

# 健脾补土方对脑缺血再灌注大鼠缺血侧皮质 Claudin-5、Occludin、p-BAD、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响

陈佳敏 李花 刘旺华 陈岩岩 陈心豪

**【摘要】** **目的** 探讨健脾补土方减轻脑缺血再灌注大鼠神经元损伤的可能作用机制。**方法** 将 80 只 SD 大鼠随机分为假手术组 10 只、手术组 70 只,手术组经模型制备后评价,剔除不成功的及死亡大鼠,二次分组,分为模型组、依达拉奉组、健脾补土方高、中、低剂量组,每组各 13 只。手术组采用大脑中动脉栓塞法制备脑缺血再灌注模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO),干预 7 天,取材。取材前每组选取 10 只,采用国际公认的大鼠脑卒中后神经功能缺损评分法(mNss 评分)进行神经功能缺损评分。取材部位为缺血侧脑皮质组织。每组随机选取 3 只采用苏木素—伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察病理形态改变;每组随机选取其中 5 只采用 Western blot 法检测紧密连接蛋白-5(Claudin-5)、闭合蛋白(Occludin)表达量;剩余 5 只采用免疫组化法检测磷酸化相关死亡启动因子(phospho-Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter, p-BAD)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达量。**结果** (1)造模后,与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分明显上升,经药物干预后,各组神经功能缺损评分均有所下降( $P < 0.05$ ),其中以依达拉奉组与健脾补土方高剂量组下降最为明显;(2)造模后,模型组大鼠较假手术组病理改变严重,出现组织大片坏死,经药物干预后,各组病理改变均有所改善,依达拉奉组和健脾补土方高剂量组尤为明显;(3)与模型组比较,各药物干预组脑组织缺血皮质区 Occludin、Claudin-5 蛋白表达均有所上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中以依达拉奉组和健脾补土方高剂量组最为显著;(4)与模型组比较,各药物干预组脑缺血皮质组织 p-BAD、Bcl-2 蛋白表达均明显增加,Caspase-3 蛋白表达有所降低( $P < 0.05$ ),其中依达拉奉组与健脾补土方高剂量组最为显著。**结论** 健脾补土方可能通过上调 p-BAD、Bcl-2、Claudin-5、Occludin 蛋白表达,下调 Caspase-3 蛋白表达,从而改善脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损症状及脑组织病理改变,进而促进缺血脑组织损伤修复。

**【关键词】** 脑缺血再灌注; 健脾补土方; 磷酸化相关死亡启动因子; B 淋巴细胞瘤-2 基因; 半胱氨酸蛋白酶-3; 紧密连接蛋白-5; 闭合蛋白

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2023.04.011

## The Effect of Spleen-strengthening Decoction on Claudin-5, Occludin, p-Bad, Bcl-2, Caspase-3 protein expression in ischemic cortex of cerebral ischemia/reperfusion rats

CHEN Jiamin, LI Hua, LIU Wanghua, CHEN Yanyan, CHEN Xinhao

基金项目: 国家自然科学基金(81473567); 湖南省中医药科研计划重点项目(2021013, A2023038); 湖南省高校创新平台开放基金(20K097)

作者单位: 410208 长沙, 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科[陈佳敏(硕士研究生)、李花、刘旺华、陈岩岩、陈心豪], 中医诊断学湖南省重点实验室(李花、刘旺华), 数字中医药协同创新中心(李花、刘旺华、陈岩岩)

作者简介: 陈佳敏(1998-), 2020 级在读硕士研究生。研究方向: 脑血管病中医药防治研究。E-mail: 1721867305@qq.com

通信作者: 李花(1976-), 博士, 教授, 硕士生导师。研究方向: 脑血管病中医药防治研究。E-mail: 420039931@qq.com

Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Corresponding author: Li Hua, E-mail: 420039931@qq.com

