

活血、破血药对急性脑缺血大鼠基底动脉内皮细胞 VEGF 和 bFGF 表达的影响

谢辉*, 龙志江, 朱久宜, 罗尧岳, 谢海波, 周小青
(湖南中医药大学, 长沙 410007)

[摘要] **目的:**探讨活血、破血药对急性脑缺血动脉血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。**方法:**SD大鼠40只,随机分为假手术组、模型组、活血组、破血组,每组10只;假手术组予以假手术,其余各组结扎法制作大鼠急性脑缺血模型。造模前每天上午9时预防ig给药7d,假手术组、模型组ig蒸馏水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,活血组ig当归、川芎煎液 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 $3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),破血组ig三棱、莪术煎液 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 $1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。造模观察2d后如前法继续给药7d,2h后静脉空气栓塞处死,取基底动脉组织。免疫组化法检测基底动脉内皮细胞VEGF和bFGF表达。**结果:**与模型组VEGF平均吸光度($A, 0.348 \pm 0.086$)比较,活血组 $A(0.443 \pm 0.061)$ 、破血组 $A(0.558 \pm 0.12)$ VEGF蛋白表达升高,差异具有统计学意义($P < 0.01 \sim P < 0.05$);活血组与破血组间比较,破血组VEGF蛋白表达更强,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组bFGF(0.394 ± 0.080)比较,活血组bFGF(0.553 ± 0.097)蛋白表达升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$),破血组bFGF(0.302 ± 0.084)蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**活血、破血药均能促进VEGF蛋白的表达,而且破血药作用更强;活血药可升高bFGF蛋白的表达,破血药却能降低bFGF蛋白的表达。这说明两者在活血化瘀的机制上既有相同之处,又有差异。

[关键词] 活血药; 破血药; 急性脑缺血; 血管内皮细胞生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0183-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0933.015.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 9:33

Promoting and Expelling Blood Circulation Drugs Affect the Expression of VEGF and bFGF of Endothelial Cells in Acute Cerebral Ischemia Basilar Artery

XIE Hui*, LONG Zhi-jiang, ZHU Jiu-yi, LUO Yao-yue, XIE Hai-bo, ZHOU Xiao-qing
(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the promoting and expelling blood circulation drugs on the expression of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) into basic fibroblast growth factor (bFGF) in acute cerebral ischemic arterial. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, promoting blood group, expelling blood group ($n = 10$). The acute cerebral ischemia model was established. The sham operation and model groups were given distilled water, promoting blood group was given Angelica and Chuanxiong decoction $3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, expelling group was given Sanleng Ezhu decoction $1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Drugs were given before modeling for 7 days, after 2 days of modeling, continuous administration for 7 day was carried out of 2 h after end administration, rats were killed for collection of the basilar artery. Immunohistochemical was used for detection of basilar artery endothelial cells, VEGF and bFGF expression. **Result:** Compared with model group VEGF absorbance (A) of (0.348 ± 0.086), in promoting blood group (0.443 ± 0.061) and expelling blood group (0.558 ± 0.12), VEGF protein expression was increased in a statistically significant difference ($P < 0.01$ to $P <$

[收稿日期] 20120515(016)

[基金项目] 湖南省中医药管理局科研项目(湘中医药[2010]25号);湖南省自然科学基金项目(10JJ6029);湖南省教育厅优秀青年基金项目(09B076)

[通讯作者] * 谢辉, 副教授, 医学博士, 从事方剂证治研究, Tel: 0731-85381077, E-mail: xh5450@163.com

0.05)。Compared with promoting blood group, the effect of expelling blood group was stronger, the difference was statistically significant ($P < 0.05$)。Compared with the model group A of bFGF (0.394 ± 0.080), in promoting blood group bFGF (0.553 ± 0.097) protein expression was elevated, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), in the expelling blood group bFGF (0.302 ± 0.084) protein expression decreased, the differences statistically significant ($P < 0.05$)。 **Conclusion:** Promoting blood circulation drugs and expelling blood circulation drugs can promote the expression of VEGF protein, and expelling the drug showed more potent; promoting blood circulation drugs increased the expression of bFGF protein, expelling blood circulation drugs were able to reduce the expression of bFGF protein. This shows that for the mechanism of promoting blood circulation, promoting and expelling blood circulation drugs have both similarities and differences.

