

侯氏黑散对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经生长因子表达的影响

赵 晖*, 张秋霞, 穆 阳

(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 研究侯氏黑散对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织神经生长因子(NGF)表达的影响。方法: 栓线法阻断大脑中动脉建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 术后观察动物神经行为学变化并进行神经病学评分, 采用免疫组化与医学图像分析相结合的方法检测假手术组、模型组、侯氏黑散各组大鼠缺血脑组织 NGF 的表达。结果: 与模型组缺血侧比较, 侯氏黑散组大鼠神经功能缺损得到改善, 皮质及海马区 NGF 的阳性细胞数及面积光密度值比模型组明显增加($P < 0.05$)。结论: 侯氏黑散可上调脑缺血再灌注后缺血脑组织内源性 NGF 的表达, 而起到脑保护作用。

[关键词] 神经生长因子; 脑缺血; 免疫组织化学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)06-0043-04

Effects of Houshiheisan on Nerve Growth Factor Expression after Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

ZHAO Hui*, ZHANG Qiu-xia, MU Yang

(College of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100013, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Houshiheisan on the expression of nerve growth factor(NGF) after focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** Rat cerebral ischemia reperfusion injury model was produced by occlusion of the right middle cerebral artery. Using behavioral test, evaluate the neurological deficiency of each group after operation. Immunohistochemistry method was performed to observe the NGF expression as well as the effect of Houshiheisan on them. **Results:** Houshiheisan significantly improved the neurological deficits, In the ischemic side of the model group, the number of NGF positive cells were lower as compared with those in the sham-operated side of the sham-operated group ($P < 0.05$). The number of NGF positive cells in the Houshiheisan group were more than that of model group($P < 0.05$), similar to that of sham-operated group. **Conclusion:** The results indicate Houshiheisan can improve the expression of NGF after cerebral ischemia. It may be one of mechanisms for the treatment of ischemic stroke.

[Key words] nerve growth factor(NGF); cerebral ischemic; immunohistochemistry

缺血性脑中风是严重威胁人类健康的疾病之一, 具有发病率高和致残率高的特点。干预缺血性脑中风最重要的任务是保护和恢复受损神经元的功

能。中枢神经细胞损伤后很难恢复的原因之一为损伤局部微环境缺少修复神经损伤的神经生长因子^[1]。如何增加脑内 NGF 以提供合适的微环境来减轻脑损伤, 促进中枢神经系统修复成为当前研究的重点。目前人们在增加脑内 NGF 以减轻脑损伤方面进行了很大的努力, 包括将 NGF 灌注入神经细胞 NGF 生成细胞的移植以及 NGF 的基因治疗, 但这些治疗方法的治疗效果及远期疗效还有待于进一

[收稿日期] 2006-04-11

[基金项目] 北京市教委资助项目, 项目号(KM2003100025099)

[通讯作者] * 赵晖, Tel: (010) 83911635; E-mail: zhaohui8957@sina.com

步研究。侯氏黑散为《金匱要略·中风历节篇》治疗中风的有效名方,本方温补气血、祛风化痰,组方配伍严谨,治疗中风疗效确切。本实验室对侯氏黑散阻抑脑缺血损伤的机理进行了大量的研究工作,发现该方对缺血脑区 NGF 的表达有上调作用,提示中医药对改善缺血脑组织的微环境具有很大的潜力,应加强这方面的基础研究,拓宽临床应用思路。现报道如下。

1 材料

1.1 受试药品 侯氏黑散煎剂(处方为菊花 40g、白术 10g、细辛 3g、茯苓 3g、牡蛎 3g、桔梗 8g、防风 10g、人参 3g、黄芩 5g、当归 3g、干姜 3g、川芎 3g、矾石 3g、桂枝 3g)药材均购自北京同仁堂药店,由本实验室按常规方法制备,加水煎煮两次,每次 1h,合并煎液,浓缩成含生药 3g/mL 的汤剂。

1.2 试剂 兔抗 NGF 多克隆抗体 SP 超敏试剂盒均由北京中山生物技术有限公司分装(Santa Crus 公司)。

1.3 动物 雄性 SD 大鼠,体重 250~300 克,由首都医科大学动物中心提供合格证号:SCXK(京)2000-0012。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型制备 参照 Koizumi 法^[1]制作。大鼠以水合氯醛 350mg/kg,ip 麻醉,仰卧固定,颈正中切口,依次暴露右侧颈总、颈外和颈内动脉,结扎颈总动脉、颈外动脉,于颈总动脉分叉下方剪一切口,将预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线(长 4cm,直径 0.265mm)置于颈内动脉 17~18mm,到有轻微阻力感为止,即达到较细大脑前动脉,阻断大脑中动脉的所有血液供应,2h 后,撤出栓塞线,扎紧动脉残端,缝合皮肤。假手术组大鼠麻醉后,仅暴露颈内外动脉分支,不闭塞大脑中动脉。

