

方药研究

复健片对缺血性卒中后遗症模型大鼠脑组织
GFAP、GAP-43表达的影响刘伟¹ 周永红² 付先军³ 王中琳⁴ 胡怀强¹ 王新陆⁵

摘要 目的:探讨复健片对缺血性卒中后遗症模型大鼠星形胶质细胞活性及其神经轴突再生的作用。方法:以大脑中动脉阻塞(MCAO)大鼠模型为实验对象,利用免疫组织化学方法,分别以大鼠脑组织胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经生长相关蛋白质(GAP-43)为指标,观察复健片对星形胶质细胞活性、轴突生长的影响。结果:复健片可增强GFAP、GAP-43的表达,并且GFAP与GAP-43表达呈显著正相关。结论:复健片可促进缺血性卒中后神经轴突的再生,诱导神经功能重塑,这与该药能够改善星形胶质细胞活性有密切关系。

主题词 中风后遗症/中医药疗法 神经胶质原纤维酸性蛋白质/代谢 @ 复健片

Effects of Fujian Tablets on Expression of GFAP and GAP-43 in Brain Tissue of Ischemic Stroke Sequela Model Rats

Liu Wei¹, Zhou Yonghong², Fu Xianjun³, et al.

(1. Shandong University of TCM, Jinan 250014; 2. Medical College of Qingdao University; 3. Chinese University of Oceanography)

Objective: To explore effects of Fujian Tablets on activity of astrocytes and axonal regeneration in the ischemic stroke sequela model rat. **Methods:** The ischemic stroke sequela model rat was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Glial fibrillary acid protein (GFAP) and growth-associated protein-43 (GAP-43) were determined with immunohistochemical method and were used to evaluate the effects of Fujian Tablets on the activity of astrocytes and axonal regeneration. **Results:** Fujian Tablets increased expressions of both GFAP and GAP-43 in the brain of MCAO rat, and there was significantly positive correlation between GFAP and GAP-43 expressions. **Conclusion:** Fujian Tablets can promote axonal regeneration and induce remodeling of nervous functions in the ischemic stroke sequela model rat, which are related with improving action of Fujian Tablets on activity of astrocytes.

Key Words Stroke sequela/TCM therapy; Glial fibrillary acid protein/metabolism; @Fujian Tablets

复健片是根据王新陆教授临床经验筛选的中药复方制剂,可明显促进缺血性卒中的康复^[1]。前期研究发现,该药可促进卒中后模型大鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子、血小板源生长因子等神经生长因子的表达,改善局部微环境,从而诱导脑损伤后神经功能重塑^[2]。研究发现,星形胶质细胞在缺血性卒中的神经康复中具有重要意义,可以促进轴突的再生和突触的形成,而中药对星形胶质细胞的干预研究尚少。因此,我们观察了复健片对缺血性卒中后遗症模型大鼠脑组织胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经生长相关蛋白质(GAP-43)表达的影响,并探讨复健片对星形细胞活性

的调节作用及其与轴突再生的关系,以进一步揭示复健片促进缺血性卒中神经功能恢复的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组:雄性Wistar大鼠40只,12周龄,体重250~300g,由山东大学实验动物中心提供(动物合格证号:鲁动质字20021024)。动物按照1:2:2的比例随机分为假手术组(8只)、缺血性卒中后遗症模型组(16只,以下简称模型组)和药物组(16只)。

1.2 模型制备:按Tamura^[3]的方法稍加改进行右侧近端大脑中动脉电凝术制成大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,麻醉醒后符合以下条件为MCAO模型复制成功,纳入试验,进行分组,余者弃之。(1)左侧肢体疼痛刺激收缩现象消失;(2)向左侧倾倒或转圈;(3)提尾时左上肢不能向前伸直。前期研究界定MCAO术后5周为缺血性卒中后遗症期大鼠模型^[4]。假手术组大鼠行相同的开颅术而不凝闭大脑中动脉。

1.3 给药方法:造模成功后,3组同时进行灌胃给药。药物组按9g生药/kg体重给予复健片(山东中医药大

基金项目:国家自然科学基金(30171165)

