

补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响

周赛男¹, 蔺晓源², 易健², 郭乐¹, 刘莉¹, 郭纯², 刘柏炎², 蔡光先^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学省部共建中医内科学教育部重点实验室, 长沙 410007)

[摘要] **目的:**探讨补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠的神经保护作用。**方法:**189 只大鼠随机分为假手术组、模型组和补阳还五汤组, 每组 63 只, 常规饲养 1 周后, 采用线栓法制备脑缺血大鼠模型。补阳还五汤组动物于术后 2 h 后开始给药, 给药剂量为 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每日 ig 1 次。各组又分为三个亚组即分别于给药后 7, 14, 21 d 3 个时间点处死动物, 观察各组不同时间点的脑梗死面积、神经功能评分及脑组织形态学变化。**结果:**各时间点补阳还五汤组脑梗死面积明显小于同时相模型组, 其神经功能评分也均较模型组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 且补阳还五汤组海马和皮质细胞形态明显改善, 细胞排列较模型组整齐。**结论:**补阳还五汤促进脑缺血损伤后神经恢复和组织修复, 具有脑保护作用。

[关键词] 补阳还五汤; 脑缺血; 梗死面积; 神经功能; 细胞形态

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0251-04

Effects of Buyang Huanwu Decoction on Nerve Function and Cell Morphology in Experimental Rats with Cerebral Ischemia

ZHOU Sai-nan¹, LIN Xiao-yuan², YI Jian², GUO Le¹,
LIU Li¹, GUO Chun², LIU Bai-yan², CAI Guang-xian^{2*}

(1. Traditional Chinese Medicine (TCM) University of Hunan, Changsha 410208, China;

2. Key Laboratory Constructed by Ministry of Education and Provincial Governments
of Hunan TCM University, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects of Buyang Huanwu decoction on focal cerebral ischemia in rat. **Method:** One hundred and eight-nine SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and Buyang Huanwu decoction group ($n = 63$). One week after the regular feeding, cerebral ischemia animal models was established. Buyang Huanwu decoction was given 2 h after operation (the dose of $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig 1 times per day). Each group was divided into three sub-groups namely 7 days after administration, 14, 21 d three time points. neurological function and brain tissue morphological changes in each group at different time points were observe. **Result:** The infarction area and neurological score in Buyang Huanwu decoction group were significantly decreased compared with model group at the same time-phase, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Hippocampal and cortical cell morphology was significantly improved and cells were arranged neatly in Buyang Huanwu decoction group compared with the model group. **Conclusion:** Buyang Huanwu decoction can improve cerebral ischemic injury neurological recovery and tissue repair, has cerebral protective effect.

[Key words] Buyang Huanwu decoction; cerebral ischemia; infarction area; nerve function; cell morphology

[收稿日期] 20120829(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072939);湖南省科技计划项目(2011SK3103);湖南省自然科学基金(12JJ5046)

[第一作者] 周赛男, 讲师, 博士, 从事中西医结合脑血管疾病研究, E-mail: hnzousainan@163.com

[通讯作者] * 蔡光先, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治消化、心脑血管疾病研究, E-mail: lby1203@sina.com。

脑缺血属中风范畴,是临床常见病,具有高发病率、高死亡率及高致残率的特点,严重危害着人类健康。迄今为止,国内外在治疗脑缺血及其后遗症方面还缺少有效的化学治疗药物^[1]。循证医学表明,中医药对缺血性脑卒中的治疗有一定优势^[2]。当前大量研究集中在中药对急性脑缺血损伤的保护作用^[3]。而脑缺血后的功能恢复是一个较长时间^[4]过程,目前对其进行较长时间观察的研究较少。出自清代王清任《医林改错》的补阳还五汤,是治疗缺血性中风及中风后遗症的经典名方,该方在临床上应用广泛且疗效确切,但其促神经功能恢复机制还需进一步阐明。本文采用大鼠中动脉线栓法复制大鼠局灶性脑缺血模型,探讨了补阳还五汤较长时间多时间点对其神经功能的保护作用,以期治疗缺血性脑中风的临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 189 只,SPF 级,体重 260~280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号 SCXK(湘)2009-0004,动物合格证号 004535。

