

# 化痰通络方联合 rt-PA 对急性脑梗死溶栓后 神经功能缺损及皮质神经元微观形态的影响

周震<sup>1</sup>, 宋宛珊<sup>2</sup>, 王占奎<sup>1</sup>, 毛蕾<sup>2</sup>, 马妍<sup>2</sup>, 张玉莲<sup>1\*</sup>

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

**[摘要]** 目的: 观察化痰通络法对急性脑梗死大鼠重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓后神经功能缺损评分及神经元微观形态的影响, 为化痰通络法防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤提供实验依据。方法: 选择健康雄性 SD 大鼠 80 只, 随机分为 3 组, 即假手术组、模型组、化痰通络法联合 rt-PA 组(每组又分 6, 24 h, 3, 7 d 4 个时相), 采用自身栓子法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO), 化痰通络法结合 rt-PA 组于血栓注入后 3 h 一次性由尾静脉缓慢注入 2 mL 0.9% 生理盐水 + 5.67 mg·kg<sup>-1</sup> rt-PA, 并分别给予高、低剂量化痰通络方灌胃治疗(2.88, 1.44 g·kg<sup>-1</sup>), 每日 2 次。对大鼠不同时相进行神经功能缺损评分, 并通过光电镜对大脑皮质缺血区神经元进行形态观察。结果: Bederson's 评分: 与模型组相比, 治疗组神经功能缺损评分明显降低( $P < 0.01$ ), 其中以 rt-PA 联合化痰通络方低、高剂量组神经功能缺损评分降低最为明显( $P < 0.05$ )。光镜下, 在同一时相中, 与模型组相比, 治疗组皮质神经元少量变性, 组间并无显著差别。同组不同时相比较, 以 7 d 神经元变性最多。电镜下, 在同一时相中, 与模型组相比, 治疗组均起到保护神经元及内皮细胞的作用, 但以化痰通络方联合 rt-PA 组更为显著。同组不同时相比较, 以 24 h 神经元水肿最为严重, 7 d 神经元破坏最为严重。各组横向比较, 以化痰通络方联合 rt-PA 高剂量组 24 h 时相对神经元的保护作用最好, 化痰通络方联合 rt-PA 低剂量组 3 d 和 7 d 对神经元形态保护为最佳。结论: 化痰通络法可以减轻急性脑梗死溶栓后神经功能缺损症状, 改善皮质微观形态学变化, 同时针对溶栓后不同时相调整中药的用药剂量, 可以更好的减轻溶栓后缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 化痰通络法; 脑梗死; 溶栓; 神经元; 形态学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0219-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1208.028.html>

**[网络出版时间]** 2012-7-11 12:08

急性脑梗死是目前致残、致死率均高的疾病之一, 早期有效的治疗对患者预后影响很大。美国卒中协会(ASA)特别推荐急性脑梗死 3 h 内可采用重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓治疗<sup>[1]</sup>。根据国际卫生组织统计, 有约 30% 的急性脑梗死溶栓患者在溶栓后会出现缺血再灌注损伤<sup>[2]</sup>, 因此缺血再灌注损伤已经成为严重限制溶栓疗法广泛应用于临床的直接原因之一。研究证明, 化痰通络法联合溶栓剂具有提高溶栓药物使用的安全性、减少溶栓后出再灌注损伤等并发症发生的趋势<sup>[3]</sup>。故本研究

拟观察不同浓度化痰通络中药联合 rt-PA 对改良大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型大鼠皮质的影响, 从动物症状体征及神经元微观形态学角度探讨其可能的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 SD 大鼠 168 只, 体重 200 ~ 250 g, 清洁级, 购自中国医学科学院实验动物中心及军事医学科学院第四研究所实验动物中心(2 级), 许可证号 SCXK(津)2010-0002。

**1.2 药物与试剂** 化痰通络方中药组成: 天麻 10 g, 清半夏 10 g, 胆南星 5 g, 丹参 30 g, 川芎 10 g, 地龙 10 g, 酒大黄 5 g。以上药物 400 g 加 10 倍水, 煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 煎煮液浓缩至 500 mL, 生药质量浓度为 0.8 g·mL<sup>-1</sup>。以上均由天津中医药大学第二附属医院制剂室制备, 4 ℃ 保存备用。注射用重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA, 批号 005765201304, 德国勃林格殷格翰公司), 血栓诱导剂(批号 20081218, 长春国奥药业有限公司)。

