

芪仙通络方对脑缺血大鼠内源性神经干细胞再生的影响及机制

林秀慧, 周春吉, 马珂, 刘芳*, 刘祖贻
(湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

[摘要] 目的:探讨芪仙通络方对脑缺血大鼠内源性神经干细胞再生的影响及可能机制。方法:采用线栓法复制大鼠中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)局灶性脑缺血模型;将 160 只大鼠随机分为正常组,假手术组,模型组,吡拉西坦组(吡拉西坦片灌胃),芪仙通络方组(芪仙通络方灌胃);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy uridine, BrdU)腹腔注射标记脑内增殖细胞,造模后 3, 7, 14, 28 d,分别采用免疫荧光 BrdU/神经元核抗原(neuronal nuclei antigen, NeuN), BrdU/胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)双标法检测缺血海马区新生的神经元及星形胶质细胞,并计算其双标阳性细胞率,免疫组化法检测缺血侧脑内脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达。结果:术后 7, 14, 28 d,芪仙通络方组、吡拉西坦组 BrdU/NeuN, BrdU/GFAP 双标阳性细胞率均高于模型组($P < 0.01$),且各时间点芪仙通络方组 BrdU/NeuN 阳性细胞均高于吡拉西坦组($P < 0.05$),而仅在术后 7 d,芪仙通络方组 BrdU/GFAP 双标阳性细胞率高于吡拉西坦组($P < 0.05$),随后均呈下降趋势;与模型组比较,术后各时间点芪仙通络方组、吡拉西坦组缺血脑内 BDNF 表达均升高($P < 0.01$),芪仙通络方组 BDNF 表达于术后 3 d 达到高峰,之后水平虽有所下降,但仍高于吡拉西坦组($P < 0.05$)。结论:芪仙通络方可促进脑缺血大鼠内源性神经干细胞再生,以恢复期和后遗症期明显,而早期活化星形胶质细胞及上调 BDNF 的表达可能是其作用机制之一。

[关键词] 脑缺血; 芪仙通络方; 神经干细胞再生; 脑源性神经营养因子; 星形胶质细胞; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0141-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240141

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1047.024.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 10:47

Effect and Mechanism of Qixian Tongluo Decoction on Regeneration of Endogenous Neural Stem Cells After Cerebral Ischemia in Rats

LIN Xiu-hui, ZHOU Chun-ji, MA Ke, LIU Fang*, LIU Zu-yi

(The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and possible mechanism of Qixian Tongluo decoction on endogenous neural stem cells regeneration after cerebral ischemia in rats. **Method:** The focal cerebral ischemia model was established by the method of middle cerebral artery occlusion (MCAO). A total of 160 rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, piracetam group (piracetam tablets intragastric administration), and Qixian Tongluo decoction group (Qixian Tongluo decoction intragastric administration). 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) was injected intraperitoneally to label proliferating cells in brain; at day 3, 7, 14 and 28 after MCAO modeling, the neonatal neurons and astrocytes in the ischemic hippocampus were detected by immunofluorescence BrdU/neuron nuclear antigen (NeuN) and BrdU/glial fibrillary acidic protein

[收稿日期] 20170720(013)

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2015JJ5401)

[第一作者] 林秀慧, 硕士, 中医师, 从事中医脑病研究, Tel:15888712131, E-mail:1041480097@qq.com

[通讯作者] *刘芳, 博士, 研究员, 从事名老中医经验继承研究, Tel:15073126326, E-mail:msliufang23@126.com

(GFAP) double staining, and then the positive rate of double labeling cells was calculated. In addition, the expression level of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the ischemic brain was detected by immunohistochemistry. **Result:** The percentages of BrdU/NeuN and BrdU/GFAP double-labeled positive cells in Qixian Tongluo decoction group and piracetam group were all higher than those in the model group at day 7, 14 and 28 after cerebral ischemia ($P < 0.01$). The percentages of BrdU/NeuN positive cells in Qixian Tongluo decoction group were all higher than those in piracetam group at different time points ($P < 0.05$); however, the percentage of BrdU/GFAP double-labeled positive cells in Qixian Tongluo decoction group was higher than that of piracetam group only at day 7 after MCAO ($P < 0.05$), and then the percentages were decreased in both groups. As compared with the model group, the expression levels of BDNF in the ischemic brain of Qixian Tongluo decoction group and piracetam group were all higher at different time points after cerebral ischemia ($P < 0.01$). The expression level of BDNF in Qixian Tongluo decoction group reached the peak at day 3 after MCAO, and then declined at the following time points, but still higher than that in the piracetam group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qixian Tongluo decoction can promote endogenous neural stem cells regeneration in rats with cerebral ischemia especially during convalescence and sequelae stages, and the early activation of astrocytes and upregulation of BDNF in ischemia brain may be one of its mechanisms.

