

本文引用:廖亮英,蔡光先,周赛男.补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2、Bax 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):257-260.

补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2、Bax 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 探讨补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的影响。方法 将 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,复制局灶性脑缺血大鼠模型,造模后按神经功能缺损评分进行分层,随机分为 5 组,每组 15 只,分别于移植后 7 d、14 d、28 d 进行神经功能评分,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 Bcl-2、Bax。**结果** 补阳还五汤能显著减轻神经功能缺损,Bcl-2、Bax 在各时间点(7 d、14 d、28 d)表达与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),模型加移植加补阳还五汤超微饮片组上调 Bcl-2、拮抗 Bax 表达的作用优于模型加移植加补阳还五汤传统饮片组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 补阳还五汤可调节脑缺血后 Bcl-2、Bax 的表达,是其促进神经功能恢复的可能机制之一,且超微饮片组的作用较传统饮片组更加显著。

〔关键词〕 补阳还五汤;局灶性脑缺血;神经干细胞;细胞移植;Bcl-2;Bax

〔中图分类号〕R289.3;R255.2 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.007

Effects of Buyang Huanwu Ultra-Fine Powder on Apoptosis Gene Bcl-2 and Bax of Transplanted Neural Stem Cells in Rats with Focal Cerebral Ischemia

LIAO Liangying¹, CAI Guangxian^{2*}, ZHOU Sainan²

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

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

〔Abstract〕 Objective To investigate the effects of Buyang Huanwu ultra-fine powder on apoptosis protein of Bcl-2 and Bax in transplanted neural stem cells in rats with focal cerebral ischemia. **Methods** Eighty Sprague-Dawley rats, half male and half female, were copied the focal cerebral ischemia models, which were randomly divided into five groups, 15 rats in each group. The model rats were intervened by using Buyang Huanwu ultra-fine powder and traditional decoction. At 7 d, 14 d and 28 d of post-transport, the neural function defect scale was measured. The rats were sacrificed at according time. Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemical staining. **Results** Buyang Huanwu decoction could improve the neurological defect. Compared with model group, the expression of Bcl-2 and Bax increased obviously at different time points (7 d, 14 d, 28 d), the differences were statistically significant ($P<0.05$). The model-transplantation-Buyang Huanwu ultra-fine powder group in increasing Bcl-2 and decreasing Bax was better than the model-transplantation-traditional Buyang Huanwu decoction, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu decoction could regulate the expression of Bcl-2 and Bax protein after cerebral ischemia, which may be one of mechanisms of promoting the recovery of neural function. The effect of Buyang Huanwu ultra-fine powder was better than traditional decoction.

〔Keywords〕 Buyang Huanwu decoction; cerebral ischemia; neural stem cell; cell transplantation; Bcl-2; Bax

〔收稿日期〕2017-12-05

〔基金项目〕国家自然科学基金(81302953);湖南省中医药科研计划项目(2014136);湖南省教育厅科研项目(15C1050);中药粉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(ZYFT201510)。

〔作者简介〕廖亮英,女,助理研究员,医学硕士,主要从事心脑血管疾病的防治研究。

〔通讯作者〕*蔡光先,男,研究员,博士研究生导师,E-mail:lly_4448@163.com。

缺血性脑血管病(ischemic cerebral vascular disease, ICVD)以其高发病率、高致残率和高死亡率严重危害着人们的身体健康,已成为现代医学研究的热点问题^[1]。补阳还五汤是中医治疗缺血性脑损伤的有效经典方,能够降低患者的致残率^[2]。Bcl-2和Bax基因是细胞凋亡过程中重要的调节基因,研究表明脑缺血后神经功能恢复重建的机制可能与神经干细胞凋亡的相关调控基因密切相关,本试验拟探讨超微补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后Bcl-2、Bax表达的影响及其作用特点,以更好地应用于临床。现报道如下。

1 材料

1.1 药物

补阳还五汤传统饮片:处方来源于《医林改错》,组成如下:黄芪120g,赤芍10g,川芎10g,全当归10g,干地龙10g,红花10g,桃仁10g,药材购自我院药剂科,经鉴定均为道地药材,符合《药典》规定,一煎加水500mL,煎汁150mL,二煎加水300mL,煎汁150mL,两煎混合,文火煎成膏状(每mL含生药1.5g),4℃冷藏备用。补阳还五汤超微饮片:取传统补阳还五汤剂量的1/3并混合,采用震动粉碎技术(用贝利粉碎机),将黄芪、赤芍、川芎、全当归、干地龙、红花粉碎至1~75微米,桃仁粉碎至200~400微米(40~80目),收集微粉,一煎加水500mL,煎汁150mL,二煎加水300mL,煎汁150mL,两煎混合,文火煎成膏状(每mL含生药0.5g),4℃冷藏备用。