1.2 药物 补阳还五汤处方来源于清·王清任《医林改错》,按原方组成:黄芪 120 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,归尾 6 g,干地龙 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g,药材经湖南中医药研究院鉴定均符合《中国药典》2005 年版标准。补阳还五汤药剂制备:饮片先用清水浸泡 30 min,第一煎加药材及 5 倍体积双蒸水,煎煮 60 min,二煎 5 倍体积双蒸水,煎煮 60 min,两煎混匀,浓缩至含生药 2 g·mL⁻¹,冷藏待用。

1.3 试剂 10% 水合氯醛(扬州市奥鑫助剂厂),多聚甲醛(长沙市锦华化工有限公司),TTC(红四氮唑,Sigma 公司)。

1.4 仪器 Bx51 光学显微镜及 IPP5.1 图像分析系统(日本 Olympus),FA 型电子天平(上海台之衡电子衡器有限公司),自动双重纯水蒸馏器(上海玻璃仪器一厂),Finesse 325 型石蜡切片机(英国 Shando)。

2 方法

2.1 分组与给药 将大鼠随机分为假手术组、模型组和补阳还五汤组,每组 63 只,每组动物又分 3 个时间点,即分别于首次给药后 7,14,21 d 处死,每个时间点 21 只动物。补阳还五汤组动物于术后 2 h 后开始给药,给药剂量为 5 g·kg⁻¹·d⁻¹,每日 ig 1 次。模型组和假手术组动物均给予等体积蒸馏水。

2.2 模型制备与评价 参照文献[5]采用大鼠中

动脉线栓法复制大鼠局灶性脑缺血模型:10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹) ip 麻醉,取颈正中切口长约 3 cm,逐层分离,结扎颈外动脉,夹闭颈内动脉、再结扎颈总动脉,于颈总动脉充盈分叉部下方约 4 mm 处将一长为 4 cm 直径为 0.26 mm 的尼龙鱼线插入颈内动脉,直到遇到轻微阻力为止,固定尼龙线,缝合切口。假手术组仅切开皮肤、分离左侧颈总动脉后随即缝合。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒内,自由饮水、进食。动物清醒 2 h 后参照 Longa 及 Bederson^[6]的 5 分制法进行神经功能评分,分值在 1~3 分者入组。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。评分越高,神经功能缺损越严重,反之亦然。不纳入标准:评分低于 1 分;蛛网膜下腔出血;HE 染色无脑缺血病理改变;未到时间点死亡。死亡等不足动物时随机替补。

2.3 指标检测

2.3.1 TTC 染色测脑梗死面积比 每组每个时间点 5 只大鼠,10% 水合氯醛麻醉后,断头取大脑,置于 -20 °C 冷冻 20 min 后,自额极每隔 2 mm 切 1 片。第 1 刀在脑前极与视交叉连线中点处;第 2 刀在视交叉部位;第 3 刀在漏斗柄部位;第 4 刀在漏斗柄与后叶尾极之间,共 A,B,C,D,E 5 片^[7]。用 2% 的红四氮唑染色,37 °C 下避光 30 min,正常组织呈深红色,而梗死组织则为白色。拍照后选最大缺血断面 C 片梗死面积,运用 Image-Pro Express 图像分析系统扫描计算,取梗死面积占 C 片大脑总面积的百分比表示。为消除梗死侧大脑半球因脑水肿造成的误差,按 Swanson 方法进行校正后计算 C 片梗死面积百分比(IS)。

$$IS = (S1 - Sr) / 2S1 \times 100\%$$

S1: C 片健侧总面积;Sr: C 片患侧非梗死区面积。

2.3.2 神经功能评分 每组每个时间点 10 只大鼠,于术后 2 h 及动物处死前 1 h 进行神经功能评分。评分方法同 2.2。

2.3.3 HE 染色观察海马、皮质组织病理学变化 每组每个时间点 6 只。同 2.3.1 取大脑后 4% 多聚甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,脑冠状连续切片(片厚 5 μm),取含海马切片贴于载玻片上,随后 HE 染色,光镜下观察比较各组大鼠左侧海马、皮质组织细胞形态病理学改变。

2.4 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用

SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计分析,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组脑梗死面积比较 通过 TTC 染色,假手术组着色比较均匀,为深红色;7,14,21 d 模型组与补阳还五汤组染色不均匀,局部梗死区为白色,梗死部位在缺血侧顶叶大脑皮质、海马周围。梗死面积分析显示,模型组和补阳还五汤组随时间点后延脑梗死面积均逐渐缩小($P < 0.05$);且 7,14,21 d 补阳还五汤组梗死面积明显小于同时相模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠脑梗死面积比较($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	脑梗死面积		
		7 d	14 d	21 d
假手术	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	28.95 ± 0.08 ¹⁾	26.42 ± 1.18 ¹⁾	10.52 ± 1.16 ¹⁾
补阳还五汤	5	14.03 ± 0.55 ^{1,2)}	6.23 ± 0.29 ^{1,2)}	3.64 ± 0.34 ^{1,2)}

