

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.04.015

健脾益智胶囊联合丰富康复训练对缺血性脑卒中大鼠梗死灶周围皮质神经生长相关蛋白 43 表达的影响

胡科, 张保朝*, 任应国, 徐明超, 贾东佩

(南阳市中心医院, 河南省南阳市工农路 312 号, 473000)

[摘要] **目的** 探讨健脾益智胶囊联合丰富康复训练对缺血性脑卒中大鼠运动功能的影响及可能作用机制。**方法** 72 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、康复组、综合康复组, 每组 18 只。除假手术组外其余各组采用热凝闭大脑中动脉法复制缺血性脑卒中大鼠模型。造模成功后第 3 天开始康复组给予丰富康复训练治疗, 每日 1 次; 综合康复组在康复组的基础上给予健脾益智胶囊混悬液 15 ml/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次。各组大鼠分别于造模成功后 7、14、21 天进行 Longa 评分、平衡木行走实验评分、转棒上行走实验评分, 并检测脑组织梗死灶周围皮质神经生长相关蛋白 43 (GAP-43) 表达。**结果** 各时间点综合康复组 Longa 评分及平衡木行走实验评分、转棒上行走实验评分均较模型组降低, 大鼠脑组织梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数较模型组增加, 且优于康复组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 健脾益智胶囊联合丰富康复训练的综合治疗方法可有效地促进缺血性脑卒中大鼠的神经功能恢复, 其机制可能与增加大鼠脑组织梗死灶周围皮质 GAP-43 表达有关。

[关键词] 缺血性脑卒中; 健脾益智胶囊; 丰富康复训练; 神经生长相关蛋白 43

缺血性脑卒中的发病率、致残率和致死率较高, 患者存活下来以后常出现运动、认知、言语、吞咽等功能障碍, 是由于脑缺血造成中枢神经系统损伤后轴突不能有效再生, 往往造成不可逆性功能丧失, 出现后遗症^[1-2]。我们前期研究采用健脾益智胶囊对大脑中动脉栓塞大鼠进行干预, 发现健脾益智胶囊可能通过激活 Notch 通路以促进缺血后神经干细胞增殖分化^[3]。丰富康复训练综合了丰富环境 (含社交)、简单运动训练和复杂运动训练, 它不仅可以促进运动及学习记忆功能恢复, 亦可缩短神经功能恢复的时间窗^[4]。本实验观察健脾益智胶囊结合丰富康复训练对缺血性脑卒中大鼠运动功能及脑组织梗死灶周围皮质神经生长相关蛋白 43 (GAP-43) 表达的影响, 探讨该疗法治疗缺血性脑卒中的疗效及可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康 SD 雄性大鼠 72 只, 9 周龄, 体质

量 250 ~ 280 g, 由上海西普尔-必凯实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2008-0016, 自由饮水, 饲养环境温度 18 ~ 26℃。

1.2 药品

健脾益智胶囊组成: 黄芪 20 g, 白术 20 g, 制何首乌 15 g, 人参 10 g, 远志 6 g, 石菖蒲 6 g, 水蛭 3 g。将药物颗粒剂 (南京同仁堂药业有限公司, 国药准字 Z20113052) 溶解于浓度为 0.9% 的氯化钠溶液中, 制备成 0.5 g/ml 混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

6% 水合氯醛 (批号: 206-117-5, 武汉博莱特化工有限公司); 免疫组化染色试剂盒 (批号: K92413A)、浓缩型 DAB 试剂盒 (批号: ZLI-9032)、GAP-43 抗体 (批号: sc-33705), 北京中杉生物技术有限公司。

RA700-702 型牙科钻 (广州锦沐齿科医疗器械有限公司); 200B 型电凝器 (四川科仪诚科技有限公司); BX 51 型显微镜 (日本 Olympus 公司); XTL-600 型动物手术显微镜 (上海领成生物科技有限公司); BM-IX 型生物组织包埋机 (德国徕卡公司); TS-12A 型生物组织自动脱水机 (孝感市宏业