1 山东中医药大学2003级博士研究生、2002级硕士研究生,济南市经十路53号(250014)

2 青岛大学医学院

3 中国海洋大学

4 山东中医药大学附属医院

5 山东中医药大学

收稿日期:2005-05-30;修回日期:2005-07-25

学药剂教研室提供,批号:20030115,由制何首乌、决明子、槲寄生、海马、淫羊藿等组成,每片含生药 2.25g)。

1.4 脑组织取材:假手术组大鼠于灌胃 1 周后处死,其余两组大鼠分别于灌胃 1 周、2 周末各处死 8 只。取材时,每组取大鼠脑组织,甲醛固定,石蜡包埋,超薄切片,ABC 法染色,进行 GFAP 和 GAP-43 的测定。

1.5 指标测定:采用免疫组化法。石蜡切片常规脱蜡复水;30% H_2O_2 1 份+蒸馏水 10 份混合,室温 5~10 分钟灭活内源性酶,蒸馏水洗 10 分钟 $\times$ 3 次;滴加复合消化液 10 分钟,蒸馏水洗 3 次;滴加正常山羊血清封闭液 20 分钟,不洗,甩去多余液体;按检测要求分别滴加不同一抗(GFAP、GAP-43 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为:021008001、021029005),25℃ 孵育 2 小时,再 4℃ 过夜,PBS 洗 2 分钟 $\times$ 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温下 20 分钟,PBS 洗 2 分钟 $\times$ 3 次;滴加试剂 SABC 复合物,室温 20 分钟,PBS 洗 5 分钟 $\times$ 4 次;DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。取 1ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片;室温显色,镜下控制反应时间,一般 10 分钟左右;蒸馏水多次洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片,显微镜观察。免疫组织化学染色对照:用正常山羊血清和 PBS 代替一抗作孵育,其余步骤同上,用以检查免疫反应的特异性。

1.6 图像分析方法:全部测量均在相同光学条件下完成。采用 Leica QwinV3 图像分析系统对免疫组化切片进行图像分析,测定染色平均灰度。

1.7 统计学方法:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SAS 8.1 统计软件进行统计学分析。同指标组间比较采用单因素方差分析,Newman-Keuls 检验。相关性采用相关分析。

2 结果

2.1 复健片对模型大鼠 GFAP、GAP-43 表达的影响:附表示,模型组与假手术组之间 GFAP 表达差异无显著性;而药物组给药 1 周后,GFAP 的表达较同期模

型组与假手术组增强,差异有显著性($P < 0.01$);药物组给药 2 周后,GFAP 的表达较给药 1 周时、同期模型组与假手术组均有增强,差异有显著性($P < 0.01$)。

假手术组 GAP-43 在大脑皮质及部分脑区有表达,且呈对称性分布,各时点差异无显著性。模型组在梗死灶中心区 GAP-43 未见表达,梗死灶周围区 GAP-43 阳性信号密度值与假手术组比较差异无显著性。药物组治疗 1 周时同模型组比较 GAP-43 表达仍不显著,第 2 周梗死灶周围区 GAP-43 表达明显增高,与其他两组比较差异均有显著性($P < 0.01$)。

2.2 GFAP 和 GAP-43 表达的相关性:我们选取药物组灌胃 2 周后的模型大鼠,进行 GFAP 和 GAP-43 表达相关性分析。结果表明,GFAP 与 GAP-43 在大鼠脑组织中的表达具有相关性,相关系数 γ 为 0.75, $P = 0.0319$,GAP-43 表达随 GFAP 表达的上调而增强。

3 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统内数量比重最大的细胞群体,可以刺激中枢神经损伤后神经再生,促进新生突触形成。GFAP 特异性地存在于星形胶质细胞中,且在活性星形胶质细胞中 GFAP 的表达相对更多。广泛的生理生化损伤和严重的病理生理损害可刺激成熟星形细胞合成 GFAP,这是星形细胞对脑内严重损害的一种特有反应,可持续存在于任何受损部位。实验表明,GFAP 的表达与星形胶质细胞的活性呈正比^[5]。

