

通瘀开窍与滋阴潜阳法对局灶性脑缺血再灌注后神经上皮干细胞巢蛋白表达的影响

杜少辉¹ 杨卓欣¹ 陈东风² 张进³ 黎晖² 张宜² 魏志军¹ 于海波¹

摘要 目的:探讨通瘀开窍与滋阴潜阳对局灶性脑缺血再灌注后神经上皮干细胞巢蛋白(Nestin)表达的不同影响。方法:采用大脑中动脉线栓法造成局灶性脑缺血再灌注模型,应用免疫组织化学技术检测 Nestin 的表达,观察通瘀开窍方牛珀至宝微丸与滋阴潜阳药龟甲对脑缺血后 Nestin 的不同影响。结果:脑缺血再灌注后,通瘀开窍方与滋阴潜阳药缺血侧室管膜、室管膜下区、皮层和纹状体 Nestin 阳性细胞数显著多于缺血对照组($P < 0.05$),通瘀开窍方药对皮层和纹状体影响明显($P < 0.05$),而滋阴潜阳药对室管膜、室管膜下区影响明显($P < 0.05$),两组方药神经病学评分明显低于缺血对照组($P < 0.05$),而以通瘀开窍方起效较早。结论:通瘀开窍方药治疗缺血性脑血管病的机理之一主要与其对脑缺血再灌注后皮层和纹状体 Nestin 的表达相关($P < 0.05$),而滋阴潜阳药治疗缺血性脑血管病的机理之一主要与其对脑缺血再灌注后室管膜、室管膜下区影响 Nestin 的表达相关。

关键词 脑缺血/中医药疗法 再灌注 @Nestin 蛋白

既往认为神经元于出生后不久其发育即停止,然而,近年研究发现成年个体海马和室管膜下层细胞具有分裂产生新生神经元的能力,并分离了能不断分裂增殖且具有多种分化潜能的细胞群,即神经干细胞(neural stem cells, NSCs)^[1-4],这为中枢神经系统功能重建和神经再生带来新希望。但是,脑组织自身产生新的神经干细胞的比率极低,因此,诱导体内神经干细胞的增殖作用具有重要临床意义,而通瘀开窍方牛珀至宝微丸与滋阴潜阳药龟甲为临床治疗脑梗塞常用方药,其机理是否与诱导脑缺血后神经干细胞增殖相关?两者又有何不同?为此,我们进行了以下研究。

1 材料和方法

1.1 药品制备:牛珀至宝微丸(1g/支)由江西中医院热病研究室提供,批号 9901,主要药物为水牛角、玳瑁、麝香、琥珀、血竭、藏红花、大黄、石菖蒲等,将微丸溶于水,制备成含生药量 1mg/ml 的口服液。龟甲为龟科动物乌龟的腹甲(*Chinemys reevesii*),水煎龟甲约 1

小时制备成含生药量 1mg/ml 的口服液。根据成人日服药量折算成大鼠灌胃剂量,牛珀至宝微丸组为 5mg/100g,龟甲为 7.5mg/100g。

1.2 动物分组:纯种 SD 大鼠 180 只,清洁二级,雌雄各半,月龄 4~7 个月,体重 250~300g,由广州中医药大学实验动物中心提供。将 180 只大鼠随机分为对照组、通瘀开窍方牛珀至宝微丸组(简称为通瘀组)与滋阴潜阳龟甲组(简称滋阴组)。中药治疗组于局灶性脑缺血后每天给予含药中药口服液灌胃,对照组则给予等体积蒸馏水灌胃,每日 1 次,给药时间分别为 1 天、3 天、7 天、14 天、21 天。

