

• 实验研究 •

通心络超微粉对脑缺血大鼠微血管的影响

常丽萍^{1,2} 秦 桢³ 魏 聪^{1,2} 王宏涛^{1,4} 韩建科¹ 贾振华^{5*}

(1. 河北以岭医药研究院, 河北省石家庄市天山大街 238 号, 050035; 2. 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病); 3. 石家庄以岭药业股份有限公司; 4. 河北省络病重点实验室;

5. 河北医科大学附属以岭医院国家中医药管理局中医络病学重点学科)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2005CB523301, 2012CB518606)

* 通讯作者: changliping@yiling.cn, (0311)85901553

[摘要] 目的 观察通心络超微粉对脑缺血大鼠微血管及血流灌注量的影响。方法 将 48 只健康 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、通心络大剂量组[1.6 g/(kg·d)]、通心络中剂量组[0.8 g/(kg·d)]、通心络小剂量组[0.4 g/(kg·d)]、尼莫地平组[10 mg/(kg·d)], 每组 8 只。采用开颅结扎法阻断大鼠一侧大脑中动脉制备局灶性脑缺血大鼠模型, 假手术组大鼠只挑开脑膜, 不结扎血管。各用药组均在动物苏醒后灌胃, 假手术组和模型组给予等体积生理盐水。给药 14 天后, 利用激光扫描共聚焦显微镜观察各组大鼠脑组织微血管形态、直径及血流灌注量。结果 与模型组比较, 各用药组大鼠大脑皮层微血管均呈现迂曲不规则形状, 其中通心络大剂量组血管明显呈迂曲、不规则, 微血管分支数目增多, 血管之间靠拢形成连接。模型组缺血侧 40% 微血管直径在 5~6 μm 之间; 通心络大剂量组缺血侧 41% 微血管直径在 2~3 μm 之间; 通心络中剂量组缺血侧 40% 微血管直径在 3~4 μm 之间; 通心络小剂量组缺血侧 40% 微血管直径在 4~5 μm 之间。与模型组比较, 通心络大、中剂量组、尼莫地平组显著促进缺血侧脑组织皮层区微血管血流灌注量增加($P < 0.01$)。结论 通心络超微粉可促进脑缺血大鼠脑缺血区微血管新生, 增加缺血脑组织血流灌注量。

[关键词] 通心络超微粉; 脑缺血; 血管新生; 微血管; 血流灌注量

Effect of Tongxinluo Superfine Powder on Microvessels in Cerebral Ischemia Rats

CHANG Liping^{1,2}, QIN Long³, WEI Cong^{1,2}, WANG Hongtao^{1,4}, HAN Jianke¹, JIA Zhenhua⁵

(1. Hebei Yiling Medical Research Institute, Hebei Province 050035; 2. Key Laboratory of State Administration of TCM for Cardio-Cerebral Vessel Disease; 3. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Company; 4. Key Laboratory of Hebei Province for Vessel Diseases; 5. Yiling Hospital Affiliated to Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Tongxinluo Superfine Powder (TSP, superfine powder to free the heart vessels) on microvessels and blood perfusion in cerebral ischemia rats. **Methods** Totally 48 healthy SPF SD rats were randomized into sham operation group, model group, TSP high-dose group (1.6 g/kg·d), TSP middle-dose group (0.8 g/kg·d), TSP low-dose group (0.4 g/kg·d) and nimodipine group (10 mg/kg·d), with 8 in each. The focal cerebral ischemia models were established with craniotomy ligation of one side of the middle cerebral artery. The rat meninges in the sham operation group were picked open without vascular ligation. Each treatment group was given intragastric administration after waking and the sham operation group and model group were given the same volume of normal saline. The morphology, diameters and blood perfusion of cerebral microvessels were observed with laser scanning confocal microscopy on the 14th day of administration. **Results** Comparing with the model group, the cerebral cortex microvessels in each treatment group showed a tortuous and irregular shape and the cerebral cortex microvessels in the TSP high-dose group showed obviously irregular shape, numerous microvascular branch and close connection between microvessels. The diameter of 40% microvascular of ischemic side of the rats in the model group was 5 to 6 μm . The diameter of 41% microvascular of ischemic side of the rats in the TSP high-dose group was 2 to 3 μm . The diameter of 40% microvascular of ischemic side of the rats in the TSP middle-dose group was 3 to 4 μm . The diameter of 40% microvascular of ischemic side of the rats in the TSP low-dose group was 4 to 5 μm . Comparing with the model group, the blood perfusion in the TSP high-dose group, TSP middle-dose group and nimodipine group was significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** TSP can promote angiogenesis in cerebral cortex after focal cerebral ischemia and increase the blood perfusion.

