

• 药理与临床 •

补阳还五汤延缓大鼠胫前肌失神经肌萎缩的基因筛选

周 岚, 吴颢昕, 梅晓云

南京中医药大学基础医学院, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 运用基因芯片技术筛选补阳还五汤延缓大鼠胫前肌失神经肌萎缩的靶基因, 并对变化显著的 PI3K 基因进行验证。**方法** 建立大鼠腓总神经夹伤模型, 将造模的 20 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为补阳还五汤组与模型组, 术后 ig 给药, 18 d 后芯片筛选差异表达基因。并运用 RT-PCR 与 Western blotting 法验证 PI3K 基因与蛋白的差异表达。**结果** 与模型组相比, 补阳还五汤组基因表达谱有显著性差异, 其中 14 条基因表达上调, 10 条基因表达下调, 其中 *Angptl4* 与 *Pik3c2g* 基因表达变化较明显 (上调 5 倍); 同时基因验证表明: 与模型组相比, 补阳还五汤中、高剂量 (生药 12.96、25.92 g/kg) 组 PI3K mRNA 与蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 补阳还五汤对失神经肌萎缩的防治作用与其对多种相关基因的调控有关, 其机制可能是通过促进能量合成与血管新生, 保护神经, 抑制细胞凋亡与胶原合成等方面来防治失神经肌萎缩的发生; 补阳还五汤可能通过增加 PI3K 基因与蛋白表达, 从而延缓肌萎缩的发生; PI3K/Akt 信号转导通路的激活可能在补阳还五汤延缓失神经肌萎缩中发挥重要作用。

关键词: 补阳还五汤; 失神经; 肌萎缩; 胫前肌; 基因芯片; PI3K/Akt 信号转导通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0516-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.012

Gene screening of Buyang Huanwu Decoction used for delaying denervated tibial muscle atrophy of rats

ZHOU Lan, WU Hao-xin, MEI Xiao-yun

Basical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To screen the target gene of Buyang Huanwu Decoction (BHD) used for delaying denervated tibial muscle atrophy of rats by genechip technique and to verify the differentially expressed gene PI3K. **Methods** After 20 Sprague-Dawley (SD) rats were subjected to common peroneal nerve crush model of 5 mm injury, they were randomly divided into BHD and model groups, for daily ig administration of drugs after operation. The drug administration lasted for 18 d, the genechip analysis was performed to screen the differentially expressed gene. Then, RT-PCR and Western-blotting were used to detect the differential expression of PI3K and protein. **Results** Compared with the model group, there was a significant difference of gene expression profile in BHD group. Among them, the expression of 14 genes had up-regulation and 10 genes had down-regulation. In the differential expression genes, *Angptl4* and *Pik3c2g* had the more obvious change (up-regulation for 5-fold). Simultaneously, the validation tests showed: Compared with the model group, the PI3K mRNA and protein expression in the BHD mid- and high-dose (crude drug 12.96 and 25.92 g/kg) groups increased significantly ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** The preventive and therapeutic effects of BHD on denervated tibial muscle atrophy of rats are relevant with the regulation of many related genes. The mechanism may be as follows: promoting energy synthesis and blood neogenesis, neuroprotection, anti-apoptosis, and inhibition of collagen synthesis; BHD could delay the denervated tibial muscle atrophy of rats by increasing the expression of PI3K and protein; The activation of PI3K/Akt signal transduction pathway probably play an important role in delaying the denervated muscle atrophy by BHD.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; denervation; muscle atrophy; tibial muscle; genechip; PI3K/Akt signal transduction pathway

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 国家自然科学基金 (青年科学基金) 资助项目 (81302890); 江苏省高校自然科学基金面上项目 (13KJB360003); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK2011816); 高等学校博士学科点专项科研基金面上项目 (新教师类) (20123237120004); 南京中医药大学青年自然科学基金项目 (12XZR09)

