

# 回族药扎里奴思方联合骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经元及P-糖蛋白的影响

任非非<sup>1</sup>, 刘敬霞<sup>1\*</sup>, 朱万平<sup>2</sup>, 虎喜成<sup>1</sup>, 刘会贤<sup>3</sup>, 刘洋<sup>3</sup>, 李娟<sup>3</sup>

(1. 宁夏医科大学 中医学院, 银川 750004;

2. 宁夏医科大学 基础医学院, 银川 750004;

3. 宁夏医科大学 附属回医中医院, 宁夏 吴忠 751100)

**[摘要]** 目的:观察扎里奴思方联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对脑缺血再灌注(MCAO)模型大鼠神经元及P-糖蛋白(P-gp)表达的影响。方法:250只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、扎方组(扎里奴思方组)、移植组和联合组(扎里奴思方和移植组),除假手术组10只外,其余各组再分为1,3,7,14 d组,分别为15只。大鼠术前4 d开始ig给药( $14.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),假手术组、模型组和移植组给予等体积的生理盐水),线栓法制备大鼠MCAO模型,体外全骨髓贴壁筛选法培养及扩增BMSCs,术后24 h, BMSCs悬浮液经颈内动脉移植入脑( $2 \times 10^6$ 个/200  $\mu\text{L}$ );移植后1,3,7,14 d取材,观察海马CA1区神经元密度(ND)和脑组织病理损伤、免疫组化法测P-gp表达变化。结果:模型大鼠海马CA1区ND较假手术组明显降低( $P < 0.01$ ),病理损伤明显( $P < 0.01, P < 0.05$ ),P-gp表达明显增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,扎方、移植组3,7,14 d及联合各组ND增加( $P < 0.01, P < 0.05$ ),各组病理损伤减轻,以扎方、移植、联合组7,14 d明显( $P < 0.01, P < 0.05$ ),扎方、移植、联合各组P-gp表达降低( $P < 0.01$ );与移植组比较,扎方组1 d ND增高( $P < 0.01$ ),14 d降低( $P < 0.05$ ),联合各组ND均增高( $P < 0.01$ ),联合组7,14 d病理损伤减轻( $P < 0.05$ ),扎方组1,3,7 d P-gp表达降低,以1 d降低明显( $P < 0.05$ ),14 d P-gp表达增高( $P < 0.05$ ),联合各组P-gp表达均降低( $P < 0.01$ );扎方与联合组比较,联合各组上述指标均改善( $P < 0.01, P < 0.05$ );同组间比较,均以7 d变化显著,14 d有明显改善( $P < 0.01$ )。结论:脑缺血后脑组织海马CA1区神经元密度及组织病理学均出现不同程度损伤;扎里奴思方和BMSCs移植均可不同程度改善脑缺血后脑组织神经元存活数量及状态,以二者联合作用显著,其机制可能与干预P-gp动态表达有关。

**[关键词]** 脑缺血再灌注; 扎里奴思方; 骨髓间充质干细胞; 神经元; P-糖蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0125-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080125

## Effect of Hui Medicine Zhali Nusi Fang Combined Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Neurons and P-glycoprotein Expression in Rats After Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

REN Fei-fei<sup>1</sup>, LIU Jing-xia<sup>1\*</sup>, ZHU Wan-ping<sup>2</sup>, HU Xi-cheng<sup>1</sup>, LIU Hui-xian<sup>3</sup>, LIU Yang<sup>3</sup>, LI Juan<sup>3</sup>  
(1. Traditional Chinese Medicine School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Basic Medical School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Affiliated Hui Medicine & Chinese Medicine Hospital of Ningxia Medical University, Wuzhong 751100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Hui medicine Zhali Nusi Fang (ZLNS) combined bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on neurons and P-glycoprotein (P-gp) expression in rats after cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI). **Method:** Two hundred and fifty SD rats were randomly divided into the sham-operated group, the model group, the ZLNS group, the BMSCs transplantation group and the ZLNS combined BMSCs transplantation group. The rats except the 10 rats in the sham-operated group were subdivided into day 1, 3, 7 and 14 groups of 15 each. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was duplicated by inserting a nylon thread. BMSCs were cultured and amplified by a whole bone marrow adherence method. Drugs