Keywords Tongxinluo; cerebral ischemia; angiogenesis; microvessels; blood flow perfusion

缺血性脑血管病因其高致残、致死率成为研究的热点。治疗性血管新生为其开辟了一条再血管化的新途径,新生的血管可以改善缺血区周围的组织灌流,增加脑血流量,从而增加受损脑组织的氧与能量供给,抑制脑缺血后的一系列级联反应,减轻脑损伤面积,促进脑缺血后的神经功能康复。本研究通过观察通心络超微粉对脑缺血大鼠缺血侧大脑皮层微血管及血流灌注量的影响,探讨通心络促进脑缺血后神经功能恢复及防治脑血管病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体重 110~140 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2006—2009。

1.2 药物

通心络超微粉(由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等组成,石家庄以岭药业股份有限公司提供,批号 20090430),每克超微粉含 1.47 g 生药,用生理盐水配制成基础浓度为 0.16 g 超微粉/ml,4℃ 保存;尼莫地平片(拜耳医药保健公司提供,批号: H20003010)。

1.3 试剂与主要仪器

FITC-右旋糖酐(美国 Sigma 公司);水合氯醛(天津市大茂化学试剂厂,批号 20090228);多聚甲醛(天津市永大化学试剂开发中心,批号 20090513)。VT1000s 型振动切片机(德国 Leica 公司);LSM-510META 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

1.4 模型制备

参考文献[1]方法,10%水合氯醛(3.5 ml/kg)腹腔麻醉大鼠,左侧眼眶后至耳的中点纵形切开皮肤,沿颞骨缘剪开颞肌筋膜,直至完全暴露颞骨的颞鳞和蝶骨大翼,在颞弓上方颞鳞与蝶骨大翼交界处进行钻孔,以尖头手术刀切开硬膜,可见横过嗅束向上行走的大脑中动脉,用 11/0 号手术线结扎大脑中动脉中段;其中 8 只大鼠作为假手术组只挑开脑膜、不结扎血管。常规消炎处理,随后分层缝合肌肉和皮肤,单笼饲养。

1.5 动物分组及给药

动物苏醒后,参考文献[2]方法,对造模大鼠神经功能障碍程度评分。0 分,无任何神经功能丧失;1 分,右前肢不能充分伸展;2 分,提尾时向右环形或旋转运动;3 分,向右转圈,成追尾状或向右倾倒;4

分,不能自然行走或无自发活动意识障碍。取神经功能障碍评分 1~3 分的大鼠,采用随机数字表法分为模型组、通心络大、中、小剂量组和尼莫地平组,每组 8 只。通心络大、中、小剂量组分别以通心络超微粉 1.6 g/kg、0.8 g/kg、0.4 g/kg 灌胃,相当于成人临床剂量的 16、8、4 倍,尼莫地平组以尼莫地平片 10 mg/kg 灌胃,假手术组和模型组以等体积生理盐水灌胃,每天 1 次,给药 14 天后检测指标。

1.6 脑组织皮层区血流灌注量检测

10%水合氯醛(3.5 ml/kg)麻醉大鼠,用激光扫描共聚焦显微镜观察,激发波长 488 nm, z 轴方向以 0.5 μ m 递进,扫描 100 个层面,将所获得的图像进行三维重建,用绿色荧光所占的体积表示血浆容量,通过图像叠加和像素计算的方式测定绿色荧光所占的体积,即扫描组织的血浆容量,脑组织血流灌注量的值以扫描区血浆容量与扫描区总容量比值表示^[3]。

