

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

苏晓慧^{1,2}, 孔祥英^{2*}, 庞宗然³, 林娜^{2*}

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)

[摘要] 目的: 观察补阳还五汤对大鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 后神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 迁移的影响。方法: 采用 MCAO 模型, 缺血 90 min 后再灌。将造模成功的大鼠分层并随机分组分为模型组和补阳还五汤组, 24 h 后 ig 补阳还五汤 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 连续 3 周。另 16 只不阻塞动脉大鼠设为手术组。分别在给药后 1, 2, 3 周进行行为学评分; 并在第 4 天和 18 天 ip 5-溴-2-脱氧尿苷 (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 各连续 3 d。2, 3, 5-三苯基四氮唑 (TTC) 染色测量梗死面积; 免疫组化检测 BrdU 阳性细胞; 酶联免疫法 (ELISA) 检测基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 蛋白表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组 1 周和 3 周神经行为学评分显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 脑梗死面积、缺血侧室管膜下区 (subventricular zone, SVZ) 及纹状体区 BrdU 阳性细胞数均显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 补阳还五汤能显著改善大鼠 MCAO 神经功能缺失症状, 药后 1, 2, 3 周神经功能评分为 (1.33 ± 0.60) , (0.89 ± 0.58) , (0.50 ± 0.31) 分, 明显低于模型组的 (1.72 ± 0.46) , (1.56 ± 0.51) , (1.89 ± 0.50) 分 ($P < 0.01$); 降低脑梗死面积, 药后 1, 3 周分别为 $(16.1 \pm 5.2)\%$, $(10.3 \pm 0.40)\%$, 明显低于模型组的 $(35.2 \pm 6.3)\%$, $(29.8 \pm 6.9)\%$, ($P < 0.01$), 提高 SVZ 和纹状体区 BrdU 阳性细胞数, 药后 1 周分别为 (71.17 ± 5.19) , (83.8 ± 3.83) 个, 明显高于模型组的 (52.17 ± 6.52) , (60.20 ± 6.72) 个, 药后 3 周分别为 (43.33 ± 6.06) , (54.60 ± 5.77) 个, 明显高于模型组的 (35.83 ± 4.88) , (22.00 ± 3.87) 个 ($P < 0.01$); 给药 3 周时显著提高 SDF-1 表达, 3 周时为 $(36.3 \pm 2.71) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 明显高于模型组的 $(28.65 \pm 3.47) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.05$)。结论: 补阳还五汤能促进 MCAO 大鼠缺血侧 NSCs 迁移, 其可能机制是通过上调 SDF-1 蛋白的表达水平实现的。

[关键词] 补阳还五汤; 大脑中动脉阻塞; 神经干细胞; 迁移; 基质细胞衍生因子 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0159-04

Effect of Buyang Huanwu Decoction on Migration of Neural Stem Cells after Focal Cerebral Ischemia in Rats

SU Xiao-hui^{1,2}, KONG Xiang-ying^{2*}, PANG Zong-ran³, LIN Na^{2*}

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) on migration of neural stem cells after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. **Method:** Cerebral ischemia/reperfusion model of MCAO was established in rats using the suture method, successful modelings were divided into ischemia model group and BYHWD group randomly. BYHWD ($12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was administered orally 24 h after ischemia once a day for 21 days. Neurological deficit was assessed by neuroethological assessment. The area of cerebral was determined by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) positive

[收稿日期] 2012-01-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30873394); 中国中医科学院自主选题 (ZZ2006105)

[第一作者] 苏晓慧, 硕士研究生, 从事中药药理研究, E-mail: sxh66159@163.com

[通讯作者] * 孔祥英, 博士, 助理研究员, 从事中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: kongu0051@163.com; * 林娜, 博士, 研究员, 博导, 从事中药药性理论与中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: kongu0051@163.com

cells were examined by immunohistochemistry, the expression of stromal cell derived factor-1 (SDF-1) measured by ELISA. **Result:** After MCAO the neurological behavioral score, cerebral ischemia area, the number of BrdU-positive cells were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to model group, BYHWD could significantly reduce neurological behavioral score and cerebral ischemia areas ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), enhance the SDF-1 protein level ($P < 0.05$). The number of BrdU-positive cells in subventricular zone (SVZ) and corpus striatum also increased markedly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** BYHWD improves migration of neural stem cells in ischemic penumbra after MCAO, the possible mechanism is related to the increased expression of SDF-1.

