

·论著·

黄芩甙 川芎嗪诱导大鼠脑组织
热休克蛋白 70 合成

毛定安¹, 杨于嘉², 虞佩兰², 陶永光²

(1. 中南大学湘雅二医院儿科; 2. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 * 长沙 410011)

[摘要] 目的 探讨黄芩甙、川芎嗪是否通过诱导热休克蛋白(HSP70)合成增加来保护脑组织。方法 SD大鼠随机分为 正常对照组, 热休克处理组, 感染性脑水肿组, 黄芩甙组, 川芎嗪组。其中黄芩甙和川芎嗪又分为小剂量、治疗量及大剂量各3组。采用 Western 印迹杂交技术检测各组的 HSP70 的表达。结果 正常对照组、黄芩甙小剂量组、川芎嗪小剂量组及感染性脑水肿组均有一定量的 HSP70 合成, 而黄芩甙、川芎嗪的治疗量及大剂量组以及热休克处理组均见明显的 HSP70 条带。结论 黄芩甙、川芎嗪能诱导脑组织 HSP70 合成明显增加, 两药对感染性脑水肿的治疗机制可能与 HSP70 合成增加有关。

[关键词] 黄芩甙; 川芎嗪; 脑水肿; 大鼠; 热休克蛋白

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)04-0367-03

Expression of Heat Shock Protein 70 Induced by Baicalin and
Tetramethylpyrazine

MAO Ding-An, YANG Yu-Jia, YU Pei-Lan, et al.

Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China

Abstract: **Objective** The previous experiments of our department had demonstrated that Baicalin (BC) and Tetramethylpyrazine (TMPZ) had protective effect against infectious brain edema in rats and rabbits. In the present study we would look for whether BC and TMPZ could influence HSP70 expression with heat shock responses (HSR). **Methods** Twenty-seven male rats were randomly divided into: NS group (n=3); HSR + pertussis bacilli (PB) group (n=3); PB group (n=3); BC group, in which the rats were subdivided into three groups (n=3 in each group) with BC injected intraperitoneal at 48 mg/kg, 120 mg/kg, 194 mg/kg respectively. TMPZ group, 9 rats were evaluated as follows, with 37.5 mg/kg, 100 mg/kg, 160 mg/kg TMPZ injected intraperitoneal respectively. The animals were killed after 28 hours and the expression of HSP 70 was evaluated by western blot analysis. **Results** HSP70 in the brain tissues was significantly elevated in the HS + PB group and 120 mg/kg BC, 194 mg/kg BC, 100 mg/kg TMPZ, 160 mg/kg TMPZ groups. HSP70 was only at base levels in the PB and NS groups and 48 mg/kg BC, 37.5 mg/kg TMPZ groups. **Conclusions** BC and TMPZ could influence HSP70 expression with HSR. The protective mechanism of BC and TMPZ on infectious brain edema in rats may be associated with the increase of HSP70 synthesis.

Key words: Baicalin; Tetramethylpyrazine; Brain edema; Rat; Heat shock proteins

中医药对脑损伤的保护作用是目前一个活跃的研究领域。实验研究已发现 20 余种中药具有抑制脂质过氧化, 清除氧自由基的作用^[1,2]。本研究室以前的动物实验已证实黄芩甙 (Baicalin, BC)、川芎

嗪 (Tetramethylpyrazine, TMPZ) 对大鼠和兔感染性脑水肿有保护作用^[3], 同时以前的动物实验表明热休克反应 (HSR) 对大鼠感染性脑水肿有明显的保护作用^[4], 为临床上防治感染性脑水肿展示了良好

[收稿日期] 2000-10-15; [修回日期] 2001-06-26
[基金项目] 国家自然科学基金项目(39870251)
[作者简介] 毛定安(1956-), 男, 博士, 教授。

的应用前景。故寻找诱导机体 HSP70 合成的药物以及检验它们对大脑的保护作用,对于临床具有非常重要的现实意义。本研究试图应用黄芩甙、川芎嗪诱导 HSP70 的产生,进一步阐明两药对感染性脑水肿的治疗机制,为临床用药提供有力的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

黄芩甙:分子量 446,湘雅医院药剂科提供;盐酸川芎嗪注射液:无锡制药厂,批号 9610031;百日咳菌液:含菌 10.8×10^9 /ml,卫生部北京生物制品研究所提供,批号 93 - 24 - ;丙烯酰胺,三甲双丙烯酰胺,苯甲基磺酰氟(PMSF),二硫苏糖醇(DTT),鼠抗 HSP70 单克隆抗体,AKP 标记的羊抗鼠 IgG,均由美国 Sigma 公司提供。

