

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.17.015

血塞通胶囊对大鼠梗死脑组织自体神经干细胞修复和再生的影响

张金生¹, 张宝霞^{2*}, 杜梅梅¹, 王小雅¹, 范慧慧¹

(1. 河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450008; 2. 河南中医学院第三附属医院)

基金项目: 2010 年河南省高校杰出科研人才创新工程——科技创新杰出青年资助项目 (104100510010)

摘要 **目的** 探讨血塞通胶囊对大鼠梗死脑组织自体神经干细胞增殖分化的影响。**方法** 参照改良 Zea-Longa 法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型, 将造模成功大鼠随机分为模型组和中药高、中、低剂量组, 每组 40 只, 另设健康大鼠 40 只为正常组。中药高、中、低剂量组分别以血塞通胶囊 60、40、20 mg/(100 g·d) 灌胃, 正常组和模型组以 1 ml/(100 g·d) 生理盐水灌胃, 各组均灌胃 28 天。分别于给药后 1、3、7、14、28 天取材 8 只大鼠, 检测梗死边缘区 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)、微管相关蛋白-2 (MAP-2)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、3 型 β 微管蛋白 (III β -Tubulin) 表达变化。**结果** 正常组偶见 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 表达阳性细胞, 模型组和中药高、中、低剂量组各时间点梗死边缘区 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 表达阳性细胞均较正常组显著增加 ($P < 0.05$); 中药高、中剂量组在给药后 1、3、7、14 天时 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 阳性细胞数较模型组同时点显著增多 ($P < 0.05$)。**结论** 血塞通胶囊可促进梗死脑组织神经干细胞增殖分化, 参与损伤脑组织的修复和再生作用。

关键词 血塞通胶囊; 神经干细胞; 脑梗死; 细胞增殖; 细胞分化

目前以骨髓间充质干细胞 (bone marrow stem cell, BMSCs) 为基础的治疗脑梗死的新策略已成为研究热点, 但许多研究集中在对其有效性的验证上, 而关于 BMSCs “归巢” 过程中迁移、增殖等关键环节的调控作用仍不明确^[1-2]。我们前期研究发现, 活血化瘀药物对脑缺血后内源性神经干细胞的增殖、分化有一定调控作用^[3-4]。因此, 本研究通过探讨活血化瘀中药血塞通胶囊对大鼠梗死脑组织自体神经干细胞 (neural stem cell, NSCs) 修复和再生的影响, 旨在为探索更积极手段提高干细胞疗效提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 200 只, 体重 280 ~ 300 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2006-0009。

1.2 药物与试剂

血塞通胶囊, 批号: Z53020134, 昆明制药集团股份有限公司。微管相关蛋白-2 (MAP-2) 免疫组化试剂盒, 批号: ZM-0380, 北京中杉金桥生物技术有限公司; 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫组化试剂盒, 批号: GM07610, 基因科技 (上海) 有限公司; 3 型 β 微管蛋白 (III β -Tubulin) TU-20 免疫组化试剂盒, 批号: SC-51670, SantaCruz 公司; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 免疫组化试剂盒, 批号: bs-0917R, 北京博奥森生物有限公司; 免疫组化染色试剂盒, 批号: SP-9001, 北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒, 批号: PV-6000-D, 北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

CX40 生物显微镜: 日本 Olympus 公司; RM2535 型石蜡切片机: 德国 Leica 公司。

1.4 模型建立

参照改良的 Zea-Longa 法^[5]建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注 (MCAO) 损伤模型。10% 水合氯

* 通讯作者: zhangbaoxia@126.com

醛 (35 mg/100 g) 腹腔麻醉, 常规消毒, 颈正中切口, 依次分离左侧颈总动脉 (CCA), 颈外动脉 (ECA) 与颈内动脉 (ICA), 结扎 ECA、CCA, 在颈总与颈内分叉处系一活结。夹闭分叉口远心端, 血管剪在 CCA 至 ICA 分叉口处剪一小口, 持线栓将其圆钝一头自剪口处插入 CCA, 然后将线栓送至 ICA, 入颅时稍遇阻力则止, 计算栓线插入深度距离 ICA、ECA 分叉处约 (18.0 ± 0.5) mm。ICA 上丝线打一死结, 线栓尾部留在皮肤表面, 逐层缝合皮肤, 消毒伤口。术后大鼠侧卧, 注意保暖。缺血 2 h 后, 将线栓轻轻外抽, 感到阻力时, 表明线栓的头端已回到 ICA 的主干中, 实现大脑中动脉的再灌注。连续 3 天给予青霉素 4 万单位肌肉注射抗感染, 术后大鼠自由吃食、饮水。造模成功入选标准: ①术后存活 24 h 者; ②出现左侧 Horner's 征和右侧神经功能缺损。

