

滋补肝肾中药对局灶性脑缺血大鼠 脑内基质金属蛋白酶表达的影响※

● 付 强¹ 郭春莉¹ 指导:王新陆²

摘 要 目的:脑梗死后星形胶质细胞的过度活化将形成胶质瘢痕阻碍轴突生长,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是分解细胞外基质的蛋白酶类中最重要的一类。本实验拟研究滋补肝肾中药复健片对局灶性脑缺血大鼠脑内 MMP-2、MMP-9 表达的影响,探讨复健片治疗缺血性卒中的作用机理。方法:雄性 Wistar 大鼠 49 只随机分为假手术组、模型组(分设 1w、2w、3w 组)、给药组(分设 1w、2w、3w 组),模型组与给药组进行右侧近端大脑中动脉电凝术造成大鼠局灶性脑缺血模型,假手术组行同样开颅术,但不凝闭大脑中动脉,其余操作同模型组。于造模成功后第 6 天起药物组灌胃给予复健片,剂量为 9g 生药/kg/d,余二组分别灌胃给予同等量生理盐水,日 1 次。分别在相应时间点取材后用酶联免疫吸附法检测 MCAO 大鼠脑内 MMP-2、MMP-9 的表达。结果:模型组 MMP-2、MMP-9 活性在给药 1 周后较假手术组有显著差异,说明造模成功;模型组在给药 1 周、2 周和 3 周后无差异;药物组在治疗 2 周和 3 周后同组间较前期有差异,说明 MMP-2、MMP-9 活性随着用药时间的延长逐渐表达增强;药物组在治疗 1 周后 MMP-2、MMP-9 活性较同期模型组尚无显著差异,但 2 周及 3 周后表达显著增强,与同期的模型组产生了显著差异。结论:复健片治疗缺血性卒中的作用机理可能与后期上调 MMP-2、MMP-9 的表达,从而抑制胶质瘢痕的形成,以解除神经功能重塑的负面因素有关。

关键词 复健片 缺血性卒中 MMP-2 MMP-9

中枢神经系统内的胶质细胞和神经元共同形成一个统一的有机体,胶质细胞参与神经元功能的调节,并在联系和维持神经元生存的微环境中起重要作用。而星形胶质细胞(Astroglia, As)是中枢神经系统最主要的大胶质细胞。脑缺血缺氧后,星形胶质细胞的反应性活化,对神经元具有“双刃”作用^[1]。瘢痕阻碍轴突生长的成分主要是胶原,而明胶酶是唯一能降解Ⅳ型胶原三螺旋部位的酶类。Ⅳ型胶原酶主要包括明胶酶 A(MMP-2)和明胶酶 B(MMP-9),通常情况下只以酶原的形式存在,机体主要通过对其基因表达、酶原激活、活性抑制等步骤的调控来控制其降解作用。因此,研究药物对 MMP-2 及 MMP-9 的调控作

用,可以减少损伤诱导的基膜沉积,从而有利于神经纤维延长穿过损伤区,沿着原先的路径重新支配靶目标,重新髓鞘化,恢复正常传导,使星形胶质细胞的功能扬长避短,对防治神经系统疾病具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 实验设计 随机对照的动物实验研究。

1.2 单位 实验在山东大学医学院药理实验室、山东中医药大学附属医院完成。

1.3 材料 实验动物:取雄性 Wistar 大鼠(清洁级),体重约 250~300g,共 49 只(山东大学实验动物中心提供,动物合格证号:鲁动质字 20030004)。单笼饲养一周,自由饮水和摄食。饲养室温度 24~25℃,相对湿度 7% 左右,光照明暗比为 13:11。

1.4 实验仪器 造模所需仪器:显微手术钻,XSZ-2 型,上海光电公司;双极电凝器, SJ-2 型,上海光电公司;WT11001R 型电子天平,江苏省常州市万得天平

※基金项目 高等学校教育部博士学科点专项科研基金资助课题(No:20040441018)

• 作者单位 1. 山东中医药大学中医内科学博士研究生(250014); 2. 山东中医药大学临床学院(250014)

