

川芎嗪对神经发生影响的研究进展

覃清霞, 孔祥英*, 林娜

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 脑卒中可一定程度促进神经发生,但这种作用比较有限。通过药物促进神经发生是治疗脑卒中的重要途径。川芎嗪(TMP)药理作用广泛,其中对神经保护作用逐渐备受关注,目前被广泛应用于心脑血管疾病,尤其是脑卒中的防治。本文通过对 Pubmed 等数据库查找到的川芎嗪对脑缺血后神经发生影响的相关文献进行汇总、分析和综述。结果表明,川芎嗪可通过促进神经干细胞的增殖、分化,尤其迁移,影响脑缺血后神经发生,进而发挥神经保护作用。本文总结了 TMP 在脑卒中防治过程中的可能机制,也为 TMP 在其他神经发生障碍相关性疾病中的扩大应用提供一些有益的提示。

[关键词] 川芎嗪; 脑缺血; 神经发生

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0219-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010219

Review of Effect of Tetramethylpyrazine on Neurogenesis

QIN Qing-xia, KONG Xiang-ying*, LIN Na

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Stroke can, to a certain extent, promote neurogenesis, but this effect is limited. Promoting neurogenesis by drugs is an important way for treatment of stroke. In recent years, tetramethylpyrazine (TMP) has received the attention because of its neuroprotection effect, and widely been applied in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases, especially stroke. The effect of TMP on neurogenesis after cerebral ischemia was accessed from Databases, such as Pubmed. In this article, we summarized, analyzed and reviewed the literature. The results showed that TMP significantly promoted neurogenesis by increasing the proliferation, differentiation, especially migration of neural stem cells after cerebral ischemia. This article summarized the possible mechanism of TMP in the prevention and treatment of stroke, also provide some useful hints for expand the application of TMP in other neurogenesis disorder related diseases.

[Key words] tetramethylpyrazine; stroke; neurogenesis

脑中风,又称脑卒中,已成为全球第二大常见死因。因其病因、病机复杂,目前所采取的干预措施如脑梗死的早期溶栓等,仍存在着相当的局限性。随着人们对神经系统可塑性、神经再生及干细胞认识的逐渐深入,干细胞已被应用于某些神经系统变性疾病的实验与临床治疗。脑中风作为中医药优势病种之一,中药的治疗发挥重要的作用。因此以促进神经发生为核心,研究中药治疗脑中风的作用及其分子机制,对脑中风的中医临床治疗和新药的研究

都具有重大意义。

川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)化学名为四甲基吡嗪,是从川芎的生物碱中分离得到的有效单体,具有活血化瘀、抗血小板凝集、抗氧化、改善微循环等多种作用。目前在临床上广泛应用于闭塞性脑血管疾病如脑供血不全、脑血栓形成、脑栓塞等治疗。最近的研究表明,TMP还可以有效调节神经发生,尤其最新结果表明,TMP可以显著促进神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的迁移。本文就近年

[收稿日期] 20150930(005)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ070825,ZXKT15014)

[第一作者] 覃清霞,在读硕士,主要从事中药药理研究,E-mail: qqxyifan@163.com

[通讯作者] *孔祥英,博士,副研究员,主要从事中药药理研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail: kongu0051@163.com

来 TMP 对神经发生的研究进展进行综述,以期探讨 TMP 在脑卒中防治过程中的可能机制,也为 TMP 在其他神经发生障碍相关性疾病中的扩大应用提供一些有益的提示。

1 脑卒中与神经发生

神经发生是 NSCs 增殖、多向分化并向功能区迁移,最终完善神经功能的过程。长期以来神经发生被普遍认为仅存在于动物胚胎期或者发育早期,成年脑内神经元缺乏增殖、分化能力。20 世纪 90 年代初发现^[1],成年小鼠大脑纹状体中存在可增殖、分化为神经元和星形胶质细胞的细胞。正常情况下,NSCs 在成年哺乳动物脑组织中主要分布于海马齿状回颗粒下层(subgranular zone, SGZ)和侧脑室壁的脑室下区(subventricular zone, SVZ),且处于相对静止期(图 1 左)。而在某些病理性条件的刺激下,如癫痫、脑缺血、神经退行性疾病等,这两个区域的神经发生会被激活或者抑制^[2-3]。尤其脑缺血所引起的神经发生是研究最多最深入的(图 1 右)。

