

小续命汤对急性脑缺血再灌注线粒体相关蛋白 Hsp60、Mitofilin 表达的影响

兰瑞¹, 张勇², 马云枝¹, 吴涛¹, 郑海忠³, 古春青¹, 李亚娜¹, 武继涛¹

1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450004

2. 郑州大学第三附属医院, 河南 郑州 450052

3. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008

[摘要] 目的: 观察小续命汤对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及对线粒体相关蛋白表达的影响。方法: 60 只雄性 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、小续命汤组、环孢素 A 组、溶媒组 5 组, 每组 12 只。采用大脑中动脉线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型, 观察各组大鼠的一般情况、神经功能缺损, 采用 Nissl 染色观察神经细胞损伤, Western blot 和免疫组织化学法检测脑缺血再灌注后缺血半暗带皮层线粒体热休克蛋白 60 (Heat shock protein 60, Hsp60) 和 mitofilin 蛋白的表达。结果: 与假手术组比较, 模型组出现明显神经功能缺损, 细胞发生缺血再灌注损伤, 缺血半暗带皮层 Hsp60、mitofilin 蛋白的表达上调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 小续命汤组、环孢素 A 组可显著改善大鼠神经功能缺损评分, 减轻神经细胞的缺血再灌注损伤, 并显著上调脑缺血半暗带皮层 Hsp60、mitofilin 蛋白的表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 小续命汤可改善大鼠神经功能缺损评分, 减轻神经细胞的缺血再灌注损伤, 上调脑缺血半暗带皮层 Hsp60、Mitofilin 蛋白的表达, 从而发挥脑保护的作用。

[关键词] 急性脑缺血再灌注损伤; 小续命汤; 热休克蛋白 60 (Hsp60); Mitofilin 蛋白; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 10-0009-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.10.003

Xiaoxuming Tang Has Effect on Expression of Mitochondria-related Protein Hsp60 and Mitofilin in Acute Cerebral Ischemia-reperfusion

LAN Rui, ZHANG Yong, MA Yunzhi, WU Tao, ZHENG Haizhong,
GU Chunqing, LI Yana, WU Jitao

Abstract: Objective: To observe the neuroprotective effect of Xiaoxuming tang on rats with acute cerebral ischemia-reperfusion injury and its effect on the expression of mitochondria-related protein. **Methods:** Divided 60 male SD rats in SPF grade into 5 groups randomly including the sham operation group, the model group, the Xiaoxuming tang group, the cyclosporine group A and the solvent group, 12 rats in each group. Established the model of cerebral ischemia-reperfusion injury by using the method of suture embolization in middle cerebral artery, and observed the general condition and neurologic impairment(NIHSS) of rats in each group. Observed the injury of nerve cells via Nissl staining, and detected the expression of heat shock protein 60 (Hsp60) and mitofilin protein in mitochondria of ischemic penumbra cortex after cerebral ischemia-reperfusion via Western blot and immunohistochemistry. **Results:** Comparing with the sham operation group, the model group appeared evident neurologic impairment and ischemia-reperfusion injury in cells, which also induced the up-regulation of the expression of Hsp60 and mitofilin protein in ischemic penumbra cortex ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the scores of NIHSS were improved, ischemia-reperfusion injury of nerve cells was alleviated, and the expression of Hsp60 and mitofilin protein in ischemic penumbra cortex was up-regulated in the Xiaoxuming tang group and the cyclosporine group A, difference being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xiaoxuming tang can improve the scores of NIHSS in rats, alleviate ischemia-reperfusion injury of nerve cells and up-regulate the expression of Hsp60 and mitofilin protein in ischemic penumbra cortex, thus to take effect in cerebral protection.