仪器厂;电热恒温水槽,DK-600 型,上海精宏实验设备有限公司;手术显微镜,光学显微镜均为上海医用光学仪器厂产品;大鼠固定器。

指标检测所需仪器:GZY-DH 型电热恒温干燥箱,宁波医疗器械二厂;SEAC 型全自动酶标仪,意大利进口;电热恒温水浴箱,北京长安科学仪器厂;高速离心机,德国进口;手工匀浆器;20 μ L、100 μ L、1000 μ L 移液器及吸头。

1.5 实验药品及试剂 复健片(由山东鲁信药业有限公司生产,批号:20030115,主要药物为何首乌、桑寄生、草决明、海马、淫羊藿);戊巴比妥钠购自上海化学试剂采购供应站分装厂;注射用青霉素钠购自山东鲁抗医药股份有限公司;氯代三苯基四氮唑(红四氮唑,TTC)购自上海试剂三厂;MMP-2、MMP-9 酶联免疫试剂盒购自美国 Bionewtrans Pharmaciutical Biotechnology 公司,批号:36331。

1.6 实验方法

1.6.1 动物分组及造模 大鼠按统计学随机数字表法随机分为假手术组、模型组(分设 1w、2w、3w 组)、给药组(分设 1w、2w、3w 组),每组各 7 只,共 49 只。模型组和给药组按 Tamura[2]的方法稍加改进进行右侧近端大脑中动脉电凝术制备大鼠局灶性脑缺血(MCAO)模型。麻醉醒后 24h 内出现①左侧肢体痛刺激收缩现象消失;②向左侧倾倒或转圈;③提尾时左上肢不能向前伸直。具备以上 3 项为大鼠局灶性脑缺血模型复制成功,纳入实验,进行分组,余者弃之。假手术组大鼠行同样开颅术,但不凝闭大脑中动脉,其余操作同模型组。因手术死亡 5 只。

1.6.2 给药及取材 在造模的基础上给予复健片灌胃,给药组分别于造模成功后第 6 天起开始给予复健片灌胃,剂量为 9g 生药/kg/d,假手术组与模型组分别给予等量的生理盐水。注:大鼠在进行右侧近端大脑中动脉电凝术后,因伤口疼痛、舌肌瘫痪等原因严重影响动物主动进食,为了保证其营养供应,特在每日早晨和晚间分别灌胃给予 5ml 牛奶,并将普通大鼠饲料进行软化,制作成球状投入鼠笼中便于其摄取。分别于给药 1w、2w、3w 时断头处死大鼠,并取梗死灶周围脑组织置于 -80℃ 冰箱保存备用待测。

1.6.3 指标检测 标本融化后仍然保持 2~8℃ 的温度。与匀浆缓冲液(0.01M PBS PH 7.4)以 1:9 的比例置于玻璃匀浆缓冲器中充分研磨混匀,制成体积分数为 10% 的脑匀浆。匀浆液置于试管中,离心 20 分钟左右(2000 转/分),仔细收集上清。取出一定量的

上清用 PBS 缓冲液稀释 10 万倍。采用酶联免疫吸附法测定分析 MMP-2、MMP-9 的活性。(1)取出酶标板,依照次序对应分别加入 50 μ l 的标准品于空白微孔中;(2)分别标记样品编号,加入 50 μ l 样品于空白微孔中;(3)在标准品孔和样品孔中加入 50 μ l 的生物素标记溶液;(4)37℃ 孵育反应 60 分钟;(5)洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 秒;(6)在标准品孔和样品孔中加入 50 μ l 的酶标记溶液;(7)37℃ 孵育反应 30 分钟;(8)洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 秒;(9)每孔加入底物 A、B 液各 50 μ l;(10)37℃ 下避光孵育反应 15 分钟;(11)每孔加入 50 μ l 终止液,终止反应。

1.6.4 结果判断及统计学分析 (1)仪器值:于波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值;(2)以 OD 值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,绘制曲线图;(3)根据样品的 OD 值查找对应的浓度范围;(4)敏感度:0.1ng/ml。

所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SAS 8.1 统计软件包对数据进行处理,多组计量资料的样本均数比较采用方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 和 $\alpha = 0.01$ 作为检验标准。

