

补肾活血法对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织保护研究

赵晓娇¹ 孙英健² 王媛媛²

(1 河南省郑州市航海医院 郑州 450015; 2 辽宁省大连市第二人民医院 大连 116021)

摘要:目的:探讨补肾活血法对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织的保护机制。方法:采用合并糖尿病大鼠脑缺血再灌注模型,通过透射电镜对大鼠海马 CA1 区超微结构及细胞凋亡进行观察,并采用免疫组化法观察再灌注脑组织中 NF- κ B 的表达。结果:糖尿病大鼠脑缺血再灌注 2d 后,海马 CA1 区存在细胞坏死和细胞凋亡两种细胞死亡形式,补肾活血法治疗后未见明显的细胞坏死,神经元超微结构较模型组改善,细胞凋亡发生较模型组减轻。补肾活血方组 NF- κ B 的阳性表达明显减少($P < 0.05$)。结论:补肾活血法可以通过抑制 CA1 区神经元坏死和凋亡而发挥抗糖尿病合并缺血性脑损伤的作用。

关键词:补肾活血法;糖尿病;缺血再灌注脑损伤;NF- κ B

Abstract:Objective:To evaluate the effects of Bushenhuoxue method (BSHXF) on ultrastructure and apoptosis of hippocampal SD rat CA1 area in cerebral tissue of diabetes and cerebral ischemic reperfusion.Methods:Ultrastructure and apoptosis of hippocampal SD rat CA1 area in cerebral tissue were observed on gerbil model with diabetes and cerebral ischemic reperfusion using transmission electron microscope observe expression of NF- κ B.Results:On gerbil model with ischemic injury and two days reperfusion there were two forms of cell death in cerebral tissue, neuronal necrosis and apoptosis.In BSHXF recipe group,there was no neuronal necrosis,neuronal ultrastructure was more improved than model group, neuronal apoptosis was slighter than that of model group.Conclusion:BSHXF may play the role of antagonizing diabetes and cerebral ischemia by an-tagonizing CA1 area neuronal necrosis and apoptosis.

Key words:Bushenhuoxue method;diabetes;cerebral ischemic injury;NF- κ B

中图分类号:R 743.31

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2009)03-0008-02

糖尿病合并脑梗死是临床常见病,缺血性脑血管病合并糖尿病患者较无糖尿病患者的临床转归更差。滋阴补肾活血法为中医治疗该病的基本疗法^[1]。本实验采用糖尿病合并完全性脑缺血再灌注大鼠模型,用电镜观察补肾活血法对大鼠海马 CA1 区脑组织的作用及采用免疫组化法观察再灌注脑组织中 NF- κ B 的表达,从不同的角度探讨该方的作用机制。

1 实验材料

1.1 药物 补肾活血法主方:熟地 20g,枸杞子 12g,山茱萸 12g,黄芪 30g,生晒参 10g,仙灵脾 20g,何首乌 15g,赤芍 15g,红花 10g,地龙 30g,全蝎 10g 等。

1.2 动物 健康雄性(SD)大鼠共 72 只,体重 180~220g。

2 实验方法

2.1 造模 大鼠禁食不禁水 12h,腹腔注射 1%链脲佐菌素(STZ)180mg/kg,注射 72h 后测大鼠尾静脉血糖 ≥ 12 mmol/L 为造模成功,造模成功后普通饲料喂养 4 周。

2.2 分组 造模成功大鼠随机分为假手术组、对照组、补肾活血方组,每组 20 只大鼠。缺血术前 5d 开始灌胃,每日 1 次,连续 5 次,灌胃剂量为补肾活血方组 22g/kg,对照组灌阿斯匹林 6mg/kg,假手术组灌等量生理盐水,末次灌胃后 1h,分离两侧颈总动脉,除假手术组外,其余两组均用无创性小动脉夹夹闭双侧颈总动脉 15min,缺血 15min 后松开动脉夹再灌注,假手术组只分离不结扎颈总动脉,缝合皮肤、继续饲养,于再灌注后 12、24、36、48h 分别灌

胃 1 次,末次灌胃 1h 后,再以盐酸氯胺酮麻醉,打开胸腔,于右心房心耳部剪一小口,从左心室插入导管至主动脉,向主动脉方向缓慢灌注 37℃的生理盐水,直至右心室流出液变清亮,然后再灌注内固定液 4%多聚甲醛约 50mL,灌注完后迅速取出大脑,置 2.5%戊二醛溶液(0.2M,pH7.4PBS 50mL,25%戊二醛 10mL,加水至 100mL)中固定作电镜用。

2.3 观察指标及方法 (1)大鼠海马 CA1 区电镜观察:样品经戊二醛灌注固定后,10%锇酸后固定 1h,梯度丙酮脱水,Epon-812 环氧树脂浸泡、包埋聚合。LKB 8800 型组织修块机半薄切片(2~4 μ m),甲苯胺兰染色后,光学显微镜下定位海马 CA1 区神经细胞带半摄影;超薄切片机切超薄片(700A),枸橼酸铅-醋酸双氧铀电子染色,H-600 型透射电镜观察。(2)采用免疫组织化学染色检测 NF- κ B 活性。石蜡切片经新鲜配制的 3% H₂O₂ 溶液灭活内源性过氧化物酶,予 0.11M PBS 洗;加一抗(兔抗小鼠 NF- κ B P65 亚单位的多克隆抗体,经预定实验定为稀释度 1:200),4℃置湿盒过夜,予 0.11M PBS 洗;依次加入二抗(生物素化羊抗兔)和三抗(辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素),DAB 显色。阴性对照用正常山羊血清代替一抗。阳性细胞为光镜下细胞核内出现棕黄色物质,测定阳性细胞的平均光密度值(OD)。

