

三七通舒胶囊对大鼠局灶脑缺血再灌注后神经功能保护作用☆

张微微, 周小英

解放军北京军区总医院神经内科, 北京市 100700
张微微☆, 女, 1952年生, 上海市人, 汉族, 1995年瑞典乌普萨拉大学毕业, 博士, 主任医师, 主要从事脑血管病治疗的研究。
zhangzhww@sina.com
中图分类号: R743 文献标识码: A 文章编号: 1671-5962-(2005)41-0099-03
收稿日期: 2004-11-23 修回日期: 2005-10-06 (14/SY/YQ)

Protective effects of sanchi *Tongshu* capsule on neural function after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats Zhang Weiwei, Zhou Xiao-ying, Department of Neurology, General Hospital of Beijing Military Area Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China
Zhang Wei-wei☆, Doctor, Chief physician, Department of Neurology, General Hospital of Beijing Military Area Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China zhangzhww@sina.com
Received: 2004-11-23 Accepted: 2005-10-06

Abstract

AIM: To observe the neural protective effects of sanchi *Tongshu* capsule (composed of sanchi mainly, produced by CHENGDU HOIST INC., LTD. with the batch number of 940316) after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats.

METHODS: The experiment was conducted at the Department of Neurosurgery, Affiliated Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences between February 2003 and April 2004. Ischemia/reperfusion rat models were made with Koizumi method. Eighty-eight rats were assigned randomly into 3 groups: sham operation group (8 rats), ischemia/reperfusion group, reperfusion was conducted at 2 hours after ischemia. According to the different sampling time after reperfusion, there were 1, 3, 7, 10 and 15 days, totally 5 groups (8 rats in each group). Intervention group, after ischemia for 2 hours and reperfusion for 2 hours, drug was given. According to the different sampling time after reperfusion, there were also 1, 3, 7, 10 and 15 days, totally 5 groups (8 rats in each group). Materials were drawn at every phase point. Pathological changes were observed with hematoxylin-eosin staining, and content of water in brain was detected; Vascular endothelial growth factor (VEGF) in brain tissue and expression of laminin were observed with immunohistochemical method. Quantitative analysis was performed with media mix color pathological image analysis system. Changes of ultrastructure in ischemia brain tissue were observed with oxalic-potassium pyroantimonate electron microscope cytochemistry technique.

RESULTS: Level of content of brain water in ischemia/reperfusion group and intervention group was obviously higher than that in sham operation group [taking ischemia/reperfusion for 7 days as an example, it was $(70.79 \pm 2.44)\%$, $(68.11 \pm 2.78)\%$, $(65.76 \pm 2.57)\%$, $P < 0.05$ in the ischemia/reperfusion group, intervention group and sham operation group, respectively]. There were only a little VEGF expression in the sham operation group, while many laminins [VEGF was (18.37 ± 4.86) per high power field; laminin was (62.76 ± 5.99) per high power field]. In the ischemia/reperfusion group, with the prolongation of reperfusion time, VEGF around infarcted focus showed increasing trend [it was (35.34 ± 6.64) , (56.96 ± 5.86) , (113.86 ± 9.05) per high power field, respectively at 1, 3 and 10 days of reperfusion], while the expression of laminin weakened, and then strengthened gradually [it was (30.86 ± 4.94) , (56.74 ± 4.16) , (88.36 ± 3.03) per high power field, respectively at 1, 3 and 10 days of reperfusion]. In the intervention group, with the prolongation of administration time, the expressions of the two were the same to that in the ischemia/reperfusion group, and the expressions of VEGF and laminin in the intervention group were stronger than those in the ischemia/reperfusion group.

CONCLUSION: The sanchi *Tongshu* capsule probably reduce the brain water, enhance expressions of VEGF and laminin and relieve brain damage after ischemia/reperfusion. Thus, it has the effects of certain neural protection and accelerating repair of nervous tissue.