[收稿日期] 2018-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81503422)

[作者简介] 兰瑞 (1984-), 女, 主治医师, 研究方向: 中西医结合神经病学。

[通信作者] 武继涛, E-mail: wujitao1345@126.com。

Keywords: Acute cerebral ischemia-reperfusion injury; Xiaoxuming tang; Heat shock protein 60 (Hsp60); Mitofilin protein; Animal experiment; Rats

脑卒中是一组突然起病,以局灶性神经功能缺失为特征的急性脑血管病,好发于中年人,是威胁人类生命和致残的重要因素之一,缺血性脑卒中约占脑卒中的 60%~80%^[1-2]。因其高致残率、高病死率,一直是研究热点。中医学为中风的诊疗积累了丰富的治疗经验。小续命汤来源于唐代名医孙思邈的《备急千金要方》,临床应用治疗中风效果显著^[3-5],本课题组在前期研究的基础上,建立脑缺血再灌注损伤大鼠模型,观察小续命汤对急性脑缺血再灌注损伤后皮层缺血半暗带线粒体相关蛋白的表达,以期小续命汤的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 250~280 g,购自河南省实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(豫)2017-0001。

1.2 小续命汤药物制备 中药材统一采购于河南中医药大学第一附属医院门诊中药房。小续命汤中麻黄、桂枝、芍药、川芎、黄芩、杏仁、附子、甘草、人参、防己、防风、生姜以 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1.5:5 的比例配药,将中药材水浸 1 h 后,用 10 倍体积水煎 1 h,滤取上清,再加 10 倍体积水煎 1 h,重复 3 次。合并 3 次所得药汁并浓缩至 100% 浓度,冷却后加入无水乙醇使其达到总体积的 75%,磁力搅拌过夜,25 000 × g 离心 20 min 后取上清。药渣收集后用 75% 乙醇浸泡,过滤后收集上清,与离心所得的上清合并,恒温蒸发尽酒精,用蒸馏水调药物浓度至 1 g/mL^[6-8]。

1.3 主要试剂及仪器 兔抗 Hsp60 抗体购自 Cell Signal Signal 公司,货号 12165S,兔抗 Mitofilin 抗体购自 Abcam 公司,货号 ab48139,羊抗兔 IgG 二抗购自杭州华安生物技术有限公司,货号 HA1001。环孢素 A、通用 SP 检测试剂盒购自 Solarbio,货号分别为 SC5120、SP0041。凝胶配置试剂盒、ECL 显色试剂盒购自西安晶彩生物科技有限公司,货号分别为 JC-PE022,JC-PC001。电子天平(启东友铭衡量有限公司),系列磁力搅拌器(河南爱博科技发展有限公司),SSW 型电热恒温水箱(上海博迅实业有限公司)。电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪、PVDF 膜均购自 BIO-RAD,优普系列超纯水仪器(成都超纯科技有限公司),光学显微镜(日本尼康公司)。

1.4 模型的制作 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,常规皮肤消毒后,沿颈部中线偏左侧皮肤剪开,钝性分离肌肉,将颈外动脉远端结扎,近心端结扎备用后,结扎颈总动脉远心端,确保动脉夹完全夹闭颈内动脉,沿着颈外动脉远端结扎处剪断一 V 型小口,将 1 根 3.0 mm 尼龙丝线插入动脉后,沿小口彻底剪断颈外动脉。将颈外动脉残端沿着颈内动脉拉直,缓慢推进丝线至有阻力停止,离颈总动脉分叉处约 19.5 mm 结扎备线。动脉阻塞 90 min 后缓慢轻柔拉出丝线实现

