

· 实验研究 ·

益气活血法对脑出血大鼠脑内凝血酶敏感蛋白-1 及其受体 CD36 表达的影响

陈柏林, 邢之华, 唐涛*, 刘宜峰, 阳鹤鹏, 刘清娥, 吴汉军

(中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 通过观察益气活血法对脑出血大鼠脑内损伤区凝血酶敏感蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)及其受体 CD36 表达的影响,初步探讨益气活血法治疗脑出血的机制。方法 将 155 只 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、益气活血组、益气组和活血组;用Ⅶ型胶原酶诱导脑出血大鼠模型,再对相应的组分别灌服补阳还五汤及该方的益气药组和活血药组,在不同的时间点取脑组织并用免疫印迹(Western-blotting)分析鼠脑 TSP-1 及 CD36 的表达。结果 正常组和假手术组不同时间点 TSP-1 和 CD36 表达无明显变化。模型组 TSP-1 在脑出血后 4 d 达高峰,CD36 分别在脑出血后 4、28 d 达高峰。益气活血组 1 d TSP-1 表达低于模型组($P<0.01$),4 d TSP-1 和 CD36 表达均低于模型组($P<0.01$),28 d CD36 表达高于模型组($P<0.01$)。结论 益气活血法有可能通过影响脑出血后损伤区 TSP-1 及其受体 CD36 的表达,降低其对血管新生的抑制作用,促进新生血管形成、成熟和脑组织修复。

关键词:脑出血;益气活血法;凝血酶敏感蛋白-1;受体;免疫印迹

中图分类号:R743.34

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2011)04-0342-04

Effects of Replenishing Qi and Promoting Blood Circulation Treatment on the Expression of Thrombospondin-1 and Receptor CD36 of Intracerebral Hemorrhagic Rats

CHEN Bo-lin, XING Zhi-hua, TANG Tao*, LIU Yi-feng, YANG He-peng, LIU Qing-e, WU Han-jun

(Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central-south University, Changsha, 410008, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To make a primary study of the mechanism of replenishing qi and promoting blood circulation treatment for curing intracerebral hemorrhage (ICH) rats by observing the expression of thrombospondin-1 (TSP-1) and its receptor CD36. **METHODS** 155 SD rats were randomly divided into six groups, namely normal group, sham operated group, ICH model group, replenishing qi and promoting blood circulation treatment group, replenishing qi group and promoting blood circulation treatment group. ICH model was established by injecting collagenase type Ⅶ, while replenishing qi group, promoting blood circulation treatment group and replenishing qi and promoting blood circulation treatment group were respectively administered with replenishing qi decoction, promoting blood circulation treatment decoction and Buyang Huanwu Decoction. Afterwards, brain tissue was extracted different and the expression of TSP-1 and CD36 were detected by western blotting. **RESULTS** There was no significant changes in the expression of TSP-1 and CD36 between normal group and sham operated group at different time. In ICH model group, TSP-1 reached peak on the fourth day, CD36 on the 4th and 28th day. In replenishing qi and promoting blood circulation treatment group, the expression of TSP-1 was lower than that in model group on the 1st day($P<0.01$); the expression of TSP-1 and CD36 was both lower than that in model group on the 4th day($P<0.01$); the expression of CD36 was higher than that in model group on the 28th day($P<0.01$). **CONCLUSION** Replenishing qi and promoting blood circulation treatment may regulate the expression of TSP-1 and its receptor CD36 in ICH rat, thus it can lower the inhibiting effect on angiogenesis and promote the shaping and maturity of new blood vessels as well as the recovery of brain tissue injury.