Zhang WW, Zhou XY. Protective effects of sanchi *Tongshu* capsule on neural function after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2005;9(41):99-101[China]

张微微, 周小英. 三七通舒胶囊对大鼠局灶脑缺血再灌注后神经功能保护作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(41):99-101 [www.zgckf.com]

摘要

目的: 观察三七通舒胶囊(主要成分是三七, 成都华神集团股份有限公司

生产, 批号: 940316)对大鼠局灶脑缺血再灌注性损伤后的神经保护作用。方法: 实验于2003-02/2004-04在首都医科大学附属天坛医院神经外科试验中心完成。采用Koizumi法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 88只大鼠随机分3组: 假手术组(8只); 缺血再灌注组, 缺血2h后进行再灌注, 依照再灌注后取样时间点的不同分为1, 3, 7, 10, 15 d共5组(每组8只); 三七通舒胶囊药物干预组, 缺血2h再灌注后2h即开始给药, 依照再灌注后取样时间点的不同亦分为1, 3, 7, 10, 15 d共5组(每组8只)。各时相点取材, 苏木素-伊红染色观察病理改变, 并进行脑含水量测定; 免疫组化观察脑组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及层粘连蛋白的表达变化, 并使用多媒体彩色病理图像分析系统进行定量分析; 利用草酸-煮钨酸钾电镜细胞化学技术观察缺血脑组织的超微结构改变。

结果: 脑缺血再灌注组与药物干预组脑含水量明显高于假手术组[以缺血再灌注7d为例, 缺血再灌注组、药物干预组、假手术组分别为 $(70.79 \pm 2.44)\%$, $(68.11 \pm 2.78)\%$, $(65.76 \pm 2.57)\%$, $P < 0.05$]。假手术组大鼠脑组织仅见少量VEGF表达, 而层粘连蛋白表达较多[VEGF为 (18.37 ± 4.86) 个/高倍视野, 层粘连蛋白为 (62.76 ± 5.99) 个/高倍视野]。缺血再灌注组中, 随着再灌注时间的延长, 梗死灶周边区VEGF呈逐渐增强的趋势[再灌注1, 3, 10 d分别为 (35.34 ± 6.64) , (56.96 ± 5.86) , (113.86 ± 9.05) 个/高倍视野], 而层粘连蛋白的表达呈先减弱后逐渐增强的趋势[再灌注1, 3, 10 d分别为 (30.86 ± 4.94) , (56.74 ± 4.16) , (88.36 ± 3.03) 个/高倍视野]。药物干预组中, 随给药持续时间的延长, 二者表达趋势同缺血再灌注组, 且三七通舒胶囊药物干预组大鼠其VEGF、层粘连蛋白的表达较缺血再灌注组更强。

结论: 三七通舒胶囊可能减少缺血再灌注后脑含水量并增强VEGF及层粘连蛋白的表达, 减轻缺血再灌注性脑损伤, 从而起到了一定的神经保护及促进神经组织修复的作用。

主题词: 脑缺血; 再灌注; 内皮生长因子; 层粘连蛋白; 免疫组织化学; 三七

0 引言

临床上治疗脑梗死的药物很多, 三七通舒胶囊是新近研制出来的一种脑梗死治疗性药物, 本实验通过制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 探讨该药对大鼠缺血再灌注性脑损伤的保护性作用。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计、对照实验。

单位: 解放军北京军区总医院的神经内科。

材料: 实验于2003-02/2004-04在首都医科大学附属天坛医院神经外科试验中心完成。选取清洁级成年SD大鼠88只, 雌雄不拘, 体质量250~300 g, 标准环境下饲养, 由北京天坛医院动物实验中心提供[动物合格证号: SYXK(京)2003-001]。免疫组织化学浓缩型血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体及SABC试剂盒购自武汉博士德公司, 层粘连蛋白抗体(90518113F, 0.1 mL)购自迈新公司。三七通舒胶囊是成都华神集团股份有限公司生产, 批号: 940316, 主要成分为三七。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者、实施和评估为第二作者, 未采用盲法评估。

方法: 脑缺血再灌注动物模型制备: 采用Koizumi

等^[1]方法制备大鼠脑缺血再灌注动物模型,88只大鼠随机分为3组:假手术组8只,只进行手术,不栓塞;缺血再灌注组40只,缺血2h后进行再灌注,分别于再灌注后1,3,7,10,15d取样,每个时间点8只;三七通舒胶囊药物干预组40只,缺血2h再灌注后2h腹腔注射给予三七通舒胶囊(50 mg/kg),1次/d,分别于再灌注后1,3,7,10,15d取样,每个时间点8只。

脑含水量测定:采用干湿重法测定脑组织脑水含量^[2],相应时间点麻醉处死大鼠,经枕骨大孔处撬开颅骨,小心拔出完整脑组织,分成两个半球,从尾状核层面冠状切开,每块厚2 mm,从尾状核层面缺血区取1 mm³大小脑组织,每块组织称湿重后,在110℃干燥箱中烘干48 h,称取干重,脑水含量=(湿重-干重)/湿重×100%。