[**Key words**] cerebral ischemia; Qixian Tongluo decoction; neural regeneration; brain derived neurotrophic factor; astrocyte activation; rat

脑梗死是一种严重威胁人类健康的脑血管疾病,具有高发病率、高病死率和高致残率特点,已成为导致我国人口死亡和致残的第一位原因^[1]。目前,无论是超早期溶栓或介入机械取栓,均无法挽救缺血坏死的神经元,导致不同程度的神经功能缺损及其后遗症^[2]。而神经功能缺损的根本原因是神经元的减少^[3]。因此,如何促进脑缺血后神经干细胞再生,对修复脑梗死患者的神经功能、提高其生活质量具有重要的现实意义。近年来,国内、外科研工作做了大量关于神经再生的研究,但因神经干细胞本身再生能力有限及脑内神经营养因子不足、后期胶质过度活化等局部不利微环境等多种因素的影响,足量神经干细胞再生及存活难以实现^[4]。至今为止,西医对脑梗死后神经修复多数是从细胞水平或分子水平进行研究,仍处于探索阶段,神经修复仍是现阶段研究的重点、难点。除此之外,西医并未发现对神经修复切实有效的西药,因而神经修复的研究目前还无法应用于临床、切实地造福病患。

中医药在治疗脑梗死后遗症方面具有较为明显的优势。芪仙通络方是国医大师刘祖贻治疗中风后后遗症的经验方,临床疗效显著,但其作用机制目前尚不完全清楚。本研究拟通过大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观测芪仙通络方对脑缺血大鼠的缺血海马区内源性神经干细胞再生及星形胶质细胞活化、脑内脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)

表达的影响,探讨该方对脑缺血后神经修复的影响及机制。

1 材料

1.1 动物 8~12 周龄雄性 SD 大鼠 160 只,SPF 级,体重(250 ± 20)g,由湖南斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号 SYXK(湘)2015-0003。饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心,实验动物使用许可证号 SYXK(湘)2015-0059。实验动物的开展取得了湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 HN-KY-GZR-2015005)。饲养环境温度(24 ± 0.5)℃,相对湿度 50%,自由饮食进水,昼夜光照节律。适应性喂养 1 周后用于实验。

1.2 药物及试剂 芪仙通络方由黄芪、枸杞子、淫羊藿、制首乌、水蛭、丹参、葛根、山楂组成,饮片由湖南省中医药研究院中药房提供,由湖南中医药大学中药鉴定教研室刘塔斯教授鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范。将中药水煎浓缩至含生药质量浓度为 1.58 g·mL⁻¹的水煎液,常温冷却后,至 4℃ 冰箱内保存备用。吡拉西坦片(北京紫竹药业有限公司,0.1 g × 100 片,批号 20160112),粉碎后加蒸馏水稀释成质量浓度为 43.6 g·L⁻¹的水溶液备用。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)粉末(美国 Sigma 公司,货号 B5002); Mouse anti-BrdU antibody, Rabbit Anti-GFAP antibody, 抗荧光衰减封片剂(武汉博士德公司,货号分别为 BM0201, BA-0056, AR1109); Rabbit Anti-

NeuN antibody(北京博奥森公司,货号 bs-10394R);羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G-TRITC,羊抗兔 IgG(H+L)-FITC, Rabbit Anti-BDNF antibody, Goat Anti-rabbit IgG/HRP(北京中杉金桥公司,货号分别为 ZF-0313, ZF-0311, sc-20981, PV6001)。

