

益气活血药物对脑梗死恢复期大鼠 c-fos 基因表达的影响

王嘉麟 邢佳 贺立娟 朱晓晨 王椿野 王蕊 郑建颖 张迎 李秋祥 崔洪志
秦裕驹 符海燕 高维 郭晓 袁清洁 高东阳 郭凯航 王建伟 王玉来 郭蓉娟
(北京中医药大学东方医院,北京,100078)

摘要 目的:基于 c-fos mRNA 观察益气活血药物对脑梗死恢复期大鼠的影响。方法:以 Longa 的方法略作改良制作大鼠左侧大脑中动脉阻塞模型,按照随机数字表的方法随机分为正常组、模型组、假手术组、益气组、活血组、益气活血组、ERK 抑制剂 7 组,采用 RT-PCR 技术,在治疗 28 d 观察益气活血药物对脑梗死恢复期大鼠梗死皮层 c-fos mRNA 表达的影响。结果:在治疗 28 d 后,模型组较正常组 c-fos mRNA 表达明显下降($P < 0.05$),益气活血组与 ERK 抑制组较模型组有一定程度提高($P < 0.05$),活血组与模型组比较,无明显统计学意义($P > 0.05$),益气组的 c-fos mRNA 表达低于其他各组($P < 0.05$)。结论:在脑梗死恢复期,益气活血药物在一定程度上可改善脑缺血,优于单纯益气与单纯活血,其疗效机制可能与提高 c-fos mRNA 的表达有关。

关键词 脑梗死;c-fos;益气活血

Effect of Supplementing Qi and Activating Blood Circulation Drugs on C-Fos Mrna of Rats with Cerebral Infarction

Wang Jialin, Xing Jia, He Lijuan, Zhu Xiaochen, Wang Chunye, Wang Rui, Zheng Jianying, Zhang Ying, Li Qiuxiang,

Cui Hongzhi, Qin Yuju, Fu Haiyan, Gao Wei, Guo Xiao, Yuan Qingjie, Gao Dongyang, Guo Kaihang,

Wang Jianwei, Wang Yulai, Guo Rongjuan

(Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract Objective: To observe the expression of c-fos mRNA of rats with cerebral infarction in recovery period under supplementing qi and activating blood circulation drugs. **Methods:** Longa method was slightly modified in making the rat model of left middle cerebral artery occlusion. According to the random number table method, the rats were randomly divided into 7 groups, including a normal group, a model group, a sham operation group, a supplementing qi group, an activating blood circulation group, a supplementing qi and activating blood circulation group, and an ERK inhibitor group. Using RT-PCR technique, we observed the effect of supplementing qi and activating blood circulation drugs on c-fos mRNA of rats with cerebral infarction after 28 days' treatment in myocardial infarction cortex. **Results:** After 28 days' treatment, compared with normal group, c-fos mRNA expression in the model group was significantly decreased ($P < 0.05$); c-fos mRNA expression in the supplementing qi and activating blood circulation group and ERK inhibition group increased to a certain extent than that in the model group ($P < 0.05$); the activating blood circulation group had no significant statistical difference with the model group ($P > 0.05$); c-fos mRNA expression in supplementing Qi group was lower than the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** In the recovery period of cerebral infarction, supplementing qi and activating blood circulation drugs can improve cerebral ischemia in a certain degree, which is better than simply supplementing qi and activating blood circulation, and its therapeutic mechanism may be related to improving the expression of c-fos mRNA.

Key Words Cerebral infarction; C-fos; Supplementing qi and activating blood circulation

中图分类号:R256 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.043

脑梗死是一种严重危害人类健康的常见难治性疾病,寻求有效的防治方法一直是脑梗死研究领域

的热点课题。益气活血中药在脑梗死恢复期的治疗中起到重要价值,然而其疗效的分子机制尚不清楚,

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2015CB554401);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20120013120014);北京中医药大学东方医院人才培养计划项目(东方新星)(DFRC2014C01)

作者简介:王嘉麟(1982.04—),男,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合防治脑病基础与临床研究,E-mail:WJL2008420@sina.com,Tel:(010)67689749

通信作者:郭蓉娟(1964.08—),女,医学博士,主任医师,博士研究生导师,北京中医药大学东方医院副院长,研究方向:中西医结合防治脑病基础与临床研究,Tel:(010)67689749,E-mail:dfguorongjuan@163.com