再灌注。假手术组步骤同上,仅进行动脉分离但不插入丝线。待大鼠苏醒后评估神经功能缺损,出现神经功能缺损症状视为模型制作成功。

1.5 动物分组及给药 本课题组前期研究发现小续命汤 60 g/(kg·d) 为治疗急性脑缺血再灌注损伤的最优剂量^[6]。本研究将 60 只实验动物随机分为假手术(Sham)组,模型(IR)组,小续命汤(XXMD60)组,环孢素 A(CsA)组和溶媒(Vehicle)组。用乙醇溶解阳性药环孢素 A,按照配制环孢素 A 的剂量比配制相应的溶剂。XXMD60 组给予相应剂量的小续命汤,Sham 组、IR 组给予相应剂量的双蒸水,CsA 组以 10 mg/(kg·d) 的 CsA 腹腔注射。Vehicle 组每天以相应剂量的溶剂腹腔注射,持续至处死大鼠。所有的给药均在实验前 3 天开始连续进行灌胃直到研究设定的观察时间点。

1.6 观察指标

1.6.1 观察一般情况 研究期间观察并记录实验大鼠的毛色、活动、进食饮水,称量体质量。

1.6.2 测定神经行为学 依据 Longa EZ 等^[9]介绍的方法,进行神经功能缺损的评估。0 分:无神经功能缺损;1 分:病灶对侧前爪不能完全伸展;2 分:向病灶对侧自发性旋转;3 分:向病灶对侧倾倒;4 分:无自发性行走且出现意识丧失。

1.6.3 Nissl 染色观察细胞缺血损伤 脑缺血再灌注 24 h 后,实验大鼠深度麻醉后,经心脏灌注生理盐水 200 mL 待右心耳流出液体清亮后,换 4% 多聚甲醛溶液匀速灌注 300 mL。取出脑组织放置于 4% 多聚甲醛溶液后固定 24 h,经梯度脱水,石蜡包埋,切片。脑组织石蜡切片 58℃ 烤片 2 h。经脱腊、水化后,将切片放入 1% 甲苯胺蓝染色液中,50℃ 染色 30 min。PBS 洗 3 次,各 5 min。经脱水后中性树脂封片,自然晾干。光学显微镜下观察缺血皮层半暗带区观察缺血性损害,并拍片。

1.6.4 Western blot 检测 Hsp60、mitofilin 蛋白的表达 取新鲜脑缺血半暗带皮层组织 100 mg,剪碎放入 1.5 mL 离心管中,将 1 mL RIPA 加入离心管,放置快速研磨仪中研磨 4 min 后,冰上静置 15 min,将蛋白溶液置于 4℃ 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液。应用 BCA 法进行蛋白浓度检测。用 10%~12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,蛋白分离后转移至 PVDF 膜。将 PVDF 膜放于封闭液,室温摇床上 2 h,用 5% BSA 溶液将一抗稀释成合适的浓度后滴加至 PVDF 膜,4℃ 摇床上孵育过夜;次日 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;将 HRP 标记的二抗用 5% BSA 溶液稀释为 1:2 000 滴加至 PVDF 膜,室温摇床上孵育 2 h;TBST 洗涤后用 ECL 化学发光试剂盒在凝胶成像分析系统显影,分析条带灰度值。

1.6.5 免疫组织化学染色检测 Hsp60、mitofilin 蛋白的定位表

达 经烤片、脱腊、水化后,将片子插入柠檬酸修复溶液放置于微波炉进行修复抗原。PBS 洗片,3% H_2O_2 溶液滴加至切片上室温处理 20 min。PBS 洗片后,5% BSA 封闭液滴加至组织上,室温封闭 60 min。滴加相应稀释浓度的一抗 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加合适稀释浓度的 HRP 标记抗兔二抗 37℃ 孵育 1 h。PBS 洗 3 次,每次 5 min。按照试剂盒说明书配制 DAB 显色试剂,混匀后滴加至切片,显微镜下观察显色情况,自来水洗 15 min。苏木素复染 5 min 后,自来水洗 15 min。1% 盐酸酒精迅速分化。梯度脱水后,中性树胶封片,自然晾干。光学显微镜下观察缺血皮层半暗带阳性细胞并拍摄照片。

