

“祛风通窍方”对血管性痴呆大鼠海马线粒体 COX 活性及 COX II mRNA 表达的影响

白雪 唐红梅 叶丽莎 杨云芳 张德绸 罗刚

(泸州医学院附属中医医院,四川泸州 646000)

摘要 目的:观察祛风通窍方对血管性痴呆(Vascular dementia,VD)大鼠海马线粒体细胞色素氧化酶(COX)及细胞色素氧化酶 II 亚型(COX II)mRNA 表达的影响,探讨祛风通窍方对 VD 可能的保护机制。方法:大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组和祛风通窍方高、中、低剂量组。除假手术组外,其余各组大鼠采用经典的永久性结扎双侧颈总动脉法制备 VD 模型。假手术组、模型组用等体积蒸馏水灌胃,各给药组予相应药物灌胃,连续 30d。ELISA 法检测海马线粒体 COX 活性;RT-PCR 法检测 COX II mRNA 表达水平。结果:与假手术组比较,其余各组大鼠 COX 活性明显降低,COX II mRNA 表达明显降低;与模型组比较,尼莫地平组和祛风通窍方高、中剂量组 COX 活性明显升高,COX II mRNA 表达明显增加。结论:祛风通窍方对 VD 大鼠线粒体功能具有一定的保护作用,可能与其改善 VD 大鼠线粒体 COX 活性,增加 COX II mRNA 的表达有关。

关键词 血管性痴呆 祛风通窍方 海马线粒体 COX COX II 实验研究

中图分类号 R749.130.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)05-0075-03

血管性痴呆(Vascular dementia,VD)是在各种脑血管疾病基础上,因脑组织慢性缺血、缺氧而导致的以记忆、认知功能障碍为特征的痴呆综合征。本研究采用经典的永久性结扎双侧颈总动脉(2-VO)法造模^[1-3],在前期研究基础上,进一步观察“祛风通窍方”对 VD 大鼠海马组织线粒体细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase,COX)活性及细胞色素 C 氧化酶 II 亚型(cytochrome C oxidase subunit II,COX II)mRNA 表达的影响,探讨“祛风通窍方”对 VD 的可能作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 48 只,普通级,12~24 月龄,体重(350±20)g,由泸州医学院实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:2010-200。

1.2 药物与试剂 “祛风通窍方”由麻黄 10g、葛根 30g、水蛭 5g、地龙 10g、全蝎 5g、灵芝 10g、石菖蒲 20g 组成。购入的中药由泸州医学院附属中医医院制剂室制备成浓缩液,每 1mL 浓缩液相当于原生中药 3g 的含量。尼莫地平片由山西亚宝药业生产。ELISA 试剂盒、RT-PCR 试剂盒、天根 RNA 提取试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。内参 GAPD H 引物(RT-PCR 试剂盒内带):上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3',产物长度 400bp;COX II 引物(上海生工生物技术服务有限公司合成):上游 5'-ACGCCACATCACCAATC-3',下游 5'-GCCAAGTTCACCTAGTT-3',产物长度 371bp。

2 实验方法

2.1 分组与造模 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为假手术

组、模型组、尼莫地平组和祛风通窍方高、中、低剂量组,每组 8 只。VD 模型采用永久性结扎双侧颈总动脉法制备,假手术组只分离双侧颈总动脉但不结扎。造模后 1 月开始给药,给药剂量按照人与动物之间用药剂量换算得到祛风通窍方高、中、低剂量组生药量分别为 26.8、13.4、6.7g/(kg·d);尼莫地平组给予尼莫地平 6.25mg/(kg·d),模型组、假手术组予等体积蒸馏水,各组均连续灌胃 30d。

2.2 指标检测

2.2.1 海马组织线粒体 COX 活性测定 末次给药后,大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉,断头取脑组织,剥离海马,制备海马组织匀浆,4℃、3500r/min 离心 15min,取上清液,4℃、12000r/min 离心 15min 获得线粒体,超声细胞破碎仪破碎线粒体,根据说明书 ABC-ELISA 法试剂盒说明书测定 COX 活性。

