

## 补阳还五汤联合运动训练对脑梗死 大鼠神经元突触重建的影响

王海涛<sup>1,2</sup>, 杨明峰<sup>1</sup>, 曹晓岚<sup>2</sup>, 孙保亮<sup>1\*</sup>

(1. 泰山医学院附属医院神经内科、山东省高校脑微循环重点实验室, 山东 泰安 271000;  
2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 研究补阳还五汤联合运动训练对脑梗死大鼠神经元突触重建的影响。方法: 用自体血栓经导管注入右侧大脑中动脉建立大鼠局灶性脑梗死模型, 分别给予生理盐水、运动训练、补阳还五汤以及补阳还五汤联合运动训练处理, 观察神经功能损伤情况, 脑组织中突触体素 P38 (P38) 和生长相关蛋白-43 (GAP-43) 的动态表达变化。结果: 运动训练、补阳还五汤和联合治疗均能够使大鼠神经功能损伤评分降低, P38, GAP-43 表达增加, 以联合治疗组最为明显。结论: 补阳还五汤联合运动训练可改善脑缺血后神经行为症状, 促进神经细胞突触再生重建, 两者联合具有协同增效的作用。

[关键词] 脑梗死; 补阳还五汤; 运动训练; 突触体素; 生长相关蛋白-43

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0132-04

## Effect of Buyang Huanwu Decoction Combined with Sports Training on Neurons Synapse Remodeling in Rats with Focal Cerebral Infarction

WANG Hai-tao<sup>1,2</sup>, YANG Ming-feng<sup>1</sup>, CAO Xiao-lan<sup>2</sup>, SUN Bao-liang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Taishan Medical College, Key Laboratory of Cerebral Microcirculation in Universities of Shandong, Taian 271000, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Buyang Huanwu Decoction combined with sports training on the behavior and neurons synapse remodeling in rats with focal cerebral infarction. **Method:** Rats were subjected to embolic focal ischemia using homologous clots and treated with: saline, sports training, Buyang Huanwu Decoction, Buyang Huanwu Decoction combined with sports training, the expression of P38 and growth associated protein-43 (GAP-43) were detected by immunohistochemical approach at 7th, 14th and 21st day after each management. **Result:** The sports training group, Buyang Huanwu group and the combined group all can reduce the damage score of rats nerve function, and the recovery was most significant in the combined group. The expression of P38 and GAP-43 in the combined group was remarkably increased compared with the sports training group and the Buyang Huanwu group. **Conclusion:** Buyang Huanwu Decoction combined with sports training can improve the scores of cerebral ischemia nerve behavior and promote synapse building and new contact of synapse regeneration, the combination of the decoction and sports showed excellent performances and synergism.

[Key words] cerebral infarction; Buyang Huanwu Decoction; sports training; P38; GAP-43

[收稿日期] 20100325(003)

[基金项目] 泰山医学院青年基金项目(20092RQN036)

[第一作者] 王海涛, 主治医师, 山东中医药大学在读博士, 研究方向: 中西医结合防治脑血管病研究, Tel: 0538-6237428, E-mail: docwht@163.com

[通讯作者] \* 孙保亮, Tel: 0538-6227116, E-mail: blsun88@163.com

运动训练是促进神经元突触重建,改善突触可塑性的有效手段<sup>[1]</sup>,而运动训练结合药物包括中药治疗是临床实践中的常用措施,补阳还五汤是治疗气虚血瘀型中风的代表方剂,广泛应用于脑血管病的恢复治疗。所以本研究通过自体血栓大鼠脑梗死模型,观察补阳还五汤联合运动训练对梗死后脑组织突触体素 P38(P38)和生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)的影响,探讨二者联合应用对神经元轴突再生和突触重建的作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 药品与试剂** 药品:补阳还五汤煎液(黄芪 120 g,当归尾 3 g,赤芍 5 g,川芍 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g,地龙 3 g,由山东中医药大学附属医院药剂科购齐并鉴定,煎液浓缩至生药含量为  $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。免疫组化 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、兔抗 GAP-43 多克隆抗体,武汉博士德生物工程有限公司产品;兔抗 P38 多克隆抗体, Santa Cruz 生物公司产品。