1.7 统计学方法 用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。统计学差异由单因素方差分析进行检验,方差齐性检验后用 t 检验和 post hoc Fisher's 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及神经功能缺损评分比较 见表 1。造模前各组大鼠体重、一般情况无差异。造模后,与 Sham 组比较,IR 组大鼠毛发黄暗,活动能力显著下降,进食饮水困难,体重均显著下降($P < 0.05$),均表现出明显的神经功能缺损($P < 0.05$);与 IR 组比较,Vehicle 组无显著性差异;

XXMD60 组、CsA 组大鼠毛发发黄,活动能力受限,进食饮水较正常,反应较迅速,神经功能缺损评分显著下降($P < 0.05$),体重明显上升($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠造模前后体重及神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模前体重(g)	造模后体重(g)	神经功能缺损评分(分)
Sham 组	5	282.12 ± 35.21	308.45 ± 32.32	0
IR 组	5	285.27 ± 31.18	261.28 ± 33.54 ^①	2.83 ± 0.16 ^①
XXMD60 组	5	283.19 ± 30.53	278.43 ± 34.22 ^②	1.78 ± 0.21 ^②
CsA 组	5	279.25 ± 38.44	281.38 ± 42.19 ^②	1.62 ± 0.26 ^②
Vehicle 组	5	284.36 ± 19.26	268.36 ± 35.63	2.75 ± 0.19

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞结果比较 见图 1、图 2。Nissl 染色结果显示,Sham 组皮层神经元形态结构完整,数量多,排列有序,细胞形态清晰饱满,细胞核圆。IR 组、Vehicle 组则见缺血区大片淡染,缺血再灌注半暗带区神经细胞排列杂乱,细胞质体积小,严重呈空泡样变,细胞核呈皱缩深染色。XXMD60 组、CsA 组细胞排列较整齐,细胞形态较正常,细胞层数略少,细胞质较饱满,与 IR 组比较损伤明显减轻。

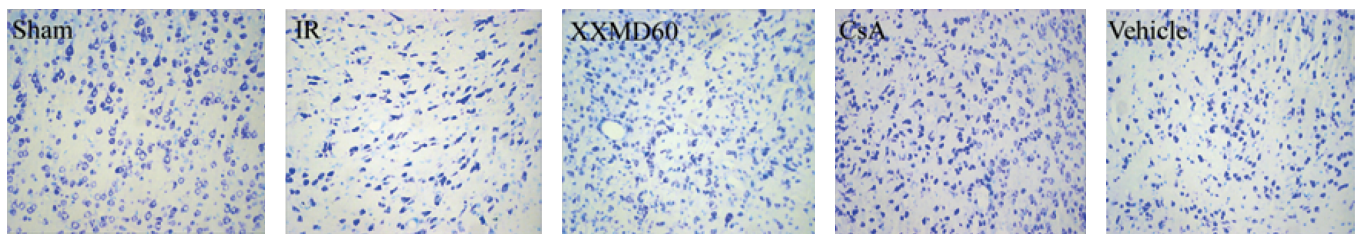
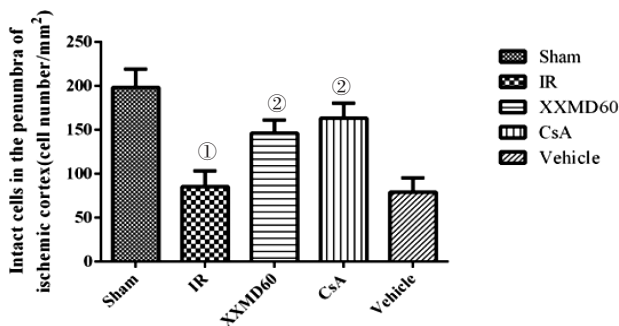


图 1 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞损伤结果 (×200)