**1.3 仪器** Leica dm rxa2 型全自动多功能显微镜

**[收稿日期]** 20111130(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072796); 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(10JCZDJC20500)

**[第一作者]** 周震, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中西医结合脑血管病临床与科研工作, Tel: 13110057681, E-mail: zhouzhen7681@126.com

**[通讯作者]** \* 张玉莲, 医学博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合脑病临床与科研工作, Tel: 13821151196, E-mail: zyl220@126.com

(德国莱卡公司生产), H-7500 型透射电子显微镜(日立建机株式会社生产)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 随机将大鼠分为 3 组,即假手术组、模型组、化痰通络方联合 rt-PA 组(以下称中药组)。化痰通络方结合 rt-PA 组又分为化痰通络方高、低剂量组。除假手术组 8 只大鼠外,其余每组分为 6, 24 h, 3, 7 d 4 个时相, 每组每个时相 8 只大鼠。给药剂量参照文献[4]中“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算。化痰通络方结合 rt-PA 组于血栓注入后 3 h 一次性由尾静脉缓慢注入 2 mL 0.9% 生理盐水 + 5.67 mg·kg<sup>-1</sup> rt-PA, 中药组分别给予化痰通络方高、低剂量(2.88, 1.44 g·kg<sup>-1</sup>) ig, 每日 2 次。假手术组与模型组予相同时间点 ig 等量蒸馏水。

**2.2 大鼠大脑中动脉栓塞模型制备** 首先进行栓子制备, 随后参考文献<sup>[5-6]</sup>建立大鼠大脑中动脉栓塞模型。模型组、rt-PA 组和中药组大鼠均造模。假手术组手术方法同模型制作, 只在注射时以生理盐水 0.3 mL 代替栓子溶液。

### 2.3 检测指标

**2.3.1 神经功能缺损症状** 大鼠造模成功后, 分别于 6, 24 h, 3, 7 d 4 个时相从大鼠的精神状态、活动力、四肢状态等进行简单的症状观察, 评分标准参考 Bederson 等<sup>[7]</sup>的方法。

**2.3.2 光镜检测** 大鼠 ip 10% 水合氯醛(400 mg·kg<sup>-1</sup>), 麻醉成功后, 打开胸腔, 暴露心脏, 将注射针

头插入左心室, 剪开右心耳, 快速灌注 0.9% 生理盐水, 待肝脏变为灰白色, 换 4% 多聚甲醛 10 mL·min<sup>-1</sup> 灌注, 当大鼠四肢强直时快速断头取脑。将脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。进行乙醇系列脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋, 制成 5 μm 厚连续切片。将石蜡切片 HE 染色, 光学显微镜观察皮质组织形态学变化并拍照。

**2.3.3 电镜检测** 大鼠直接脱颈处死, 快速断头取脑, 在冰上取皮层区 1 mm<sup>3</sup> 的组织块放入前固定液(4% 戊二醛固定液)中, 以上步骤在 3 min 之内全部完成。7 d 之内进行锇酸固定、乙醇系列脱水、树脂包埋聚合, 制成 50 nm 的超薄切片。用醋酸铀 30 ~ 40 min 和柠檬酸铅 30 min 双重电子染色, 置于透射电镜下观察皮质超微结构。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行处理, 计量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据间的比较采用单因素方差分析方法。P < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 Bederson's 评分** 同模型组相比, 各治疗组在 4 个时相(6, 24 h, 3, 7 d)中 Bederson's 评分均明显降低(P < 0.05)。同组内不同时相比较, 化痰通络方结合 rt-PA 组(低、高剂量组)在 24 h 时 Bederson's 评分均明显升高, 符合脑梗死的发展规律。在 3, 7 d 时, 化痰通络方结合 rt-PA 组评分均明显降低(P < 0.05)。见表 1。