为此设立本研究。通过比较单纯益气及单纯活血药物,于梗死 28 d 观察益气活血药物对脑梗死恢复期大鼠的 c-fos 基因的影响,从分子生物学水平揭示益气活血药物治疗脑梗死恢复期的疗效机制,为益气活血药物治疗脑梗死恢复期的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 42 只,体重(207~238)g,平均(219.84±6.72)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2015-0001。饲养在 SPF 环境下,术前 12 h 禁食,不禁水。

1.1.2 药物 活血药:注射用血栓通(冻干)(三七总皂苷)(广西梧州制药集团股份有限公司,批准文号:国药准字 Z20025652,生产批号:14052406)。益气药:黄芪注射液(正大青春宝药业有限公司,批准文号:国药准字 Z33020179,生产批号:1409051)。益气活血药:注射用血栓通(冻干)+黄芪注射液。ERK 抑制剂:U0126(Sigma)。

1.1.3 试剂与仪器 1)试剂:TRNzol 总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技有限公司)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa 公司)、SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus),ROX plus(TaKaRa 公司)、DL2000 DNA Marker(TaKaRa 公司)、引物合成(Invitrogen)。2)主要仪器:涡旋振荡仪(QL-902)(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、离心机(Centrifuge 5415D)(Eppendorf)、分光光度计(NANODROP 2000)(Thermo scientific)、荧光定量 PCR 仪(ABI7500)(Applied Biosystems)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 1)分组:按照随机数字表法,将大鼠分为 7 组:正常组、假手术组、模型组、ERK 抑制组、单纯活血组、单纯益气组、益气活血组,每组 6 只,由于本研究观察时点较长,部分大鼠因进食困难等因素而死亡,因此,每组实际完成研究的例数为 3 只。2)模型制备方法:以 Longa 的方法略作改良,制作线栓阻塞大鼠左侧大脑中动脉模型,同时按照 Bederson 评分观察术后动物的神经症状和体征^[1]。

1.2.2 给药方法 各组均在脑梗死造模后开始给药。中药各组给予相应中药注射剂腹腔注射,1 次/d,连续给药 28 d,其中活血组给予血栓通注射液 0.45 g/(kg·d)(配比浓度 0.03 g/mL,平均给药 3.3 mL),1 次/d,益气组给予黄芪注射液 60 g/(kg

·d)(配比浓度 2 g/mL,平均给药 6.6 mL),1 次/d,益气活血组给予黄芪注射液联合血栓通注射液,1 次/d,剂量同上 2 组。假手术组与模型组给药时间和途径同中药组,以蒸馏水代替药液。ERK 抑制组:予 ERK 抑制剂 U0126 腹腔注射(0.1 mg/(kg·d),1 次/d)(配比浓度 0.01 mg/mL,平均给药 2.2 mL)。

1.2.3 检测指标与方法 1)检测指标:各组大鼠梗死皮层的 c-fos mRNA 的表达;2)检测方法:RT-PCR 法检测,引物在北京 Invitrogen 公司合成,c-fos 上游引物序列 CCGAAGGGAAAGGAATAAGATG,c-Fos 下游引物序列 GGGCTGCCAAAATAAACTCC,PCR 扩增片段长度大小 173bp;内参 GAPDH 上游引物序列 CCTTCCGTGTTCTACCCC,GAPDH 下游引物序列 GCCCAGGATGCCCTTTACTG,PCR 扩增片段长度大小 131 bp。采用通用方法^[2]提取总 RNA、反转录 cDNA、RT-PCR 扩增及检测。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式:

$$F=2^{[(\text{待测目的基因平均 Ct 值}-\text{待测组管家基因平均 Ct 值})-(\text{对照组目的基因平均 Ct 值}-\text{对照组管家基因平均 Ct 值})]}$$

计算出相对于对照样品,各组目的基因 mRNA 转录水平的差异。

1.3 统计学方法 将获得的实验数据输入 excel 数据库,以均数±标准差来表示,采用 SPSS 20.0 软件作统计分析,计量资料组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,以 $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般情况观察 造模前,各组大鼠健康状况相同;毛色光亮、顺滑;行动、饮食、饮水、排泄均正常。造模后,各组大鼠在苏醒后即刻观察,其中假手术组大鼠一般状况可,毛色光亮,受伤口影响,行动缓慢,进食、饮水、排泄正常。而模型组等其他各组大鼠一般状况较差,形体消瘦,进食量明显减少,毛色黄暗,被毛不顺滑,出现右侧肢体偏瘫、转圈、不能直立,身体向右侧倾倒,或者在原地向右侧转圈、追尾等,评分在 1~3 分,不能自主到食盒内采食,不能自主饮水,需要人为辅助喂食喂水。给药 28 d 后,中药各组、ERK 抑制组大鼠偏瘫症状均好于模型组。