KEY WORDS: ICH; replenishing qi and promoting blood circulation treatment; TSP-1; receptor; Western blotting

收稿日期:2010-12-28;修稿日期:2011-03-11

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30400581),中国博士后科学基金(2005038224),湖南省博士后专项资助计划(2006FJ4244),湖南省青年骨干教师培养对象经费(湘教通[2005]247号)

作者简介:陈柏林(1982-),男,湖南新宁人,中南大学湘雅医院 2009 级博士研究生。*通信作者:falcontang@126.com

脑出血属于中医“中风”范畴,继往认为其病因病机有风、痰、火、气、血、虚等6端,属本虚标实之证,治疗多从风痰论治。近代以来众多学者开始深入探讨脑出血的病机(如张山雷提出“血冲脑”之说,张锡纯将中风分为脑充血和脑贫血,认为脑充血成因为“血之与气并走于上”),并结合“离经之血便是瘀”的理论,开始将急性脑出血归于中医血证,认为血溢脉外是发病的原因,血蓄于脑是基本的病机,也是治疗的关键。其中王清任根据“气能行血”理论创制的益气活血经典方补阳还五汤在脑出血治疗中效果显著,已证实其有改善微循环,改善缺血缺氧,保护脑细胞,促进血肿吸收及脑水肿消退,抑制炎症反应等作用^[1]。脑出血损伤区随着血肿、水肿的吸收,炎症的消退,必然要开始损伤组织包括血管的修复和重建,最后恢复脑组织功能。益气活血法是否也改变着血管重建的过程,而发挥其“祛瘀生新”的作用。本文将通过观察血管新生抑制因子凝血酶敏感蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)及其受体 CD36 在脑出血鼠脑模型中的表达规律及益气活血法干预后的变化规律来进行初步探讨。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级健康 SD 大鼠 155 只,雌雄各半,体重(220±20) g,鼠龄 8~12 周,动物及饲料由中南大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与药物

Ⅶ型胶原酶、Protease inhibitor cocktail 均为美国 Sigma 公司产品;BCA 蛋白浓度测定试剂盒为美国 Pierce 公司产品;TSP-1 及 CD36 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗山羊 IgG(二抗)为 VECTOR 公司产品;内参 GAPDH 为上海康成生物公司产品;LumiGLO Western Blotting Kit 为美国 KPL 公司产品;生药(黄芪、赤芍、当归、川芎、桃仁、红花、地龙)由湘雅医院药剂科中药房提供。

1.3 主要仪器

Stoel Ting TL-2 鼠脑立体定位仪产自美国;Mini-PROTEAN R3 电泳仪产于美国 Bio-Rad 公司;高速低温离心机为美国 Sigma 公司产品。

2 方法与结果

2.1 动物造模

参照 Rosenberg 方法复制脑出血大鼠模型,用 10%水合氯醛腹腔注射(400 mg/kg)麻醉后,将大鼠俯卧固定于鼠脑定位仪上,局部消毒,切开皮肤,颅骨窗型切开,苍白球定位:取前囟后 1.40 mm,右旁开 3.20 mm 处垂直进针 5.60 mm,以微量进样器缓慢注入含 0.5 U Ⅶ型胶原酶的生理盐水 2.5 μL,2 min 注完,留针 5 min,拔针缝合皮肤,局部络合碘消毒。假手术组以同样方法注入灭菌生理盐水 2.5 μL。

2.2 样品制备

补阳还五汤全方(剂量参照《中医方剂大辞典》,彭怀任主编)(黄芪:赤芍:当归:川芎:桃仁:红花:地龙用量按照 20:3:3:2:3:3:3 比例)及补阳还五汤益气组分(黄芪)与补阳还五汤活血组分(赤芍、当归、川芎、桃仁、红花、地龙)生药材均从中南大学湘雅医院中药房一次选购,每方均用蒸馏水煎 2 次,各方煎剂分别浓缩为 3.08 g/mL、1.62 g/mL 和 1.46 g/mL,4℃保存备用。