1.3 大脑中动脉线栓法造成局灶性脑缺血模型(MCAO):参照文献[3]取大鼠,用 10%水合氯醛腹腔麻醉(35mg/100g 体重)仰卧手术台上,颈正中切开,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),电热烧灼器烧断 ECA 的分支,结扎并游离 ECA 主干一段,沿 ICA 向下分离翼腭动脉,穿线沿起点结扎。在 ECA 剪一小口注入 0.03ml 浓度为 2.4×10^6 U/L 肝素钠溶液,将制备好的日本制尼龙线(直径 0.205mm)插入 ECA,经 CCA 分叉处通过 ICA 入颅至大脑前动脉(ACA),尼龙线插入深度平均为 18.5 ± 0.5 mm,以阻断该侧大脑中动脉的血流,持续时间为 15min。此时大鼠左眼虹膜颜色变浅,出现右侧 Horner's 综合征,右侧眼裂变小,瞳孔缩小出现左侧偏瘫,以左上肢为明显,提尾悬拉后出现左转圈、跌倒。再灌注时外拉尼龙线使其球端回至 ECA 内即可恢复大脑中动脉(MCA)血供。

1.4 神经病学评分:参考 Zea Longa 评定神经功能缺损程度的 5 级 4 分法标准^[4]。0 分:无神经功能缺损症状;1 分:轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2 分:中度局灶性神经功能缺损,向左侧转圈;3 分:重度局灶性神经功能缺损,向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识水平下降。

1.5 神经上皮干细胞巢蛋白(Nestin)免疫组化反应(SABC 法)

1.5.1 切片制备:参照文献[5],分别于第 6 小时、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天宰杀动物,大鼠在戊巴

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271677;39970914)

1 深圳市中医院内科,广东省深圳市福田区福华路 1 号(518033)

2 广州中医药大学解剖教研室

3 深圳市沙河医院

收稿日期:2003-07-07;修回日期:2003-09-08

表 1 各组大鼠脑缺血后神经病学评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 2 小时	第 1 天	第 3 天	第 7 天
对照组	60	2.917±0.669	2.583±0.515	2.000±0.603	1.917±0.512
通瘀组	60	2.883±0.776	1.270±0.621*	1.280±0.821	0.790±0.442*
滋阴组	60	2.833±0.718	2.250±0.622	1.250±0.621	0.750±0.452*

* 与对照组比较, $P < 0.05$ 表 2 各组大鼠脑缺血后室管膜下区、皮层及纹状体 Nestin 阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	时间	Nestin 阳性细胞数		
			室管膜下区	皮质	纹状体
对照组	60	第 6 小时	6.4±0.8	5.4±0.8	7.2±1.0
		第 3 天	7.6±1.1	5.8±0.7	7.8±0.8
		第 7 天	9.0±1.2	11.1±1.3	13.7±1.2
		第 14 天	5.1±0.8	7.8±1.3	8.6±1.3
通瘀组	60	第 21 天	3.1±0.8	4.1±0.8	5.1±0.9
		第 6 小时	6.2±0.7	5.2±0.9	6.5±0.9
		第 3 天	7.7±1.2	6.1±1.8	7.1±1.0
		第 7 天	18.0±1.3*△	33.3±1.6*△	40.8±1.5*△
滋阴组	60	第 14 天	16.5±1.6*△	30.1±1.6*△	37.6±1.4*△
		第 21 天	14.5±1.3*△	20.6±1.3*△	31.0±1.6*△
		第 6 小时	6.1±0.5	5.1±0.7	6.4±0.8
		第 3 天	7.3±1.3	6.0±1.2	6.9±0.9
		第 7 天	19.0±1.0*	24.2±1.4*	32.4±1.7*
		第 14 天	23.5±1.8*	22.1±1.5*	26.6±1.1*
		第 21 天	19.5±1.2*	16.7±1.2*	22.1±1.3*

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与滋阴组比较, △ $P < 0.05$

比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉下开胸,经升主动脉插管,先用生理盐水 150ml 冲去血液,继而灌注含 4%多聚甲醛的 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(PB, pH7.4)350ml,注毕立即取脑置于相同的新鲜灌注液后固定 4 小时,洗去表面的固定液,再置于 20%蔗糖溶液中至组织块沉底。冰冻连续切片,片厚 25 μ m,隔 4 片取 1 片进行免疫组化反应。