1.7 脑组织皮层区微血管直径分布及形态观察

10%水合氯醛(3.5 ml/kg)麻醉大鼠,股静脉注射 0.1 ml FITC-右旋糖酐,1 min 后断头,取脑组织置于 4%多聚甲醛,避光保存,4℃ 固定 48 h,取视交叉部位用振动切片机行冠状切片,片厚 150 μ m。用激光扫描共聚焦显微镜分析血管直径小于 8 μ m 的血管^[3],放大 400 倍观察血管形态和直径,记录不同直径微血管占总血管百分比。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 或 Dunnett's T_3 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠大脑皮层区微血管形态观察

与假手术组比较,模型组大脑皮层微血管走行紊乱、不规则。与模型组比较,各用药组大脑皮层微血管均呈现迂曲不规则形状,其中通心络大剂量组血管明显呈迂曲、不规则,微血管分支数目增多,血管之间靠拢形成连接;缺血侧脑组织与各自对侧大脑皮层相比,缺血侧脑组织的微血管数目明显增多,血管呈迂曲的不规则形状。

2.2 各组大鼠脑组织皮层区微血管直径分布比较

各组不同直径微血管分布比较:假手术组 6~7 μ m 微血管占 35%,5~6 μ m 及 7~8 μ m 微血管均占 20%,其余各段分布较少。模型组缺血侧 40%微血管分布在 5~6 μ m 之间;其对侧 5~6 μ m 微血管仅占 20%,34%分布在 6~7 μ m 之间,其余各段分

布较少。通心络大剂量组缺血侧 41% 微血管在 2~3 μm 之间; 其对侧 2~3 μm 血管仅占 16%, 35% 微血管在 3~4 μm 之间。通心络中剂量组缺血侧 2~3 μm 微血管占 36%, 3~4 μm 微血管占 40%; 其对侧 3~4 μm 微血管占 32%, 4~5 μm 微血管占 27%, 其余各段分布较少。通心络小剂量组缺血侧 40% 微血管在 4~5 μm 之间; 其对侧 4~5 μm 仅占 18%, 30% 微血管在 5~6 μm 之间。尼莫地平组缺血侧 35% 微血管在 4~5 μm 之间; 其对侧 4~5 μm 仅占 27%, 23% 微血管在 5~6 μm 之间。

2.3 各组大鼠脑组织皮层区血流灌注量比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血侧脑组织皮层区血流灌注量明显减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 通心络大、中剂量组、尼莫地平组均能够促进缺血侧皮层区血流灌注量增加 ($P < 0.01$); 通心络大剂量组缺血侧皮层区血流灌注量高于通心络小剂量组 ($P < 0.05$); 通心络大剂量组缺血对侧血流灌注量高于模型组缺血对侧 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠大脑皮层区血流灌注量比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	缺血侧脑组织 血流灌注量	缺血对侧脑组织 血流灌注量
假手术组	8	25.00 $\pm$ 5.89	23.00 $\pm$ 3.14
模型组	8	7.00 $\pm$ 2.11*	25.00 $\pm$ 5.23
通心络大剂量组	8	28.00 $\pm$ 4.34 $\Delta\Delta\Delta$	39.00 $\pm$ 5.55 Δ
通心络中剂量组	8	17.00 $\pm$ 3.23 $\Delta\Delta$	32.00 $\pm$ 4.56
通心络小剂量组	8	12.00 $\pm$ 2.17	26.00 $\pm$ 3.65
尼莫地平组	8	20.00 $\pm$ 3.12 $\Delta\Delta$	28.00 $\pm$ 3.46

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组同侧比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与通心络小剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$

3 讨论

通心络由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等药物组成, 方中人参为君药, 补益心气。水蛭化痰通络, 张锡纯谓: “凡破血之药, 多伤气分, 惟水蛭味咸专入血分, 于气分丝毫无损, ……真良药也”; 全蝎通络止痉, 祛风逐邪, 兼引诸风药入达病所也; 两者合用以解心络之绌急, 共为臣药。土鳖虫逐瘀通络合水蛭搜剔络中之瘀, 配合蜈蚣搜风解痉, 张锡纯云: “蜈蚣味微辛, 性微温, 走窜之力最速, 内而脏腑外而经络, 凡气血凝聚之处皆能开之”。蝉蜕甘咸性凉, 熄风止痉, 定惊安神, 配合全蝎既能疏散风邪以祛外风, 又能解痉止痛以熄内风。赤芍活血散瘀, 行瘀止痛, 与以上虫类之品共为佐药。冰片芳香引诸药入络通窍为使药。诸药配合, 益心气扶正以固本虚, 通脉络搜风解痉以祛邪, 正气存内, 气旺血