光镜观察病理改变:麻醉动物成功后断头处死,速取脑组织放入40 g/L多聚甲醛缓冲液(pH=7),4℃固定24 h,石蜡包埋。按Pellegrion大鼠脑冠状图谱,由额极至枕极间隔2 mm连续切片,切片厚5 μm,苏木素-伊红染色,显微镜下观察其组织学改变。

电镜观察超微结构:采用草酸-焦锑酸钾电镜细胞化学技术对缺血2h后再灌注3d组、三七通舒胶囊药物干预3d组及三七通舒胶囊药物干预10d组各1只大鼠进行脑组织超微结构观察。大鼠以100 g/L水合氯醛(4 mL/kg)腹腔注射麻醉后,打开胸腔,经左心室穿刺入升主动脉快速灌注生理盐水200 mL,剪开右心耳,随后在30 min内灌注4℃,25 g/L戊二醛-20 g/L多聚甲醛磷酸盐缓冲液200 mL,断头经枕骨大孔开颅,取出脑组织,取材于尾状核层面缺血周边区组织,大小约1 mm³,放入4℃,25 g/L戊二醛-20 g/L多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定,后经30 g/L锇酸固定,700~1 000 mL/L梯度乙醇、丙酮逐级脱水,环氧树脂Epon-812常规电镜包埋。经LKB-V型超薄切片机做半薄切片,天青Ⅱ-亚甲基兰染色光镜观察;超薄切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重电子染色后,日立H-600透射电镜观察,摄片。

免疫组化观察VEGF及层粘连蛋白的表达^[3]:给予相应时间点各组大鼠腹腔麻醉,经左心室灌注,具体方法同上,灌注液及固定液更换为4℃,40 g/L多聚甲醛磷酸盐缓冲液,固定24 h后按Pellegrion大鼠脑冠状图谱冠状位切块,取材于大脑中动脉供血区脑组织,每块厚度2 mm。经乙醇脱水,二甲苯透明,低熔点石蜡包埋,5 μm连续切片备用。采用SABC法^[4]进行免疫组化染色。

图像分析:观察大鼠脑组织皮质、基底核、海马、脑室旁等部位神经元、血管内皮细胞、胶质细胞VEGF的表达结果,以及脑微血管基底膜层粘连蛋白的表达结果。便于分析,仅对鼠位于梗死周边区的皮质部分

进行VEGF阳性细胞计数及层粘连蛋白阳性微血管计数。每只大鼠选3张组织片,每一时相点6只大鼠共取18张组织片,首选在100倍镜下进行观察,400倍镜下进行计数。每张组织片随机选40个VEGF阳性反应的胞体及40个层粘连蛋白阳性反应的微血管,输入MPIAS-500多媒体彩色病理图像分析系统(由同济医科大学计算机教研室研制),对皮质缺血区VEGF的阳性细胞以及层粘连蛋白阳性反应的微血管进行吸光度值测定。所得数据经统计学处理后,分别求出各时相点皮质缺血区VEGF阳性反应的细胞、层粘连蛋白阳性反应的微血管的平均数目及其平均灰度值(A值)。

主要观察指标:各组脑水含量测定;光镜下苏木素-伊红染色结果;电镜观察结果;各组VEGF阳性细胞数、层粘连蛋白阳性微血管数及平均灰度值(A值)。

统计学分析:由解放军北京军区总医院神经内科朱光明采用SPSS 12.0进行LSD方差分析,各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入动物88只,进入结果分析86只,缺血2h后再灌注1d和缺血2h后再灌注3d分别死亡1只。

2.2 统计推断 脑水含量测定结果见表1。

表1 各组脑含水量变化测定结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	t(取样)/d				
		1	3	7	10	15
假手术组	8	65.76±2.57	-	-	-	-
缺血再灌注组	38	68.11±2.07	72.64±3.14	70.79±2.44	68.57±3.57	67.11±2.74
药物干预组	40	67.01±3.57	70.21±3.86	68.11±2.78	65.68±3.85*	64.68±3.96*

与假手术组比较,* $P > 0.05$;其余各组间均有显著差异, $F=12.31, P < 0.05$

光镜下苏木精-伊红染色结果:与缺血再灌注组相比,药物干预组大鼠脑组织中皱缩或肿胀神经元数目少,胞浆肿胀较轻,胶质细胞肿胀不明显,血管周围间隙水肿和渗出较轻。多形核中性粒细胞浸润不明显。