**【Abstract】 Objective** To explore the possible mechanism of Spleen-strengthening Decoction in alleviating neuronal injury in rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** A total of 80 SD rats were randomly divided into sham operation group ( $n=10$ ) and operation group ( $n=70$ ). The operation group was evaluated after model preparation. After excluding unsuccessful and dead rats, the rats were divided into model group, edaravone group, high, medium and low dose groups of Spleen-strengthening Decoction, with 13 rats in each group. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was prepared by middle cerebral artery embolization in the operation group, and the intervention lasted for 7 days. Before sampling, the internationally recognized neurological deficit score (mNss score) after stroke was used to score the neurological deficit. The tissue was taken from the ischemic cerebral cortex, and 3 rats in each group were randomly selected to observe the pathological changes by HE staining. Five of each group were randomly selected to detect the expression of Claudin-5 and Occludin by Western Blot. The expression of phosphorylation-associated death promoter (p-BAD), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Caspase-3 were detected by immunohistochemistry in the remaining 5 rats. **Results** (1) Compared with the sham operation group, the neurological deficit scores of rats in the model group were increased significantly. After drug intervention, the neurological deficit scores of each group were decreased ( $P<0.05$ ), among which the edaravone group and the high-dose Spleen-strengthening Decoction group were decreased most significantly. (2) Compared with the sham group, the pathological changes of rats in the model group were more serious, and large areas of tissue necrosis occurred. After drug intervention, the pathological changes of each group were improved, especially in the edaravone group and the high dose group of Spleen-strengthening Decoction. (3) Compared with the model group, the expression of Occludin and Claudin-5 protein in the ischemic cortex of each drug intervention group was up-regulated, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ), among which the edaravone group and the high-dose group were the most significant; (4) Compared with the model group, the expression of p-BAD and Bcl-2 protein in the cerebral ischemic cortex of each drug intervention group was significantly increased, and the expression of Caspase-3 protein was decreased ( $P<0.05$ ). among which the edaravone group and the high-dose group were the most significant. **Conclusion** Spleen-strengthening Decoction may improve the symptoms of neurological deficits and pathological changes of brain tissue in rats with cerebral ischemia-reperfusion by up-regulating the expression of p-BAD, Bcl-2, Claudin-5 and Occludin protein and down-regulating the expression of Caspase-3 protein, thus promoting the repair of ischemic brain tissue injury.

**【Key words】** Cerebral ischemia reperfusion; Spleen-strengthening decoction; Phosphorylation-related death initiation factor; B cell lymphocyte-2 gene; Cysteine protease-3; Tight junction protein-5; Closed protein

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 是缺血性脑卒中的常见并发症。中医藏象理论认为,脾为后天之本,脑卒中发生后常并发腹胀、腹泻、便秘及营养障碍等症状,皆与脾胃失调有关<sup>[1]</sup>。本研究采用的健脾补土方由四君子汤加减化裁而成,多用于脑卒中恢复期患者的治疗,具有一定临床疗效<sup>[2]</sup>。课题组前期研究显示,神经细胞外基质滋养、承载、调护神经元的作用与中医脾土“至哉坤元,万物滋生,坤厚载物”的功能有相通之处,认为神经细胞外基质可纳入中医“脾土”范畴,健脾补土方对神经细胞外基质有一定保护作用<sup>[3]</sup>。神经细胞外基质中含有多种黏附分

子,如纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、紧密连接蛋白-5 (Claudin-5)、闭合蛋白 (Occludin) 等,能引导神经生长,保护脑损伤。课题组前期研究发现,健脾补土方组可以上调磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, p-Akt) 蛋白的表达水平,从而抑制神经细胞凋亡,减少脑缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>。有研究发现,p-Akt 可直接作用于其下游靶点相关死亡启动因子 (Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter, BAD),而 BAD 又是将上游蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号途径与 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族连接起来的信号中转站,Bcl-2 同样与细胞凋亡关系紧密,半胱天

冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 是调节凋亡的重要和潜在药物靶点<sup>[5-6]</sup>。因此本实验基于前期研究,观察健脾补土方对 I/R 大鼠脑组织缺血皮质区 Claudin-5、Occludin、p-BAD、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平的影响,为阐明健脾补土方减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的作用机制提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 80 只,8 周龄,体质量 (260±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SYXK(湘)2013-0005,动物质量合格证号:NO.43004700048236。饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障系统,环境温度为 26℃,相对湿度 55%,自由进食饮水,光暗循环 12 小时。本研究所有操作均符合相关管理准则并已通过湖南中医药大学动物实验伦理委员会审查(编号:20150908)。

### 1.2 药物

健脾补土方由经典名方四君子汤《太平惠民和剂局方》加减化裁而来:白参 15 g、黄芪 15 g、山药 12 g、茯苓 10 g、白术 12 g、薏苡仁 12 g、炙甘草 6 g。由湖南中医药大学第一附属医院提供。常规水煎煮,利用旋转蒸发仪浓缩至生药浓度 1 g/mL,灭菌分装,4℃ 冰箱冷藏备用。依达拉奉注射液(批号 2012B00528,南京先声东元制药有限公司)。

### 1.3 主要试剂与仪器

兔抗大鼠 p-BAD (AF347, 美国 Affinity Biosciences 公司);兔抗大鼠 Bcl-2 (A0208, 武汉爱博泰克生物科技有限公司);兔抗大鼠 Caspase-3 (bs-0081R, 北京博奥森生物技术有限公司);兔抗 Claudin-5 多克隆抗体 (34-1600, 美国 Invitrogen 公司);兔抗 occludin 多克隆抗体 (13409-1-AP, 美国 Proteintech 公司);兔抗 β-肌动蛋白多克隆抗体 (20536-1-AP, 美国 Proteintech 公司);显影定影试剂 (G2016, 武汉谷歌生物科技公司);RIPA 裂解液 (G2001, 武汉谷歌生物科技公司);PVDF 膜 0.45 μm (TA-09, Millipore 公司);MCAO 栓线(规格:2630-20A4, 北京西浓科技有限公司)。