**1.2 动物与分组** 96 只 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重( $250\pm 50$ ) g,由山东中医药大学实验动物中心提供。大鼠随机分为 4 组,模型对照组(A 组)、运动训练组(B 组)、补阳还五汤组(C 组)和补阳还五汤联合运动训练治疗组(D 组),每组各 24 只。各组大鼠在组内又随机分为 7 d,14 d 和 21 d 共 3 个小组,每小组 8 只,分别于术后 7 d,14 d 和 21 d 取材。A 组造模后不做任何处理,B 组和 D 组大鼠均从造模 24 h 后开始接受运动训练,C 组和 D 组大鼠在术后给予补阳还五汤治疗,所有大鼠饲养条件相同。

**1.3 给药方法** C 组和 D 组大鼠在手术后 24 h 开始给予补阳还五汤 ig 治疗,剂量  $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ (合生药  $10\text{ g}\cdot\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$ );A, B 组大鼠在相应时间点给予相应剂量的生理盐水。

**1.4 运动训练方法** 参照文献<sup>[2]</sup>,对 B 组和 D 组大鼠术后 24 h 开始进行康复训练,包括采用平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练。平衡木上行走训练方法为采用宽 2 cm,长 170 cm 的木板,诱导大鼠在上面行走,训练其平衡和行走能力;转棒上转动训练方法为将大鼠置于直径 4.5 cm,长 150 cm 的圆木棒上,圆木棒中点固定在  $10\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的转动器上转动,训练大鼠的抓握和动态平衡能力;网屏训练方法为应用 40 cm × 50 cm 网屏,网眼为 1 cm × 1 cm,训练时先将网屏水平放置,将大鼠放于其上,再缓缓将网屏竖直,然后在网屏竖直位状态下顺

时针或逆时针方向用手以缓慢转动网屏,训练大鼠的抓握能力。

**1.5 脑梗死模型制备及标本采集** 参照文献[3]并略加改良制备自体血栓大鼠急性脑梗死模型。股动脉抽血肝素抗凝后离心,加入凝血酶、伊文思蓝混匀后吸入消毒 PE40 导管,37 ℃ 温箱放置 15 min,制作线性自体血栓,剪成长约 4 ~ 5 mm 的栓子备用。颈部手术:分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,剪断颈外动脉并经颈外动脉插管注入栓子栓塞大脑中动脉,造成局部脑梗死。模型成功的标志是动物苏醒后左侧前肢屈曲、行走左转或左侧跌倒,不合格的动物剔除。在造模后不同时间点(7, 14, 21 d)用 4% 多聚甲醛灌注后立即取脑,常规石蜡包埋,做连续切片备染。

**1.6 神经功能损伤评估** 分别于术后 1, 7, 14, 21 d 对各组大鼠进行修订的神经功能损害评分(modified neurological severity scores, mNSS)评价<sup>[4]</sup>。以客观地量化和评价大鼠神经功能损伤的障碍程度,mNSS 评分系统评价了神经功能损伤的严重程度,包含了运动、感觉、反射等方面的综合评价,得分越高,说明神经损伤程度越重。满分为 18 分,可将损伤程度大致分为轻度 0 ~ 5 分,中度 6 ~ 11 分,重度 12 分以上。

**1.7 免疫组化染色** 采用 SABC 免疫组化染色,按说明书进行。石蜡切片常规脱蜡至水。充分水洗后将切片浸入  $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾,经 PBS 洗涤 2 次进行抗原热修复;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加稀释一抗(P38 为 1:200, GAP-43 为 1:150),4 ℃ 过夜;PBS 洗 3 次,滴加生物素化二抗(1:200),37 ℃ 孵育 20 min;PBS 洗 3 次;滴加 SABC,37 ℃ 孵育 20 min, PBS 洗 4 次;DAB 显色,蒸馏水洗涤、脱水、透明、中性树脂封片。采用 Image-Pro-Plus 5.0 图像分析系统进行分析,统计比较积分吸光度(IA)。

