补阳还五汤抗脑缺血神经细胞凋亡实验研究进展

刘俊娥[1,2], 张继平[2]

(1. 广东医学院药理学教研室, 广东 湛江 524023; 2. 南方医科大学附属佛山医院, 广东 佛山 528000)

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血; 细胞凋亡; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2011.09.056

中图分类号: R277.733 **文献标识码**: A **文章编号**: 1005-5304(2011)09-0110-03

脑缺血后, 因脑组织缺血缺氧, 缺血中心区神经细胞发生急性坏死, 而在缺血半暗带区, 神经细胞则发生以凋亡为主的迟发性死亡, 且凋亡在重新恢复血流供应后不会终止, 这与缺血后脑组织损伤面积发展扩大有关。因此, 抑制凋亡、挽救濒死细胞、减少神经元死亡是脑缺血神经细胞保护治疗重点。补阳还五汤出自清代王清任《医林改错》, 由黄芪、当归尾、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙组成, 本方首重补气, 兼以活血化瘀, 对缺血性脑血管疾病疗效显著。研究表明, 在脑缺血及缺血再灌注后, 补阳还五汤可对神经细胞凋亡过程的多个环节进行干预, 包括抑制凋亡诱导启动、调节凋亡相关基因表达、拮抗凋亡执行蛋白酶活化, 从而减少神经细胞的凋亡。笔者现就近年来补阳还五汤抗脑缺血神经细胞凋亡的实验研究作一综述。

基金项目: 广东省第六批科学事业计划(2004B36001009); 广东省 2010 年建设中医药强省立项资助(2010008)

通讯作者: 张继平, Tel: 0757-88032005

1 抑制凋亡诱导启动

细胞内外相关因素通过信号转导途径诱导凋亡启动, 补阳还五汤对凋亡相关因素及信号转导途径均有影响。

1.1 对凋亡相关因素的影响

缺血及缺血再灌注后神经细胞凋亡涉及诸多诱导因素, 包括缺血缺氧、兴奋性氨基酸(EAA)毒性作用、细胞内钙超载、自由基过度形成、一氧化氮(NO)细胞毒效应等, 补阳还五汤可通过以下途径对抗凋亡诱导因素并促进凋亡抑制因子的表达。

1.1.1 改善血液流变学及血液循环 脑缺血期间血流供应中断同时存在血液流变学异常, 包括血小板聚集、血液黏滞度增加、红细胞变形能力下降、血液凝固性异常等, 这些病理生理改变进一步加重了缺血区神经元的损伤, 及时恢复血流供应、建立侧支循环有助于减少神经细胞的凋亡和坏死。张氏等[1]通过离体和在体实验研究发现, 补阳还五汤对血小板活化因子(PAF)诱导的血小板聚集有一定的抑制作用。宫氏等[2]采用血清药理学方法研究发现, 补阳还五汤家兔含药血清对 PAF 诱导