1.3 仪器 DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);CI-1 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);G. E 型冰冻切片机(英国 Thermo Shandon 公司);Motic 6.0 型数码医学图像分析系统, RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);YD-A 型生物组织摊片机(上海金迪生物科技集团);Motic BA410 型研究型显微镜(北京瑞科中仪科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备及评价 本实验采用改良 Longa 线栓法^[5]制备 MCAO 模型。大鼠实验前 12 h 禁食、不禁水。10% 水合氯醛按 $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉。大鼠仰卧位,取颈部正中切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。结扎颈总动脉、颈外动脉。于颈总动脉上端近分叉处约 4 mm 处剪一“V”型小口,将直径为 0.286 mm 的线栓插入颈内动脉,至线栓头端至大脑中动脉开口处,从而阻断大脑中动脉。插入深度由分叉部计为约 18.0 ~ 22.0 mm,固定线栓,依次关闭切口。假手术组只结扎左侧颈总动脉,不导入线栓,其余步骤和手术组相同。大鼠术后清醒,采用 Longa 5 分制神经功能评分法^[5]评分,选取评分为 1 ~ 3 分者纳入实验,死亡大鼠予以随机替补。

2.2 分组与给药 取造模成功大鼠 96 只,按随机数字表法随机分为模型组、芪仙通络方组、吡拉西坦组 3 组,另设假手术组及空白组各 32 只,总共 160 只。于造模后次日开始灌胃,芪仙通络方组以芪仙通络方汤剂灌胃,其给药剂量按等效体表面积^[6]计算:大鼠用量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) = 人的用量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) $\times 5.446$ 。吡拉西坦组以吡拉西坦水溶液灌胃,给药剂量按等效体表面积计算法换算^[6],大鼠用量为 $0.436 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。其余各组均以相应剂量生理盐水灌胃。另外,每个时间点每组随机选取 8 只大鼠进行增殖细胞标记,将 BrdU 用生理盐水充分溶解后,按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射给药,于处死前每隔 2 h 注射 1 次,总共注射 4 次^[7]。

2.3 指标观测

2.3.1 神经功能评分 于造模后 3, 7, 14, 28 d, 每组取 8 只大鼠进行神经功能评分,参考文献[5]进

行 Longa 5 分制评分。0 分为无神经损伤症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为向对侧转圈;3 分为向对侧倾倒;4 分为不能自发行走,意识丧失。评分越高,神经功能缺损越严重。

2.3.2 神经干细胞再生、胶质细胞活化检测 于造模后 3, 7, 14, 28 d, 将每组 BrdU 标记的 8 只大鼠进行处死,4% 多聚甲醛灌注取脑,冰冻切片机连续冠状切片,切片厚 18 μm 。取大脑左侧海马组织平面,胰蛋白酶修复 15 min, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 5% 羊血清室温封闭 30 min, 加入 Rabbit Anti-NeuN antibody (1 : 100), Rabbit Anti-GFAP antibody (1 : 100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,复温 30 min, PBS 洗 5 min, 3 次,滴加 2 种荧光标记二抗(1 : 50), 室温避光孵育 1 h, PBS 洗 5 min, 3 次,抗荧光衰减封片剂 20 μL 封片,荧光显微镜下观察。每只大鼠随机取 5 张切片,每张切片随机选取海马区 5 个 400 倍高倍镜视野,检测 BrdU 单标以及分别与神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN), 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 共染色双标阳性细胞,分别代表新生神经干细胞及星形胶质细胞,记录 BrdU 单标阳性细胞数和 BrdU/NeuN, BrdU/GFAP 双标阳性细胞数,并计算阳性细胞率。

2.3.3 BDNF 表达 于造模后 3, 7, 14, 28 d, 将冰冻切片后的组织标本脱水后石蜡包埋,石蜡切片机做连续冠状切片,切片厚度 5 μm 。取大脑左侧海马组织平面,采用 SP 免疫组化法染色及苏木素复染后,光镜下观察。每只动物随机取 5 张切片,每张切片选取缺血侧脑内皮层区与梗死区 5 个 200 倍镜下视野,在相同条件下用数码医学图像分析系统进行平均吸光度分析。