作者简介: 周 岚 (1978—), 女, 辽宁人, 讲师, 博士, 研究方向为神经系统疾病康复。E-mail: 13805189258@163.com

***通信作者** 梅晓云 (1954—), 女, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为神经系统疾病康复。E-mail: xiaoyun663399@163.com

周围神经损伤后骨骼肌因为神经营养作用的丧失及自身废用而发生萎缩^[1]。临床上延缓失神经肌萎缩的治疗效果均不能令人满意^[2]。因此,如何在神经建立重新支配前防止肌肉萎缩是目前研究的热点与难题。失神经肌萎缩属于祖国医学的“痿证”范畴。前期研究发现补阳还五汤对失神经肌萎缩具有较好疗效^[3]。因此探索其保护机制成为进一步研究的关键。然而目前研究主要集中于少数几个基因和蛋白质^[4],通过基因芯片技术从整体水平研究的报道还比较少。因此本研究采用大鼠腓总神经夹伤模型,利用基因芯片技术筛选补阳还五汤作用后的差异表达基因,并运用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 与免疫印迹验证 PI3K 基因与蛋白的差异表达,进一步探讨补阳还五汤延缓失神经肌萎缩的分子机制。

1 材料

1.1 实验药物

补阳还五汤(由黄芪 120 g、当归 6 g、芍药 6 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g 组成)煎煮、提取、浓缩成浸膏,每克浸膏相当于生药 4 g,由南京中医药大学药学院制剂室制备后放入 4 ℃冰箱中保存备用。弥可保,500 μg/片,卫材(中国)药业有限公司生产(批号 H20030812)。

1.2 主要仪器与试剂

ABI7500 Real-time 荧光定量 PCR 仪、line-gene K FQD—48A 型荧光定量 PCR 检测系统、MJ—PTC200 PCR 反转录仪、DNA/RNA 测定仪、Trizol RNA 提取试剂均为 Invitrogen 公司产品;M-MLV 反转录酶(M1705),GoTaq[®] qPCR Master Mix (promega A6001)及 dNTP 为 Promega 公司产品;Oligo dT18、Random primer、RNase Inhibitor 为南京生兴生物技术有限公司产品;引物均由上海生工生物公司合成。

2 方法

2.1 实验动物与分组

本实验选用 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 200 g 左右,由南京中医药大学实验动物中心提供。基因筛选实验动物随机分为 2 组:补阳还五汤组与模型组(生理盐水组),每组 10 只大鼠;基因验证实验动物随机分为 6 组:假手术组,模型组,补阳还五汤高、中、低剂量组,弥可保组,每组 10 只大鼠。全部大鼠均经适应性喂养 1 周以上无异常后开始正式实验。

2.2 大鼠腓总神经夹伤模型制备及给药

大鼠称体质量,以复合麻醉剂(2 mL/kg) ip

麻醉大鼠,左股后正中作 1.5 cm 切口,依次切开皮肤和筋膜,游离并充分暴露坐骨神经股部。向下进行腓总神经钳夹术,以 14 cm 止血钳,上全齿钳夹腓总神经 3 次,10 s/次,每次间隔 10 s,挤压损伤的宽度为 5 mm^[5]。损伤远端以无损伤缝合线作一标记,逐层缝合手术切口。全部模型由同一人同手法操作,保持损伤程度的均一性。模型制备及术后饲养观察均在南京中医药大学实验动物中心进行,手术后动物按照不同分组分笼饲养。

造模第 2 天开始 ig 给药,补阳还五汤组剂量为生药 25.92、12.96、6.48 g/kg(中剂量相当于临床使用剂量)^[6],用生理盐水稀释至 4 mL,假手术组与模型组给予生理盐水 4 mL,弥可保组剂量为 625 μg/kg。基因筛选实验中补阳还五汤剂量为 25.92 g/kg。

2.3 神经丝蛋白(NF)免疫组织化学染色

预试验中,大鼠造模后,取神经标本行冰冻矢状切片,进行免疫组织化学染色,正常羊血清(1:20)封闭非特异性结合位点,20 min 后去除但不漂洗;anti-NF100(1:200, Sigma)室温孵育 24 h;0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min,3 次;FITC 标记的抗小鼠二抗(1:400)室温孵育切片 2 h;0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min,3 次;50%甘油-PBS 封片;荧光显微镜观察。

2.4 基因芯片检测差异基因的表达

术后第 18 天,动物给药后,取术侧胫前肌肌腹中部组织,立即放入 Trizol 中,送至上海晶泰生物公司进行基因芯片检测。本研究所用的基因芯片为小鼠全基因组表达谱芯片,型号为 GeneChip[®] Rat Genome 230 2.0 Arrays,上海晶泰生物公司提供。

