

复健片促进脑梗死大鼠运动功能康复和神经再生的作用

周永红¹ 胡怀强² 王新陆³

摘要 **目的** 观察中药复方复健片促进脑梗死模型大鼠中枢神经再生的作用,探讨其改善运动功能的机制。**方法** 90 只 Wistar 大鼠随机分为药物组、模型组、假手术组,每组 30 只。用电凝法制备大鼠中动脉闭塞大鼠模型,于造模成功后 6 h 药物组给予复健片水溶液 9 g/kg 灌胃,余 2 组分别给予同等量生理盐水灌胃,每日 1 次,共 2 周。用横木行走实验评定运动功能;用免疫组化法观察模型大鼠梗死周边区脑组织巢蛋白(nestin)、多唾液酸神经细胞黏附分子(polysialic acid neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM)、微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)、生长相关蛋白(growth-associated protein, GAP-43)、突触素(synaptophysin, Syn)的表达,并测定染色平均灰度或光密度值。**结果** 86 只大鼠纳入结果分析。给药 2 周后药物组大鼠神经功能评分明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);药物组大鼠在梗死周边区脑组织 nestin、PSA-NCAM、MAP-2、GAP-43、Syn 各指标表达方面均较模型组明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 复健片可促进神经再生,从而改善脑梗死大鼠运动功能。

关键词 中药复健片;脑梗死;神经再生

Promotion of Compound Fujian Tablet on the Motor Function Rehabilitation and Neurotization in Rats with Cerebral Infarction ZHOU Yong-hong¹, HU Huai-qiang², and WANG Xin-lu³ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Qingdao University, Qingdao (266021), China; 2 Department of Neurology, Jinan Military General Hospital, Jinan (250031), China; 3 Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong (250014), China

ABSTRACT **Objective** To study the effects of Compound Fujian Tablet (FJT) on the neurotization in the cerebral infarction rats and to explore its mechanisms for promoting the motor skills. **Methods** Totally 90 Wistar rats were randomly divided into the drug group, the model group, and the sham-operation group, 30 in each group. The rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was successfully established by electrocoagulation. Six hours after successful modeling, the rats of the drug group were orally administered with 9 g/kg FJT water solution, and the other groups were orally administered with equal volume of normal saline, once a day for two weeks. The motor skills of rats were examined by beam walking test. The expressions of nestin, polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), microtubule-associated protein 2 (MAP-2), growth-associated protein (GAP-43), and synaptophysin (Syn) in the brain tissue around the infarction were observed by immunohistochemical assay. The mean staining gray or the optical density value were detected. **Results** The 86 rats were recruited in the result analysis. After two weeks of administration, the neural function scoring was obviously higher in the drug group than in the model group with statistical difference ($P < 0.01$). The expressions of nestin, PSA-NCAM, MAP-2, GAP-43, and Syn in the brain tissue around the infarction were more obviously enhanced in the drug group than in the model group, showing statistical difference ($P < 0.01$). **Conclusion** FJT can promote neurotization and improve the motor skill recovery after cerebral infarction.

KEYWORDS Compound Fujian Tablet; cerebral infarction; neurotization

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30672745);山东省科技发展计划资助项目(No. 2006GG3202005)

作者单位:1.青岛大学医学院中医教研室(山东青岛 266071);2.济南军区总医院神经内科(济南 250031);3.山东中医药大学临床学院(济南 250014)

通讯作者:周永红, Tel:13793231711, E-mail:doctorzyh@yahoo.com.cn

复健片由何首乌、草决明、桑寄生、海马、淫羊藿组成,为纯中药制剂,具有滋补肝肾作用,是笔者临床治疗脑梗死的经验方。以往的研究表明,复健片可有效治疗脑梗死,改善患者的神经功能缺损评分、日常生活活动能力、智能状况和胰岛素抵抗状态,还可增加梗死周围组织及对侧的局部脑血流^[1];并可促进脑梗死模型大鼠脑血管发生^[2]。为深入探讨其促进运动功能康复的相关机制,作者观察了复健片对脑梗死大鼠脑神经再生的影响。

材料与方法

1 动物 普通级健康 Wistar 雄性大鼠 90 只(山东省实验动物中心提供),12 周龄,体重(300 ± 20)g。单笼饲养 1 周,自由饮水和摄食。饲养室温度 24 ~ 25 ℃,相对湿度 7% 左右,光照明暗比为 13:11。