2 实验结果

2.1 实验动物数量分析 最初纳入动物 49 只,造模不成功或死亡 14 只,最后每组 5 只共 35 只大鼠进入结果分析。

2.2 复健片对局灶性脑缺血大鼠脑内基质金属蛋白酶表达的影响 见表 1。

表 1 复健片对 MCAO 大鼠 MMP-2、MMP-9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	时间	MMP-2 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	MMP-9 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
假手术组	5	给药 1w 后	334.17 \pm 6.68	536.17 \pm 8.31
	5	给药 1w 后	582.00 \pm 6.21 ^A	800.40 \pm 7.02 ^A
模型组	5	给药 2w 后	573.80 \pm 6.30 ^B	793.80 \pm 6.54 ^B
	5	给药 3w 后	565.00 \pm 9.10 ^B	787.33 \pm 6.77 ^B
	5	给药 1w 后	590.80 \pm 9.60 ^D	806.40 \pm 5.77 ^D
药物组	5	给药 2w 后	602.20 \pm 3.83 ^{CE}	819.40 \pm 7.50 ^{CE}
	5	给药 3w 后	613.20 \pm 7.23 ^{CE}	834.40 \pm 8.99 ^{CE}

注:与假手术组比较,AP < 0.01;与同组前期比较,BP > 0.05,CP < 0.05;同期组间比较,DP > 0.05,EP < 0.01。

结果显示,模型组 MMP-2、MMP-9 活性在给药 1 周后较假手术组有显著差异,说明造模成功;模型组在给药 1 周、2 周和 3 周后无差异;药物组在治疗 1 周、2 周和 3 周后同组间较前期有差异,说明 MMP-2、MMP-9 活性随着用药时间的延长逐渐表达增强;药物组在治疗 1 周后 MMP-2、MMP-9 活性较同期模型组尚

无显著差异,但2周及3周后表达显著增强,与同期的模型组产生了显著差异。

3 讨论

星形胶质细胞有利于可塑性修复作用发生,在缺血性脑损伤时其在损害区周围形成一胶质界膜,以减少缺血损伤扩大^[3],在正常组织、损伤区及血管之间起着特殊的运输作用,并分泌多种神经营养因子^[4],以促进中枢神经和周围神经轴索的生长和存活^[5],利于损伤的修复;但是另一方面过度的胶质化却可作为机械屏障影响髓鞘和轴索的再生,从而影响周围神经组织的结构修复和功能恢复。因而,星形胶质细胞在脑损伤中具有“双刃剑”作用,其在脑内的适度活化无疑具有重要的意义。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是分解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的蛋白酶类中最重要的一类。它们存在于正常人体,参与伤口愈合、妊娠分娩等生理过程,也参与了多种病理过程,包括肿瘤浸润、炎症反应等。近来研究表明,MMPs尤其是明胶酶(MMP-2、MMP-9)与脑血管病、脑肿瘤、脱髓鞘病变等关系密切^[6]。

瘢痕阻碍轴突生长的成分主要是胶原或基膜,其中Ⅳ型胶原是组成细胞外基质的主要结构蛋白,而Ⅳ型胶原酶/明胶酶是唯一能降解Ⅳ型胶原三螺旋部位的酶类。Ⅳ型胶原酶也被称为明胶酶(gelatinase),主要包括Mr分别为 72×10^3 和 92×10^3 的明胶酶A(MMP-2)和明胶酶B(MMP-9),通常情况下只以酶原的形式存在,机体主要通过对其基因表达、酶原激活、活性抑制等步骤的调控来控制其降解作用。脑缺血后涉及MMP活性表达的调节机制还不清楚。由于MMP基因结构中具有API(激活剂蛋白1)的结合位点,故认为某些早期基因如c-fos和c-jun可能参与了MMP表达的调节过程;同时,分裂原激活蛋白激酶信号传导路的激活可能也与此有关^[7]。MMPs几乎能够降解细胞外基质的所有成分^[8]。

有学者^[9]研究认为活性MMP-9于血管闭塞后3h即可检测到。另有研究结果显示,脑梗死病人发病2~5天内血浆MMP-9水平明显升高,而发病2周时血浆MMP-9水平降至正常^[10]。Romanic等^[11]则用含明胶的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)酶谱法检测大鼠MCAO后6至30天内MMP的脑内表达与活性,发现卒中后6h可检测到MMP-9活性,卒中后12h明显升高,24h表达最多。提示脑梗死早

