

髓复康对大鼠脑缺血损伤区内髓鞘相关蛋白和硫酸软骨素蛋白多糖表达的影响^Δ

张平*, 胡佩岩, 李国辉[#](中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

中图分类号 R285;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0583-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.03

摘要 目的:研究髓复康对大鼠脑缺血损伤区内髓鞘相关蛋白(MAG)和硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs)的影响。方法:通过Koizumi法复制SD大鼠单侧大脑中动脉阻塞模型(MACO),将SD大鼠随机分为正常对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、甲基强的松龙(30 mg/kg)和髓复康高、中、低剂量(50、25、12.5 g/kg)组,各组又分别在给药8、15、30 d取大鼠脑组织,通过免疫组化法检测各组脑缺血损伤区MAG和CSPGs的表达。结果:在相应时间点,与模型组比较,髓复康高、中、低剂量组MAG和CSPGs表达显著减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:髓复康可以抑制脑缺血损伤区MAG和CSPGs的表达,通过改善脑缺血损伤区轴突再生的微环境,促进脑缺血损伤后轴突的再生。

关键词 髓复康;脑缺血损伤;硫酸软骨素蛋白多糖;髓鞘相关蛋白

Effects of Suifukang on the Expression of MAG and CSPGs in Cerebral Ischemic Injury Area of Rats

ZHANG Ping, HU Pei-yan, LI Guo-hui (Wangjing Hospital of China Academy of CMS, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of Suifukang on the expression of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) and myelin-associated glycoprotein (MAG) in cerebral ischemic injury area of rats. METHODS: Middle cerebral artery occlusion (MACO) model of SD rats were induced and randomized into normal group (isovolumic saline), model group (isovolumic saline), methylprednisolone group (30 mg/kg), Suifukang high-dose, medium-dose and low-dose groups (50, 25, 12.5 g/kg). Cerebral tissues of rats were collected after 8 d, 15 d and 30 d treatment. The expressions of CSPGs and MAG were detected by immunohistochemistry assay. RESULTS: Compared with model group, the expressions of CSPGs and MAG in Suifukang high-dose, medium-dose and low-dose groups were less ($P<0.01$ or $P<0.05$) in the corresponding time point. CONCLUSION: Suifukang can inhibit the expression of CSPGs and MAG, and improve the microenvironment of axon regeneration in cerebral ischemic injury area so as to promote axon regeneration after cerebral ischemic injury.

KEY WORDS Suifukang; Cerebral ischemia injury; CSPGs; MAG

脑缺血损伤的修复再生一直是神经科学领域内尚未解决但是又迫切需要解决的一道难题,成年哺乳动物中枢神经系统损伤后轴突不能有效再生,往往是不可逆性功能丧失的主要原因。在影响损伤神经元轴突再生的微环境中,胶质瘢痕分泌的以硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs)为主的大量抑制因子,是严重阻碍轴突再生的化学屏障^[1]。CSPGs是神经系统细胞外基质成分中的一类蛋白多糖,其中以NG2的轴突抑制作用最明显。髓鞘相关蛋白(MAG)也是目前研究比较多的具有明确抑制轴突再生作用的关键蛋白之一^[2],MAG是神经髓鞘的重要组成部分,直接与轴突接触抑制神经元轴突发芽。有学者认为CSPGs和MAG等蛋白的高表达是导致中枢神经系统损伤后轴突再生失败的主要原因。髓复康为益气活血补肾方,功能主要为益气升阳、活血通络、补肾生髓。黄宇明等在对髓复康的研究中发现其可促进中枢神经系统损伤后的轴突再生^[3]。本研究旨在利用免疫组化法,分析髓复康对抑制轴突再生的CSPGs与MAG的调节作用,为中药治疗脑缺血损伤修复提供一定的理论基础。

1 材料

1.1 仪器

EG1150H型包埋机、RM2235型切片机、H II 210型摊片机(德国Leica公司);BX51显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

甲基强的松龙(Methylprednisolone, MP, 济南健仁祥药业有限公司,批号:20120403,规格:40 mg/支);髓复康(中国中医科学院望京医院药房制剂室,质量浓度:2.5 g/ml);乙醇、二甲苯(北京化学试剂公司);哈瑞氏苏木素染液(天合力恩试剂公司);CSPGs一抗(英国Abcam公司);GAP-43一抗(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.3 动物

清洁级成年SD大鼠144只,♂,体质量220~240 g,购自维通利华实验动物中心[动物使用合格证号:SCXK(京)2007-0001]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

参照Koizumi法复制大鼠右侧大脑中动脉阻塞再灌注(MACO)模型,从颈总动脉分叉处插入4-0丝线,沿颈内动脉进入距离颈总动脉分叉处约2.0 cm处停止,1 h后拔出丝线进行缺血再灌注。实验分为6组,即正常对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、甲基强的松龙(30 mg/kg)与髓复康高、