与 Sham 组比较,① $P < 0.05$;与 IR 组比较,② $P < 0.05$

图 2 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带完整细胞数

2.3 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞 Hsp60、mitofilin 的表达和分布结果比较 见表 2,图 3~5。免疫组织化学染色结果显示,Sham 组 Hsp60、mitofilin 的阳性细胞数较少。与 Sham 组比较,IR 组、Vehicle 组可见神经细胞呈缺血再灌注损伤表现,细胞皱缩,空泡改变,阳性细胞呈褐色,主要表达在

胞浆,大脑皮层缺血半暗带神经细胞 Hsp60、mitofilin 的表达明显升高($P < 0.05$)。与 IR 组比较,XXMD60 组、CsA 组大鼠大脑皮层缺血半暗带区神经细胞缺血再灌注损伤较轻,细胞形态较为正常,两种蛋白阳性细胞数较 IR 组显著升高($P < 0.05$)。

图 4~5 结果显示,Sham 组 Hsp60、mitofilin 两种蛋白的表达均较低,与 Sham 组比较,IR 组、Vehicle 组上述 2 种蛋白的表达均显著上调($P < 0.05$);与 IR 组比较,XXMD60 组、CsA 组上述两种蛋白表达均显著上调($P < 0.05$)。

3 讨论

脑缺血再灌注属于中医学中风范畴,中医理论认为中风多由风、火、痰、瘀等引起,导致脏腑阴阳失调、气血逆乱、直冲犯脑或脑脉闭阻而发病。临床上中风辨证分为中经络或中脏腑。中经络当祛邪活络为要,中脏腑则醒神开窍为先。中经络者发病特点为正气亏虚,气血不和,脉络空虚,风邪乘虚入中经络,气血痹阻,肌肤筋脉失于濡养,症见神志不清,半身不遂,肢麻胀痛,言语不利等症状,故以祛风活络为主。小续命

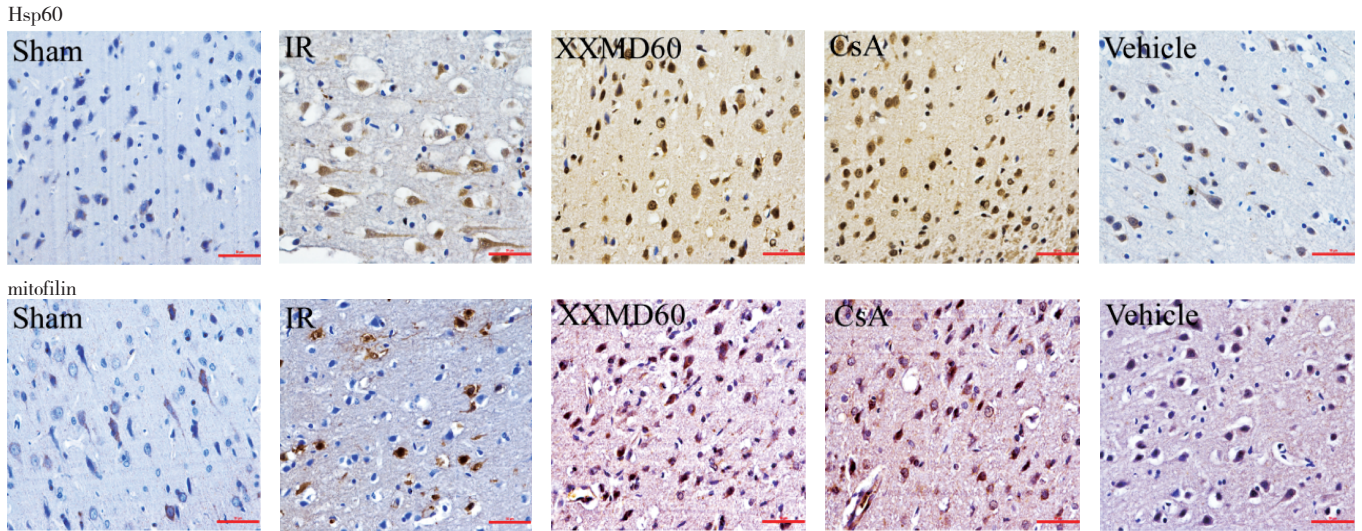


图3 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞 Hsp60、mitofillin 表达结果 (×200)