2.5 RT-PCR 检测 PI3K 基因表达

术后第 18 天,动物给药后,于肌腹中部切取肌组织,立即放入 Trizol 中提取总 RNA,组织匀浆后转入 Eppendorf 管,室温放置 5 min;加入 0.2 mL 氯仿剧烈震荡 15 s 后,室温放置 3 min;12 000 r/min,4 ℃离心 15 min;取上清液,加等体积异丙醇室温放置 10 min,12 000 r/min,4 ℃离心 10 min。沉淀用 75%乙醇洗涤 1 次,干燥 5 min,加适量 DEPC 处理过的无菌水溶解 RNA。紫外分光光度计在波长 260 nm 和 280 nm 处测定吸光度值,进行定量和纯度检测,并鉴定其分子完整性。PI3K 正向引物:5'-CCGACCGCTAAGGTTCCAGG-3',反向引物:5'-GGTGTGAACATGACCGAGGCT-3';β-actin 正向引物:5'-GGGAAATCGTGCGTGACATT-3';反

向引物: 5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'。逆转录按以下步骤进行: 已灭菌且无核酸酶的 0.2 mL PCR 管中依次加入总 RNA 2 μ g、Oligo dT 1 μ L、Random primer 1 μ L, 无核酸酶的双蒸水加至总体积 13.5 μ L, 65 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 然后冰浴 5 min; 0.2 mL PCR 管依次加入 RNase 抑制剂 0.5 μ L、M-MLV 5 $\times$ Reaction Buffer 4 μ L、dNTPs 1 μ L、逆转录酶 1 μ L, 总体积 20 μ L。先在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 然后 70 $^{\circ}$ C 保温 15 min。PCR 扩增按以下步骤进行: 25 μ L 反应体系含 2 $\times$ qPCR Master Mix 12.5 μ L, 逆转录后的 cDNA 2 μ L, 2 μ mol/L 上下游引物 2.5 μ L, Nuclease-Free Water 9.5 μ L。PCR 优化程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、1 min, 40 个循环。

2.6 Western-blotting 检测 PI3K 蛋白表达

冰浴中取出胥前肌, 加入提前预冷的 RI-PA 裂解液, 匀浆器匀浆 10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定蛋白的量, 置于沸水中煮 5 min 使蛋白变性, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清转移到另一个离心管中, -20 $^{\circ}$ C 保存。上样后经电泳分离, 然后湿法转移至 NC 膜上, 用 TBST 溶液室温封闭 2 h, 分别与 PI3K 一抗、 β -actin 一抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 再与辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 发光显影后用凝胶成像分析仪扫描后进行图像分析。计算 PI3K 与内参 β -actin 灰度比值, 以此作为蛋白的相对表达量。

2.7 统计分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行单样本 t 检验。

3 结果

3.1 神经丝蛋白免疫组织化学染色

本实验是研究补阳还五汤对失神经肌萎缩的保护作用, 适宜选用损伤较轻的神经夹伤模型, 因此本研究选用 Sunderland II 度 (Seddon II) 损伤模型。损伤较轻, 虽然远侧段轴突发生瓦勒变性, 但神经外膜保持完整, 神经与肌肉的功能恢复较容易, 更容易在短时间内观察到药物的疗效。本研究造模后, 损伤部位神经丝蛋白免疫组织化学染色显示阳性信号完全消失, 说明夹伤处神经轴突已经完全断裂, 证实了造模成功。见图 1。

3.2 芯片杂交信号散点图

散点图均是两个样品(每个样品对应 1 张芯片)的对应探针值进行比较得到倍数后绘制得到的。

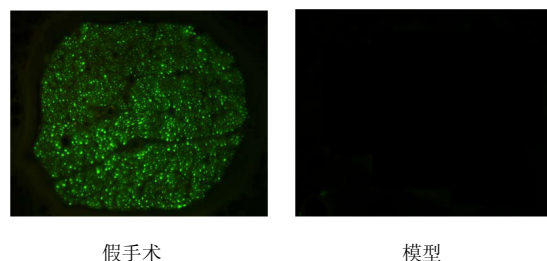


图 1 神经丝蛋白免疫组织化学染色

Fig. 1 Immunohistochemical staining of neurofilament protein

Affymetrix 表达谱芯片都是单色荧光, 芯片杂交后, 每个探针都会给出是否“表达”的判断, 一般来说信号值较高的就是“表达”的。图 2 中红色是“表达”的探针之间比较, 黄色是“介于表达和不表达之间”的探针比较, 蓝色是“不表达”的探针比较。图 2 是 MAS5 方法分析后作比较得到的。散点图中 x 轴和 y 轴分别代表用来比对的两个样品对应探针的信号值(取对数)大小。对角线上是表达无变化的基因, 图中从上到下排列的 4 条平行线分别代表上调 3 倍、上调 2 倍、下调 2 倍、下调 3 倍。越靠近 x 轴或 y 轴, 表明该基因差异表达越显著。