[23] 宋·陈言. 三因极一病证方论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 223.
[24] 元·朱震亨. 丹溪心法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 65.
[25] 宋·窦汉卿. 疮疡经验全书[M]. 明刻本, 50.
[26] 明·李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1765.
[27] 清·叶桂. 本草经解要[M]. 上海: 上海古籍出版社, 1996: 372.
[28] 清·吴鞠通. 吴鞠通医案[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960: 155.
[29] 清·黄宫绣. 本草求真[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 189.
[30] 元·沙图穆苏. 瑞竹堂经验方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 76.
[31] 明·傅仁宇. 审视瑶函[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 251.
[32] 清·杨时泰. 本草述钩元[M]. 上海: 科技卫生出版社, 1958: 425.
[33] 清·张璐. 本经逢原: 卷三[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 155.
[34] 明·张浩. 仁术便览[M]. 上海: 商务印书馆, 1957: 109.
[34] 明·卢之颐. 本草乘雅半偈[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 261.
[35] 明·李中梓. 本草征要: 卷四[M]. 上海: 锦章书局石印本, 1917: 41.
[36] 明·缪希雍. 炮炙大法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 179.
[37] 宋·朱佐. 类编朱氏集验医方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 176.
[38] 明·张介宾. 景岳全书[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 112.
[39] 清·医方集解[M]. 上海: 科技卫生出版社, 1957: 184.
[40] 清·王翊. 握灵本草[M]. 乾隆五年补刻本, 1740: 25.
[41] 清·陈其瑞. 本草撮要: 卷四[M]. 清光绪二十八年资生堂刻本, 1902: 45.
[42] 明·缪希雍. 先醒斋广笔记[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 56.
[43] 清·傅山. 傅青主女科[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 172.
[44] 明·陈嘉谟. 本草蒙筌[M]. 文茂堂藏版, 32.
[45] 宋·许叔微. 普济本事方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 97.
[46] 清·陈修园. 时方妙用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 179.
[47] 清·陈修园. 医学从众录[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1958: 165.
[48] 清·吴仪洛. 本草从新[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1958: 52.
[49] 唐·孟诜. 食疗本草[M]. 上海: 大东书局印刷, 1934: 36.
[50] 明·兰茂. 滇南本草[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1959: 71.
[51] 明·陈实功. 外科正宗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 282.
[52] 明·李士材. 雷公炮制药性解: 卷二[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 132.
[53] 清·刘云密. 本草述: 卷 24[M]. 清光绪二年丙子(1876)姑苏来青阁印武进薛还读山房版, 56.
[54] 清·陈复正. 幼幼集成[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1956: 260.
[55] 清·祁坤. 外科大成[M]. 上海: 科技卫生出版社, 1958: 136.
[56] 清·蒋示吉. 医宗说约[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004: 77.
[57] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 27.

(收稿日期: 2011-01-24, 编辑: 梅智胜)

的家兔血小板聚集有明显的抑制作用,方中补气药黄芪可降低活血药对 PAF 受体结合作用的过强抑制。刘氏等[3]报道,补阳还五汤可增强大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子(VEGF)及其受体的表达和提高 VEGF 蛋白水平。田氏等[4]发现,补阳还五汤可促进局灶性脑缺血大鼠缺血区血管新生,并可部分拮抗重组人血管内皮抑制素阻断的血管新生。赵氏等[5]研究表明,补阳还五汤治疗脑缺血再灌注损伤的机制与改善缺血再灌注损伤后的微循环障碍有关。

1.1.2　拮抗兴奋性氨基酸毒性　脑缺血引起神经细胞膜去极化,中枢神经系统 EAA 特别是谷氨酸(GLU)大量释放、重摄取受阻以及突触后膜 EAA 受体过度激活,最终导致神经元急性坏死或迟发性死亡,使局部性脑缺血呈恶性发展。邹氏等[6]探讨了补阳还五汤含药脑脊液对 GLU 损伤皮质神经细胞应激反应的调节作用,结果发现补阳还五汤能对抗皮质神经细胞的 GLU 损伤,其机制可能通过抑制即早基因 c-fos、c-jun 的表达,防止皮质神经细胞凋亡。邱氏等[7]通过制备脑缺血再灌注大鼠模型,采用微透析-高效液相色谱的方法检测不同时间点大鼠脑脊液中 EAA 的含量以及补阳还五汤对其进行干预后的变化,结果显示,补阳还五汤能使不同时间点脑脊液中 GLU、天门冬氨酸(ASP)的含量降低,表明补阳还五汤抗缺血性脑损伤的保护作用机制可能与其对抗脑缺血再灌注损伤后 EAA 的升高有关。

