

补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 TLR4 表达的影响

周赛男¹, 蔺晓源², 郭 乐¹, 易 健², 谭 峰¹, 郭 纯², 刘柏炎², 蔡光先², 黄献平³ (1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学省部共建中医内科学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410007; 3. 湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑组织 TLR4 表达的影响。**方法** 72 只大鼠随机分为假手术组、模型组和补阳还五汤组, 每组按给药后 7、14、21 d 3 个时间点再各分 3 组, 用免疫组化、Western blot、RT-PCR 法检测各组不同时间点 TLR4 的蛋白和基因表达。**结果** 模型组和补阳还五汤组各时间点 TLR4 蛋白和 mRNA 表达均高于假手术组($P < 0.05$), 补阳还五汤组在第 7、14 天 TLR4 蛋白表达明显低于模型组, 但 TLR4 mRNA 水平在第 7 天、14 天却明显高于模型组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 补阳还五汤通过调节缺血后脑组织 TLR4 的表达可能是其治疗脑缺血的作用机制之一。

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血; TLR4; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.005

Effect of Buyang Huanwu Decoction on Cerebral TLR4 Expression of Rats with Focal Cerebral Ischemia

ZHOU Sainan¹, LIN Xiaoyuan², GUO Le¹, YI Jian², TAN Feng¹, GUO Chun², LIU Baiyan², CAI Guangxian², HUANG Xianping³ (1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Key Lab of Internal Medicine Constructed by Ministry of Education and Provincial Government, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 3. State Key Subject of Diagnostics, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Buyang Huanwu Decoction on TLR4 expression in brain tissue of rats with focal cerebral ischemia. **Methods** Seventy-two SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, and Buyang Huanwu Decoction group. Each group was divided into three subgroups according to the time after administration for 7d, 14d and 21d respectively. TLR4 protein and mRNA levels in each group were examined by using immunohistochemistry, Western blotting and RT-PCR respectively. **Results** Expression of TLR4 protein and mRNA at each time point were increased in the model group and Buyang Huanwu Decoction group as compared with the corresponding sham group ($P < 0.05$). Expression of TLR4 protein in Buyang Huanwu Decoction group was significantly lower than the model group on day 14, but the level of TLR4 mRNA on day 7 and 14 was significantly higher than the model group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction in regulating cerebral TLR4 expression of ischemia rats may be one of its therapeutic mechanisms for cerebral ischemia.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; Cerebral ischemia; TLR4; Rats

脑缺血后可导致一系列细胞、分子事件, 主要包括线粒体能量代谢障碍、离子平衡失调、氧化应激、细胞凋亡、炎症反应、组织修复与再生等, 其中炎症

反应扮演着重要角色。而 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 作为炎症反应信号传导通路的门户蛋白之一, 可能成为治疗脑缺血的新靶点^[1]。补阳还

收稿日期: 2012-09-10

作者简介: 周赛男, 女, 讲师, 研究方向: 中西医结合脑血管疾病研究。Email: hnzhouzainan@163.com。通讯作者: 蔡光先, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治消化、心脑血管疾病研究。Email: lly1203@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072939); 湖南省科技计划项目(2011SK3103); 湖南省自然科学基金资助项目(12JJ5046)。

五汤出自清代王清任的《医林改错》，是治疗缺血性中风及其后遗症的经典名方，该方在临床上应用广泛且疗效确切^[2-3]，但作用机制尚未明确。本文采用大脑中动脉线栓法复制大鼠局灶性脑缺血模型，探讨补阳还五汤对实验性脑缺血后 TLR4 表达的影响，以期治疗缺血性脑中风临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 99 只，SPF 级，体质量 260~280 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物合格证号：004535。

1.2 药物 补阳还五汤来源于《医林改错》，处方组成：黄芪 120 g，赤芍 4.5 g，川芎 3 g，归尾 6 g，干地龙 3 g，红花 3 g，桃仁 3 g。药材经湖南省中医药研究院鉴定均符合《中国药典》2005 年版标准，补阳还五汤药剂水煎并浓缩至 2 g·L⁻¹，冷藏待用。