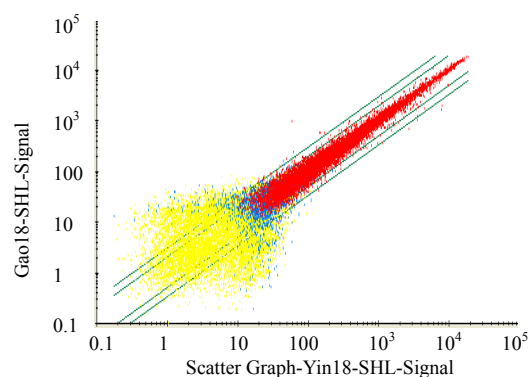


图 2 芯片杂交信号散点图

Fig. 2 Scatter plot of chip hybridization signal

3.3 补阳还五汤组与模型组胥前肌基因表达变化

补阳还五汤作用 18 d 后, 芯片杂交结果表明, 补阳还五汤组胥前肌基因表达与模型组相比有显著差异(差异表达 2 倍以上), 其中 14 条基因表达上调, 10 条基因表达下调。上调基因中变化最明显的基因为 *Angptl4* 与 *Pik3c2g*, 其余基因功能主要是促进能量合成, 还有些基因的功能不明确, 具体上调基因见表 1。

下调基因主要涉及到 Na^+ 、 K^+ 通道, 胶原合成, 抑制血管新生, 细胞凋亡这几类。还有些基因的功能不明确, 具体下调基因见表 2。

表 1 补阳还五汤组与模型组比较表达上调的基因

Table 1 Up-regulated genes in BHD group compared with model group

基因 ID	基因符号	基因名称	基因功能	差异表达倍数
AA818262	Angptl4	angiopoietin-like 4	血管新生	15.87
NM_053923.1	Pik3c2g	phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	信号转导	5.00
NM_133606.1	Ehhadh	enoyl-coenzyme A (CoA), hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	促进能量合成	2.92
BI274605	Ucp3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	促进能量合成	2.51
M33648.1	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)	促进能量合成	2.32
NM_031559.1	Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	促进能量合成	2.31
Y09333.1	Acot2	acyl-CoA thioesterase 2	促进能量合成	2.23
NM_053477.1	MLycd	malonyl-CoA decarboxylase	促进能量合成	2.21
BI278288	Pnpla2	patatin-like phospholipase domain containing 2	促进能量合成	2.18
NM_053716.1	Fbp2	fructose-1, 6-bisphosphatase 2	促进能量合成	2.05
NM_019157.1	Aqp7	aquaporin 7	功能不明确	3.90
BI283223	Rbp7	retinol binding protein 7, cellular	功能不明确	2.53
NM_080892.1	Selenbp1	selenium binding protein 1	功能不明确	2.52
BE110883	Ttk	Ttk protein kinase	功能不明确	2.15

表 2 补阳还五汤组与模型组比较表达下调的基因

Table 2 Down-regulated genes in BHD group compared with model group

基因 ID	基因符号	基因名称	基因功能	差异表达倍数
BE097574	Kcnab1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	K ⁺ 通道	-2.79
BI274401	P4ha1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha	胶原合成	-2.67
NM_022290.1	Tnmd	tenomodulin	抑制血管新生	-2.17
BI288619	Jun	jun oncogene	凋亡	-2.11
NM_030875.1	Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	Na ⁺ 通道	-2.11
AA957801	Msi2	musashi homolog 2 (Drosophila)	功能不明确	-2.56
AI411594	Plscr2	phospholipid scramblase 2	功能不明确	-2.37
AI170193	Rcan1	regulator of calcineurin 1	功能不明确	-2.07
AI706673	Wasl	Wiskott-Aldrich syndrome-like	功能不明确	-2.04
AA901203	Zfp91	zinc finger protein 91	功能不明确	-2.03

