其中, 以 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 最为重要。一般情况下, *c-fos* 基因在许多组织都是低水平表达, 但当受到如缺血、缺氧等外界刺激时, 它的表达水平会有显著的改变, 可出现过度表达, 其产物 *c-fos* 蛋白由胞质转入核内, 与 *c-jun* 基因的蛋白产物 *c-jun* 蛋白形成 *fos-jun* 异源二聚体, 调节相应迟发性基因的表达, 促进细胞凋亡。有研究显示, 大鼠缺血再灌注 24 h 脑组织 *c-fos* 蛋白表达达至高峰, 与此同时神

经元凋亡也达高峰, 表明 *c-fos* 的激活可进一步诱导神经元凋亡, 使神经细胞凋亡数量明显增加<sup>[5]</sup>。*c-myc* 是调控细胞周期的重要基因, 既可诱导细胞增生, 也可介导细胞凋亡。细胞在 *c-myc* 基因作用下出现哪种结果, 取决于细胞接受的外来信号<sup>[12]</sup>。高氏等<sup>[13]</sup>研究发现, *c-myc* 蛋白和 mRNA 于再灌注 6 h 即开始出现, 24 h 达高峰, 以后则呈下降趋势; 与之相应的是, 大鼠缺血再灌注损伤后 6 h 脑组织即有少量 TUNEL 阳性细胞, 随着再灌注时间的延长损伤区阳性细胞逐渐增多, 24 h 阳性细胞数达高峰, 表明超急性期脑缺血再灌注这一不良信号能够引起 *c-myc* 蛋白和 mRNA 表达增加, 从而引发神经细胞凋亡。

本研究通过线栓法成功复制了 MCAO/R 大鼠模型, 采用常规的预给药 3 d 和造模后频繁给药, 并基于上述文献对 MCAO/R 大鼠神经细胞凋亡、即早基因表达于再灌注 24 h 达到高峰的认识, 采取再灌注 24 h 取材观察丹龙醒脑方对皮质 IP 区神经细胞凋亡与即早基因 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 表达的影响。结果表明, 丹龙醒脑方能显著降低脑缺血后神经功能缺损评分和减少神经细胞凋亡, 还能显著下调 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 的表达, 提示下调即早基因的表达可能为丹龙醒脑方减少神经细胞凋亡

的机制之一。

丹龙醒脑方为周小青教授经验方,是抗缺血性脑损伤的临床效方,用于治疗脑卒中及其后遗症已有多年的研究也表明,该方对于缺血性脑损伤,不仅能促进神经再生,还能多环节干预包括神经细胞凋亡在内的级联反应<sup>[4]</sup>,而本研究再一次验证了该结论。丹龙醒脑方以丹参为君,田七、远志、石菖蒲为臣,佐以地龙、淫羊藿、菟丝子,共奏活血通络、化痰开窍、补肾温通之功。研究表明,补肾活血化痰类方药具有显著的抗神经细胞凋亡作用,对缺血再灌注脑组织损伤具有保护作用<sup>[5]</sup>。贾占红等研究显示,具有活血通络功效的竹叶总皂苷可通过抑制 c-fos、c-jun 蛋白表达,从而减少脑缺血后神经细胞凋亡<sup>[6]</sup>;辛随成等发现中药组和针药结合组可通过下调 c-myc 的表达而抑制脑缺血损伤神经细胞凋亡<sup>[7]</sup>,均与本研究结果一致。现代药理学也证实,三七总皂苷<sup>[8]</sup>、丹参酮 II A<sup>[9]</sup>、石菖蒲提取液<sup>[20]</sup>能有效地抑制脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡,淫羊藿素有抗 A $\beta$  肽致大鼠原代培养神经细胞凋亡作用<sup>[21]</sup>。研究还表明,三七皂苷 R<sub>g1</sub>、R<sub>b1</sub> 可通过抑制 c-fos、c-jun 的表达而降低脑细胞凋亡<sup>[22]</sup>,丹参酮抑制脑缺血后 c-fos 基因的表达而发挥脑保护作用<sup>[23]</sup>。而这些都是丹龙醒脑方减少神经细胞凋亡及与下调即早基因表达有关的理论和物质基础。