2.4 统计学分析 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 22.0 统计软件进行统计。组间比较用单因素方差分析;组内比较用配对 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠造模情况 大鼠脑缺血后各个时间段活动较正常组及假手术组减少,体重减轻,饮食减少。假手术组术中及术后死亡 3 只,失败 0 只,替补 3 只;模型组死亡 5 只,失败 4 只,替补 9 只;芪仙通络方组死亡 5 只,失败 3 只,替补 8 只;吡拉西坦组死亡 7 只,失败 4 只,替补 11 只。

3.2 模型建立 在本实验条件下成功制备了大鼠 MCAO 模型,模型成功率为 70% 左右,成模大鼠表

现出典型的神经功能缺损表现,行走时不同程度右侧转圈或倾倒,提尾时不能完全伸展右侧前爪。

3.3 神经功能评分比较 空白组、假手术组各时间点大鼠神经功能评分均为 0 分;各组间对比,各相同

时间点,模型组、芪仙通络方组、吡拉西坦组组间评分差异均无统计学意义;各组内对比,术后 7, 14, 28 d 模型组、芪仙通络方组、吡拉西坦组评分均低于同组术后 3 d 的评分($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同时间点各组大鼠神经功能评分($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Neural function in rats at different time points scoring($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	7 d	14 d	28 d
空白	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
假手术	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	1.78 ± 0.67	1.25 ± 0.50 ¹⁾	1.17 ± 0.41 ¹⁾	1.12 ± 0.30 ¹⁾
芪仙通络方	15.8	1.78 ± 0.44	1.00 ± 0.00 ¹⁾	1.00 ± 0.00 ¹⁾	1.00 ± 0.00 ¹⁾
吡拉西坦	0.436	1.67 ± 0.71	1.17 ± 0.41 ¹⁾	1.00 ± 0.00 ¹⁾	1.00 ± 0.00 ¹⁾

注:与同组术后 3 d 比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

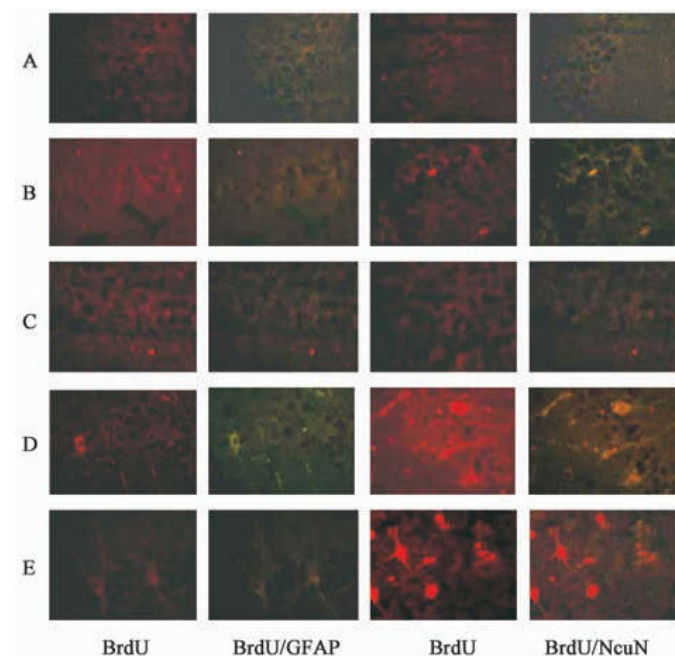
3.4 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血海马区神经再生的影响

3.4.1 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BrdU, BrdU/GFAP 与 BrdU/NeuN 镜下表达的影响

BrdU 阳性细胞为胞核呈桔红色,整合图中 BrdU/NeuN 双标阳性细胞核呈黄色, BrdU/GFAP 双标阳性细胞胞核呈桔红色,细胞膜呈绿色。见图 1。

3.4.2 BrdU 单标阳性细胞数比较 术后各时间点空白组、假手术组大鼠海马区均可见一定量 BrdU 阳性细胞表达,但差异无统计学意义。术后 7, 14 d, 模型组 BrdU 阳性细胞数较假手术组增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。术后 7, 14, 28 d, 芪仙通络方组、吡拉西坦组 BrdU 阳性细胞数均高于模型组($P < 0.01$),且芪仙通络方组高于吡拉西坦组($P < 0.05$)。见表 2。术后 14 d BrdU 单标免疫荧光见图 1。