**1.8 统计学处理** 试验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,使用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理,组间差异采用方差分析。取  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 神经功能损伤评分** 造模成功后 1 d 各组动物神经功能评分无显著性差异,7, 14, 21 d 运动训练组、补阳还五汤组以及联合治疗组神经功能损伤评分低于模型对照组,有显著性差异;运动训练组较补

阳还五汤组 7, 4, 21 d 神经功能损伤评分略低, 但差异无显著性; 联合治疗组在 7, 14, 21 d 神经功能损

伤评分均较运动训练组、补阳还五汤组低, 统计有显著性差异。

表 1 改良神经功能损伤评分 (mNSS) ( $\bar{x} \pm s$   $n=8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	1 d	7 d	14 d	21 d
A 模型对照	-	11.1 ±0.8	9.3 ±0.3	8.9 ±0.2	8.4 ±0.3
B 运动训练	-	10.9 ±0.3	7.8 ±0.2 <sup>1, 2)</sup>	7.5 ±0.3 <sup>1, 2)</sup>	6.3 ±0.4 <sup>1, 2)</sup>
C 补阳还五汤	10	10.7 ±0.4	7.9 ±0.3 <sup>1, 2)</sup>	7.8 ±0.4 <sup>1, 2)</sup>	6.5 ±0.3 <sup>1, 2)</sup>
D 联合治疗	10	11.2 ±0.4	6.9 ±0.4 <sup>1)</sup>	6.8 ±0.5 <sup>1)</sup>	5.5 ±0.2 <sup>1)</sup>

与 A 组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 D 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$

**2.2 P38 免疫组化染色结果** 免疫组化染色显示模型对照组大鼠脑内 P38 的阳性细胞主要见于梗死灶周边区, 胞浆胞核染色呈棕黄色, 排列紧密, 染色较深。缺血中心区有少量表达, 对侧半球有所增加, 但不及缺血半球。模型对照组大鼠 P38 的积分吸光度值 (IA) 在 7 d 时最低 (1 214 ±125), 随着时间的延长逐渐增高, 14 d 达高峰 (1 824 ±145), 21 d 时有下降趋势 (1 610 ±138), 但同 14 d 组比较, 无显著差异。运动训练组 (7, 14, 21 d IA 分别为 (1 420 ±214), (2 070 ±223), (1 890 ±198)); 补阳还五汤组 7, 14, 21 d IA 分别为 (1 308 ±157), (2 100 ±169), (1 850 ±247); 联合治疗组 7, 14, 21 d IA 分别为 (1 750 ±133), (2 640 ±247), (2 570 ±236) P38 阳性细胞与模型对照组有相似表达规律, 但高于对应时间点的模型对照组, 在 14, 21 d 时有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 联合治疗组大鼠脑 P38 阳性细胞数比运动训练组、补阳还五汤组高, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 GAP-43 免疫组化染色结果** 免疫组化染色显示 GAP-43 的阳性表达为胞浆染呈棕褐色, 阳性细胞分布不均匀, 皮层下细胞减少尤其明显。模型对照组梗死周边区 GAP-43 的阳性细胞数于缺血后 7d 阳性细胞数最多 IA 为 (3 509 ±251), 缺血后 14 d IA 为 (2 798 ±234) 和 21 d IA 为 (2 201 ±189) 阳性细胞数逐渐减少。与模型对照组相比, 运动训练组、补阳还五汤组及联合治疗组在 7 d IA 分别为 (4 507 ±314), (4 362 ±407), (5 624 ±366); 14 d IA 分别为 (4 021 ±235), (3 810 ±364), (5 012 ±414); 21 d 时 IA 分别为 (3 500 ±228), (3 450 ±236), (4 820 ±317) GAP-43 阳性细胞数增高, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 运动训练组 GAP-43 阳性细胞数高于补阳还五汤组, 在 14 d 时差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 其余时间点无显著性差异。联合治疗组在 7, 14, 21 d 时

