

丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠血管新生及对 Ang-1 蛋白表达的影响

张秋雁¹, 朱伟¹, 徐瑾瑜², 唐金强¹, 梁昊^{1*}, 苏剑峰¹, 唐映红¹, 逯晶¹
(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 华恩堂养生管理有限公司, 长沙 410000)

[摘要] 目的:研究丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠血管新生及血管生成素-1(Ang-1)的影响。方法:用线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞缺血再灌注(MCAO)模型,2 h后开放血流再灌注。大鼠造模成功后被分为6组(丹龙醒脑方14.76,7.38,3.69 g·kg⁻¹剂量组,尼莫地平10.8 mg·kg⁻¹组,模型组,假手术组),ig 7 d后处死大鼠取脑,用免疫组化法测定缺血海马区的内皮细胞数和微血管密度(MVD)及Ang-1的蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠内皮细胞计数及MVD,Ang-1蛋白表达均明显增强($P < 0.05$);与模型组相比,丹龙醒脑方组内皮细胞数、MVD及Ang-1蛋白表达均有明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:丹龙醒脑方能够促进脑缺血再灌注大鼠缺血脑组织血管新生,对缺血脑组织具有保护作用,其作用机制可能与上调Ang-1蛋白表达有关。

[关键词] 丹龙醒脑片; 脑缺血再灌注; 血管新生; 血管生成素-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0139-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010139

Effect of Danlong Xingnao Decoction on Angiogenesis and Ang-1 Protein Expressions in Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion

ZHANG Qiu-yan¹, ZHU Wei¹, XU Jin-yu², TANG Jin-qiang¹,
LIANG Hao^{1*}, SU Jian-feng¹, TANG Ying-hong¹, LU Jing¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Huaentang Health Management Co. Ltd., Changsha 410000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Danlong Xingnao decoction on the angiogenesis and the angiopoietin 1 (Ang-1) protein expression of rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Method:** A rat model of the middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO) was created by using the suture method, and the blood reperfusion was performed 2 hours later. The rats were randomly divided into six groups, high-dose, medium-dose and low-dose (14.76, 7.38, 3.69 g·kg⁻¹) Danlong Xingnao decoction groups, nimodipine (10.8 mg·kg⁻¹) group, model group and sham group. The rats were given by gavage once a day for 7 days. The microvessel vascular density (MVD) were observed and the expression of Ang-1 at protein level were studied by the immunohistochemical method. **Result:** Compared with the sham group, the microvessel density, Ang-1 in model group were higher significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, Danlong Xingnao decoction groups showed significantly higher levels of MVD and the protein expression of Ang-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Danlong Xingnao decoction could promote angiogenesis and protect ischemic brain tissue in rats. Its mechanism may be correlated with the up-regulation of the expression of Ang-1.

[Key words] Danlong Xingnao decoction; cerebral ischemia reperfusion; angiogenesis; angiopoietin-1

[收稿日期] 20150314(004)

[基金项目] 湖南省高校创新平台开放基金项目(12K090)

[第一作者] 张秋雁,博士,教授,硕士生导师,从事心脑血管疾病防治研究,Tel:0731-88458710,E-mail:qyz17@aliyun.com

[通讯作者] *梁昊,硕士,助教,从事中西医结合心脑血管病防治研究,E-mail:lianghao118@163.com

丹龙醒脑方由丹参、三七、地龙、石菖蒲等药物组成,具有活血通窍,化痰醒脑之功效,主要用于缺血性中风及其后遗症的治疗,经多年临床应用,确有疗效。团队前期的研究表明,丹龙醒脑片能调节缺血再灌注大鼠脑组织兴奋性氨基酸含量、减轻其兴奋性毒性,保护大脑海马区神经元^[1];能显著抑制细胞凋亡数及相关因子 Fas Ligand (Fas/FasL),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达,从而有效减轻脑细胞损伤,对急性脑缺血有显著保护作用^[2-4]。本研究拟从血管新生入手,以大脑中动脉栓塞再灌注方法建立脑缺血再灌注大鼠模型,以微血管密度(MVD)评价血管新生的效果,并从血管生成素-1(Ang-1)蛋白的表达探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 230 ~ 280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。

1.2 药品 丹龙醒脑方由湖南中医药大学第一附属医院同一时间购买实验全部药品(丹参 10 g,三七 6 g,地龙 6 g,远志 8 g,淫羊藿 8 g,菟丝子 8 g),统一煎煮后浓缩成 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 放冰箱备用。尼莫地平片(山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,批号 120501)制成混悬液。

