

· 论著 ·

滋肾通络方对局灶性脑缺血大鼠脑组织 脑源性神经营养因子蛋白含量的影响

王华 陈泽涛

【摘要】 目的 观察滋肾通络方对 MCAO 大鼠脑组织脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 蛋白含量的变化,以探讨 BDNF 在脑缺血中的意义及滋肾通络方对缺血周围区神经细胞损伤修复的作用。**方法** 制作 MCAO 大鼠模型,随机分为假手术组、模型组、中药高剂量组、中药低剂量组和西药组。灌胃 20 天后,取大鼠脑组织,用免疫组织化学法检测各组 BDNF 的蛋白表达。**结果** 假手术组海马区几乎见不到 BDNF 阳性细胞表达;模型组切片染色增强,阳性细胞略有表达;西药组、中药低剂量组及高剂量组均见到切片染色强,BDNF 阳性细胞强表达,尤以中药高剂量组阳性细胞表达最强。**结论** BDNF 与损伤后神经元的修复作用有关。滋肾通络方可通过调节 BDNF 的合成,促进神经细胞的存活和损伤修复,从而减轻缺血性脑损伤。

【关键词】 滋肾通络方; MCAO 大鼠; 脑源性神经营养因子基因表达

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.08.003

Influence of nourishing kidneys and unblocking collaterals formula on the BDNF protein in the MCAO rat's brain tissue WANG Hua, CHEN Ze-tao. Department of Health Care, Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China

Corresponding author: CHEN Ze-tao, E-mail: Zetaochen2007@126.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of the nourishing kidneys and unblocking collaterals formula on the BDNF protein amount in MCAO rat's brain tissue and explore the significance of BDNF in cerebral ischemia and the effect of nourishing kidneys and unblocking collaterals formula on recovery of damaged neural cells in the peripheral area of ischemia. **Methods** MCAO rat model was randomly classified into pseudo-operation group, model group, high-dosage herb group, low-dosage herb group, and western medicine group. After administration of medicine for 20 days, remove the brain tissue from rats and measure the expression of BDNF protein in each group with immunohistochemical method. **Results** In pseudo-operation group, there was hardly expression of BDNF positive cell; in model group, there was the increased section staining, and little expression of positive cells; in western medicine group, low-dosage herb group, and high-dosage group, there were the increased section staining and strong expression of BDNF positive cells, especially in the high-dosage herb group, with the strongest expression of positive cells. **Conclusions** BDNF is closely related to the recovery of damaged neural cell. The nourishing kidneys and unblock collaterals formula can promote the survival and recovery of neural cell by regulating the synthesis of BDNF, therefore to reduce the damage of ischemic brain injury.

【Key words】 Nourishing kidneys and unblocking collaterals formula; MCAO rat; BDNF genetic expression

基金项目:山东省中医管理局课题(2007-098);山东省中医药科技发展计划项目

作者单位:250011 济南,山东中医药大学附属医院保健科

作者简介:王华(1972-),博士,副主任医师。从事中西医结合老年病的研究。E-mail:wang1386409@163.com

通讯作者:陈泽涛(1961-),博士,主任医师。从事中西医结合老年病的研究。E-mail:zetaochen2007@126.com

文献标引格式:

王华,陈泽涛.滋肾通络方对局灶性脑缺血大鼠脑组织脑源性神经营养因子蛋白含量的影响[J].环球中医药,2012,5(8):569-572.

缺血性卒中有发病率高、病死率高、致残率高、复发率高的特点,目前在对神经细胞营养修复方面无切实可行的中西药物,笔者通过多年的临床观察,研制出滋肾通络方治疗本病,取得明显的效果。

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是在脑内合成的一种蛋白质,它广泛分布于中枢神经系统内,BDNF 为一种碱性蛋白质,对神经元的存活、分化、生长发育起重要作用;并具有调节突触可塑性和神经递质传递等功能;同时,能防止神经元受损伤死亡、改善神经元的病理状态、促进受损神经元再生及分化等生物效应。本实验通过免疫组织化学法观察局灶性脑缺血大鼠(MCAO)治疗后脑组织 BDNF 的蛋白含量,以判断滋肾通络方对缺血周围区神经细胞损伤修复的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康 Wistar 雄性大鼠,体重 250 ~ 300 克,由山东大学动物实验中心提供,许可证号 SCXK 鲁 20030004。摄食饲料为山东大学动物实验中心提供的混合饲料,实验期间自由饮水,室温 18 ~ 25 ℃,相对湿度 62% ~ 72%。