3 结果

3.1 透射电镜观察结果 假手术组 CA1 区神经细胞超微形态基本正常,细胞呈圆或卵圆形,排列紧密有序,神经毡及毛细血管亦未见明显的形态异常,未观察到凋亡细胞或凋亡小体、暗细胞。补肾活

血方治疗组海马 CA1 区细胞排列规则紧密,少数细胞有轻度水肿,线粒体、粗面内质网和高尔基复合体囊泡有少许的肿胀和扩张,有时可见胞质内出现大小不一的空泡,神经毡内有少量空泡结构,未见明显的暗细胞或凋亡小体。对照组 CA1 区神经细胞排列紧密,细胞呈不同程度的水肿,线粒体及粗面内质网等膜结构见空泡变,神经毡及细胞间有水肿空泡,还可见到少量胞体浓缩变小,基质电子密度增大及核染色质块状聚集的暗细胞,程度较补肾活血方组稍重,考虑为凋亡前细胞。

3.2 免疫组化结果 NF- κ B 阳性反应主要以梗死灶及其周围区域的微血管为主,表现为血管壁的棕黄色深染。假手术组未见明显 NF- κ B 阳性表达,对照组可见 NF- κ B 阳性表达,补肾活血方组较对照组 NF- κ B 阳性表达明显降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 NF- κ B 阳性表达结果(OD 值) ($\bar{X} \pm S$)

组别	假手术组	对照组	补肾活血方组
NF- κ B 阳性表达	0.071 \pm 0.001	0.425 \pm 0.020	0.289 \pm 0.012 [△]

注:组间比较,[△] $P < 0.01$ 。

4 讨论

细胞坏死和细胞凋亡是细胞死亡的两种形式。细胞凋亡作为脑缺血后神经细胞死亡的一种重要方式参与脑缺血后脑梗塞体积的扩大^[1],其作用日渐受到重视。细胞凋亡是细胞接受某种信号后一种由一些相关基因相互作用的以细胞 DNA 早期降解为特征的主动性自杀过程。凋亡细胞有其典型的形态学和生化特征,其形态学特征表现为核染色质固缩,胞浆浓缩,胞膜重新分割包裹细胞器,形成凋亡小体^[2]。本实验中,笔者采用透射电镜对糖尿病大鼠合并缺血性脑损伤后神经细胞进行观察。由于海马 CA1 区对缺血性脑损伤最敏感,本实验重点观察海马 CA1 区的神经细胞变化,发现大鼠缺血再灌后海马 CA1 区神经细胞出现了不同程度的肿胀,线粒

体、粗面内质网等肿胀破裂,细胞膜及核膜破裂等细胞坏死,同时也出现了神经锥体细胞固缩变小,基质电子密度增大,核染色质聚集等细胞凋亡的现象,结果显示在糖尿病合并缺血再灌注损伤中同时存在着细胞坏死和细胞凋亡两种损伤机制。补肾活血法可防止糖尿病合并缺血性脑损伤后海马 CA1 区神经细胞的死亡,包括坏死和凋亡,对糖尿病合并缺血性脑损伤有防治作用。

脑缺血再灌注损伤的机制包括一系列复杂的级联反应,脑缺血再灌注时的炎症反应促进了继发性脑损害,是脑缺血再灌注损伤的主要原因之一。近年来的研究发现,核转录因子 - κ B 与炎症反应机制密切相关,并且是多种信号传导途径的汇聚点,广泛存在于真核细胞中,参与许多基因表达的调控^[4]。缺血再灌注后产生的炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 等激活后可诱导 NF- κ B 转录各种急性期蛋白的基因表达,如细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1)等基因的表达,进一步促进炎症的反应,而这些复苏后的局部和全身的炎症反应又可能通过 NF- κ B 信号传导途径诱导相关的细胞发生凋亡。目前,NF- κ B 在脑缺血再灌注损伤中的作用已成为学者们研究的热点,补肾活血方可能通过抑制缺血后炎症反应从而减轻糖尿病大鼠神经细胞损伤。

参考文献

- [1] 邓奕辉,崔莲珠,喻嵘,等.降糖通脉方治疗糖尿病合并脑梗塞 32 例临床观察[J].湖南中医学院学报,2004,24(5):40
- [2] Ichimiya S, Davis JG, O'Rourke DM, et al. Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury [J]. DNA Cell Bio 1,2007,16(3): 311-312
- [3] Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of apoptosis machinery [J]. TiPS, 2004,19:2
- [4] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-Kappa B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cell [J]. Blood, 2001,97(1):46-55

中药结合按抖复位法治疗腰椎间盘突出症

李海波

(江西省抚州市临川区中医院 抚州 344100)

关键词:中药;按抖复位法;腰椎间盘突出症

中图分类号:R 681.53

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2009)03-0009-01

腰椎间盘突出症是由于腰椎间盘退变、损伤,髓核突出刺激压迫神经根,造成以腰腿痛为主的一系列临床症候群,是骨科常见病和多发病,多发于青壮年。患者痛苦大,严重者可致截瘫,对患者生活、工作和劳动均可造成很大影响。笔者自 2004 年 5 月~2008 年 3 月采用中药结合按抖复位法治疗腰

椎间盘突出症 58 例,取得满意疗效。现报告如下:

1 临床资料

本组 58 例患者中,男 38 例,女 20 例;年龄 17~50 岁,平均 35 岁。治疗前均行 X 线、CT 或 MRI 检查确诊为腰椎间盘突出症,其中病变部位在 L₄₋₅ 30 例, L₅-S₁ 27 例, L₃₋₄ 1 例。全部病(下转第 11 页)