**[收稿日期]** 20140820(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260569)

**[第一作者]** 任非非, 硕士, 从事中医药及回族医药防治脑病研究, Tel:13895393580, E-mail: rff19870518@163.com

**[通讯作者]** \*刘敬霞, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药及回族医药防治老年病研究, Tel:13519216687, E-mail: ljx199566@163.com

were given to the rats by intragastric administration ( $14.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), BMSCs suspension solution were transplanted into brain through carotid artery ( $2 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ ). Rat brain was taken out at 1, 3, 7, 14 days after transplantation. The neuronal density (ND) in hippocampal CA1 area and brain pathological damage (BPD) were observed and determined. The expression of P-gp was measured by using an immunohistochemical method. **Result:** Compared with the sham-operated group, ND decreased ( $P < 0.01$ ), BPD increased ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), and the P-gp expression increased significantly ( $P < 0.01$ ) in the model group. Compared with the model group, the ND increased at day 3, 7 and 14 in the ZLNS, transplantation and combination groups ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), the P-gp expression decreased significantly in the ZLNS, transplantation and combination groups ( $P < 0.01$ ), the BPD decreased in all groups, and the results were obvious at day 7 and 14 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ). Compared with the transplantation group, the ND increased at day 1 in ZLNS group ( $P < 0.01$ ), decreased at day 14 in ZLNS group, and increased in combination groups ( $P < 0.01$ ), the BPD alleviated at day 7, 14 in the combination group ( $P < 0.05$ ), the P-gp expression decreased at day 1, 3 and 7 in the ZLNS groups, and the results were obvious at day 1 ( $P < 0.05$ ) and increased at day 14 ( $P < 0.05$ ), the P-gp expression decreased significantly in all combination groups ( $P < 0.01$ ). Compared with the ZLNS group, all the indicators in the combination groups were improved ( $P < 0.01, P < 0.05$ ). Compared with the same time group, all changes were more obvious at day 7 and were improved at day 14. **Conclusion:** The ND in hippocampal CA1 area and BPD had a variable degree of damage in rats after cerebral ischemia. Both ZLNS and BMSCs transplantation could improve the amounts and condition of neurons, and the effect was superior when they were combined. Its mechanism may be related to the regulation of the dynamic expression of P-gp.

[**Key words**] cerebral ischemia reperfusion; Zhali Nusi Fang; bone marrow mesenchymal stem cells; neurons; P-glycoprotein

缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 是目前威胁人类健康的主要疾病之一, 约占全部脑血管病的 80% 左右<sup>[1]</sup>。而存在于脑内并具有低通透性、低疏水性、高反射系数和高电阻等特性的血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 是病理状态下限制药物进入脑内的主要因素<sup>[2]</sup>。P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是位于脑内毛细血管管腔侧内皮细胞膜顶端的与 BBB 屏障特性密切相关的转运蛋白, 参与物质的摄取与外排, 对中枢神经系统的稳态、药物转运及分布起重要作用<sup>[3]</sup>。研究显示<sup>[4]</sup>, P-gp 的外排作用能显著降低脑内的血药浓度, 给脑损伤药物治疗带来不利影响。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是存在于骨髓基质中的成体干细胞, 具有强大的增殖和多向分化潜能, 取材方便、来源充足、免疫原性低, 成为干细胞移植治疗脑缺血领域的热点<sup>[5]</sup>。扎里奴思方出自《回回药方》, 具有芳香开窍, 补肾活血功效, 前期研究显示<sup>[6]</sup> 其能调控脑缺血后 BBB 通透性, 改善脑组织损伤程度。本研究拟以 SD 大鼠为研究对象, 观察正常及脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 时大鼠 BBB 上 P-gp 表达的变化及应用扎里奴思方

联合 BMSCs 移植对其变化的影响, 探讨联合应用治疗脑缺血损伤的机制, 为回医药联合干细胞移植治疗神经系统疾病的临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠, 250 只, 清洁级, 体重 ( $350 \pm 30$ ) g, 由宁夏医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(宁)2009-0001; 所有大鼠于同一动物房中饲养, 温度 ( $26 \pm 1$ ) °C, 湿度 ( $50 \pm 10$ ) %, 光暗周期 12 h/12 h, 自由进食和饮水。常规环境适应性饲养 7 d 后进行实验。

**1.2 药物及试剂** 扎里奴思方出自《回回药方》, 方药组成为: 阿你松 (即安息香) 3 g, 法里公 (即小茴香) 12 g, 兀沙吉 (即乳香) 12 g, 法忒刺撒里荣 (即当归) 12 g, 木里 (即没药) 12 g, 撒法郎 (即红花) 12 g, 阿咱儿公 (即牡丹皮) 9 g, 拆不牙刺 (即芦荟) 12 g, 伯思八牙 (即水龙骨) 12 g, 祖伐 (即怀牛膝) 24 g, 撒的知 (即肉桂) 6 g, 膈脓脐 (即海狗肾) 12 g, 阿夫忒蒙 (即菟丝子) 12 g, 哈咱卜咱里刺 (即石菖蒲) 12 g。制剂由宁夏医科大学附属回医中医院制剂室提供, 煎煮滤取并浓缩药液至生药质量浓度为  $1.46 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 4 °C 保存备用。培养基 DMEM/F-12 (美国 Life Technologies 公司, 批号 1292607),