1.3 仪器 JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),HHS-2 型电子恒温不锈钢水浴锅(上海南阳仪器有限公司),LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司),医用微波炉(Haier 集团),MIAS 医学图象分析系统(北航公司),S2-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司),DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),Motic B5 型显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

1.4 试剂 水合氯醛(中国白鹤化工厂,批号 20120108),2,3,5-氯化三苯基氮唑(TTC,北京中生瑞泰科技有限公司,批号 T-8877),多聚甲醛(4%多聚甲醛,含 DEPC,批号 AR1069),CD34 兔源性多克隆抗体(批号 BA0532),Ang-1 兔源性多克隆抗体(批号 BA0636),DAB 显色试剂盒(批号 AR1021),即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(批号 SA1022),均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

2 方法

2.1 造模 用改良 Longa^[5] 栓线法复制大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。大鼠禁食 12 h 后,10%水合

氯醛($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠,腹面向上固定,颈部剪去毛发,备皮并用络合碘消毒,取颈正中切口稍微偏左,将左侧胸锁乳突肌与胸骨舌肌之间的肌间隙钝形分离,暴露出颈总动脉,用眼科弯镊挑出颈总动脉用 0 号丝线穿过备用,不用打结。沿颈总动脉在舌骨下缘挑出颈外动脉,0 号丝线结扎颈外动脉。用小号动脉夹分别夹闭颈总动脉,颈内动脉,在颈总动脉远心端用清洁的 1 mL 一次性注射器针头由颈总往颈内方向开一小口,用清洁棉球吸干残血,暴露切口,将制备好的具有光滑线头的 0.28 mm 尼龙线栓经该切口由颈总动脉插入颈内动脉,直到遇到阻力,松开颈内动脉动脉夹,继续缓慢推进,动作轻柔,直到感到有轻度阻力为止,稍微退出,线栓进入颈内动脉与颈总动脉分叉处为 18 mm 标记,固定线栓,松开颈总动脉动脉夹,逐层缝合创口。术中应保持体温 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,2 h 后拔出线栓,术后单笼饲养,自由饮食。假手术组暴露分离颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,但不插入线栓,其余同上。造模成功标准^[5]以清醒后动物出现前肢弯曲,肩内旋,以对侧上肢为重的瘫痪,前进时向手术对侧转圈,并伴有同侧 Horner 征阳性为模型成功的判断标准,不成功者剔除。

2.2 分组 造模后动物按体重编号,用随机数字表法随机分为 6 组,即丹龙醒脑方高、中、低剂量组,尼莫地平组,模型组,假手术组,每组各 8 只。

2.3 给药剂量 造模后 24 h 内开始第 1 次灌胃给药,丹龙醒脑方高、中、低剂量(14.76, 7.38, 3.69 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,分别相当于等效剂量 2,1,0.5 倍;尼莫地平组给予尼莫地平($10.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);假手术组和模型组给予等体积蒸馏水,均为 ig 给药,连续 7 d,每天 1 次。

2.4 取材 实验所用器材紫外线消毒,禁食 12 h 后将大鼠用 10% 水合氯醛溶液($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉,麻醉后迅速从后颈处断头处死,用眼科剪剪开头部皮肤暴露颅骨,分离除去后颈部肌肉,用弯钳仔细剔除颅骨,注意不要损伤脑组织,避免硬脑膜划伤,分离颅底组织时从延髓慢慢开始,固定保存。

2.5 检测指标

2.5.1 缺血脑组织血管内皮细胞数和微血管密度的测定 采用 CD34 多克隆抗体免疫组化染色后,CD34 阳性表达以血管内皮细胞染成棕黄色或浅棕色颗粒沉着为标准,以单个血管内皮细胞作为血管单位,采用显微摄像系统,采用盲法随机选择 5 个不重复的高倍视野(400 倍),计算每个视野内皮细胞数及 MVD,取平均值。

2.5.2 缺血脑组织 Ang-1 蛋白表达 采用免疫组化方法检测 Ang-1 在缺血海马区的蛋白表达情况,石蜡包埋脱水,3% H₂O₂ 室温孵育 5 ~ 10 min,然后用蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,5% ~ 10% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,勿洗,滴加一抗工作液(1:100),37 °C 孵育 1 ~ 2 h,PBS 冲洗,滴加适量二抗(1:100)工作液,37 °C 孵育 10 ~ 30 min,显色剂显色 3 ~ 15 min,蒸馏水冲洗,复染,脱水,透明,封片。采用显微摄像系统,400 倍光镜视野下采集图像,用 MIAS 医学图像分析系统,每张切片采用盲法随机选择 5 个不重复的高倍视野,计算每个视野阳性区吸光度 *A*,取平均值。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析。全部数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血管内皮细胞数及微血管密度 与假手术组相比,模型组内皮细胞数和 MVD 均明显增加($P < 0.05$);与模型组相比,各用药组内皮细胞数和 MVD 明显增加($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

