

风药、补虚药对脑缺血大鼠淀粉样 β 蛋白及其蛋白前体表达的影响

王海征¹ 张秋霞¹ 赵晖¹ 张弛² 张楠¹ 王雅丽¹ 杨亦龙¹

(1 首都医科大学中医药学院,北京,100069; 2 北京中医药大学期刊中心,北京,100029)

摘要 目的:观察侯氏黑散方中风药、补虚药、风药补虚药联用对脑缺血大鼠淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、 β -淀粉样蛋白(A β)表达的影响。方法:线栓法阻断大鼠大脑中动脉,制备局灶性脑缺血大鼠模型,采用免疫组化与医学图像分析相结合的方法检测侯氏黑散方中风药、补虚药、风药补虚药联用对 APP 及 A β 42 表达的影响。结果:脑缺血 24 h、48 h,模型组大鼠皮层 APP、A β 42 表达较假手术组明显增强($P < 0.01$)。缺血 24 h,补虚药、风药补虚药联用可明显下调 APP 表达,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);缺血 48 h,风药组大鼠皮层 APP 表达较模型组明显降低($P < 0.05$);缺血 48 h,风药补虚药联用可明显降低 A β 42 表达,与模型组相比有统计学意义($P < 0.01$)。结论:风药补虚药联用可明显下调 APP 表达,抑制 A β 42 的异常积聚,降低 A β 42 的毒性,从而发挥抗脑缺血损伤的作用。

关键词 脑缺血;淀粉样前体蛋白; β -淀粉样蛋白;风药;补虚药

Influence of Wind-dispelling Medicine Assisted with Deficiency-nourishing Medicine on the Expression of APP and A β 42 for Cerebral Ischemic in Rats Model

Wang Haizheng¹, Zhang Qiuxia¹, Zhao Hui¹, Zhang Chi², Zhang Nan¹, Wang Yali¹, Yang Yilong¹

(1 Traditional Chinese Medicine College of Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2 Journal Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effects of wind-dispelling medicine, deficiency-nourishing medicine, wind-dispelling medicine assisted with deficiency-nourishing medicine of Houshiheisan on the expression of APP and A β 42 in cerebral ischemic rats. **Methods:** Local cerebral ischemia injured rats was replicated by occlusion of the right middle cerebral artery. The immunohistochemistry and MIPS were used to measure the expressions of APP and A β 42 in the cortex after cerebral ischemia. **Results:** Expressions of APP and A β 42 were significantly increased in model group in comparison with sham group ($P < 0.01$). Twenty-four hours after cerebral ischemic occurred, deficiency-nourishing medicine and combination group reduced expression of APP. There was a significant difference in comparison with model group ($P < 0.05$). Forty-eight hours after cerebral ischemic occurred, wind-dispelling medicine reduced expression of APP. There was a statistically difference in comparison with model group ($P < 0.05$). Forty-eight hours after cerebral ischemic occurred, combination group could reduce expressions of A β 42. There was a significant difference in comparison with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Wind-dispelling medicine assisted with deficiency-nourishing medicine of Houshiheisan can reduce the expression of APP, inhibition aggregation of A β 42, and the cytotoxicity of A β 42, thus resisting the ischemia injure.

Key Words Cerebral ischemia; Amyloid precursor protein; Amyloid protein β ; Wind-dispelling medicine; Deficiency-nourishing medicine

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.08.031

医圣张仲景在《内经》的基础上,提出了中风的病名,认为中风的病机是“内虚邪中”。侯氏黑散是张仲景针对中风“正虚邪中”病机关键而创立的治疗中风“第一方”^[1]。方中以风药(菊花、防风、桂枝、川芎、细辛、桔梗)祛风、搜风、熄风,配伍补虚药(白术、人参、茯苓、当归)益气健脾、补益肝血,充分体现了风药佐助补虚药治疗脑中风的用药特色。《经方发挥》认为“《金匱要略》之侯氏黑散……列为治中风之首方,绝非偶然,而是有其深刻意义。”前期研究表明^[1-6],侯氏黑散可通过调节神经营养因子、控制星形胶质细胞的适度活化,减少炎症反应因子的释放,对脑缺血大鼠神经血管单元有很好的保护作用。为进一步阐释侯氏黑散组方之精妙,本文利用免疫组化方法观察淀粉样前