2.2 各组脑梗死恢复期大鼠 c-fos mRNA 表达比较 (RT-PCR 法)以正常组的平均 ΔCt 值 4.445 作为对照样本,治疗 28 d 后,c-fos mRNA 表达趋势:正常组与假手术组>抑制组与益气活血组>模型组与活血

组 > 益气组,即模型组较正常组 c-fos mRNA 表达明显下降($P < 0.05$),益气活血组与 ERK 抑制组较模型组有一定程度提高($P < 0.05$),活血组与模型组比较,无明显统计学意义($P > 0.05$),益气组的 c-fos mRNA 表达低于其他各组,提示益气活血药物在一定程度上可提高 c-fos mRNA 的表达,好于单纯益气及单纯活血,与 ERK 抑制组的疗效大致相当,但仍未恢复至正常。见表 1。

表 1 各组对脑梗死恢复期大鼠 c-fos mRNA 表达的影响比较($n = 3$)	
组别	28 d
正常组	1.00 ± 0.044
假手术组	0.83 ± 0.095
模型组	0.25 ± 0.072
益气组	0.14 ± 0.036
活血组	0.31 ± 0.024
益气活血组	0.41 ± 0.0033
抑制组	0.44 ± 0.054
<i>F</i>	181.2
<i>P</i>	<0.001

3 讨论

脑梗死是严重危害人类健康的重大疾病,许多患者在急性期过后,常常留有肢体瘫痪、言语障碍、吞咽困难、二便失控、生活难以自理等症状,这给患者带来极大的痛苦及悲观情绪,甚至丧失生活信心,针对脑梗死具有较高的致残率和复发率,探讨脑梗死恢复期有效的治法,促进脑梗死患者的康复,提高其生命质量,显得非常重要。脑梗死属于中医“中风病”范畴,病理性质属本虚标实,急性期多以痰、瘀实证的表现为主,而恢复期则多表现为虚(气虚、阴虚)、瘀,益气活血法成为重要治法,王清任创立了中风病气虚血瘀理论,他在《医林改错》中说:“半身不遂,亏损元气,是其本源”“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”,提示脏腑气血的运行均有赖于元气的推动,气无则血无以依附。久病或脏腑衰竭,造成元气虚弱,气虚鼓动无力,不能帅气正常运行于脉中,而变成瘀血。采用益气活血代表方剂——补阳还五汤治疗中风偏瘫,至今仍有很高的立论和临床指导意义,备受后世医家推崇。益气活血法成为脑梗死恢复期的经典治法,大量研究证实其有效性^[3-4]。

益气活血中药治疗脑梗死有确切疗效,但是其疗效机制非常复杂,这与脑梗死病理机制庞杂以及中药本身具有多水平、多通道、多靶点的效应有关。例如,益气活血法可促进脑缺血再灌注大鼠的血管

新生,改善脑循环^[5],参与调节 Notch 通路^[6]及 Wnt 信号通路^[7],其中黄芪注射液^[8]还可使脑缺血再灌注大鼠的神经营养因子表达。丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinases, MAPKs)是细胞内的至关重要的蛋白激酶。研究证实,MAPK 信号转到通路存在于大多数细胞内,将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。MAPK 可分为 3 个主要的亚群,即细胞外信号调节激酶(Extracellular Signal-regulated Kinase, ERK),应激活化蛋白激酶(JNK)和 p38MAPK。其中,ERK1/2 在细胞信号转导通路中起主要作用。ERK1/2 由 2 种同工异构体组成,分别为 ERK1 和 ERK2,两者在体外有相同的作用底物,两者在功能上的重叠。活化的 ERK 形成二聚体,转入细胞核,磷酸化其他转录因子如癌基因 c-fos、c-jun 等而调控基因表达,参与细胞的增殖、存活、分化、凋亡、炎症反应和氧化应激等。c-fos 是 ERK 下游的转录因子之一,正常情况下,在神经元中呈极低水平表达,但其作为细胞核的“第三信使”,通过启动和调控某些具有特殊功能意义的靶基因的表达,对神经元的生长、分化、再生和重塑起着举足轻重的作用。研究发现, c-fos 的表达与脑缺血缺氧后神经元的信息传递、凋亡密切相关。脑缺血缺氧后即快速而短暂的诱导表达。c-fos 的表达参与了脑缺血耐受,是脑缺血耐受的保护机制之一。c-fos 蛋白的积累说明缺血后神经元蛋白质合成能力的快速恢复,并可能在学习记忆过程中起到重要作用^[9-10]。也有学者认为 c-fos 参与脑缺血的损伤^[11-15]。