[Key words] Buyang Huanwu decoction; middle cerebral artery occlusion; neural stem cells; migration; stromal cell derived factor-1

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在局灶脑缺血后神经功能损伤修复中发挥重要作用^[1]。诱导 NSCs 定向迁移,是治疗脑缺血损伤的关键环节。临床显示具益气活血、通经活络功效复方如补阳还五汤在改善脑缺血后神经功能损伤方面有较好的疗效^[2],实验研究也发现其能显著减少脑缺血动物的脑梗死面积,且该作用与促进 NSCs 增殖和分化及血管生成有关^[3-5]。为了进一步明确补阳还五汤对脑神经功能损伤修复的作用机制,本研究观察补阳还五汤对大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后 NSCs 迁移的干预作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,购自军事医学科学院,清洁级,体重 250 ~ 270 g。动物许可证号 SCXK(军)2007-004。

1.2 药品与试剂 补阳还五汤(由黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g 组成)购自同仁堂,制成水煎液,冷藏备用。5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)(美国 Sigma 公司,批号 20071109);小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(中杉金桥公司,批号 11980907);SABC 检测试剂盒(武汉博士德公司,20110816);二氨基联苯胺(DAB)染色试剂盒(武汉博士德公司);RIPA 裂解液(北京普利来基因技术有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 造模及模型判定 参照文献方法^[6],采用 MCAO 法复制局灶性脑缺血大鼠模型。电热毯取暖维持体温在 37 °C 左右,90 min 后复灌。模型制备 6 h 动物苏醒后采用 Bederson^[7]评分法进行行为学评分,>1 分为模型制备成功,分值在 1 ~ 3 分者入组。

2.2 分组与给药 将造模成功的大鼠随机、分层分为模型组和补阳还五汤组。另 16 大鼠只分离右侧颈动脉,不进行栓塞,设为伪手术组。补阳还五汤组

ig 补阳还五汤 12 g·kg⁻¹,连续 3 周。伪手术和模型组 ig 同体积生理盐水;在第 4 ~ 7,18 ~ 21 天 ip BrdU 50 mg·kg⁻¹,1 次/d,之后处死动物取材。

2.3 行为学评分 在治疗 1,2,3 周后利用 Bederson 评分标准进行行为学评分。

2.4 测量脑梗死面积 给药 1,3 周后断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干后,用生理盐水冲洗后吸干周围水分,沿冠状切成 5 片,然后迅速将脑片置于 1% 2,3,5-三苯基四氮唑(TTC)的磷酸缓冲溶液中,避光温孵 30 min,其中每隔 7 ~ 8 min 翻动 1 次,温孵完后将脑片照相,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统计算梗死区域的面积。脑梗死面积百分比计算公式为:

$$\text{脑梗死面积} = (\text{白色梗死面积} / \text{脑片总面积}) \times 100\%$$

2.5 组织处理 分别在给药后 7,21 d 大鼠以 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)麻醉后,心脏灌流,开颅取脑,4% 多聚甲醛后固定 24 h,依次放入 20%,40% 蔗糖脱水 24 h,OTC 包埋,冰冻切片连续切片,厚度为 15 μm。另一半大鼠迅速断头取脑,预冷 PBS 冲洗血污,立即置液氮中保存。

2.6 免疫组化染色 取组织冰冻切片,氯仿、丙酮脱包埋剂后 50% 甲酰胺/2 × SSC 65 °C 水浴 2 h,2 mol·L⁻¹ 盐酸 37 °C 30 min,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化氢酶。PBS 洗涤,血清封闭 1 h,滴加小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:50 稀释),4 °C 过夜,用即用型 SABC 检测试剂盒进行脑片 BrdU 免疫组织化学染色。DAB 显色,脱水,透明,封片。应用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理分析系统,在 200 倍视野下,进行 BrdU 阳性细胞计数。

2.7 细胞基质衍生因子(SDF-1)蛋白含量检测 准确称取缺血区脑组织 10 mg,按体积比为 10:1 加入 RIPA 裂解液,提取脑组织蛋白,测定蛋白浓度,按 ELISA 法试剂盒操作说明测定每 1 mg 蛋白中 SDF-1 蛋白含量。