1.3 药品及试剂 兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体，批号：20110319，武汉博士德生物工程有限公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(批号：20110808)、PV-6001 免疫组化试剂盒(批号：20100906)、DAB 显色试剂盒(批号：20100315)，北京中杉金桥生物技术有限公司；DNA Maker，批号：20100206，北京科技有限公司；逆转录试剂盒，批号：20111204，Fermentas 公司；PCRMix，批号：20120316，北京天根科技有限公司。

1.4 主要仪器 Finesse 325 型石蜡切片机，英国 Shando 公司；Bx51 光学显微镜及 IPP5.1 图像分析系统，日本 Olympus 公司；GE-100 凝胶电泳仪、TC-48/T/H(a) 基因扩增仪，杭州大和热磁电子有限公司；UV-1750 紫外分光光度计，日本岛津公司；GIS-1000 数码凝胶图像分析系统，上海天能科技公司。

1.5 实验方法

1.5.1 模型制备及评价 采用大脑中动脉线栓法复制大鼠局灶性脑缺血模型^[4]。假手术组仅切开皮肤、分离左侧颈总动脉后随即缝合。动物清醒 2 h 后参照 Longa^[4]及 Bederson^[5]的 5 分制法进行神经功能评分，分值在 1~3 分者入组。评分越高，神经功能缺损越严重。剔除标准：评分低于 1 分；蛛网膜下腔出血；HE 染色无脑缺血病理改变；未到时间点死亡。因大鼠死亡等致样本量不足时随机替补。

1.5.2 分组及给药 将大鼠随机分为假手术组、模型组和补阳还五汤组，每组 24 只，每组又按 3 个时间点分别于首次给药后 7、14、21 d 处死，每个时间点 8 只。补阳还五汤组于术后 2 h 后开始给药，每天给药剂量为 5 g·kg⁻¹ (成人等效剂量)，每天灌胃 1 次。

模型组和假手术组均给予等体积蒸馏水。

1.5.3 免疫组化法检测大鼠脑组织 TLR4 表达 每组每个时间点 5 只大鼠，10 %水合氯醛麻醉后断头取脑，4 %多聚甲醛固定。各组组织切片一抗用兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体 (1 : 100)，阴性对照用 PBS 替代，4 ℃冰箱孵育过夜，山羊抗兔二抗室温孵育 40 min，DAB 显色。每只动物取切片 5 张，采用 IPP5.1 图像分析系统，光镜高倍(×400)下记录每张切片 5 个相同单位面积的阳性细胞数。

1.5.4 免疫印迹法(Western blot)法检测大鼠脑组织 TLR4 表达 每组每个时间点 3 只大鼠，水合氯醛麻醉后冰上断头取左侧海马、顶叶皮质放于液氮灌中备用。操作步骤依次为：①蛋白质提取；②BCA 法测定蛋白浓度；③使蛋白质变性；④SDS-PAGE 凝胶电泳；⑤转印；⑥杂交；⑦扫描蛋白印迹条带；⑧图像分析及数据处理：western blot 结果用美国 Bio Rad 公司 Quantity one 4.5.0 软件系统分析各条带的灰度值。

1.5.5 RT-PCR 法检测大鼠脑组织 TLR4 表达 取材同“1.5.4 项”。引物序列见表 1。采用两步法 RT-PCR 扩增相应片段。逆转录合成程序为：42 ℃ 1 h，70 ℃ 5 min。PCR 反应所用程序：94 ℃预变性 3 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，35 个循环；最后于 72 ℃再延伸 10 min。取 3 μL PCR 产物于已加入溴乙锭 2 %琼脂糖凝胶电泳检测，并于凝胶成像系统摄像分析。