1.5 动物分组与给药

造模成功的 160 只大鼠采用随机数字表法分为模型组和中药高、中、低剂量组, 每组 40 只, 另设健康大鼠 40 只为正常组。中药高、中、低剂量组分别给予血塞通胶囊 60、40、20 mg/(100 g · d) 灌胃, 正常组和模型组给予 1 ml/(100 g · d) 生理盐水灌胃, 各组均每日 1 次, 共 28 天。

1.6 指标检测

各组分别于给药第 1、3、7、14、28 天随机选取大鼠 8 只, 心脏灌注取梗死侧大脑半球, 4% 的多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切取 3 μm 厚切片。免疫组织化学法检测不同时间点梗死边缘区 BrdU、MAP-2、GFAP、IIIβ-Tubulin 阳性表达。光镜下观察切片, 取 4 个不重复视野, 计数每个视野阳性细胞数, 为避免计数重复, 不计算血管内的阳性细胞, 对每 1 个动物, 由 3 张切片获得一个平均值代表表达阳性细胞数。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 所有数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对所得数据进行单因素方差分析, 方差不齐者, 将数值取对数值后

进行方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 BrdU 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 各时间点模型组大鼠脑梗死边缘区 BrdU 阳性细胞数明显增高 ($P < 0.05$); 各时间点中药高、中剂量组 BrdU 阳性细胞数亦显著高于模型组 ($P < 0.05$); 各时间点中药低剂量组与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。除正常组, 其余各组在 7 天时 BrdU 阳性细胞达到高点 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 MAP-2 的表达比较

表 2 示, 各时间点模型组 MAP-2 阳性细胞与正常组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各时间点中药高、中剂量组 MAP-2 阳性细胞数与模型组相比亦升高 ($P < 0.05$)。各时间点中药低剂量组与模型组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。除正常组, 其余各组在 7 天或 14 天时 MAP-2 阳性细胞达到高点 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 GFAP 表达比较

表 3 示, 各时间点模型组大鼠脑梗死边缘区 GFAP 阳性细胞与正常组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各时间点中药高、中剂量组 GFAP 阳性细胞数与模型组相比亦升高 ($P < 0.05$)。各时间点中药低剂量组与模型组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。除正常组, 其余各组在 7 天时 GFAP 阳性细胞达到高点 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 IIIβ-Tubulin 表达比较

表 4 示, 各时间点模型组 IIIβ-Tubulin 阳性细胞与正常组相比均升高 ($P < 0.05$); 各时间点中药高、中剂量组 IIIβ-Tubulin 阳性细胞数与模型组亦升高 ($P < 0.05$)。各时间点中药低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。除正常

表 1 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 BrdU 阳性细胞数比较 (个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常组	8	14.53 ± 1.78	15.62 ± 1.23	14.63 ± 1.24	15.55 ± 0.89	13.66 ± 1.22
模型组	8	20.47 ± 3.47*	46.66 ± 2.61*△	67.05 ± 8.27*△	45.51 ± 6.23*△	15.62 ± 2.18*△
中药高剂量组	8	26.50 ± 4.89▲	60.91 ± 4.56▲△	90.40 ± 6.99▲△	70.32 ± 4.32▲△	18.11 ± 1.22▲△
中药中剂量组	8	24.21 ± 1.27▲	52.08 ± 3.23▲△	80.20 ± 5.73▲△	60.23 ± 1.37▲△	17.02 ± 0.23▲△
中药低剂量组	8	22.26 ± 2.12	47.14 ± 3.72△	70.13 ± 3.84△	47.01 ± 8.52△	16.29 ± 0.89△

注: 与正常组同时时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间比较, ▲ $P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, △ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 MAP-2 阳性细胞数比较 (个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常组	8	5.68 ± 1.90	5.61 ± 2.80	5.77 ± 1.69	5.59 ± 2.38	5.93 ± 0.34
模型组	8	7.41 ± 1.06*	20.69 ± 3.50*	22.26 ± 2.39*	14.51 ± 1.98* [△]	5.00 ± 1.03* [△]
中药高剂量组	8	13.16 ± 5.20 [▲]	31.06 ± 5.95 ^{▲△}	34.58 ± 5.16 [▲]	38.65 ± 5.85 [▲]	28.04 ± 5.77 ^{▲△}
中药中剂量组	8	11.18 ± 1.27 [▲]	27.12 ± 1.23 ^{▲△}	31.27 ± 4.27 ^{▲△}	34.62 ± 1.03 [▲]	25.23 ± 0.74 ^{▲△}
中药低剂量组	8	8.18 ± 1.60	22.87 ± 1.70 [△]	23.71 ± 1.39	15.27 ± 0.98 [△]	8.21 ± 4.15 [△]