2.8 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 对 MCAO 大鼠神经功能的影响 造模 1 周后大鼠的行为学评分为 (1.722 ± 0.461) 分,随时间推移,评分逐渐下降。给予补阳还五汤后 1~3 周神经功能评分均显著低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$),且随着时间延长,其对神经功能缺失症状的改善作用越明显。见表 1。

表 1 补阳还五汤对 MCAO 大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$) 分

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	1 周			2 周			3 周		
假手术	-		0 ²⁾		0 ²⁾		0 ²⁾			
模型	-		1.72 ± 0.46		1.56 ± 0.51		1.39 ± 0.50			
补阳还五汤	12		1.33 ± 0.60 ¹⁾		0.89 ± 0.58 ²⁾		0.50 ± 0.31 ²⁾			

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

3.2 对 MCAO 大鼠梗死面积的影响 经 TTC 染色

表 2 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧 SVZ、纹状体区 BrdU 阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) 个/mm²

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	1 周		3 周	
		SVZ	纹状体	SVZ	纹状体
假手术	-	32.67 ± 3.01 ²⁾	4.8 ± 1.48 ²⁾	28.83 ± 4.58 ¹⁾	4.4 ± 1.637 ²⁾
模型	-	52.17 ± 6.52	60.20 ± 6.72	35.83 ± 4.88	22 ± 3.87
补阳还五汤	12	71.17 ± 5.19 ²⁾	83.8 ± 3.83 ²⁾	43.33 ± 6.06 ¹⁾	54.60 ± 5.77 ²⁾

白表达升高,3 周后较模型组降低。给药组 SDF-1 蛋白水平高于模型组,给药 3 周后与模型组相比具有显著性差异 $P < 0.05$ 。见表 3。

表 3 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧脑室 SDF-1 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	1 周		3 周	
假手术	-		30.38 ± 6.17		32.56 ± 3.08
模型	-		33.28 ± 5.59		28.65 ± 3.47
补阳还五汤	12		34.82 ± 6.09		36.30 ± 2.71 ¹⁾

4 讨论

正常状态下,成年哺乳动物中枢神经系统中的 NSCs 主要集中在海马齿状回颗粒细胞层下区(subgranular zone, SGZ)和室管膜下区(SVZ),大多处于静息状态。研究表明^[8]脑缺血可诱导神经再生,有助于脑损伤后神经功能的恢复。脑缺血后神经发生可分为 3 个阶段,首先是激活 SGZ 和 SVZ 的

后,正常脑组织呈玫瑰红色,而梗死组织呈白色,且界限分明。单纯脑缺血再灌注后脑组织出现明显梗死,1 周和 3 周时梗死面积分别占 $(35.2 \pm 6.3)\%$, $(29.8 \pm 6.9)\%$;给予补阳还五汤 1,3 周后大鼠脑梗死面积明显降低,分别为 $(16.1 \pm 5.2)\%$, $(10.3 \pm 4.0)\%$,与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

3.3 对 MCAO 大鼠缺血侧 SVZ、纹状体 BrdU 阳性细胞数的影响 假手术组中 SVZ 可见 BrdU 阳性细胞,纹状体区偶见 BrdU 阳性细胞。与假手术组相比,大鼠缺血再灌注 1 周缺血侧 BrdU 阳性细胞增加 ($P < 0.01$),3 周时较 1 周减少,但与假手术组相比仍具有显著性差异 ($P < 0.05$)。给予补阳还五汤 1 周后大鼠缺血侧 SVZ、纹状体区 BrdU 阳性细胞显著增加,与模型组比较均具有显著性差异 ($P < 0.01$),3 周后 BrdU 阳性细胞数较 1 周下降,但仍显著高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对 MCAO 大鼠缺血侧 NSCs SDF-1 表达的影响 与假手术组比较,MCAO 模型 1 周后 SDF-1 蛋

