

• 实验研究 •

髓复康对脑缺血大鼠缺血损伤区硫酸软骨素蛋白多糖及生长相关蛋白 43 表达的影响

张 平 曹 智 张世民 郑格琳*

(中国中医科学院望京医院, 北京市朝阳区花家地街, 100102)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30701094)

* 通讯作者: zhenggelin@163.com, (010) 64722269

[摘要] 目的 观察髓复康对脑缺血大鼠脑缺血损伤的修复作用机制。方法 将 144 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组和髓复康大、中、小剂量组, 每组 24 只, 除正常组外其余各组大鼠建立右侧大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注模型, 髓复康大、中、小剂量组分别灌胃髓复康浓缩剂 5 g/100 g、2.5 g/100 g、1.25 g/100 g, 每日 1 次; 阳性对照组腹腔注射甲基强的松龙 30 mg/kg, 隔日 1 次; 模型组灌胃等量生理盐水, 正常组不做任何处理。各组在给药 8、15 和 30 天取大鼠脑组织, 免疫组织化学方法检测各组大鼠脑缺血损伤区硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs)、生长相关蛋白 43(GAP-43)表达量。结果 各组给药 8、15 和 30 天时组内比较, CSPGs 及 GAP-43 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。各时间点与正常组比较, 模型组 CSPGs 表达显著增强($P < 0.01$); 各给药组 CSPGs 表达显著低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各时间点与正常组比较, 模型组 GAP-43 表达差异无统计学意义($P > 0.05$); 与模型组比较, 髓复康大、中、小剂量组 GAP-43 表达显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 髓复康可以抑制大鼠脑缺血损伤区 CSPGs 的表达, 促进 GAP-43 的表达, 可能通过改善脑缺血损伤区轴突再生的微环境, 从而促进脑缺血损伤后轴突的再生。

[关键词] 髓复康; 脑缺血损伤; 硫酸软骨素蛋白多糖; 促轴突生长因子; 生长相关蛋白 43

Effect of Suifukang on the Expression of Chondroitin Sulfate Proteoglycans and Axonal Growth Promoting Factors in Ischemic Brain Region of Cerebral Ischemic Rats

ZHANG Ping, CAO Zhi, ZHANG Shimin, ZHENG Gelin

(Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102)

ABSTRACT Objective To study the effect and mechanism of Suifukang (brain-marrow rehabilitation formula) on cerebral ischemic injury in rats. **Methods** Totally 144 rats were randomized into the normal group, model group, positive control group and Suifukang large-dose, middle-dose and small-dose groups, with 24 in each. The right middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion rat models were established in each group except the normal group. The rats in Suifukang large-dose, middle-dose and small-dose groups were gavaged with 5 g, 2.5 g and 1.25 g crude drug of Suifukang per 100 g once daily. The positive control group was given intraperitoneal injection of 30 mg/kg methylprednisolone every other day. The model group was gavaged with the same amount of normal saline and the normal group received no treatment. The brain tissues were removed in each group on the 15th and 30th day of administration. The expression of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) and growth associated protein 43 (GAP-43) in ischemic brain region of rats in each group was detected by immunohistochemistry method. **Results** In-group comparisons showed that there was no significant difference in the expression of CSPGs and GAP-43 on the 8th, 15th and 30th day of administration ($P > 0.05$). Comparing with the normal group, the expression of CSPGs was significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the expression of CSPGs in the administration groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of GAP-43 between the normal group and model group ($P > 0.05$). Comparing with the model group, the expression of GAP-43 in the Suifukang large-dose, middle-dose and small-dose groups was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Suifukang can inhibit the expression of CSPGs and promote the expression of GAP-43 in ischemic brain region of rats, which may be related to improving the microenvironment of axonal regeneration in ischemic brain region and promoting axonal regeneration after cerebral ischemia.