注: 与正常组同时时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间比较, [▲] $P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, [△] $P < 0.05$

表 3 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 GFAP 阳性细胞数比较 (个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常组	8	4.62 ± 0.57	4.83 ± 1.47	5.50 ± 1.64	5.33 ± 1.75	5.17 ± 1.16
模型组	8	5.72 ± 0.57*	7.33 ± 1.21*	13.17 ± 2.47* [△]	8.83 ± 1.50* [△]	4.17 ± 1.83* [△]
中药高剂量组	8	6.92 ± 0.47 [▲]	8.83 ± 1.13 [▲]	20.00 ± 1.41 ^{▲△}	12.17 ± 1.47 ^{▲△}	7.17 ± 1.72 ^{▲△}
中药中剂量组	8	6.23 ± 0.52 [▲]	8.50 ± 0.74 ^{▲△}	18.50 ± 1.04 ^{▲△}	11.50 ± 1.78 ^{▲△}	6.65 ± 0.23 ^{▲△}
中药低剂量组	8	5.77 ± 0.36	7.83 ± 0.26	16.26 ± 1.78 [△]	9.50 ± 1.51 [△]	5.33 ± 1.57 [△]

注: 与正常组同时时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间比较, [▲] $P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, [△] $P < 0.05$

表 4 各组大鼠不同时间脑梗死边缘区 III β -Tubulin 阳性细胞数比较 (个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常组	8	4.27 ± 1.32	4.27 ± 1.32	4.29 ± 1.03	4.27 ± 1.02	4.28 ± 1.03
模型组	8	5.51 ± 0.22*	7.37 ± 0.56*	9.69 ± 1.17* [△]	12.70 ± 1.04* [△]	9.75 ± 0.63*
中药高剂量组	8	7.26 ± 1.12 [▲]	8.71 ± 1.04 [▲]	14.30 ± 1.01 ^{▲△}	17.20 ± 0.94 ^{▲△}	12.30 ± 0.74 ^{▲△}
中药中剂量组	8	6.72 ± 1.31 [▲]	8.51 ± 0.24 ^{▲△}	12.70 ± 1.14 ^{▲△}	15.90 ± 1.34 ^{▲△}	11.80 ± 0.93 ^{▲△}
中药低剂量组	8	5.27 ± 1.32	7.88 ± 0.21	11.30 ± 1.04 [△]	13.60 ± 0.92	10.30 ± 0.67

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [▲] $P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, [△] $P < 0.05$

组, 其余各组在 7 天或 14 天时 III β -Tubulin 阳性细胞达到高点 ($P < 0.05$)。

3 讨论

在脑梗死时, 机体可以自发动员或促进自体 NSCs 激活, 促进 NSCs 迁移增殖分化, 参与损伤修复, 但这种自我修复能力有限, 尚不足以改善脑缺血后血供及神经功能恢复^[6-7]。近年来研究证明, 中药在调节内源性神经干细胞的迁移中发挥了重要作用, 如苏晓慧等^[8]研究发现给予补阳还五汤 3 周后损伤区残存或侵入的星形胶质细胞和内皮细胞基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 的表达上调, 缺血区周围 BrdU 阳性细胞数显著增加。冯珂等^[9]证实健脾益智胶囊可促进 BrdU 阳性细胞数量增加, 通过激活 Notch 通路以促进缺血后神经干细胞增殖分化, 延长神经干细胞增殖分化时间的作用。程建华等^[10]发现姜黄素除促进缺血后内源性 NSCs 的增殖外, 也促进其迁移, 其机制可能是通过激活 Notch 信号通路产生的。NSCs 在脑梗死区局部微环境诱导下可分化为神经元、星形胶质细胞等; MAP-2 为神经细胞骨架成分, III β -Tubulin 是成熟神经元标记物之一, GFAP 是星形胶质细胞的特异性标记

物, BrdU 是反映神经干细胞增殖较为理想的指标^[11-14]。

本研究结果显示, 正常组偶见 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 阳性细胞, 模型组和中药低、中、高剂量组各时间点梗死边缘区 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 阳性细胞数均比正常组明显增多; 并且除正常组, 其余各组 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 阳性细胞数随缺血时间延长有增多趋势, 在 7 天或 14 天达到高点 ($P < 0.05$)。中药中、高剂量组在 1、3、7、14 天时 BrdU、MAP-2、GFAP、III β -Tubulin 阳性细胞数比模型组相应时间点显著增多 ($P < 0.05$)。提示血塞通胶囊对于 NSCs 有激活作用, 有利于脑缺血后神经功能重建, 并促进 NSCs 增殖和在脑内转移, 说明血塞通胶囊对维持神经元较长时间处于分化状态作用明显。