行, 邪无居处, 脉络畅通。现代研究发现^[4], 通心络可以促进缺血大脑皮层内皮细胞黏附分子 (CD₃₁)、血管内皮生长因子 (VEGF) 等血管新生相关因子表达, 从而促进脑微血管新生, 改善脑神经功能。

真炳攸等^[5]研究发现, 大鼠脑皮质内微血管丰富, 直径在 5.0~5.5 μm 之间, 直径大于 8 μm 的微动脉均有平滑肌, 因此本研究采用激光共聚焦显微镜观察小于 8 μm 的微血管变化。本研究结果发现, 通心络大剂量组缺血侧微血管直径仅为 3.35 μm 左右, 其中 47% 微血管小于 3 μm , 微血管迂曲、不规则, 分支数目明显增多, 而对侧多数微血管 (63%) 直径在 3~5 μm 之间, <3 μm 的微血管仅占 21%, 微血管迂曲不规则, 可能是血管新生的表现^[6]。由此可以推断, 本实验中通心络主要促进了 <3 μm 的毛细血管新生。通心络大、中剂量组缺血侧皮层区的血流灌注量明显高于模型组 ($P < 0.01$), 这表明通心络能显著改善缺血大脑皮层的血流灌注, 增加神经元血液循环。通心络能够增加缺血区微血管密度, 微血管分支数目明显增多, 提示通心络能够促进缺血区微血管新生, 血流灌注量的增加很可能为这些新生血管所致, 这表明新生的微血管可以增加缺血脑组织的血流灌注量, 发挥一定的代偿作用。研究表明^[7], 神经功能的恢复与缺血后大脑皮层血管生成和血流量有很强的相关性, 新生的血管可以后发轴突和树突的发芽以及神经再生^[8], 因此通心络促进脑缺血后微血管新生, 增加缺血脑组织的血流灌注量, 发挥一定的代偿作用, 可能是脑缺血后神经功能恢复的机制之一, 但是对于通心络促进脑微血管新生的分子学证据还需进一步研究。

参考文献

- [1] Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia [J]. Stroke, 1989, 20(12): 1627-1642.
- [2] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [3] Xerri C, Azogui YZ. Influence of the postlesion environment and chronic piracetam treatment on the organization of the somatotopic map in the rat primary somatosensory cortex after focal cortical injury [J]. Neuroscience, 2003, 118(1): 161-177.
- [4] 常丽萍, 张秋燕, 韩建科, 等. 通心络超微粉对缺血性脑卒中大鼠微血管新生影响的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(7): 1015-1018.

(下转第 1144 页)

目》又云：“大黄乃足太阴、手足阳明、手足厥阴五经血分之药，凡病在五经血分者宜用之”。全方益气养阴，补而不滞；活血化瘀，通络止痛而无破血耗血之弊，共奏益气养阴、化瘀通络之功。

现代药理研究表明，黄芪及有效成分有降糖、降压、降脂、减少尿蛋白和免疫调节作用；可抑制糖尿病大鼠的肾脏肥大，减轻肾小球基底膜增厚及系膜基质增生；纠正肾脏的高灌注、高滤过状态；降低肾脏细胞膜蛋白激酶 C 的活性；抑制 TGF- β 的过度表达等^[9-11]。生地黄不仅有降糖作用，还可以减少高糖作用下的系膜细胞的增殖，对 DN 的发生发展也有一定的抑制作用^[12-13]。鬼箭羽可通过抑制磷脂肌醇信号途径(PKC)的激活，减少 DN 大鼠尿蛋白的排出，改善肾脏病理改变；通过调节 Smad4 与 Smad7 的蛋白表达，从而抑制 TGF- β 的表达，防治 DN 肾小球硬化^[14-15]。大黄可抑制肾小球系膜细胞增殖，防止细胞外基质(ECM)的堆积并促进其降解，延缓肾小球的硬化；通过改善微循环、抗凝、抗血栓等作用调节肾脏血流动力学；具有保护肾功能、延缓肾功能衰竭进展等作用^[16-17]。这些研究均为芪卫颗粒用于 DN 的防治提供了科学依据。