1.2 试剂

DMEM/F12粉由Hyclon公司提供;bFGF由R&D公司提供;B27添加物、EGF由GLBCO公司提供;胰酶、EDTA、Qtracker Cell Labeling Kit Protocol、Rabbit Anti-Bcl-2抗体,产品批号:BA0412、Rabbit Anti-Bax抗体,产品批号:BA0315,均由武汉博士德生物工程公司提供;细胞凋亡检测试剂盒,产品批号:MK1022,由长沙丽欣生物公司提供;水合氯醛、0.01MPBS、Triton-X100、双氧水、甲醇、无水甘油由长沙丽欣生物公司提供;SABC试剂盒、AEC显色剂、多聚赖氨酸包埋玻片、水溶性封片剂由北京中杉

生物公司提供。

1.3 动物

SD大鼠80只,清洁级,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,动物合格证号:004535,实验动物生产许可证为SCXK(沪)2003-0002。

1.4 仪器与器械

BX-51光学显微镜、AlphaImager显微图像分析系统、IX71倒置显微镜、CCD摄像头(日本Olympus公司);Galaxy 170R CO₂培养箱(shell lab公司);WP8025鼠脑立体定位仪(美国WPI公司);TDZS-WS台式离心机(湘仪);Pureloab Classic UVF超纯水仪(Mil-lipor公司);E60冰冻切片仪(英国shamton公司);BFM-T6B2微粉机(济南贝利公司)。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 神经干细胞的分离、培养、传代 参考本研发团队建立的方法^[3]从新生3~5d SD大鼠脑内分离纯化。

2.1.2 模型制备 参考文献^[3]采用大脑中动脉线栓法复制局灶性脑缺血大鼠模型,造模后有5只SD大鼠死亡。待动物清醒24h后,参考文献^[3]采用Zea Longa神经功能缺失评分标准初步评价动物造模情况。

2.1.3 细胞标记 参考文献^[4]采用量子点的标记方法。

2.1.4 细胞移植 参考文献^[5]采用侧脑室细胞移植的方法。

2.1.5 动物分组与给药 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)、模型+空白移植组(B组),模型+移植组(C组),模型+移植+补阳传统饮片组(4.57g/kg,D组),模型+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组给予等体积生理盐水,给药体积均为10mL/kg,每天给药1次。

2.1.6 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。

2.1.7 动物处理 动物注射细胞后分别存活 7、14、28 d,参考文献^[3]进行组织处理。

2.1.8 存活细胞检测 采用免疫组化法检测 Bcl-2、Bax,严格按照试剂说明书完成,每只动物随机取海马部位切片 5 张,置于 100 倍物镜下,每张切片随机选 3 个视野,用 Olympus Micro Image 4.0 图像处理系统自动计数免疫阳性细胞数。

2.1.9 统计学方法 所有数据应用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。多组间均数比较用方差分析,方差分析前先进行正态性、方差齐性检验,满足条件者用 *F* 检验,*F* 检验有统计学意义者,再进行两两比较;两两比较方差齐者用 *SNK* 法,方差不齐者用 *Tamhane's T2* 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 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。

2.2.2 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2 表达的影响 C 组 Bcl-2 表达水平较 A、B 组增加,D、E 组 Bcl-2 表达水平较 C 组增加,E 组上调 Bcl-2 表达较 D 组明显,组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。组内比较:三组在 7、14、28 d Bcl-2 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1,图 1-3。

表 1 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5, 个$)

组别	Bcl-2 表达水平		
	7 d	14 d	28 d
A 组	5.60±2.06	11.35±3.38	11.75±4.59
B 组	8.45±3.83	11.60±2.64	12.60±2.78
C 组	12.40±3.63 ^{△*}	24.90±8.82 ^{△*▲}	20.25±7.97 ^{△*▲☆}
D 组	19.55±9.63 ^{△*#}	55.20±17.04 ^{△*#▲}	38.05±14.58 ^{△*#▲☆}
E 组	29.70±5.97 ^{△*#*#}	71.4±17.03 ^{△*#*#▲}	52.45±15.70 ^{△*#*#▲☆}

注:组间比较:与 A 组比较,△ $P < 0.05$;与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,# $P < 0.05$;与 D 组比较,★ $P < 0.05$ 。组内比较:与 7 d 比较,▲ $P < 0.05$;与 14 d 比较,☆ $P < 0.05$ 。

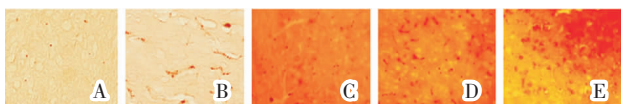


图 1 超微补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2 表达的影响(术后 7 d)

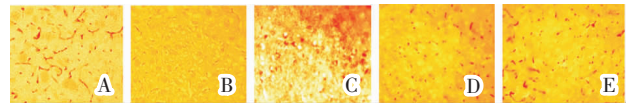


图 2 超微补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2 表达的影响(术后 14 d)

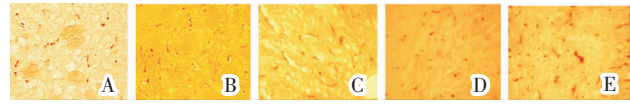


图 3 超微补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2 表达的影响(术后 28 d)