1.2 方法

1.2.1 MCAO 模型大鼠的制备 参照 Zea-Longa^[1]报道的颈外动脉栓线法制备局灶性大鼠脑缺血模型。Wistar 雄性大鼠用 1% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 行腹腔注射麻醉,并取仰位固定;剪去大鼠颈部毛发后,常规碘伏消毒颈部皮肤,沿颈部正中切开,钝性分离皮下组织,从两侧颌下腺之间剪开浅筋膜,暴露左侧胸锁乳突肌,钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌肌之间的肌间隙,暴露左侧颈总动脉(CCA),沿此间隙继续向上方分离,找到 CCA 分叉,在颈总动脉深面穿一细线,钝性分离颈内、外动脉。提起该侧 CCA,在接近颈内动脉(ICA)与颈外动脉(ECA)分叉处,用眼科剪小心在 CCA 剪一约 0.2 mm 的横切口,将一直径约 0.2 mm 的鱼钩线(尼龙线),穿入 ICA,穿线前标记从动脉切口到眼外眦的距离,将鱼钩线缓慢穿入至接近标记位置,当感到有一定阻力时即停止推送,此时栓线进入距 CCA 分叉处约 1.8 ~ 2.0 cm,头端正好位于 MCA 起始部位,阻断 MCA 血流,可见大鼠右眼虹膜颜色变浅,出现 Honer's 征。然后将切口的远心端及动脉内的丝线牢固结

扎,剪去多余的丝线,逐层缝合皮肤,局部撒青霉素粉,将栓线的尾端暴露在皮外。术中及术后保持室温 25 ℃ 左右,采用 60 W 的白炽灯照射动物以维持其肛温在 $(37.5 \pm 0.3)^\circ\text{C}$,相当于脑温 $(37.9 \pm 0.4)^\circ\text{C}$ 左右。

1.2.2 动物分组 上述 Wistar 雄性大鼠 50 只,随机分成 5 组,即模型组、假手术组、中药低剂量组、中药高剂量组、西药组各 10 只。假手术组仅把栓线插入 ICA 6 mm 而不入颅,术后不给予任何处理。

1.2.3 用药方法 西药组灌胃给予吡拉西坦片(南利民制药有限责任公司生产,每片 0.4 g,产品批号:0612146),按 50 mg/100 g 大鼠/每日计算;中药低剂量组、中药高剂量组灌胃给予滋肾通络方(由制首乌、白芍、生山楂、红花按 15 : 12 : 12 : 5 比例组成)水溶液 2 ml(中药低剂量组 1 ml \approx 1.28 g 生药,中药高剂量组 1 ml \approx 2.55 g 生药),按成人千克体重剂量的 6 倍、12 倍给予;余二组分别灌胃给予生理盐水 2 ml,每天 1 次,共 20 天。于造模成功后 24 小时给药,固体饲料和水自由摄取。

1.3 免疫组织化学染色及图像分析

1.3.1 制片 上述 MCAO 模型大鼠灌胃 20 天后,麻醉后迅速断头,在低温下取脑,将左侧海马部分脑组织迅速切成 1.8 mm 厚的冠状脑片,置 10% 福尔马林液固定,常规梯度酒精脱水后,石蜡包埋后进行连续切片,切片厚度约 4 μm 。

1.3.2 染色进行免疫组化染色 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 分钟;3% H_2O_2 去离子水孵育 5 ~ 10 分钟,以消除内源性过氧化物酶活性;滴加山羊血清工作液室温孵育 10 ~ 15 分钟,倾去,勿洗;再滴加适当比例稀释的 BDNF 抗体,37℃ 孵育 2 ~ 3 小时或 4℃ 过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟;滴加生物素化二抗工作液,室温或 37℃ 孵育 10 ~ 15 分钟;PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟;再滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温或 37℃ 孵育 10 ~ 15 分钟;PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟;DAB 显色剂显色;自来水充分冲洗后用封片剂封片。

1.3.3 检测方法 首先光镜下观察神经元出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。再在高倍镜($\times 400$ 倍)下每张切片随机选取 5 个不重叠的区域进行拍摄,将图像输入到 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文分析系统内,在相同的背底倍体条件下选择相应的参数进行计算机完全定量分析,用平均灰度值来表述 BDNF 的蛋白含量。