3.4.3 BrdU/GFAP, BrdU/NeuN 双标阳性细胞率比较 术后各时间点空白组、假手术组大鼠海马区均可见少量 BrdU/GFAP, BrdU/NeuN 双标阳性细胞表达,但差异无统计学意义。术后 7, 14 d, 模型组



A. 空白组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 芪仙通络方组; E. 吡拉西坦组(图 2 同)

图 1 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BrdU, BrdU/GFAP 与 BrdU/NeuN 表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 1 Effect of Qixian Tongluo decoction on rats with ischemic hippocampal area of BrdU, BrdU/GFAP and BrdU/NeuN expression of affect (immunofluorescence, ×400)

表 2 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BrdU 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 2 Effect of Qixian Tongluo decoction on expression of BrdU in hippocampus of ischemic side of MCAO rats($\bar{x} \pm s, n = 16$)

个

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	7 d	14 d	28 d
空白	-	36.38 ± 4.07	77.63 ± 20.18 ⁴⁾	90.88 ± 23.69 ⁴⁾	89.38 ± 27.45 ⁴⁾
假手	-	52.13 ± 8.51	85.75 ± 19.29 ⁴⁾	88.75 ± 24.24 ⁴⁾	87.88 ± 20.88 ⁴⁾
模型	-	141.88 ± 17.04	142.13 ± 30.51 ^{1,4)}	138.88 ± 22.58 ^{1,4)}	121.88 ± 23.56 ⁴⁾
芪仙通络方	15.8	176.25 ± 17.65	256.25 ± 23.18 ^{2,3,4)}	287.38 ± 28.05 ^{2,4)}	331.00 ± 28.30 ^{2,4)}
吡拉西坦	0.436	180.88 ± 12.20	212.38 ± 43.99 ^{2,4)}	239.39 ± 13.93 ^{2,4)}	232.50 ± 51.98 ^{2,4)}

注:与同时间点假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与同时间点模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与同时间点吡拉西坦组比较³⁾ $P < 0.05$;与同组术后 3 d 比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

BrdU/GFAP, BrdU/NeuN 双标阳性细胞率均高于假手术组 ($P < 0.05$)。术后 7, 14, 28 d, 芪仙通络方组、吡拉西坦组 BrdU/GFAP, BrdU/NeuN 双标阳性细胞率均高于模型组 ($P < 0.01$); 而仅在术后 7 d,

芪仙通络方组 BrdU/GFAP 双标阳性细胞率高于吡拉西坦组 ($P < 0.05$), 随后均呈下降趋势。见表 3。术后 14 d BrdU/GFAP, BrdU/NeuN 双标免疫荧光见图 1。

表 3 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BrdU/GFAP, BrdU/NeuN 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 3 Effect of Qixian Tongluo decoction on expression of BrdU/GFAP and BrdU/NeuN in hippocampus of ischemic side of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 16$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BrdU/GFAP			
		3 d	7 d	14 d	28 d
空白	-	33.1 ± 4.6	38.5 ± 5.6 ⁵⁾	34.9 ± 5.6 ⁵⁾	34.2 ± 4.9 ⁵⁾
假手术	-	36.1 ± 4.2	36.9 ± 8.15 ⁵⁾	32.0 ± 3.9 ⁵⁾	39.9 ± 7.5 ⁵⁾
模型	-	35.7 ± 5.7	42.8 ± 6.8 ^{1,5)}	38.4 ± 5.6 ^{1,5)}	39.1 ± 6.4 ⁵⁾
芪仙通络方	15.8	38.7 ± 3.2	61.0 ± 6.1 ^{3,4,5)}	57.5 ± 5.8 ^{3,5)}	54.7 ± 7.4 ^{3,5)}
吡拉西坦	0.436	36.7 ± 5.3	54.3 ± 5.6 ^{3,5)}	47.2 ± 5.6 ^{2,5)}	46.5 ± 8.7 ^{2,5)}