1.1.3　抑制细胞内钙离子超载　脑缺血后神经细胞离子通道通透性发生异常改变,大量 Ca^{2+}内流造成细胞内钙离子超载,引起神经细胞迟发性死亡。孙氏等[8]研究显示,补阳还五汤可对抗和治疗中风后遗症气虚血瘀证大鼠模型脑组织中 Ca^{2+}的升高。关氏等[9]发现,补阳还五汤在缺血再灌注早期(再灌 2 h),主要通过降低 L 型 Ca^{2+}通道开放概率,即影响 L 型 Ca^{2+}通道的可利用性以减少 Ca^{2+}内流;而在缺血再灌注后期(再灌 72 h),主要通过降低 L 型 Ca^{2+}通道开放时间,即影响 L 型 Ca^{2+}通道开放特性以减少 Ca^{2+}内流。

1.1.4　抗自由基氧化损伤　脑缺血时机体自由基产生和消除的动态平衡状态遭到破坏,自由基积聚蓄积并引发“瀑布”式连锁反应,丙二醛(MDA)是自由基引发细胞膜脂质过氧化反应的代谢产物。张氏[10]研究表明,脑缺血再灌注模型大鼠血清及脑组织中 MDA 含量升高,而自由基清除剂超氧化物歧化酶(SOD)含量则下降,补阳还五汤一方面能降低缺血再灌注后 MDA 的含量,另一方面则升高 SOD 的含量。说明补阳还五汤可通过抗自由基达到抗脑缺血再灌注损伤作用。

1.1.5　合理调控一氧化氮合酶　NO 在脑缺血损害早期具有神经元保护作用,而在缺血晚期,特别是在再灌注后,NO 过度生成导致神经元损伤。一氧化氮合酶(NOS)同工酶有 3 种亚型,即内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)。一般源于 eNOS 所产生的 NO 有神经保护作用,而源于 nNOS 和 iNOS 过度表达所形成的 NO 却有神经毒性。廖氏等[11]认为,补阳还五汤通过选择性抑制脑缺血后 nNOS 活性上调而起到脑组织保护作用。高氏等[12]发现,补阳还五汤可在一定程度上抑制老龄大鼠脑缺血/再灌注中 iNOS、nNOS 的表达,增加有神经细胞保护作用的热休克蛋白 70(HSP70)、eNOS 的表达。

1.1.6　调控与凋亡相关的生长因子　神经生长因子(NGF)可通过磷脂酰肌醇三激酶/蛋白激酶 B(PI3K/PKB)信号转导途径抑制细胞凋亡,保护缺血神经细胞。尹氏等[13]报道,补阳还五汤可促进脑缺血后脑组织的 NGF 表达,并能上调其 PI3K/PKB 信号转导的表达,调控脑缺血神经细胞的凋亡,从而对脑缺血模型大鼠脑组织产生保护作用。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是一种具有强烈促增殖作用的多肽生长因子,脑缺血/再灌注损伤后 bFGF 表达升高,在一定程度上可抑制神经元凋亡,促进神经功能状态恢复。刘氏等[14]研究表明,脑缺血可致脑组织中 bFGF 阳性细胞和 bFGF 蛋白含量增加,补阳还五汤则能维持较长时间 bFGF 蛋白高水平表达,这可能是其抗脑缺血神经细胞凋亡的机制之一。

1.2　对凋亡信号转导途径的影响

p38MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)家族成员之一,p38MAPK 信号转导通路介导脑缺血损伤后神经细胞的凋亡。赵氏等[15]制作了沙鼠前脑缺血模型,实验发现,与模型组相比,补阳还五汤组中大鼠的学习记忆功能得到改善、神经元形态结构损伤减轻、磷酸化 p38MAPK 蛋白、Caspase-3 蛋白以及神经细胞凋亡数量下降,且上述变化在高剂量补阳还五汤组更为明显。研究表明,补阳还五汤可部分抑制缺血损伤后 P38MAPK/Caspase-3 级联通路的活化,减少神经细胞凋亡。

