

不同黄芪剂量的补阳还五汤 对大鼠脑缺血后神经干细胞增殖的影响

俞天虹, 储利胜*, 刘志婷, 曲铁兵, 李琳
(浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**研究不同黄芪剂量的补阳还五汤对大鼠脑缺血后室下区神经干细胞增殖的影响。**方法:**采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞模型,缺血 24 h 后分别 ig 黄芪剂量为 120, 60, 30, 15 g 的补阳还五汤(剂量分别为 13.07, 7.61, 4.88, 3.55 g·kg⁻¹),并 ip 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU, 50 mg·kg⁻¹),1 次/d,连续 14 d。在缺血后第 1, 7, 14 天,采用改良的神经症状严重程度评分和角实验评价感觉运动功能;缺血后第 14 天,采用 BrdU/Nestin 免疫荧光双标检测室下区神经干细胞增殖情况。**结果:**与模型组比较,在缺血后第 7, 14 天,黄芪剂量为 120, 60 g 组的补阳还五汤显著改善神经症状评分和减少大鼠右转次数($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);缺血后第 14 天,黄芪剂量为 120, 60 g 组的补阳还五汤显著促进室下区神经干细胞增殖($P < 0.01$)。**结论:**大剂量黄芪组方的补阳还五汤能显著促进脑缺血后室下区神经干细胞增殖和神经功能恢复,以黄芪剂量为 120 g 的效果最佳。

[关键词] 补阳还五汤; 黄芪; 局灶性脑缺血; 神经干细胞; 增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0182-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070182

Effect of Buyang Huanwu Decoction with Different Doses of *Astragalus membranaceus* on the Proliferation of Neural Stem Cells after Focal Cerebral Ischemia in Rats

YU Tian-hong, CHU Li-sheng*, LIU Zhi-ting, QU Tie-bing, LI Lin
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) with different doses of *Astragalus membranaceus* on the proliferation of neural stem cells in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle after focal cerebral ischemia in rats. **Method:** Focal cerebral ischemia was induced by occlusion of the right middle cerebral artery for 90 min using the intraluminal filament model. BYHWD with different doses of *A. membranaceus* (120, 60, 30, 15 g, respectively, orally) and bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg·kg⁻¹, ip) were treated on day 1 after ischemia once a day for 14 days. The modified neurological severity score (mNSS) and the corner test were used to evaluate sensorimotor function on 1, 7, 14 days after ischemia. BrdU/Nestin positive cells were examined by double immunofluorescence on 14 days after ischemia. **Result:** Compared with the model group, BYHWD with *A. membranaceus* (120, 60 g) significantly ameliorated neurological dysfunction and reduced the number of right turn on 7, 14 days after ischemia ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The number of BrdU/Nestin positive cells in SVZ was significantly enhanced on 14 days after ischemia. **Conclusion:** BYHWD with higher dose

[收稿日期] 20121129(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073075);浙江省自然科学基金项目(Y204294)

[第一作者] 俞天虹, 硕士研究生, 从事中医药对脑损伤的保护与修复研究, Tel: 0571-86613744, E-mail: yutianhong919@163.com

[通讯作者] * 储利胜, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药对脑损伤的保护与修复研究, Tel: 0571-86613744, E-mail: chulisheng@21cn.com

of *A. membranaceus* improves the proliferation of neural stem cells in SVZ and neurological function recovery following focal cerebral ischemia, the effect of 120 g *A. membranaceus* is the best.

[Key words] Buyang Huanwu decoction; *Astragalus membranaceus*; focal cerebral ischemia; neural stem cells; proliferation

脑缺血是成年人致残的主要原因之一。近年来研究发现增强脑缺血后神经发生能促进神经功能恢复^[1]。补阳还五汤是中医临床治疗脑缺血及其后遗症的常用方剂,其配伍特点是大剂量黄芪配伍小剂量活血祛瘀药,使气旺促血行,活血而不伤正,共奏补气活血通络之功。虽有研究表明,补阳还五汤能促进脑缺血后神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖和迁移^[2-3],但本研究旨在观察不同黄芪剂量的补阳还五汤对脑缺血后神经干细胞增殖的影响,以期阐明补阳还五汤配伍用量的科学内涵。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性SD大鼠,体重250~300 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物 补阳还五汤原方来源《医林改错》,黄芪120 g,当归6 g,川芎4.5 g,赤芍4.5 g,地龙3 g,红花3 g,桃仁3 g,简称黄芪120 g组,其他各组黄芪剂量分别为60, 30, 15 g,其余药物剂量不变,分别简称为黄芪60 g组、黄芪30 g组和黄芪15 g组。以上各组药物加水浸泡2 h,水煎2次,每次40 min,合并后浓缩为含生药2 g·mL⁻¹。