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BrdU/NeuN			
		3 d	7 d	14 d	28 d
空白	-	33.1 ± 4.6	38.5 ± 5.6 ⁵⁾	34.9 ± 5.6 ⁵⁾	34.2 ± 4.9 ⁵⁾
假手术	-	36.1 ± 4.2	36.9 ± 8.15 ⁵⁾	32.0 ± 3.9 ⁵⁾	39.9 ± 7.5 ⁵⁾
模型	-	35.7 ± 5.7	42.8 ± 6.8 ^{1,5)}	38.4 ± 5.6 ^{1,5)}	39.1 ± 6.4 ⁵⁾
芪仙通络方	15.8	38.7 ± 3.2	61.0 ± 6.1 ^{3,4,5)}	57.5 ± 5.8 ^{3,4,5)}	54.7 ± 7.4 ^{3,4,5)}
吡拉西坦	0.436	36.7 ± 5.3	54.3 ± 5.6 ^{3,5)}	47.2 ± 5.6 ^{2,5)}	46.5 ± 8.7 ^{2,5)}

注:与同时间点假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与同时间点模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与同时间点吡拉西坦组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与同组术后 3 d 比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BDNF 表达的影响 BDNF 主要表达在缺血侧大脑皮质、缺血灶周边及海马,表达位于神经干细胞和胶质细胞的胞浆及胞外,阳性表达呈棕黄色颗粒(图 2)。术后各时间点空白组、假手术组均有较低水平 BDNF 表达,但差异无统计学意义;脑缺血刺激后

第 3,7 天,模型组 BDNF 表达要高于假手术组 ($P < 0.05$)。与模型组比较,术后 3,7,14,28 d,芪仙通络方组、吡拉西坦组 BDNF 表达均升高 ($P < 0.01$)。芪仙通络方组 BDNF 表达于术后 3 d 达到高峰,之后水平虽有所下降,但仍高于吡拉西坦组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BDNF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 4 Effect of Qixian Tongluo decoction on BDNF expression in hippocampus of ischemic side of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	7 d	14 d	28 d
空白	-	0.011 ± 0.0042	0.015 ± 0.0059 ⁴⁾	0.011 ± 0.0073 ⁴⁾	0.011 ± 0.0043 ⁴⁾
假手术	-	0.012 ± 0.0051	0.011 ± 0.0044 ⁴⁾	0.012 ± 0.0092 ⁴⁾	0.012 ± 0.0049 ⁴⁾
模型	-	0.019 ± 0.0216 ¹⁾	0.012 ± 0.0075 ^{1,4)}	0.012 ± 0.0049 ⁴⁾	0.011 ± 0.0042 ⁴⁾
芪仙通络方	15.8	0.054 ± 0.0169 ^{2,3)}	0.050 ± 0.0111 ^{2,3,4)}	0.049 ± 0.0123 ^{2,3,4)}	0.026 ± 0.0079 ^{2,3,4)}
吡拉西坦	0.436	0.033 ± 0.0148 ²⁾	0.032 ± 0.0075 ^{2,4)}	0.031 ± 0.0060 ^{2,4)}	0.020 ± 0.0061 ^{2,4)}

注:与同时间点假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与同时间点模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与同时间点吡拉西坦组比较³⁾ $P < 0.05$;与同组术后 3 d 比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

