

# 补肾祛痰活血汤对缺血再灌注损伤大鼠 Occludin、ZO-1 蛋白的调节作用

杨 涛<sup>1,2</sup>, 王净净<sup>1\*</sup>, 陶 琳<sup>1</sup>, 钟乔青<sup>1</sup>, 吴彬才<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.衡阳市江东中医院,湖南 衡阳 421002)

**【摘要】目的** 观察补肾祛痰活血汤对预处理脑缺血再灌注损伤的大鼠脑组织水肿、血脑屏障通透性及损伤区咬合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)的影响。**方法** SD成年雄性大鼠50只,按随机数字表法分为正常组、模型组、假手术组、治疗组、对照组,每组10只。治疗组给补肾祛痰活血汤、对照组给消栓通络胶囊,正常组、模型组、假手术组给与相应量的双蒸馏水。采用线栓法复制脑缺血再灌注损伤模型,72 h后,干湿重法测定脑含水量反映脑水肿程度,用免疫组织化学方法测定损伤区Occludin、ZO-1蛋白的表达量,并对各结果进行相关性分析。**结果** 与正常组、假手术组比较,模型组、治疗组、对照组72 h时间点大鼠脑组织含水量较正常组、假手术组要增高一些,脑组织损伤区周围Occludin、ZO-1蛋白表达明显降低( $P<0.01$ )。脑组织含水量与脑组织损伤程度正相关,脑组织损伤区周围Occludin、ZO-1蛋白与脑组织损伤程度呈负相关。**结论** 补肾祛痰活血汤对缺血性脑损伤发生后损伤区Occludin、ZO-1蛋白含量降低有抑制作用,抑制血脑屏障通透性增高,减轻脑水肿形成。

**【关键词】** 补肾祛痰活血汤;咬合蛋白;闭锁小带蛋白;脑缺血再灌注损伤模型;制附子;桂枝;熟地黄

**【中图分类号】**R285.5;R278

**【文献标识码】**B

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.08.006

## The Effect of Bushen Huoxue Decoction through Regulating ZO-1 and Occludin Proteins in Ischemia Reperfusion Injury Model Rats

YANG Tao<sup>1,2</sup>, WANG Jingjing<sup>1\*</sup>, TAO Lin<sup>1</sup>, ZHONG Qiaoqing<sup>1</sup>, WU Bincai<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Jiangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hengyang, Hunan 421002, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of Bushen Huoxue decoction on rat brain edema, blood brain barrier permeability, damage zone occlusal protein (occludin), zonula occludens (ZO-1) protein in pretreatment ischemia reperfusion injury rats. **Methods** Fifty SD adult male rats were divided into normal group, model group, sham operation group, treatment group, control group according to the random number table method, 10 rats in each group. The treatment group was given Bushen Huoxue decoction, while the control group was given Xiaoshuan Tongluo capsule. The normal group, model group, sham operation group were given the corresponding double distilled water. The model of cerebral ischemia-reperfusion injury was established by suture method. After 72 hours, the brain water content was determined by dry wet weight method to reflect the degree of brain edema. The damage zone occludin and ZO-1 protein expression were tested by immunohistochemical method, and the results were analyzed by correlation analysis. **Results** Compared with the normal group and sham operation group, the brain tissue water content in rats at 72 h of model group, treatment group and control group was increased, the occludin and ZO-1 protein expression in brain tissue damage zone were significantly decreased ( $P<0.01$ ). The water content of brain tissue

**【收稿日期】**2016-03-15

**【基金项目】**衡阳市科学技术局科技计划发展项目项目编号(2014KJ63)。

**【作者简介】**杨 涛,男,在读硕士研究生,副主任医师,研究方向:中西医结合脑血管疾病防治。

**【通讯作者】**\*王净净,男,教授,博士研究生导师,E-mail:wangjingjing1954@163.com。

was positively correlated with the degree of brain tissue injury, ZO-1 and occludin protein were negatively correlated with the degree of brain tissue injury. **Conclusion** Bushen Quyu Huoxue decoction can inhibit the decrease of occludin and ZO-1 protein, inhibit the blood brain barrier permeability and relieve brain edema formation.