2.2.2 RT-PCR 法检测海马组织线粒体 COX II mRNA 表达

运用 RNA 提取试剂盒提取海马组织线粒体的 RNA,进行线粒体 RNA 浓度测定、纯度测定后逆转录合成 cDNA。20μL 反应体系:5xRT Buffer 4μL,dNTP Mixture (each 10mmol/L) 2μL,Super-RI 0.5μL,RT-Enhancer 0.5μL,Random Primer 1μL,Total RNA 11μL,Rever Tra Ace 1μL;反应条件:30℃ 10min—42℃ 35min—99℃ 5min—4℃ 5min,反应结束后得到 cDNA。PCR 反应体系 20μL:RT 反应后原液 2μL,RNase Free H₂O 6μL,序列特异的上游引物(10pmol/μL)1μL,序列特异的下游引物(10pmol/μL)1μL,l2x Taq PCR MasterMix 10μL;PCR 扩增条件:94℃变性 30s,50℃解链

基金项目:四川省教育厅重点项目(11ZA152);泸州市科技局项目(2012-S-38)

30s, 72℃延伸1min, 反应 30 个循环, 最后 72℃延伸 5min。PCR 反应结束后, 取 6μL 产物, 加 6μL 溴酚蓝混匀, 2%琼脂糖凝胶上样, 然后电泳, 当电泳迁至凝胶全长的 2/3 处时终止电泳, 取出凝胶, 将凝胶置于凝胶成像仪内拍照, 用 Quantity one 软件分别计算出各组 COX II-mRNA 和 GAPDH 强度的比值, 检测大鼠海马组织线粒体中 COX II-mRNA 的相对含量。

2.3 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量统计用($\bar{x}\pm s$)描述, 两两比较用 LSD-t 法, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠海马组织线粒体 COX 活性的比较 与假手术组比较, 模型组、尼莫地平组和祛风通窍方高、中、低剂量组大鼠海马组织线粒体 COX 活性明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, 尼莫地平组和祛风通窍方高、中剂量组 COX 活性明显升高($P<0.05$), 祛风通窍方低剂量组 COX 活性无显著性差异; 与尼莫地平组比较, 祛风通窍方高、中剂量组 COX 活性明显增高, 低剂量组 COX 活性明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与祛风通窍方高剂量组比较, 中、低剂量组 COX 活性明显降低($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠海马组织线粒体 COX 活性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	剂量	COX(U/mg prot)
假手术组	8	—	0.5965±0.005#*
模型组	8	—	0.2909±0.0082*
尼莫地平组	8	6.25mg/(kg·d)	0.4220±0.0047#*
祛风通窍方高剂量组	8	26.8g/(kg·d)	0.5397±0.0081***
祛风通窍方中剂量组	8	13.4g/(kg·d)	0.4856±0.0081***
祛风通窍方低剂量组	8	6.7g/(kg·d)	0.2918±0.0074**

注: *与假手术组比较, $P<0.05$; #与模型组比较, $P<0.05$;

★与尼莫地平组比较, $P<0.05$; ◆与祛风通窍方高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠海马组织线粒体内 COX II mRNA 表达情况

与假手术组比较, 模型组、尼莫地平组和祛风通窍方高、中、低剂量组相对灰度值明显偏低($P<0.05$); 与模型组比较, 祛风通窍方高、中剂量组和尼莫地平组相对灰度值均有明显升高($P<0.05$); 与尼莫地平组比较, 祛风通窍方高、中剂量组相对灰度值升高, 低剂量组相对灰度值降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与祛风通窍方高剂量组比较, 中、低剂量组灰度值明显降低($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠海马组织线粒体内 COX II mRNA 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	剂量	相对灰度值
假手术组	8	—	0.5274±0.0365#
模型组	8	—	0.1627±0.0971*
尼莫地平组	8	6.25mg/(kg·d)	0.2341±0.0179#*
祛风通窍方高剂量组	8	26.8g/(kg·d)	0.4091±0.0559***
祛风通窍方中剂量组	8	13.4g/(kg·d)	0.3196±0.0393***
祛风通窍方低剂量组	8	6.7g/(kg·d)	0.1651±0.1013**

注: *与假手术组比较, $P<0.05$; #与模型组比较, $P<0.05$;

★与尼莫地平组比较, $P<0.05$; ◆与祛风通窍方高剂量组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