本研究发现,在治疗 28 d 时,模型组的 c-fos mRNA 表达量较正常组明显下降,而经过益气活血药物治疗后,呈现上升趋势(见表 1),这提示在脑梗死恢复期中,c-fos 本身参与脑缺血的保护作用,这与部分学者^[16]的结果相一致,益气活血药物的疗效机制之一是提高 c-fos mRNA 的表达。

本研究的不足之处,每组样本量较小,需要在今后的实验中扩大样本量进行验证,不妥之处望同行指正。

参考文献

[1]王嘉麟,刘雪梅,邢佳,等.基于火毒病机研究急性脑梗死重症大鼠皮层的核转录因子 κ B、c-fos 蛋白表达及中药干预效应[J].环球中医药,2014,7(1):6-11.

[2]方肇勤.分子生物学技术在中医药研究中的应用[M].2版.上

- 海:上海科学技术出版社,2008,110-112.
- [3]王成太. 益气活血法治疗缺血性脑卒中恢复期患者的临床疗效及对 hs-CRP、Fg、HCY 水平的影响[J]. 实用临床医药杂志,2016,20(3):28-31.
- [4]纪永胜. 益气活血通络汤治疗缺血性脑中风疗效观察[J]. 中医临床研究,2016,8(9):42-43.
- [5]明康文,胡丽竹. 益气活血法对急性脑梗死大鼠侧支循环重建影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(4):17-19.
- [6]徐伟,胡建鹏,王键,等. 益气活血方和补肾益髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Ctnnb1 和 Krt1 基因及其蛋白表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(2):112-115.
- [7]俞丽华,胡建鹏,王键,等. 两种中药复方对局灶性脑缺血再灌注大鼠额顶叶皮层 LRP5 和 β -Catenin 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(4):17-20.
- [8]孙丽,刘英北,王岭,等. 黄芪注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后 BDNF 表达的影响[J]. 世界中医药,2016,11(4):686-689.
- [9]张小乔,梅元武,刘传玉. 经颅磁刺激对脑梗死大鼠皮质 c-Fos 和 BDNF 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2006,28(2):86-89.
- [10]薛占霞,高永山,沈丽霞. 大黄酚对小鼠脑皮层 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的影响及与学习记忆的关系[J]. 药物评价研究,2015,38(4):375-379.
- [11]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.
- [12]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.
- [13]陈衍晨,赵丹,卿娣,等. 缺氧再灌注斑马鱼胚胎脑部细胞凋亡及 c-fos 基因的表达[J]. 中国组织工程研究,2013,17(37):6613-6619.
- [14]毛晓霞,夏爱华,吴晓光,等. 山楂叶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡和 c-fos, c-jun 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):174-177.
- [15]李凯,张平,周杰. 益气活血补肾方对大鼠脑缺血损伤后 c-Fos、c-Jun 表达影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(1):27-29,58.
- [16]颜玲,黄德斌,黄芪多糖对缺血脑损伤大鼠海马神经递质及 c-fos mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(2):263-268.

(2016-09-13 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 2163)

- [14] Royuela M, De Miguel MP, Bethencourt FR, et al. Transforming growth factor beta 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma[J]. Growth Factors, 1998, 16(2):101-110.
- [15] Luo J, Dunn T, Ewing C, et al. Gene expression signature of benign prostatic hyperplasia revealed by cDNA microarray analysis[J]. Prostate, 2002, 51(3):189-200.
- [16] 吴晓阳,徐俊芳. 保列治(非那雄胺)对良性前列腺增生(BPH)患者体内双氢睾酮(DHT)的影响[J]. 世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊,2016,16(6):57-58.
- [17]柳建军,曹军,许志坚,等. 非那雄胺对前列腺增生症术中及术后出血的治疗作用[J]. 中华泌尿外科杂志,2001,22(8):490-492.
- [18]孙自学,陈建设,王德军,等. 前列安对良性前列腺增生症大鼠模型前列腺组织碱性成纤维生长因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):101-104.

(2016-10-10 收稿 责任编辑:杨觉雄)