[**Keywords**] Bushen Huoxue decoction; occludin; zonula occludens protein; cerebral ischemia reperfusion injury model; prepared monkshood; Cassia Twig; prepared rehmannia root

脑卒中是神经系统较为常见疾病之一,是死亡较高的三大疾病之一。在脑血管疾病中,最常见的是缺血性脑卒中,约占60%~80%。迅速重建梗塞区域血流供应能显著改善缺血性脑卒中预后<sup>[1]</sup>。中医药对急性期及恢复期脑梗所致的神经功能缺损的有改善的作用。常以益气活血通络、化痰通腑为治疗法则,较少提及温阳治法。本研究将温阳通络为主的补肾祛痰活血汤作用于预处理脑缺血再灌注损伤大鼠,探讨其预防保护作用与机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,鼠龄 6~8 周,体质量 180~220 g,由湖南斯莱克景达动物有限公司提供,动物使用许可证编号:SYXK(湘)2013-0005。

1.1.2 受试药物 补肾祛痰活血汤:由制附子 10 g(先煎),桂枝 10 g,熟地黄 10 g,山茱萸 10 g,山药 10 g,巴戟天 10 g,肉苁蓉 10 g,石菖蒲 10 g,远志 10 g,黄芪 30 g,水蛭 3 g,当归 10 g,川芎 10 g,丹参 10 g,牡丹皮 10 g,桃仁 10 g,防风 10 g,刺蒺藜 10 g,地龙 10 g,甘草 5 g 等 23 味药组成,以上饮片由湖南中医药大学中医附属第一医院中药房提供,228 g/剂,加水煎煮浓缩为 114 mL,含生药 2 g/mL。消栓通络胶囊:由川芎,丹参,黄芪,泽泻,三七,槐花,桂枝,郁金,木香,冰片,山楂 11 味药组成(吉林省东北亚药业股份有限公司,国药准字 Z10940067,0.37 g/粒),6 粒溶散于 114 mL 双蒸水,含生药 0.019 5 g/mL。

1.1.3 试剂及仪器 一抗试剂 Rabbit-anti-Occ(Cat Number bs10011R, Lot 类型 AD081219),一抗 Rabbit-anti-ZO-1(Cat Number bs1329R, Lot 类型 AD120439),均购自北京奥博森生物技术有限公司;二抗试剂通用型(批号:K152318A),购自北京中杉金桥, Motic B5 显微摄像图像分析系统(麦克奥迪实业集团公司);S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公

司产);LEICA DM LB 型双目显微镜(德国 LEICA 公司产)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模<sup>[2]</sup> SD 大鼠经过适应性喂养 1 周后,按随机数字表随机分为正常组、假手术组、模型组、治疗组、对照组,共 5 组,每组 10 只。实验组、对照组、模型组造模,将 SD 大鼠麻醉后固定于操作台,从其右颈部逐层切开,将颈总动脉分离出来,分离出颈内动脉、颈外动脉,将颈总动脉近分支端用血管夹钳夹,颈外动脉结扎,近颈总动脉段将颈内动脉斜形切开,将 3.0 的鱼线插入大脑中动脉,进行栓塞,用线打结固定线栓,于伤口处覆盖湿润生理盐水纱布,1.5 h 后,将线栓拔出,逐层缝合,伤口络合碘消毒,1 h 后再进行评分。模型评定:0 分为肢体活动正常;1 分为提尾悬空后不能伸展对侧前爪;2 分为行走向对侧转圈;3 分为行走困难,并向对侧侧倒;4 分为不能自发行走或昏迷。1~3 分的纳入实验:模型组 2 分的 7 只,3 分的 1 只。治疗组 2 分的 5 只,3 分的 3 只,对照组 1 分的 1 只,2 分的 7 只。假手术组造模,大鼠麻醉后固定于操作台,从其右颈部逐层切开,将颈总动脉分离出来,分离出颈内动脉、颈外动脉,颈总动脉后,颈内动脉不切开,不插入线栓,立即逐层缝<sup>[3]</sup>。正常组未做处理。