2.2 模型的判定和神经病学评分 参照 Bederson^[2]10 分法标准,进行评分:(1)提起鼠尾,观察前肢有无异常表现。凡有左前肢内收、内旋者,视其轻重评为 1~3 分。如果大鼠表现为躯体向右侧旋转,评为 4 分。(2)将大鼠置于金属网上,向后轻拉鼠尾,观察大鼠两前肢张力。根据其左前肢肌力下降程度评为 0~2 分。(3)将大鼠置于光滑平面上,观察侧向推挡阻力。根据向左侧推挡阻力下降程度评为 0~2 分。(4)大鼠出现左眼上睑下垂、左眼分泌物增多者评为 2 分。对麻醉清醒(术后约 2h)大鼠进行评分,如分

值在 2 分或 2 分以上则认为模型制作成功并纳入实验研究,动物脑缺血 24h 及 48h 后再次评分,其结果作为评价疗效的指标之一。

2.3 分组及给药 将雄性 SD 大鼠 60 只随机分成 5 组,每组 12 只,即假手术组、缺血损伤模型组、侯氏黑散大剂量组、侯氏黑散中剂量组、侯氏黑散小剂量组。按体表面积折算,大鼠每天的侯氏黑散等效剂量为 11.6g 生药/kg,小剂量组大鼠投以等效剂量即 11.6g 生药/kg 中剂量组予以 2 倍等效剂量即 23.2g 生药/kg,大剂量组予以 4 倍等效剂量即 46.4g 生药/kg。用药组先灌胃给药 5d,第 5d 给药后 40min 造模,术后每 12h 给药 1 次,共给药 4 次。其假手术组、模型组灌服等量的生理盐水。

2.4 灌注固定及取材 大鼠局灶性脑缺血再灌注 48h 后,于末次给药 40min 后每组取 6 只动物麻醉后剪开胸腔,充分暴露心脏,快速心内插管,以 37℃生理盐水冲洗 5min 后,用 4% 多聚甲醛 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)心内灌注固定,待固定充分后,开颅取全脑,冠状位取视交叉向尾端 3~4mm 组织块,投入相同固定液于 4℃固定一周后,石蜡包埋。冠状切片(片厚 5μm),贴附于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,以抗 NGF 抗体行免疫组织化学染色。

2.5 免疫组化染色方法 所有切片均按照常规 SP 法进行,在相同条件下完成免疫组化反应,NGF 抗体(1:100)于 4℃孵育过夜。暴露抗原方法为 0.01% mol/L 枸橼酸缓冲液(pH6.0),微波处理两次,每次 10min。室温下 DAB 显色 10min,自来水冲洗终止反应,常规脱水,透明,封固。设阴性对照组,用 0.05mol/L, PBS 取代 1 抗,其余步骤相同。

2.6 结果观察 定性观察:在 Olympus 光学显微镜下观察各组切片右侧(缺血侧)脑组织海马及皮质部 NGF 阳性神经元经 DAB 显色后染色深浅。免疫组织化学染色强度判定:阴性为细胞内无着色;弱阳性为细胞内淡黄色颗粒;阳性为细胞内见黄色颗粒;中等阳性为细胞内见较深棕黄色颗粒;强阳性为细胞内见大量深棕黄色颗粒。

2.7 图像处理及统计分析 采用美国 MIS-2000 SP 型 3Y 显微图象分析仪进行图像分析。每只动物采集图像的部位为右侧大脑皮质额叶、顶叶各 2 个视野和右侧海马 CA₁ 区、CA₂ 区各 1 个视野对拟定的观察视野进行阳性细胞计数,免疫反应强度用面积光密度值(OD)表示。面积光密度=阳性标记物面积