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30701094)

* 副主任医师。研究方向:神经药理学。电话:010-84739055。

E-mail: pinglele@sina.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:中药药理学。E-mail: pinglele@sina.com

中、低剂量(50、25、12.5 g/kg)组。各组根据给药时间不同,分为8、15、30 d 3个亚组。术后待大鼠清醒后开始ig给药,甲基强的松龙组隔日1次,其余组每天1次。

各组均是每3天称体质量1次,重新计算每只大鼠药量,直至取材时。各亚组在相应的取材时间点ip 0.4%戊巴比妥钠(40 mg/kg),4%多聚甲醛(调pH值为7.2~7.4)经心脏主动脉插管灌注处死大鼠。取全脑,制备全脑病理切片,备用。

2.2 免疫组化法分析大鼠脑缺血损伤区 CSPGs 和 MAG 的表达

制备全脑病理切片后,进行前期脱腊处理:二甲苯 I、II 浸泡各 30 min→无水乙醇 I、II 浸泡各 5 min→95%乙醇浸泡 2 min→80%乙醇浸泡 2 min→放入蒸馏水; PBS 冲洗 5 min×3 次; 3% H₂O₂ 冲洗; 进行抗原修复; 加入一抗, 37 °C 孵育作用 2 h; PBS 冲洗 5 min×3 次; 加入二抗, 37 °C 孵育作用 1 h; PBS 冲洗 5 min×3 次; 进行 DAB 显色; 最后进行苏木素复染, 封片。免疫组化染色后, 通过图像分析软件半定量分析 CSPGs 和 MAG 的表达量。

2.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 软件分析, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 脑缺血损伤区内 CSPGs 的表达

在相应时间点上, 与正常对照组比较, 模型组大鼠脑损伤区内 CSPGs 阳性表达显著增强(P<0.01); 与模型组比较, 髓复康高、中、低剂量组大鼠脑损伤区内 CSPGs 阳性表达显著减弱(P<0.01 或 P<0.05)。大鼠脑损伤区内 CSPGs 的表达分别见表 1、图 1(图中箭头所指为 CSPGs 阳性细胞)。

表 1 大鼠脑损伤区内 CSPGs 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression of CSPGs in cerebral ischemic injury area of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	时间点		
			8 d	15 d	30 d
正常对照组	24		4.32±1.00	3.98±0.89	4.04±1.30
模型组	24		35.71±6.32*	36.65±5.21*	31.12±2.36*
甲基强的松龙组	24	30 mg/kg	25.94±4.95*	23.14±3.75*	20.27±1.77*
髓复康高剂量组	24	50 g/kg	12.89±1.44 ^{##}	14.60±2.79 ^{##}	8.75±1.13 ^{##}
髓复康中剂量组	24	25 g/kg	10.22±2.79 ^{##}	12.09±2.30 ^{##}	7.64±2.01 ^{##}
髓复康低剂量组	24	12.5 g/kg	26.03±5.13*	22.53±4.76*	21.16±5.71*

与正常对照组比较: *P<0.01; 与模型组比较: [#]P<0.05, ^{##}P<0.01
vs. normal control group: *P<0.01; vs. model group: [#]P<0.05, ^{##}P<0.01

3.2 脑缺血损伤区内 MAG 的表达

在相应时间点上, 与正常对照组比较, 模型组大鼠脑损伤区内 MAG 阳性表达显著增强(P<0.01); 与模型组比较, 髓复康高、中、低剂量组大鼠脑损伤区内 MAG 阳性表达显著减弱(P<0.01 或 P<0.05)。大鼠脑损伤区内 MAG 的表达分别见表 2、图 2(图中箭头所指为 MAG 阳性细胞)。

4 讨论

脑缺血损伤的修复再生一直是神经科学领域的热点问题。越来越多的研究表明, 并不是中枢神经元自身的特性使其不能修复再生, 若置于合适的微环境中, 受损伤神经元轴突是可以再生的。