白表达升高,3 周后较模型组降低。给药组 SDF-1 蛋白水平高于模型组,给药 3 周后与模型组相比具有显著性差异 $P < 0.05$ 。见表 3。

NSCs,促进其增殖;其次是增殖的 NSCs 迁移至缺血损伤区,如嗅球、大脑皮层、纹状体、海马齿状回等;最后,迁移的 NSCs 分化为区域特定的神经元表型,整合到神经网络发挥生理功能。但这种代偿性反应极为有限,因此亟需寻找促进 NSCs 增殖和迁移的药物。

补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》,由生黄芪、当归尾、川芎、赤芍、桃仁、红花、地龙组成,具有益气养血、活血通络之功效,系临床治疗脑中风后遗症的经典名方,既往研究报道补阳还五汤能显著改善 MCAO 大鼠的神经学症状,降低梗死面积,有关其作用机制的研究,发现其可以促进海马齿状回 NSCs 的增殖和存活,调节 NSCs 的分化^[3-5]。此外还可以促进梗死区血管形成、上调 VEGF 及受体等的表达^[9-10]。但无论在胚胎期还是成年的神经系统中大部分 NSCs 都要经过一定距离的迁移才能抵达它们发挥功能的部位,也就是说,迁

移是 NSCs 发育成熟的必经阶段。因此,脑损伤后 NSCs 向病灶处迁移,是其参与神经组织的再生修复的关键环节^[11]。究竟补阳还五汤对 MCAO 内 NSCs 的迁移有无作用,至今未见报道。

本研究通过线栓法成功复制了 MCAO 大鼠模型,并借助此模型观察补阳还五汤对 NSCs 迁移的作用,结果显示给予补阳还五汤后能明显改善神经功能缺失症状,减少梗死面积;同时还能有效地提高缺血后 1 周和 3 周大鼠 SVZ 和纹状体区 BrdU 阳性细胞的数量,尤其缺血周围的纹状体区 NSCs 显著增加,推测一方面缺血导致机体的代偿性修复,激活缺血半暗带区 NSCs 的增殖;另一方面,NSCs 可能是从神经发生的富集区,即从 SVZ 及 SGZ 迁移而来。

SDF-1 是目前已知的干细胞最强大的趋化剂,它属于趋化因子 CXC 亚家族,系统命名为 CXCL12,广泛且稳定地表达于脑、心脏、肝等组织中。国内外学者发现缺血性脑损伤可引起 SDF-1 表达上调,并主要通过与其受体 CXCR4 结合,调节内源性 NSCs 的迁移^[12]。本研究发现,脑梗死 1 周后 SDF-1 有上升的趋势,但无统计学差异,这提示是缺血导致的代偿性反应是有限的,3 周时甚至稍低于假手术组。而给予补阳还五汤 1 周后 SDF-1 的表达仅轻度升高,3 周时显著上调,这可能源于损伤区残存或侵入的星形胶质细胞和内皮细胞 SDF-1 的表达上调,进而激活表达 CXCR4 的 NSCs 应答并向病损区迁移,表现为缺血区周围 BrdU 阳性细胞数显著增加。其确切的作用机制有待进一步的研究证实。

[参考文献]

[1] 熊方令,高宜录. 内源性神经干细胞修复中枢神经系统损伤的策略[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(10):1105.

[2] 谢静红. 补阳还五汤治疗急性缺血性脑卒中气虚血瘀证 30 例[J]. 河南中医, 2011, 31(2): 187.

[3] 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.

[4] 高剑锋,吕风华,王晓辉. 补阳还五汤对老龄大鼠脑缺血再灌注海马齿状回细胞增殖分化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(18):2348.

[5] 佟丽,谭现辉,沈剑刚. 补阳还五汤及不同配伍组方对缺血性脑中风后大鼠神经增殖作用的对比研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(6):519.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Jin K, Wang X, Xie L, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain [J]. PNAS, 2006, 103(35):13198.

[9] 刘柏炎,蔡光先,刘维,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体 Flk1 的影响[J]. 中草药, 2007, 38(3):394.

[10] 李军,王朝阳. 补阳还五汤对急性脑缺血大鼠血管新生影响的实验研究[J]. 中国中医急症, 2011, 20(2):273.

[11] Ikedab T. Stem cells and neonatal braininiury[J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1): 263.

[12] Lanfranconi S, Locatelli F, Corti S. Growth factors in ischemic stroke [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(8):1645.

[责任编辑 何伟]