1.4 统计学处理

脑组织平均灰度值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 用 SPSS 14.0 软件进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组脑组织 BDNF 蛋白表达的比较见图 1~5 及表 1。由图 1 可见, 假手术组海马区 BDNF 切片染色很弱, 几乎无阳性细胞表达; 图 2 可见, 切片染色增强, 阳性细胞略有表达; 图 3、图 4、图 5 可见, 西药组、中药低剂量组及中药高剂量组均见到切片染色强, BDNF 阳性细胞强表达, 尤以中药高剂量组阳性细胞表达最强。由表 1 可看出, 模型组大鼠局灶性脑缺

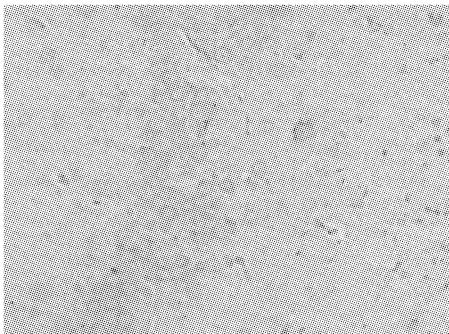


图 1 假手术组海马区 BDNF 的表达

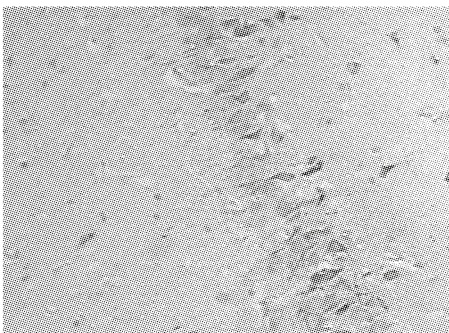


图 2 模型组海马区 BDNF 的表达

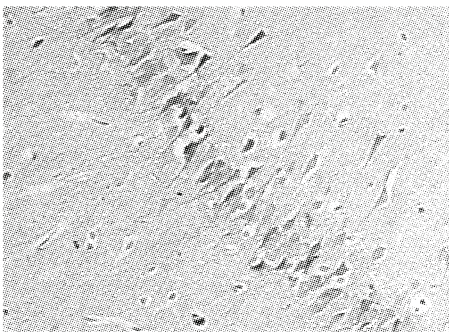


图 3 西药组海马区 BDNF 的表达

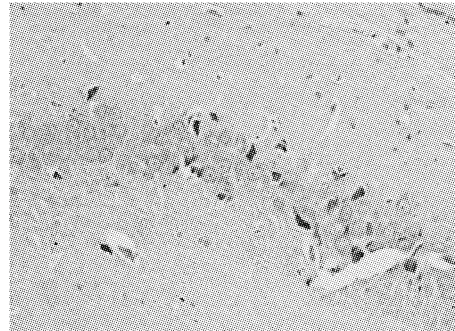


图 4 中药低剂量组海马区 BDNF 的表达

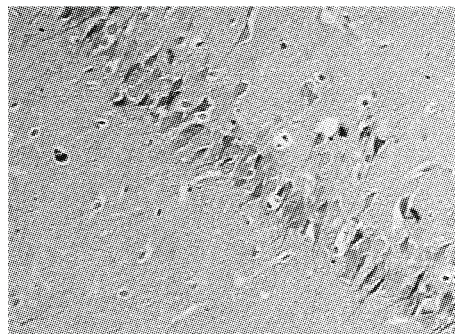


图 5 中药高剂量组海马区 BDNF 的表达

表 1 各组脑组织 BDNF 平均灰度值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均灰度值
假手术组	113.42±23.23
模型组	118.64±16.27
西药组	134.46±18.56 ^{ab}
中药低剂量组	135.32±16.42 ^{ab}
中药高剂量组	144.74±15.31 ^{abcd}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$; 与西药组比较, ^c $P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, ^d $P < 0.05$

血后, 脑组织 BDNF 平均灰度值升高, 但与假手术组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 西药组、中药高剂量组、中药低剂量组脑组织 BDNF 平均灰度值较假手术组及模型组显著升高 (P 值均小于 0.01)。中药高剂量组平均灰度值较中药低剂量组及西药组明显升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