期可以诱导MMP-9的表达,并呈现一定的时间效应。脑缺血诱导MMP-9表达升高的确切机制目前尚不清楚。多数学者认为中性白细胞、内皮细胞是脑梗死后早期表达MMP-9的细胞,受炎性介质的刺激,小胶质细胞也能产生^[12];晚期表达则见于巨噬细胞^[11]。学者研究发现,MMP-2及MMP-9的表达有时间依赖性,MMP-2在MCAO后6小时、12小时可见表达增加,在24小时、2天表达增加显著,在5天后达高峰,7天渐下降。MMP-9在MCAO后6小时可见表达增加,在12小时、24小时表达增加显著,在2天达高峰,5~7天渐下降。这种时间依赖与MMP-2及MMP-9在MCAO的作用密切相关^[13]。

因此,对脑缺血后期区域性MMP-2和(或)MMP-9表达的上调可以减少损伤诱导的基膜沉积,从而有利于神经纤维延长穿过损伤区,沿着原先的路径重新支配靶目标,重新髓鞘化,恢复正常传导功能。

肝肾精血之盛衰与神经元密切相关。中医范畴的“脑髓”似应涵盖神经元、神经干细胞、神经祖细胞、神经胶质细胞、基质细胞、胞外基质等脑内基本结构和功能单位^[14]。中医认为“肾”是神经系统、内分泌系统、免疫系统等功能的高度整合单位。肾主骨,生髓,为先天之本。脑为髓海,脑髓是脑实施功能的物质基础。故神经功能的重塑与肾密切相关。肝肾同源,肝藏血而且主疏泄,封藏于肾之精,需依赖于肝血的滋养而维持充足;肾脏生髓的功能,也依赖于肝气的疏泄作用而将血量调节得当。肝肾封藏疏泄有度,则血液运行正常;肝肾精血充盈,则脑髓生长旺盛。肝脏还具有生升阳气以启通诸脏的作用,维持脑髓再生之动力。是故肝肾无疑在维持脑内神经元的相对恒定,抗损伤修复机制中占主导地位。

复健片是导师在阅读了大量古今文献的基础上,结合多年的临床经验创制而成,是导师多年来用于缺血性卒中临床治疗的经验方。药物组成:何首乌、桑寄生、草决明、海马、淫羊藿。何首乌:苦甘性温,归肝肾经,可补肝肾、益精血,重用为君药。桑寄生味苦甘性平,归肝肾经,得桑之余气而生,质厚而柔,不寒不热,为补肾利血之要剂,可以益肝肾、强筋骨;草决明味甘性微寒,归肝肾、大肠经,既补肝肾又清肝热,与桑寄生共为臣药,助何首乌以达滋补肝肾之功。海马:味甘性温,归肝肾经,有温补肾元之功;淫羊藿味辛甘性温,归肝肾经,亦可温补肾元,与海马共为佐药,阳气充足,阴津得以上承,收阳中求阴之效。诸药合用,体现了调补肝肾,补益精血的治疗大法,可以图治中风之根本。

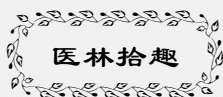
本实验发现,复健片可在用药 2 周后明显增强 MCAO 大鼠脑内 MMP-2、MMP-9 的表达,说明复健片可增强缺血性卒中后模型大鼠脑组织中的 MMP-2、MMP-9 的活性,充分调动其在卒中后期对神经系统损伤的各种修复机能,从而抑制胶质瘢痕的形成以解除神经功能重塑的负面因素。本研究从分子水平揭示了补益肝肾中药治疗缺血性卒中的作用机制,其研究结果有望为本病的治疗提供确切可行的治法和行之有效的中药制剂。从一定程度上揭示了“肾生髓”理论的物质基础。其研究结果对中医基础理论的发覆和创新,有一定借鉴意义和示范作用,有助于全面系统地认识和把握中医学,使中医学沿着多元化的模式发展。

参考文献

- [1] 刘之荣,段德新. 星形细胞在缺血性脑损伤中的可能作用[J]. 国外医学·脑血管疾病分册,2000,8(3):148-150.
- [2] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat; 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. Cereb Blood Flow Metab, 1981,1(1):53-60.
- [3] Sulkowski G, Bubko I, Struzynska L, et al. Astrocytic response in the rodent model of global cerebral ischemia and during reperfusion[J]. Exp Toxicol Pathol, 2002,54(1):31-38.
- [4] Dallner C, Woods AG, Deller T, et al. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain[J]. Glia, 2002,37(4):374-378.