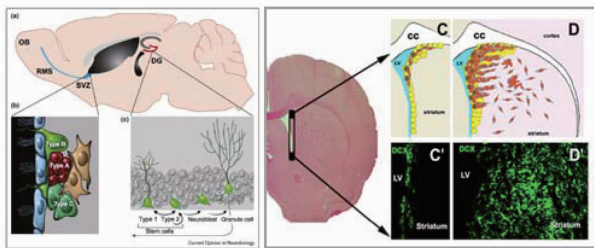


图 1 正常(左)以及缺血(右)状态下脑内神经发生^[4-5]
Fig.1 Normal(left) and ischemic(right) condition occurs in brain

有研究发现,脑卒中可以诱导 NSCs 增殖、迁移以及分化,从而进行脑组织神经再生,减轻脑损伤。Arvidsson 等^[6]采用成年大鼠制备大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,通过 5-溴-2-脱氧尿苷(5-bromo-2-deoxyuridine, Brdu)标记分裂间期细胞,发现中风可以诱导成年大鼠 SVZ 的 NSCs 的增殖,并向损伤区域迁移。Tanaka 等^[7]通过向短暂性脑缺血沙鼠模型海马齿状回内注射增强型绿色荧光蛋白标记处于分裂期的细胞,发现在脑缺血后初期新生细胞主要位于颗粒细胞层下区,5 d 后颗粒细胞层的新生细胞开始增加,到 30 d 时只有极少数新生细胞仍处于颗粒细胞层下区,大多数最终迁移至颗粒细胞层,并分化为成熟神经元。这提示了机体自身可以通过激活神经发生发挥脑修复功能。但是这种能力却是有限的,还不足以有效恢复神经功能。

随着对脑卒中神经发生研究的深入,NSCs 治疗

脑卒中也成为了研究热点。目前运用 NSCs 治疗脑卒中主要有 2 种途径:外源性途径和内源性途径。外源性途径主要是通过将 NSCs 移植进入体内,进行增殖、分化、转移,恢复神经功能。Yi Cheng 等^[8]向脑缺血大鼠尾静脉注射小鼠神经干细胞系 C17.2 细胞,结果发现静脉注射的 C17.2 细胞能够通过血脑屏障迁移至脑缺血区,此外还可以增强内源性 NSCs 的迁移,进而在损伤区分化为神经元和星形胶质细胞,发挥治疗作用。Dai 等^[9]研究也表明外源性 NSCs 能够迁移至缺血性区域,并分化成星形胶质细胞和神经元。内源性途径主要是通过外源物质或者对机体进行刺激,激活内源性 NSCs 并使之增殖、分化为神经元和星形胶质细胞。Liu 等^[10]发现功能性电刺激可以促进 MACO 大鼠同侧 SVZ 区 Brdu 标记的细胞数增加。另有报道^[11]一些中药及其活性成分能够维持内源性 NSCs 的存活,并起到诱导其增殖和分化作用。

2 TMP 治疗脑卒中的临床研究

TMP 作为活血化瘀类药物,现已广泛应用于临床心脑血管疾病的防治,临床上应用的剂型较多,如盐酸川芎嗪注射液、丹参川芎嗪注射液、磷酸川芎嗪片、磷酸川芎嗪胶囊等,同时治疗过程中联合不同药物进行治疗,其疗效也得到了肯定。

郝艳萍^[12]的临床研究发现,给予 TMP 后 15 d 和 30 d 可以显著提高脑卒中患者的神经功能评分和日常生活能力,缩短神经功能恢复时间。另有报道^[13],TMP 与血塞通联合治疗可以降低缺血性脑卒中患者的神经功能恢复时间和住院时间,改善血液流变学指标、神经功能评分。此外,刘文铠等^[14]的临床观察发现,丹参川芎嗪治疗后,其治疗总有效率、治疗效果以及神经功能改善情况显著高于对照组。可见 TMP 单独以及联合其他药物应用,在脑卒中的治疗中均可改善脑功能恢复,显示出良好的临床疗效。

3 TMP 对神经发生的影响

脑缺血后神经再生过程主要为首先激活 SGZ 和 SVZ 的内源性 NSCs 增殖;其次增殖的 NSCs 向缺血损伤区迁移,如向海马齿状回、嗅球、纹状体、大脑皮质等;最后,迁移至缺血区的 NSCs 分化为区域特定的神经元表型,整合到神经网络发挥生理功能。近年来大量对 TMP 药理学研究表明 TMP 能够促进脑缺血后神经发生。