本研究观察了芪卫颗粒对 KK-Ay 小鼠肾组织内 TGF- β_1 /Smads 信号通路上相关位点的作用效果，发现芪卫颗粒可以改善这些位点蛋白与基因的表达。本研究结果显示，芪卫颗粒使促纤维化因子 TGF- β_1 及 P-Smad2、P-Smad3 的表达减弱，使具有抑制通路活性作用的 Smad7 的表达增强，最终减少通路下游因子 ILK 的表达。故芪卫颗粒可以通过多靶点、多层次抑制 TGF- β_1 /Smads 信号通路介导的 TEMT 过程，延缓 DN 肾间质纤维化的发生发展。

参考文献

- [1]王海燕. 肾脏病学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1414.
- [2]Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1627-

1637.

- [3]Najafian B, Alpers CE, Fogo AB. Pathology of human diabetic nephropathy [J/OL]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 36-47. doi:10.1159/000324942
- [4]Strutz F, Müller GA. Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(12): 3368-3370.
- [5]Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, et al. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling [J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 77: S45-52.
- [6]Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [7]张玉领, 孙长颢. 2 型糖尿病动物模型的研究进展 [J]. *实用糖尿病杂志*, 2011, 7(4): 7-9.
- [8]高彦彬, 唐代屹, 刘铜华, 等. 芪卫颗粒对糖尿病大鼠肾组织晚期糖化终产物的影响 [J]. *中国现代医药杂志*, 2005, 7(1): 2-5.
- [9]方玉茹, 罗士云. 黄芪在糖尿病肾病中的应用 [J]. *陕西中医*, 2010, 31(4): 512-513.
- [10]黄海艳, 高建东. 黄芪药理特性及在糖尿病肾病中运用研究概况 [J]. *实用中医内科杂志*, 2011, 25(10): 80-82.
- [11]许成群, 徐明松, 王元. 黄芪治疗糖尿病肾病研究近况 [J]. *实用中医药杂志*, 2011, 27(3): 215-216.
- [12]刘圣, 陈礼明. 清热中药现代药理与临床 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1999: 236-252.
- [13]孙敏, 孙晶, 朱荃. 清热中药对高糖培养下肾小球系膜细胞增殖的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2005, 39(3): 58-59.
- [14]朴元林, 梁晓春, 杨楠, 等. 菟丝子合剂对糖尿病大鼠肾组织蛋白激酶 C 活性作用的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(7): 685-689.
- [15]张威, 甄仲, 黄文政, 等. 复方鬼箭羽合剂对糖尿病肾病大鼠肾组织 Smad4、Smad7 的影响 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2011, 21(3): 129-132.
- [16]熊智慧. 大黄素治疗糖尿病肾病最新研究近况 [J]. *北方药学*, 2011, 8(9): 36-37.
- [17]许成群, 徐明松, 王元. 大黄治疗糖尿病肾病研究近况 [J]. *中医药导报*, 2011, 17(4): 123-125.

(收稿日期: 2012-08-29; 修回日期: 2013-05-02)

[编辑: 洪 涛]

(上接第 1140 页)

- [5]真炳收, 张留保, 金国忠. 大脑皮质微血管构筑 [J]. *解剖学报*, 1987, 18(4): 345-347.
- [6]Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of Angiogenesis in Patients with Cerebral Ischemia Stroke [J]. *Stroke*, 1994, 25(1): 1794-1798.
- [7]Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of

blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4): 379-392.

- [8]Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis [J]. *J Comp Neurol*, 2000, 425(4): 479-494.

(收稿日期: 2012-08-16; 修回日期: 2013-05-02)

[编辑: 洪 涛]