参考文献

- [1] 束波, 刘志江, 范芳. 基质细胞衍生因子-1 α 预处理对大鼠骨髓间充质干细胞体外存活及旁分泌的影响 [J]. 基础医学与临床, 2012, 32(8): 884-888.
- [2] 华艳龙, 李彩萍. 间充质干细胞分化的调控机制及其

- 影响因素 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14 (36): 6809-6812.
- [5] Zhang JS, He QY, Huang T, et al. Effects of panax notoginseng saponins on homing of C-kit + bone mesenchymal stem cells to the infarcted heart in rats [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31 (3): 203-208.
- [6] 张金生, 何庆勇. 三七总皂苷对不同时点心梗大鼠心肌 VEGF、bFGF 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (11): 1496-1499.
- [7] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts [J]. Aging Cell, 2008, 7 (3): 335-343.
- [8] 熊方令, 高宜录. 内源性神经干细胞修复中枢神经系统损伤的策略 [J]. 基础医学与临床, 2010, 30 (10): 1105-1107.
- [9] 张兴秀, 郭慧娟, 李琳, 等. 缺血性脑卒中大鼠模型骨髓干细胞的动员和神经修复作用 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34 (12): 1192-1196.
- [10] 苏晓慧, 孔祥英, 庞宗然, 等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞迁移的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (6): 159-162.
- [11] 冯珂, 纪立金. 健脾益智胶囊对大鼠中动脉栓塞大鼠海马神经干细胞增殖及 Notch1、Jagged1 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (4): 921-924.
- [12] 程建华, 刘双, 韩钊, 等. 姜黄素通过调控 Notch 通路促进大鼠脑缺血后神经干细胞增殖和迁移 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29 (5): 878-882.
- [13] 聂蕾, 殷祎隆, 刘永琦, 等. 当归红芪超滤膜提取物诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33 (5): 632-637.
- [14] 魏楚蓉, 董丽萍, 伍赶球. β III-微血管蛋白在人胎肾发育不同时期的表达及意义 [J]. 海南医学院学报, 2012, 18 (6): 744-747.
- [15] 洪兴福, 李宝赛, 孙震晓. 去甲斑蝥素对体外微管蛋白聚合的抑制作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26 (3): 1-5.
- [16] 朱茜, 赵云鹤, 刘雪芹, 等. BrdU 标记法检测不同年龄阶段小鼠神经前体细胞的增殖潜能 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16 (6): 994-997.

Effects of Xuesaitong Capsules on the Repair and Regeneration of Autologous Neural Stem Cells in Infarcted Brain Tissue of Rats

ZHANG Jinsheng¹, ZHANG Baoxia², DU Meimei¹, WANG Xiaoya¹, FAN Huihui¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Henan Province 450008; 2. The Third Affiliated Hospital of Henan University of TCM)

ABSTRACT Objective To study the effects of *Xuesaitong Capsules* on the repair and regeneration of autologous neural stem cells in infarcted brain tissue of rats. **Methods** The middle cerebral artery ischemia-reperfusion injury model was established with modified Zea-Longa method. The rat models were randomized into the model group and *Xuesaitong Capsules* high-dose, middle-dose and low-dose groups, with 40 in each. Forty healthy rats were selected as the normal group. *Xuesaitong Capsules* high-dose, middle-dose and low-dose groups were gavaged with 60 mg/ (100 g · d), 40 mg/ (100 g · d) and 20 mg/ (100 g · d) of *Xuesaitong Capsules* respectively. The normal group and model group were gavaged with same volume of normal saline. The intragastric administration lasted for 28 day. Eight rats were sacrificed on the 1st, 3rd, 7th, 14th and 28th day after administration respectively to detect the expressions of 5-bromodeoxyuridine (BrdU), microtubule associated protein-2 (MAP-2), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and β -Tubulin. **Results** The BrdU, MAP-2, GFAP and β -Tubulin positive cells were occasionally seen in the normal group. Comparing with the normal group, the BrdU, MAP-2, GFAP and β -Tubulin positive cells were significantly increased in the model group and *Xuesaitong Capsules* high-dose, middle-dose and low-dose groups ($P < 0.05$). Comparing with the model group at the same time point, the BrdU, MAP-2, GFAP and β -Tubulin positive cells were significantly increased in *Xuesaitong Capsules* high-dose, middle-dose and low-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** *Xuesaitong Capsules* can promote the proliferation and differentiation of neural stem cells in infarcted brain tissue and improve the repair and regeneration of damaged brain tissue.

Keywords *Xuesaitong Capsules*; neural stem cells; cerebral infarction; cell proliferation; cell differentiation

(收稿日期: 2013-09-25; 修回日期: 2014-04-22)

[编辑: 洪涛]