石蜡切片机(RM2235 型,德国 Leica 公司);旋转蒸发仪(RE-52AA 型,上海雅荣生化仪器设备有限公司);半干转膜仪系统(WSE-4040, ATTO 生产);alphaEaseFC 灰度分析软件(Alpha Innotech 生

产);显微摄像图像分析系统(MoticBA600-4 型,麦克奥迪实业公司);图像分析软件(Image-Pro Plus 型,美国 Image-Pro 公司)。

### 1.4 MCAO 模型制备

80 只大鼠适应性喂养 1 周后,运用随机数字表进行初分组,分为假手术组 10 只,手术组 70 只。参照改良 Longa EZ<sup>[7]</sup> 的线栓法将手术组大鼠制备局灶性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,术前禁食 24 小时,操作前大鼠用 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,剪开颈部皮肤,暴露手术部位,分离血管,0.28 mm 尼龙线蘸取肝素后,自左侧颈内动脉(internal carotid artery, ICA)插入大脑中动脉至有轻微阻力感停止,平均插入(18.5±0.5)mm,闭阻 2 小时后抽出栓线。假手术组只暴露手术部位,分离 ICA,不对血管做任何结扎处理。模型成功的判断标准<sup>[7]</sup>以清醒后动物出现前肢腕屈,肩内旋,以对侧上肢为重的瘫痪,前进时向手术对侧转圈、歪倒,并伴有同侧霍纳征阳性为主,不成功者剔除。造模阶段 4 只未成功,均剔除,因损伤太重死亡 1 只,手术组余 65 只。

### 1.5 动物分组及给药

将造模成功的大鼠按随机数字表法二次分组为:模型组,依达拉奉组,健脾补土方高、中、低剂量组,每组 13 只。大鼠给药剂量参考魏伟等<sup>[8]</sup>主编的《药理实验方法学》附录中的种属间等效剂量折算表,根据 70 kg 成人每日服用 82 g 生药剂量,按人大鼠体表面积换算系数确定健脾补土方高、中、低剂量组大鼠用药剂量,分别为 14.76 g/(kg·天)、7.38 g/(kg·天)、3.69 g/(kg·天),其中健脾补土方中剂量组相当于临床等效剂量。以同样的方法得出依达拉奉等效剂量为 3.2 mg/(kg·天)。除中药组外,其他组均予以 2 mL 蒸馏水灌胃,除依达拉奉组外,其他组均予以 1 mL 生理盐水腹腔注射。造模成功 24 小时后各组首次给药,连续给药 7 天,每日 1 次。给药 7 天后,处死大鼠取缺血侧脑组织,取材前禁食 24 小时,组织按指标检测要求保存。

### 1.6 检测指标与方法

1.6.1 神经功能缺损症状评分 采用国际公认的大鼠脑卒中后神经功能缺损评分法(modified neurological severity score, mNss),取材前 2 小时随机在手术组各组大鼠中随机选取 10 只,与假手术组 10 只对比,共 60 只大鼠,进行神经功能缺损状况评价,

采用双盲法。评价标准:1~6 分为轻度局灶性神经功能缺损;7~12 分为中度局灶性神经功能缺损;13~18 分为重度局灶性神经功能缺损<sup>[9]</sup>。

**1.6.2 大鼠脑组织病理形态改变观察** 采用苏木素—伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法,每组随机选取 3 只大鼠,取缺血侧脑组织后,即刻用 4%多聚甲醛固定 24 小时以上,而后石蜡包埋,切片。脱蜡后染色,光学显微镜下观察各组大脑皮质组织病理形态改变,并保存图片。每组重复 3 次。

**1.6.3 大鼠脑组织缺血皮质区 Claudin-5、Occludin 蛋白检测** 采用 Western blot 法。每组选取 5 只大鼠,取缺血侧脑组织后-80℃冻存。检测前提前取出解冻。(1)蛋白定量:检测蛋白浓度,配上样液。(2)电泳。(3)转膜,将目标蛋白条带转移到聚偏二氟乙烯膜上。(4)配 5%脱脂奶粉浸泡携带目的蛋白的膜,室温下封闭 90 分钟。(5)一抗孵育:将膜置于 4℃与一抗(Occludin 稀释比例 1:2000; Claudin-5 稀释比例 1:2000;  $\beta$ -actin 稀释比例 1:1000)孵育过夜,第二天将膜用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 分钟,(6)室温二抗孵育 2 小时。而后 TBST 洗涤 6 次,每次 5 分钟。(7)使用 ECL 试剂显影并保存条带图。每组重复 5 次。采用 alphaEaseFC 灰度分析软件分析条带灰度值,目的蛋白以样品条带灰度值/相应内参灰度值表示,本研究以  $\beta$ -actin 为内参。

