

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.08.024

补阳还五汤对脑缺血后神经血管单元的保护作用研究

贺小松¹, 刘诗娴², 蔡 军³, 罗春云⁴

1. 广州医科大学基础学院人体解剖教研室 (广东 广州 511436); 2. 广州医科大学第一临床学院 (广东 广州 511436); 3. 广东省中医院大学城分院 (广东 广州 510120); 4. 广州医科大学附属第四医院 (广东 广州 511436)

【摘要】 目的 探讨补阳还五汤对脑缺血后神经血管单元功能的保护作用。**方法** 采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血模型,并将大鼠随机分为治疗组和对照组;治疗组给予补阳还五汤灌胃治疗,对照组给予等量 0.9% NaCl 溶液灌胃,疗程 7 天。采用 NRSS 神经行为学评分评价大鼠脑缺血后行为学表现,采用 TTC 染色检测梗死面积,采用免疫组织化学染色的方法评价神经元数量情况,IGC 染色评价神经血管单元的结构完整性。**结果** 干预处理后,与对照组比较,治疗组 NRSS 行为学评分降低、脑梗死面积缩小、神经元数量增多及神经血管单元完整性良好($P < 0.05$)。**结论** 补阳还五汤可通过保护神经血管单元的完整性以促进脑缺血后的康复。

【关键词】 补阳还五汤;脑缺血;神经血管单元;大鼠

Protective role of “Buyang Huanwu Decoction” on the integrity of the neurovascular unit after rat brain ischemia

HE Xiao-song¹, LIU Shi-xian², CAI Jun³, LUO Chun-yun⁴

1. Preclinical School, Guangzhou Medical University, Guangdong, 511436; 2. The First Clinical College of Guangzhou Medical University, Guangdong, 511436; 3. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, 510120; 4. The Fourth Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong, 511436

Abstract: Objective To study the protective effects of “Buyang Huanwu Decoction” on the integrity of neurovascular unit after brain ischemia in rats. **Methods** MCAO was established in rats and then the rats were randomized into the treatment group and control group. The treatment group was orally given “Buyang Huanwu Decoction” and the control group was orally given normal saline, with a course of seven days. The neurological score was used to test the behavioral performance, the TTC staining was used to determine the infarct area, the number of neuron and integrity of the neurovascular unit. was determined by immunohistochemistry **Results** Compared with the control group, NRSS score could reduced, the infarct area the number of neuron positive cells and the integrity of the neurovascular unit increased($P < 0.05$). **Conclusion** “Buyang Huanwu Decoction” can promote the recovery following MCAO via improving the integrity of neurovascular unit.

Keywords: “Buyang Huanwu Decoction”; cerebral ischemia; neurovascular unit; rat

脑缺血,又称缺血性卒中,是脑血管受阻后脑内细胞缺乏氧气和营养物质供给而引起神经功能障碍的一类神经血管性疾病,具有高发病率、高致死率和高致残率等特点,严重危害人类健康。我国每年有近 150 万人死于脑缺血,并新增 200 万残疾幸存者,给社会和家庭造成沉重的经济和心理负担。目前临床上对脑缺血的治疗,除 tPA 溶栓外,无其他有效的治疗手段,但 tPA 溶栓有严格的治疗时间窗,即仅为缺血发生后的 4.5 个小时内,而且 tPA 溶栓会增加出血风险,这使大多数患者无法及时接受 tPA 溶栓治疗^[1]。研究促进卒

中患者神经功能恢复的新方法,对于改善我国人民的健康及保证社会和经济的稳定持续发展有着重大意义。

当前,关于脑卒中治疗困境在于多个实验证明有效的脑保护药物在向临床转化的过程中都以失败告终。究其原因,很重要的一点在于过去的研究往往针对的是某个特定的神经元,而未将多个因素考虑在内^[2]。研究发现,神经血管单元内多个细胞往往相互影响,因此将多个细胞在一个整体内考虑有助于阐述脑缺血后的病理发展。例如,通心络胶囊可以通过保护神经血管单元的完整性而达到保护脑损伤的目的^[3]。因此,探索传统中医药在保护血管神经单元中的作用有助于促进脑缺血的康复研究的发展。补阳还

[基金项目] 广州医科大学科研基金项目(L1451012)