3.1 TMP 对 NSCs 增殖的影响 有关 TMP 对 NSCs 增殖的影响多有报道。BrdU 可代替胸腺嘧啶在

DNA 合成期(S 期)掺入到新生的细胞中,活体注射或细胞培养加入,而后利用其单克隆抗体染色,可判断增殖细胞速度,被常用于细胞增殖动力学研究。祁存芳等^[15]研究发现脑缺血可诱导 SVZ 区 BrdU 阳性细胞增多,给予 TMP 可进一步提高 SVZ 区 BrdU 阳性细胞数,尤其缺血后 7 d 达到顶峰。Xiao 等^[16]采用 MCAO 模型大鼠,也得到了相类似的结果。另有邱芬等^[17]研究发现,TMP 可以显著提高 NSCs 另一主要生发地 SGZ 区 BrdU 阳性细胞数,在其观察的缺血后 7,14,21 d 的时间内,14 d 呈现最高值。可见,TMP 不但可以促进 SVZ 区的 NSCs 增殖,还可以激活 SGZ 区神经发生。但不同区域其增殖的高峰期出现不同。

TMP 促进 NSCs 增殖的可能机制的研究,目前认为可能与抑制脑内一氧化氮合酶(neural nitric oxide synthase, nNOS)表达,一方面抑制 NSCs 的凋亡^[18-19];另一方面,促进 NSCs 的增殖。此外,还有研究表明,TMP 可以通过激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路,进而促进 NSCs 的增殖^[20]。

3.2 TMP 对 NSCs 迁移的影响 发育中的神经元都要经过迁移过程,到达特定区域分化为特殊功能的神经元发挥作用。NSCs 主要存在于动物胚胎期或者发育早期以及成年哺乳动物脑组织 SGZ 区和 SVZ 区,在一定条件下会定向迁移,维持神经功能。有研究表明在脑缺血时 NSCs 会定向向缺血区迁移,与缺血区其他神经元建立神经功能通路,然而迁移的细胞并不足以弥补缺血缺氧所造成的神经元缺失,因而还需要相应的刺激促进神经元前体细胞的迁移,由此进行神经再生。

邱芬等^[21]借助 MCAO 模型大鼠,通过迁移的蛋白标志物 Doublecortin (DCX)的染色来标记迁移的 NSCs,结果发现除 SVZ 吻侧迁移流 RMS 可见一条明显的 DCX 阳性细胞迁移带外,TMP 治疗早期缺血区纹状体和胼胝体的 DCX 阳性细胞数也明显增加,而且 NSCs 也向缺血皮质区迁移。Gao 等^[22]也报道 TMP 可促进缺血后内源性神经干细胞增殖,并向病变部位迁移。笔者最近对 TMP 对 NSCs 迁移的影响进行了系统的研究^[23],通过体外 NSCs 放射状迁移,划痕修复性迁移,transwell 趋化性迁移以及对脑微血管内皮细胞共培育性迁移等多种细胞迁移模型,从静态终点检测到动态多点跟踪,结果显示 TMP 均可以显著促进 NSCs 的迁移。可见 TMP 对 NSCs 随意性迁移、细胞-细胞相互作用性迁移、定向性迁移

等多种细胞迁移模式均发挥促迁移作用。此外,TMP 还可以明显促进 MCAO 大鼠脑内 NSCs 向缺血区的迁移。

NSCs 的迁移会受多种细胞因子的诱导影响,如趋化因子、生长因子、神经营养因子、炎症因子等。基质细胞衍生因子-1(stromal-derived factor 1, SDF-1)是目前已知的细胞迁移最强大的趋化剂。有报道^[24]SVZ 中的 NSCs 能够通过血管的支架作用由 SVZ 区向缺血区纹状体迁移;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为血管通透性因子,除了能够增加血管通透性,促进血管新生,还参与了神经损伤后 NSCs 的迁移。笔者的结果^[23]显示 TMP 可以显著上调 NSCs 培养液以及 MCAO 模型大鼠脑内 SDF-1 的表达;而且 TMP 促进 NSCs 迁移的作用可以被细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK),磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K)以及蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的抑制剂部分消除,可见 TMP 促迁移作用与 PI3K/PKC/ERK 信号通路有关(图 2)。陈懿等^[25]通过月桂酸钠制备大鼠血管内皮细胞损伤的局灶性脑缺血模型,发现 TMP 治疗后相应脑区内 VEGF 蛋白及其 mRNA 的表达均明显高于模型组。沈淑萍等^[26]也发现缺血再灌后海马区 VEGF 阳性表达增加,在 3 d 达到峰值;给予 TMP 治疗后 VEGF 蛋白进一步提高,且在 1 d 即有显著的增加。朱慧渊^[27]检测 MCAO 大鼠脑组织中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)含量,发现缺血再灌后 NGF 含量下降,给予 TMP 后 NGF 含量显著性增加。这些提高的细胞因子和神经营养因子,可能是 TMP 促进 NSCs 迁移的机制。