**1.6.4 大鼠脑组织缺血皮质区 p-BAD、Bcl-2、Caspase-3 蛋白检测** 采用免疫组化法。每组选取 5 只大鼠,取材后缺血侧脑组织用 4%多聚甲醛固定 24 小时以上,石蜡脱水包埋并切片保存。3%  $H_2O_2$  室温孵育 10 分钟后蒸馏水冲洗,磷酸盐溶液内浸泡 5 分钟,加一抗(p-BAD 稀释比例 1:500, Bcl-2 稀释比例 1:500, Caspase-3 稀释比例 1:1000),孵育 2 小时。磷酸盐溶液冲洗,而后滴加二抗,孵育 30 分钟。加入 DAB 染色液显色 5~20 分钟,蒸馏水冲洗、复染、脱水、透明、封片、镜检。每组重复 5 次。显微镜下观察,400 倍镜下,随机选取 5 个视野,保存图片,采用 Image-Pro Plus 图像分析软件测定阳性面积,以平均阳性面积作为蛋白表达量。

## 1.7 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 21.0 统计软件分析,对数据进行正态性检验及方差齐性检验后,均服从正态分布,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,且均满足方差齐性。故组间两两比较均采用单因素方

差分析比较(采用 LSD 检验法),若  $P<0.05$  则证明差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 健脾补土方对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损症状评分的影响

与假手术组比较,其他各组大鼠神经功能缺损症状评分显著增加( $P<0.05$ );与模型组比较,依达拉奉组、健脾补土方各剂量神经功能缺损评分均有明显降低( $P<0.05$ );与依达拉奉组比较,健脾补土方中、低剂量组大鼠神经功能缺损评分增加( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损症状评分比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠只	剂量(g/kg)	神经功能缺损评分
假手术组	10	/	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	10	/	6.83 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>
依达拉奉组	10	0.0032	2.02 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>
健脾补土方低剂量组	10	3.69	3.80 $\pm$ 0.51 <sup>bc</sup>
健脾补土方中剂量组	10	7.38	3.69 $\pm$ 0.22 <sup>bc</sup>
健脾补土方高剂量组	10	14.76	2.32 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

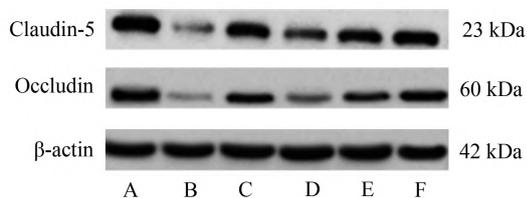
注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与依达拉奉组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

### 2.2 健脾补土方对脑缺血再灌注大鼠脑组织病理形态改变的影响

假手术组神经细胞胞体形态完整、排列正常有序;胞核深染,核膜完整清晰,胞浆呈粉红色,未见侵染;与假手术组相比,模型组神经细胞大量消失,脑组织大片坏死,排列疏松紊乱,胞核固缩,间质水肿;与模型组相比,依达拉奉组、健脾补土方各剂量组均有一定程度病理软化现象改善,水肿减轻;神经细胞增多,排列改善,可见部分胞核偏移、固缩解,核膜相对平整,尤以依达拉奉组和健脾补土方高剂量组改善最为明显。见图 1。

### 2.3 健脾补土方对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Claudin-5、Occludin 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组 Occludin、Claudin-5 蛋白表达明显下调( $P<0.05$ );与模型组相比,依达拉奉组、健脾补土方各剂量组 Occludin、Claudin-5 蛋白表达均上调,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中以依达拉奉组和高剂量组上调最为显著。见图 2,表 2。