1.3 试剂 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、小鼠抗BrdU单克隆抗体和兔抗Nestin多克隆抗体(Sigma公司产品),FITC标记的羊抗鼠二抗和Cy3标记的羊抗兔二抗(Jackson公司产品)。

1.4 仪器 HM 340E石蜡切片机和EC 350组织包埋机(德国Microm);FV10-SU激光共聚焦显微镜(日本Olympus)。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型复制 参照Longa等^[4]建立大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠用10%水合氯醛(400 mg·kg⁻¹, ip)麻醉,分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎并游离颈外动脉主干,在颈外动脉剪一小口,将头端烧圆的3-0单股尼龙线轻轻插入颈内动脉,当尼龙线插入距颈总动脉分叉1.8~2.0 cm处有轻微阻力时,保持尼龙线位置。缺血90 min后,将尼龙线轻轻拔出再灌注。假手术组,尼龙线只插入0.5 cm左右。术中用电热板

和白炽灯加温,维持肛温在37℃左右,术后将大鼠置于恒温箱中直至苏醒。

2.2 动物分组和给药方案 大鼠随机分成6组,即假手术组,模型组,黄芪120 g组、60 g组、30 g组、15 g组,每组8只。给药组在缺血后24 h开始灌胃,剂量分别为13.07, 7.61, 4.88, 3.55 g·kg⁻¹, 1次/d,连续14 d,假手术组和模型组分别灌服等容量的生理盐水。

2.3 BrdU标记 缺血后第1天开始腹腔注射BrdU,50 mg·kg⁻¹,1次/d,连续14 d。

2.4 改良的神经功能缺损程度评分(modified neurological severity score, mNSS) 参照文献[5]方法,在缺血后第1, 7, 14天进行mNSS评分,包括运动、感觉、反射和平衡实验。神经功能评分等级0~18分,正常为0分,最大功能缺损为18分,分值越高,说明动物行为障碍越严重。

2.5 角实验(corner test) 按文献[6]方法,用于检测感觉运动的整合功能。缺血后1, 7, 14 d检测。将两块同样大小木板连成30°角,两木板交界处留一缝隙,将大鼠面向夹角放在两木板中间部,当大鼠进入夹角深部时,两侧胡须接触到木板,大鼠会后肢站立、转身,面向后方。正常大鼠随机向左右两侧转身,但缺血大鼠偏好转向非损伤肢体侧,每只大鼠重复10次,分别记录大鼠向左右转身的次数。

2.6 免疫荧光检测 在缺血后14 d用10%水合氯醛麻醉大鼠,经主动脉用生理盐水快速冲洗后,再灌4%多聚甲醛固定,取脑,多聚甲醛后固定,蔗糖脱水沉底,取材后乙醇梯度脱水,二甲苯透明,包埋,制备5 μm石蜡切片。BrdU/Nestin免疫荧光双标染色具体步骤如下:脱蜡至水,微波修复,2 mol·L⁻¹ HCl 37℃孵育30 min,0.1 mol·L⁻¹ 硼酸漂洗10 min,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,5%羊血清封闭内源性IgG,加入一抗(小鼠抗BrdU单克隆抗体1:1 000、兔抗Nestin多克隆抗体1:200);4℃过夜, FITC标记的羊抗鼠二抗(1:100)和Cy3标记的羊抗兔二抗(1:200),37℃孵育40 min,封片,激光共聚焦显微镜观察。

2.7 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行分析。mNSS采用非参数Mann-

Whitney *U* 检验, 其余均采用 One way ANOVA (Student-Newman-Keuls) 进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 对脑缺血后大鼠 mNSS 评分的影响 脑缺血后第 1 天, 大鼠表现出严重的神经功能缺损。在缺血后第 7, 14 天, 与模型组比较, 黄芪 120, 60 g 组能改善神经功能缺损 ($P < 0.01, P < 0.05$), 而黄芪 30, 15 g 组则无显著性差异, 见表 1。

3.2 对脑缺血大鼠角实验的影响 脑缺血后第 1

天, 大鼠右转次数显著增加。在缺血后第 7, 14 天, 与模型组比较, 黄芪 120, 60 g 组能显著减少大鼠右转次数 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 黄芪 30 g 组在缺血后 14 d 能减少大鼠右转次数 ($P < 0.05$), 而黄芪 15 g 组则无显著性差异, 见表 2。