[**Key words**] promoting blood circulation drugs; expelling blood circulation drugs; acute cerebral ischemia; VEGF; bFGF

活血化瘀药通常根据中药活血化瘀程度不同,可分为活血药和破血药两类,为临床处方选药提供了大概方略。但是,如何科学地、全面地诠释活血药和破血药的涵义及其异同,针对具体的病理选择哪一类活血化瘀药,尚存一定疑虑。故本实验以结扎法复制大鼠急性脑缺血模型,运用活血药对当归、川芎和破血药对三棱、莪术,干预脑缺血后基底动脉内皮细胞生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),试探讨两者的作用差异,为临床处方选药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 40 只 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,雄雌各半。由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物许可证 SCXK(湘)2009-0001。饲养条件:雌雄分笼饲养,每笼 5 只;室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(65 ± 5)%;标准饲料,全营养喂养,自由饮水;笼具每周清洗消毒 1 次,紫灯灭菌 10 min。实验动物在实验室饲养房内观察 5 d,无异常者用于本试验。湖南中医药大学 SPF 动物实验室。鼠用全价颗粒饲料由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物专用饲料生产许可证 SCXK(湘)2009-0009。

1.2 药物 活血药当归、川芎和破血药三棱、莪术均购自湖南中医药大学附一院药剂科,由湖南中医药大学周小江鉴定,当归为伞形科植物当归 *Angelicae Sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根;川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎;三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparaganium stiloniferum* Buch.-Ham. 的干燥块茎;莪术为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥根茎。

1.3 试剂及仪器 VEGF, bFGF 试剂盒(均由美国 Peprotech 公司提供,批号分别为 2915CY12, 2818CY10), PG802-S 型电子天平(梅特勒-托力公

司,德国), MAIS 医学图像分析系统(北航公司,中国), CM-1800 恒温冰冻切片机(山顿公司,英国), Motic B 5 双目生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,中国)。

2 方法

2.1 实验用药配制 按照大鼠与人临床用药剂量、体型系数公式 $\text{dB} = \text{dA} \times \text{RB}/\text{RA} \times (\text{WA}/\text{WB})^{1/3}$ 计算大鼠用药剂量,活血药当归、川芎煎液 $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于成人日用药量当归、川芎各 20 g); 破血药灌服三棱、莪术煎液 $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于成人日用药量三棱、莪术各 20 g)。采用常规水提法进行煎煮,药材加 10 倍量水煎煮两次,每次 1 h, 滤过,合并水煎液,减压浓缩至相对密度为 1.10 (50°C 测), 4°C 保存备用。

2.2 动物分组与造模 采用完全随机设计,将 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、活血组、破血组。假手术组予以假手术:3% 戊巴比妥钠按 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 耳缘静脉注射麻醉鼠,仰卧背位固定,剪去颈部体毛,75% 乙醇消毒被皮后,从距右下颌骨隅突离心端 1 cm 处向近心端正中偏右剪开颈部皮肤约 3 ~ 4 cm, 然后再缝合皮肤。其余各组予以结扎法制作大鼠急性脑缺血模型^[1]:3% 戊巴比妥钠按 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 耳缘静脉注射麻醉鼠,仰卧背位固定,剪去颈部体毛,75% 乙醇消毒被皮后,从距右下颌骨隅突离心端 1 cm 处向近心端正中偏右剪开颈部皮肤约 3 ~ 4 cm, 依次分离颈总动脉、颈内动脉、颌外动脉,结扎颌外动脉远心端,并留置线备用,以规格为 $0.7 \times 32\text{RWLB}$ 的穿刺针由颌外动脉切口行颌外动脉穿刺到颈内动脉,固定穿刺管,接着注射以 2 mL N. S 混悬 0.4 ~ 0.5 mg 微球栓塞剂,注射栓塞剂后,再注射 2 mL 的 NS。最后拔出穿刺管,结扎颌外动脉,其他血管恢复血供。伤口以注射用青霉素

钠(16万单位/mL)清洗后分层缝合,自然苏醒。

2.3 给药方法 假手术组、模型组灌服蒸馏水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;活血组灌服当归、川芎煎液 $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于成人日用药量当归、川芎各 20 g);破血组灌服三棱、莪术煎液 $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于成人日用药量三棱、莪术各 20 g)。每天上午 9 点灌胃 1 次,术前预防给药 7 d,术后观察 2 d,然后连续给药 7 d,静脉空气栓塞处死取基底动脉。