3.4 PI3K 基因在大鼠胫前肌中的差异表达

以 β -actin 作为内参,与假手术组相比,各组大鼠术侧胫前肌 PI3K mRNA 表达量皆不同程度的降低 ($P<0.01$);补阳还五汤中、高剂量组与模型组相比,PI3K mRNA 表达量均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),而弥可保组与补阳还五汤组间比较无统计学差异 ($P>0.05$);补阳还五汤高、中、低剂量组两两比较均无统计学差异 ($P>0.05$)。结果表明补阳还五汤能明显增加 PI3K 基因表达,见表 3。

3.5 PI3K 蛋白在大鼠胫前肌中的差异表达

以 β -actin 作为内参,PI3K 的蛋白表达量的灰度值显示,与假手术组比较,各组动物术侧胫前肌 PI3K 蛋白表达均降低 ($P<0.01$);补阳还五汤中、高剂量组与模型组比较,PI3K 蛋白表达均升高 ($P<0.05$ 、 0.01),而弥可保组与补阳还五汤组间无统计学差异 ($P>0.05$);补阳还五汤高、中、低剂量组两两比较也无统计学差异 ($P>0.05$)。结果表明补阳还五汤能明显增加 PI3K 蛋白合成,见图 3。

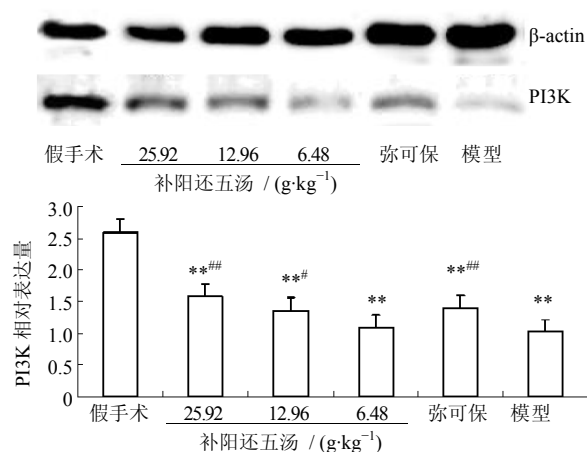
表3 PI3K mRNA 基因在大鼠胫前肌中的差异表达
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Differential expression of PI3K mRNA in tibial muscle of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	PI3K / β -actin
假手术	—	3.83 ± 0.41
模型	—	1.62 ± 0.17**
弥可保	6.25 × 10 ⁻⁴	2.98 ± 0.21***
补阳还五汤	25.92	3.18 ± 0.13***
	12.96	1.86 ± 0.25**
	6.48	1.76 ± 0.18**

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图3 PI3K 蛋白在大鼠胫前肌中的表达

Fig. 3 Expression of PI3K protein in tibial muscle of rats

4 讨论

补阳还五汤始见于《医林改错》，由清代名医王清任所创，临床广泛用于周围神经病变等病症，疗效显著。近年来有研究表明其在防治失神经肌萎缩方面也有显著疗效^[3]。周围神经损伤后，骨骼肌因为失去神经营养作用出现失神经肌萎缩，属于中医学的“痿证”范畴。其主要病理机制是元气大伤，血脉瘀滞，其有效的防治原则是益气活血^[2]。补阳还五汤治疗失神经肌萎缩，切合病机，正是“治痿独取阳明”思路的体现。本方重用补气药，其中黄芪为君药，使气旺则促进血行；同时配伍少量活血药（红花、桃仁、赤芍、地龙、川芎），与黄芪共奏补气活血通络之效，让瘫痪萎软的肌肉逐渐恢复。前期研究发现^[3]，补阳还五汤能在形态与功能