1.2 感染性脑水肿模型制备^[2]

实验动物采用 25 %乌拉坦麻醉,3 ml/kg 腹腔注射,取仰卧位,颈正中切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉及其分支,分别结扎翼腭动脉和枕动脉,在夹闭左颈外动脉后,PB 组及 HS + PB 组从左颈总动脉穿刺向左颈内动脉注入百日咳菌液 0.2 ml/kg 体重,于 10 ~ 15 秒钟注射完。正常对照组则用同法注射灭菌生理盐水 0.2 ml/kg。温度计测肛温,用热灯和取暖器保持大鼠直肠温度(37 ± 0.5)。

1.3 实验动物分组

27 只雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 240 g,随机分为 5 组。生理盐水组(NS):即正常对照组($n = 3$),腹腔内注射与治疗量等量的生理盐水;热休克处理组(HS + PB):大鼠用 2 %戊巴比妥钠麻醉后,置 45 °水浴箱中,使其肛温升至 42 °后,转至 42 °水浴箱中维持 15 min,然后置室温恢复 24 h 后制作感染性脑水肿模型($n = 3$);感染性脑水肿组:腹腔内注射与治疗量等量的生理盐水,24 h 后制备感染性脑水肿模型($n = 3$);黄芩甙组(BC):共分 3 组(每组 $n = 3$),腹腔内分别注射 3 种不同剂量的黄芩甙溶液,即小剂量 48 mg/kg,治疗量 120 mg/kg,大剂量 194 mg/kg,间隔 4 h 再注射同样剂量 1 次;川芎嗪组(TMPZ):共分 3 组(每组 $n = 3$),腹腔内分别注射 3 种不同剂量的川芎嗪溶液,即小剂量 37.5 mg/kg,治疗量 100 mg/kg,大剂量 160 mg/kg,间隔 4 h 再注射同样剂量 1 次;上述治疗量是根据以前的实验换算得来,小剂量及大剂量是根据优选法确定。动物观察 28 h 断头处死。

1.4 Western 印迹技术检测脑组织 HSP70 表达产物

动物断头处死后,立即取左脑组织约 150 mg,按文献方法^[5]稍作修改,制备蛋白质样本,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。取出硝酸纤维素膜,用封闭液(PBS 中含 0.05 % Tween 20,1 % BSA),平缓摇动 8 h,4 °过夜封闭 24 h,按 1 : 1000 (用封闭液稀释抗体)加入抗 HSP70 单克隆抗体,4 °平缓摇动过夜,取出硝酸纤维素膜,用 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min;按 1 : 2000 (用 PBS 稀释)加入 AKP 标记羊抗鼠 IgG 抗体,室温 2 h,PBS 洗膜 3 次,每次 10 min;加入 AKP 生色底物缓冲液(5 ml AKP 缓冲液中含 BCIP 16.5 μ l, NBT 33 μ l),室温,平缓摇动,观察生色过程,至蛋白条带显色清晰时,加入 0.5 M EDTA 100 μ l 终止反应。拍摄照片,记录实验结果。

2 结果

正常对照组、黄芩甙小剂量组、川芎嗪小剂量组及感染性脑水肿均有一定的 HSP70 合成,但黄芩甙、川芎嗪的治疗量及大剂量组以及热休克处理组均见明显的 HSP70 条带,经 CS - 930 扫描仪密度扫描定量检测,结果显示与正常对照组比较,黄芩甙小剂量组、川芎嗪小剂量组及感染性脑水肿组的差异在统计学上无显著性意义($P > 0.05$),而黄芩甙、川芎嗪的治疗量及大剂量组以及热休克处理组与正常对照组比较在统计学上有显著性意义($P < 0.01$)。见图 1 及表 1。

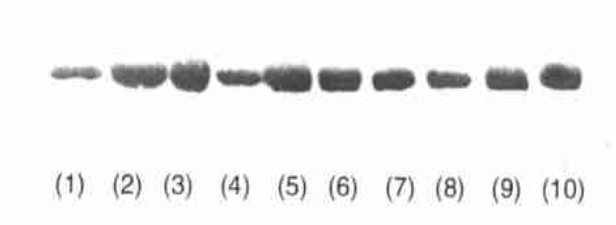


图 1 Western 印迹杂交电泳图谱

Figure 1 Electrophoretogram of Western blot analysis

(1)NS 组,(2)(3) HS + PB 组,(4) PB 组,(5) 黄芩甙大剂量组,(6) 黄芩甙治疗量组,(7) 黄芩甙小剂量组,(8) 川芎嗪小剂量组,(9) 川芎嗪治疗量组,(10) 川芎嗪大剂量组