基金项目: 国家自然科学基金 (81373528)

* 通讯作者: 782458756@qq.com, 18538953366

医用仪器有限公司); 针灸针 (无锡佳健医疗器械股份有限公司, 型号: 0.25 mm × 13 mm)。

1.4 分组及造模方法

采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、康复组及综合康复组, 每组 18 只。采用热凝闭大脑中动脉法复制局灶性脑缺血模型^[5]: 6% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠。大鼠右侧卧位固定于手术台, 去除左侧颞顶部鼠毛, 75% 乙醇和碘伏对颞顶部皮肤进行消毒。在左眼与左耳二者间将皮肤切开, 实施颞肌分离操作, 促进颞骨翼板充分暴露, 术中加强对颞神经进行保护, 避免遭受损伤。以牙科钻从颞骨翼板一直钻至硬脑膜, 手术显微镜监视下将大脑中动脉找出, 使用小咬骨钳向下将部分颅骨咬去, 使大脑中动脉近端得以充分暴露, 以电凝器对近端至大脑下静脉间的大脑中动脉实施凝闭。完成凝闭后再依次将颞肌及皮肤缝合。假手术组的操作仅到大脑中动脉暴露, 不进行凝闭。大鼠苏醒后参照 Longa 评分法^[6]评分, 造模成功分数为 1 ~ 3 分。

1.5 治疗方法

康复组: 给予丰富康复训练^[7]治疗, 造模成功后第 3 天开始进行丰富环境和运动疗法两部分。丰富环境包括对大鼠笼内物品定时进行更换, 变化放置乒乓球、转盘、管道、阶梯、摇铃、爬梯等, 同时给予不同的声、灯光刺激, 每次 2h, 每天 1 次, 每周将环境改变 2 次, 分别连续治疗至造模成功后第 7、14 和 21 天。运动治疗包括平衡木行走实验^[8]: 长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒, 平放在距地面 7 cm 高处, 作为一个平衡木让大鼠在其上行走, 每天训练 10 min; 转棒上行走实验: 1 根长、直径分别为 150 cm、4.5 cm 的木棒, 其终点固定在 3 r/min 的转动器上, 分别向左右交替转动, 大鼠在转棒上可进行抓握、旋转、行走等, 每天训练 10 min, 分别连续治疗至造模成功后 7、14、21 天, 每个时间点 6 只大鼠。

综合康复组: 造模成功后第 3 天在康复组治疗的基础上给予健脾益智胶囊混悬液 15 ml/(kg · d) 灌胃, 每日 1 次, 分别连续治疗至造模成功后 7、14、21 天。

假手术组及模型组造模成功后常规饲养于笼内, 不进行任何干预治疗。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 Longa 评分^[6] 0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸展手术对侧前爪或后爪; 2 分: 行走时向手术对侧转圈; 3 分: 行走时向手术对侧倾

倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。分值越高, 神经损伤越严重。

1.6.2 平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分 参照文献 [9] 中评分标准, 分值越高, 神经损伤越严重。于造模后 7、14、21 天 3 个时间点 (每个时间点 6 只大鼠) 进行上述评分。

1.6.3 梗死灶周围皮质 GAP-43 表达 采用免疫组织化学法检测, 各组大鼠分别于造模后 7、14、21 天进行取材。6% 水合氯醛 (0.5 ml/100 g) 腹腔注射麻醉大鼠, 固定于手术台, 4% 多聚甲醛心脏灌注后断头取脑, 在视交叉处切开, 冠状切取 2 mm 厚包含梗死灶区域的脑组织浸于 4% 多聚甲醛中再固定, 常规梯度乙醇脱水; 在二甲苯 I、II 中分别浸泡。脑组织石蜡包埋备用, 连续冠状切片, 厚 5 μm。链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法检测大鼠脑组织中梗死灶周围皮质的 GAP-43 表达。切片常规脱蜡、水化, 根据免疫组化试剂盒表明相关步骤开展实验操作。DAB 显色, 显微镜下观察并摄片, 在 400 倍光镜视野下, 选取 5 个互不重叠的视野, 阳性表达为胞质中的棕黄色颗粒, 计数出每个视野内阳性细胞数, 5 个视野相加取平均值, 即 GAP-43 阳性细胞数。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据若满足正态性分布及方差齐性, 采用单因素方差分析, 组间两两比较选用 LSD 检验, 否则采用秩和检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点 Longa 评分比较