脑梗死有病死率高、致残率高的特点, 在脑缺血损伤过程中, 神经细胞损害与死亡是导致神经功能永久性丧失的重要因素。基于此, 本研究开创滋肾通络法治本病, 并用免疫组化法揭示实验性大鼠脑梗死的发病机理及滋肾通络方对模型动物神

经细胞的保护作用 and 神经修复作用的影响。旨在改善临床脑梗死的防治现状,并为中医药防治该病提供分子水平的理论依据。

根据临床多年治疗缺血性中风的经验,把滋补肾阴和活血通络法结合起来,提出滋肾通络是缺血性中风的基本治法,使肾精得复,脑髓得充,经络畅通“补而不腻,通而不泄”,脑络得以濡养。滋肾通络方药凡 4 味,由何首乌、白芍、山楂、红花组成,是笔者多年在临床观察应用于缺血性卒中治疗的经验方。本方药味虽少,但能充分体现滋肾通络的治法,其制方遣药,谨遵君臣佐使方意。

BDNF 广泛存在于脑内各组织,以大脑皮质、海马、纹状体分布最为丰富。BDNF 在脑内对发育中的交感、感觉和运动神经元的存活、分化和增殖有促进作用^[2-4],并具有抗凋亡作用^[5]。BDNF 是唯一不断的在中枢神经系统和周围神经系统组织中表达的神经营养因子,它能促进神经元生存、延缓变性的自然死亡,参与脑缺血损伤的保护过程^[6]。

本实验研究表明,模型组大鼠局灶性脑缺血 20 天后 BDNF 表达反应性增强,说明 BDNF 与损伤后神经元的修复作用有关。经滋肾通络方治疗后 BDNF 表达显著增强,特别是中药高剂量组增强更明显,与西药组及模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。说明滋肾通络方可通过调节 BDNF 的合

成,促进神经细胞的存活和损伤修复,从而减轻缺血性脑损伤。

参 考 文 献

- [1] Longa EZ, Weinstein Pr, Carlson, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91
- [2] Ying SX, Cheng JS. Effect of electro-acupuncture on c-fos expression in gerbil hippocampus during transient global ischemia [J]. Acupunct Electrother Res, 1994, 19(4): 207-213.
- [3] Barde YA, Edger D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain [J]. EMBOJ, 1982, 1 (5): 549-553.
- [4] Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, et al. The role of brain derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain [J]. Neuro-surgery, 1994, 34(2): 323-331.
- [5] Pringle AK, Sundstrom LE, Wild GJ. Brain derived neurotrophic factor, but not neurophin-3, prevents ischemia induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampus slice cultures [J]. Neurosci Lett, 1996, 211: 203-206.
- [6] Endres M, Fan G, Hirt L, Fuji M, Matsushita K, Liu X, Jaenisch R, Moskowitz MA. Ischemic brain damage in mice after secretory modifying BDNF or NT-4 gene expression [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(1): 139-144.

(收稿日期: 2012-05-08)

(本文编辑: 秦楠)

· 信息之窗 ·

本刊对来稿中图、表的有关要求

凡能用文字说明者,尽量不用图表。图表均应有简要的图题和表题。图、表序号一律用阿拉伯数字,分别按其在正文出现的先后次序连续编码,并在正文相应位置标示。

图 在 WORD 文档中出现的图,印刷效果不好,要求另附图片原始文件。

表 一律采用“三线表”,其内容不可与文字和图重复。表内不设备注栏,如有需说明的事项(如 P 值等),以简炼文字写在表的下方,表内依次用 ^a、^b、^c、^d 号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同,放在表的右上方;如各栏参数的单位不同,则放在各栏的表头内,(均值±标准差)用($\bar{x} \pm s$),置于表的右上方。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多一位。统计学处理结果统一用 ^a、^b、^c、^d 表示 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

本刊对来稿中缩略语的有关要求

在摘要及正文中首次出现缩略语时应注明全称。缩略语应尽量少用,以免影响阅读的流畅性,不超过 4 个汉字的名词不使用缩略语。已被公知公认的缩略语可以直接使用,如 DNA、RNA、HBsAg、PCR 等。尚未被公知公认的缩略语以及原词过长、在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。例如:流行性脑脊髓膜炎(流脑),阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)。全文缩略语以 5 个以下为宜。