上延缓失神经肌萎缩的发生，对腓总神经损伤后的胫前肌萎缩具有较好的防治作用。因此在此基础上，应用基因芯片筛选了补阳还五汤作用失神经肌萎缩后的差异表达基因。

基因芯片筛选结果发现，表达变化最明显的是 Angptl4 基因，其是血管生成素相关新基因，主要参与了血管腔的形成，与血管新生密切相关。研究证实^[7]，Angptl4 是通过和内皮细胞特异性的受体 Tie-2 结合，促进新生血管的生成、延伸和成熟。朱洪新等^[8]研究显示，Angptl4 基因能够促进原代猪主动脉内皮细胞的迁移、浸润、管状形成及小鼠血管新生。Le Jan 等^[9]将重组 Angptl4 通过 CHO 细胞移植入鸡胚尿囊膜，引起明显的新生血管形成及血管的重新分布。Hermann^[10]也表明 Angptl4 在关节炎的形成中促进了血管生成。众所周知，骨骼肌具有丰富的血液供应，每根肌纤维周围都有一个网状的毛细血管围绕，即使短期阻断骨骼肌的正常血供，都会对肌细胞造成严重的损害。因此，良好的血供是肌肉正常收缩活动所必需的。失神经后毛细血管退化和丧失的速度较肌纤维丧失的速度快，这将直接导致失神经肌肉毛细血管与肌纤维数的比例下降^[11]。因此，不充足的血液供应可能是引起失神经骨骼肌萎缩的重要原因。而基因芯片结果发现：补阳还五汤治疗失神经骨骼肌后 18 d，Angptl4 大约上调 5 倍，且已用基因与蛋白表达验证 Angptl4 表达的增加。因此推测补阳还五汤可能通过大补元气，气能生血的机制引起 Angptl4 基因表达上调，从而促进血管新生，增加失神经萎缩肌肉的血液供应，延缓肌萎缩的发生。

此外，Pik3c2g 的表达变化也很明显，药物作用 18 d 后上调约 5 倍。PI3K 即磷脂酰肌醇-3-激酶是一个包括许多脂质激酶的大家族。而 Pik3c2g 是其中一员。而 Akt (PKB) 被认为是 PI3K 直接的下游作用靶点。PI3K 可激活 PI3K/Akt 信号转导通路而在体内发挥重要的生物学作用。例如，PI3K/Akt 信号通路具有增加蛋白质合成，通过泛素化途径减少蛋白质降解、促进血管新生、肌卫星细胞的增殖与分化、抗凋亡、细胞周期调控等多种生理功能。本实验芯片筛选结果发现，补阳还五汤作用后，Pik3c2g 基因表达明显上调。同时通过从 mRNA 和蛋白水平也验证了芯片结果。因此推论，具有补气作用的补阳还五汤可能通过 PI3K/Akt 信号通路的激活在延缓失神经肌萎缩中发挥重要作用。

芯片筛选结果还发现其他上调基因,主要是一些具有促进能量合成的基因。在中医理论中,“气”是能量与功能的体现。王相利^[12]在研究中也发现,补阳还五汤作用后,大鼠切断坐骨神经后再生轴突内有较多的线粒体。因此推测,补阳还五汤可能通过补气来调节能量代谢,增加肌肉的能量供应,延缓失神经肌萎缩。

有研究证实,Na⁺与K⁺离子通道的抑制剂或阻断剂可以保护神经细胞,发挥神经元的保护作用^[13-14]。而本研究发现,药物作用后电压依赖的Na⁺、K⁺通道基因表达下降,因此推测:这些基因表达下降后可能通过保护损伤神经而发挥失神经肌萎缩的保护作用,但确切机制仍需进一步探讨。Tenomodulin (TeM)蛋白是一种跨膜糖蛋白,也是一种强有力的血管生成抑制因子,它在体外有特异性抑制血管内皮细胞增生及血管样结构形成的作用,对新生血管也具有极强的抑制作用^[15]。本研究表明补阳还五汤作用后TeM表达下降,从而降低对血管新生的抑制作用,因此可能在一定程度上改善血供,促进萎缩肌肉的恢复。细胞凋亡是受到高度基因调控的主动而有序的细胞自我消亡过程。目前,国内外的研究均证实细胞凋亡与失神经骨骼肌萎缩的发生密切相关,Jun蛋白是c-jun基因的表达产物,具有促凋亡作用。而补阳还五汤作用后Jun基因表达下降,说明药物很可能通过抑制凋亡延缓肌萎缩的发生^[16]。另外在下调基因中,脯氨酰-4-羟化酶(P4ha1)是胶原合成的关键酶,周围神经损伤后,胶原纤维随着失神经时间的延长而逐渐增多,这些增生的胶原纤维可能成为再生神经重新支配骨骼肌的物理屏障,造成失神经骨骼肌功能恢复不佳。药物作用18d后,脯氨酰-4-羟化酶基因表达减少,胶原合成因此也减少,从而能有效防止失神经骨骼肌中胶原纤维的产生。同时,脯氨酰-4-羟化酶也是缺氧诱导因子-1 α (HIF-1)的降解因子,而HIF-1可以通过促进血管新生、改善缺血组织代谢、减轻组织损伤等方面发挥对缺血、缺氧组织的保护作用^[17-18]。药物作用后,P4ha1表达下降,对HIF-1的降解作用也减少,从而HIF-1的量增加,因此可以通过调控多种基因的表达,发挥对缺血缺氧组织多靶点的保护作用。因此,补阳还五汤延缓肌萎缩的发生可能是通过降低P4ha1的表达来减少胶原纤维的合成,增加HIF-1对失神经组织的保护作用而实现的。