表 1 示, 假手术组无神经功能缺损症状, Longa 评分均为 0 分。各时间点模型组 Longa 评分较假手术组均升高 ($P < 0.01$)。各时间点康复组、综合康复组 Longa 评分较模型组均降低 ($P < 0.05$)。各时间点综合康复组 Longa 评分较康复组降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠造模成功后 7、14、21 天 Longa 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	21 d
假手术组	6	0	0	0
模型组	6	2.81 ± 0.62*	2.52 ± 0.43*	1.82 ± 0.61*
康复组	6	2.21 ± 0.22 [△]	1.43 ± 0.21 [△]	1.21 ± 0.24 [△]
综合康复组	6	1.50 ± 0.11 ^{△▲}	0.80 ± 0.20 ^{△▲}	0.52 ± 0.12 ^{△▲}

注: 与假手术组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与康复组同时间比较, $\blacktriangle P < 0.05$

表 2 各组大鼠造模成功后 7、14、21 天平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	平衡木行走实验评分			转棒上行走实验评分		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
假手术组	6	0	0	0	0	0	0
模型组	6	3.31 $\pm$ 0.43*	2.80 $\pm$ 0.37*	2.63 $\pm$ 0.43*	2.80 $\pm$ 0.23*	2.25 $\pm$ 0.27*	1.78 $\pm$ 0.38*
康复组	6	3.15 $\pm$ 0.22	1.75 $\pm$ 0.21 Δ	1.48 $\pm$ 0.25 Δ	2.70 $\pm$ 0.25	1.48 $\pm$ 0.24 Δ	1.20 $\pm$ 0.18 Δ
综合康复组	6	2.15 $\pm$ 0.10 $\Delta\blacktriangle$	1.15 $\pm$ 0.15 $\Delta\blacktriangle$	0.75 $\pm$ 0.14 $\Delta\blacktriangle$	2.15 $\pm$ 0.13 $\Delta\blacktriangle$	1.13 $\pm$ 0.15 $\Delta\blacktriangle$	0.85 $\pm$ 0.12 $\Delta\blacktriangle$

注: 与假手术组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与康复组同时间比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2.2 各组大鼠不同时间点平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分比较

表 2 示, 假手术组平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分均为 0 分。各时间点模型组大鼠平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分较假手术组均增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 除造模后 7 天康复组大鼠两个实验评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各时间点康复组、综合康复组大鼠平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分较模型组均降低 ($P < 0.05$)。各时间点综合康复组平衡木行走实验评分及转棒上行走实验评分均较康复组降低 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠不同时间点脑组织梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数比较

表 3 示, 各时间点模型组大鼠脑组织梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数较假手术组增加 ($P < 0.01$)。康复组与综合康复组在各时点大鼠脑组织中梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数较模型组均增加 ($P < 0.01$)。综合康复组在各时点大鼠脑组织中梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数亦高于康复组 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠造模成功后 7、14、21 天脑组织梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	21 d
假手术组	6	7.00 $\pm$ 0.43	8.01 $\pm$ 0.37	8.52 $\pm$ 0.26
模型组	6	13.00 $\pm$ 0.52*	12.51 $\pm$ 0.38*	16.73 $\pm$ 0.32*
康复组	6	17.47 $\pm$ 0.23 $\Delta\blacktriangle$	16.00 $\pm$ 0.42 $\Delta\blacktriangle$	20.11 $\pm$ 0.32 $\Delta\blacktriangle$
综合康复组	6	20.08 $\pm$ 0.28 $\Delta\blacktriangle$	17.95 $\pm$ 0.26 $\Delta\blacktriangle$	23.45 $\pm$ 0.18 $\Delta\blacktriangle$