Keywords Suifukang; cerebral ischemic injury; chondroitin sulfate proteoglycans; axonal growth promoting factors; growth associated protein 43

脑缺血损伤的修复再生一直是神经科学领域内亟待解决的难题,在影响损伤神经元轴突再生的微环境中,致密的胶质瘢痕不仅是轴突再生的物理屏障,对轴突再生起着直接的阻碍作用;而且胶质瘢痕分泌的以硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs)为主的大量抑制因子,也构成严重阻碍轴突再生的化学屏障^[1]。促轴突生长因子生长相关蛋白 43(GAP-43)是轴突再生的特异性标记蛋白,其表达增加表明损伤区内的轴突再生增加^[2]。髓复康是益气活血补肾方,具有益气升阳、活血通络、补肾生髓的功能。研究证实,髓复康在离体和在体实验中均可明显抑制胶质瘢痕的形成^[3]。本实验通过观察髓复康对 CSPGs 及 GAP-43 的调节作用,探讨其促轴突再生机制,为中药治疗脑缺血损伤修复提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级雄性 SD 大鼠 144 只,体重 220~240 g,购自北京维通利华实验动物中心,动物合格证号:SCXK(京)2007-0001。

1.2 药物与试剂

注射用甲基强地松龙(40mg/支,大连辉瑞制药有限公司,批号 040112);髓复康(主要成分为黄芪 30 g、葛根 10 g、三七 10 g、川芎 6 g 等,由中国中医科学院望京医院药房提供,水煎煮,将药物浓缩至含生药 2.5 g/ml,置于 4℃ 冰箱中备用)。乙醇、二甲苯(北京化学试剂公司);哈瑞氏苏木素染液(天合力恩试剂公司);CSPGs 一抗(英国 Abcam 公司);GAP-43 一抗(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.3 仪器

EG1150H 包埋机、RM2235 切片机、HI1210 摊片机(德国 Leica 公司);BX51 显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组

将 144 只大鼠以随机数字表法分为正常组、模型组、阳性对照组及髓复康大、中、小剂量组,各 24

只。各组根据给药时间不同,采用随机数字表法分为 8 天、15 天和 30 天 3 个时间点,每个时间点 8 只大鼠。参照 Koizumi 法^[4]制作大鼠右侧大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注模型,除正常组外,其余各组大鼠从颈总动脉分叉处插入 4-0 号丝线,沿颈内动脉进入距离颈总动脉分叉处约 2.0 cm 处停止,1 h 后拔出丝线进行缺血再灌注。术后待动物清醒后,髓复康大、中、小剂量组分别灌胃髓复康浓缩剂 5 g/100 g、2.5 g/100 g、1.25 g/100 g,每日 1 次;阳性对照组腹腔注射甲基强地松龙 30 mg/kg,隔日 1 次;模型组灌胃等量生理盐水;正常组同期喂养不做任何处理。各时间点用 0.4%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,4%多聚甲醛(pH 值 7.2~7.4)经心脏主动脉插管灌注固定。取全脑,常规脱水,石蜡包埋,制备全脑病理切片,备用。

2.2 检测指标与方法

免疫组织化学方法检测各组大鼠脑缺血损伤区 CSPGs 和 GAP-43 蛋白的表达。全脑病理切片,常规脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭,抗原修复,一抗 37℃ 孵育 2 h, PBS 清洗,二抗 37℃ 孵育 1 h, PBS 清洗, DAB 显色,苏木素复染,封片。通过图像分析软件(MIAS 4.0)半定量 CSPGs 和 GAP-43 蛋白的表达量。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行统计分析,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠不同时间点脑缺血损伤区 CSPGs 蛋白表达比较

表 1 示,术后 8 天、15 天和 30 天各组组内 CSPGs 表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 8 天、15 天和 30 天,与正常组比较,模型组出现 CSPGs 强阳性表达($P < 0.01$);各给药组 CSPGs 表达均低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与髓复康小剂量组比较,髓复康大剂量组、中剂量组 CSPGs 表达差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间点脑缺血损伤区 CSPGs 表达比较(OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	8 天	15 天	30 天
正常组	8	4.12±1.12**	4.12±1.12**	4.12±1.12**
模型组	8	35.71±6.32	36.65±5.21	31.12±2.36
阳性对照组	8	25.94±4.95*	23.14±3.75*	20.27±1.77*
髓复康大剂量组	8	12.89±1.44**△	14.60±2.79**△	8.75±1.13**△
髓复康中剂量组	8	10.22±2.79**△△	12.09±2.30**△	7.64±2.01**△△
髓复康小剂量组	8	26.03±5.13*	22.53±4.76*	21.16±5.71*