体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)在缺血大鼠脑组织的表达变化,探讨侯氏黑散方中风药、补虚药及风药补虚药联用对脑缺血大鼠轴突转运及淀粉样沉淀的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 雄性 Sprague-Dawley 大鼠,清洁级,体重 280~300 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(许可证号为 SCXK(京)2012-0001)。饲养于首都医科大学实验动物中心(许可证号为 SYXK(JING)2010-0020)。将动物分为假手术组、模型组、风药组、补虚药组、风药补虚药联用组(简称联用药组)。

1.2 受试药物 侯氏黑散方中主要药物分为风药组、

基金项目:国家自然科学基金(编号:30973782);北京市自然科学基金(编号:7102014);北京市自然科学基金(编号:7122018);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(编号:PXM2011014226)

作者简介:王海征,硕士研究生, Tel:13811835832, E-mail:diary_1120@yahoo.cn

通信作者:赵晖,博士研究生,副教授,硕士生导师, Tel:010-83911635, E-mail:zhaohui8957@sina.com;张秋霞,博士研究生,副教授,硕士生导师, Tel:010-83911640, E-mail:zqx26@163.com

补虚药组。风药由菊花 40 g、防风 10 g、桂枝 3 g、川芎 3 g、细辛 3 g、桔梗 8 g 组成;补虚药由人参 3 g、白术 10 g、茯苓 3 g、干姜 3 g、当归 3 g 组成。(药物剂量依据《金匱要略》侯氏黑散原方的剂量比例确定)。风药补虚药联用组由菊花 40 g、防风 10 g、桂枝 3 g、川芎 3 g、细辛 3 g、桔梗 8 g、生白术 10 g、茯苓 3 g、干姜 3 g、当归 3 g、人参 3 g 组成。中药购自北京同仁堂药店。

1.3 试剂 APP: #1565 - 1, EPITOMICS; A β 42: ab10148, Abcam; 山羊抗兔 IgG - HRP: ANR02 - 1, 欣博盛生物; 苏木素: CW0127, 北京康为世纪生物科技有限公司; DAB, ZLI - 9018, 中杉金桥; 3% H₂O₂, 中杉金桥; 兔超敏二步法检测试剂盒: PV - 9001, 中杉金桥。

1.4 主要仪器 DENVER INSTRUMENT 电子天平: 北京赛多利其仪器系统有限公司; 微波炉 (PTOD20TL - D4): 格兰仕微波炉电器有限公司; 电热鼓风干燥箱: 天津市泰斯特仪器有限公司; MENLAB - U/4C501H 生物信号采集处理系统: 南京美易科技有限公司; 光学显微镜 Nikon Eclipse 80i: 日本; 涡旋振荡器 (VG3S25): IKA 公司; 台式离心机 (94 - 108): Sigma 公司; AR1140 电子天平: 美国 Adrenturer 公司; NIS - Elements Basic Research 图像采集分析系统, 日本; centrifuge 5810R 离心机: 美国 Eppendorf 公司。

2 实验方法

2.1 脑缺血大鼠模型制备 参照文献^[7]制备大鼠中动脉永久性缺血模型。雄性 Sprague - Dawley 大鼠, 麻醉后, 仰卧固定, 结扎颈总动脉近心端和颈外动脉。将预先处理成圆头的尼龙线 (直径 0.265 mm) 置于颈内动脉 18 mm, 阻断大鼠中动脉的血液供应, 扎紧动脉残端, 缝合皮肤。假手术组大鼠麻醉后, 仅暴露颈内外动脉分支, 不闭塞大鼠中动脉。参考 Zea Longa^[8]法于缺血 24 h、48 h 进行神经功能缺损评分。通过神经功能评分判断脑缺血模型的成功与否, 2~3 分为入选动物。

