

中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及血管内皮生长因子表达的影响

王宝亮¹, 韩艳丽^{2*}

(1. 河南中医学院第一附属医院脑病区, 郑州 450008; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经保护作用及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响。方法: 50 只 SD 大鼠随即分成: 假手术组, 缺血再灌注组, 脑缺血再灌注 + 中风皂贝化痰胶囊高、中、低剂量组 (1.62, 1.08, 0.54 g·kg⁻¹·d⁻¹)。采用 Zea-Longa 方法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 观察中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及 VEGF 表达的影响。结果: 与假手术组相比, 缺血再灌注大鼠出现严重的神经功能缺失症状, 皮质和海马区 VEGF 表达增强; 与脑缺血再灌注组相比, 中风皂贝化痰胶囊治疗组能显著改善大鼠神经功能缺失症状, 增加 VEGF 的表达, 其中以中风皂贝化痰胶囊高剂量组的神经保护作用最为显著, VEGF 阳性细胞区积分吸光度为 (150.8 ± 9.8)。结论: 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其作用机制可能与增加 VEGF 的表达有关。

[关键词] 中风皂贝化痰胶囊; 脑缺血再灌注损伤; 血管内皮生长因子; 大鼠模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0138-04

Influence of Zhongfeng Zaobei Huatan Jiaonang on Nerve Protection and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

WANG Bao-liang¹, HAN Yan-li^{2*}

(1. Encephalopathy Department of No. 1 Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Zhongfeng Zaobei Huatan Jiaonang (ZFZBHTJN) on nerve protection and the VEGF expression in cerebral ischemia-reperfusion injury rats model. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into sham operation group, ischemia-reperfusion (I-R) group, ZFZBHTJN high, Medium, low

[收稿日期] 20100711(008)

[基金项目] 河南省教育厅教育攻关项目 (2007360031)

[第一作者] 王宝亮, 本科, 主任医师, 教授, 研究方向: 脑血管病的防治与研究, E-mail: wang_baoliang@163.com

[通讯作者] * 韩艳丽, E-mail: 42354658@qq.com

[5] 李江, 黄忠仕, 黄仁彬, 等. 复方六月雪颗粒提取工艺研究[J]. 中国药房, 2005, 16(1): 16.

[6] Mbsmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55.

[7] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 143.

[8] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76.

[9] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209.

[责任编辑 聂淑琴]

dose group(1.62, 1.08, 0.54 g·kg⁻¹·d⁻¹). The rat model of cerebral ischemia-reperfusion was produced by Zea-longa method. The impacts of ZFZBHTJN on neuro logic function and expression of VEGF were observed. **Result:** Compared with sham operation group, I-R group presented severe neuro logic deficits and increases of VEGF expression in cortex and hippocampus. Compared with those in I-R group, neuro logic deficits of rats were relieved significantly and VEGF expression increased distinctly in ZFZBHTJN groups. High dose group (1.62 g·kg⁻¹·d⁻¹) presented the most significant effect on nerve protection ($P < 0.01$). **Conclusion:** ZFZBHTJN may relive cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by increasing VEGF expression.

[Key words] Zhongfeng Zaobei Huatan Jiaonang (ZFZBHTJN); cerebral ischemia-reperfusion injury; vascular endothelial growth factor; rat model

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是已知作用最强和特异性最高的血管生长因子^[1], 与其受体结合后在血管生成和神经保护方面发挥着重要作用^[2]。近年来, 对中医药治疗干预脑血管病的研究日益增多, 中风皂贝化痰胶囊是河南中医学院第一附属医院院内制剂, 由牙皂、川贝、天麻、水蛭、石菖蒲、川芎、泽泻、胆南星、白附子、天麻等组成, 有祛痰化痰开窍之功效。本研究采用脑缺血再灌注损伤大鼠模型观察中风皂贝化痰胶囊对 VEGF 表达的影响, 探讨中风皂贝化痰胶囊对缺血再灌注损伤的神经保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠, 普通级, 8~10 周龄, 体重(250~300) g, 由河南省动物实验中心提供, 合格证号 SCXK(豫) 2005-0012。

1.2 药物 中风皂贝化痰胶囊, 由河南中医学院第一附属医院制剂室提供(生产批号 z05010656) 将该药的细药粉加入蒸馏水中。低剂量、中剂量和高剂量分别制成含药粉 0.054, 0.108, 0.162 g·mL⁻¹ 混悬液。