注:A 假手术组;B 模型组;C 依达拉奉组;D 健脾补土方低剂量组;E 健脾补土方中剂量组;F 健脾补土方高剂量组

图 2 各组大鼠脑组织 Claudin-5、Occludin 蛋白电泳图

### 2.4 健脾补土方对脑缺血再灌注大鼠脑组织 p-BAD、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响

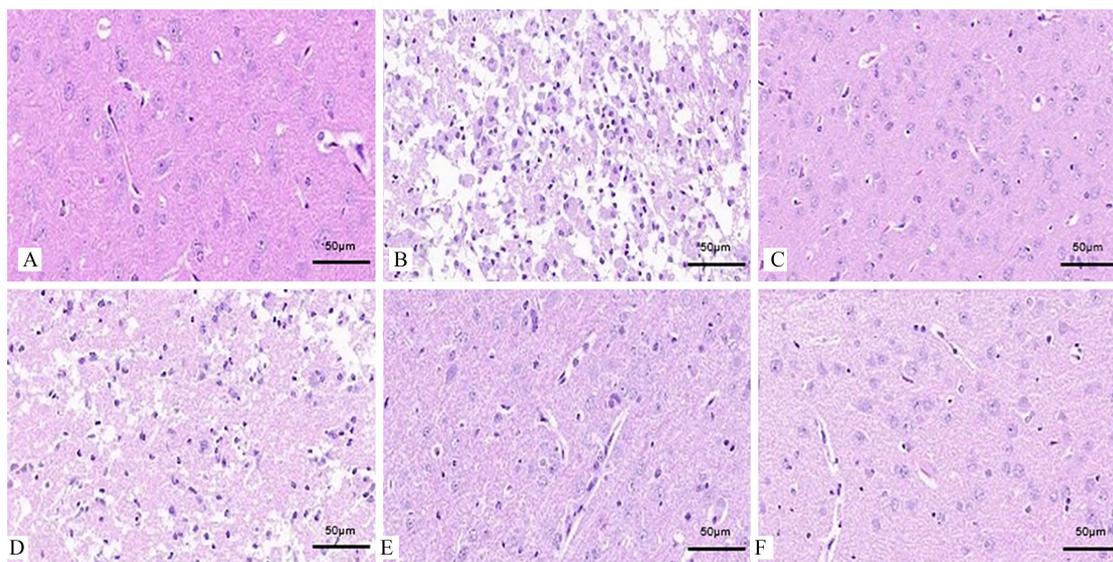
与假手术组比较,模型组大鼠脑组织缺血皮质区 p-BAD、Bcl-2 蛋白表达均有所降低,Caspase-3 蛋白表达明显增高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,依达拉奉组、健脾补土方各剂量组大鼠脑组织缺血皮质区 p-BAD、Bcl-2 蛋白表达均明显增加,Caspase-3 蛋白表达有所降低 ( $P<0.05$ );与依达拉奉组比较,健脾

补土方中、低剂量组大鼠脑组织缺血皮质区 p-BAD、Bcl-2 蛋白表达有所下降,Caspase-3 蛋白表达有上升,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),而健脾补土方高剂量组 p-BAD、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达与之差异不明显 ( $P>0.05$ )。见表 3、图 3~图 5。

表 2 各组大鼠脑组织缺血皮质区 Occludin、Claudin-5 蛋白表达水平的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠只	Occludin/ $\beta$ -actin	Claudin-5/ $\beta$ -actin
假手术组	5	0.699 $\pm$ 0.064	0.865 $\pm$ 0.024
模型组	5	0.163 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	0.188 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>
依达拉奉组	5	0.498 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>	0.622 $\pm$ 0.083 <sup>b</sup>
健脾补土方低剂量组	5	0.330 $\pm$ 0.010 <sup>bc</sup>	0.503 $\pm$ 0.028 <sup>bc</sup>
健脾补土方中剂量组	5	0.413 $\pm$ 0.010 <sup>bc</sup>	0.566 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>
健脾补土方高剂量组	5	0.547 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	0.686 $\pm$ 0.053 <sup>b</sup>

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与依达拉奉组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。



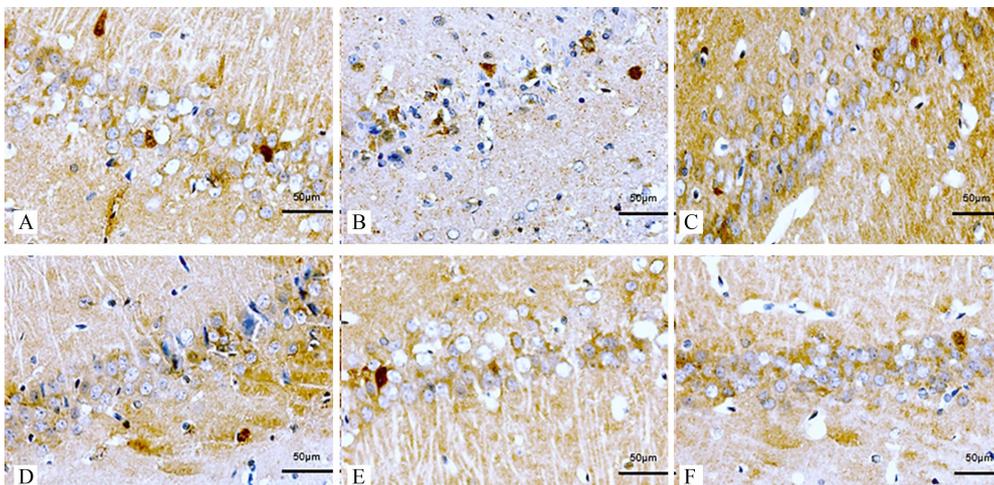
注:A 假手术组;B 模型组;C 依达拉奉组;D 健脾补土方低剂量组;E 健脾补土方中剂量组;F 健脾补土方高剂量组

图 1 各组大鼠脑组织病理 HE 染色结果 ( $\times 400$ )