芪仙通络方可促进脑缺血大鼠内源性神经干细胞再生,以恢复期和后遗症期明显,而早期活化星形

胶质细胞及上调 BDNF 的表达可能是其作用机制之一。

BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在有丝

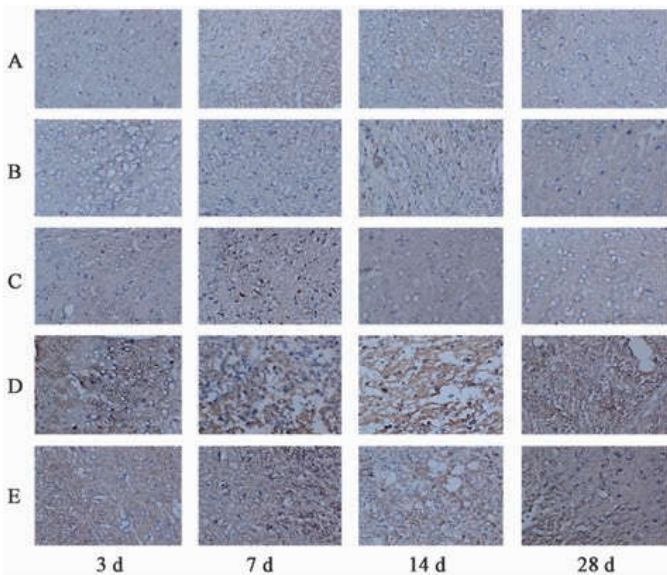


图 2 芪仙通络方对 MCAO 大鼠缺血侧海马区 BDNF 表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Qixian Tongluo decoction on expression of BDNF in hippocampus of ischemic side of MCAO rats (immunohistochemistry, $\times 200$)

分裂的 S 期整合入 DNA, 是活性细胞增殖的标志物; NeuN 是一种可溶解的核蛋白, 其免疫反应性只能在成熟神经元中表达; GFAP 则是中枢神经系统星形胶质细胞的特异性标志物^[8]。本实验以 BrdU 单标阳性标记脑内增殖细胞, BrdU/NeuN 双标阳性标记新生的成熟神经干细胞, BrdU/GFAP 双标阳性标记新生的星形胶质细胞。

在时间点的选取上, 查阅相关文献后发现术后 3 d 以前为脑梗死急性期, 4 ~ 14 d 为恢复期, 14 d 以后则为后遗症期^[9-11]。故本实验选取术后 3, 7, 14, 28 d 进行神经功能评分及指标检测。神经功能评分显示, 相同时间点各组组间评分均无显著性差异, 考虑因大鼠脑血管侧支循环较丰富, 梗死区功能得以代偿, 故神经功能恢复较快, 但缺血脑内是否有新生的神经干细胞情况有待深入探讨。

研究表明, 成年哺乳动物室管膜下区、海马齿状回等部位存在神经前体细胞 (neural precursor cells, NPCs), 正常情况下处于休眠状态^[12], 但在特定条件如缺血、神经营养因子诱导等因素诱导下, NPCs 可以被激活, 发生增殖、迁移、分化为神经元并整合入神经环路^[13]。但研究发现, 缺血脑内 NPCs 分化为神经元的概率很低^[14]。因此, 如何促进缺血脑内 NPCs 增殖并分化为成熟神经元对受损神经的修复具有重要的现实意义。本研究发现, MCAO 术后 7, 14 d 模型组大鼠海马区 BrdU 阳性细胞表达及 BrdU/NeuN 双标阳性细胞率较假手术组稍增高, 说

明脑缺血损伤可有限地刺激恢复期脑内细胞增殖、神经干细胞再生, 与既往研究结果一致^[15]。

星形胶质细胞是中枢神经系统的主要骨架细胞, 与神经元联系密切, 在中枢神经系统的发育、营养、代谢及修复等活动调节中扮演了重要角色。星形胶质细胞增生活化对脑缺血后神经干细胞再生发挥着具有“双刃剑”作用, 在缺血早期, 星形胶质细胞能够分泌多种神经营养因子以及限制炎症因子扩散, 营养及保护新生神经元免受炎症因子破坏, 而在缺血后期, 其过度增生活化则会形成胶质疤痕阻碍神经再生^[16]。BDNF 是哺乳动物脑内分布最广、含量最高的神经营养因子, 主要由神经元、胶质细胞等分泌释放, 在皮层和海马组织中表达尤其丰富, 在 NPCs 增殖与分化、突触形成以及促进神经元的存活调控等方面发挥了重要作用^[17]。本实验发现, 脑缺血后, 星形胶质细胞被一定程度激活、增生活化, 脑内 BDNF 表达上调, 而随着神经修复进程逐渐呈降低趋势, 这与之前的文献报道相符合^[18]。