2.4 免疫组化及样本处理 ①取基底动脉 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,制备厚 $4 \mu\text{m}$ 组织切片。载玻片经防脱片剂处理(APES)。②切片常规脱蜡入水。③蒸馏水加 H_2O_2 至 0.3%,室温 30 min 以灭活内源性酶,蒸馏水洗涤。④滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗。⑤分别滴加兔抗大鼠 VEGF, bFGF 抗体, 37°C 120 min。 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗 2 min \times 3 次。⑥ VEGF, bFGF 的标本滴加生物素标记山羊抗大鼠 IgG 抗体。 37°C 20 min。 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗 2 min \times 3 次。⑦滴加试剂 SABC, 37°C 20 min。 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗 5 min \times 4 次。⑧ DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒(ED1022)。取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A, B, C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,一般 5~20 min。蒸馏水洗涤。⑨ 苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜观察。⑩用 MAIS 医学图像分析系统计算。每张切片随机测定 5 个视野,在 400 倍视野下测吸光度,取其均值作为该鼠的平均

吸光度(A)。

2.5 统计处理 统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有统计检验均采用双侧检验,符合正态性和方差齐性的资料,采用 LSD 检验;不符合正态性和方差齐性的资料,采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

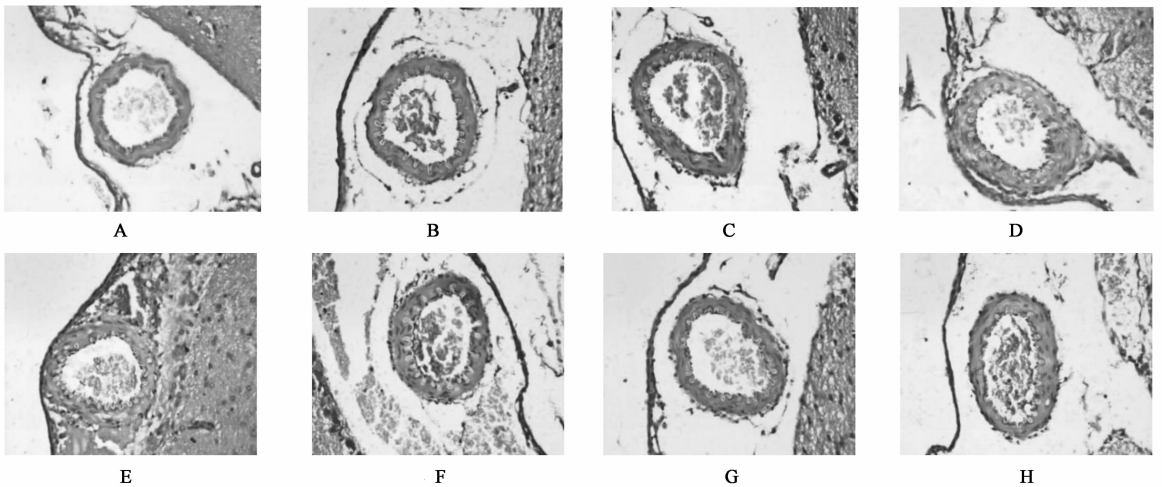
3 结果

活血、破血药对各组大鼠基底动脉 VEGF, bFGF 蛋白表达的影响与模型组 VEGF 比较,活血组、破血组 VEGF 蛋白表达升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01 \sim 0.05$);活血组与破血组间比较,破血组 VEGF 蛋白表达更强,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组 bFGF 比较,活血组 bFGF 蛋白表达升高,差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$),破血组 bFGF 蛋白表达降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1, 图 1。

表 1 各组基底动脉 VEGF 和 bFGF 蛋白平均吸光度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 药物剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | VEGF | bFGF |
|-----|--|--------------------------|--------------------------|
| 假手术 | - | $0.174 \pm 0.087^{1)}$ | $0.188 \pm 0.072^{1)}$ |
| 模型 | - | 0.348 ± 0.086 | 0.394 ± 0.080 |
| 活血 | 3.6 | $0.443 \pm 0.061^{2)}$ | $0.553 \pm 0.097^{1)}$ |
| 破血 | 1.8 | $0.558 \pm 0.124^{1,3)}$ | $0.302 \pm 0.084^{2,3)}$ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;活血与破血组间比较³⁾ $P < 0.05$ 。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 活血组 ($3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); D. 破血组 ($1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); E. 假手术组; F. 模型组; G. 活血组 ($3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); H. 破血组 ($1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

图 1 活血、破血药对基底动脉 VEGF (A-D), bFGF (E-H) 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

4 讨论

中医血瘀证是一个复杂的病理过程,指血液的循环迟缓,流行不畅,甚则血液停滞的病理状态。现代研究表明血瘀病理与血液循环和微循环障碍、血液高黏滞状态、血小板活化和黏附聚集、血栓形成、组织和细胞代谢异常、免疫功能障碍等多种病理生理改变有关。