表 3 各组大鼠脑组织缺血皮质区 p-BAD、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠只	P-Bad	Bcl-2	Caspase-3
假手术组	5	0.200 $\pm$ 0.033	0.214 $\pm$ 0.031	0.140 $\pm$ 0.025
模型组	5	0.143 $\pm$ 0.030 <sup>a</sup>	0.143 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	0.541 $\pm$ 0.049 <sup>a</sup>
依达拉奉组	5	0.318 $\pm$ 0.032 <sup>b</sup>	0.401 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	0.201 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup>
健脾补土方低剂量组	5	0.229 $\pm$ 0.125 <sup>c</sup>	0.241 $\pm$ 0.042 <sup>bc</sup>	0.369 $\pm$ 0.038 <sup>bc</sup>
健脾补土方中剂量组	5	0.264 $\pm$ 0.018 <sup>bc</sup>	0.265 $\pm$ 0.031 <sup>bc</sup>	0.355 $\pm$ 0.041 <sup>bc</sup>
健脾补土方高剂量组	5	0.301 $\pm$ 0.034 <sup>b</sup>	0.386 $\pm$ 0.121 <sup>b</sup>	0.215 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与依达拉奉组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。



注:A 假手术组;B 模型组;C 依达拉奉组;D 健脾补土方低剂量组;E 健脾补土方中剂量组;F 健脾补土方高剂量组,下同。

图 3 各组大鼠脑组织缺血皮质区 p-BAD 蛋白表达(IHC,×400)

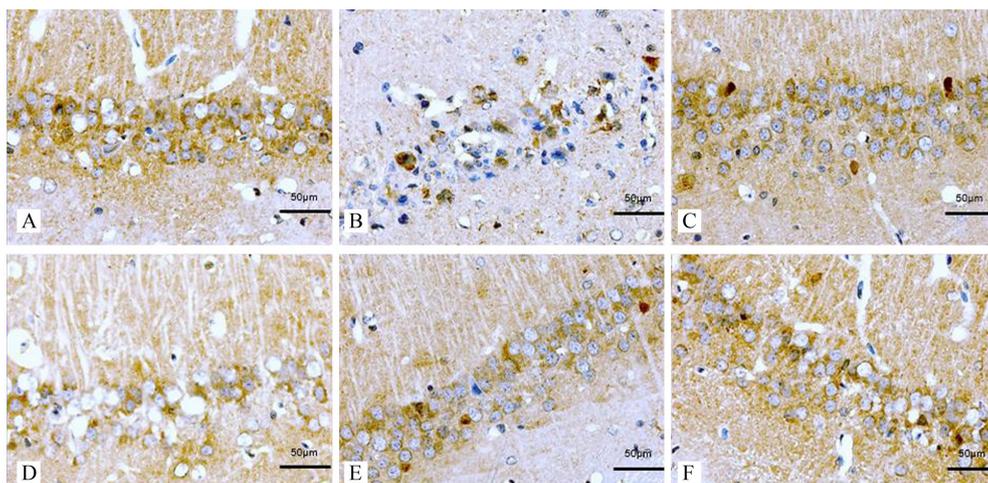


图 4 各组大鼠脑组织缺血皮质区 Bcl-2 蛋白表达(IHC,×400)

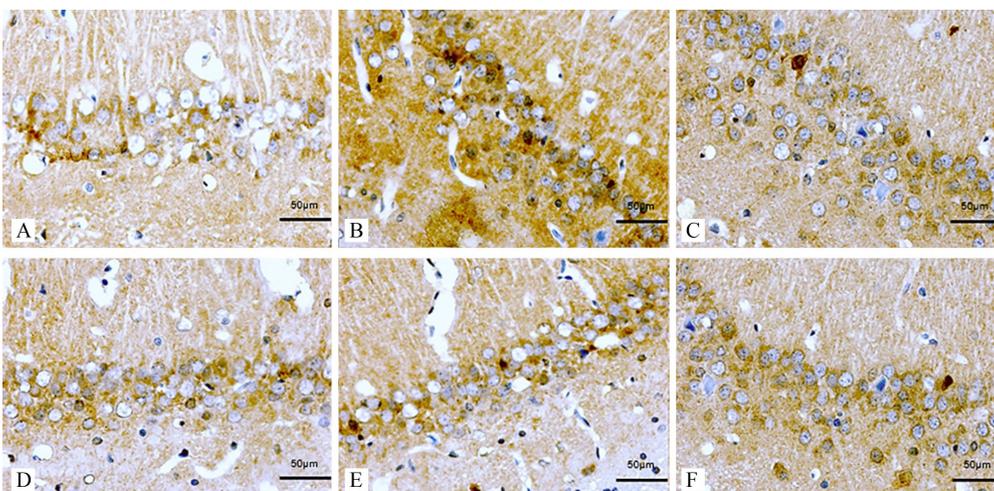


图 5 各组大鼠脑组织缺血皮质区 Caspase-3 蛋白表达(IHC,×400)