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

3.2 各组神经功能评分情况 假手术组各时间点大鼠神经功能评分均为 0 分;补阳还五汤组各时间点神经功能评分均较同时相模型组低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

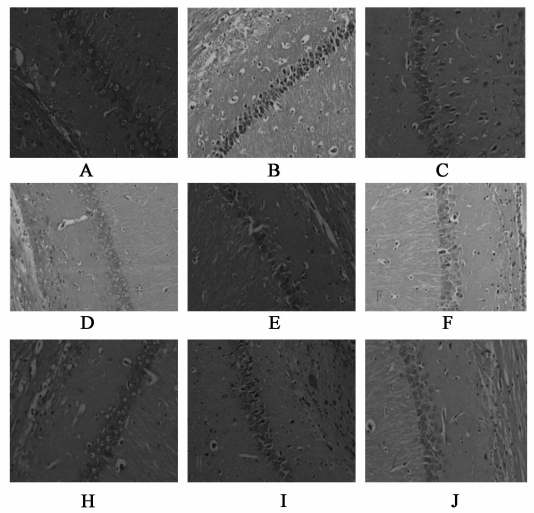
表 2 各组大鼠神经功能评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$) 分

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	神经功能评分		
		7 d	14 d	21 d
假手术	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	1.33 ± 0.21 ¹⁾	1.13 ± 0.13 ¹⁾	1.25 ± 0.16 ¹⁾
补阳还五汤	5	0.50 ± 0.22 ^{1,2)}	0.63 ± 0.18 ^{1,2)}	0.50 ± 0.13 ^{1,2)}

3.3 各组海马、皮质组织细胞形态学变化

3.3.1 海马 假手术组海马细胞形态正常,细胞轮廓清晰可见,细胞核染色均匀,细胞排列整齐,间质着色均匀。7,14,21 d 模型组海马神经细胞皱缩,出现细胞核固缩,核边集严重,细胞内有空泡,细胞形态由椭圆形变成梭形、三角形,细胞间间距增大,间质染色稀疏,有空洞。7,14,21 d 补阳还五汤组海马细胞空泡样细胞较模型组明显减少,细胞形态明显改善,细胞排列较模型组整齐。7,14 d 补阳还五汤组仍存在少量核深染及空泡样改变细胞,但 21 d 补阳还五汤组海马细胞形态接近假手术组。见图 1。

3.3.2 皮质 假手术组皮质细胞形态正常,边缘清晰,排列整齐,形态完整,胞核着色均匀,细胞间质染色均匀。7,14,21 d 模型组缺血细胞呈空泡样坏死,



A. 7 d 假手术组;B. 7 d 模型组;C. 7 d 补阳还五汤 5 g·kg⁻¹组;
D. 14 d 假手术组;E. 14 d 模型组;F. 14 d 补阳还五汤 5 g·kg⁻¹组;
G. 21 d 假手术组;H. 21 d 模型组;
I. 21 d 补阳还五汤 5 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 各组不同时间点海马组织细胞形态变化(HE 染色, ×400) 细胞形态丧失,细胞间间隙增大,染色变浅,呈网状改变;残存细胞其体积缩小、细胞核固缩深染、细胞边界不清。补阳还五汤组各时间点皮质细胞空泡样细胞较同时相模型组明显减少,细胞形态明显改善,细胞排列整齐,神经细胞核较清晰,细胞间隙染色较均匀。见图 2。

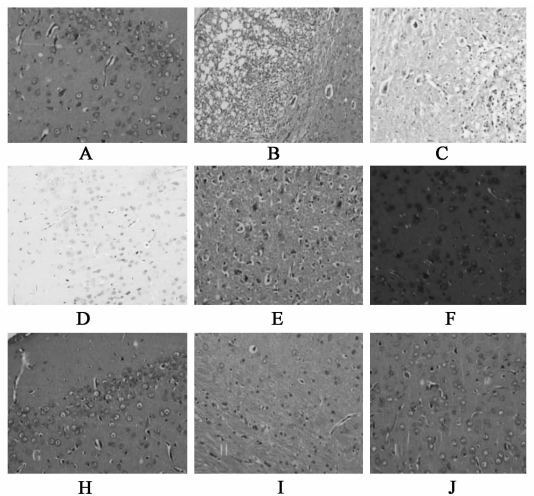


图 2 各组不同时间点皮质组织细胞形态变化(HE 染色, ×400)