3.2 Ang-1 蛋白表达 与假手术组相比,模型组 Ang-1 蛋白表达增强($P < 0.05$);与模型组相比,各用药组 Ang-1 蛋白表达显著增强($P < 0.01$)。见表 1,图 2。

表 1 丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠缺血脑组织内皮细胞数和微血管密度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Danlong Xingnao decoction on endothelial cell counts and microvessel density in ischemic rat brain tissues of all groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	内皮细胞数 /个/视野	微血管密度 /条/mm ²	Ang-1 蛋白 /A
假手术	-	70 ± 8	5.9 ± 1.4	0.12 ± 0.02
模型	-	112 ± 9 ¹⁾	8.7 ± 0.5 ¹⁾	0.15 ± 0.02 ¹⁾
尼莫地平	10.8 × 10 ⁻³	159 ± 20 ²⁾	11.7 ± 2.5 ²⁾	0.27 ± 0.06 ³⁾
丹龙醒脑方	14.76	151 ± 34 ²⁾	13.2 ± 2.2 ²⁾	0.31 ± 0.08 ³⁾
	7.38	155 ± 11 ²⁾	12.2 ± 2.6 ²⁾	0.27 ± 0.04 ³⁾
	3.69	170 ± 28 ²⁾	11.6 ± 2.6 ²⁾	0.26 ± 0.06 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

丹龙醒脑方以活血化瘀之丹参为君,田七为臣,地龙为佐,三者配伍,活血化瘀,通利经络,相辅相成,相得益彰,使活血通络之力倍增,配伍淫羊藿、菟丝子,补益肝肾,阴阳兼顾,补虚培元,再配伍远志为

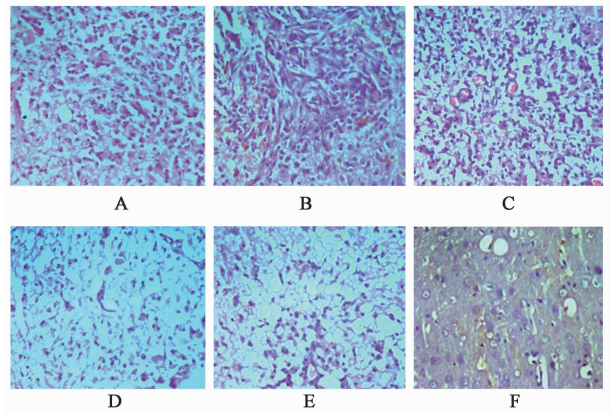


图 1 丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠缺血脑组织血管内皮细胞计数及微血管密度的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Danlong Xingnao decoction on endothelial cell counts and microvessel density in ischemic rat brain tissues (HE, ×400)

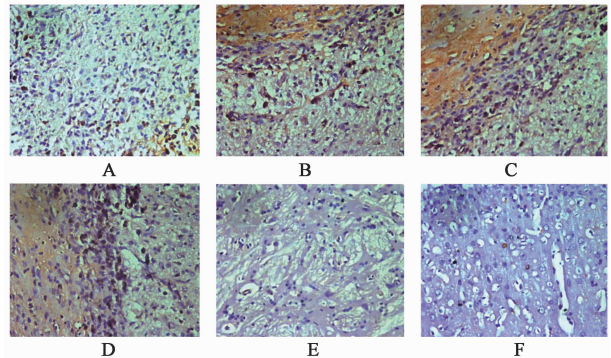


图 2 丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠缺血脑组织 Ang-1 蛋白表达情况(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Danlong Xingnao decoction on Ang-1 expression in ischemic rat brain tissues (IHC, ×400)

臣药,化痰开窍。本方药少力专,配伍精当。活血药注重活血不伤正,化痰药重在开窍醒神,安神定志,而祛痰作用较轻。活血化痰无伤正之忧,温阳而无刚燥之弊,切中本病病机。

研究表明,在脑缺血再灌注损伤后,神经功能缺损能够自然恢复,而在缺血区也能够发现自发性的血管新生^[6]。内皮细胞数和微血管密度是反映血管新生强度的指标,现在已经被很多实验应用,本研究采用抗体 CD34 来标记内皮细胞及微血管密度,通过实验发现,丹龙醒脑方能够促进缺血区大脑皮层的血管新生和侧枝循环的建立,减轻神经系统的损伤,促进神经损伤的修复,从而发挥脑保护作用,其具体机制推测与其增强血管新生因子的表达