脑梗死属于中医学“中风”范畴。本病其病位在脑, 病性属本虚标实, 后遗症期病机多为肾虚血瘀, 历代医家补肾活血为多, 温养阳气少用^[19]。中医认为, 阴精为生命构成的物质基础, 而生命体生长的过程需要阳气的孕育、催化、推动, 所谓“阳化气, 阴成形”。国医大师刘祖贻认为, 脑窍“气阳主用”, 填精益髓时同样需要阴阳二气相互鼓荡, 其中阳气为生之关键。脑为髓海, 神经元是髓海的重要物质, 神经干细胞再生即属于精髓再生。故刘老对于中风后遗症的治法常采用补益肾精, 温养阳气, 助以活血通络。因此, 在该治法指导下创立了芪仙通络方。方中黄芪为君药, 益气健脾; 淫羊藿、枸杞子为臣药, 填精生髓、温补肾阳, 达到助阳生阴之用; 水蛭等破血逐瘀以通络为佐使。诸药合用, 共奏温肾益精、活血通络之功。经过多年的临床验证, 对改善脑梗死后神经功能缺损后遗症, 疗效显著。本研究结果表明, 芪仙通络方可促进恢复期、后遗症期脑缺血大鼠海马区神经干细胞增殖、再生, 且作用优于西营养神经药吡拉西坦片 (表 2, 3, 图 1); 同时, 发现芪仙通络方能促进早期星形胶质细胞激活, 以脑缺血后 7 d 明显 (表 3, 图 1); 而从造模后 3 d 开始, 芪仙通络方、吡拉西坦片干预后缺血脑内 BDNF 表达均上调, 之后水平虽有所下降, 但芪仙通络方组仍高于吡拉西坦组, 提示芪仙通络方具有促进脑内细胞增殖、神经干细胞再生的作用, 其机制可能是通过促进 BDNF 的分泌释放、早期活化星形胶质细胞而实

现的,且 BDNF 的表达上调可能在 BDNF 释放—星形胶质细胞活化—神经干细胞再生循环链中起着始动作用,但其具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 贾建平. 神经病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2013:170.
- [2] Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, et al. Stem cells for brain repair and recovery after stroke [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13 (11):1479-1483.
- [3] 马寅仲,陈乃宏. 神经干细胞的命运决定机制及其靶点调控研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2012, 2(3): 37-42.
- [4] Doepfner T R, Kaltwasser B, ElAli A, et al. Acute hepatocyte growth factor treatment induces long-term neuroprotection and stroke recovery *via* mechanisms involving neural precursor cell proliferation and differentiation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31 (5):1251-1262.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1):84-91.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:165-166.
- [7] Khan M M, Wakade C, De Sevilla L, et al. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 146 (10):38-47.
- [8] QU H L, ZHAO M, ZHAO S S, et al. Forced limb-use enhanced neurogenesis and behavioral recovery after stroke in the aged rats [J]. *Neuroscience*, 2015, 286: 316-324.
- [9] BAO X, WEI J, FENG M, et al. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res Rev*, 2011, 1367(1):103-113.
- [10] Ashton J C, Rahman R M, Nair S M, et al. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 412 (2):114-117.
- [11] Pradillo J M, Murray K N, Coutts G A, et al. Reparative effects of interleukin-1 receptor antagonist in young and aged/co-morbid rodents after cerebral ischemia [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 61: 117-126.
- [12] JIAO J W, CHEN D F. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals [J]. *Stem cells*, 2008, 26 (5):1221-1230.
- [13] Jessberger S. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24 (10):558-563.
- [14] Doepfner T R, Kaltwasser B, Elali A, et al. Acute hepatocyte growth factor treatment induces long-term neuroprotection and stroke recovery *via* mechanisms involving neural precursor cell proliferation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31 (5):1251-1262.
- [15] JIN K, SUN Y, XIE L, et al. Directed migration of neuronal pre-cursors into the ischemic cerebral cortex and striatum [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24 (3): 171-189.
- [16] 李泓江,孙兆良,杨西涛,等. 星形胶质细胞活化对视神经损伤后再生的影响 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2016, 21 (6):283-285.
- [17] Hsiao Y H, Hung H C, CHEN S H, et al. Social interaction rescues memory deficit in an animal model of Alzheimer's disease by increasing BDNF-dependent hippocampal neurogenesis [J]. *J Neurosci Res*, 2014, 34(49):16207-16219.
- [18] ZHANG Y, Pardridge W M. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 2006, 11(11):227-229.
- [19] 雷亚玲. 中医药治疗急性缺血性脑卒中 (AIS) 的文献计量分析及临床研究 [D]. 广州:广州中医药大学, 2014.

[责任编辑 邹晓翠]