0.25% 胰酶(美国 HyClone 公司,批号 J130020),胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 051126),青霉素、链霉素(美国 Solarbio 公司,批号 20110726),尼龙线栓(北京沙东生物科技有限公司,批号 2636-4A),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20100709),氨苄青霉素钠(美国 Amresco 公司,批号 0339),200 目细胞过滤筛(北京索莱宝科技有限公司),密闭式静脉留置针(苏州碧迪医疗器械有限公司,批号 8323695),一抗(武汉博士德生物公司,批号 BA1351-1),辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗(北京 ZSGB-BIO 公司,批号 ZB-2301),浓缩型 DAB 试剂盒(北京 ZSGB-BIO 公司,批号 ZLI-9017)。

**1.3 仪器** PM-10AD 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),T02323 型二氧化碳培养箱(美国 Sheldon Plumbing 有限公司),YP1201N 型电子天平(上海精科天平仪器厂),TGL-10C 型高速台式离心机(上海精科实业有限公司),MDF-U7386S-sanyo 型超低温冰箱(日本三洋公司),CU-420 型电热恒温水槽(上海一恒科技公司),HS-840U 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),GZX-DH·500-BS 型电热恒温干燥箱(上海昕仪仪器仪表有限公司),YY0088-92 型微量进样器(江苏省金坛市欣悦玻璃仪器有限公司),图像分析系统 Image-Pro Plus Version 6.0(美国 Media Cybernetics 有限公司)。

## 2 方法

**2.1 局造性脑缺血再灌注大鼠模型制备** 参照 Longa 等<sup>[7]</sup>的改良线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。10%水合氯醛 *ip* 麻醉大鼠,待麻醉完全后,仰卧位固定大鼠,常规消毒手术视野区皮肤,颈前正中切开皮肤,钝性分离左侧颈总动脉(CCA);分离颈内(ICA),颈外(ECA)动脉,穿线备用;结扎 ECA 近心端和远心端,将 ECA 从中间剪断;结扎翼腭动脉(PA),于 ECA 近 CCA 分叉处剪一小口,将线栓通过小口穿入 ICA 并缓慢前向推进,直至有阻力感为止,线栓插入深度约为(18.0 ± 0.5) mm;插线成功后留出线栓残端约 1 cm,结扎 ECA 剪口处,缝合皮肤,并在切口处滴注青霉素钠溶液,以防感染。缺血 2 h 后拆线并缓慢拔出线栓(但未全部拔出 ECA)以进行缺血再灌注,后缝合皮肤。假手术组只分离 CCA, ICA 及 ECA,不插入线栓。手术过程中保持大鼠肛温(37.0 ± 0.5) °C,保持室温(26 ± 1) °C。术后参考 Longa 等<sup>[7]</sup>的 5 级 4 分法对模型进行评分:

①0 分,正常,无神经功能缺损症状。②1 分,不能完全伸展病变对侧上肢。③2 分,出现 Horner 征,行走时向病变对侧旋转。④3 分,行走时向病变对侧倾倒。⑤4 分,无自发活动伴意识降低。1~3 分者为成功模型。若术中意外死亡、缺血再灌注 24 h 内死亡、线栓插入过深造成蛛网膜下腔出血的大鼠被剔除。

## 2.2 BMSCs 的培养、扩增和移植

**2.2.1 悬液收集** 将 2 月龄雄性 SD 大鼠(平均体重 250 g)断颈处死,全身浸泡于 75% 乙醇中消毒 10 min。无菌条件下取出股骨、胫骨,剔除表面附着的组织,PBS 清洗 3 次;剪掉股骨、胫骨的骨垢端,露出骨髓腔,用 DMEM/F-12 培养基(含肝素及青、链霉素)10 mL 反复冲洗骨髓腔,反复吹打后用 200 目细胞过滤筛过滤,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清;加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基 5 mL 吹打混匀,重悬,收集 BMSCs 单细胞悬液。