血瘀状态下血管内皮细胞(VEC)往往异常活跃,其分泌的 VEGF, bFGF 为目前研究最清楚,作用最明确的促血管生长因子。VEGF 是一种特异性作用于血管内皮细胞的促有丝分裂剂,在血管新生的起始阶段及其后的血管形成、稳定过程中发挥着关键作用^[2]。bFGF 为一种对中胚层来源的细胞有强烈促增殖、分化作用的生长调节因子,是血管新生的必备条件^[3]。

活血药当归、川芎和破血药三棱、莪术是现代临床活血化瘀的常用药,研究颇多,尤其是前者^[4-5]。从当归分离得到的主要有挥发油类、多糖类、苯酚类、黄酮类、香豆素类等,其中阿魏酸、藁苯内酯和当归多糖是其抗脑缺血作用的主要活性成分^[6]。现代药理研究表明其抗脑缺血作用与抑制血小板聚集、抗血栓、抗动脉粥样硬化、改善血液流变性、促进造血、抗贫血、抗氧化、清除自由基、脑缺血损伤的保护等多种药理活性有关;当归挥发油对兔离体正常胸主动脉平滑肌具有显著的舒张作用^[7]。对川芎的研究,北京制药工研究所早在 20 世纪 70 年代就从川芎提取物中获得了川芎有效成分川芎嗪单体(tetramethylpyrazine, TMP),其化学结构为四甲基吡嗪,目前, TMP 已能大量人工合成,并作为活血化瘀成分广泛应用于临床各科。三棱中的化学成分主要是挥发油类、有机酸类、甾体类、黄酮类、苯丙素类等^[8]。莪术的主要有效成分有挥发油和姜黄素等,研究发现三棱和莪术能减少肺组织细胞过度凋亡,从而延缓肺纤维化进程^[9]。研究发现在改善微循环、抑制血栓形成及血小板聚集方面,破血逐瘀药三棱作用最强;活血散瘀药丹参作用次之,在抑制血栓形成,改善血小板聚集性方面,作用优于和血行血药川芎^[10]。

本研究表明,中医常用活血药对当归、川芎和破血药对三棱、莪术对 VEC 分泌的内皮细胞生长因子

(VEGF)均有促进作用,当脑组织缺血缺氧时,可能与活血药和破血药诱导 VEC 过量表达 VEGF 有关,从而其促进内皮细胞的分裂、增殖、迁移,利于新生血管的生成和侧支循环的建立,使血流迅速恢复,阻止组织的缺血坏死,并缩小组织的坏死区域。但是,活血药可升高 bFGF 蛋白的表达,破血药却能降低 bFGF 蛋白的表达,这说明两者在活血化瘀的机制上是有差异的,于永红^[11]等研究发现三棱提取物可以抑制兔动脉 SMC 的增殖,我们的结果与其是一致的。破血药降低 bFGF 蛋白表达在活血化瘀中究竟起到何种作用尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张丽红. 急性脑缺血实验动物模型制作[J]. 山西大同大学学报:自然科学版,2008,24(4):60.
- [2] Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors [J]. Nat Rev Cancer,2002,2(10):795.
- [3] Lee C H, Smits P C. Vascular growth factors for coronary angiogenesis [J]. J Interv Cardiol,2002,15(6):511.
- [4] 李伟霞,唐于平,郭建明,等. 当归-川芎药对及其组成药味对 3 种血虚模型补血作用的比较研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(13):1808.
- [5] 李伟霞,唐于平,尚尔鑫,等. 基于人工神经网络的当归川芎药对整体功效与化学物质关联性分析[J]. 中国中药杂志,2012,37(19):2935.
- [6] 孙蓉,张亚囡,吕丽莉. 当归基于功效物质基础的抗脑缺血药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒,2011,8(10):615.
- [7] 吴国泰,高云娟,田振华,等. 当归挥发油对兔离体胸主动脉平滑肌的影响[J]. 甘肃中医学院学报,2011,28(5):1.
- [8] 戴仕林,吴启南,殷婕. 中药三棱的现代研究进展[J]. 中国民族民间药物,2011(1):63.
- [9] 王英豪,姚欣,邱颂平,等. 三棱和莪术对肺纤维化大鼠肺组织细胞凋亡的影响[J]. 福建中医药大学学报,2011,21(4):28.
- [10] 李伦,刘琳,李传钰,等. 3 种活血化瘀药对实验性血瘀证模型大鼠作用的比较研究[J]. 中医药学报,2011,39(6):37.
- [11] 于永红,孟卫星,张国安,等. 茵陈、赤芍、三棱、淫羊藿对培养的兔动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 湖北民族学院学报:医学版,1999,16(2):1.

[责任编辑 聂淑琴]