### 3 讨论

缺血性脑卒中属于中医“中风”范畴,其病性为本虚标实,其发病机制与多个脏器相关<sup>[10]</sup>。缺血性脑卒中患者多见气血亏虚不足之证候,脾脏是调控全身气血生成、运行的重要脏器。脾为后天之本,气血生化之源,参与气血的生成;其主运化、主升清,能输送精气及水谷精微至全身脏腑经络、形体官窍。脾失健运致水谷不化,气血不生,则脑腑失养;脾胃虚弱,气血运行不畅则涩于脉内,统摄失司则血流于脉外,导致筋脉痹阻;脾气不升,则气机逆乱,可致清阳不升,浊阴不降,痰浊闭阻,出现神昏语蹇,肢麻偏瘫,口舌歪斜诸症<sup>[11]</sup>。因此在治疗脑卒中时应当重视健脾益气,扶正祛邪,使疾病向愈。正如张仲景所云:“若五脏之真气通畅,人即安和。”因此健脾益气,使气血调和,筋脉通达,对于中风病的恢复大有裨益。本研究结果显示,健脾补土方干预后可降低大鼠神经功能缺损评分并改善脑组织病理形态,说明健脾补土方对缺血性脑卒中大鼠损伤脑组织有一定保护作用,其中以健脾补土方高剂量组作用最佳。

失巢凋亡是一种特殊的细胞凋亡形式,是由于失去或不适当细胞粘附引起。当细胞外基质蛋白(如 Claudin-5)表达异常下降,会导致细胞间的屏障结构完整性被破坏,使细胞间粘附性下降,从而导致细胞发生失巢凋亡<sup>[12]</sup>。Occludin、Claudin-5 都是紧密连接蛋白家族的重要成员,对维持血脑屏障功能以及细胞外基质稳定有着重要作用<sup>[13-14]</sup>。本课题组前期研究发现健脾补土方可以降低血脑屏障通透性<sup>[15]</sup>,同时可以稳定神经元细胞外基质,促进 p-Akt 蛋白的表达,抑制了神经细胞凋亡,保护脑缺血损伤<sup>[4]</sup>。本研究结果显示,健脾补土方可上调大鼠缺血侧脑组织 Occludin、Claudin-5 蛋白表达水平,其中中药干预组以中剂量及高剂量组最为明显,表明健脾补土方可能通过上调 Occludin、Claudin-5 蛋白表达发挥对缺血性脑卒中大鼠损伤的保护作用。

尽管失巢凋亡有着独特的定义,但它本质依然是细胞凋亡,凋亡发生和执行可以由不同的途径驱动,最终汇聚成 Caspase 的活化和 DNA 片段化。Bcl-2 家族是凋亡通路的关键参与者。它们包括抗凋亡蛋白,如 Bcl-2、Bcl-XL,或促凋亡蛋白,如 Bax、Bak,或 Bid、BAD、Bim 等<sup>[16]</sup>。研究表明<sup>[5]</sup>,BAD 是 Bcl-2 基因家族中含有高度保守序列的促凋亡蛋白,

通过 BH3 结构域与 Bcl-2 家族的其他成员 Bcl-XL 和相关细胞死亡抑制因子结合而发挥细胞凋亡的作用。另有研究表明<sup>[17-18]</sup>,BAD 可以在任一 Ser-112 或 Ser-136 被磷酸化为 p-BAD 来发挥其抗细胞凋亡作用,神经细胞存活的关键在于被多个磷酸化丝氨酸残基改变的 BAD,能同时改变 Bcl-2 蛋白家族的促生存成员,两者相互作用,BAD 作为中转站将上游信号途径与 Bcl-2 蛋白家族紧密连接起来。有研究显示<sup>[19]</sup>,Bcl-2 与 Bax 能够在体内形成同源或异源二聚体参与调节细胞凋亡,细胞缺血缺氧后是否存活与抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的比值呈正相关。Bcl-2 表达增高能抑制“死亡蛋白酶”Caspase-3 的表达来减轻细胞损害,Caspase 家族作为细胞凋亡的起始点和执行因子可以被自动激发或被其他类似的特定酶激活,导致蛋白水解发生级联瀑布效应。Caspase-3 在家族诱导的蛋白酶级联反应中起着决定性作用,严重抑制 DNA 复制、转录和损伤修复功能,最终导致细胞发生不可逆的凋亡效应。实验研究证实<sup>[20]</sup>,脑 I/R 损伤形成后大鼠海马神经元中 Caspase-3 表达显著增强,神经细胞凋亡数目随之增加,二者之间存在显著相关性;而通过向大鼠脑室注射 Caspase-3 阻滞剂后,发现脑组织梗死区间细胞凋亡数目显著减少。这些发现均证明了脑 I/R 后 Caspase-3 蛋白的激活与脑缺血损伤密切相关。本研究表明,健脾补土方干预可上调大鼠缺血侧脑组织 p-BAD、Bcl-2 蛋白表达水平,下调 Caspase-3 蛋白表达水平,说明 p-BAD、Bcl-2、caspase-3 蛋白可能是健脾补土方治疗脑缺血再灌注大鼠的作用靶点,可通过对其发挥影响而减轻脑组织损伤。