注: GAP-43, 神经生长相关蛋白 43; 与假手术组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.01$; 与康复组同时间比较, $\blacktriangle P < 0.01$

3 讨论

中医学认为, 脑为髓海, 其在化生气血、脾胃运化中均发挥着极为重要的作用。在机体中, 气运动的枢机为脾胃, 早在《素问·六微旨大论篇》中便已记载“是以升降出入, 无器不有。故器者生化之宇, 器散则分之, 生化息矣。故无不出入,

无不升降”。因此, 脑也同样是时刻都在不断升降和出入, 脑必须依靠脾胃的力量才能使自身的生理机能得到有效发挥。脑在机体整个生命活动中起到主宰作用, 该作用主要体现为统帅及调节机体中脏腑相关功能的发挥, 同时也对脾胃功能的发挥起主宰作用^[10], 脑与脾二者在机体生命活动中相互制约又相互依赖。王彩霞等^[11]研究发现, 滋补脾阴方药、温补脾阳方药的应用可使痴呆患者病情得到有效改善, 同时也可使脾虚证时病理损害得到有效减轻, 促进动物记忆、学习能力得到明显提高, 可使痴呆症状得到较大程度改善。

健脾益智胶囊方以人参、黄芪为君, 大补以强健脾气, 以养五脏; 制何首乌、石菖蒲、水蛭等为臣, 补精填髓、豁痰醒脑、祛瘀通络, 共助君药增加健脾之功效; 佐以远志益智宁神, 交通心肾。纵观全方, 从脾立论, 一则后天之精化源充足, 可补五脏之不足, 化生万物而充脑髓; 二则气血运行通畅, 既可杜绝痰浊、血瘀等病理因素的产生, 又可使产生之痰浊瘀血消失。诸药合用, 共奏健脾益智、补精化瘀之效。

丰富康复训练被认为是一种无创的物理康复疗法, 已经被广泛应用于缺血性脑卒中、脑外伤等疾病的治疗^[12]。本研究结果显示, 综合康复组与康复组均可促进缺血性脑卒中大鼠神经功能的恢复, 在 Longa 评分、平衡木行走实验评分、转棒上行走实验评分各时间点综合康复组的评分均低于模型组和康复组, 说明健脾益智胶囊联合丰富康复训练较单纯康复训练可更有效地促进缺血性脑卒中大鼠的神经功能恢复。GAP-43 是神经组织特异性磷酸蛋白质, 是神经元发育及神经生长、再生标志蛋白, 可促进神经细胞生长、轴突再生和突触重构^[13]。本研究结果显示, 综合康复组在各时点大鼠脑组织中梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性细胞数较康复组、模型组均增加, 说明健脾益智胶囊联合丰富康复训练在对 GAP-43 蛋白的表达起到很好的促进作用。