表 1 各组不同时相 Bederson's 评分比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别                          | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 6 h                       | 24 h                      | 3 d                         | 7 d                         |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 假手术                         | -                     | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00                 | 0.00 ± 0.00                 |
| 模型                          | -                     | 9.12 ± 0.84               | 9.38 ± 0.92               | 9.12 ± 0.61                 | 8.75 ± 0.89                 |
| 化痰通络方结合 rt-PA <sup>4)</sup> | 1.44                  | 5.62 ± 0.92 <sup>2)</sup> | 7.25 ± 0.71 <sup>1)</sup> | 4.88 ± 0.84 <sup>2,3)</sup> | 4.5 ± 1.20 <sup>2,3)</sup>  |
|                             | 2.88                  | 6.00 ± 0.54 <sup>2)</sup> | 7.25 ± 0.71 <sup>1)</sup> | 5.5 ± 0.93 <sup>1,3)</sup>  | 4.75 ± 0.71 <sup>2,3)</sup> |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01; 与 24 h 比较<sup>3)</sup> P < 0.05; <sup>4)</sup> 于血栓注入后 3 h 一次性由尾静脉缓慢注入 2 mL 0.9% 生理盐水 + 5.67 mg·kg<sup>-1</sup> rt-PA。

**3.2 皮质组织微观形态观察(光镜)** 本研究选取皮质第 5 层(内锥体层)进行观察(图 1)。HE 染色显示假手术组可见较清晰的神经元, 突起明显, 核浆比值大, 细胞核为圆形或椭圆形, 着色均匀为浅蓝紫色, 可见深染的核仁, 偶见神经元胞体缩小, 胞浆浓缩, 核固缩, 整个细胞深染成红色, 散在胶质细胞。

溶栓 6 h 后, 模型组可见全部神经细胞胞体缩小, 胞浆浓缩, 核固缩, 整个细胞深染成红色, 神经元

数量轻度减少;化痰通络方结合 rt-PA 低、高剂量组可见少部分神经细胞胞体缩小, 胞浆浓缩, 核固缩, 整个细胞深染成红色, 神经元数量轻度减少。

溶栓 24 h 后, 模型组大部分神经元高度肿胀, 可见少部分神经细胞胞体缩小, 胞浆浓缩, 核固缩, 整个细胞深染成红色, 神经元数量明显减少;化痰通络方结合 rt-PA 低剂量组神经元中度肿胀, 可见少部分神经细胞胞体缩小, 胞浆浓缩, 核固缩, 整个细胞深染成

红色,神经元数量轻度减少;化痰通络方结合 rt-PA 高剂量组神经元轻度肿胀,可见少部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量轻度减少。其中以化痰通络方结合 rt-PA 高剂量组神经元整体形态损伤相对较轻。

溶栓 3 d 后,模型组大部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量明显减少;化痰通络方结合 rt-PA 低剂量组部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量轻度减少;中药高剂量组部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量中度减少。其中以中药低剂量组神经元整体形态损伤相对较轻。

溶栓 7 d 后,模型组神经细胞明显减少,几乎全部神经元胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色;中药低剂量组神经细胞中度减少,部分神经元胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色;中药高剂量组部分神经元胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色。其中以中药低剂量组神经元整体形态损伤相对较轻。见图 1。

现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,游离核糖体轻度减少,可见 4 个初级溶酶体;中药低剂量组神经元高尔基复合体成碎片状,线粒体少部分嵴和部分膜融合、模糊不清,粗面内质网轻度颗粒融合及脱颗粒现象;中药高剂量组线粒体少部分嵴和部分膜融合、模糊不清,粗面内质网轻度颗粒融合及脱颗粒现象。其中以中药低、高剂量组整体形态损伤相对较轻。

