

益脑康对动脉粥样硬化基础急性缺血性中风大鼠脑组织病理及脑组织血管内皮生长因子表达的影响

秦秀德¹, 黄燕^{2*}, 朱磊¹, 周喜燕¹, 陈杰¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] 目的: 研究益脑康对动脉粥样硬化(AS)及AS基础上的急性缺血性中风(AIS)SD大鼠脑组织病理及脑组织血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,以期部分阐述其作用机制。方法:将体重(180±20)g SD雄性大鼠115只随机分为A组(正常组)15只;B、C、D、E、F组共100只大鼠(其中C组为AS组、D组为复合模型组、B组为益脑康预防组、E组为益脑康治疗组、F组为立普妥治疗组),第8d一次性VD₃腹腔注射后开始给养高脂饲料复制AS模型,第65d,除C组外均采用ET-1 MCA附近注射法复制AIS模型。第74d,每组随机抽取3只检测脑组织病理情况及VEGF表达情况。结果:益脑康组脑组织VEGF免疫组化结果提示血管壁纤维和内皮细胞着色强度为++,强于立普妥组。结论:益脑康可能通过上调AIS大鼠脑组织VEGF表达而发挥对AIS大鼠脑组织的保护作用。

[关键词] 缺血性中风;益脑康;AIS动物模型;VEGF表达

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0166-04

Yinaokang Effect on AS Based AIS SD Mices Brain VEGF Expression and Brain Pathological Change

QIN Xiu-de¹, HUANG Yan^{2*}, ZHU Lei¹, ZHOU Xi-yan³, CHEN Jie³

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;

3. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] Objective: To study how the Yinaokang affect the atheroma(AS) and AS based acute ischemic apoplexy (AIS) SD mices brain VEGF expression and brain pathological changes, so as to explain its mechanism. **Method:** 115 SD rats weighted (180±20)g were randomly divided into A group (normal) 15; B-F group (model) 100: C is AS group, D is composite group, B is Yi Naokang foregoing group, E is Yinaokang group, F is lipitor group. On the 8th day the B-F group would be given intraperitoneal injection of VD₃ one-time and then begain to supply with high fat feed to copy AS model, on the 65th day, inject ET-1 near the MCA area except group C to copy AIS model. On the 74th, 3 rats would be picked out randomly to test their brain VEGF expression and HE stained to observe the brain pathological changes. **Result:** The VEGF expression in the Yinaokang group is ++ while the lipitor group is +, the expression of VEGF in the Yinaokang group is stronger than the lipitor group. **Conclusion:** Yinaokangs treatment effect on AIS maybe is related with its function of upregulating VEGF expression in the ischemic brain.

[Key words] ischemic stroke; Yinaokang; AIS animal model; VEGF expression

[收稿日期] 20100627(001)

[基金项目] 国家科技部十五攻关课题(2004BA721A02)

[第一作者] 秦秀德, 博士, 主要从事中医脑病的临床与基础研究

[通讯作者] * 黄燕, 本科, 教授, 博士生导师, 从事中医脑病的临床与基础研究, E-mail: stroketcm15@yahoo.com.cn, Tel: 020-81887233-34530

益脑康是国家科技部十五攻关课题“急性缺血中风辨证规范与疗效评价的示范研究”中医综合方案中所选用的广东省中医院脑病中心常用的中成药,临床部分的研究表明^[1],含有益脑康的中西医结合综合治疗方案可改善神经功能缺损;并且中西医结合综合治疗方案有提高患者生存质量的趋势;在改善急性缺血性中风(AIS, acute ischemic stroke)患者症状和体征等不适方面,也显示了中医药的优势。为探究其作用机制,特复制动脉粥样硬化(AS, atherosclerosis)及AS基础上的AIS SD大鼠,益脑康干预后检测其对动物模型脑组织病理及脑组织VEGF表达的影响,以期部分阐述其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠115只,体重(180±20)g,由广州中医药大学实验动物中心提供(合格证号SCSK(粤2008-0020))。