4.1 CSPGs 具有抑制轴突再生的作用

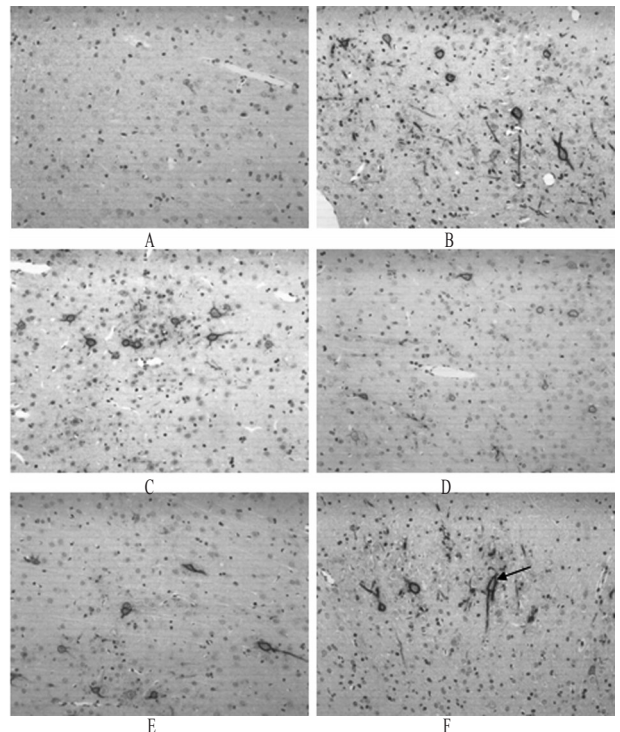


图 1 大鼠脑损伤区内 CSPGs 的表达(200×)

A.正常对照组;B.模型组;C.甲基强的松龙组;D.髓复康高剂量组;E.髓复康中剂量组;F.髓复康低剂量组

Fig 1 The expression of CSPGs in cerebral ischemic injury area of rats(200×)

A.normal control group;B.model group;C.methylprednisolone group;D.Suifukang high-dose group; E.Suifukang middle-dose group; F.Suifukang low-dose group

影响损伤神经元轴突再生的微环境中, 致密的胶质瘢痕不仅是轴突再生的物理屏障, 对轴突再生起着直接的阻碍作用, 而且胶质瘢痕分泌的以 CSPGs 为主的大量抑制因子, 则构成严重阻碍轴突再生的化学屏障。CSPGs 可与细胞膜上的神经黏附分子和神经元-胶质细胞黏附因子结合而抑制轴突生长, 也可通过与玻璃酸结合发挥抑制作用, 但具体机制尚未阐明。Davies M 等^[4]发现, 将周围神经系统神经元植入大鼠的脊髓后能够再生, 但再生的轴突达到 CSPGs 丰富的损伤区就停滞不前, 这表明 CSPGs 对中枢神经系统损伤后的轴突再生有显著的抑制作用。用软骨素酶消化损伤脊髓内的 CSPGs, 能促进感觉与运动轴突生长, 并恢复一定的功能。

4.2 MAG 具有抑制轴突生长的作用

Arregui CO 等^[5]1994 年发现, 大鼠髓磷脂中的 MAG 具有抑制轴突生长的作用。MAG 直接与轴突接触, 能够阻止神经元轴突发芽, 避免神经纤维过度增生, 维持成年中枢神经系统的稳定性。但是, 这种抑制作用在神经损伤时也阻止了损伤神经元的轴突再生。

4.3 改善中枢神经系统轴突再生的生物微环境, 就要有效地消除生长抑制因素

目前, 消除生长抑制因素的主要途径是: (1) 除去产生抑制因子的细胞; (2) 阻止抑制性物质的合成; (3) 阻断抑制性物质作用的信号转导通路; (4) 降解抑制性物质。但是, 目前还没有真正有效的方法去改善轴突再生的微环境。

表2 大鼠脑损伤区内MAG的表达($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The expression of MAG in cerebral ischemic injury area of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	时间点		
			8 d	15 d	30 d
正常对照组	24		1.03±0.21	1.22±0.361	1.18±0.27
模型组	24		18.57±1.44*	20.77±1.62*	19.30±2.31*
甲基强的松龙组	24	30 mg/kg	5.22±1.221 [#]	7.86±1.031 [#]	6.99±1.641 [#]
髓复康高剂量组	24	50 g/kg	3.89±1.042 ^{##}	4.22±1.362 ^{##}	4.69±1.032 ^{##}
髓复康中剂量组	24	25 g/kg	3.65±0.752 ^{##}	4.17±1.122 ^{##}	3.40±1.342 ^{##}
髓复康低剂量组	24	12.5 g/kg	5.62±1.191 [#]	6.28±1.001 [#]	6.32±1.451 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