4 讨论

局灶性脑缺血又称缺血性脑卒中,是由于脑的血液供应障碍,导致脑组织缺血、缺氧,所致相应区域脑梗死性坏死,大量神经元丧失,而产生相应的神经功能缺损症状与体征,是脑血管疾病中最为常见的临床类型。目前西医治疗脑缺血的主要方法包括溶栓、抗凝、降纤、扩血管、高压氧、介入治疗等,还有

尚处于动物实验阶段的基因治疗、神经干细胞移植等^[8]。这些治疗方法中除了超早期(发病 3 h 内)溶栓治疗有效率高达 21% ~ 93%,其他疗法效果并不确定。而且溶栓治疗因其严格的时间窗,意味着只有不到 5% 的病人有机会进行这一治疗^[9]。因此,缺血性脑中风的病人约 80% 留下不同程度的后遗症——神经功能缺损。

典型的缺血性脑卒中在临床上可按照病程分为 3 期。第 1 期急性期,脑卒中后 1 个月内;第 2 期恢复期,脑卒中后 2 ~ 6 个月内;第 3 期后遗症期,脑卒中 6 个月后^[10]。补阳还五汤主要用于脑缺血恢复期及后遗症期治疗,是治疗脑缺血后遗症的首选方,临床应用疗效显著。因此在动物实验中我们观察的时间点最长达到缺血后 21 d,这相当于人脑缺血后遗症期。本实验研究中,神经功能评分结果表明补阳还五汤能促进脑缺血后大鼠神经功能恢复。其作用机制有学者认为与促血管生成、扩血管、抗凝、溶栓等改善脑缺血局部微循环,减轻脑水肿及氧自由基损伤,保护脑组织,从而促进神经功能恢复^[11]。本实验室及国内其他实验室研究表明补阳还五汤能促进缺血后脑内神经干细胞增殖、迁移、分化^[12-13],可能也是其促进缺血后神经功能恢复机制之一。通过比较各组动物脑梗死面积比,结果显示补阳还五汤各时间点分别较同时间相模型组脑梗死面积明显缩小。可能的原因有:其一,补阳还五汤在脑缺血急性期起脑保护作用,抑制了大量神经元死亡与凋亡导致梗死面积变小;其二,补阳还五汤促进缺血后脑组织再生、修复、代偿,而导致梗死面积较相应的模型组缩小;二者也可能兼而有之。另外,通过比较补阳还五汤组与模型组缺血后海马、皮质组织学改变,结果表明补阳还五汤能明显改善细胞形态与排列,促进脑缺血损伤后组织修复。

总之,本研究证实了补阳还五汤具有降低脑缺血神经功能评分、减小脑梗死面积、改善脑组织细胞形态与排列的脑保护作用,为该药临床治疗缺血性脑卒中提供了有力的实验依据。

[参考文献]

- [1] 张琦,叶夷露,颜吟雪,等. 黄连解毒汤对小鼠脑缺血慢性神经损伤的保护作用[J]. 浙江大学学报:医学版,2009,38(1):75.
- [2] 唐红梅,白雪. 中医药治疗缺血性脑卒中的优势探讨[J]. 中医药导报,2011 17(10):90.
- [3] 刘斌,蔡梅芝,李爱华,等. 参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):229.
- [4] 刘敬霞,李建生,俞维. 星萎承气汤和补阳还五汤对脑缺血大鼠海马神经元损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):233.
- [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.
- [6] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986,17(3):472.
- [7] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1998:1241.
- [8] 赵见文,田军彪,张颜伟,等. 化浊解毒活血通络法对脑缺血再灌注损伤小鼠行为学及海马 CA1 区神经细胞形态学的影响[J]. 世界中医药,2011,6(6):524.
- [9] Kriz J, Lalancette-Hébert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia [J]. Acta Neuropathol,2009,117(5):497.
- [10] 王维治. 神经病学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2003:113.
- [11] 高旭清. 补阳还五汤治疗脑梗死 50 例临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(8):1005.
- [12] 刘柏炎,赖鼎元,谢勇,等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠经侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2009,16(1)22.
- [13] 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):335.

[责任编辑 聂淑琴]