目前认为 VD 的发生、发展与脑卒中有密切关系, 与脑卒中的其他危险因素也相关, VD 的发病机制认为有氧化应激损伤、兴奋性氨基酸毒性、胆碱能受损、炎症反应、程序性细胞凋亡等。VD 虽是多种因素参与的复杂的慢性的病理过程, 其线粒体(mitochondrion, MIT)氧化损伤起着关键性的作用。COX 存在于 MIT 内膜上, 其参与 MIT 有氧呼吸及能量产生。在脑组织慢性缺血缺氧时, MIT 功能障碍, 生成过多氧自由基(Oxygen free radicals, OFR), 能量生成障碍, MIT 受损, 神经元退化、变性、坏死等, 使得 VD 的病情进一步加重。

COX 存在于线粒体内膜上, 是一种由 nDNA 和 mtDNA 复合的跨膜蛋白, 是呼吸链中电子传递链的关键酶, 转移电子到氧气分子(O_2)并把 O_2 还原为水。COX 与有氧代谢及呼吸密切相关, 其活性不仅受线粒体周围化学环境的影响, 更受遗传物质 COX II 的影响。COX 在参与有氧代谢时将线粒体氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation, OXPHOS)过程中的能量转变为三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP), 为神经细胞提供能量。当大脑长期慢性缺血缺氧后, 脑组织内 OFR 生成增多, 线粒体成为 OFR 攻击的靶点, 线粒体功能受损, 由 mtDNA 编码的 COX II 表达受到抑制^[7], 进而使得 COX 活性下降, 线粒体的 OXPHOS 过程发生障碍, ATP 产生也发生障碍, 神经元细胞受损, 发生迟发性的变性、坏死等, 进而影响学习、记忆功能。当 COX 活性下降后, O_2 不能被还原, 生成过多的 OFR, 使得线粒体编码基因发生紊乱, 线粒体编码的亚型基因 COX II 表达受到抑制, 形成恶性循环, 最终线粒体形态及功能受损。实验研究发现, 缺血缺氧时, OFR 的增加对膜脂、蛋白质、DNA 及其他大分子物质造成损伤, 抑制 COX II 的转录和翻译, 使 COX II 表达下降^[8]。

VD 的防治多为危险因素的干预, 治疗原发性脑血管病; 当出现认知功能障碍时, 常给予药物改善。常用的有胆碱酯酶抑制剂、改善脑循环的药物、促进脑细胞代谢的药物、神经生长因子、自由基清除剂、高压氧治疗等。其中改善微循环药中非二氢吡啶类 Ca^{2+} 拮抗剂尼莫地平是迄今选择性扩张脑血管最强的 Ca^{2+} 通道阻滞剂, 易透过血脑屏障, 临床广泛用于 VD 的治疗^[4-6]。

本研究发现, 模型组 COX 的活性及 COX II 的 mRNA 表达下降, 尼莫地平组和祛风通窍方高、中剂量组 COX 活性、COX II mRNA 表达较模型组明显升高; 与尼莫地平组比较, 祛风通窍方高、中剂量组 COX 活性、COX II mRNA 表达明显升高。

本研究基于文献提出五脏六腑皆有玄府, 脑亦不例外, 认为脑之玄府不通乃为 VD 发病根本^[9-10]。治疗原则为“开通玄府, 滋补促智”。因“高巅之上, 唯风药易到”, 故组方中重用风药, 配伍滋补药、虫类药。祛风通窍方中麻黄、葛根为君, 通玄府, 散精气; 水蛭、地龙、全蝎“血肉有情”之品为臣, 可搜风通络, 通玄府; 佐灵芝益气扶正, 滋补五脏; 石菖蒲为使, 开窍宁神, 取其清轻流动之性, 引药直达脑窍。诸药合用, 共奏祛风通窍、活血化瘀、滋补促智的功效。现代药理研究发现, 麻黄对自氧化有较强的抑制作用, 能清除氧自由

抵当芪桂汤对糖尿病大鼠血清 TGF- β 1 及胰岛组织超微结构的影响

杨景锋¹ 任艳芸² 冷伟¹ 赵天才¹ 夏米娜¹

(1.陕西中医学院,陕西咸阳 712046; 2.陕西中医学院附属医院,陕西咸阳 712000)