**2.2.2 培养、扩增** 将收集到的 BMSCs 单细胞悬液以 1 × 10<sup>8</sup>/L 细胞密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中,置于 37 °C,5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养;3~4 d 换液 1 次,弃去未贴壁细胞后继续培养,倒置显微镜下逐日观察细胞形态及生长;待瓶底贴壁细胞达 80%~90% 时,弃去瓶内培养基,PBS 缓慢洗涤细胞,以清除培养瓶内混杂细胞;加入 0.25% 胰酶 2 mL 消化,于倒置显微镜下观察,待贴壁细胞明显收缩,间隙变大,大部分细胞形态变圆并开始脱落时,加入完全培养基终止消化,结束原代培养;反复吹打培养基,收集细胞悬液至 15 mL 离心管中,1 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 5 min,弃上清,加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基重悬,按 1:2 比例进行传代培养。逐日观察细胞生长状态。

**2.2.3 重悬、计数** 收集 P3 代细胞,如前法进行消化、离心及 PBS 漂洗 3 次,进行细胞重悬并计数,调整细胞密度至每 0.2 mL PBS 含细胞数为 2 × 10<sup>6</sup> 个备用。

**2.2.4 移植** 建立 MCAO 模型 24 h 后,拆线并将剩余线栓残端全部拔出 ECA,沿 ECA 切口将直径 0.7 mm 密闭式静脉留置针管缓慢插入 ECA,缓慢向前推进至 ICA 前端并结扎;用微量移液器抽取 BMSCs 单细胞悬液 200 μL,对移植组和联合组大鼠经留置针管由缺血同侧的颈内动脉缓慢移植入脑,后拔出留置针,彻底结扎 ECA 残端,缝合皮肤。

## 2.3 分组与用药

**2.3.1 分组** SD 大鼠按随机数字表法分为假手术

组、模型组、扎里奴思方组(简称扎方组),BMSCs移植组(简称移植组),BMSCs移植联合扎里奴思方组(简称联合组);其中后4组根据取材时间点不同又各分为1,3,7,14 d,每个时间点组大鼠15只,假手术组10只大鼠。

**2.3.2 用药** 假手术组及模型组以同等体积生理盐水 *ig*;模型组颈内动脉给予和移植组同等体积的生理盐水;扎方组于术前4 d *ig* (大鼠 *ig* 用药的剂量根据人与大鼠等效剂量换算公式计算,*ig* 体积按照100 g大鼠 *ig* 1 mL计算,生药用量为  $14.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,配成的混悬液为  $1.46 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),再灌注后24 h颈动脉给予生理盐水200  $\mu\text{L}$ ;移植组于术前4 d给予和扎方组同等体积的生理盐水 *ig*,再灌注后24 h颈内动脉给予BMSCs悬浮液200  $\mu\text{L}$ (细胞数为  $2 \times 10^6$  个);联合组于术前4 d给予扎里奴思方 *ig*,再灌注后24 h颈内动脉给予BMSCs悬浮液200  $\mu\text{L}$ 。大鼠于术前12 h禁食,不禁水。

**2.4 取材** 假手术组于术后14 d取材,其余各组根据时间点分别于颈内动脉用药后1,3,7,14 d取材;麻醉大鼠,4%的多聚甲醛溶液进行灌注固定,断头取脑,用4℃生理盐水冲洗3次。于冰盘上迅速分离大脑半球,取左侧半球,自距离额极5 mm处冠状切取2 mm厚脑组织放入盛有4%多聚甲醛的棕色瓶内固定,待作病理观察;再向后冠状切取2 mm厚脑组织待作免疫组化检测;其余标本置于液氮内保存。

## 2.5 指标检测

**2.5.1 海马CA1区神经元密度** 高倍镜下观察双侧海马CA1区神经元存活情况;计数双侧海马CA1区每1 mm长度细胞条带内未死亡的椎体细胞数目,每侧计数6个区段,取平均数为神经元密度(neuronal density, ND)。

**2.5.2 海马CA1区神经元组织学病理分级** 参考Kitagawa等<sup>[8]</sup>的分级方法确定海马CA1区神经元组织学病理分级。具体标准为:0级,无神经元死亡;I级,散在的神经元死亡;II级,大量的神经元死亡;III级,几乎全部神经元死亡。

**2.5.3 免疫组织化学染色法检测P-gp表达** 取4℃保存的脑组织石蜡切片,常温放置30 min;入二甲苯和乙醇梯度依次常规脱蜡;0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS洗3次×5 min;入胰酶修复液(含胰酶质量浓度5 g·L<sup>-1</sup>,CaCl<sub>2</sub>浓度10 g·L<sup>-1</sup>)37℃恒温箱修复20 min;0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS洗3次×5 min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min;0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS洗3次×5 min;入0.03% Triton-