1.2 试剂 益脑康胶囊(广东省中医院院内制剂,主要由制天麻、川芎、制南星、黄芪等组成),广东省中医院中心药房;立普妥(阿托伐他汀钙),辉瑞制药有限公司;内皮素-1, Merck公司;维生素D₃注射液, MBchem公司; VEGF免疫组化试剂盒, 武汉博士德生物制剂有限公司。

1.3 仪器 鼠脑定位仪, 美国 Stoelting公司; 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; 日立7600-020型全自动生化分析仪; YS100光学显微镜, 日本NIKON公司; 显微数码照相机 Olympus BX40F4, 日本Olympus公司。

2 方法

2.1 分组 封闭群纯种SPF级Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠115只, 体重(180±20)g, 鼠龄60~90d, 安静环境下分笼饲养, 室温(23±1), 相对湿度60%, 光线自动控制, 明(07:00~19:00)暗(19:00~07:00)交替, 普通大鼠饲料适应性喂养7d。采用随机数字表法分为A组(正常组)15只、B组(益脑康预防组)20只、AS组80只。复制、评价AS模型并留取所需标本后, 从剩余的77只AS模型大鼠中随机抽取15只作为C组(单纯AS组), 剩余AS模型大鼠复制AIS模型, 评价AIS模型并留取所需标本后, 将剩余的AS基础AIS模型大鼠45只随机分为D组(AS基础AIS组)15只、E组(益脑康组)15只、F组(立普妥组)15只。

2.2 大鼠AS模型的复制 采用杨鹏远等^[2]介绍

的方法建立AS大鼠的模型。模型组喂食高脂饲料: 即3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧、5%白糖、10%猪油、81.3%基础饲料, 同时在喂食开始时1次性腹腔注射维生素D₃ 60万IU·kg⁻¹, 连续喂养6周。

第64d分别从A组及AS组大鼠中随机抽取10只, 眼球取血2mL, 分别采用酶法测定TC, TG, LDL和HDL。并从AS组大鼠中随机抽取3只进行AS程度检测。

2.3 急性脑缺血再灌模型制备 造膜方法: 第65d, 参考顾国军等^[3]介绍的方法, 将剩余的18只益脑康预防组及62只动脉粥样硬化组大鼠复制急性缺血中风模型。造模评价: 第66d, 通过评价造模后大鼠的神经学评分以确定中风模型成功与否(动物模型制作成功标准参照Zea Longa评定神经功能缺损程度的方法^[4])。

2.4 给药方法及时间 A组(正常组): 普通饲料正常饲养。B组(益脑康预防组): 复制AS模型以及AIS模型的同时, 给予益脑康0.625mg·kg⁻¹·d⁻¹溶于3mL生理盐水灌胃, 日1次, 连续9周。C组(AS组): 于第65d开始予等容量生理盐水灌胃, 日1次, 连续9d。D组(AS基础AIS组): 于第67d开始给予等容量生理盐水灌胃, 日1次, 连续1周。E组(益脑康组): 于第67d开始给予益脑康0.625mg·kg⁻¹·d⁻¹溶于3mL生理盐水灌胃, 日1次, 连续1周。F组(立普妥组): 于第67d开始给予立普妥2.08mg·kg⁻¹·d⁻¹, 溶于3mL生理盐水, 灌胃给药, 日1次, 连续1周。以上药物均由蒸馏水配制, 配制后储存于4℃冰箱中, 药液定期配制。