1.5.2 Nestin 免疫组化反应(SABC 法):(1)含新鲜 0.5% H_2O_2 的纯甲醇中 30min 灭活内源性酶,双蒸水洗;(2)切片入 0.1%Triton 溶液中 30min;(3)滴加正常山羊血清 60min,不洗,甩去多余液体;(4)滴加兔抗鼠 Nestin 一抗(1:2000, Sigma),室温下(25℃)孵育 1 小时,再 4℃下过夜, PBS 洗;(5)滴加生物素化山羊抗兔 IgG(博士德二抗试剂盒),室温下 60min, PBS 洗;(6)滴加试剂 SABC,室温 60min, PBS 洗 15min×4 次;(7)DAB 显色(博士德),室温下 20min,双蒸水多次洗涤;(8)脱水、透明,中性树胶封片。上述未提及的洗涤时间均为 10min×3 次。

1.5.3 免疫组化染色对照:同一组片中,分别用正常山羊血清和 PBS 代替 Nestin 一抗作孵育,其余步骤同上,用以检查 Nestin 免疫反应的特异性。

1.6 病理组织观察:取免疫组化反应阳性切片的相邻

切片 HE 染色进行病理观察。

1.7 图像分析:切片在光镜的统一放大倍数下,将图像输入图像分析系统,设置相等的检测窗口面积平均阳性细胞数。随机选 Nestin 阳性细胞,背景随机选 10 个视野,所得数据输入计算机用 SPSS 软件进行统计学处理,均数间两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠脑缺血再灌注后神经病学评分比较:由表 1 可见,脑缺血后 2h 各组神经病学评分最高,各组间比较,差异无显著性,说明各组脑缺血状况基本一致。但脑缺血再灌注后 7d,通瘀组与滋阴组神经病学评分降低明显,与同时间对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$),而通瘀组降低神经病学评分较滋阴组为早,于 1d 即有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 病理组织 HE 染色观察:对照组缺血中心区 7d 片可见大量神经元细胞死亡,出现很多细胞死亡留下的空泡,部分神经元核固缩深染,核仁异染染色体消失,并见胶质细胞广泛增生;而通瘀组与滋阴组则损伤较轻,尚能观察到形态结构完整的神经元细胞。

2.3 室管膜、室管膜下区 Nestin 在各组的表达:表 2 示,脑缺血再灌注后 6h 缺血侧室管膜、室管膜下区中出现 Nestin 阳性细胞表达,通瘀组及滋阴组 Nestin 阳

性细胞数与对照组相比差异无显著性。缺血再灌注后 7d, 对照组 Nestin 表达最强, 14d 后明显降低。通瘀组及滋阴组 Nestin 阳性细胞数开始多于对照组, 一直持续至 21d; 有向外上方迁移进入缺血区的迹象, 滋阴组缺血再灌注后室管膜、室管膜下区 Nestin 比通瘀组表达还强。

2.4 皮质 Nestin 在各组的表达: 表 2 示, 脑缺血再灌注后 7d, 各组 Nestin 阳性细胞主要见于缺血区扣带皮质和额叶皮质。对照组缺血再灌注后皮质 Nestin 阳性反应 7d 达到高峰, 14d 时 Nestin 反应减弱或消失, 胞浆着色浅淡。通瘀组与滋阴组在缺血再灌注后 7d 开始至 21d 后, 同一部位皮质 Nestin 阳性数明显多于对照组, 组间比较, 差异有显著性; 而通瘀组 Nestin 阳性免疫反应明显强于滋阴组, 差异有显著性。

2.5 纹状体 Nestin 在各组的表达: 表 2 示, 脑缺血再灌注后 6h, 纹状体 Nestin 在各组中出现表达, 但差异无显著性。脑缺血再灌注后 7d, 对照组纹状体 Nestin 阳性反应较强, 14d 后 Nestin 反应减弱, 胞浆着色浅淡。而同时段, 同一部位通瘀组与滋阴组 Nestin 阳性反应强, 阳性细胞数明显多于对照组, 差异有显著性, 细胞形态呈椭圆形为主, 胞浆着色深而均匀, 突起短亦着色。而通瘀组 Nestin 阳性免疫反应明显强于滋阴组, 差异有显著性。