均高于相应运动训练组, 在 14, 21 d 时更明显 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

脑梗死是威胁人类健康与生存的主要疾病, 已成为我国城市和农村人口第一位致残和死亡原因<sup>[5]</sup>, 给家庭和社会带来沉重负担, 因此对脑梗死患者及时有效康复治疗日益受到关注。运动训练和补阳还五汤都是临床较为常用的治疗手段, 有研究表明它们可通过多种途径干预脑缺血过程, 但尚未见到将这 2 种临床常用治疗方法结合起来着眼于对脑缺血后神经元突触重建影响的研究报道。

突触体素 (synaptophysin, SYN) 是突触前囊泡特有的钙结合糖蛋白, 相对分子质量 Mt 为  $3.8 \times 10^5$ , 又称为 P38, 它的密度和分布可间接反应体内突触的数量和分布情况, 是突触重构和神经可塑性的重要标志之一<sup>[6]</sup>。GAP-43 (又名 B-50, F1, 神经调素) 是一种快速转运胞膜磷酸蛋白, 与神经发育、轴突再生、突触重建等密切相关, 是神经元轴突再生的分子标志<sup>[7]</sup>。因此, 本实验选用代表神经轴突生长和再生的 GAP-43, 反映突触活性和突触重建的 SYN 为观察对象, 来研究神经元突触重建和可塑性变化。

本研究结果显示, 脑梗死后 P38 和 GAP-43 表达均升高, 分别在 14 d 和 7 d 达高峰, 直至 21 d 时仍维持较高水平, 提示大鼠大脑在脑梗死后机体本身存在着自我修复和神经再塑机制, 而且随着时间的延长有减弱趋势, 表明这种修复和再塑作用是有限的, 积极寻找有效促进轴突再生、突触重建的方法, 将对脑缺血损伤的神经元重塑及功能修复具有重要意义。

运动训练组和补阳还五汤组大鼠脑梗死后 7, 14, 21 d 各个时间点的 P38 和 GAP-43 的阳性表达均高于相同时间点的模型对照组, 神经功能损伤评分低于模型对照组, 表明单纯的运动训练和单纯给予

补阳还五汤药物均能提高脑梗死后的神经元突触重建功能,减轻神经损伤水平,但其机制还不十分清楚,有研究表明运动训练<sup>[8]</sup>和补阳还五汤<sup>[9]</sup>均能促进缺血后脑内神经干细胞增殖,增加新生神经元数量,促进脑缺血后神经再生从而有利于神经功能康复。

补阳还五汤联合运动训练治疗能够减轻神经功能损伤评分,提高梗死后 P38 和 GAP-43 表达,促进大鼠脑梗死后缺血周边区 P38, GAP-43 的表达,促进神经细胞突触重建,而且优于单纯运动训练、单纯补阳还五汤治疗,二者联合应用具有更为明显的效果,具有协同增效的作用。

#### [参考文献]

- [1] 邓小鹿,刘发益,胡德文,等. 运动训练对大鼠局灶性脑梗死区周边皮质 GFAP、GAP-43 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(6): 1009.
- [2] 陆敏. 运动训练与电针治疗对脑缺血再灌注大鼠神经可塑性和脑卒中患者功能改善的作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [3] Krueger K, Busch E. Protocol of a thromboembolic stroke model in the rat: review of the experimental procedure and comparison of models[J]. Invest Radiol, 2002, 37(11): 600.
- [4] Chen J, Zhang Z G, Li Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats[J]. Circ Res, 2003, 92(6): 692.
- [5] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2010[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 154.
- [6] Sun D, McGinn M J, Zhou Z, et al. Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery[J]. Exp Neurol, 2007, 204(1): 264.
- [7] Carmichael S T. Plasticity of cortical projections after stroke[J]. Neuroscientist, 2003, 9(1): 64.
- [8] 方杰,胡昔权. 功能训练对脑梗死后神经干细胞影响的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(4): 374.
- [9] 刘柏炎,蔡光先,陈雪梅,等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经元再生的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2007(8): 762.

[责任编辑 聂淑琴]