X100室温孵育10 min;0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS洗3次×5 min;10%山羊血清室温封闭1 h;加入兔抗大鼠单克隆抗体P-gp(浓度1:100,阴性对照组加PBS)4℃过夜;0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS洗3次×5 min;加入辣根酶标记山羊抗兔IgG,37℃孵育1 h;DAB显色,常规脱水,透明及树脂封片。使用Image-Pro Plus Version 6.0图像分析系统,每组各标本的每张切片随机选取5个视野,测其平均积分吸光度(IA)。

**2.6 统计学分析** 采用SPSS 17.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行正态分布检验,符合正态分布且方差齐性资料比较采用单因素方差分析,多个样本均数间的多重比较采用SNK-*q*法检验;不符合正态分布且方差不齐的资料采用秩转换的非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对海马CA1区神经元密度的影响** 与假手术组比较,模型组各时间点海马CA1区神经元密度减少( $P < 0.01$ )。与模型组比较,扎方、移植各组3,7,14 d组及联合组各时间点海马CA1区神经元密度增大( $P < 0.01, P < 0.05$ );与移植组比较,扎方组1 d海马CA1区神经元密度增大( $P < 0.01$ ),14 d神经元密度减少( $P < 0.05$ ),3,7 d变化无统计学意义,联合组各时间点海马CA1区神经元密度增大( $P < 0.01$ )。扎方组与联合组比较,联合各组海马CA1区神经元密度增加,以3,7,14 d变化明显( $P < 0.01$ )。同组别不同时间点比较,模型、移植、扎方及联合组各7 d海马CA1区神经元密度均较各1,3,14 d减少( $P < 0.01$ ),模型、扎方及移植组14 d均较各1 d减少( $P < 0.01$ ),联合组14 d较1 d增大,但变化无统计学意义,移植、联合组14 d较各3 d海马CA1区神经元密度增大( $P < 0.01$ ),模型、扎方组14 d较各3 d变化无统计学意义。见表1。

**3.2 对海马CA1区神经元组织学病理分级的影响** 模型组大鼠脑组织海马CA1区神经元细胞损伤明显,形态欠规则,胞膜不光整,胞核固缩,细胞间质疏松,可见变性坏死细胞,组织学病理分级多为2~3级,与假手术组相比有显著差异( $P < 0.01, P < 0.05$ ),模型组7 d比较明显。与模型组比较,扎方、移植及联合各组大鼠脑组织海马CA1区神经元损伤均不同程度减轻,以各组7,14 d减轻明显( $P < 0.01, P < 0.05$ )。与移植组比较,扎方组神经元损伤变化不显著,联合组7,14 d神经元损伤减轻( $P < 0.05$ )。扎方与联合组比较,联合组7,14 d神经元损伤减轻( $P < 0.05$ )。同组不同时间点比较,模型、

表 1 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠海马 CA1 区神经元密度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of ZLNS combined with BMSCs on neuronal density in hippocampal CA1 area of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	t/d	海马 CA1 区神经元密度
假手术	10	-	14	191.00 ± 5.96
模型	15	-	1	121.50 ± 10.20 <sup>2,12,14)</sup>
	15	14.6	3	93.80 ± 3.22 <sup>2,10,14)</sup>
	15	14.6	7	70.70 ± 3.95 <sup>2,10,12)</sup>
	15	14.6	14	92.40 ± 6.62 <sup>2,10,14)</sup>
扎方	15	14.6	1	125.20 ± 6.56 <sup>6,12,14)</sup>
	15	14.6	3	102.10 ± 2.96 <sup>4,10,14)</sup>
	15	14.6	7	83.60 ± 4.77 <sup>4,10,12)</sup>
	15	14.6	14	104.20 ± 2.97 <sup>4,5,10,14)</sup>
移植	15	-	1	118.30 ± 5.46 <sup>12,14)</sup>
	15	-	3	103.10 ± 2.02 <sup>4,10,14)</sup>
	15	-	7	83.50 ± 4.38 <sup>4,10,12)</sup>
	15	-	14	110.00 ± 4.67 <sup>4,10,12,14)</sup>
联合	15	14.6	1	127.10 ± 5.55 <sup>3,6,12,14)</sup>
	15	14.6	3	112.90 ± 6.12 <sup>4,6,8,10,14)</sup>
	15	14.6	7	97.30 ± 6.00 <sup>4,6,8,10,12)</sup>
	15	14.6	14	129.90 ± 3.84 <sup>4,6,8,12,14)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与移植组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ ;扎方组与联合组比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>8)</sup>  $P < 0.01$ ;与同组 1 d 比较<sup>9)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>10)</sup>  $P < 0.01$ ;与同组 3 d 比较<sup>11)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>12)</sup>  $P < 0.01$ ;与同组 7 d 比较<sup>13)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>14)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