2.5 标本采集 血样的采集: 第66d, 从AS组、AS基础ACI组中各随机抽取10只, 依次用10%水合氯醛腹腔注射麻醉(300mg·kg⁻¹, 必要时补充注射)后, 经眼眶采血, 接取3mL至分离胶管中, 4℃, 3000r·min⁻¹离心10min, 取上层血清, 待检; 动脉采集: 第64d, 在正常组、AS组中随机抽取3只大鼠, 水合氯醛麻醉后沿主动脉瓣至髂动脉分支处剥离全长动脉, 纵向剪开, 在10%甲醛溶液中固定; 脑组织采集: 第64d, 从正常组、AS组中随机抽取3只大鼠, 断头取左侧大脑, 除去嗅球、脑干及小脑, 行脑组织病理学观察及免疫组化检测。第66d, 从AS组中、AS基础AIS组中随机抽取3只大鼠, 断头取左

侧大脑,除去嗅球、脑干及小脑,行脑组织病理学观察及免疫组化检测。第 74 d,将 AS 基础 AIS 组、益脑康预防组、益脑康组、立普妥组采血后大鼠断头取左侧大脑,除去嗅球、脑干及小脑,进行组织病理学观察及免疫组化检测。

2.6 检测项目及方法 血脂测定:血脂指标采用全自动生化分析仪检测。大鼠脑组织病理学观察:将第 64, 66, 74 d 采集的脑组织标本,进行 HE 染色后光镜观察。大鼠脑组织 VEGF 免疫组化:将第 64, 66, 74 d 采集的脑组织及主动脉标本进行免疫组化检测。免疫组化方法结果判断方法参照许良中的方法^[5]。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行统计学处理,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验/方差分析;方差不齐时采用秩和检验(Keuskal-Wallis 法等)。

3 结果

3.1 一般情况描述

3.1.1 神经功能评价 AS 基础 AIS 模型中,13 只大鼠神经功能评分达 3 级,35 只达 4 级,6 只在 3 级以下,神经功能评分在 3 ~4 级的大鼠所占比例为 88.89%;中药预防组中 3 只大鼠神经功能评分达 3 级,10 只达 4 级,4 只在 3 级以下,神经功能评 3 分在 3 ~4 级的大鼠所占比例为 76.47%。

3.1.2 造模成功时病理表现 见表 1。第 64 d 进行主动脉 HE 染色病理结果提示 AS 模型组管腔内膜、中膜和外膜分界不清楚,管壁厚薄不一,管腔面部分内皮细胞脱落,局部内皮细胞聚集成小团块,管腔内见大的血栓形成,血栓内见钙盐沉积。

表 1 造模成功时大鼠血脂相关指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	mmol·L ⁻¹			
	TCHO	TG	LDL	HDL
正常	1.26 ±0.23	0.26 ±0.11	0.27 ±0.07	0.69 ±0.11
动粥	10.34 ±2.57 ²⁾	0.47 ±0.07 ¹⁾	4.97 ±0.81 ²⁾	0.43 ±0.12 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

3.2 益脑康对 AS 基础 AIS SD 大鼠脑组织病理的影响 正常组皮质层神经元结构完整,无炎细胞浸润,无出血灶,管壁无扩张,管周无明显水肿,胶质细胞排列整齐,血管壁结构无异常。AS 组皮质层神经元结构完整,无炎细胞浸润,但小灶区可见出血;神经元细胞排列整齐,神经胶质细胞肿胀。中风后 7 d 皮质层结构不完整,有大量炎细胞浸润,并聚集形成小脓肿,血管壁周围炎细胞浸润成“套袖状”,血管

壁周围水肿。益脑康组皮质层结构完整,无炎细胞浸润,无出血区,血管壁周围水肿明显,神经胶质细胞肿胀明显,排列较紊乱。益脑康预防组皮质层神经元结构尚完整,无炎细胞浸润,但可见小片区出血灶,血管壁周围水肿,神经胶质细胞肿胀,排列稍紊乱。立普妥组皮质层神经元结构尚完整,血管壁周围轻度水肿,胶质细胞肿胀,排列紊乱。