表 1 PCR 引物序列

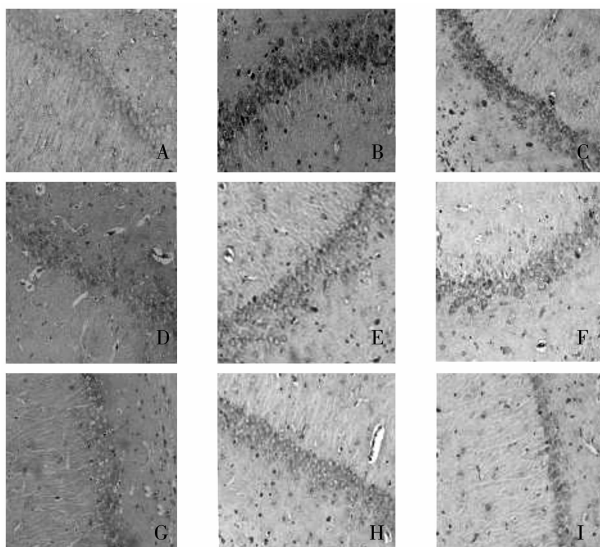
Table 1 Sequences of primers in PCR

基因名称	引物序列	扩增产物
GAPDH(rat)	F: 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTTTG-3'	496 bp
	R: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'	
TLR4(rat)	F: 5'-GCC GGA AAG TTA TTG TGG T3'	356 bp
	R: 5'-ATG GGT TTT AGG CGC AGA GTTT3'	

1.6 统计学处理方法 所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计分析，组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫组化法检测 TLR4 在脑组织中的表达 见图 1 及表 2。TLR4 表达位于细胞浆与细胞膜，阳性细胞为棕褐色或棕黄色，主要表达区域为海马、皮质、缺血灶周围。与假手术组比较，模型组和补阳还五汤组各时间点 TLR4 蛋白表达均增加($P < 0.05$)，但补阳还五汤组在 7 d、14 d 明显低于模型组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A、D、G 为 7、14、21 d 假手术组；B、E、H 为 7、14、21 d 模型组；C、F、I 为补阳还五汤组

图1 各组大鼠脑组织 TLR4 的表达($\times 400$)

Figure 1 TLR4 expression in rat brain tissue of each group

表 2 各组大鼠脑组织 TLR4 阳性细胞计数($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 TLR4 positive cell count in rat brain tissue of each group

组别	TLR4 阳性细胞数/个 $\cdot$ mm $^{-2}$		
	7 d	14 d	21 d
假手术组	196.33 $\pm$ 26.82	188.42 $\pm$ 18.57	198.50 $\pm$ 20.14
模型组	301.58 $\pm$ 52.61 $^{\Delta}$	262.25 $\pm$ 24.31 $^{\Delta}$	277.83 $\pm$ 14.86 $^{\Delta}$
补阳还五汤组	254.75 $\pm$ 47.29 $^{\Delta*}$	219.67 $\pm$ 14.72 $^{\Delta*}$	266.17 $\pm$ 39.62 $^{\Delta}$

注：与假手术组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$ 。

2.2 Western blot 法检测脑组织匀浆 TLR4 表达 见

表 3。脑组织匀浆 TLR4 结果显示，假手术组有低水平 TLR4 表达，各实验组大鼠缺血侧海马、脑室下区、大脑皮层组织提取的蛋白均与兔抗大鼠 TLR4 抗特异性结合，在相对分子量约 100 kD 处出现阳性条带，在大鼠脑缺血后第 14 天模型组 TLR4 表达最高，第 14、21 天补阳还五汤组较同期模型组 TLR4 表达明显降低($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠 TLR4/GAPDH 蛋白光密度比值($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

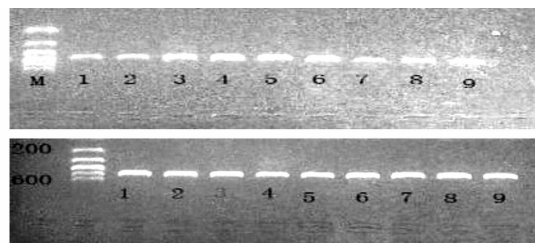
Table 3 TLR4/GAPDH protein optical density ratio of rats in each group