1.2.2 药物干预 正常组、假手术组和模型组按 11 ml/(kg·d)的双蒸馏水灌胃给药。治疗组以补肾祛痰活血汤浓缩成 114 mL,按 23 g/(kg·d)灌胃给药<sup>[4]</sup>。对照组给予消栓通络胶囊,将 6 粒胶囊溶散于 114 mL 双蒸水,按 0.224 g/(kg·d)给药。给药 3 d 后,将治疗组、对照组、模型组造模,假手术组按相关方案处理,造模后第 2 天各组灌胃相应的双蒸水或药物,3 d 后,将所有实验大鼠进行标本取材及检测。

1.2.3 脑水肿程度测定 采用干湿重法测定脑组织含水量。各组取 8 只大鼠,水合氯醛腹部注射麻醉后,尾静脉按体质量注射 EB,运用 2% EB 按 0.2 mL/100 g 注射,身体及双眼变蓝 1 h,心内注入生理盐水,直到右心耳漏出清凉液体,迅速断头,取出左侧前端大脑皮质 100 mg,用电子天平称其湿重

后,置入 60 °C 烤箱中烤干 24 h 至恒重。脑组织含水量=(湿重—干重)÷湿重×100%。

1.2.4 免疫组织化学方法检测相关因子的表达 将所取的左侧大脑组织入 4%多聚甲醛固定 24 h 以上,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚 4~5 μm,铺片,烤片,染色,封片,干后镜下观察并显微镜采图。切片脱蜡,水化组织切片,3%双氧水阻断内源性过氧化物酶,入 PBS 修复液置微波炉修复抗原,冷至室温,PBS 冲洗,加 1:100 一抗 Rabbit-anti-Occludin/Rabbit-anti-ZO-1, 每片 50 μL,4 °C 过夜,PBS 漂洗,滴加试剂 1 聚合物辅助剂每片 50 μL,滴加二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色,镜下控制,水洗,苏木精复染,脱水、透明、封片,镜下观察并拍照。

### 1.3 统计学处理

计量资料数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组样本均数均满足正态分布及方差齐性,用 F 检验,两组之间比较用 q 检验,否则用秩和检验。同组间比较采用成组 *t* 检验。采用 SPSS 17.0 软件进行分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

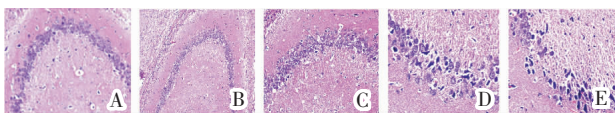
## 2 结果

### 2.1 脑组织含水量

正常组、假手术组、治疗组、对照组与模型组比较,正常组与假手术组没有明显差异( $P > 0.05$ ),治疗组、对照组各组脑含水量较模型组明显减低( $P < 0.01$ )。治疗组较对照组能更好减轻脑组织水肿( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

### 2.2 HE 染色结果

实验大鼠左侧大脑海马 C<sub>2</sub> 区,正常组与假手术组细胞核成圆形,核质分布均匀,核仁明显,清晰圆润。模型组细胞核固缩,塌陷,核质不清晰,部分细胞坏死消失,胶质细胞增生,较其他组坏死比例明显增加。治疗组较对照组坏死细胞减少。补肾祛痰活血汤较消栓通络胶囊能更好地保护脑组织,减少脑细胞破坏。见图 1。

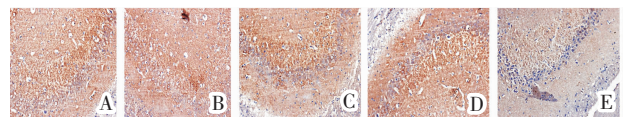


注:A.正常组,B.假手术组,C.治疗组,D.对照组,E.模型组

图 1 大鼠脑组织染色形态光镜图(HE×400)