× 阳性平均光密度值。阳性标记神经元的面积设定其滤过值为 500~ 5 000 图像分析仪单位。本实验所有数据利用 SPSS10.0 统计软件, 进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 侯氏黑散对局灶性脑缺血再灌损伤大鼠神经病学评分的影响 大鼠脑缺血再灌损伤后, 由于局部脑组织缺血缺氧出现明显的神经功能障碍; 侯氏黑散组动物的神经功能损伤程度均较同时段模型组有不同程度减轻, 侯氏黑散 46.4、23.2、11.6g/kg 组动物神经功能症状评分均显著低于同时段的模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 侯氏黑散对局灶性脑缺血再灌损伤大鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	神经功能评分	
		24h	48h
模型	—	7.56 ± 0.70	6.96 ± 0.74
侯氏黑散大剂量组	46.4	5.96 ± 0.81 ¹⁾	4.79 ± 0.92 ¹⁾
侯氏黑散中剂量组	23.2	6.53 ± 0.89 ¹⁾	5.86 ± 1.05 ¹⁾
侯氏黑散小剂量组	11.6	6.64 ± 0.93 ¹⁾	5.97 ± 0.74 ¹⁾

与模型组比较: ¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 侯氏黑散对局灶性脑缺血再灌损伤大鼠 NGF 表达的影响 假手术组皮质区及海马区均有广泛的神经元呈 NGF 免疫反应阳性表达; 大鼠脑缺血再灌损伤 48h 后, 缺血侧中动脉供血区脑组织 NGF 阳性细胞没有典型神经元的形态结构, NGF 免疫反应呈弱阳性表达, 缺血周边区神经元 NGF 表达呈中等阳性; 各治疗组 NGF 的表达均较模型组有不同程度的增强, 侯氏黑散高剂量组缺血中心区可见部分神经细胞呈 NGF 免疫反应中等阳性表达, 缺血周边区皮质神经元呈 NGF 强阳性免疫反应。侯氏黑散中、小剂量组在缺血中心区可见少量神经细胞呈 NGF 免疫反应阳性表达, 缺血周边区神经元 NGF 表达呈中等阳性免疫反应。(图 1~ 5)。

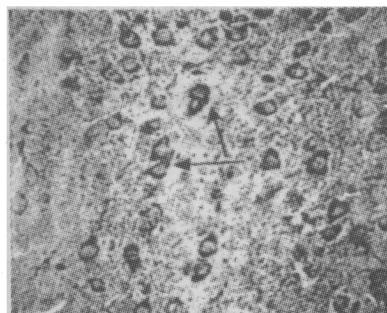


图 1 假手术组皮质额叶 NGF 表达
DAB 染色 × 400
↑ 示 NGF 阳性反应神经元(下同)

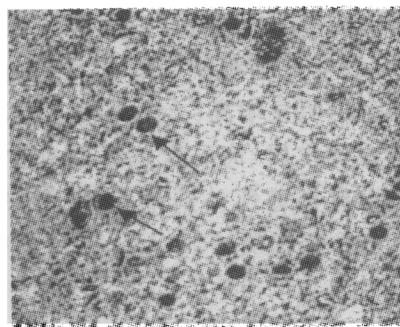


图 2 模型组皮质额叶 NGF 表达
DAB 染色 × 400

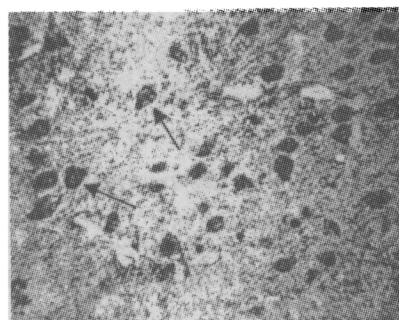


图 3 侯氏黑散大剂量组皮质额叶
DAB 染色 × 400

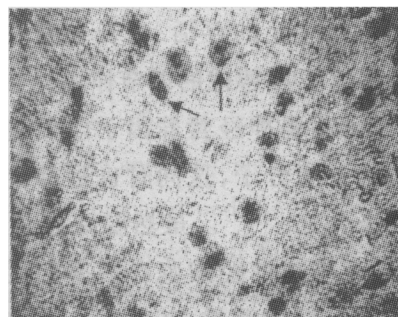


图 4 侯氏黑散中剂量组皮质额叶 NGF 表达
DAB 染色 × 400



图 5 侯氏黑散小剂量组皮质额叶 NGF 表达
DAB 染色 × 400

侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠缺血脑组织 NGF 表达影响的图像分析结果显示(见表 2): 模型组缺血脑组织皮质、海马区 NGF 的阳性细胞数比假手术组明显减少 ($P < 0.05$), 面积光密度值明显降低 (P