3.3 益脑康对 AS 基础 AIS SD 大鼠脑组织 VEGF 表达的影响 动脉粥样硬化组血管壁纤维和内皮细胞着色强度为 -;急性中风组血管壁纤维和内皮细胞着色强度为 +;预防中药组血管壁纤维和内皮细胞着色强度为 +;益脑康组血管壁纤维和内皮细胞着色强度为 ++;立普妥组血管壁纤维和内皮细胞着色强度为 +。益脑康组的脑组织 VEGF 表达强于立普妥组。

4 讨论

张氏等^[6]利用局灶脑缺血 3 h 后再灌注模型,发现再灌后 3 ~6 h 出现缺血中心区 VEGF 表达增强,再灌后 24 ~72 h 中心区 VEGF 表达接近正常,而半影区 VEGF 表达 24 h 达峰值,72 h 有下降。近年来的研究发现脑缺血后 VEGF 在脑组织内表达增加,并参与水肿和脑保护等过程^[7]。在脑梗塞中,水肿的形成先于血管生成,VEGF 已被证实能发挥调节毛细血管的通透性和血管生成的作用^[8]。有研究^[9]表明卒中恢复期应用 VEGF 可显著增加血管产生和减少神经功能缺失。Alon 等^[10]的研究提示,VEGF 可防止毛细血管消失,保护内皮细胞不致发生程序性死亡。可见,急性脑梗塞后血管的再生有助于缺血区侧支循环的建立,减少细胞的凋亡从而对缺血区及缺血半暗带区的神经细胞的起到一定的挽救和保护作用。

益脑康是广东省中医院刘茂才教授在中医辨证论治的理论的指导下结合自己治疗中风病多年的基础上总结的经验方,主要选取天麻、川芎、制南星、黄芪等组成方剂,其中主药黄芪补脾益气、天麻平肝息风、川芎活血化瘀、制南星燥湿化痰祛风,药物选择切中缺血性中风阴类证肯綮,合而具有益气醒神、破瘀涤痰的功效。中药对疾病的治疗具有多靶点多方位的优势。本研究表明,益脑康能够增强 AS 基础的 AIS 大鼠脑组织 VEGF 表达,且强于立普妥组,说明益脑康可能通过上调急性缺血性中风大鼠脑组织 VEGF 的表达,促进缺血区及缺血半暗带毛细血管

的再生和侧枝循环的建立,从而发挥对 AIS 大鼠脑组织的保护作用。病理结果也表明益脑康组的皮质层结构比较完整,炎细胞浸润明显少于中风组和立普妥组。

[参考文献]

- [1] 潘峰,郭建文,王新志.急性缺血性中风综合治疗方案多中心临床试验研究[J].天津中医药,2007,24(6):458.
- [2] 杨鹏远,芮耀诚,焦亚斌.动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J].第二军医大学学报,2003,7(24):7.
- [3] 顾国军,黄振兴,陶凯忠,等.HBO对内皮素-1诱导的大鼠局灶性脑缺血模型的疗效观察[J].第二军医大学学报,2006,27(10):1134.
- [4] Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84.
- [5] 许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判定标准[J].中国癌症杂志,2000,69(4):229.
- [6] 张睿,徐洋,房学迅,等.VEGF在大鼠局灶性脑缺血

再灌注损伤中表达变化[J].北华大学学报:自然科学版,2003,4(3):219.

- [7] Carmeliet P, Storkbaum E. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders[J]. Semin Cell Dev Biol, 2002, 13(1):39.
- [8] Brogi E, Wu T, Namiki A, et al. Indirect angiogenic cytokines unregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cell whereas hypoxia upregulates VEGF expression only [J]. Circulation, 1994, 90: 649.
- [9] Zhang Z G, Zhang L, Jiang Q. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain [J]. J Clin Invest, 2000, 106(7):829.
- [10] Alon T, Hemo I, Itin A, et al. VEGF acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and implications for retinopathy of prematurity [J]. Nat Med, 1995, 1: 1024.

[责任编辑 邹晓翠]