2 药物 复健片由何首乌、草决明、桑寄生、海马、淫羊藿组成,按 5:5:3:1:1 的比例配制,由山东鲁信药业有限公司生产,批号:20081022023,并按照成人剂量的 20 倍[9 g/(kg · d)]将其制成水溶液,浓度为 0.9 g/mL(即 1 mL/100 g),置于 4 ℃ 冰箱中备用。

3 试剂及仪器 巢蛋白(nestin)、多唾液酸神经细胞黏附分子(polysialic acid neural cell adhesion molecule,PSA-NCAM)、微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2,MAP-2)、生长相关蛋白(growth-associated protein,GAP-43)、突触素(synaptophysin,Syn)等单克隆抗体均由武汉博士德生物工程有限公司提供。Leica 切片机(RM-2135)、Leica QWIN V 3.0 图像分析系统(LA 型)均由德国 LEICA 公司提供。

4 方法

4.1 分组方法 90 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法进行完全随机化分组,分为药物组、模型组、假手术组,每组 30 只。模型组和药物组按下述方法制作大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型,假手术组大鼠行同样开颅术,但不凝闭大脑中动脉,其余操作同模型组。

4.2 MCAO 模型制备方法 按 Tamura A^[3]的方法稍加改进行右侧近端大脑中动脉电凝术。麻醉醒后 24 h 内出现左侧肢体痛刺激收缩现象消失;向左侧倾倒或转圈;提尾时左上肢不能向前伸直为模型复制成功,纳入试验。

4.3 给药及切片制作方法 药物组给予复健片 9 g/kg(相当于成人剂量的 20 倍),配制成药液灌胃,余 2 组分别灌胃给予同等量生理盐水,1 次/天,

共 2 周。于造模成功后 6 h 给药,固体饲料和水自由摄取。实验动物结束喂药、末次观察神经系统症状后,迅速开胸暴露心脏,经升主动脉插管后,先用 100 mL 生理盐水快速冲洗,随后用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲剂心脏灌注约 30 min,灌毕立即取脑浸入上述固定液 1 天,常规脱水、浸蜡、包埋。予正中隆起水平在切片机上行 4 μm 连续冠状切片备用。

4.4 主要指标及检测方法

4.4.1 神经行为评分 采用 Feeney DM 等^[4]的大鼠走横木试验,评价大鼠精细运动功能恢复情况。在治疗前、治疗后由 2 人同时测试评分。

4.4.2 nestin、PSA-NCAM、MAP-2、GAP-43、Syn 的表达测定 采用免疫组织化学法(ABC 法)进行观察。石蜡切片常规脱蜡复水,30%(体积分数)H₂O₂ 1 份 + 蒸馏水 10 份混合,室温 5 ~ 10 min 以灭活内源性酶,蒸馏水洗 10 min × 3 次;滴加复合消化液 10 min,蒸馏水洗 3 次;滴加正常山羊血清封闭液 20 min,不洗,甩去多余液体;分别滴加兔抗鼠 nestin、PSA-NCAM、MAP-2、GAP-43、Syn 一抗,室温下(25 ℃)孵育 2 h,在 4 ℃ 下过夜,PBS 洗 2 min × 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,于室温下 20 min,PBS 洗 2 min × 3 次;滴加 SABC 复合物,于室温下 20 min,PBS 洗 5 min × 4 次;DAB 显色(使用 DAB 显色试剂盒):取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片,于室温下显色,控制反应时间 10 min 左右。蒸馏水多次洗涤,苏木素轻度复染。脱水,透明,中性树胶封片后显微镜下观察。用正常山羊血清和 PBS 分别代替 nestin、PSA-NCAM、MAP-2、GAP-43、Syn 孵育,其余步骤同上,用以检查免疫反应的特异性。

4.4.3 图像分析方法 在脑梗死病灶边缘区随机选取上、下、左、右、中 5 个视野,采用 Leica QwinV3 图像分析系统对切片进行图像分析,测定染色平均灰度或光密度值。全部测量均在相同光学条件下完成。

5 统计学方法 应用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组动物死亡情况分析 实验过程中模型组大鼠有 3 只死亡,药物组大鼠有 1 只死亡,进入结果分析大鼠共 86 只。

2 各组 MCAO 大鼠神经功能评分比较(表 1) 与假手术组比较,给药前模型组与药物组评分均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与假手术组

比较,给药 2 周后药物组和模型组评分均有升高,差异有统计学意义($P<0.01$),与模型组比较,给药 2 周后药物组大鼠神经功能评分升高更显著($P<0.01$)。