3 讨论

局灶性脑缺血再灌注与 Nestin 表达的关系: Nestin 是一种中间丝蛋白, 只在多潜能的神外胚层细胞表达, 随着神经上皮的分化成熟逐渐消失^[6,7], 因此常作为神经干细胞的标记。但在某些因素下在少数仍保持神经发生功能的部位仍有表达, 主要是大脑海马齿状回。室管膜是由神经上皮发育、演变而来的一层上皮性结构, 它被覆于脑室和脊髓中央管的腔面。因为神经上皮和早期室管膜下层中存在着大量未分化细胞具有极大的分化潜能, 神经上皮细胞、胚胎早期的室管膜层细胞对于室管膜的形成, 中枢及周围神经组织的发生起着至关重要的作用^[8,9]。

而缺血周围区出现的 Nestin 阳性细胞中可能有两类神经干细胞。第一类是能分化成胶质细胞的神经干细胞, 其来源可能主要是反应性胶质细胞; 环绕缺血周围, 它们的纤维交织成网, 可以减少缺血区的进一步扩大, 有利于缺血区的修复。第二类是能分化成新的神经元的神干细胞, 其可能来自侧脑室的室管膜下区和海马齿状回的神干细胞。此类神经干细胞从侧脑室的室外管膜下区迁移到缺血区, 有可能分化为胶质细胞和神经元, 代替缺血损伤神经元, 因此, 它们是成

体脑中神经细胞新生基础, 在缺血损伤后修复中意义非常重要^[10,11]。

成体神经干细胞正常情况下处于静息状态, 但遇到与胚胎时期相同因子的影响或异常情况时也会被诱导分裂、分化, 它可被碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、脑机械性损伤及脑缺血等诱发分裂^[7,12~15]。脑缺血后, 机体通过诱导内源性神经干细胞增多而对缺血损伤产生代偿性适应性反应; 但也有人认为, 脑缺血损伤可能刺激脑内成熟的间质细胞或星形胶质细胞返回到神经干细胞, 再重新分化成受损最严重的神经元细胞, 从而可能发挥修复和重排神经网络的作用。本实验观察到脑缺血再灌注后 Nestin 的表达随时间的延长而逐渐降低, 第 7d 达高峰, 第 21d 明显降低。然而脑缺血损伤后调动内源性神经干细胞的数量不足, 因此, 用中药增强内源性神经干细胞的活化成为我们的研究目标。

通瘀开窍药与滋阴潜阳药对局灶性脑缺血再灌注后 Nestin 表达的影响: 脑缺血中医称之为中风, 阴虚风动、瘀血阻滞为中风的根本病机, 因此, 滋阴潜阳、通瘀开窍为其治疗的基本大法。本研究发现, 这两种治疗方法不但使脑缺血再灌注后神经干细胞的 Nestin 的表达数量增多, 而且还使其表达时间延长。牛珀至宝微丸是据清代何廉臣《重订广温热论》载犀珀至宝丹化裁, 具有通瘀开窍之功, 何氏称其“此丹大剂通瘀直达心窍, 又能上清脑络, 下降浊阴, 专治一切时邪内陷血分, 瘀塞心房, 不省人事”。本实验发现, 用牛珀至宝微丸治疗的脑缺血再灌注组, 大鼠的神经损伤评分降低较快, 这与方中大量通瘀开窍药的作用有关; 而在缺血周围区的 Nestin 阳性细胞表达增多比室管膜及室管膜下区明显, 差异有显著性, 这是因为通瘀开窍药不但能较快地改善病侧的缺血缺氧^[16,17], 而且具有抗氧化功能, 而抗氧化剂能诱导神经干细胞的生长。