2　调控凋亡相关基因表达

在神经元缺血缺氧凋亡过程中,bcl-2 家族、p53、p21 等相关基因均是关键的调控因子。bcl-2 家族根据其功能可分为 2 组,即 bcl-2、bcl-xL 等抗凋亡因子和 bax、bad 等促凋亡因子。p53 基因有野生型和突变型 2 种形式,野生型诱导细胞凋亡,而突变型抑制细胞凋亡。曲氏等[16]采用血清药理学方法进行离体实验,发现补阳还五汤通过下调 p53 和 p21 基因的表达抑制缺氧神经元的凋亡。刘氏等[17]采用在体实验,建立脑缺血再灌注损伤大鼠模型,研究显示,与模型组相比,补阳还五汤组大鼠脑组织梗死灶明显缩小、细胞凋亡减少、bax/bcl-2 明显降低,说明补阳还五汤可通过抑制神经细胞凋亡,达到保护脑缺血半暗带区、减轻脑缺血再灌注损伤的目的。另有研究显示,补阳还五汤可通过下调 bax/bcl-2 抑制脑缺血再灌注损伤神经细胞的凋亡[18-19]。

3　拮抗凋亡执行蛋白酶活化

半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)家族是执行细胞凋亡的主要酶类,其中启动分子 Caspase-8、9、10 等为蛋白酶级联反应的起始者,效应分子 Caspase-3、6、7 等则通过裂解细胞的多种蛋白质或酶使细胞凋亡,少数 Caspase 如 Caspase-1 等与炎性反应有关。细胞中的 Caspase 一旦被活化,凋亡即不可避免。廖氏等[20]研究发现,缺血后 24 h,缺血模型组大鼠脑组织半暗区 Caspase-3 mRNA 较正常对照组显著升高,补阳还五汤可降低局灶性脑缺血后半暗区 Caspase-3 mRNA 的表达,从而抑制细胞凋亡的发生。唐氏等[21]采用大鼠大脑中动脉闭塞局灶性

脑缺血模型,运用免疫组化法检测模型组及补阳还五汤 4 类有效部位干预组中大鼠脑组织 Caspase-1、3、8 的蛋白表达。结果显示,补阳还五汤 4 类有效部位生物碱、苷、多糖和苷元均可抑制 Caspase-1 的表达,其中生物碱、苷和苷元可抑制 Caspase-3 表达,抑制缺血后神经元凋亡,从而对抗神经元迟发性死亡;生物碱、苷、多糖和苷元可能是补阳还五汤抗缺血性脑损伤的主要物质基础。张氏等[22]则应用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法研究,发现补阳还五汤原方主要抑制 Caspase-3 mRNA 的表达,而其有效部位生物碱则对 Caspase-1、3、8 mRNA 的表达均有抑制作用。

4 小结

综观上述实验研究,补阳还五汤可通过多途径、多环节、多靶点发挥抗脑缺血神经细胞凋亡的作用,近年来研究重点集中在对凋亡伊始凋亡相关因素的干预作用上,但关于补阳还五汤如何影响凋亡信号转导途径的报道还很少。细胞凋亡信号的转导具有多样性、耦联性、统一性和多途性,复杂的分子机制给相关研究带来了一定困难,已知经典的细胞凋亡途径有 2 种,即细胞膜表面死亡受体途径和线粒体相关蛋白诱导途径,补阳还五汤是否可通过阻断这些途径及其他通路达到抗脑缺血神经细胞凋亡的目的,有待今后全面深入探讨。

参考文献:

[1] 张继平,李长龄,张玉萍.补阳还五汤对血小板活化因子诱导的家兔血小板聚集的影响[J].中国中医药科技,2000,7(1):16－17.

[2] 宫丽,张继平,李齐欢,等.补阳还五汤家兔含药血清对 PAF 诱导的家兔血小板聚集的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7):60－61.

[3] 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.

[4] 田兆华,刘柏炎.补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响[J].中国动脉硬化杂志,2010,18(3):193－198.

[5] 赵雅宁,吴晓光,李建民,等.中药补阳还五汤对沙鼠再灌注损伤及微循环障碍的治疗作用[J].四川大学学报:医学版,2010,41(1):53－56.