2.2 分组及给药 60 只 SD 雄性大鼠, 用随机数字表方法将实验动物随机分为 5 组, 即假手术组、模型组、风药组、补虚药组, 联用药组, 每组 12 只动物。给药剂量按体表面积折算, 风药组等效剂量为 7.7 g/kg; 补虚药组等效剂量为 2.59 g/kg; 联用药组等效剂量为 10.5 g/kg。各给药组先灌胃给药 3 d, 第 4 d 给药后 20 min 施行手术, 术后 24 h 及 48 h 各组每 6 h 给药 1 次。模型组灌胃等容量生理盐水。

2.3 取材及标本处理 大鼠造模后分别于缺血 24 h、48 h 取材。每组随机取 5 只大鼠, 麻醉后, 生理盐水快速灌流至清澈。继以 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 心内灌注固定, 待充分固定后, 开颅取

脑。冠状位取视交叉向尾端 3~4 mm 组织块, 投入相同固定液于 4 °C 固定 1 周后, 常规石蜡包埋, 切片, 进行免疫组化染色。

2.4 APP、A β 42 检测 采用二步法免疫组织化学染色法进行染色。APP、A β 42 免疫组织化学染色暴露抗原方法: 用 0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液进行微波修复, PBS 冲洗。然后每片滴加一抗 50 μ L (APP 抗体稀释浓度 1:100; A β 42 抗体稀释浓度 1:50), 4 °C 孵育 40 h, 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗。接着每片滴加二抗 I 50 μ L, 37 °C 孵育 0.5 h, PBS 冲洗, 每片滴加二抗 II 50 μ L, 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗。最后 DAB 显色 25 min, 蒸馏水洗涤终止, 苏木素染细胞核 5 min, 显色后脱水、透明、封片。

表 1 风药、补虚药对脑缺血大鼠皮层 APP 表达的影响 (IOD: $\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	24 h	48 h
假手术组	7633.21 \pm 4908.46 **	8962.43 \pm 6059.67 **
模型组	16067.40 \pm 11588.74	25097.16 \pm 13264.01
风药组	12843.80 \pm 5874.36	16542.14 \pm 5403.21 *
补虚药组	10634.40 \pm 3613.26 *	20982.00 \pm 6772.84
联用药组	6528.33 \pm 2705.76 **	24905.17 \pm 15243.36

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 风药、补虚药对脑缺血大鼠皮层 A β 42 表达的影响 (IOD: $\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	24 h	48 h
假手术组	855.00 \pm 761.71 **	794.50 \pm 511.03 **
模型组	13547.69 \pm 7183.60	17395.77 \pm 9104.63
风药组	12829.25 \pm 5865.49	12245.82 \pm 5873.84
补虚药组	11248.00 \pm 7170.08	17295.00 \pm 12773.28
联用药组	12743.56 \pm 9080.78	9743.00 \pm 4618.24 **

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.5 图像分析 在 Olympus 光学显微镜下观察免疫组化染色切片, 在各组动物右侧 (缺血侧) 颞叶皮层选取 5 个视野, LEICA 数字显微照相机采集图像, 利用 NIS - Elements Basic Research 图像采集分析系统分析每个视野下 APP 及 A β 42 阳性表达的积分光密度 (IOD, integrated optical density) 以反映 APP 及 A β 42 免疫染色强度。

2.6 统计学分析 所有数值均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 运用 SPSS11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA) 进行统计学分析, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

APP 表达主要位于神经元核周体及周围的轴突部位。缺血 24 h 后, 缺血侧脑组织 APP 免疫反应明显增强, 棕黄色颗粒增多, 染色加深, 免疫阳性细胞呈丛状聚集。图像分析结果显示, 缺血 24 h、48 h 大鼠颞叶皮

层 APP 表达明显高于假手术组 ($P < 0.01$)；与模型组相比,补虚药、联用药可明显下调缺血 24 h 大鼠颞叶皮层 APP 的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)；缺血 48 h, 风药组大鼠颞叶皮层 APP 表达也明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1, 图 1。