注:与模型组同时间比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与髓复康小剂量组同时间比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠不同时间点脑缺血损伤区 GAP-43 表达比较(OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	8 天	15 天	30 天
正常组	8	6.10±0.99	6.10±0.99	6.10±0.99
模型组	8	9.15±1.32	13.30±1.20	16.22±2.31
阳性对照组	8	11.84±2.13	14.49±1.90	15.39±2.07
髓复康大剂量组	8	22.37±3.01**△	28.23±2.01**△	30.72±1.39**△
髓复康中剂量组	8	26.60±3.05**△△	32.02±2.51**△△	34.91±4.71**△△
髓复康小剂量组	8	12.03±0.75*	16.35±3.50*	14.87±2.31*

注:与模型组同时时间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与髓复康小剂量组同时时间比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

3.2 各组大鼠不同时间点脑缺血损伤区 GAP-43 蛋白表达比较

表 2 示,术后 8 天、15 天和 30 天,各组组内 GAP-43 的表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。术后 8 天、15 天和 30 天,与正常组比较,模型组 GAP-43 表达略增强,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,阳性对照组 GAP-43 表达差异无统计学意义($P>0.05$);与髓复康小剂量组比较,髓复康大剂量组、中剂量组 GAP-43 表达差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

4 讨论

成年哺乳动物中枢神经系统损伤后轴突不能有效再生,往往是不可逆性功能丧失的主要原因。研究表明,并不是中枢神经元自身的特性使其不能修复再生,若置于合适的微环境中,受损伤神经元轴突是可以再生的^[5]。CSPGs 是神经系统细胞外基质成分中的一类蛋白多糖。Davis 等^[6]发现,将周围神经系统神经元植入大鼠的脊髓后能够再生,但再生的轴突达到 CSPGs 丰富的损伤区就停滞不前,这表明 CSPGs 对中枢神经系统损伤后的轴突再生有显著的抑制作用。Zou 等^[7]发现 CSPGs 能够抑制轴突生长蛋白 GAP-43 的表达及作用。

刘伟等^[8]报道,滋补肝肾的中药可以通过调节星型胶质细胞的活性从而增加 GAP-43 的表达从而达到促进缺血性脑卒中后神经轴突再生的功效。髓复康由黄芪、葛根、三七、川芎等组成,是益气活血补肾方,功能为益气升阳、活血通络、补肾生髓。中医认为,脑缺血的主要病机是机体阴阳失调,肝肾阴精受损,风火痰气血等病理产物旋而生。其病机关键为肝肾阴虚,肝肾阴虚成于中风之先,是脑梗死发病的根本,发病后贯穿于脑梗死的整个病理过程,且在其发展演变和治疗过程中往往进一步伤耗阴津,故宜采用滋补肝肾法进行治疗。本实验证明,髓复康能够抑制损伤区 CSPGs 蛋白的表达,同时可以增加 GAP-43 的表达,进而说明髓复康能够抑制胶质瘤

痕形成的化学屏障的作用,从而达到促进轴突再生的功能,进一步阐明了髓复康促进脑缺血损伤后神经损伤修复再生的作用机制。

参考文献

- [1] Li HP, Homma A, Sango K, et al. Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site [J]. Neurosci Res, 2007, 85(3):536-547.
- [2] Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, et al. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1):543-554.
- [3] Huang Y, Zhao Y, Tian W, et al. Experimental Study on Effect of Suifukang in Promoting Repairing and Regeneration of Nerve Fibers in Spinal Cord [J]. Chin J of Integr Med, 2007, 27(8):724-727.
- [4] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Stroke, 1986, 16(8):1-8.
- [5] Young W, Rappaport ZH, Chalif DJ, et al. Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia [J]. Stroke, 1987, 18(4):751-759.
- [6] Davis M, Whitely T, Turnbull DM, et al. Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage [J]. Acta Neurochir Suppl, 1997, 70:56-58.
- [7] Zou J, Meubauer De, Dyess K, et al. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue [J]. Exp Neurol, 1998, 154(2):654-662.
- [8] 刘伟, 周永红, 付先军, 等. 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 [J]. 中医杂志, 2006, 47(5):378-380.

(收稿日期:2012-06-14;修回日期:2012-12-10)

[编辑:洪 涛]