1.3 试剂 血管内皮生长因子 (VEGF) 试剂盒(批号 10110001): 兔多克隆, 美国 SANTA CRUZ 公司产品; SP 9001 试剂盒(批号 701323A) 北京中杉生物工程公司产品; 二氨基联苯胺 (DAB) 试剂盒(批号 1386184) 北京中杉生物工程公司产品; PBS 缓冲液 (AR0030): 武汉博士德生物工程有限公司产品; 多聚甲醛: 上海试剂厂产品; 多聚赖氨酸 (AR0003): 武汉博士德生物工程有限公司产品等。

1.4 仪器 图象采集软件: 德国 Lecia 显微照像系统; 数据分析系统: 上海山富科学仪器有限公司, Biosens Digital Imaging System v1.6; 微波炉: 格兰仕; 温箱: 电热恒温干燥箱 DHG-9031, 上海; 1/万电子天

平: BS224S 德国; 病理切片机: HM2235, 德国生产, 河南省人民医院病理科; AUTO-CAD 图像处理软件等。

2 方法

2.1 脑缺血再灌注损伤模型建立 参照 Zea-Longa 方法并予改良的大脑中动脉线栓法 (MCAO) 制备大鼠右侧大脑中动脉缺血 2 h 再灌注 24 h 模型。将头端直径为 0.21~0.27 mm 的线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大鼠大脑中动脉起始部, 遇微小阻力时停止。从颈总动脉分叉处计算插入深度为 17~18 mm, 造成大脑中动脉血供阻断。缺血 2 h 后, 将线栓拔退至颈总动脉, 恢复大脑中动脉的血供。造模成功的判定标准: 大鼠清醒后出现右侧 Homer 征及以左前肢为重的偏瘫。

2.2 分组及给药方法 50 只 SD 大鼠随机分成假手术组, 缺血再灌注组, 中风皂贝化痰胶囊高、中、低 3 个剂量组(各组 $n=10$)。脑缺血再灌注 + 中风皂贝化痰胶囊处理组于术前 7 d 开始, 按高、中、低剂量组分别 ig, 具体用药剂量如下: 1.62, 1.08, 0.54 g·kg⁻¹。用法: 10 mL·kg⁻¹, qd, ig。造模后未再给药。假手术组与缺血再灌注组均 ig 等量生理盐水。

2.3 神经症状评分 缺血 2 h 再灌注 24 h 后观察大鼠神经功能缺失状态, 参照 Zea Longa 评分标准进行评定。0 分: 无任何神经功能缺失; 1 分: 左前爪不能完全伸直; 2 分: 向左侧行走; 3 分: 向左侧转圈成追尾状; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。

2.4 VEGF 免疫组化染色 各组大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 打开胸腔, 经心脏灌注 0.9% 的生理盐水, 续之以 4% 多聚甲醛灌流固定。假手术对照组于术后 24 h 将大鼠麻醉后打开胸腔, 仍经心脏灌注。剥取脑组织, 以视交叉到枕叶处两点连续作 5 个冠状切片, 常规固定、脱水、透明、浸蜡、包埋

切片 5 μm 厚进行相应染色, 进行 VEGF 免疫组化染色。免疫组化染色阳性反应的 VEGF 主要见于脑缺血侧梗塞区及其周围的毛细血管管壁, 呈棕黄色或棕褐色, 于神经元和胶质细胞也可见 VEGF。细胞每个切片在 400 倍显微镜下观察, 在右侧大脑半球缺血半暗带区皮质和海马区取 3 个冠状切片, 计数其中阳性细胞的数量, VEGF 结果用半定量分析, 根据图像分析系统 (biosens digital Imaging system) 用积分吸光度 (A) 来计数染成深棕色的阳性细胞, 每个标本计数 5 个视野, 取平均值, 以反映阳性细胞表达的量 and 强度。

2.5 统计学方法 统计学处理采用 SPSS 13.0 统计软件, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析方法进行显著性检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 神经缺损评分 假手术组无神经功能缺失症状, 缺血再灌注组出现明显的神经功能缺失症状。与缺血再灌注组比较, 中风皂贝化痰胶囊能明显改善脑缺血再灌注损伤后的神经功能缺失症状, 尤其中风皂贝化痰胶囊高剂量组改善最为显著, 结果见表 1。