表 1 各组神经功能评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	神经功能评分	
		治疗前	治疗后
假手术	30	7.00 $\pm$ 0.00	7.00 $\pm$ 0.00
模型	27	5.10 $\pm$ 0.12 *	5.20 $\pm$ 0.13 *
药物	29	5.09 $\pm$ 0.13 *	5.77 $\pm$ 0.15 * Δ

注:与假手术组同期比较, * $P<0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P<0.01$

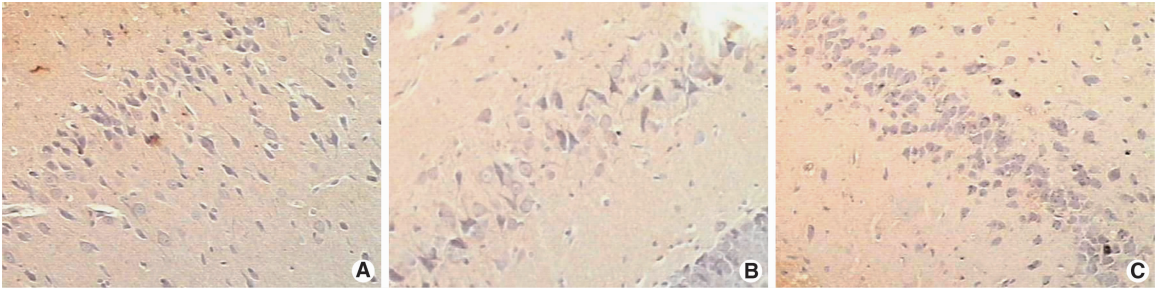
3 各组 MCAO 大鼠 nestin 及 PSA-NCAM 表达比较(图 1、2,表 2) 与假手术组比较,给药 2 周后模型组和药物组 nestin、PSA-NCAM 的染色平均灰度均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,药物组大鼠降低更为显著($P<0.01$)。(注:

表 2 各组 nestin 及 PSA-NCAM 平均灰度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	nestin	PSA-NCAM
假手术	30	203.11 $\pm$ 4.98	141.98 $\pm$ 7.93
模型	27	185.62 $\pm$ 7.63 *	129.56 $\pm$ 1.21 *
药物	29	175.48 $\pm$ 5.67 * Δ	99.76 $\pm$ 2.14 * Δ

注:与假手术组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

染色平均灰度降低为表达增强)。
4 各组 MCAO 大鼠 MAP-2、GAP-43、Syn 表达比较(图 3-5,表 3) 与假手术组比较,给药 2 周后模型组和药物组 MAP-2 及 GAP-43 的光密度值均显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$),与模型组比较,药物组增高更为明显($P<0.01$);与假手术组比较,2 周后模型组 Syn 的光密度值显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),而药物组则显著增高,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为药物组;下图同
图 1 各组 nestin 表达比较(DAB 显色, $\times 100$)

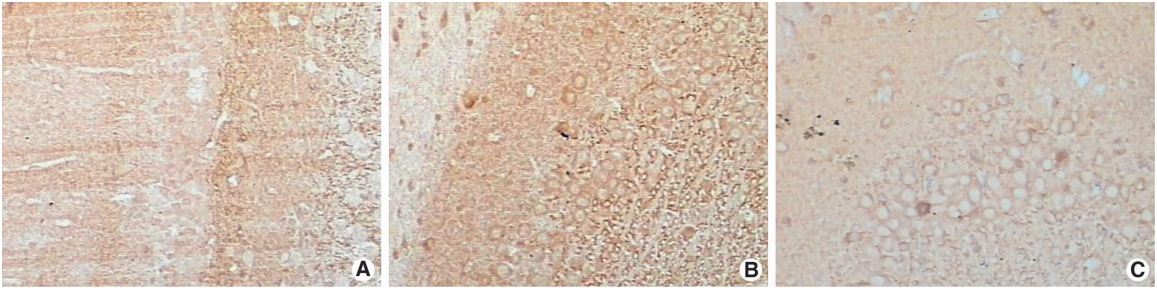


图 2 各组 PSA-NCAM 表达比较(DAB 显色, $\times 100$)