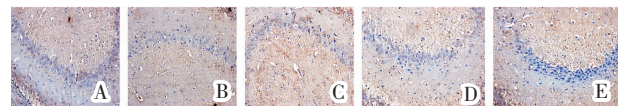
### 2.3 各组 Occludin 与 ZO-1 表达的比较

实验大鼠左侧大脑海马 C<sub>2</sub> 区 Occludin 阳性表达为棕黄色。正常组、假手术组胞质强阳性表达,胞核弱阳性表达,细胞外组织表达强阳性。模型组胞核表达弱阳性,细胞外表达弱阳性,少部分细胞核呈阳性表达,坏死的细胞核固缩。治疗组、对照组胞核弱阳性表达,胞外突起表达呈中阳性。实验大鼠左侧大脑海马 C<sub>2</sub> 区 ZO-1 阳性表达为棕黄色。正常组、假手术组胞核胞质均有表达,胞外阳性表达丰富,治疗组部分细胞坏死。模型组 ZO-1 海马部位细胞无表达,胞外弱阳性,较多细胞坏死。对照组、治疗组 ZO-1 表达呈中阳性,部分细胞坏死,与正常组和假手术组比较,模型组 Occludin、ZO-1 光密度值均下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,治疗组与对照组 Occludin、ZO-1 光密度值均升高( $P < 0.01$ ),且治疗组优于对照组( $P < 0.01$ )。说明补肾祛痰活血汤较消栓通络胶囊能更好调节 Occludin、ZO-1 的表达,减少脑组织损伤。见表 1,图 2-3。



注:A.正常组,B.假手术组,C.治疗组,D.对照组,E.模型组

图 2 大鼠脑组织 Occludin 的表达光镜图(免疫组化×400)



注:A.正常组,B.假手术组,C.治疗组,D.对照组,E.模型组

图 3 大鼠脑组织 ZO-1 的表达光镜图(免疫组化×400)

## 3 讨论

模型鼠大脑局部梗塞后,血脑屏障功能破坏,脑组织功能受损伤。病灶中心区脑组织发生损害多为不可逆性,其周围半暗带区神经组织损害可逆,尽早解除梗塞,尤为重要。恢复血流可缩小甚至消除梗塞,改善脑组织功能,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>[5]</sup>。血脑屏障是脑毛细血管内皮细胞、其间的紧密连接、基底膜下星型胶质细胞周足及基底膜构成的屏障<sup>[6]</sup>。紧密连接是维持血脑屏障功能与的结构重要基础<sup>[7]</sup>。紧密连接[Tight junction, TJ]存在于细胞间,对于细胞旁途径(屏障功能)的调控具有重要意义。occludin 蛋白是构成 TJ 的重要跨膜蛋白,对其组成和屏障功能维持起到了重要作用<sup>[8]</sup>。ZO-1 表达水平的高低与血脑屏障的通透性密切相关<sup>[9]</sup>,occludin 及 ZO-1 蛋白

表 1 各组脑组织含水量、Occludin 及 ZO-1 的比较

组别	n	脑组织含水量(%)	Occludin 光密度值	ZO-1 光密度值
正常组	8	0.805 0±0.009 3	0.336 2±0.020 7	0.515 0±0.017 7
假手术组	8	0.802 5±0.012 8	0.335 0±0.020 0	0.516 0±0.026 1
模型组	8	0.888 7±0.012 5 <sup>△△</sup>	0.173 8±0.020 7 <sup>△△</sup>	0.281 3±0.025 9 <sup>△△</sup>
治疗组	8	0.835 0±0.009 3 <sup>△△▲▲##</sup>	0.260 0±0.011 9 <sup>△△▲▲##</sup>	0.441 3±0.025 3 <sup>△△▲▲##</sup>
对照组	8	0.853 7±0.010 6 <sup>△△▲▲</sup>	0.220 0±0.0119 <sup>△△▲▲</sup>	0.330 0±0.016 0 <sup>△△▲▲</sup>
F 值		85.771	132.224	104.361
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较<sup>△△</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>▲▲</sup>P<0.01;与对照组比较<sup>##</sup>P<0.01。