3.3 对脑缺血后大鼠神经干细胞增殖的影响 缺血后第 14 天, 与模型组比较, 黄芪 120, 60 g 组大鼠室下区 BrdU, Nestin 免疫阳性细胞以及 BrdU/Nestin 共标记免疫阳性细胞数量显著增多 ($P < 0.01$), 但黄芪 30, 15 g 组无显著性差异, 见表 3, 图 1。

表 1 不同黄芪剂量的补阳还五汤 (BYHWD) 对脑缺血大鼠 mNSS 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
假手术	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	11.87 ± 1.56 ¹⁾	10.50 ± 1.07 ¹⁾	8.87 ± 0.99 ¹⁾
BYHWD (含黄芪 15 g)	3.55	12.03 ± 1.46	10.13 ± 1.25	8.85 ± 0.89
BYHWD (含黄芪 30 g)	4.88	11.62 ± 1.69	9.95 ± 1.58	8.01 ± 1.07
BYHWD (含黄芪 60 g)	7.61	11.37 ± 1.51	9.00 ± 0.93 ²⁾	7.75 ± 1.67 ²⁾
BYHWD (含黄芪 120 g)	13.07	11.00 ± 1.67	7.50 ± 1.20 ³⁾	5.75 ± 0.71 ³⁾

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

表 2 不同黄芪剂量的补阳还五汤 (BYHWD) 对脑缺血大鼠右转次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
假手术	-	5.25 ± 0.89	5.13 ± 0.64	4.91 ± 0.76
模型	-	9.62 ± 1.56 ¹⁾	8.75 ± 0.46 ¹⁾	8.25 ± 0.46 ¹⁾
BYHWD (含黄芪 15 g)	3.55	9.50 ± 0.53	8.68 ± 0.35	7.88 ± 0.35
BYHWD (含黄芪 30 g)	4.88	9.38 ± 0.74	8.50 ± 0.53	7.62 ± 0.51 ²⁾
BYHWD (含黄芪 60 g)	7.61	9.63 ± 0.52	7.25 ± 0.71 ²⁾	6.38 ± 0.78 ³⁾
BYHWD (含黄芪 120 g)	13.07	9.75 ± 0.58	6.63 ± 0.52 ³⁾	5.63 ± 0.52 ³⁾

表 3 不同黄芪剂量的补阳还五汤 (BYHWD) 对脑缺血大鼠 BrdU⁺, Nestin⁺, BrdU⁺/Nestin⁺ 细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$) 个/mm²

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BrdU ⁺	Nestin ⁺	BrdU ⁺ /Nestin ⁺
假手术	-	53.88 ± 8.76	76.38 ± 5.25	27.00 ± 8.32
模型	-	107.80 ± 5.78 ¹⁾	128.80 ± 5.49 ¹⁾	83.25 ± 10.06 ¹⁾
BYHWD (含黄芪 15 g)	3.55	111.40 ± 7.87	134.80 ± 5.49	88.63 ± 7.31
BYHWD (含黄芪 30 g)	4.88	114.30 ± 8.37	135.90 ± 7.53	90.13 ± 9.21
BYHWD (含黄芪 60 g)	7.61	195.00 ± 8.26 ³⁾	218.90 ± 8.58 ³⁾	119.10 ± 8.46 ³⁾
BYHWD (含黄芪 120 g)	13.07	261.40 ± 7.63 ³⁾	285.50 ± 7.89 ³⁾	178.50 ± 10.58 ³⁾

4 讨论

正常情况下, 成年脑内神经发生主要位于侧脑室室下区 (subventricular zone, SVZ) 和海马齿状回颗粒下区 (subgranular zone, SGZ)。脑缺血能诱导 SVZ 内神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 增殖、向缺血周边区迁移、分化为特定的神经元表型, 然后