组别	TLR4 蛋白/GAPDH 蛋白(光密度比值)		
	7 d	14 d	21 d
假手术组	0.2043 $\pm$ 0.0013	0.1862 $\pm$ 0.0020	0.1825 $\pm$ 0.0016
模型组	0.5045 $\pm$ 0.0013 $^{\Delta}$	0.5130 $\pm$ 0.0018 $^{\Delta}$	0.5032 $\pm$ 0.0016 $^{\Delta}$
补阳还五汤组	0.5035 $\pm$ 0.0020 $^{\Delta}$	0.3246 $\pm$ 0.0012 $^{\Delta*}$	0.2076 $\pm$ 0.0016 $^{\Delta*}$

注：与假手术组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$ 。

2.3 RT-PCR 法检测 TLR4 mRNA 表达 见图 2、

表 4。假手术组有较低水平 TLR4 mRNA 表达，脑缺血刺激后模型组从第 7 天到 21 天处于持续低水平状态，但仍高于假手术组($P < 0.05$)。补阳还五汤组于第 7 天表达最高，之后水平有所下降，但仍高于假手术组($P < 0.05$)，且第 7、14 天水平也明显高于模型组，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



1、2、3 为 7、14、21 d 假手术组；4、5、6 为 7、14、21 d 补阳还五汤组；7、8、9 为 7、14、21 d 模型组

图2 各组大鼠 TLR4 mRNA 电泳图

Figure 2 The TLR4 mRNA electropherogram of the rats in each group

表 4 各组大鼠 TLR4/GAPDH mRNA 光密度比值($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 TLR4/GAPDH mRNA optical density ratio of rats in each group

组别	TLR4 mRNA/GAPDH mRNA(光密度比值)		
	7 d	14 d	21 d
假手术组	0.4570 $\pm$ 0.0025	0.4701 $\pm$ 0.0012	0.6180 $\pm$ 0.0008
模型组	0.6180 $\pm$ 0.0011 $^{\Delta}$	0.7023 $\pm$ 0.0016 $^{\Delta}$	0.7434 $\pm$ 0.0013 $^{\Delta}$
补阳还五汤组	1.1284 $\pm$ 0.0012 $^{\Delta*}$	0.9309 $\pm$ 0.0021 $^{\Delta*}$	0.8137 $\pm$ 0.0026 $^{\Delta}$

注：与假手术组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$ 。

3 讨论

炎症反应在脑缺血疾病的病理生理中起着非常重要的作用，参与了缺血性脑中风的发生、发展及预后。在缺血性脑卒中由于缺血缺氧导致脑组织细胞损伤、坏死，受损及坏死的组织细胞释放出一系列损伤相关分子模式(DAMPs)，这些分子包括由活化及坏死细胞释放到细胞外环境的细胞内分子，也包括由组织损伤所降解的细胞外基质分子，如热休克蛋白、HMGB1、RNA、DNA、透明质酸、硫酸肝素等。Toll 样受体家族(toll-like receptors, TLRs) 是 1997 年发现于人类与果蝇 Toll 蛋白的同源物质，属于 I 型跨膜糖蛋白。目前在哺乳动物中至少发现 13 个成员，作为一类同源模式识别受体，TLRs 主要通过特异识别病原相关分子模式(PAMPs)和 DAMPs 来启动免疫反应，是先天性免疫系统的重要组成部分及连接获得性免疫与先天性免疫的“桥梁”^[6]。TLRs 作为炎症信号级联途径的始发者，近年来在脑缺血研究中备受关

注。Gao Y 等^[7]用 TLR4 抗体阻断后可减轻脑缺血小鼠脑组织海马 CA1 区和顶叶皮质缺血再灌注神经元损伤,提示 TLR4 参与脑缺血再灌注损伤的炎症反应机制。临床方面,Brea D 等^[8]发现 TLR4 与中风的预后及病灶梗死体积均独立相关。