综上所述,丹龙醒脑方能显著降低脑缺血后神经功能缺损和减少神经细胞凋亡,下调即早基因 c-fos、c-jun 和 c-myc 的表达可能为其机制之一。本研究在前期基础上进一步探索了丹龙醒脑方抑制神经细胞凋亡的作用靶点和环节,为其临床应用提供了新的实验依据,也有利于该药新药的开发。但由于只选取再灌注 24 h 对三个基因的表达进行平行观察,因此该方对即早基因的时效动态变化和各基因之间相互作用的影响,还有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 国家卫生和计划生育委员会脑卒中筛查与防治工程委员会. 卒中筛查与防治技术规范[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2013,5(9): 44-50.
- [2] 李花,刘旺华,周小青,等. 活血通络方对大鼠脑缺血再灌注后 Cyto-C 和 caspase 表达的干预[J]. 现代生物医学进展,2009,19(12): 2 218-2 221.
- [3] 刘旺华,李花,周小青,等. 大鼠脑缺血再灌注后 Smac、XIAP 和 caspase-9 表达及活血通络方的干预作用[J]. 现代生物医学进展, 2009,19(13):2 424-2 427.
- [4] Dragunow M, Beilharz E, Si rianne E, et al. Immediat e-ear-

- ly gene prot ein expression in neurons undergoing delayed death , but not necrosis, following hypoxi c ischemic injury to the young rat brain[J]. Brain Res Mol Brain Res,1994,25(2):19-33.
- [5] 陈江君,陈军,鲁雅琴,等. 大鼠脑缺血再灌注 c-fos 表达与神经细胞凋亡关系研究[J]. 卫生职业教育,2014,32(6):89-90.
- [6] 翁维良. 中药临床药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:40.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989,20(1):84-91.
- [8] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke,2001,32(11):2 682-2 688.
- [9] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer,1972,26(8):239-257.
- [10] 周玉弟,惠康丽,段满林,等. 艾芬地尔预先给药对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带区 iNOS 和细胞凋亡的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2010,30(3):358-361.
- [11] 孙灵芝,李淑玲. 硝酸甘油偏头痛模型对大鼠即早基因表达的影响及盐酸氟桂利嗪的干预作用 [J]. 中国医药导报,2013,10(24): 32-34.
- [12] Larsson LG, Henriksson MA. The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy[J]. Exp Cell Res,2010,316(8):1 429-1 437.
- [13] 高亮,杨涌杰,郑广顺. 大鼠脑缺血再灌注损伤后 c-myc 蛋白和 mRNA 表达及细胞凋亡的研究[J]. 山西医药杂志,2005,34(3): 191-193,265.
- [14] 曹泽标,周小青,张利美,等. 丹龙醒脑方抗缺血性脑损伤机制的实验研究进展[J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(4):59-62.
- [15] 张树泉,徐西元. 补肾活血化痰方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(6):515-517.
- [16] 贾占红,赵晖. 竹节参总皂苷对脑缺血大鼠神经细胞凋亡和即早基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):168-172.
- [17] 辛随成,郭书文,王国华. 针药结合对实验性脑缺血脑细胞凋亡及相关因素的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(3):218-220.
- [18] 李花,邓常清,陈北阳,等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(2):189-193.
- [19] 王媛婕,刘彦慧,廖瑞雪. 丹参酮 II A 对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤后神经细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2015,31(3):443-444.
- [20] 匡忠生,谢宇晖,李翎,等. 石菖蒲提取液对脑缺血-再灌注诱导的神经细胞凋亡的保护作用[J]. 广东医学,2002,23(5):459-460.
- [21] 张翔南,王欢欢,王志强,等. 淫羊藿素抗 A $\beta$  肽致大鼠原代培养神经细胞凋亡作用[J]. 浙江大学学报(医学版),2007,36(3):224-228.
- [22] 张路,张霞,武凡. 三七皂苷 R<sub>g1</sub>、R<sub>b1</sub> 对大鼠局灶性脑缺血后 c-fos、c-jun 表达的抑制作用分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2012,5(12A):18-20.
- [23] 吴卫平,李振洲,匡培根. 脑缺血再灌注后脑组织 c-fos 基因表达与丹参的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,1995,2(1):1-3.