2002,37(4):374-378.

- [5] Ajtai BM, Kalman M. Reactive glia support and guide axon growth in the rat thalamus during the first postnatal week. A sharply timed transition from permissive to non-permissive stage[J]. Int J Dev Neurosci, 2001,19(6):589-597.
- [6] 章 昀,黄鉴政. 基质金属蛋白酶与神经系统疾病[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册,2002,29(2):140.
- [7] Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases[J]. J Biol Chem, 1999,274(31):21491-21494.
- [8] 牛光明,万 锋,李 俊,等. MMP-2、TIMP-2 在脑胶质瘤中的表达及其意义[J]. 中国临床神经外科杂志,2004,9(4):260.
- [9] Fujimura M, Gasche Y, Morita Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion[J]. Brain-Res, 1999,842(1):92-100.
- [10] 章 昀,黄鉴政,闻树群,等. 缺血性脑卒中血浆 MMP-9 的测定及临床意义[J]. 心脑血管病防治,2002,2(4):8.
- [11] Romanic AM, White RF, Arleth AJ, et al. Matrix metalloproteinase expression increase after cerebral focal ischemia in rats; Inhibition of matrix metalloproteinases-9 reduces infarct size[J]. Stroke, 1998,29(8):1020-1030.
- [12] Colton CA, Keri JE, Chen WT, et al. Protease production by cultured microglia; substrate gel analysis and immobilized matrix degradation[J]. J Neurosci Res, 1993,35:297-304.
- [13] 周 进. MMP-2 及 MMP-9 在缺血再灌注大鼠脑中的表达及意义[J]. 辽宁医学杂志,2005,19(4):176.
- [14] 熊 露,田少霞,范吉平,等. 中医药治疗缺血性中风研究探讨[J]. 中医杂志,2004,45(1):5-7.



骨碎补趣谈

骨碎补,又名猴姜,为水龙骨科多年生草本附生蕨类植物,主产于我国浙江、福建、台湾、广东、广西、江西、湖北、四川、贵州、云南等地。

说起骨碎补和猴姜这两个名字的来历,还流传着一个神奇的故事。传说唐代开元年间,有一位老药农,养了一只小猴子。这只猴子机灵可爱,老药农经常带着它上山采药。有一天,小猴不慎从悬崖上摔下来,跌断了小腿骨。老药农用草药为它治伤,不见好转。夜里,小猴躺在草窝里疼得嗷嗷直叫,恰巧被路过此地的一只老猴发现。老猴窥视周围见没有什么动静,便从窗子跳进草窝里,查看了小猴受伤的小腿后,低低地叫了几声就走了。第二天凌晨,老猴嘴里叼着一些草药又跳进草窝里,将那草药的块根嚼烂敷在小猴腿伤处后,便悄悄离去。几天后,小猴的腿伤竟奇迹般地痊愈了,又活蹦乱跳起来。老药农十分高兴。他仔细观察小猴窝里的草药,只见其根粗壮扭曲,略似猴形,再尝尝味道,辛辣如姜,便给它取名“猴姜”。此后,老药农经常采挖“猴姜”为乡亲们治疗骨伤,证实此药对治疗跌打损伤、骨折确有奇效。不久,唐玄宗李隆基因荡秋千,不慎跌坏腰脊骨,痛楚异常,虽经御医多方诊治,均未见效。他命令张贴皇榜寻求良医。老药农闻讯前去揭了皇榜,用“猴姜”治愈了唐玄宗的腰伤。玄宗大喜,问明此药的来历,认为它治疗跌打损伤、骨折疗效甚佳,遂赐名“骨碎补”。从此,“骨碎补”的名字便流传下来。

关于骨碎补得名,虽有多种说法,但确与其功效有关。《本草拾遗》记载:“骨碎补,本名猴姜,以其主伤折、补骨碎,故命此名。”中医认为,骨碎补性温,味辛苦,具有补肾强骨、活血化瘀、消肿止痛、接骨续伤、祛风除湿的功效,可用于治疗肾虚腰痛、腰肌劳损、腰膝疼痛、跌打闪挫、损伤筋骨、外伤肿痛等症。特别是骨碎补鲜品治疗胸肋挫伤、骨折伤,其止痛的功效非常显著。