综上所述, 健脾益智胶囊联合丰富康复训练

的综合治疗方法可有效地促进缺血性脑卒中大鼠的神经功能恢复, 增加大鼠脑组织梗死灶周围皮质 GAP-43 表达可能是治疗缺血性脑卒中重要的机制之一。

参考文献

- [1] BERKHEMER OA, FRANSEN PS, BEUMER D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke [J]. N Engl J Med, 2015, 372(1): 11-20.
- [2] LAMBERT C, CISTERNAS P, INESTROSA NC. Role of Wnt signaling in central nervous system injury [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(4): 2297-2311.
- [3] 冯珂, 纪立金. 健脾益智胶囊对大鼠脑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.
- [4] MASCHIO M, DINAPOLI L, FABI A, et al. Cognitive rehabilitation training in patients with brain tumor-related epilepsy and cognitive deficits: a pilot study [J]. J Neurooncol, 2015, 125(2): 419-426.
- [5] TANG Y, WANG L, WANG J, et al. Ischemia-induced angiogenesis is attenuated in aged rats [J]. Aging Dis, 2016, 7(4): 326-335.
- [6] SCHUCH CP, JEFFERS MS, ANTONESCU S, et al. Enriched rehabilitation promotes motor recovery in rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia [J]. Behav Brain Res, 2016, 304: 42-50. doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.010.
- [7] LIU ZH, YIP PK, PRIESTLEY JV, et al. A single dose of docosahexaenoic acid increases the functional recovery promoted by rehabilitation after cervical spinal cord injury in the rat [J]. J Neurotrauma, 2017, 34(9): 1766-1777.
- [8] SHI N, ZHU C, LI L. Rehabilitation training and resveratrol improve the recovery of neurological and motor function in rats after cerebral ischemic injury through the sirt1 signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1732163. doi: 10.1155/2016/1732163.
- [9] RYMO I, KERN S, BJERKE M, et al. CSF YKL-40 and GAP-43 are related to suicidal ideation in older women [J]. Acta Psychiatr Scand, 2017, 135(4): 351-357.
- [10] 陈丽娟, 冯珂. 论脾与脑的相关性 [J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(1): 11-13.
- [11] 王彩霞, 李德新, 姜哲浩, 等. 理脾阴正方提高 Alzheimer 痴呆模型动物学习记忆能力的机理探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(4): 242-243.
- [12] MATEER CA, SOHLBERG MM. Cognitive rehabilitation: An integrative neuropsychological approach [M]. New York: Guilford Publications, 2017.
- [13] TRACY K, NORSTROM EM. Phosphorylation of GAP-43 and the effect on APP processing [J]. Depaul Dis, 2015, 4(1): 1-4.

Effect of *Jianpi Yizhi Capsule* (健脾益智胶囊) Combined with Enriched Rehabilitation Training on the Expression of Nerve Growth Related Protein 43 in Perinfarction Cortex of Ischemic Stroke Rats

HU Ke, ZHANG Baochao, REN Yingguo, XU Mingchao, JIA Dongpei

(Central Hospital of Nanyang, Henan Province 473000)

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Jianpi Yizhi Capsule* (健脾益智胶囊) combined with enriched rehabilitation training on the motor function of rats with ischemic stroke and its possible mechanism. **Methods** Seventy-two Sprague Dawley rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, a rehabilitation group and a comprehensive rehabilitation group, with 18 rats in each group. All the groups except the sham operation group were treated by thermocoagulation on middle cerebral artery to replicate the rat model of ischemic stroke. Since the third day after successful modeling, both the rehabilitation group and the comprehensive rehabilitation group were given enriched rehabilitation training for treatment, once a day; and the comprehensive rehabilitation group was given 15 ml/(kg · d) of *Jianpi Yizhi Capsule* suspension once a day in addition. Conducted Longa score, balance beam walking test score and walking rod test score were evaluated, and the expression of nerve growth associated protein 43 (GAP-43) in perinfarction cortex of brain tissue was detected in each group on the 7th, 14th and 21st days after modeling, respectively. **Results** At each time point, the Longa score, the balance beam walking test score and the walking rod test score in the comprehensive rehabilitation group were all lower than those in the model group. The number of GAP-43 positive cells in perinfarction cortex of brain tissue of rats in the comprehensive rehabilitation group increased compared with that in the model group, and it was better than that in the rehabilitation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Jianpi Yizhi Capsule* combined with enriched rehabilitation training could effectively promote the recovery of neurological function in rats with ischemic stroke, and its mechanism may be related to the increase of GAP-43 expression in perinfarction cortex of rat brain tissue.

Keywords ischemic stroke; *Jianpi Yizhi Capsule*; enriched rehabilitation training; nerve growth related protein 43

(收稿日期: 2017-08-10; 修回日期: 2017-10-31)

[编辑: 邓媛]