GAP-43 是近年来分离鉴定的一种钙调蛋白结合胞膜磷酸蛋白。在神经元的发育和再生过程中,GAP-43 伴随着轴突的生长大量合成,是轴突生长的一种标记物。其表达产物主要位于轴突生长锥质膜面。Stroemer 等^[6]发现大鼠脑缺血损伤区周围的皮质中 GAP-43 表达上调,且存在一定的时空分布特点,其表达与运动功能的恢复时间存在相关性。本研究结果显示,GAP-43 表达的增强与 GFAP 表达的上调呈正相关性,提示星形细胞活性的增强可促进轴突的再生。

中医学认为,中风病急性期过后,标实渐去,本虚之象渐现,一因中风日久,风火之邪劫伤阴液而使肝肾阴亏更甚;二是中风病治疗过程中各种祛风化痰活血药多辛香温燥,易于耗伤阴液,致使肝肾阴亏更为明显。肝肾阴亏又使诸症迁延难愈,成为痼疾顽症。故宜采用滋补肝肾法治疗缺血性卒中后遗症。复健片正是根据此法而设,由何首乌、淫羊藿、海马等组成,具有调补肝肾之效,补肾以填精生髓,补肝以养春生之木气,助肾生髓,肝肾并补,意在加强生髓以充脑。实验发现,复健片可在用药两周后明显增强 MCAO 大鼠大脑额叶皮质星形细胞 GFAP 的表达,说明复健片可增强缺

附表 复健片对模型大鼠 GFAP、GAP-43 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	GFAP 平均灰度	GAP-43 平均灰度
假手术组	灌胃后 1 周	8	109.40 $\pm$ 18.34	15.5 $\pm$ 1.2
模型组	灌胃后 1 周	8	107.78 $\pm$ 14.31	15.7 $\pm$ 1.4
	灌胃后 2 周	8	122.07 $\pm$ 23.40	15.3 $\pm$ 1.3
药物组	灌胃后 1 周	8	134.85 $\pm$ 15.12 $\blacktriangle$	16.5 $\pm$ 1.7
	灌胃后 2 周	8	161.79 $\pm$ 20.51 $\ast\blacktriangle$	23.4 $\pm$ 1.3 $\ast\blacktriangle$

与本组前期比较,4 周 $20 \leq P < 0.01$;与假手术组比较,1 周 $10 \leq P < 0.01$ 与同期模型组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

血性卒中后遗症模型大鼠脑组织中的星形胶质细胞活性,充分调动其在卒中后期对神经系统损伤的各种修复机能。与此同时,GAP-43 的表达亦明显增强,二者呈明显正相关,提示复健片促进缺血性卒中后遗症模型大鼠神经轴突再生,诱导神经功能重塑与改善星形胶质细胞的活性有关。

参考文献

- 1 周永红.复健片治疗缺血性卒中后遗症 30 例临床研究.中医杂志,2002,43(5):355~356.
- 2 周永红.复健片对 MCAO 大鼠脑内 bFGF、VEGF、PDGF 表达的影响.中医药学刊,2003,21(1):70~72.

- 3 Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1(1): 53~60.
- 4 王新陆, 王中琳. 缺血性中风后遗症模型的建立与评价. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 6(3): 14~18.
- 5 Petito CK, Morgello S, Felix JC, et al. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rats brain. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 10(6): 850~859.
- 6 Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. Stroke, 1995, 26(11): 2135~2144.

益元康治疗慢性肾小球肾炎 104 例

刘艳春* 贾小翠* 尚宇翔* 王 维*

慢性肾小球肾炎简称慢性肾炎,其特征是长期持续性尿异常,如蛋白尿和(或)血尿;可有高血压、水肿和缓慢进行性肾功能损害。其发病率居肾脏疾病之首位,严重危害人类健康。对该病的治疗目前尚无特异有效之方法。我们根据长期临床经验,自拟了中药方剂益元康,根据不同证型加减治疗慢性肾小球肾炎 104 例,并与用肾炎四味片治疗的 38 例做临床对照观察,收到较好疗效,现报道如下。