3.2 VEGF 免疫组化染色 假手术组大鼠脑血管不表达 VEGF 或仅有微弱阳性反应。脑缺血再灌注后大鼠脑血管 VEGF 表达增加。阳性反应的 VEGF

表 1 脑缺血再灌注损伤后各组大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	神经功能评分
假手术	-	0 \pm 0
缺血再灌注	-	2.77 \pm 1.15 ²⁾
中风皂贝化痰胶囊	0.54	2.31 \pm 1.12 ^{1, 3)}
	1.08	1.72 \pm 1.04 ^{1, 3)}
	1.62	1.29 \pm 1.09 ¹⁾

注: 与缺血再灌注组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与中风皂贝化痰胶囊高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

主要见于脑缺血侧梗死区及其周围的毛细血管管壁, 呈棕黄色或棕褐色, 于神经元和胶质细胞也可见 VEGF。阳性反应积分吸光度结果显示, 手术组及中风皂贝化痰胶囊高、中、低剂量组表达增强, 与假手术组相比, 差异有统计学意义; 药物处理组高、中剂量的表达较模型组明显增多, 其中以高剂量组改善最为明显, 高剂量效果优于中、低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2 及图 1, 2)。

表 2 VEGF 阳性细胞积分吸光度 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	VEGF 阳性细胞区 / A
假手术	-	102.74 \pm 2.40
缺血再灌注	-	110.70 \pm 3.62 ¹⁾
中风皂贝化痰胶囊	1.62	150.80 \pm 9.79 ^{1, 2)}
	1.08	136.24 \pm 1.18 ^{1, 2)}
	0.54	120.86 \pm 4.72 ¹⁾

注: 与假手术组相比¹⁾ $P < 0.05$; 与缺血再灌注组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

免疫组化染色照片见图 1, 2。

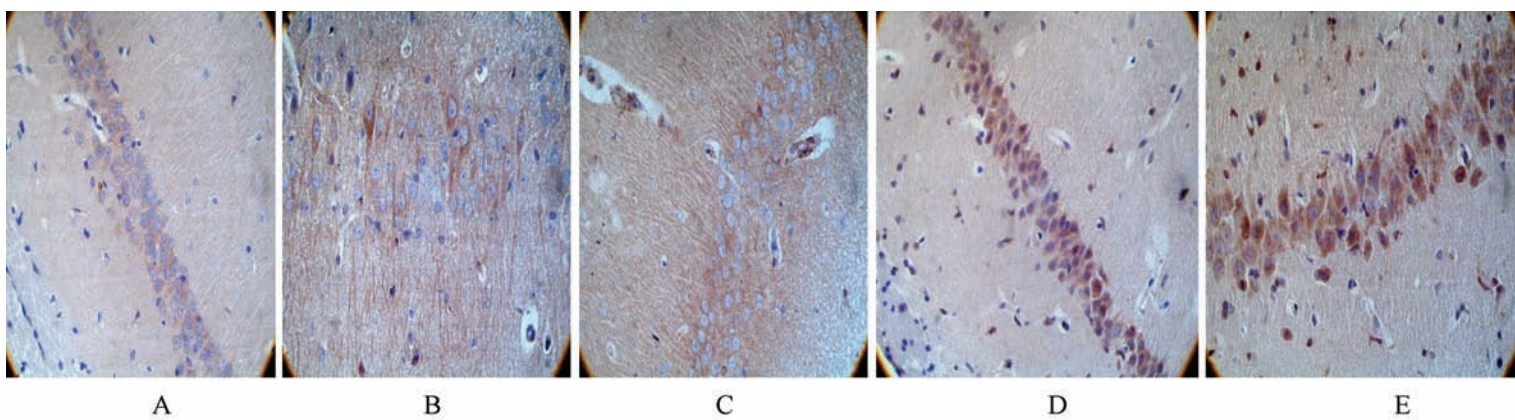


图 1 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后海马区 VEGF 表达影响 ($\times 400$)

A. 假手术组; B. 缺血再灌注组; C. 中风皂贝化痰胶囊 0.54 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 中风皂贝化痰胶囊 1.08 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 中风皂贝化痰胶囊 1.62 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2 同)