综上所述,利用基因芯片技术筛选了补阳还五

汤作用失神经肌萎缩模型大鼠后的差异表达基因,初步探讨了补阳还五汤延缓失神经肌萎缩的分子机制。结果表明:补阳还五汤对失神经肌萎缩的防治作用与其对多种相关基因的调控有关,其机制可能是通过促进能量合成与血管新生、保护神经、抑制细胞凋亡与胶原合成等方面来防治失神经肌萎缩的发生。PI3K/Akt信号转导通路具有增加蛋白质合成,减少蛋白质降解、促进血管新生与肌卫星细胞的增殖与分化,调控细胞周期等多种生理功能。因此,PI3K/Akt信号通路的激活可能在补阳还五汤延缓失神经肌萎缩中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Grigoriadis N, Albani M, Simeonidou C, *et al.* Recovery, innervation profile, and contractive properties of reinnervating fast muscles following postnatal nerve crush and administration of L-Dopa [J]. *Brain Res Dev*, 2004, 153(1): 79-87.
- [2] Jiang G L, Zhang L Y, Shen L Y, *et al.* Fibrillation potential amplitude to quantitatively assess denervation muscle atrophy [J]. *Neuromuscul Disord*, 2000, 10: 85-91.
- [3] 周 岚, 梅晓云, 吴灏昕, 等. 补阳还五汤对大鼠胫前肌失神经肌萎缩的防治作用 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(3): 401-405.
- [4] Tews D S, Behrhof W, Schindler S. Expression patterns of initiator and effector caspases in denervated human skeletal muscle [J]. *Muscle Nerve*, 2005, 31(2): 175-181.
- [5] Ding F, Cheng Q, Gu X S. The repair effects of *Achyranthes bidentata* extract on the crushed common peroneal nerve of rabbits [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(3): 161-167.
- [6] 施新猷. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989.
- [7] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 27-31.
- [8] 朱洪新, 李锦军, 覃文新, 等. 新基因 ANGPTL4 的克隆及其在血管新生中的功能研究 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(2): 94-99.
- [9] Le Jan S, Amy C, Cazes A, *et al.* Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(5): 1521-1528.
- [10] Hermann L M, Pinkerton M, Jennings K, *et al.* Angiopoietin-like-4 is a potential angiogenic mediator in arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2005, 115(1): 93-101.
- [11] Waagatsuma A, Tamaki H, Ogita F. Capillary supply and gene expression of angiogenesis-related factors in murine skeletal muscle following denervation [J]. *Exp Physiol*,

- 2004, 900(3): 403-409.
- [12] 王相利, 杨琳, 李振华, 等. “补阳还五汤”对周围神经再生影响的实验研究 [J]. 山东医科大学学报, 1999, 37(1): 41-43.
- [13] 桑楠, 孟紫强. 硫酸镁对大鼠海马神经元瞬间外向钾电流和延迟整流钾电流的抑制作用 [J]. 药学学报, 2002, 37(7): 510-512.
- [14] Hewitt K E, Stys P K, Lesiuk H J. The use-dependent sodium channel blocker mexiletine is neuroprotective against global injury [J]. *Brain Res*, 2001, 898(2): 281-287.
- [15] Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y. Molecular cloning of tenomodulin, a novel ndromodulin-related gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280: 1323-1327.
- [16] Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia of the HIF system [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 677-684.
- [17] 冯敏, 张培建, 刘新颜. 低氧诱导因子-1减轻组织再灌注损伤研究进展 [J]. 国际外科学杂志, 2007, 34(10): 688-691.
- [18] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7: 345-350.