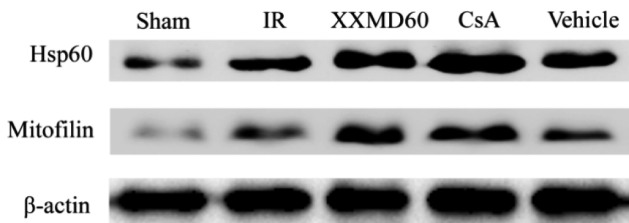


图4 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞 Hsp60、Mitofillin 蛋白表达情况

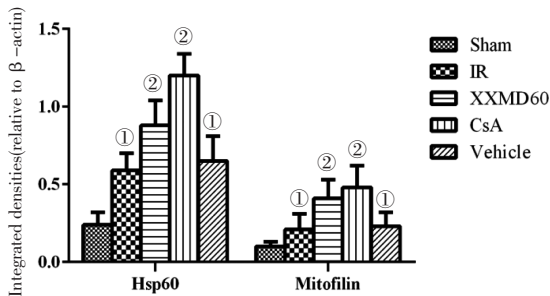
与 Sham 组比较, ① $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ② $P < 0.05$

图5 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞 Hsp60、Mitofillin 蛋白定量表达

表2 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带神经细胞

Hsp60, mitofillin 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)				个
组别	n	Hsp60 阳性细胞数	mitofillin 阳性细胞数	
Sham 组	4	5.23 ± 1.98	4.23 ± 2.18	
IR 组	4	32.16 ± 3.52 ^①	28.35 ± 4.26 ^①	
XXMD60 组	4	56.27 ± 4.34 ^②	49.27 ± 3.24 ^②	
CsA 组	4	59.35 ± 3.32 ^②	52.46 ± 3.48 ^②	
Vehicle 组	4	33.23 ± 4.15 ^①	27.16 ± 3.55 ^①	

与 Sham 组比较, ① $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ② $P < 0.05$

汤首载于唐代名医孙思邈的《备急千金要方》,具有祛风通络,活血化瘀之功效。临床治疗中风辩证治疗中风患者收效良好,可减轻患者的神经功能缺损,改善生活质量^[3-5]。本研究结果显示,小续命汤可显著降低脑缺血再灌注损伤大鼠神经能缺损评分,明显减轻神经细胞缺血性损伤及脑梗死体积形成,提示小续命汤对脑缺血再灌注损伤有神经保护作用。

脑缺血再灌注损伤根据血供减少的程度分为核心区和缺血半暗带,后者为挽救的关键部位。线粒体是极其关键的细胞器,为能量代谢、ATP 生成、氧化磷酸化的重要场所,负责线粒体 DNA 复制、转录,线粒体蛋白翻译,钙存储、生产和清除氧化产物,隔离促凋亡蛋白维持细胞存活^[10]。脑缺血再灌注可导致线粒体通透性转换孔开放,进而触发 ATP 过度消耗细胞坏死、凋亡等一系列的事件^[11]。文献报道环孢素 A 可抑制线粒体通透性转换孔开放,减少线粒体损伤进而发挥神经保护作用^[12-13],本研究设立环孢素 A 组作为阳性对照,关注缺血半暗带区线粒体蛋白,进一步探讨小续命汤对缺血半暗带区 Hsp60、Mitofillin 表达的影响。

Hsp60 是一种重要的分子伴侣,主要存在真核细胞线粒体基质中。研究发现 Hsp60 基因由线粒体中未折叠蛋白质的累积选择性诱导,诱导 Hsp60 表达可减少神经元的缺血性损伤^[14-15]。本研究结果与报道一致,脑缺血可导致 Hsp60 的表达升高^[15-16],与模型组比较,小续命汤、环孢素 A 能显著上调缺血半暗带 Hsp60 的表达,进而可能发挥神经保护作用。