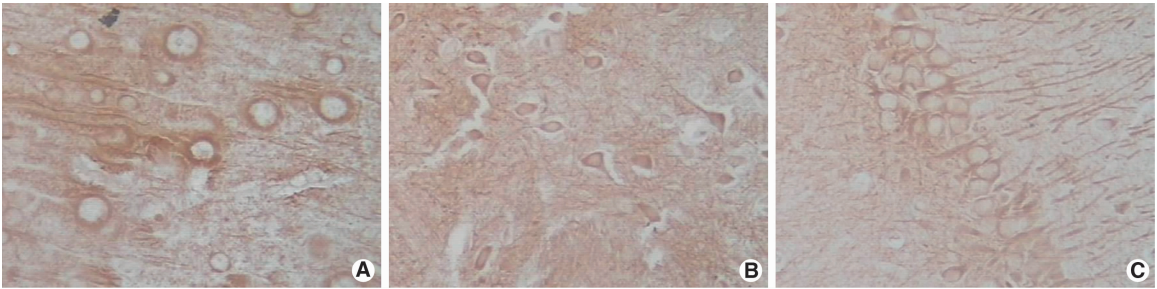


图 3 各组 MAP-2 表达比较(DAB 显色, $\times 200$)



图 4 各组 GAP-43 表达比较(DAB 显色, ×200)

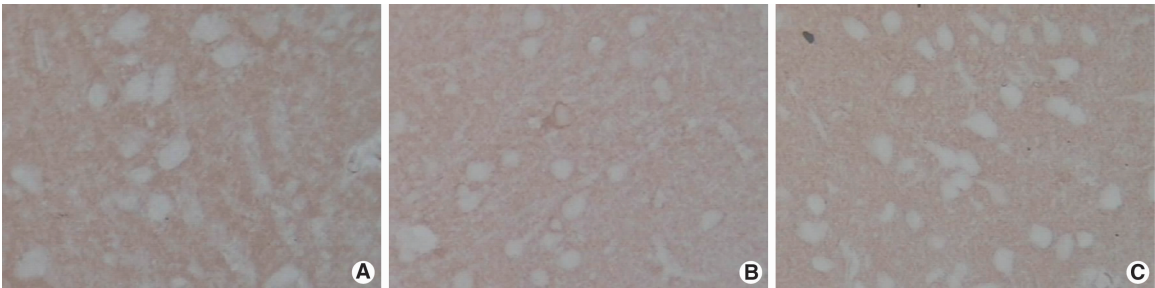


图 5 各组 Syn 表达比较(DAB 显色, ×200)

表 3 各组 MAP-2、GAP-43、Syn 的光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAP-2	GAP-43	Syn
假手术	30	17.23 ± 1.99	15.01 ± 1.13	30.61 ± 3.45
模型	27	18.94 ± 2.27 *	15.37 ± 1.34 *	19.67 ± 2.89 *
药物	29	28.10 ± 1.93 *△	24.32 ± 1.23 *△	32.36 ± 2.23 △

注:与假手术组比较, *P < 0.01;与模型组比较, △P < 0.01

讨 论

中枢神经系统损伤后的神经再生与后期康复效果密切相关,而神经再生与神经元增殖、迁移、分化、轴突生长、突触形成等多方面因素有关^[5,6]。研究促进神经再生的药物及其在脑梗死康复中的作用,有助于指导该病的康复治疗。

神经元增殖是神经再生的关键因素。Nestin 是一种中间丝类型的蛋白,对神经元的分化有促进作用,是神经干细胞的特异性标记标志物,在神经干细胞鉴定中被广泛应用^[7]。PSA-NCAM 参与神经细胞黏附和轴突生长并促进突触可塑性,可以调节神经细胞轴突生长、迁移及目标识别,对神经元前体细胞的迁移有重要作用^[8,9]。MAP-2 既是结构蛋白,又是活跃的功能性蛋白,参与神经元发育、结构稳定、突起形成和突触可塑性调节^[10-12]。GAP-43 在新生神经元的轴突生长、发育中起作用^[13,14]。Syn 既是突触发生的标志,又是突触传递效能水平的反映,其表达可反映突触的发生和密度,是突触重建的重要标志^[15]。