2.3 动物分组及处理

155 只 SD 大鼠按随机数字表法分成 6 组,除正常对照组 5 只外,其余各组设 6 个时间点:1、4、7、14、21、28 d,每个时间点 5 只大鼠,正常组 5 只,自由进食、饮水,不做手术;假手术组 30 只,大鼠麻醉后,手术注入 2.5 μL 生理盐水,蒸馏水灌胃,2 mL/次,2 次/d;模型组 30 只,手术注入 2.5 μL 含 0.5 U Ⅶ型胶原酶生理盐水,蒸馏水 2 mL 灌胃,2 次/d;益气组、活血组和益气活血组各 30 只,分别用各自方药灌胃,每次 2 mL,每日 2 次,每日剂量分别为 7.30、8.10、15.40 g/kg(按体表面积计算,为临床 70 kg 成人用量的 3 倍)。各组于术后第 1、4、7、14、21、28 天取 5 只大鼠(正常组 5 只大鼠在第 28 天),用 10%水合氯醛(800 mg/kg)麻醉,断头法取脑,置低温冰箱备用。

Western blot 检测鼠脑 TSP-1 和 CD36 表达 RIPA 裂解液(含 Tris-HCl、NaCl、脱氧胆酸钠、SDS、NP-40、Triton X-100)提取脑组织总蛋白,玻璃匀浆器冰上裂解 30 min,匀浆液低温离心(4℃,12 000 r/min)30 min,取上清液,4:1 加 5 倍上样缓冲液,100℃沸水浴变性 5 min;BCA 试剂盒测蛋白浓度;20 μg/泳道,100 V 恒压 1 h 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,制作“海绵板—三层

滤纸—胶—PVDF 膜—三层滤纸—海绵板”三明治, 100 mA 恒流 2 h 转膜; 封闭 2 h, 一抗 4 ℃ 孵育过夜(稀释比例 1 : 200), 洗膜 3 × 5 min + 1 × 10 min, 二抗室温孵育 2 h(稀释比例 1 : 10 000), 洗膜 3 × 5 min + 1 × 10 min; 暗室中 ECL 化学发光, 胶片显影、定影。膜用洗脱液洗脱, 封闭 2 h, 内参 GAPDH 室温孵育 2 h, 洗膜 3 × 5 min + 1 × 10 min, 发光剂孵育 1 min, 暗室显影、定影。

2.4 统计分析

胶片用扫描仪将图像输入电脑, Imagepro-plus6.0 图像分析软件测定 TSP-1、CD36 和内参 GAPDH 条带平均光密度值, TSP-1 和 CD36 相对表达量分别用其与内参的平均光密度值的比值表示; 所有实验数据均采用 SPSS 12.0 统计软件处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组

间比较采用 *t* 检验, 多组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.5 结果

正常组和假手术组不同时间点 TSP-1 和 CD36 表达无明显变化。模型组 TSP-1 在脑出血后 1 d 开始表达, 4 d 达高峰, 4 ~ 14 d 逐渐下降, 14 ~ 28 d 各时间点表达无差别。益气活血组和活血组 TSP-1 表达在 1 d 和 4 d 均低于模型组 ($P < 0.01$), 益气组 TSP-1 表达在 4 d 低于模型组 ($P < 0.01$) (图 1, 图 2); 模型组 CD36 在脑出血后 1 d 开始表达, 4 d 达高峰, 4 ~ 14 d 逐渐下降, 14 ~ 28 d 开始上升并于 28 d 再次达高峰, 4 d 模型组 CD36 表达高于其它 3 组 ($P < 0.01$), 28 d 益气活血组 CD36 表达高于其它 3 组 ($P < 0.01$) (图 3)。

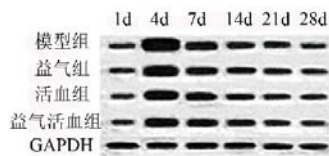
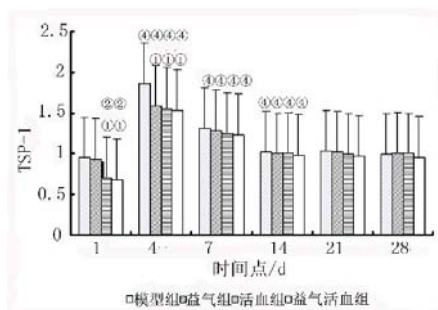