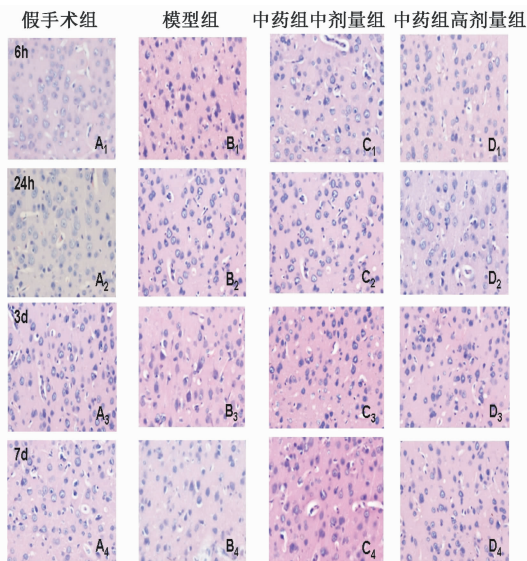
溶栓 24 h 后,模型组细胞质重度水肿,细胞器明显减少,线粒体绝大部分部分嵴和部分膜融合、模糊不清,可见线粒体空化现象;中药低剂量组细胞质轻度水肿,线粒体部分嵴和膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,可见几个次级溶酶体;中药高剂量组细胞质轻微水肿,线粒体部分嵴和膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网轻度颗粒融合及脱颗粒现象,游离核糖体轻微减少。其中以中药高剂量组整体形态损伤相对较轻。

溶栓 3 d 后,模型组细胞质重度水肿,细胞器明显减少,线粒体部分嵴和膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,可见 2 个次级溶酶体;中药低剂量线粒体部分嵴和少部分膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,可见 2 个次级溶酶体;中药高剂量线粒体部分嵴和膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象。其中以中药低剂量组整体形态损伤相对较轻。

溶栓 7 d 后,模型组线粒体绝大部分嵴和少部分膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,可见许多空化现象;中药低剂量线粒体部分嵴和少部分膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,游离核糖体中度减少,可见几个次级溶酶体;中药高剂量线粒体部分嵴和膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失现象,粗面内质网中度颗粒融合及脱颗粒现象,游离核糖体轻度减少。其中以中药低剂量组整体形态损伤相对较轻(图 2)。

#### 4 讨论

脑梗死属中医学“中风”范畴,痰瘀互结、酿生浊毒,阻闭脉络、蕴热扰神是急性缺血型中风的主要病机<sup>[9]</sup>。依据既往临床回顾性研究<sup>[10]</sup>,结合国家“十五”科技攻关课题“中风病急性期综合治疗方案研究”(2001BA701A12a)成果,采用化痰通络法联



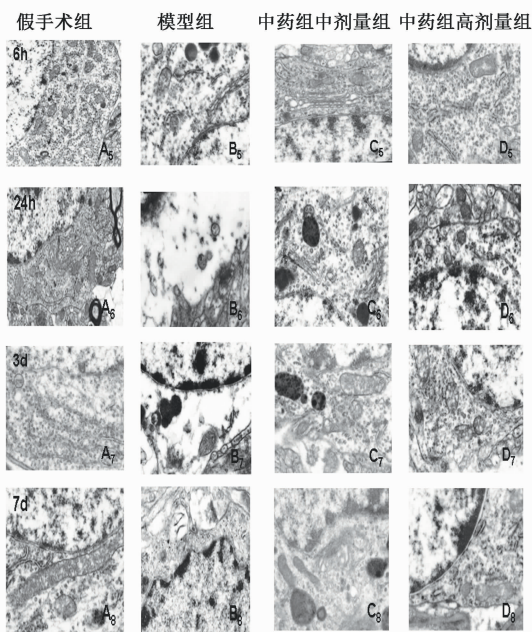
A1-A4. 假手术组;B1-B4. 模型组;

C1-C4. 化痰通络方 1.44 g·kg<sup>-1</sup> 结合 rt-PA 组;

D1-D4. 化痰通络方 2.88 g·kg<sup>-1</sup> 结合 rt-PA 组

图 1 化痰通络方联合 rt-PA 对急性脑梗死溶栓后各时间点小鼠皮质组织病理学变化(HE 染色, ×40)

**3.3 皮质组织超微结构观察(电镜)** 假手术组神经元线粒体结构基本完整,可见比较清晰的嵴和膜,粗面内质网颗粒均匀,游离核糖体均匀分布于细胞质之中。溶栓 6 h 模型组细胞质轻度水肿,线粒体部分嵴和部分膜融合、模糊不清,可见嵴断裂及缺失



A5-A8. 假手术组; B5-B8 模型组;