[作者简介] 贺小松,男,博士,讲师,主要从事脑缺血治疗研究

五汤是中医治疗气虚血瘀型脑卒中的一个经典方剂,能够减轻钙离子超载、抗氧化应激和减轻细胞的凋亡^[4]。但是,神经血管单元的完整性亦是脑缺血病理发展过程中的一个关键环节,神经血管单元的完整性影响到早期的炎症反应过程及后期的血管新生过程^[5]。而补阳还五汤能否保护脑缺血后神经血管单元的完整性从而减轻脑缺血损伤却未见报道。本研究旨在探讨补阳还五汤对脑缺血后神经血管单元完整性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只雄性 5 月龄 SD 大鼠,体质量 250~300 g,购自广州中医药大学动物中心,饲养在恒温恒湿的动物房中,每天更换垫料、饲料和水;动物合格证号:SCXK(粤)2013-0034。

1.2 药物与试剂 无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司,批号:1211093601;免疫组织化学试剂盒,福建迈新生物技术开发有限公司,批号:13011109706;抗 NeuN 抗体,Abcam 公司,批号:GR138829-25。补阳还五汤(生黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 4.5 g,地龙 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g)由广州中医药大学制备:即先用清水清洗药材,后加入约 5 倍体积清水加热约 30 min 后,过滤,留汁;第二煎方法同上,两份汁液混合后,浓缩至 5 g/ml,冷藏备用。

1.3 大脑中动脉缺血模型的制作 模型制作参考文献方法^[3]:大鼠麻醉后,将大鼠仰卧位固定于桌面上;取颈正中切口,暴露颈总动脉(CCA),分离颈内动脉(ICA)和颈外动脉,分别结扎上述动脉,在颈外动脉剪一小口;将预处理过的线栓小心地从颈外动脉(ECA)插入颈内动脉,直至大脑中动脉的起始处。栓塞 90 min 后,取出线栓。

1.4 药物干预 模型制作后大鼠被随机分成两组,治疗组和对照组。治疗组为每天给予补阳还五汤灌胃治疗(5 g·kg⁻¹·d⁻¹),连续 7 天。对照组以等量 0.9% NaCl 溶液灌胃,连续 7 天。

1.5 行为学检测 行为学评分按文献方法进行^[3],根据 NRSS14 评分细则,采取双盲方法,评价及记录大鼠再灌注 7 天后的行为学表现。

1.6 脑梗死面积计算 缺血再灌注 7 天后,用戊巴比妥钠麻醉大鼠,迅速取脑,将脑组织放入脑膜中,用刀片将脑组织切成 2 mm 厚的脑片,将脑片取出放入 2% 的 TTC 染色液中,避光放置 15 min 后,将脑片取出,用卫生纸吸干脑片表面的液体,拍照。将照片导入 Image J 软件中,统计正常侧和梗死侧面积。梗死面积=非缺血侧半球面积-缺血侧半球未梗死区面积。

1.7 免疫组织化学染色 将脑组织切片从-20℃中取出,将一组切片全部放入 37℃ 孵育好的 PBS 中,洗 3×5 min,脑片转入到含有 0.3% 的 Triton-100 的 PBS 中震荡 30 min,用以破膜,PBS 洗 3×5 min,5% 的正常驴血清封闭 1 h,后加入一抗,并 4℃ 过夜。次日,先用 PBS 洗 3×5 min,后加入二抗,室温孵育 1 h 后,将脑片在 PBS 中贴上玻片,加入辣根过氧化物酶标记的三抗,室温孵育 1 h 后,DAB 显示 5 min,后水洗,自然阴干,用封片剂封片后,在显微镜下观察并拍照。显微镜下每个脑片随机选取 6 个视野拍照,并计算阳性细胞数量。IGG 染色除不加一抗外,其余步骤相同。IGG 染色利用 IPP 软件统计每张图片的阳性面积。

1.8 统计学方法 试验数据用 Graph pad 3.01 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用配对 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡情况及行为学表现 干预处理期间,对照组大鼠死亡 2 只,治疗组大鼠死亡 1 只。治疗组大鼠的行为学评分低于对照组,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 两组大鼠行为学评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	<i>n</i>	行为学评分
对照组	13	10.4 ± 0.8
治疗组	14	8.6 ± 0.6 *

注:与对照组比较,**P* < 0.05

2.2 脑梗死面积比较 干预处理后,治疗组大鼠脑梗死面积较对照组显著缩小,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 两组脑梗死面积比较(*n* = 6, $\bar{x} \pm s$,mm²)

组别	脑梗死面积
对照组	298.6 ± 20.4
治疗组	264.2 ± 12.3 *

注:与对照组比较,**P* < 0.05

2.3 神经元数量比较 组织化学染色是检测纹状体区域神经元的数量。干预处理 7 天后,治疗组每个视野内神经元的平均数量显著多于对照组,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 两组大鼠神经元数量比较(*n* = 6, $\bar{x} \pm s$,个)