1 临床资料

两组均符合陈灏珠《实用内科学》第 11 版(人民卫生出版社,2002 年)中慢性肾小球肾炎诊断标准,排除继发性及遗传性肾小球疾病。选择 104 例门诊及住院病例为治疗组,另选 38 例用肾炎四味片治疗病例为对照组。治疗组 104 例中男 71 例,女 33 例;对照组 38 例中男 28 例,女 10 例。治疗组年龄 10~65 岁,平均(35±3.61)岁;对照组年龄 12~66 岁,平均(38±3.27)岁。两组病程均为 6 个月~6 年。两组临床资料比较差异无显著性($P>0.05$)。

2 治疗方法

两组基本治疗相同,如:限制食物中蛋白质及磷的摄入量;对伴有高血压患者,控制血压用钙离子拮抗剂、ACEI 或 β 受体阻滞剂,潘生丁抗凝;病程中出现上呼吸道感染者,以抗生素抗感染,避免加重肾脏损害因素。治疗组给予益元康口服,对照组给予一般对症治疗,两组均治疗 4 周为 1 个疗程。益元康组方:黄芪、丹参、白花蛇舌草、白术、补骨脂、茯苓等 10 余味中药。由我院中药制剂室将生药煎煮浓缩、提取有效成分,并将茯苓、芡实研粉作为赋形剂加入浓缩膏中,使浓缩液成型后烘干,研粉装制成胶囊,每粒含生药 1.5g,每次 3 粒,每日 3 次,口服,4 周为 1 个疗程,1 个疗程后评定疗效。

3 治疗结果

3.1 疗效判断标准:根据国家卫生部 1993 年制定的标准。(1)

完全缓解:临床症状体征消失,尿红细胞持续消失,尿蛋白持续阴性;(2)基本缓解:症状与体征基本消失,蛋白尿持续减少 $>50\%$,尿红细胞正常;(3)有效:症状和体征明显好转,蛋白尿减少 $>25\%$ 而 $\leq 50\%$,尿红细胞减少 $\geq 25\%$;(4)无效:临床表现与实验室检查无改善。

3.2 两组疗效比较:治疗组 104 例,缓解 16 例,基本缓解 34 例,有效 38 例,无效 16 例;对照组 38 例,完全缓解 4 例,基本缓解 10 例,有效 6 例,无效 18 例,总有效率为 52.63%。治疗组总有效率显著高于对照组,两组比较差异有显著性($P<0.05$)。

3.3 两组治疗前后各项指标比较:治疗后自觉症状、阳性体征较治疗前好转,尿红细胞计数、尿蛋白均较治疗前显著下降。对照组治疗前后症状、阳性体征也都有所改善,但对消除蛋白尿及红细胞尿,治疗组优于对照组,两组比较差异具有显著性($P<0.05$)。

4 讨论

中医学认为,慢性肾炎属于水肿、尿浊、虚损、腰痛等病证范畴。《素问·阴阳别论篇》曰:“三阴结谓之水。”此三阴是指手太阴肺、足太阴脾、足少阴肾。说明水肿之病与肺脾肾三脏功能失常有关,肺失通调,脾失运化,肾失开阖是水肿的主要病机。

该方剂中用黄芪为主药,辅以白术、茯苓健脾益气,利水消肿,补骨脂、菟丝子温阳益肾,两组药合用,使脾气得健,肾气得复,共奏健脾益肾之功;丹参、益母草针对久病之瘀,活血化瘀,改善高凝状态和肾脏血液循环,利于受损之肾小球基底膜的恢复。现代医学研究资料表明,黄芪的化学成分以苷类、多糖、氨基酸、微量元素为主,可促进肝脏合成,提高血浆蛋白水平,减少肾小球免疫复合物(IC)的沉积,促进单核-巨嗜细胞的吞噬功能,提高肾小球系膜区对沉积于局部 IC 的吞噬和清除功能;另外黄芪能清除氧自由基,通过抑制转化生长因子产生,减少细胞外基质生成,调节细胞免疫及体液免疫,降低尿蛋白,保护肾功能。益元康重用黄芪作为治疗慢性肾小球肾炎的主药,既能调节免疫功能,又可消除尿蛋白,达到缓解或治愈的目的。

* 甘肃省庆阳市中医医院,庆阳市西山区烟台巷 23 号

(745000)

收稿日期:2005-10-18