摘要 目的:观察抵当芪桂汤对 STZ 诱导糖尿病大鼠血清 TGF- β 1 含量及胰岛组织超微结构变化的影响,探讨抵当芪桂汤防治糖尿病大鼠胰岛 β 细胞功能减退的机理。方法:80 只成年雌性 SD 大鼠随机抽取 10 只为空白组,其余 70 只大鼠,禁食不禁水 12h 后予 STZ 60mg/kg 一次性腹腔注射建模。选取 50 只成模大鼠随机分为模型组、西药组、中药常量组、中药大剂量组、中西药组,分别给予相应药物干预。给药 8 周末,检测各组大鼠血清 TGF- β 1 含量,观察胰岛组织超微结构变化。结果:与模型组比较,各给药组大鼠空腹血糖均明显降低,中西药组空腹血糖最低;各给药组大鼠血清 TGF- β 1 含量均降低,中药常量组血清 TGF- β 1 含量最低;胰岛组织超微结构的改善以西药组及中药常量组最为明显。结论:抵当芪桂汤可能通过降低糖尿病大鼠血清 TGF- β 1 含量,调节胰岛 β 细胞功能,防止胰岛组织纤维化,从而改善胰岛功能状态,达到防治糖尿病的目的。

关键词 糖尿病 抵当芪桂汤 转化生长因子 病理学 实验研究

中图分类号 R587.105 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)05-0077-03

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是由于胰岛 β 细胞分泌胰岛素缺陷及(或)其生物学作用障碍引起的以高血糖为特征的内分泌代谢性疾病。胰岛 β 细胞功能减退是 2 型糖尿病主要的发病机制之一,故其功能状态是反应糖尿病发病及病情变化的一个重要指标。研究发现,持续高糖的内环境引发

患者体内发生一系列病理生理变化,导致胰岛组织慢性纤维化^[1],使胰岛 β 细胞功能逐渐下降。本实验通过观察抵当芪桂汤对 STZ 诱导的糖尿病大鼠血清转化生长因子(TGF- β 1)含量及胰岛组织超微结构变化的影响,探讨中药制剂抵当芪桂汤防治糖尿病大鼠胰岛 β 细胞功能减退的机理。

基金项目:陕西省教育厅专项科研项目(11JK0675);陕西省重点学科资助项目

基,起到抗氧化作用;葛根具有清除氧自由基抗脂质过氧化、抗血小板聚集、抗肿瘤等多种作用;水蛭可降低脑细胞的凋亡,减少神经元的不可逆损伤;地龙具有抗血栓、增强免疫、抗氧化等作用;全蝎抗血栓、抗氧化;灵芝抗氧化,提高记忆力;石菖蒲清除氧自由基,抑制神经元凋亡。本实验说明祛风通窍方在一定程度上减弱了 OFR 对线粒体编码的 COX II 基因表达的影响,使 COX 活性改善,发挥抗氧化的作用,从而对线粒体起着保护功能,此作用存在一定的量效关系。

5 参考文献

- [1] 时文远,王正君,张海燕.2-VO 法建立大鼠空间学习记忆障碍模型的探讨.中国中医急症,2009,18(12):2032
- [2] 张岗,王发渭.血管性痴呆的基础实验研究进展.军医进修学院学报,2010,31(7):734
- [3] 田先翔,梅琼彬,杨伟峰.大鼠血管性痴呆模型的制作.湖北中医学院学报,2007,9(1):19
- [4] 陈小燕.尼莫地平对血管性痴呆认知功能的影响.海峡医学,2009,21(5):168
- [5] 林绍敏,吴静,王梅平.尼莫地平用于治疗血管性痴呆的疗效观

察.海峡医学,2009,21(10):101

- [6] 尹燕霞.尼莫地平辅助治疗血管性痴呆的临床疗效分析.临床研究,2011,9(6):248
- [7] 李梨,周岐新,石京山,等.脑缺血再灌注对小鼠脑细胞色素 C 氧化酶亚基 II mRNA 表达的影响及淫羊藿苷的作用.第三军医大学学报,2006,7(28):685
- [8] 柏干荣,陆松敏,李萍,等.三七皂苷 Rg1 对失血性休克大鼠肠上皮细胞线粒体损伤保护作用的研究.中国药理学杂志,2003,9(38):665
- [9] 常富业,王永炎,高颖.玄府概念诠释(六)——玄府为神机运转之道路门户.北京中医药大学学报,2005,28(5):12
- [10] 白雪.王明杰教授治疗中风的临床经验.中国中医急症,2005,14(11):1083

第一作者:白雪(1972-),女,医学硕士,主任中医师,研究方向:中西医结合脑病的基础与临床研究。bx7246@163.com

收稿日期:2014-01-20

编辑:吴宁