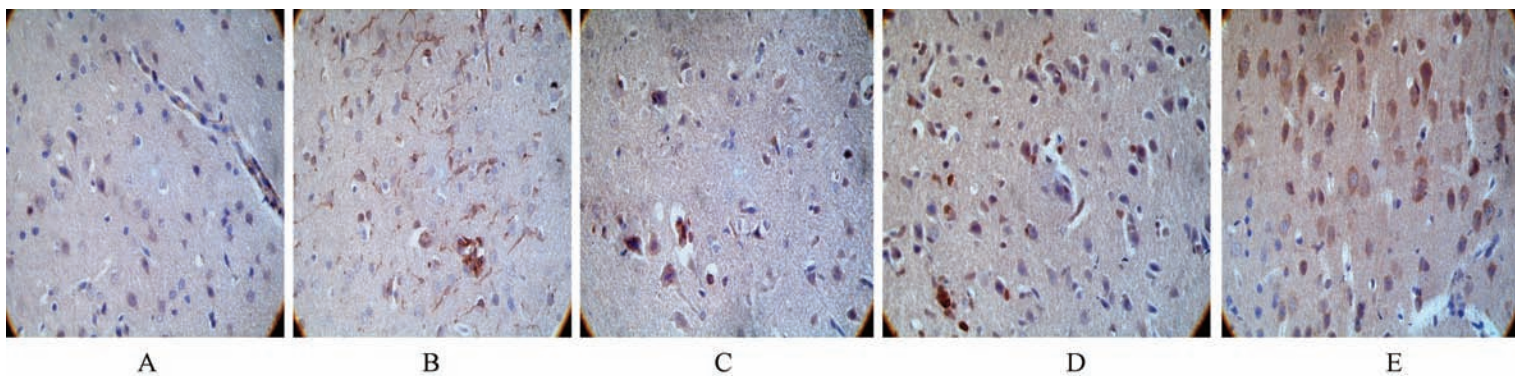


图 2 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后皮质区 VEGF 表达的影响 ($\times 400$)

4 讨论

中风皂贝化痰胶囊由牙皂、川贝、天麻、水蛭、石菖蒲、川芎、泽泻、胆南星、白附子、天麻等组成。皂贝祛痰开窍为君; 川贝、胆南星、白附子、天麻化痰熄风为臣; 苏合香、郁金、菖蒲醒脑开窍, 水蛭、川芎活血化瘀, 泽泻入肾利水, 使湿邪去之有路, 共为佐。诸药合用, 共奏祛风化痰, 化瘀通络之效。

VEGF 属于促内皮细胞有丝分裂的生长因子, 高度特异性地促进血管内皮生长, 在生理性及病理性的血管发生和血管新生中发挥极其重要的作用^[3]。研究发现, VEGF 对神经元也有直接营养和保护作用, 增强神经元活性和存活能力, 刺激神经元轴突再生^[2]。Jin 等的研究也证明, VEGF 可刺激体外和体内神经发生^[4]; 促进脑内神经干细胞存活^[5]。最新研究证明 rAAV1-VEGF(新型血清型 1 型重组腺相关病毒载体携带血管内皮生长因子基因) 可介导 VEGF 在大脑内表达, 并对脑缺血大鼠神经功能的恢复具有促进作用^[6]。VEGF 在缺血时上调是脑组织抵抗缺血和缺氧的一种防御性反应, 即通过内源性 VEGF 合成与分泌, 重新构建微血管系统, 进而恢复受累脑组织血供, 以减轻缺血性脑损伤, 保护神经系统功能。

本研究显示, 大鼠缺血再灌注 24 h 后, 神经症状有明显的缺失, 皮质和海马区 VEGF 阳性细胞数显著增多, 与其比较, 中风皂贝化痰胶囊治疗组的神

经功能缺损评分下降 VEGF 阳性细胞数明显增多, 这说明中风皂贝化痰胶囊可能通过某种途径促进 VEGF 的表达, 从而促进血管形成、改善血液循环, 促进脑功能恢复, 保护神经系统功能。

[参考文献]

- [1] 金惠铭, 李先涛. 血管新生的调控 [J]. 中国微循环杂志, 2001, 5(2) : 85.
- [2] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. J Chin Invest, 2003, 111 (12) 1843.
- [3] Ferrara N, Gerber H P, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. Nat Med, 2003, 9(6) : 669.
- [4] Jin K L, Zhu Y H, Sun Y J, et al vascular endothelial growth factor(VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. PNAS, 2002, 99(18) : 11946.
- [5] Wada T, Haigh J J, Ema M, et al. Vascular endothelial growth factor directly inhibits primitive neural stem cell survival but promotes definitive neural stem cell survival [J]. J Neurosci, 2006, 26(25) : 6803.
- [6] 栗世方, 孟庆海, 姚维成, 等. rAAV1 介导血管内皮生长因子基因表达对大鼠脑缺血新生血管形成及神经功能恢复的影响 [J]. 中华医学杂志, 2009: (3) : 167.

[责任编辑 聂淑琴]