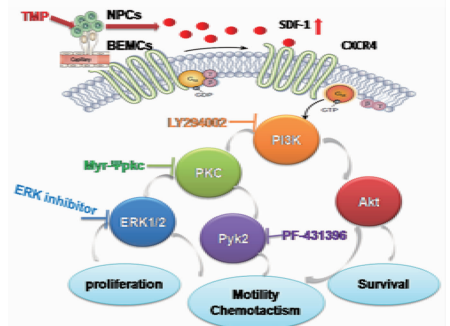


图 2 TMP 对 NSCs 迁移作用的影响有赖于 PI3K/PKC/ERK 信号通路

Fig. 2 TMP's influence on migration of NSCs role depends on PI3K/PKC/ERK signaling pathway

3.3 TMP 对 NSCs 分化的影响 NSCs 具有多向分化的功能,脑缺血后 NSCs 增殖并迁移至缺血区,最终分化为神经细胞,与原有的大脑通路整合,发挥修复神经功能作用。

Xiao 等^[16]报道 TMP 不仅增加缺血后 SVZ 区 Brdu 阳性细胞的数量,而且纹状体中 NeuN/BrdU 双阳性细胞以及胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 阳性细胞数量也明显增加,但是 GFAP/BrdU 阳性细胞的百分比并没有明显的改变。Tian 等^[20,28]研究发现,TMP 可以显著上调分化培养条件下的微管蛋白/巢蛋白 tubulin/Nestin) 双标阳性细胞数,而降低 GFAP/Nestin 双阳性细胞数,提示 TMP 可以促进 NSCs 向神经元方向分化。而这种促分化作用同时,显著提高 ERK 以及 p38 磷酸化水平,此外可以被 ERK 抑制剂 U0126 所部分逆转,提示 TMP 是通过激活 ERK 以及 p38 MAPKs 信号通路实现 NSCs 分化调节的。另有研究表明^[29],NF- κ B 通路参与了 NSCs 增殖和分化的调控,TMP 对 NF- κ B 活性具有明显的抑制作用,可能是其促进 NSCs 向神经元方向分化的另一作用途径。

4 结语

随着老龄化的到来,脑中风已成为我国“十大重大疾病”中医疗负担较重的疾病。传统治疗方法外,基于干细胞为核心的治疗方法展现宏伟的蓝图。作为中药有效单体成份的 TMP,效优价廉,在临床中被广泛应用于脑卒中,尤其是缺血性脑卒中的治疗,并展现了良好的治疗效果。TMP 对神经发生的有效调控,为其神经保护作用的阐述提供切实的实验支持,也为 TMP 应用于其他与神经发生障碍性疾病的治疗,提供一些有益的提示。此外,对神经发生尤其是对 NSCs 迁移的促进作用,为川芎嗪联合各种来源于干细胞的移植治疗提供了可能。但目前的研究仅限于川芎嗪单用时对神经发生的影响,而临床上更多的是联合其他药物或者治疗方法的应用,因此,多方位、多角度、联合应用性的评价将为临床应用提供更翔实的依据。更重要的是,开展基于临床的川芎嗪对神经发生影响的评价和观察,是今后川芎嗪研究的方向。

[参考文献]