表达的变化可能是血脑屏障通透性改变的分子基础之一。ZO-1 蛋白的变化幅度高于 Occludin 蛋白,位于细胞质内的 ZO-1 蛋白对缺血再灌注的刺激更为敏感,偏向于调节作用,而跨膜蛋白 Occludin 则更偏向于维持 TJ 形态和功能<sup>[10]</sup>。Occludin 存在于脑血管内皮细胞间的 TJ 处,对于维持 BBB 的生理功能具有重要作用。Occludin 的羧基端与 ZO-1 的 PDZ 结构域相连,ZO-1 作为细胞骨架的连接者,协助 Occludin 与细胞骨架的联系,维持内皮细胞间的连接和细胞信号的传导等。在某些病理因素的参与下,TJ 的功能下降,细胞间的通透性增高,而 Occludin 是衡量 TJ 功能变化的重要指标之一,TNF- $\alpha$  影响 BBB 的靶位点可能存在于对 Occludin 的 mRNA 的转录与蛋白质的表达有调控作用<sup>[11]</sup>。笔者将大鼠进行脑缺血再灌注,运用在王净净老师经验方化痰通络复步汤<sup>[12]</sup>的基础上,经王老师指导拟定的补肾祛痰活血汤进行治疗。本方针对阳化气,阴成形设计。阳虚不化湿,湿聚成痰,痰瘀管壁,日久瘀而不通,而发中风,即西医所说的缺血性脑卒中。从补肾入手,本虚标实,肾为先天之本,故用制附子为君药,附子可温通阳,暖命门,温坎水,破阴凝,可谓是扶阳第一要药。桂枝、巴戟天、肉苁蓉为臣药,温阳化气,痰瘀得温而化,熟地、山茱萸为佐药,佐助附子,善补阳者,阴中求阳。石菖蒲、远志祛痰,水蛭、当归、川芎、丹参、桃仁活血祛瘀,防风、刺蒺藜有祛风之效,多靶点、多系统、全方位治疗。从现代药理学来看:附子有消炎镇静的作用。桂枝有抗炎抗菌的作用,能解除毛细血管的收缩,降低血浆纤维蛋白原含量,降低血浆粘度,有助于血细胞表面电荷的充分暴露和变形活动,从而使全血黏度降低,改善组织循环,使病变组织逆转修复。当归、川芎、桃仁、具有扩张血管、增强脑血流量、改善脑部血液循环、改善血液流变性、降低血脂、改善脑缺氧及促进神经功能恢复等作用<sup>[13]</sup>,刺蒺藜可降压,红景天可以提高血红蛋白与氧的结合能力。实验研究表明,Occludin 与 ZO-1 蛋白表达越

强,血脑屏障损伤越少,补肾祛痰活血汤能提升缺血性脑损伤区脑组织 Occludin 与 ZO-1 蛋白的表达,保护血脑屏障的紧密连接,改善血脑屏障的通透性。补肾祛痰活血汤对紧密连接关系密切的 ZO-1、Occludin 蛋白有较好调控作用,具体作用与调控机制还有待进一步研究,为治疗缺血性脑卒中患者研究提供更多的思路,为临床治疗带来新的启示。

#### 参考文献:

- [1] 潘小玲,陈红芳.SSRI 类药物促进缺血性脑卒中患者神经功能恢复[J]. 心脑血管病防治,2014,14(5):418-420.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1): 84-91.
- [3] 储正达,吴颖昕,戴圆圆,等.脑梗塞动物模型探讨[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(5):46-48.
- [4] 贺石林,王 键,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2012:48.
- [5] 曹泽标,陈昱文,刘旺华,等.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[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(4):1-5.
- [6] 玛娜璐璐,孙逸坤,高永红,等.血脑屏障与脑血管疾病的相关研究[J]. 现代生物医学进展,2015,15(28):5 571-5 575.
- [7] 王剑锋,刘艳丽.脑缺血再灌注后影响血脑屏障通透性的因素[J]. 国际脑血管病杂志,2006,14(12):930-932.
- [8] 文骏雄.紧密连接蛋白 occludin 在血脑屏障中的研究概述[J]. 中国医学工程,2013,21(9):192-193.
- [9] 葛志强.人工合成 E-选择素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤血脑屏障的影响及机制探讨[D].苏州:苏州大学,2014.
- [10] Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2005, 25(5): 593-606.
- [11] Tsukita SM, Furuse MI. Multifunctional strands in tight junctions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(4): 285-293.
- [12] 李振光,刘绪银.王净净医案精华[M].北京:人民卫生出版社,2016:102-123.
- [13] 樊素琴.中西医结合治疗脑梗死后遗症 30 例临床观察[J].山西中医,2010,26(11)24.

(本文编辑 杨 瑛)