0.01

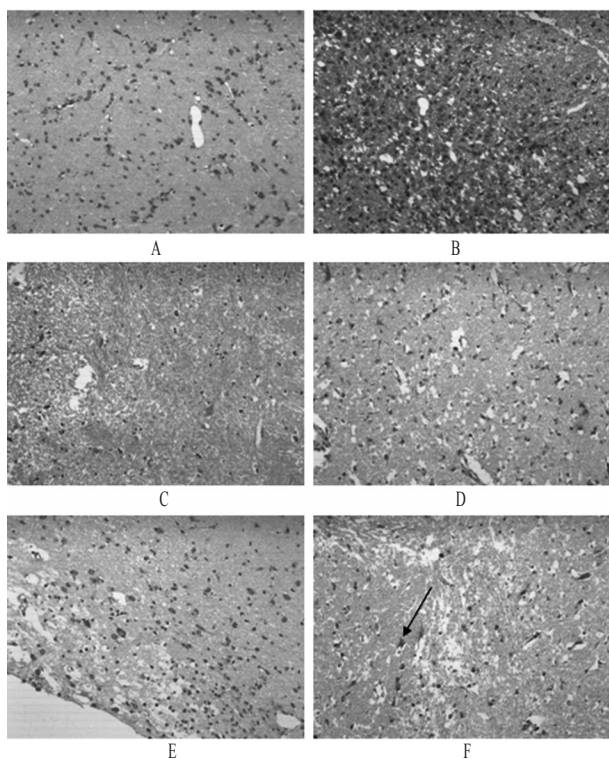


图2 大鼠脑损伤区内MAG的表达(200×)

A.正常对照组;B.模型组;C.甲基强的松龙组;D.髓复康高剂量组;E.髓复康中剂量组;F.髓复康低剂量组

Fig 2 The expression of MAG in cerebral ischemic injury area of rats (200×)

A. normal control group; B. model group; C. methylprednisolone group; D. Suifukang high-dose group; E. Suifukang middle-dose group; F. Suifukang low-dose group

4.4 中药改善中枢神经系统轴突再生的生物微环境,促进轴突再生的治疗作用方面还处于探索阶段

中医认为,脑缺血的主要病机是机体在各种病理因素作用下,机体阴阳失调,肝肾阴津受损,风火痰气血等病理产物旋而生,在各种诱因作用下引发而致。且在其发展演变和治疗过程中往往进一步伤耗阴津。故宜采用滋补肝肾法进行治疗。

髓复康由生黄芪、葛根、三七、川芎等组成。方中的生黄芪对调节神经细胞凋亡的主要酶——胱氨酸、半胱氨酸-3

(Caspase-3)有调节作用。将黄芪用于脑缺血损伤的研究中,结果显示,黄芪组动物神经元细胞凋亡率明显减少,Caspase-3的mRNA表达明显降低,表明黄芪具有保护神经细胞作用^[6];葛根中的葛根素是一种异黄酮类化合物,可以显著减轻脑缺血损伤后神经毒性作用,并且可以降低神经元的凋亡速度,提高神经细胞存活率,其作用机制是抑制线粒体功能障碍等;三七皂苷是三七的主要活性成分,其具有阻断Ca²⁺通道作用,阻滞脑损伤后神经细胞内Ca²⁺超载,减少游离脂肪酸的释放和氧自由基的产生^[7],三七皂苷还可以抑制B细胞淋巴瘤/白血病-2相关X蛋白(Bax)基因的表达,从而降低神经细胞的凋亡。但是,髓复康中各种中药成分对轴突再生的促进作用鲜有文献报道。

本研究在整体动物水平、蛋白水平上研究髓复康解除轴突再生抑制因素的作用机制,证明其能够抑制脑缺血损伤区CSPGs和MAG的表达,进而证实髓复康能够抑制胶质瘢痕形成的化学屏障的作用,从而发挥促进轴突再生的功能。这阐明了髓复康促进脑缺血损伤后神经损伤修复再生的作用机制,但是发挥解除轴突再生抑制因素作用的具体活性成分还不清楚,有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Li HP, Homma, Sango K, *et al.* Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site[J]. *Neurosci Res*, 2007, 85(3):536.
- [2] Winzeler AM, Mandemakers WJ, Sun MZ, *et al.* The lipid sulfatide is a novel myelin-associated inhibitor of CNS axon outgrowth[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(17):6 481.
- [3] 黄宇明,赵永青,田伟,等.中药髓复康促进脊髓内神经纤维修复与再生的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(8):724.
- [4] Davis M, Whitley T, Turnbull DM, *et al.* Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 1997, 70:56.
- [5] Arregui CO, Carbonetto S, McKerracher L. Characterization of neural cell adhesion sites: point contacts are the sites of interaction between integrins and the cytoskeleton in PC12 cells[J]. *Neurosci*, 1994, 14(11):6 967.
- [6] 池永学,金正勇,许春花,等.黄芪对缺氧缺血新生大鼠脑损伤的保护作用[J]. *中华实用中西医杂志*, 2004, 4(17):192.
- [7] 韩金安,胡威夷,孙增会.颅脑损伤后钙、钙调蛋白的变化及三七总皂苷的治疗作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(4):227.

(收稿日期:2012-11-01 修回日期:2012-11-26)