图 1 TSP-1 与 GAPDH 免疫印迹条带



注: 与模型组比较, ① $P < 0.01$; 与益气组比较, ② $P < 0.01$;

与活血组比较, ③ $P < 0.01$; 与本组前一时间点比较, ④ $P < 0.01$ 。

图 3 益气活血法对脑出血后大鼠 TSP-1 (左图)、CD36 (右图) 表达的影响

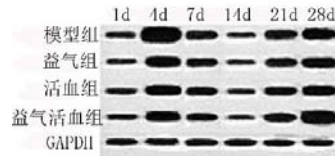
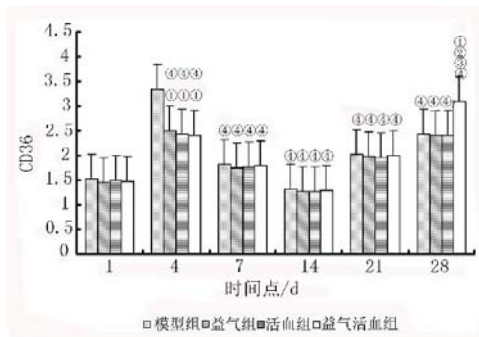


图 2 CD36 与 GAPDH 免疫印迹条带



3 讨论

TSP-1 是一个功能复杂的基质糖蛋白, 其与内皮细胞上的 B 族清道夫家族受体 CD36 结合后可通过抑制内皮细胞的增殖和迁移^[2]、诱导血管内皮细胞凋亡^[3]、调节基质金属蛋白酶和金属蛋白酶组织抑制剂表达^[4]等多种机制抑制血管新生。由内皮细胞、巨噬细胞等分泌的 TSP-1 则可与单核细胞上的 CD36 结合, 诱导单核细胞粘附迁移并促其转变为巨噬细胞进而吞噬坏死组织及凋亡细胞^[5]。

清代名医王清任将“因虚至瘀”的观点和“气行则血行”等中医基本理论相结合, 创制补阳还五

汤治疗中风。以大量补气药与少量活血药相配, 使气旺则血行, 活血不伤正, 共奏补气活血通络之功。现代用其治疗急性脑出血, 已证实其有改善微循环, 改善缺血缺氧, 保护脑细胞, 加速纤维蛋白溶解, 促进血肿吸收, 促进脑水肿消退及抗炎抗渗出等作用。本实验则观察到该方能降低脑出血大鼠脑内 TSP-1 在急性期的表达和上调 CD36 在恢复期的表达, 对脑出血后脑血管重建有着明显影响。

脑出血后 1 d, 损伤区止凝血机制启动, 凝血酶刺激血小板活化, 释放 TSP-1, 促进血小板聚集和黏附。黄芪和赤芍等活血药配伍后可显著协同

发挥抗血小板和抗血栓形成作用^[6],使得益气活血组 TSP-1 表达减弱。脑出血 4 d 时损伤区处于炎症反应阶段,炎症刺激内皮细胞和巨噬细胞等分泌 TSP-1,与 CD36 结合后诱导巨噬细胞粘附迁移并吞噬坏死组织和凋亡细胞,凝血酶的持续释放也继续刺激血小板分泌 TSP-1,使得 TSP-1 在该时间点表达活跃。活血药有明显的减轻炎症的作用,黄芪也能明显改善血肿周围微循环,减轻缺血缺氧和细胞凋亡^[7],因此使用活血药和黄芪的 3 个组凝血酶活性减低,炎症坏死及细胞凋亡反应减轻,TSP-1 表达较弱。CD36 在该时间点表达高峰的原因,除作为 TSP-1 受体而呈一定的协调作用外,还可能与脑出血后发生的脂质过氧化有关^[8]。CD36 可通过介导巨噬细胞对氧化低密度脂蛋白的识别和吞噬而抑制脂质过氧化反应^[9],而活血药和黄芪均有明显清除自由基生成,减轻脂质过氧化的作用^[10],使得含有活血药和黄芪的 3 组 CD36 表达较弱。