移植、扎方及联合各组 7 d 海马 CA1 区神经元损伤较各 1, 3, 14 d 加重, 但差异多无统计学意义, 模型组 14 d 较其 1 d 损伤程度加重 ( $P < 0.05$ ), 联合组 14 d 较其 7 d 组损伤程度减轻 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 对各组大鼠脑组织 P-gp 表达的影响** 与假手术组比较, 模型组各时间点 P-gp 表达明显增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 扎方、移植及联合各组相应时间点 P-gp 表达明显减少 ( $P < 0.01$ )。与移植组比较, 扎方组 1, 3, 7 d P-gp 表达略降低, 以 1 d 降低明显 ( $P < 0.05$ ), 扎方组 14 d P-gp 表达增高 ( $P < 0.05$ ), 联合各组 P-gp 表达均降低 ( $P < 0.01$ )。扎方与联合组比较, 联合各组 P-gp 表达均降低 ( $P < 0.01$ )。同组别不同时间点比较, 模型、移植、扎方及联合各组 P-gp 表达均在移植后 7 d 达高峰, 且较其他组有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 各组 3 d P-gp

表 2 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠海马 CA1 区神经组织病理分级的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of ZLNS combined with BMSCs on brain pathological damage in hippocampal CA1 area of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	t/d	各级病理变化/只				平均秩和
			0	I	II	III	
假手术	-	14	9	1	0	0	10.95
模型	-	1	0	3	6	1	90.10 <sup>13)</sup>
	14.6	3	0	1	6	3	112.50 <sup>1)</sup>
	14.6	7	0	0	4	6	133.80 <sup>2,9)</sup>
	14.6	14	0	1	4	5	122.60 <sup>1,9)</sup>
扎方	14.6	1	0	4	5	1	83.95
	14.6	3	0	3	6	1	90.10
	14.6	7	0	2	5	3	106.35 <sup>3)</sup>
	14.6	14	1	4	3	2	79.40 <sup>3)</sup>
移植	-	1	0	6	3	1	71.65
	-	3	0	4	4	2	89.00
	-	7	0	3	4	3	100.20 <sup>3,9)</sup>
联合	-	14	0	5	4	1	77.80 <sup>3)</sup>
	14.6	1	1	5	3	1	68.20
	14.6	3	1	4	4	1	74.35 <sup>3)</sup>
	14.6	7	1	3	4	2	85.55 <sup>3,5,7)</sup>
	14.6	14	1	6	3	0	57.00 <sup>4,5,7,13)</sup>

表达均较其 1 d 增加 ( $P < 0.01$ ), 各组 14 d P-gp 表达均较其 1 d 增加 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 较 3 d 表达降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

#### 4 讨论

脑缺血后 BBB 结构和功能改变是损伤加重的重要病理基础, 有效调控 BBB 通透性成为促进损伤恢复的重要途径。研究表明<sup>[9]</sup>, 三磷酸腺苷结合盒式结构 (ATP binding cassette, ABC) 转运蛋白家族是一类 ATP 依赖型跨膜转运蛋白, 主要位于肝脏、小肠、BBB、血脑屏障及胎盘等多个组织器官中, 介导物质的排出及药物在体内的吸收、分布、排泄过程, 并防止机体对有害物质的吸收, 对维持内环境稳态起重要作用。其中, P-gp 是目前发现的该家族中最重要且研究最多的一种转运蛋白<sup>[10]</sup>。P-gp 由多耐药基因 (multidrug resistance gene, MDR) 编码, 相对分子质量为 170 kDa, 包含 1 280 个氨基酸, 由 2 个串联重复序列及 1 个链接区组成, 每个重复序列由 610 个氨基酸构成, 链接区由 60 个氨基酸构成<sup>[11-12]</sup>。在每个重复序列中包含 6 个由跨膜  $\alpha$ -螺旋序列组成的疏水跨膜域 (transmembrane domains, TMD) 和 1 个位于胞膜内侧的亲水性核苷酸结合序