[1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. Science, 1992, 255 (5052):1707-1710.
[2] Stoll E A, Makin R, Sweet I R, et al. Neural stem cells

in the adult subventricular zone oxidize fatty acids to produce energy and support neurogenic activity [J]. Stem Cells, 2015, 33(7):2306-2319.
[3] Oscar Gonzalez-Perez. Neural stem cells in the adult human brain [J]. Biol Biomed Rep, 2012, 2(1): 59-69.
[4] Mu Y, Lee S W, Gage F H. Signaling in adult neurogenesis [J]. Curr Opin Neurobiol, 2010, 20(4): 416-423.
[5] Zhang R L, Zhang Z G, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone [J]. Neuropharmacology, 2008, 55(3):345-352.
[6] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. Nat Med, 2002, 8(9): 928-930.
[7] Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, et al. Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector [J]. Stroke, 2004, 35(6):1454-1459.
[8] Cheng Y, Zhang J J, Deng L C, et al. Intravenously delivered neural stem cells migrate into ischemic brain, differentiate and improve functional recovery after transient ischemic stroke in adult rats [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3):2928-2936.
[9] Dai J, Li S Q, Qiu Y M, et al. Migration of neural stem cells to ischemic brain regions in ischemic stroke in rats [J]. Neurosci Lett, 2013, 552:124-128.
[10] Liu H H, Xiang Y, Yan T B, et al. Functional electrical stimulation increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of rats with stroke [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(12):2361-2367.
[11] Si Y C, Li Q, Xie C E, et al. Chinese herbs and their active ingredients for activating xue (blood) promote the proliferation and differentiation of neural stem cells and mesenchymal stem cells [J]. Chin Med, 2014, 9(1):13.
[12] 郝艳萍. 注射用盐酸川芎嗪治疗脑梗死临床观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(11): 1422-1423.
[13] 李杰. 川芎嗪联合血栓通治疗缺血性脑卒中的疗效分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(17): 108-109.
[14] 刘文铠, 肖辉亮, 周徐州. 丹参川芎嗪注射液辅助辨治缺血性脑卒中的临床研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(2):110-111.
[15] 祁存芳, 张建水, 田玉梅, 等. 川芎嗪对大鼠脑缺血再

- 灌注损伤脑室下区细胞增殖的影响[J]. 中南大学学报:医学版,2007,32(3):396-400.
- [16] Xiao X, Liu Y, Qi C, et al. Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia [J]. *Neurol Res*, 2010, 32(5):547-555.
- [17] 邱芬,刘勇,张蓬勃,等. 川芎嗪对成年大鼠局灶性脑缺血后海马齿状回细胞增殖的作用[J]. 南方医科大学学报,2006,26(10):1400-1403.
- [18] 邱芬,刘勇,马波,等. 川芎嗪对脑缺血后不同脑区神经元型 NO 合酶表达的影响[J]. 西安交通大学学报:医学版,2009,5(30):540-545.
- [19] 祁存芳,张建水,田玉梅,等. 川芎嗪对成年大鼠脑缺血再灌注损伤后 nNOS 的表达和神经的影响[J]. 南方医科大学学报,2007,27(6):771-774.
- [20] Tian Y, Liu Y, Chen X, et al. Tetramethylpyrazine promotes proliferation and differentiation of neural stem cells from rat brain in hypoxic condition via mitogen-activated protein kinases pathway *in vitro* [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 474(1):26-31.
- [21] 邱芬,刘勇,钱亦华,等. 川芎嗪对成年大鼠脑缺血后神经元前体细胞迁移的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(5):435-438.
- [22] Gao H J, Liu P F, Li P W, et al. Ligustrazine monomer against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(5):832-840.
- [23] 仲米存. 川芎嗪对神经干细胞迁移的影响及机制研究[D]. 北京:首都医科大学,2015.
- [24] Kojima T, Hirota Y, Ema M, et al. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(3):545-554.
- [25] 陈懿,王国佐,葛金文,等. 川芎嗪对局灶性脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2008,6(15):329-331.
- [26] 沈淑萍,朱莉萍,孙佳红,等. 益气活血中药对大鼠前脑不全缺血再灌注后海马区血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 包头医学院学报,2004,20(4):278-280.
- [27] 朱慧渊. 益气活血法对脑缺血再灌注损伤大鼠行为学及脑组织内 NGF 水平改变的影响[J]. 中国医药导刊,2012,3(11):458-459.
- [28] Gong G, Yuan L, Cai L, et al. Tetramethylpyrazine suppresses transient oxygen-glucose deprivation-induced connexin32 expression and cell apoptosis via the ERK1/2 and p38 MAPK pathway in cultured hippocampal neurons [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e105944.
- [29] 郝军荣. NF- κ B 对成年大鼠神经干细胞增殖和分化的影响及自噬在其中的作用[D]. 苏州:苏州大学,2005.

[责任编辑 周冰冰]