C5-C8. 化痰通络方 1.44 g·kg<sup>-1</sup> 结合 rt-PA 组;

D5-D8 化痰通络方 2.88 g·kg<sup>-1</sup> 结合 rt-PA 组

图 2 化痰通络方联合 rt-PA 对急性脑梗死溶栓后各时间点大鼠皮质组织神经元超微结构观察(铁酸染色, ×20 000)

合溶栓剂治疗急性脑梗死患者可以明显的提高溶栓药物使用的安全性、减少溶栓后缺血再灌注损伤等并发症的发生与发展<sup>[3]</sup>。

大脑是人体中对缺氧最为敏感的器官,脑梗死缺血后血流的恢复在某些情况下,能导致进一步的脑组织损伤和功能障碍,即缺血再灌注损伤。脑缺血再灌注后以神经元为主的坏死与细胞凋亡是脑损伤中重要的病理生理过程<sup>[11]</sup>。皮质第 5 层(内锥体层)对缺氧最为敏感,故对其神经元超微结构进行观察可以间接反应神经功能缺损的轻重程度。本研究选择 rt-PA 作为溶栓剂联合不同剂量的化痰通络中药对急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤进行研究发现,中药组 Bederson's 评分明显低于模型组及 rt-PA 组( $P < 0.05$ ),同时中药组神经元微观形态亦明显优于模型组,均与前期实验结果相符合。本研究初步表明,化痰通络法联合 rt-PA 很可能通过保护皮层神经元超微结构,进而改善神经功能缺损症状。

本研究还发现两种不同剂量化痰通络中药比较,低、高剂量组的 Bederson's 评分明显低于模型组( $P < 0.05$ ),且两组的神经元微观形态也优于模型组。低、高剂量组相比,Bederson's 评分差距并不明显,溶栓 6 h 后,低、高剂量组对 Bederson's 评分降低程度基本相等;在溶栓 24 h 后,高剂量组对

Bederson's 评分降低程度最为明显;溶栓 3 d 及 7 d 后以低剂量组降低程度更明显一些,同小鼠大脑皮质微观形态观察结果基本相符。因此初步推断,溶栓后 24 h 内应用高剂量中药,24 h 后至 7 d 内应用低剂量中药联合 rt-PA 治疗,其治疗效果应该优于单纯一种中药剂量的应用,这也为化痰通络法联合 rt-PA 溶栓的临床应用提供依据。

同时,本研究也发现在大鼠整体行为学与皮质神经元微观形态学表现上存在一些不相符情况,如神经功能缺损评分中,各治疗组以 24 h 最为严重,而微观形态显示以 7 d 时神经元损伤最为严重,其具体原因尚不清楚,推测可能与神经修复过程中存在其他因素参与有关,有待进一步深入研究。

### [参考文献]

[1] Adams H P J, Adams R J, Brott T, et al. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: a scientific statement from the stroke council of the american stroke association [J]. Stroke, 2003, 34 (4):1056

[2] 李俐涛. 熊果酸对局灶性脑缺血再灌注损伤小鼠的脑保护作用及其信号转导机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2011.

[3] 张玉莲. 化痰通络法联合小剂量尿激酶治疗急性脑梗死溶栓的临床与实验研究[M]. 天津:中医药大学博士论文,2008.

[4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.

[5] 张新江,常丽英,张苏明,等. 大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良[J]. 卒中与神经疾病,2003,10 (1):12.

[6] 刘瑜,胡文立,宋爱利,等. 大鼠脑血栓模型的实验研究[J]. 实用医学杂志,2005,21(8):1992.

[7] 李建生,刘敬霞,王冬,等. 大黄苷元注射抗大鼠脑缺血损伤炎症级联反应[J]. 中国药理学通报,2007,23 (1):114.

[8] 李玉林. 病理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010.

[9] 周超杰. 益气活血通络汤治疗缺血性脑中风 64 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):237.

[10] 张玉莲,周震,王立存,等. 化痰通络法联合尿激酶溶栓治疗急性脑梗死临床研究[J]. 天津中医药,2010 (1):12.

[11] 陈东丽,陈旭东,夏翠英. 天麻对大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011(3):148.

[责任编辑 聂淑琴]