表 3 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠脑组织 P-gp 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Effects of ZLNS combined with BMSCs on P-gp in brain tissue of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	t/d	P-gp 含量/IA
假手术	10	-	14	95.40 ± 3.56
模型	15	-	1	133.54 ± 2.83 <sup>2,12,14)</sup>
	15	14.6	3	153.87 ± 3.71 <sup>2,10,14)</sup>
	15	14.6	7	162.13 ± 1.16 <sup>2,10,12)</sup>
	15	14.6	14	141.21 ± 4.08 <sup>2,10,12,14)</sup>
扎方	15	14.6	1	125.06 ± 1.27 <sup>4,5,12,14)</sup>
	15	14.6	3	143.19 ± 1.85 <sup>4,10,14)</sup>
	15	14.6	7	150.21 ± 4.07 <sup>4,10,12)</sup>
	15	14.6	14	132.46 ± 1.15 <sup>4,5,10,12,14)</sup>
移植	15	-	1	127.38 ± 2.37 <sup>4,12,14)</sup>
	15	-	3	145.25 ± 2.61 <sup>4,10,14)</sup>
	15	-	7	151.63 ± 0.97 <sup>4,10,12)</sup>
	15	-	14	130.20 ± 1.32 <sup>4,9,12,14)</sup>
联合	15	14.6	1	116.37 ± 1.93 <sup>4,6,8,12,14)</sup>
	15	14.6	3	136.50 ± 1.32 <sup>4,6,8,10,14)</sup>
	15	14.6	7	143.98 ± 1.71 <sup>4,6,8,10,12)</sup>
	15	14.6	14	120.41 ± 2.13 <sup>4,6,8,10,12,14)</sup>

列 (nucleotide-binding domains, NBD), TMD 参与药物结合和转运, NBD 参与 ATP 结合与水解。药物进入细胞后与 P-gp 底物结合, 同时 NBD 与 ATP 结合, 利用 ATP 水解释放的能量使 P-gp 构型改变, 药物因亲和力不同而被排出细胞外, 使细胞内药物浓度降低<sup>[13]</sup>。因此, P-gp 又称机体的“药物溢出泵”。

在脑内, P-gp 主要分布于毛细血管内皮细胞管腔侧和脉络丛的上皮细胞表面<sup>[14]</sup>, 其他细胞少见表达。但也有研究表明<sup>[15]</sup>, 病理情况下星形胶质细胞和神经元也会有 P-gp 表达。P-gp 的外排泵作用降低脑缺血损伤后脑内治疗药物的浓度, 提高机体耐药性, 影响治疗作用发挥。研究显示<sup>[16]</sup>, 抑制 CIRI 后 P-gp 表达, 能显著上调脑内丹参素含量, 对神经功能恢复起促进作用。Cen 等研究显示<sup>[17]</sup>, 脑缺血后 4 h, 缺血侧皮质中就可见到高表达的 P-gp, 且其表达与限制药物进入脑内密切相关。本研究显示, MCAO 后 1 d, 脑内缺血侧皮质及纹状体 P-gp 表达上调, 且随时间延长, P-gp 表达持续增多, 3 d 时处于较高水平, 7 d 时达高峰, 后逐渐下降, 但至 14 d 时仍高于假手术组, 这一变化趋势与 Ramos 等<sup>[18]</sup> 研究结果一致, 脑组织海马 CA1 区神经元密度随损伤

时间呈降低趋势, 7 d 时降至最低, 且组织学病理分级最严重, 提示 CIRI 后脑组织损伤与 P-gp 表达上调密切相关, P-gp 表达越高, 损伤越严重。

BMSCs 不仅能分化成脂肪、骨及软骨细胞, 也能分化成神经细胞, 促进脑缺血后运动、感觉功能恢复及改善损伤后认知功能障碍<sup>[19]</sup>, BMSCs 还能分泌多种神经营养因子促进损伤恢复<sup>[20]</sup>。因此, BMSCs 被认为是干细胞移植治疗脑缺血损伤理想的种子细胞, 利用 BMSCs 移植成为促进损伤后神经元结构和功能恢复的有效途径<sup>[21]</sup>。但同时, 移植入脑的 BMSCs 需通过 BBB 向受损部位迁徙和归巢, 而 BBB 的天然屏障作用限制了 BMSCs 进入脑内的数量, 影响治疗作用的发挥<sup>[22]</sup>。