电镜观察结果:与缺血再灌注组相比,药物干预组大鼠脑组织中胞核核膜完整、连续,无皱缩;线粒体轻度肿胀,但嵴完整,粗面内质网扩张不明显。血管内皮细胞及足突轻度肿胀,病理改变轻于缺血再灌注组。

免疫组织化学染色结果:假手术组中,大鼠脑组织仅见少量VEGF表达,而层粘连蛋白表达较多;缺血再灌注组中,随着再灌注时间的延长,梗死灶周边区VEGF呈逐渐增强的趋势,而层粘连蛋白的表达呈先减弱后逐渐增强的趋势;药物干预组中,随给药持续时间的延长,二者表达趋势同缺血再灌注组,且三七通舒胶囊药物干预组大鼠其VEGF、层粘连蛋白的表达较缺血再灌注组更强。见表2。

表2 各组 VEGF 阳性细胞数、层粘连蛋白阳性微血管数及平均灰度值(A 值)比较

组别	n	VEGF 细胞		层粘连蛋白	
		阳性细胞数 (个/高倍视野)	平均灰度值(A)	阳性微血管数 (个/高倍视野)	平均灰度值(A)
假手术组	8	18.37±4.86	142.86±10.64	62.76±5.99	171.65±7.86
再灌注 1d 组	7	35.34±6.64	146.14±11.78	30.86±4.94	155.86±6.84
再灌注 3d 组	7	56.96±5.86	150.93±12.85	56.74±4.16	165.96±6.66
再灌注 7d 组	8	97.65±7.95	158.12±10.89	75.08±5.13	171.13±7.29
再灌注 10d 组	8	113.86±9.05	164.73±12.93	88.36±3.03	177.02±5.86
再灌注 15d 组	8	128.53±8.98	168.45±8.75	99.93±5.23	183.45±6.95
药物干预 1d 组	8	45.36±5.85	150.96±8.74	46.56±4.84	164.16±10.83
药物干预 3d 组	8	79.96±6.74	155.57±11.45	69.38±5.28	171.81±11.02
药物干预 7d 组	8	120.64±7.01	163.75±9.73	96.18±7.01	180.91±11.43
药物干预 10d 组	8	144.74±8.35	169.53±9.85	103.39±9.81	184.52±12.73
药物干预 15d 组	8	168.57±9.84	174.34±11.68	118.76±10.19	191.07±11.63
F		16.64	15.34	14.98	16.10

缺血再灌注各组、药物干预各组与假手术组相比,有显著性差异, $P < 0.05$; 药物干预各组与缺血再灌注各组对应时间点相比,有显著性差异, $P < 0.05$

3 讨论

本实验中脑水肿的进展程度于缺血再灌注损伤后第3天达高峰,用三七通舒胶囊药物干预可使脑水肿程度减轻,治疗第10天恢复正常,与缺血再灌注对照组有明显差异,说明三七通舒胶囊可能有控制缺血再灌注后脑含水量增加的作用,对大鼠缺血再灌注性损伤后脑水肿的形成与发展有一定的控制作用。

本实验中假手术组光镜观察未见异常改变;药物干预组病理改变轻于缺血再灌注组。提示三七通舒胶囊可能保护缺血再灌注后受损神经元,并有效抑制血管周围间隙的水肿及渗出,从而起保护作用。本实验中假手术组电镜观察未见异常改变;药物干预组病理改变亦轻于缺血再灌注组。进一步证实三七通舒胶囊在缺血再灌注性脑损伤过程中可能起保护作用。

VEGF 参与了缺血再灌注性脑损伤的病理发展和修复过程。脑缺血发生后,梗死周边区由于缺血缺氧,引起反应性的 VEGF 蛋白表达水平上升,通过保护受损神经元以及促进侧支循环的建立而改善缺血症状。脑缺血再灌注后,梗死周边区微血管增生。其增生的范围与程度直接关系到缺血区血流的改善,影响神经元生理功能的恢复。VEGF 可调节血管生成的大多数环节,包括细胞外基质的降解、内皮细胞迁移、增生和管腔形成,可独自诱导新生血管生成^[5-14]。此外,VEGF 还有神经营养作用,它们在新血管生成之前,对神经系统起着直接保护作用,这有助于延长细胞的存活时间,直到新血管生成。