A β 42 阳性表达物为棕褐色颗粒, 分布于神经元细

胞质中, 并可见细胞核皱缩。随着缺血时间延长, A β 42 阳性表达增强。图像分析结果显示, 缺血 24 h、48 h 大鼠颞叶皮层 A β 42 表达较假手术组增强 ($P < 0.01$)；风药补虚药联用可明显下调缺血 48 h 大鼠颞叶皮层 A β 42 表达, 差异较模型组显著 ($P < 0.01$)。见表 2, 图 2。

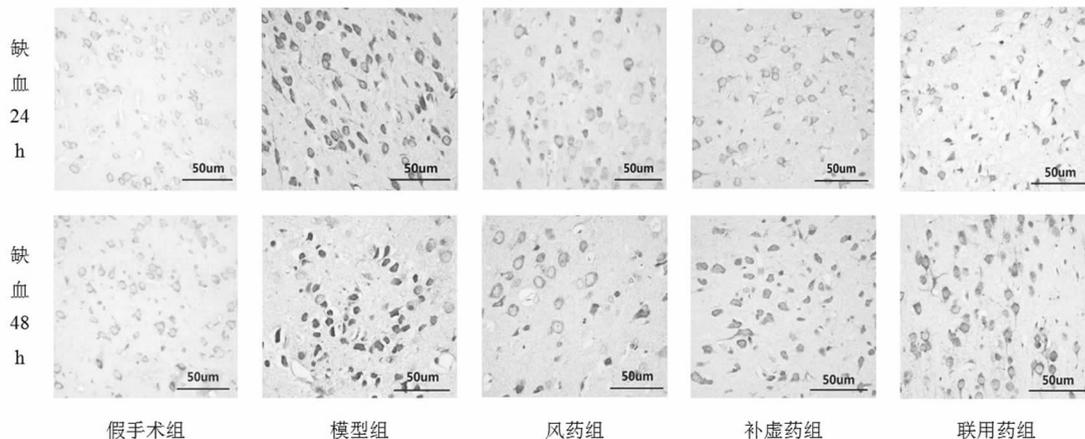


图 1 脑缺血后大鼠皮层 APP 表达的变化 (bar = 50 μ m)

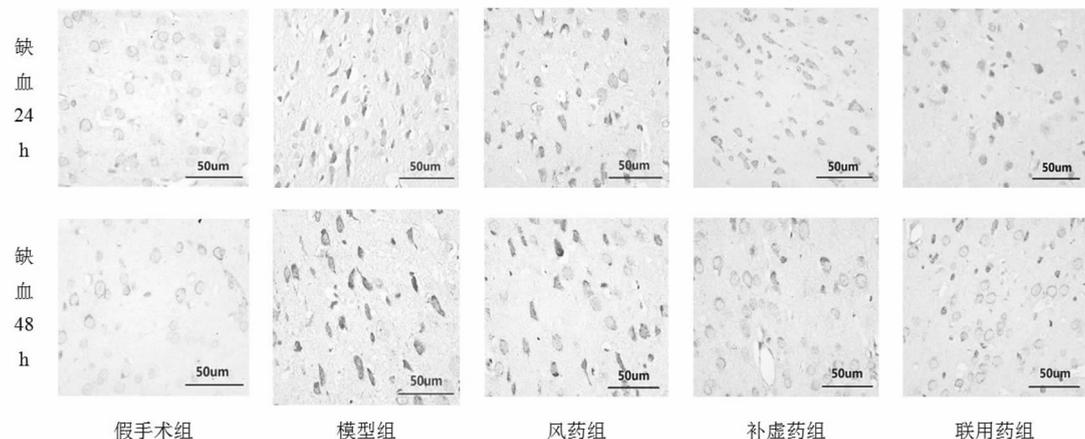


图 2 脑缺血后大鼠皮层 A β 42 表达的变化 (bar = 50 μ m)