组别	神经元数量
对照组	20.4 ± 3.1
治疗组	28.9 ± 2.6 *

注:与对照组比较,**P* < 0.05

2.4 神经血管单元完整性比较 IGG 免疫组织化学染色检测神经血管单元完整性。结果显示,干预处理 7 天后,治疗组阳性面积较对照组显著减小,差异具有统

计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 两组大鼠神经血管完整性比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	光密度/面积
对照组	25.4±5.3
治疗组	17.5±6.6*

注:与对照组比较,* $P<0.05$

3 讨论

当前,促进脑缺血后康复的方法很多,中医药方法是其中之一,如通心络可以通过保护神经血管单元的完整性以达到保护脑损伤的目的,针灸可以通过促进脑缺血后的神经再生以促进康复^[6]。但是,更为完整的治疗措施应当是既能够考虑脑缺血后早期的病理反应又能够考虑到康复期的病理过程。因此,将早期的脑保护及后期的修复过程看成一个有机的整体来研究更可能促进脑缺血的康复。

神经血管单元是由星型胶质细胞、神经元、血管内皮细胞、少突胶质细胞及小胶质细胞等多个细胞组成的一个功能单位,在这个单位的框架内探讨细胞与细胞之间的关系^[7]。神经血管单元的功能完整性对于脑缺血的病理发展具有重要作用。例如,星型胶质细胞与血管内皮细胞之间的紧密连接蛋白是神经血管单元功能完整性的结构基础。此外,有研究表明少突胶质细胞前体细胞释放 MMP-9 从而增大神经血管单元的渗透性^[8]。

补阳还五汤由生黄芪、当归尾、赤芍、地龙、桃仁、红花组成,具有补气养血、活血通络之功效^[9]。近年来,临床和实验研究发现,补阳还五汤可以通过激活 AKT 细胞信号通路以减轻细胞凋亡,从而达到脑保护的作用^[10];补阳还五汤可以明显抑制谷氨酸的释放,通过降低亲代谢型谷氨酸受体 1 RNA 的表达等机制减轻兴奋性毒性^[11];在康复阶段,补阳还五汤可促进血管内皮因子的表达以促进血管的新生,促进神经干细胞的迁移,促进脑缺血后的康复^[12]。

本研究结果发现,补阳还五汤能够促进脑缺血的

康复,但是对手术后大鼠的存活率无影响。在康复机制方面,补阳还五汤能够保护神经血管单元功能完整性,从而降低脑缺血后神经元的凋亡或者死亡的数量,减少脑缺血导致的脑梗死面积,提高脑缺血后行为学康复。

参考文献:

[1] Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit[J]. Stroke,2004,35(2):354-356.

[2] 杨国源,贺小松,王永亭. 神经血管单元在脑缺血治疗中的作用和意义[J]. 中国现代神经病杂志,2011,11(2):125-131.

[3] Liu Ye , Tang Guang Hui , Sun Yu Hao , *et al.* The protective role of Tongxinluo on blood - brain barrier after ischemia - reperfusion brain injury[J]. J Ethnopharmacol, 2013,148(2):632-639.

[4] 罗银河,葛金文,刘林. 补阳还五汤治疗缺血性中风的实验研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2015,33(2):269-271.

[5] Lo EH, Rosenberg GA. The neurovascular unit in health and disease: introduction [J]. Stroke, 2009,40(3 Suppl):S2-S3.

[6] Yang ZJ, Shen DH, Guo X. Electroacupuncture enhances striatal neurogenesis in adult rat brains after a transient cerebral middle artery occlusion [J]. Acupunct Electrother Res, 2005, 30(3-4):185-199.

[7] Lok J, Wang XS, Xing CH, *et al.* Targeting the neurovascular unit in brain trauma [J]. CNS Neurosci Ther, 2015,21(4):304-308.

[8] Seo JH, Maki T, Maeda M, *et al.* Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- β signaling [J]. PLoS One,2014,9(7):e103174.

[9] 罗银河,葛金文,刘林. 补阳还五汤治疗缺血性中风临床应用进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(3):278-281.

[10] 刘芳,尹天雷,戴飞跃,等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血后蛋白激酶 B1 和 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2013,20(5):275-278.

[11] Lian DZ, Wang JH, Guang RJ. Neuroprotective effect of Buyang Huanwu Decoction against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats-Time window and mechanism[J]. J Ethnopharmacology, 2012, 140(2):339-344.

[12] 王倩. 补阳还五汤对大鼠急性脑缺血后神经干细胞迁移的影响[J]. 山东中医杂志, 2013,12(10):742-744.

编辑:肖元春

收稿日期:2016-05-10