本实验发现,缺血再灌注组中,随着缺血再灌注时间的延长,梗死周边区 VEGF 表达逐渐增强,有助于缺血脑组织建立侧支循环,以便及早恢复血液供应,使缺血缺氧对脑组织的损伤降至最低程度;药物干预组中,随给药持续时间的延长,VEGF 表达亦呈逐渐增强的趋势,且该组 VEGF 表达强度明显强于缺血再灌注组。提示三七通舒胶囊可能增强 VEGF 的表达,促进缺血区域内皮细胞增殖和新生血管生成,从而起到减轻缺血再灌注性脑损伤的作用。

层粘连蛋白含有一些特异性结构序列,在 α 链的

近 C 端存在 IK-VAV 序列,具有血管生成的作用^[15],可促进新生血管生成。在 β 链的短臂杆状区含有一段五肽序列 YIGSR,与表皮生长因子具有同源性^[16],可参与内皮细胞之间的相互作用并促进内皮细胞分化、铺展。体内实验表明,内皮生长因子 33~42 能促进新生血管生成^[17],间接证实了层粘连蛋白在血管生成中的作用。亦有研究证实,相对分子量 67 000 的层粘连蛋白-R 的表达允许增殖的内皮细胞互相黏着并形成新的血管^[18]。层粘连蛋白也是一种富有潜力的神经突起促进因子,具有类神经生长因子的营养神经的作用,对神经元的存活、增生和神经突起的生长有很大的促进作用,在脑缺血再灌注过程中亦起着很重要的作用。

本实验发现缺血再灌注组中,随着缺血再灌注时间的延长,梗死周边区层粘连蛋白表达呈先减弱而后呈逐渐增强的趋势。再灌注早期(再灌注 1d 内)层粘连蛋白表达减弱的原因可能是基底膜严重破坏致使层粘连蛋白等基底膜组分大量裂解;而再灌注 1d 后,层粘连蛋白表达呈逐渐增强的趋势,这有助于内皮细胞血管化程度加强和加快。药物干预组中,随着给药持续时间的延长,其表达趋势同缺血再灌注组,且该组层粘连蛋白的表达较缺血再灌注组为更强。提示三七通舒胶囊还可能增强层粘连蛋白的表达,促进缺血区域新生血管生成,从而改善梗死周边区的血液供应和侧支循环,促进脑损伤的愈合。

4 参考文献

- 1 Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemia brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism infarcts in the ischemia area. *Jpn J Stroke* 1986;8(11):1-8
- 2 Rosenberg CA, Mun-Bryce S, Wesleg M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rat. *Stroke* 1990;21: 801-7
- 3 Zhang WW. The angiopathy of subcortical arteriosclerotic encephalopathy (Binswanger's disease): immunohistochemical studies using markers for components of extracellular matrix, smooth muscle actin and endothelial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;93 (3): 219-24
- 4 Zhang WW. Amyloid angiopathy of the human brain: immunohistochemical studies using markers for components of extracellular matrix, smooth muscle actin and endothelial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;96 (6): 558-63
- 5 Brogi E, Wu T, Namiki A, et al. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular muscle cells, where hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;90: 649-52
- 6 Issa R, Krupinski J, Bujny T, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest* 1999;79: 417-25
- 7 Plate KH, Beck H, Danner S, et al. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;8: 654-66
- 8 Proescholdt MA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58: 613-27
- 9 Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, et al. VEGF and flt expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996;27: 1865-73
- 10 Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58: 313-20
- 11 Risau W. What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev* 1996;15: 149-51
- 12 Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000;156: 956-76
- 13 Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, et al. VEGF and flt expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996;27: 1865-73
- 14 Samoto K, Ikezaki K, Ono M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 1995;55: 1189-93
- 15 Kibbey MC, Grant DS, Kleinman HK. Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: an *in vivo* Matrigel model. *J Natl Cancer Inst* 1992;84: 1633
- 16 Nelson J, Scott WN, Allen WE, et al. Murine epidermal growth factor peptide (33-42) binds to a YIGSR specific laminin receptor on both tumor and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271: 26179
- 17 Nelson J, Allen WE, Scott WN, et al. Murine epidermal growth factor (EGF) fragment (33-42) inhibits both EGF and laminin dependent endothelial cell motility and angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55: 3772
- 18 Grant DS, Kibbey MC, Kinsella JL, et al. The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol Res Pract* 1994;190: 854