表 1 各组 HSP70 蛋白 Westem 印迹分析密度面积扫描值

Table 1 Level of HSP70 expression in Westem blot analysis at different groups	
组别	密度面积扫描值
正常对照组	0.50
热休克处理组	1.96 ^a
感染性脑水肿组	0.67
黄芩甙小剂量组	0.56
治疗量组	1.72 ^a
大剂量组	2.84 ^a
川芎嗪小剂量组	0.68
治疗量组	2.17 ^a
大剂量组	1.63 ^a

注: a * 与正常对照组比较 $P < 0.01$

3 讨论

热休克蛋白 (HSP) 是一组细胞应激蛋白,在保护机体抵御外界损伤,促进修复中起着重要的作用。其中 HSP70 与脑损伤关系最为密切。有研究表明,脑细胞在病理刺激如脑缺血诱导 HSP70 后能减轻其再次损伤的程度,并且发现高温对大鼠大脑半球缺血的保护作用是由于细胞 HSP70 增加所致^[6]。这些研究均说明 HSP70 对脑组织的保护作用。

黄芩甙是从黄芩中提取的一种黄酮类化合物,是黄芩的主要有效成份。具有抗炎、清热、清除超氧阴离子等作用^[7],从而保护脑细胞功能,减轻脑水肿。川芎嗪是活血化瘀中药的主要有效成分,它的化学结构为四甲基吡嗪具有活血化瘀,抗血小板聚集,扩张小动脉,改善微循环等作用^[8],近几年来还证实川芎嗪具有清除氧自由基,抑制脂质过氧化,减轻缺血再灌注及脑水肿所致的脑组织损伤^[9]。

本研究室过去已发现,川芎嗪对感染性脑水肿动物有减轻脑含水量、钠离子含量及电镜观察脑水肿病变好转,并能降低颅内压。黄芩甙亦有类似作用。并发现两药与甘露醇比较,在用药后 2~4 h 的持续降颅压的作用优于甘露醇^[2,3]。本实验结果显示,小剂量的黄芩甙、川芎嗪诱导 HSP70 合成的量

与正常对照组无显著性差异,提示在临床上可能无明显治疗作用,而治疗量、大剂量的黄芩甙、川芎嗪与热休克处理组相似,均可诱导大量的 HSP70 合成,与正常对照组比较在统计学上有显著性意义 ($P < 0.01$)。由于 HSP70 对感染性脑水肿具有保护作用,提示黄芩甙、川芎嗪对感染性脑水肿的治疗机制可能与诱导 HSP70 合成增加有关。目前认为, HSP70 对于组织细胞的保护机制有阻止氧自由基导致的 DNA 链断裂,防止脂质过氧化及保护线粒体的结构和功能^[10]。黄芩甙、川芎嗪对脑组织的保护作用可能通过诱导 HSP70 合成增加,进一步清除氧自由基,防止脂质过氧化对脑组织的损伤,达到减轻脑水肿的目的。

[参 考 文 献]

[1] 虞佩兰,杨于嘉. 小儿脑水肿和颅内高压 [M]. 北京:人民卫生出版社,1999, 254 - 266.

[2] 杨于嘉,朱彩云,陈翔,等. 黄芩甙对百日咳菌液致大鼠脑水肿的保护作用 [J]. 中华医学杂志,1998, 78(8): 630 - 633.

[3] 陈光福,虞佩兰,金立明,等. 川芎嗪对兔百日咳菌液脑水肿与颅内高压的治疗作用 [J]. 中国中西医结合杂志,1999, 19(4): 224 - 226.

[4] 毛定安,杨于嘉,尹飞,等. 热应激反应对大鼠感染性脑水肿 TNF- α ,NO 的影响及意义 [J]. 中风与神经疾病杂志,1998, 15(4): 198 - 200.

[5] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 第 2 版. 北京:科学出版社,1992, 316 - 347.

[6] Gaspary H, Graham SH, Sagar SM et al. HSP70 heat shock protein induction following global ischemia in the rat [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1995, 34(3): 327 - 332.

[7] 朱英. 国内黄芩甙的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(9): 567 - 569.

[8] 肖静. 川芎嗪药理研究的新进展 [J]. 华西药学杂志,1993, 8(3): 170 - 172.

[9] 肖苏红,葛金文. 川芎嗪对沙土鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志,1993, 18(7): 435 - 346.

[10] Jacquier SMR, Fuller K, Dinh XAT, et al. Protective effects of HSP70 in inflammation [J]. Experientia, 1994, 50(8): 1031 - 1038.

(本文编辑:曹励之)