扎里奴思方出自回医经典著作《回回药方》, 由安息香、小茴香、乳香、当归、没药、红花、牡丹皮、芦荟、水龙骨、怀牛膝、肉桂、海狗肾、菟丝子、石菖蒲等药组成, 原书<sup>[23]</sup>论其“可开窍, 净其浑身厚浊风痰, 治疗痰盛弱病”, 具有芳香开窍、补肾活血功效, 是回族医学治疗脑梗死的常用方剂之一。其组方中的“香药”更是切中中风后邪蒙清窍、风痰阻窍的病机变化, 可作为药引子促进药物透过 BBB, 实现对损伤的靶向治疗, 同时也有类 P-gp 抑制剂的作用<sup>[24]</sup>, 抑制药物的排出, 促进药物吸收。前期研究<sup>[25]</sup>显示, 该方能改善脑缺血后神经元损伤程度, 促进神经功能恢复。本实验将该方与 BMSCs 联合应用, 结果显示扎方、移植与联合各组大鼠在海马区神经元密度、组织学病理分级及 P-gp 表达方面均较模型组有不同程度改善, 呈逐渐恢复趋势, 且作用以二者联合更为显著。联合各组海马区神经元密度较扎方和移植组增加, 且 14 d 增加明显。联合各组大鼠脑组织病理学分级较扎方、移植组减轻, 且以 7, 14 d 变化明显, 联合各组 P-gp 表达均较扎方、移植组减少, 提示二者联合在改善脑缺血损伤后神经元数量及状态方面作用显著, 其机制可能与下调 P-gp 的动态表达有关。

本实验证实了 CIRI 能诱导脑组织 P-gp 表达, 且随时间呈先增后减趋势, 同时发现扎里奴思方联合 BMSCs 移植能有效调节 P-gp 动态表达, 改善损伤后神经元存活数量及状态, 既解决了因 BBB 存在而使 BMSCs 透过不足的问题, 又降低了耐药蛋白的表达, 提高药物的疗效, 为回医药治疗脑病提供实验基础。

[参考文献]

[1] Sveinsson O A, Kjartansson O, Valdimarsson E M.

- Cerebral ischemia/infarction-epidemiology, causes and symptoms[J]. *Laeknabladid*, 2014, 100(5):271-275.
- [2] 刘艺平, 江沛, 李焕德, 等. 血脑屏障的膜蛋白对药物转运及临床治疗的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(6):456-460.
- [3] Borst P, Schinkel A H. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(10):4131-4136.
- [4] Yano K, Takimoto S, Motegi T, et al. Role of P-glycoprotein in regulating cilnidipine distribution to intact and ischemic brain [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 29(3):254-258.
- [5] Tsai M J, Tsai S K, Hu B R, et al. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(5):2-7.
- [6] 李娟, 刘洋, 刘会贤, 等. 扎里奴思方对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3):114-117.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-90.
- [8] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain[J]. *Brain Res*, 1990, 528(1):21-25.
- [9] Huls M, Russel F G, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328(1):3-8.
- [10] König J, Müller F, Fromm M F. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(3):944-950.
- [11] Li J, Jaimes K F, Aller S G. Refined structures of mouse P-glycoprotein[J]. *Protein Sci*, 2014, 23(1):34-37.
- [12] 王玉璘, 王少峡, 郭虹, 等. 血脑屏障中 P-糖蛋白的调节机制 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(9):1196-1199.
- [13] 王晓娟, 杨力, 郭泽云. 脑缺血后 P-糖蛋白的表达变化及影响因素 [J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(3):338-341.
- [14] 聂昊, 王晖. P 糖蛋白在不同组织中的分布与功能研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2012, 28(4):456-460.
- [15] Cardoso F L, Brites D, Brito M A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches [J]. *Brain Res Rev*, 2010, 64(2):328-332.
- [16] Chong Y, Wang T, Wang W, et al. Down-regulation of P-glycoprotein expression contributes to an increase in Danshensu accumulation in the cerebral ischemia/reperfusion brain [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3):812-816.
- [17] Cen J, Liu L, Li M S, et al. Alteration in P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the early period of MCAO in rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(5):665-669.
- [18] Ramos A J, Lazarowski A, Villar M J, et al. Transient expression of MDR-1/P-glycoprotein in a model of partial cortical devascularization [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2004, 24(1):101-106.
- [19] 王苏平, 孙鑫, 李深. 骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2014, 31(3):280-285.
- [20] Teixeira F G, Carvalho M M, Sousa N, et al. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20):3871-3876.
- [21] 杨国强, 范学慧, 萧洪文. 骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑损伤的最新研究进展[J]. *四川解剖学杂志*, 2013, 21(3):32-37.
- [22] Liu L, Eckert M A, Riazifar H, et al. From blood to the brain: can systemically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood-brain barrier? [J]. *Stem cells Int*, 2013, 43:5093-5096.
- [23] 宋岷. 《回回药方》考释. 12卷[M]. 北京: 中华书局出版社, 2007:1607.
- [24] 邹亮, 冷静, 胡慧玲, 等. P-糖蛋白方法用于中药药性理论研究的探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(17):319-323.
- [25] 刘敬霞, 李建生, 牛阳, 等. 扎里奴思方和蜜煎菖蒲方对脑缺血大鼠神经元损伤的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(11):1001-1004.

[责任编辑 周冰冰]