Mitofillin 是线粒体重要的内膜嵴形态维持蛋白,参与线粒体多项功能的调控,下调 Mitofillin 的表达影响线粒体功能,使得其受损,表现为可诱导细胞凋亡的发生,导致线粒体内膜结构紊乱,改变线粒体网格结构,降低线粒体呼吸链复合体 V 活性,减少活性线粒体数量及细胞 ATP 产量等^[17]。还有研究者发现 Mitofillin 还与聚合酶 I 相互作用,促进 PARP-1 向线粒体

定位, 该蛋白的缺失会导致线粒体 DNA 损伤积累^[18]。Mitofilin 蛋白在脑缺血再灌注这一应激创伤后表达上调, 而小续命汤与环孢素 A 治疗显著上调该蛋白的表达, 从而可能抑制细胞凋亡发生。

综上, 小续命汤干预诱导 Hsp60、Mitofilin 蛋白上调表达, 保护神经细胞损伤, 可能为小续命汤治疗脑缺血再灌注损伤的作用靶点。

[参考文献]

- [1] Mathers CD, Boerma T, Ma FD. Global and regional causes of death[J]. Br Med Bull, 2009, 92(1): 7-32.
- [2] Stinear C. Prediction of recovery of motor function after stroke[J]. Lancet Neurol, 2010, 9(12): 1228-1232.
- [3] 李泽钊, 洪震, 芮汉臣, 等. 小续命汤辅助治疗大面积急性脑梗死的疗效观察[J]. 中国中医急症, 2017, 26(4): 679-681.
- [4] 周叶, 陆征宇, 赵虹. 小续命汤治疗风痰瘀阻型急性缺血性中风的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(13): 1483-1486.
- [5] 赵红宁. 小续命汤加减治疗风痰上扰型脑梗死 60 例[J]. 中医临床研究, 2012, 4(3): 93-94.
- [6] Lan R, Xiang J, Wang GH, et al. Xiao-Xu-Ming decoction protects against blood-Brain barrier disruption and neurological injury induced by cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 629782.
- [7] Lan R, Xiang J, Zhang Y, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neurovascular unit protection of Xiao-Xu-Ming decoction against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 459467.
- [8] Lan R, Zhang Y, Xiang J, et al. Xiao-Xu-Ming decoction preserves mitochondrial integrity and reduces apoptosis after focal cerebral ischemia and reperfusion via the mitochondrial p53 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 307-316.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] Redmann M, Dodson M, Boyer-Guittaut M, et al. Mitophagy mechanisms and role in human diseases[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 53: 127-133.
- [11] Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore?[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(6): 821-831.
- [12] Friberg H, Connern C, Halestrap AP, et al. Differences in the activation of the mitochondrial permeability transition among brain regions in the rat correlate with selective vulnerability[J]. J Neurochem, 1999, 72(6): 2488-2497.
- [13] Muramatsu Y, Furuichi Y, Tojo N, et al. Neuroprotective efficacy of FR901459, a novel derivative of cyclosporin A, in in vitro mitochondrial damage and in vivo transient cerebral ischemia models[J]. Brain Res, 2007, 1149: 181-190.
- [14] Yoneda T, Benedetti C, Urano F, et al. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt18): 4055-4066.
- [15] Truettner JS, Hu K, Liu CL, et al. Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats[J]. Brain Res, 2009, 1249: 9-18.
- [16] Sheng R, Liu XQ, Zhang LS, et al. Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning[J]. Autophagy, 2012, 8(3): 310-325.
- [17] 王珊. Mitofilin 蛋白下调诱导细胞凋亡的机制研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [18] Vonderm alsburg K, Müller J, Bohnert M, et al. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis[J]. Dev Cell, 2011, 21(4): 694-707.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)