2.2.3 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bax 表达的影响 C 组 Bax 表达水平较 A、B 组增加,D、E 组 Bax 表达水平较 C 组减少,说明 D、E 组均能下调 Bax 表达,E 组下调 Bax 表达较 D 组明显,组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。组内比较三组在 7、14、28 d Bax 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2,图 4-6。

表 2 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5, 个$)

组别	Bax 表达水平		
	7 d	14 d	28 d
A 组	1.75±1.33	1.75±0.97	1.50±1.24
B 组	1.8±1.67	1.75±1.29	1.70±1.72
C 组	12.65±3.25 ^{△*}	70.95±17.34 ^{△*▲}	45.20±14.81 ^{△*▲☆}
D 组	9.52±2.33 ^{△*#}	48.15±14.11 ^{△*#▲}	30.85±12.01 ^{△*#▲☆}
E 组	6.13±1.82 ^{△*#*#}	31.35±12.59 ^{△*#*#▲}	18.30±12.74 ^{△*#*#▲☆}

注:组间比较:与 A 组比较,△ $P < 0.05$;与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,# $P < 0.05$;与 D 组比较,★ $P < 0.05$ 。组内比较:与 7 d 比较,▲ $P < 0.05$;与 14 d 比较,☆ $P < 0.05$ 。



图 4 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bax 表达的影响(术后 7 d)

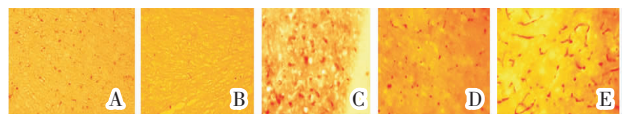


图 5 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bax 表达的影响(术后 14 d)

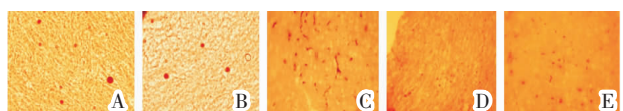


图 6 补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bax 表达的影响(术后 28 d)

3 讨论

缺血性脑血管疾病是目前严重危害人类生命健康的主要疾病之一,其高发病率和致残率使得对该病的研究成为热点。脑组织受损后,构成神经系统结构和功能的基本单位——神经元大量丢失导致脑功能缺失,而定向诱导可促进神经干细胞向神经元分化^[6],且神经干细胞在体外无限增殖,可促使神经受损后神经功能的恢复^[7],是治疗神经系统退行性病变或缺失疾病的有效途径之一。Bcl-2 和 Bax 基因是细胞凋亡过程中重要的调节基因,Bcl-2 和 Bax 可通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡,也可独立地调节细胞凋亡^[8]。

补阳还五汤是治疗缺血性脑损伤的经典方,能够降低患者的致残率,提高生存质量^[9]。本研究团队前期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^[10],可调节脑缺血后 caveolin1、2 的表达^[11],这可能是其促进缺血后神经功能恢复机制之一^[12-13]。

本研究采用导师多年的研究成果补阳还五汤超微饮片进行观察,实验结果表明,补阳还五汤能促进神经功能恢复,脑缺血损伤神经干细胞移植后 Bcl-2 表达上调,Bax 表达下调,其量效关系体现在脑缺血后模型加移植加补阳还五汤超微饮片 1.52 g/kg 对脑缺血后大鼠 Bcl-2、Bax 表达的影响作用优于模型加移植加补阳还五汤传统饮片 4.57 g/kg;提示补阳还五汤超微饮片的临床用药剂量可采用其传统饮片临床等效剂量的 1/3。

参考文献:

[1] 任非非,刘敬霞.中医药调控脑源性神经营养因子保护脑缺血再

灌注损伤的研究进展[J].中华中医药杂志,2014,29(12):3883-3888.

- [2] 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.
- [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(a03):204.
- [5] 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[J].中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):22-25.
- [6] WANG D, ZHANG J. Effects of hypothermia combined with neural stem cell transplantation on recovery of neurological function in rats with spinal cord injury[J]. Mol Med Rep,2015,11(3):1759-1767.
- [7] 刘吉星,侯博儒,杨文桢,等.神经干细胞体外培养鉴定及诱导分化的表型特征[J].中国组织工程研究,2015,19(19):3054-3060.
- [8] DESAGHER S, ASTRID S, NICOLS A, et al. Bid-induced conformational changes of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis[J]. J Cell Biol, 1999,144(5):891-901.
- [9] 许安祥,杨聪慧,陈颖,等.补阳还五汤防治急性缺血性脑卒中早期神经功能恶化的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(12):1418-1421.
- [10] 刘柏炎,蔡光先,林琳,等.补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞影响的初步研究[J].中国临床康复,2004,22(8):4532-4533.
- [11] 刘柏炎,沈剑刚,蔡光先,等.补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑内 caveolin1、2 的影响[J].湖南中医药大学学报,2008,28(1):22-28.
- [12] 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.
- [13] 黄昕,周胜强,刘胜贤,等.补阳还五汤对去势脑缺血雌性大鼠海马神经干细胞增殖及 ERK/CREB 信号通路的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(12):1-6.

(本文编辑 李杰)