健脾补土方由健脾补气之经典名方四君子汤(《太平惠民和剂局方》)加减而成。方中白参、黄芪共为君药,健脾养胃,益气温中;白术、茯苓共为臣药,白术性味甘温、苦燥,甘温以补气,苦燥运湿以健脾,协助白参增强健脾补气之功效;茯苓性味甘淡,健脾补气运湿,与白术相伍,补中益气,守而不走,相得益彰。山药性味甘平,补脾益气,滋养脾阴;薏苡仁性味甘淡,健脾益胃,共为佐药。炙甘草甘温益气,合白参、黄芪、白术可加强益气补中之力,又可调和诸药,为佐使药。全方制方严谨,条理清晰,药效确切。课题组在前期研究中已证实健脾补土方对脑 I/R 具有脑保护作用,如李花<sup>[16, 21]</sup>等发现健脾益气利水方可以改善血脑屏障紧密连接

结构,对脑水肿形成、脑组织神经细胞凋亡均具有抑制作用;胡康丽等<sup>[22]</sup>发现四君子汤加减可以通过上调 p-Akt,下调 Bax 的表达,从而减少脑 I/R 大鼠神经细胞凋亡而发挥脑保护作用。

本实验在前期研究基础上进一步发现,健脾补土方可能通过上调 Occludin、Claudin-5、p-BAD、Bcl-2 蛋白表达水平,抑制 Caspase-3 的表达,从而达到治疗脑卒中后神经损伤的作用。本研究从微观层面揭示了健脾补土方治疗脑卒中的可能作用机制,为健脾补土方多靶点干预脑卒中提供理论依据,为临床治疗脑卒中提供更多可行策略。

### 参 考 文 献

- [1] 李福海, 苏凤哲, 张小光, 等. 中医之气与脾胃关系的理论探索[J]. 环球中医药, 2021, 14(11):2000-2002.
- [2] 李花, 刘旺华, 廖亮英, 等. 健脾补土方治疗缺血性脑卒中后遗症疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3):73-74.
- [3] 刘旺华, 李花, 周小青. 论神经细胞外基质与中医脾土相关及其对脑缺血保护的启示[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, (17)3:5-6, 56.
- [4] 陈岩岩, 李花, 刘旺华, 等. 加味四君子汤通过调控 Fibulin-5, p-Akt 表达抗脑缺血大鼠神经细胞失巢凋亡机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1):112-120.
- [5] 陈显文, 李花, 刘旺华, 等. 健脾补土组方对体外神经元低氧/复氧后 PI3K、Akt、Caspase-3 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(10):1063-1069.
- [6] KONG F, WANG H, GUO J, et al. Hsp70 suppresses apoptosis of BRL cells by regulating the expression of Bcl-2, cytochrome C, and caspase 8/3[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(5):568-575.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [8] 魏伟, 吴希美, 李元建, 主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [9] Zaidi H A, Zabramski J M, Safavi-abbasi S, et al. Spontaneous Intracerebral Hemorrhage[J]. *World Neurosurg*, 2015, 84(5): 1191-1192.
- [10] 刘向哲, 宋艳芳, 王彦华, 等. 基于关键证候演变规律探讨急性缺血性中风的辨治[J]. 中医杂志, 2021, 62(23): 2051-2054.
- [11] 梁玮钰, 吕翠霞. 基于脾虚病机的中风及其恢复期探讨[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3):661-662.
- [12] ZHONG X, Rescorla F J. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(2):393-401.
- [13] Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson P T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(3):C343-C356.
- [14] Persidsky Y, Ramirez S H, Haorah J, et al. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006, 1(3): 223-236.
- [15] 李花, 胡康丽, 刘旺华, 等. 健脾益气利水方对脑缺血大鼠脑水肿及其脑组织 Occludin、Claudin-1、ZO-1 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11):5424-5428.
- [16] Taddei M L, Giannoni E, Fiaschi T, et al. Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases [J]. *J Pathol*, 2012, 226(2):380-393.
- [17] XUE X, YOU Y, TAO J, et al. Electro-acupuncture at points of Zusanli and Quchi exerts anti-apoptotic effect through the modulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 558:14-19.
- [18] Hlavac M, Dwucet A, Kast R E, et al. Combined inhibition of RAC1 and Bcl-2/Bcl-xL synergistically induces glioblastoma cell death through down-regulation of the Usp9X/Mcl-1 axis [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(3):287-301.
- [19] 冯健愉, 朱玉山, 陈佳, 等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(8):1477-1489.
- [20] ZHAO W, LI H, HOU Y, et al. Combined administration of poly-ADP-ribose polymerase-1 and caspase-3 inhibitors alleviates neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats [J]. *World Neurosurg*, 2019, 127):e346-e352.
- [21] 唐冰镕, 李花, 刘旺华, 等. 加味四君子汤对脑缺血大鼠脑组织 Occludin、Claudin-1、ZO-1 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15):57-63.
- [22] 胡康丽, 李花, 刘旺华, 等. 四君子汤加减对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织 ERK1/2、Akt、Bax 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13):152-158.

(收稿日期: 2022-08-10)

(本文编辑: 李梅)