4 讨论

淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 为具有受体样结构的跨膜糖蛋白^[9], 通过轴浆快速顺行运输, 具有维护突触膜稳定, 促进细胞黏附、增殖和分化, 抑制丝氨酸蛋白酶活性等作用^[10]。近期研究表明, 淀粉样前体蛋白也参与脑缺血损伤过程^[11-13], 并且是脑缺血的敏感指标之一^[14]。在本实验中我们发现, 局灶性脑缺血 24 h 后, 缺血侧脑组织 APP 生成增多, APP 代谢产物 A β 42 表达明显增高, 随着缺血时间延长, APP、A β 42 表达均成上升趋势。轴突纤维易受到缺氧或缺血性损伤^[15], 相关研究表明, 局灶性脑缺血 2 h 后, 就可见细胞骨架破坏, 有髓纤维快速轴突运输发生障碍^[16]。APP 作为轴突损伤后的一种快速反应性蛋白在轴突微管结构破坏, 细胞骨架崩溃后, 出现

异常聚集^[17], APP 的代谢方式有淀粉样降解途径 (amyloidogenic pathway) 和非淀粉样降解途径 (non-amyloidogenic pathway)。生理状态下, APP 主要经非淀粉样降解途径代谢, 而病理状态下, APP 则以淀粉样降解途径代谢, 产生过量的 A β 42 与 A β 40, 造成 A β 的积聚^[18]。目前研究表明 APP 的过度表达可直接引起神经损害, 促神经细胞凋亡^[19]。但 APP 的神经毒性主要是由 APP 异常裂解产生的 A β 所引起。A β 42 与 A β 40 相比, 延长的两个氨基不仅增加了 A β 的疏水性, 而且使其更容易聚集, 具有较强的神经毒性^[20], 可触及多种毒性机制: 如通过突触体脂质过氧化物作用, 引起自由基生成和氧化应激, 损伤神经元; 并通过扰乱细胞内环境的稳定, 诱导细胞凋亡^[21-22]; 还可直接激活补体系统, 通过补体经典途径和膜攻击复合物介导

产生神经毒性^[23-24]。因而调节 APP 表达,抑制 A β 42 异常聚集,可减轻神经元损伤并减缓神经元退行性变进程。

现代《中药学》以功效分类,将大部分风药归入解表药中,突出了它们发散表邪、解除表证的作用,却淡化了其他一些重要功能,在一定程度上束缚了风药的应用范围。侯氏黑散是仲景治疗缺血性脑中风的处方,方中集合诸药祛风、搜风、熄风:菊花用至四十分,祛风平肝;防风用至十分,助菊花祛风;川芎亦治风,本经谓治“中风入脑头痛”;细辛善治暗风卒倒(《世医得效方》);桂枝祛风更为仲景所推崇。配以白术、人参、茯苓益气健脾,当归补肝血、润肝燥。全方体现了风药佐助补虚药“补不足,损有余”的立法思想。本研究利用经典的脑缺血大鼠模型,探讨侯氏黑散方中风药、补虚药对淀粉样 β 蛋白及其蛋白前体表达的单独效应及联合作用。结果表明,风药、补虚药单独应用虽可不同程度降低 APP 表达,但对 A β 42 的异常积聚没有明显的阻抑作用,补虚药与风药联用可明显下调 APP 表达,抑制 A β 4 的异常积聚,降低 A β 42 的毒性,从而发挥神经元的保护作用。仲景作为中医学理、法、方、药的奠基人,治疗脑中风善用“风药”,所立经方中“风药”妙用者举不胜举。长期的医疗实践证明,风药非独祛风,在调节人体脏腑经络、畅达气血津液等方面有着重要的意义,应用范围相当广泛,尤其在多种配伍中具有独特增效作用^[25-26]。因此深入探讨风药佐助补虚药抗脑血损伤的作用机制,不仅有助于阐释仲景“内虚邪中”脑中风病机理论,还可指导风药在脑卒中临床治疗的合理配伍应用,拓宽中医治疗脑中风的思路。