[6] 邹纯朴,陈晓,杨柳.补阳还五汤含药脑脊液对受损皮质神经细胞应急反应的调节作用[J].四川中医,2008,26(11):9－12.

[7] 邱吕军,杨洁红,张宇燕.补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤的脑脊液中兴奋性氨基酸的影响[J].中华中医药学刊,2009,27(10):2063－2065.

[8] 孙忠,彭康.补阳还五汤对中风后遗症“气虚血瘀”大鼠脑组织 Na^{2+}、K^{+}、Ca^{2+}和 Mg^{2+}的影响[J].中国临床康复,2004,8(7):1296－1298.

[9] 关莉,闫福曼,张晓东.补阳还五汤对全脑缺血模型大鼠恢复脑血流灌注后的皮层神经元钙信号的影响[J].广州中医药大学学报,2007,24(3):226－230.

[10] 张运克.补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注模型大鼠血清及脑组织超氧化物歧化酶及丙二醛和一氧化氮含量的影响[J].中国临床康复,2005,9(9):237－239.

[11] 廖春来,佟丽,陈育尧.补阳还五汤对脑缺血大鼠 NOS 免疫阳性神经元的影响[J].第一军医大学学报,2004,24(8):864－868.

[12] 高剑锋,吴磊,刘轲,等.补阳还五汤对老龄大鼠脑缺血/再灌注核转录因子-κB 和一氧化氮合酶的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(5):296－299.

[13] 尹天雷,蔡光先,李勇敏,等.补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 NGF 及 PI3K/AKT 信号转导途径的影响[J].中国中医药科技,2008,15(1):24－25.

[14] 刘芳,白雪松,刘柏炎,等.补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):9－12.

[15] 赵雅宁,李建民,安朝旺,等.补阳还五汤对前脑缺血再灌注损伤沙鼠 p38MAPK/神经细胞凋亡通路的影响[J].中药药理与临床,2010,26(2):6－9.

[16] 曲宏达,佟丽,沈剑刚,等.补阳还五汤药物血清对体外培养大鼠皮层神经元缺氧后 p53 和 p21 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2004,24(2):133－135.

[17] 刘超,吴基良,张嫦娥,等.补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2005,25(7):818－819.

[18] 王新高,童萼塘,孙圣刚.补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠皮质神经细胞凋亡的影响[J].中国比较医学杂志,2005,15(6):363－367.

[19] 张运克.补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].中华中医药杂志,2007,22(6):404－407.

[20] 廖春来,佟丽,陈育尧.补阳还五汤对大鼠脑缺血半暗区 Caspase-3 mRNA 表达的影响[J].中国临床康复,2004,8(19):3821－3823.

[21] 唐映红,李花,陈北阳,等.补阳还五汤有效部位对局灶性脑缺血再灌注后 Caspase 表达的作用[J].中国中西医结合杂志,2006,26(6):533－537.

[22] 张淑萍,梁燕,邓常青.补阳还五汤及其有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase 表达的影响[J].中草药,2006,37(7):1041－1045.

(收稿日期: 2010-12-07,编辑: 梅智胜)

马来西亚酝酿立法推动中医药发展

据马来西亚《星洲日报》报道,马来西亚卫生部长廖中莱表示,传统及辅助医药法案已进入总检察署审核阶段,估计最迟于 2011 年 10 月提呈国会。

廖中莱表示,一旦政府落实传统及辅助医药法令,传统及辅助医药领域将在法令、机制及资金充足情况下获得保障及良好发展。

廖中莱在出席马来西亚中医暨针灸联合总会“2011 年医总之夜”时说,政府制定这项法令主要是为了促进本地中医药的发展,包括推动中医药旅游发展及加强中药团体与卫生部的合作。马来西亚可在法令受保护下与中国中医药界保持密切联系及合作,全面带动东南亚传统及辅助医药的发展。

(本刊通讯员)