复健片由何首乌、桑寄生、草决明、海马、淫羊藿

组成。方中重施何首乌为君,本品补肝肾、益精血,性虽微温而不燥,既无伤阴之虑,又无一般滋阴药滋腻生湿、困脾碍胃之弊,且味苦还能坚阴,因此重用之以滋补肝肾、填益真阴。复配桑寄生、草决明为臣,助首乌以达滋补肝肾之功。桑寄生质厚而柔,不寒不热,取其补肾养血而可益肝肾、强筋骨之功效,而偏走于肢体筋脉,可治疗中风病之肢体强急拘挛或筋骨羸弱瘫软诸症。草决明既能补肝肾,又能清肝热,且得木性而气浮,能引肾水上注于头面机窍,充养神机。海马、淫羊藿均能温补肾元,稍稍佐之,一取阳中求阴之旨,以助君臣药滋补肝肾,二取其温性来防止滋阴药过于滋腻,三能借其温性令药气开通经络,使气血宣行而无壅滞。以上寥寥数味,相辅成功。补肝肾、调气血、和阴阳,用于卒中之治疗。其特点有四,一则靶向明确,二则阴阳并举,三则肝肾并补,四则峻缓适宜。我们的前期研究成果表明,复健片对缺血性卒中患者的治疗效果显著,对模型大鼠运动功能障碍有改善作用,其机制非常复杂,可能包括防止迟发的远隔神经元的逆行性死亡和(或)促进新的神经元发芽和突触形成;血管系统对缺血的保护;以及血管、胶质、神经轴索再生等^[1,16]。

本研究通过检测 nestin、PSA-NCAM、MAP-2、GAP-43、Syn 的表达,分别从神经元增殖、迁移、分化、轴突生长、突触形成各方面探索复健片对神经再生的影响。结果表明,用药后 nestin 和 PSA-NCAM 染色灰度值显著降低,说明复健片可以促进 nestin 和

PSA-NCAM 的表达,从而促进神经元增殖和迁移;用药后 MAP-2、GAP-43、Syn 的光密度值增加,说明复健片可以促进 MAP-2、GAP-43、Syn 的表达,从而促进神经元分化、轴突生长和突触形成。各项指标均于用药后表达增强,提示复健片能够促进脑梗死后的中枢神经再生。本研究还通过观察神经功能评分,探索复健片对脑梗死后神经功能康复的作用。模型大鼠肢体瘫痪,2 周后模型组神经功能评分有所提高,提示脑梗死后运动功能可有不同程度自然恢复;药物组神经功能评分提高较模型组明显,提示复健片能促进脑梗死后运动功能康复,其机制可能与促进神经再生的作用相关。

参 考 文 献

- [1] 周永红.复健胶囊治疗缺血性卒中后遗症 30 例临床研究[J]. 中医杂志, 2002, 43(5): 355-356.
- [2] 周永红,王新陆,胡怀强. 中药对大鼠脑中动脉闭塞模型大鼠脑血管发生的作用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2006, 13(6): 351-354.
- [3] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1(1): 15.
- [4] Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury[J]. Science, 1982, 217(4562): 855-857.
- [5] 李常新,黄如训. 神经发生及其对实验性脑卒中康复的影响[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2003, 11(2): 138-140.
- [6] Price J, Uwango D, Peters S, et al. Neurotransplantation in neurodegenerative disease: a survey of relevant issues in developmental neurobiology[J]. Novartis Found Symp, 2000, 231(2): 148-165.
- [7] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. Cell, 1990, 60(4): 585-595.
- [8] De-Stefano ME, Leone L, Paggi P. Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in the neuroplasticity induced by axonal injury in the avian ciliary ganglion[J]. Neuroscience, 2001, 21(103): 1093-1104.
- [9] Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 14895-14900.
- [10] Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity and degeneration[J]. J Neurosci Res, 1992, 33(4): 505-512.
- [11] Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD et al. Microtubular protein proteolysis in focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(6): 1189-1202.
- [12] Dawson DA, Hallenbeck JM. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP-2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(1): 170-174.
- [13] Skene JHP, Jacobson RD, Snipe GJ, et al. Protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth cone membranes[J]. Science, 1986, 233(4765): 783-786.
- [14] 杨辉. GAP-43 表达与神经生长可塑性的关系[J]. 国外医学生理·病理与临床分册, 1995, 15(2): 117-118.
- [15] Vsnlookeren CM, Oestreicher AB, Van Bergen Enhenegouwen MP, et al. Ultrastructure double localization of B-GAP43 and synaptophysin (P38) in the neonatal and adult rat hippocampus[J]. J Neurocytol, 1990, 19(6): 948-961.
- [16] 周永红,胡怀强,张玉杰,等. 中药对脑梗死大鼠运动功能及神经再生微环境的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 68-71.

(收稿:2011-06-14 修回:2012-08-09)