有关。

Ang因子拥有比VEGF和bFGF更强的促血管新生作用^[7]。有研究表明,大鼠脑缺血后VEGF、Ang-1和Ang-2共同协调作用促进血管生成,在组织损伤修复过程中发挥着重要的作用^[8]。尤其是Ang-1,在脑缺血后,可通过多重作用机制,明显改善脑缺血后的脑血流灌注,挽救缺血半暗带的神经元,从而改善脑缺血后神经功能预后^[9]。近期研究发现,Ang-1在缺血性脑损伤后促进神经细胞的迁移,介导神经发生^[10]。缺血性脑损伤后Ang-1的作用为降低血管通透性,维持血脑屏障完整性;促进缺血脑组织侧枝循环形成,稳定血管;抑制神经细胞凋亡、保护神经元。

脑缺血再灌注损伤的病理生理是一个复杂的过程,它是由多个环节,多个因素,多种途径损伤的酶促级联反应,但是其基本原理是由于脑部血液循环障碍,造成细胞能量代谢衰竭,从而启动的损伤级联反应的结果^[11]。将脑损伤降至最低的关键,就是要维持脑动脉的结构和功能的完整性,因此血管保护可能成为脑损伤治疗的新靶点^[12]。其他研究^[13]结果推断丹龙醒脑方抑制脑缺血再灌注诱导的脑梗死可能与丹龙醒脑方降低脑缺血再灌注大鼠脑组织兴奋性氨基酸及自由基浓度,减轻脑细胞内钙超载,改善血脑屏障通透性,减轻脑水肿有关。因丹龙醒脑方中含丹参、三七等补血活血药物,大胆猜测其防治短暂性脑缺血再灌注损伤与其有效成分刺激血管生长因子,促进血管新生有关。本实验研究表明,丹龙醒脑方高、中、低剂量组内皮细胞计数及MVD明显增强,Ang-1的蛋白表达明显高于模型组,提示丹龙醒脑方促进大鼠脑缺血再灌注损伤后血管新生的作用,与其促进血管新生因子Ang-1的表达有明显关联。

[参考文献]

[1] 李花,刘旺华,周小青,等.丹龙醒脑片对沙土鼠脑缺血再灌注保护作用的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2003,10(5):29-30.
[2] 何倩,周小青,李花,等.丹龙醒脑片对大鼠局灶性

脑缺血再灌注后海马区肿瘤坏死因子 α 表达和细胞凋亡的影响[J].中国中医药信息杂志,2009,16(3):37-38.

[3] 何倩,李花,周小青,等.丹龙醒脑片对大鼠局灶性脑缺血再灌注后海马区AI及Fas/FasL,TNF- α 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2009,29(2):23-25.
[4] 马中建,刘旺华,李花,等.丹龙醒脑片对大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响[J].湖南中医药大学学报,2008,28(3):20-22.
[5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989,20:84-91.
[6] 黄浏姣,陈邦国,洪亚群.电针对脑缺血再灌注大鼠神经功能及脑组织微血管密度影响的研究[J].湖北中医药大学学报,2013,15(1):9-11.
[7] King T V, Valleo B L. Neovascularization of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits [J]. J Bone Joint Surg, 1991,73:587-590.
[8] 管丽坤,宋月佳,滕国鑫.大鼠脑缺血后血管内皮生长因子和血管生成素的表达变化及其作用[J].中华病理学杂志,2001,40(12):834-839.
[9] Zheng Q, Zhu D, Bair Y, et al. Exercise improves recovery after ischemic brain injury by inducing the expression of angiopoietin-1 and tie-2 in rats[J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 224(3):221-228.
[10] Cui X, Chen J, Zacharek A, et al. Nitric oxide donor up-regulation of SDF1/CXCR-4 and Ang1/Tie2 promotes neuroblast cell migration after stroke [J]. J Neurosci Res, 2009, 87(1):86-95.
[11] 何煜舟,汪云开,祝晨,等.中医药防治脑缺血再灌注损伤实验研究进展[J].浙江中医杂志,2012,47(8):617-619.
[12] Liu X, Chen Y. Synergistically therapeutic effects of VEGF165 and angiopoietin-1 on ischemic rat myocardium [J]. Scand Cardiovasc J, 2007, 41(2):95-101.
[13] 刘旺华,周小青,李花,等.丹龙醒脑片对血瘀证家兔血液流变性和球结膜微循环的影响[J].中国中医药信息杂志,2006,13(1):37-39.

[责任编辑 聂淑琴]