龟甲甘、咸、寒, 《本草从新》谓其“通心入肾”, 有滋阴潜阳、养血补心之功, 《临证指南医案》指明中风之因为: “精血衰耗, 水不涵木, ……肝阳偏亢, 内风时起”^[18]。叶天士、吴鞠通等治疗中风及热病后神志异常皆多用龟甲, 而张锡纯之镇肝熄风汤中龟甲为主药^[19]。运用龟甲后, 在缺血侧室管膜及室管膜下区 Nestin 阳性细胞表达增多明显, 这与中医“肾主骨生髓、髓生海、海通脑”的认识有一致之处。《灵枢·海论》有“脑为髓之海”之说, 《素问·宣明五气篇》谓“肾主骨”, 《素问·阴阳应象大论》明确指出: “肾生骨髓”, 并有“肾者其充在骨”及“肾不实则髓不能满”等论述, 依据中医所指的“肾”概念, 补肾药能促进髓海相生, 也

是其促进神经干细胞再生的机理。从发育生物学角度看,古代龟因其长寿而被列为四灵之一^[20],其长寿的原因可能与干细胞增生修复有联系;龟甲是从外胚层发育而来,在其沿 A-P 轴及 P-V 轴分化过程中,可能存有促进神经干细胞增殖的相关成分。

参考文献

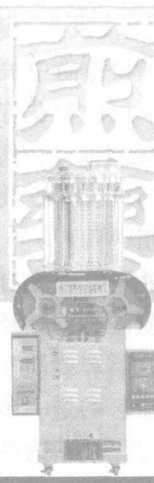
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287(5457): 1433-1438.
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997; 276(5309): 66-71.
- Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1995; 26(9): 1655-1657.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20(1): 84-91.
- 汪谦. 现代医学实验方法. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 43-45.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60(4): 585-595.
- Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*. 1999; 838(1-2): 1-10.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, et al. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 1999; 286(5439): 548-552.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*. 1999; 19(11): 4462-4471.
- Takagi Y, Nozai K, Takahashi J, et al. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res*. 1999; 831(1-2): 283-287.
- Zhang RL, Zhang LG, Zhang L, et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2001; 105(1): 33-41.
- Hauke C, Ackermann I, Korr H. Cell proliferation in the subependymal layer of the adult mouse in vivo and vitro. *Cell Prolif*. 1995; 8(11): 595-607.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, et al. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *Neurosci*. 1996; 16(8): 2649-2658.
- 阮奕文, 王传恩, 童健尔, 等. 大脑皮质机械性损伤诱导 Nestin 表达和神经前体细胞增殖. *中山医科大学学报*. 1999; 20(3): 171-173.
- Graig CG, Tropepe V, Morshead CM, et al. In vivo growth factor expression of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci*. 1996; 16(8): 2649-2658.
- 杜少辉, 黄洁, 陈东风, 等. 牛珀至宝微丸对急性脑梗塞 NO 影响的临床与实验研究. *中国中西医结合急救杂志*. 2002; 9(3): 129-131.
- 廖欣, 杜少辉, 魏志军, 等. 牛珀至宝微丸对局灶性脑缺血后三种亚型 NOS 的作用. *中国中西医结合杂志*. 2002; 22(10): 767-769.
- 临证指南医案. 北京: 华夏出版社, 1995: 674-675.
- 张锡纯. 医学衷中参西录. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1985: 288-295.
- 辞源编辑组. 辞源. 北京: 商务印书馆, 1979: 3617.

多快好省 煎好药

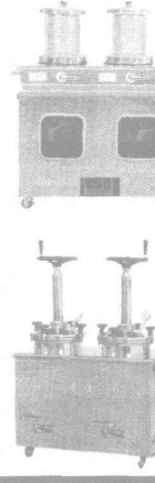
6大系列
30个品种
30个办事处
100位维修工程师
8,000家医院药店正在使用
30,000台东华煎药机谱写了
东华人10年的奋斗历程



东华煎药包装设备









东华原医疗
DONGHUAYUAN MEDICAL

北京东华原医疗设备有限责任公司
电话: 010-89718013
邮编: 102200

地址: 北京市中关村昌平科技园区振超路1号
传真: 010-89718021
网址: www.donghuagroup.com

垂询热线:
800-810-0359