4~14 d 该时间段脑组织损伤区凝血反应已经停止,炎症反应逐渐消退,损伤脑组织进入修复阶段,破坏的微血管开始新生过程,TSP-1 的下降与各种血管新生因子积极表达及血管新生活跃有关,通过降低 TSP-1 抑制血管新生的作用,保证血管新生及微循环重建的顺利进行和新生血管的成熟。而 CD36 在 4~14 d 逐渐下降后又再次上升并在 28 d 达第 2 个高峰,这可能与 CD36 功能的多样性及配体的广泛性有关,推测 CD36 作为 TSP-2 抗血管新生的受体可能在脑出血血管新生后期与 TSP-2 的表达呈现出协调性^[11]。28 d 时益气活血组 CD36 表达最强,其机制可能是益气活血药物在血管新生趋于结束时能上调 CD36 表达水平,CD36 通过与 TSP-2 结合抑制血管过度增殖,来保证整个血管新生过程的顺利和效率。

综上所述,益气活血法有可能通过影响脑出血后损伤区 TSP-1 及其受体 CD36 的表达,在血管新生开始时下调 TSP-1 及 CD36 水平,降低其对血管新生的抑制作用,有利于血管新生及微循环重建,并在血管新生结束时上调 CD36 水平,抑制血管过度增殖,使整个血管新生过程更有效率,从而在脑出血治疗中发挥促进损伤区血管重建和

脑组织修复的作用,这为在急性脑出血早期运用益气活血法的合理性提供了另一个佐证。

参考文献:

- [1]齐勇,唐涛,罗杰坤,等.益气活血法对脑出血大鼠血肿区血管新生的形态学影响[J].中国康复,2007,22(3):150-151.
- [2]Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, et al. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells[J]. J Cell Biol,1997,138(3):707-717.
- [3]Morgan-Rowe L, Nikitorowicz J, Shiwen X, et al. Thrombospondin-1 in hypoxia conditioned media blocks the growth of human microvascular endothelial cells and is increased in systemic sclerosis tissues[J]. Fibrogenesis Tissue Repair,2011,4(1):13.
- [4]John AS, Hu X, Rothman VL, et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion[J]. Exp Mol Pathol, 2009,87(3):184-188.
- [5]Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004,36(6):1115-1125.
- [6]杨洁红,张宇燕,王华锋.养阴益气活血方对培养人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的作用[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):3-5.
- [7]俞国平,戴良珏,方敏,等. Effects of supplementing qi and activating blood circulation on piamatral microcirculation in gerbils with cerebral ischemic reperfusion[J]. 中国临床康复,2006,10(31):162-164.
- [8]Titova E, Ostrowski RP, Rowe J, et al. Effects of superoxide dismutase and catalase derivatives on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats[J]. Acta Neurochir Supp,2008,105:33-35.
- [9]蒋汉明,张凤珍,翟静,等. ω -3 多不饱和脂肪酸与人类健康[J]. 预防医学论坛,2005,1(1):65-66.
- [10]马玉杰,陈强.四种活血化淤类中药注射液清除氧自由基作用的比较[J].第二军医大学学报,2000,21(5):492-493.
- [11]陈柏林,邢之华,唐涛,等.益气活血法对脑出血大鼠脑内凝血酶敏感蛋白-2 表达的影响[J].中国中医急症,17(7):954-956.

(编辑:李伟东 董宇)