在本研究中,我们用免疫组织化学法与免疫印迹法验证了大鼠脑缺血后 TLR4 蛋白表达有上调趋势,与文献报道一致^[9-10]。使用补阳还五汤干预后 TLR4 蛋白表达下降,在 14 d 均明显低于模型组($P < 0.05$)。但是用 RT-PCR 法发现,TLR4 的 mRNA 水平在模型组各时间点低于同时相的补阳还五汤组,第 7 天与第 14 天两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其可能原因有二:一是由于模型组 TLR4 蛋白持续处于高水平,使得机体相应机制反馈性对 TLR4 基因表达进行负调控,使之表达相对减少或是降解速度加快;二是技术本身的局限,PCR 对体外 DNA 扩增是以指数倍进行,扩增达 100 万倍,灵敏、高效的同时对误差容忍度低。加之本研究采用的是 RT-PCR 两步法操作,任何细微误差都可导致效应增大。该实验尚需 Real-time PCR 检测多次重复。无论基因水平表达高低,蛋白质才是生物学功能的主要执行者。以上结果提示,补阳还五汤可能通过调节 TLR4 介导的炎症信号传导通路而减轻脑缺血后损伤,实现脑保护作用,这也可能是其治疗脑缺血后遗症的作用机制之一。

参考文献:

[1] Leung PY, Packard AE, Stenzel-Poore MP. It's all in the family:

- multiple Toll-like receptors offer promise as novel therapeutic targets for stroke neuroprotection[J]. Future Neurol, 2009, 4(2): 201-208.
- [2] 刘柏炎,蔡光先,刘维,等.补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体 Flk1 的影响[J].中草药,2007,38(3): 394-397.
- [3] 储利胜,俞天虹,刘志婷,等.补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后海马齿状回神经干细胞增殖和存活的影响[J].浙江中医药大学学报,2011,35(3): 375-377.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [6] Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Type I interferons[J]. J Biol Chem, 2007, 282(21): 15319-15323.
- [7] Gao Y, Fang X, Tong Y, et al. TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway is activated by cerebral ischemia-reperfusion in cortex in mice[J]. Biomed Pharmacother, 2009, 63(6): 442-450.
- [8] Brea D, Blanco M, Ramos-Cabrera P, et al. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(6): 1424-1431.
- [9] Tu XK, Yang WZ, Shi SS, et al. Spatio-temporal distribution of inflammatory reaction and expression of TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent focal cerebral ischemia[J]. Neurochem Res, 2010, 35(8): 1147-1155.
- [10] Hua F, Ma J, Ha T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Brain Res, 2009, 1262: 100-108.

(编辑:邓响潮)

金匱肾气丸对颌下腺切除大鼠生精调控的作用及机理研究

周仕轶¹, 于军桥², 邵继春³, 张蜀武⁴ (1. 成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 611137; 2. 成都市东区医院, 四川 成都 610063; 3. 核工业部 416 医院, 四川 成都 610084; 4. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075)

摘要: **目的** 探讨金匱肾气丸对颌下腺切除大鼠生精调控的作用和机理。**方法** SD 大鼠经灌胃腺嘌呤复制成肾阳虚伴生精障碍模型,切除颌下腺将大鼠复制成唾液缺乏伴生精障碍模型。大鼠经灌胃给予金匱肾气丸混悬液,观察 1 个生精周期后大鼠附睾内成熟精子的数量与睾丸曲细精管的参数,采用免疫细胞化学法结合图像分析系统观察生精细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达情况。**结果** 金匱肾气丸作用 1 个生精周期后,与其他 5 个实验组比较,肾阳虚+肾气丸组大鼠曲细精管中生精细胞出现增殖,同时生精细胞内 Bax 表达下调和 Bcl-2

收稿日期: 2012-10-24

作者简介: 周仕轶,男,博士,助理研究员,研究方向:从事男性泌尿生殖的基础和临床研究。Email: 708975441@qq.com。