< 0.05); 侯氏黑散大、中剂量治疗组和模型组对比缺血侧皮质、海马区脑组织 NGF 阳性细胞数及面积光密度比模型组明显增高 ($P < 0.05$), 侯氏黑散小剂量治疗组缺血侧皮质、海马区脑组织 NGF 阳性细胞数和模型组没有显著性差别, 但面积光密度比模型组明显增高 ($P < 0.05$)。

表 2 侯氏黑散对局灶性脑缺血大鼠 NGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	阳性细胞数 (个)	面积光密度 (OD)
假手术组	—	73.50 ± 10.01	13.19 ± 1.72
模型组	—	60.60 ± 10.37 ²⁾	11.21 ± 1.14 ²⁾
侯氏黑散大剂量组	46.4	77.30 ± 10.37 ¹⁾	16.22 ± 2.69 ¹⁾
侯氏黑散中剂量组	23.2	72.40 ± 6.16 ¹⁾	15.18 ± 2.42 ¹⁾
侯氏黑散小剂量组	11.6	65.88 ± 8.00	14.01 ± 2.35 ¹⁾

与模型组比较: ¹⁾ $P < 0.05$; 与假手术组比较: ²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

神经生长因子是神经系统中最重要生物活性物质之一。对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持具有不可替代的调节作用。在神经损伤后, 损伤神经元需要神经营养因子以促进表达正常神经活动所需要的分子, 这同时也是神经元存活和再生的前提条件之一^[5-7]。虽然脑缺血损伤后, NGF 表达增加, 具有提高神经细胞存活率和促进神经细胞伸长的活性。但内源性 NGF 的表达增加时程很短, 表达水平有限, 加之损伤部位大量的神经元相互竞争 NGF, 因此难以对缺血脑区受损神经元具有全面而持久的保护作用。临床研究也表明, 重度脑卒中患者在起病早期, 血中 NGF 就明显升高, 但持续时间短; 而轻度或中度脑卒中患者升高的持续时间长; 病情恶化的患者, 在起病 3 天时血中 NGF 明显升高, 但是在 1 周后, 很快就降到正常水平, 提示急性脑血管病患者的预后可能与血中 NGF 的变化有一定关系^[8]。因此在脑缺血损伤早期应用各种治疗手段提高脑内 NGF 的表达水平, 对神经再生和功能的恢复具有重大的意义。

本实验室在对侯氏黑散阻抑脑缺血损伤的机理

研究中发现大鼠脑缺血损伤 48h 后, 缺血区脑组织 NGF 阳性细胞没有典型神经元的形态结构, NGF 免疫反应呈弱阳性表达, 缺血周边区神经元表达较强, 采用侯氏黑散干预后, 侯氏黑散大、中剂量治疗组和模型组对比缺血侧皮质、海马区脑组织 NGF 阳性细胞数及面积光密度比模型组明显增高, 侯氏黑散小剂量治疗组缺血侧皮质、海马区脑组织 NGF 阳性细胞数和模型组没有显著性差别, 但面积光密度比模型组明显增高, 提示侯氏黑散作为治疗脑卒中的有效名方, 能够减轻脑缺血后神经系统的损伤, 其作用环节之一为上调内源性 NGF 的表达, 这对缺血性中风后的脑功能恢复具有积极意义。

[参考文献]

- [1] Legos JJ, Barone FC. Update on pharmacological strategies for stroke prevention acute intervention and regeneration[J]. *Curr Opin Investing Drugs*, 2003, 4(7): 847-858.
- [2] 王忠诚. 神经干细胞在中枢神经系统损伤修复中的应用前景[J]. *中国康复理论与实践*, 2004, 10(1): 1.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery Occlusion Without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84.
- [4] Springer JE. Nerve growth factors in the central nervous system[J]. *Expneurol*, 1998, 102(2): 354-365.
- [5] Aitar AC, Armanini M, Dugich-Djordjevic M. Recovery of cholinergic phenotype in the injured rat neostriatum: role for endogenous nerve growth factor[J]. *Neurochem*, 1992, 59: 2167-2177.
- [6] Anderson KJ, Dam D, Lee S, *et al.* Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo[J]. *Nature*, 1988, 322: 360-361.
- [7] Alderson RF, Alterman AL, Barade YA, *et al.* Brain derived neurotrophic factor increase survival and differentiated function of rat septal cholinergic neurons in culture[J]. *Neuron*, 1990, 297-306.
- [8] 黄坚, 邵福源, 吴萍嘉, 等. 急性脑卒中患者血清神经生长因子含量的变化及其临床意义[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2004, 6(2): 20.