整合到神经环路中发挥生理功能^[7-8]。但这种代偿性反应非常有限。近年来研究证实, 增强脑缺血后神经发生可以促进神经功能恢复^[1]。

中医学认为脑为髓之海, 髓生成虽来源于先天之精, 但有赖于后天水谷精微所化生的气血充养。因此, 气血是化生脑髓的重要源泉, 是脑生长发育和

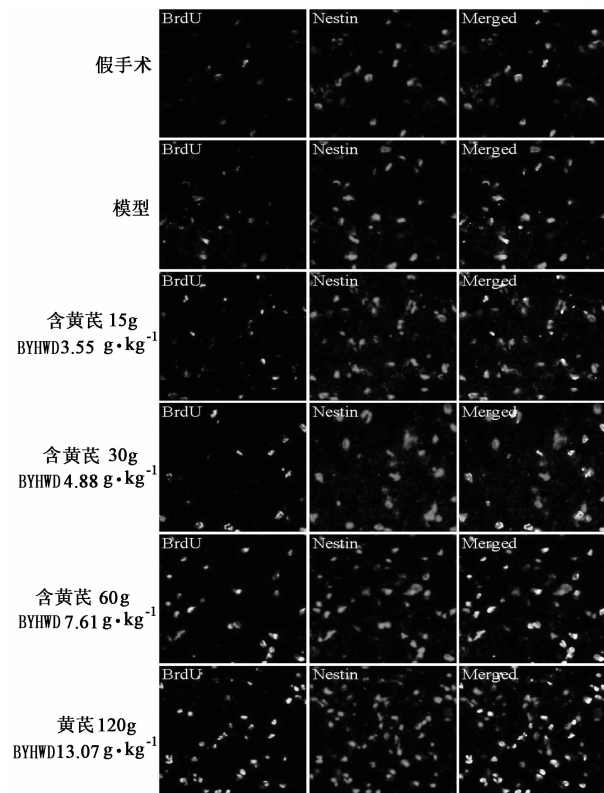


图1 各组SVZ内BrdU⁺,Nestin⁺,

BrdU⁺/Nestin⁺细胞(免疫荧光染色,×400)

产生各种功能的物质基础。近年来,有学者们认为,中医概念的“脑髓”与现代生命科学中的NSCs非常相似,气血盛衰和功能协调与NSCs增殖和分化密切相关^[9]。补阳还五汤具有益气养血、活血通络之功效,是临床治疗缺血性脑卒中及其后遗症的常用方剂。作者和其他课题组前期研究都表明,补阳还五汤能显著促进脑缺血后NSCs增殖和神经功能恢复^[2,10]。

补阳还五汤配伍用量特点为君药黄芪剂量是其他活血通络药总和的5倍,旨在气旺促血行。以往有研究报道,用不同黄芪剂量(120,60,30g)补阳还五汤治疗脑中风后遗症患者,以黄芪120g组疗效最佳,改善血液流变学和抑制血小板聚集效果最强^[11-12]。为进一步探讨补阳还五汤配伍中重用黄芪的科学内涵,作者采用BrdU/Nestin免疫荧光标记增殖的神经干细胞,观察了不同剂量黄芪(120,60,30,15g)组方的补阳还五汤对脑缺血大鼠室下区NSCs增殖和神经功能恢复的影响。结果发现,大剂量黄芪(120,60g)组方的补阳还五汤显著促进脑缺血后NSCs增殖和神经功能恢复,其中以黄芪120g组效果最好。因此,上述结果分别从不同角度揭示了补阳还五汤配伍用量的科学内涵。

总之,本研究结果表明,大剂量黄芪组方的补阳还五汤能显著促进脑缺血后神经干细胞增殖和神经功能恢复,进一步阐明了补阳还五汤组方配伍中重用黄芪的药理学机制,为其临床应用提供了科学的实验依据。

[参考文献]

- [1] Zhang Z G, Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: Underlying mechanisms and translation to the clinic[J]. Lancet Neurol. 2009;8(5):491.
- [2] 储利胜,俞天虹,刘志婷,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后海马齿状回神经干细胞增殖和存活的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2011,35(3):375.
- [3] 苏晓慧,孔祥英,庞宗然,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞迁移的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(6):159.
- [4] 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.
- [5] Chen J, Sanberg P R, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J]. Stroke, 2001,32(11):2682.
- [6] Zhang L, Schallert T, Zhang Z G, et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia [J]. J Neurosci Methods, 2002,117(2):207.
- [7] 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):963.
- [8] Jin K, Sun Y, Xie L, et al. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum [J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 24(1):171.
- [9] 唐巍,王键,胡建鹏. 中医药诱导神经干细胞增殖分化治疗缺血性脑卒中的策略和设想[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005,11(4):295.
- [10] 谭县辉,曲宏达,彭康,等. 补阳还五汤对缺血性脑卒中后遗症大鼠神经增殖作用的影响[J]. 南方医科大学学报, 2006,26(2):189.
- [11] 谢裕华,陈超. 不同黄芪剂量的补阳还五汤对中风后遗症患者外周血ESR、PCV及ηb水平的影响[J]. 新中医, 2007,39(6):23.
- [12] 张鹤年. 气行则血行——补阳还五汤中不同剂量的黄芪治疗脑梗塞恢复期108例对比观察[J]. 上海中医药杂志, 1997,31(7):10.

[责任编辑 聂淑琴]