参考文献

- [1] 张秋霞,赵晖. 侯氏黑散对大鼠大脑中动脉闭塞模型缺血脑组织 Na⁺ - K⁺ - ATP 酶及一氧化氮合酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(7):31-33.
- [2] 赵晖,张秋霞,穆阳. 侯氏黑散对缺血性中风大鼠 NGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(11):43-46.
- [3] 赵晖,张秋霞,穆阳. 侯氏黑散对脑缺血大鼠血液流变学及自由基代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(12):38-40.
- [4] 张秋霞,赵晖. 侯氏黑散对 MCAO 大鼠大脑皮质 TGF- β 1、bFGF 蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医,2007,34(2):238-240.
- [5] 穆阳,赵晖,张秋霞. 侯氏黑散及拆方对 MCAO 大鼠神经病理学的影响[J]. 山东中医药大学学报,2009,33(1):60-62,65.
- [6] Qiuxia Zhang, Hui Zhao, Lei Wang, et al. Effects of wind-dispelling drugs and deficiency-nourishing drugs of houshiheisan compound prescription on astrocyte activation and inflammatory factor expression in the corpus striatum of cerebral ischemia rats [J]. Neural Regeneration Research,2012,7(24):1851-1857.
- [7] 田金洲. 血管性痴呆[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:598-607.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [9] 邢兆宏,张秋霞,赵晖,等. 补阳还五汤与六味地黄丸合方对脑缺血大鼠 APP 蛋白及突触重构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):161-165.
- [10] 王嘉鹏,崔理立,张应玖. 淀粉样前体蛋白(APP)相互作用及其生物学意义[J]. 生命科学,2009,21(2):253-258.
- [11] 欧阳欣,于挺敏. 瑞香对大鼠前脑缺血后 β -APP 表达的影响[J]. 中华脑血管病杂志,2012,6(6):309-312.
- [12] Koike MA, Lin AJ, Pham J, Nguyen E, et al. APP knockout mice experience acute mortality as the result of ischemia[J]. PLoS One,2012,7(8):1-8.
- [13] Koike MA, Garcia FG, Kitarawa M, Green KN, et al. Long term changes in phospho-APP and tau aggregation in the 3xTg-AD mice following cerebral ischemia[J]. Neurosci Lett,2011,495(1):55-59.
- [14] 徐振华,许能贵,符文彬,等. 电针对局灶性脑缺血大鼠缺血区 APP 与 Tau-1 蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(3):361-363.
- [15] 王丽娟,赵玉梅,石学明. 短暂性局灶性脑缺血轴突损伤定量研究方法[J]. 脑与神经疾病杂志,2010,18(3):216-220.
- [16] Dewar D, Yam P, McCulloch J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter[J]. Eur J Pharmacol,1999,375(1-3):41-50.
- [17] Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, et al. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1990,87(4):1561-1565.
- [18] Zhang YW, Thompson R, Zhang H, et al. APP processing in Alzheimer's disease[J]. Mol Brain,2011,4:3.
- [19] Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Octave JN. The processing and biological function of the human amyloid precursor protein (APP): lessons from different cellular models [J]. Exp Gerontol,2000,35(6-7):843-850.
- [20] 官杰,刘剑刚,李浩,等. 还脑益聪方提取物对阿尔茨海默病模型小鼠脑组织 A β 、APP 及相关分泌酶表达的影响[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(3):236-240.
- [21] 白洪涛,尹勇,赵万,等. 弥漫性轴索损伤后早期 β 淀粉样前体蛋白及其炎性因子变化规律研究[J]. 海南医学,2012,23(9):92-94.
- [22] Van Nostrand WE, Davis J, Previti ML, et al. Clearance of amyloid- β protein deposits in transgenic mice following focal cerebral ischemia [J]. Neurodegener Dis,2013,10(1-4):108-111.
- [23] Heurtaux T, Michelucci A, Losciuto S, et al. Microglial activation depends on beta-amyloid conformation: role of the formylpeptide receptor 2 [J]. J Neurochem,2010,114(2):576-586.
- [24] Marchesi VT. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy [J]. FASEB J,2011,25(1):5-13.
- [25] 王丽萍,白雪,杨思进. 祛风药治疗缺血性中风的进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(2):146-148.
- [26] 郑国庆,王艳. 祛风药治血与中风病证治[J]. 中国医药学报,2001,16(1):13-17.