

· 药理 ·

扎里奴思方对脑缺血再灌注损伤后
大鼠脑内 NGF 表达的影响

刘洋¹, 刘会贤¹, 李娟¹, 任非非¹, 虎喜成¹, 刘敬霞^{2*}

(1. 宁夏医科大学研究生学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学中医学院, 银川 750004)

[摘要] **目的:**观察扎里奴思方对脑缺血再灌注损伤后大鼠脑内神经生长因子(NGF)表达的影响。**方法:**线栓法制备局灶性脑缺血再灌注大鼠模型。实验动物随机分为假手术组、模型组、扎里奴思方组、尼莫地平组。取材前进行神经功能评分。术后各组分别在 1,3,7,14 d 各个时间点取材, HE 染色法观察大鼠脑组织病理学改变;免疫组织化学法测定大鼠脑内 NGF 的表达。**结果:**模型组大鼠神经功能评分降低, 神经元数量减少, 大小不均, 病理损伤显著;与模型组比较, 尼莫地平和扎里奴思方组神经评分增高, 神经元数量增多, 脑组织病理损伤减轻明显, NGF 表达增高($P<0.01$, $P<0.05$);与尼莫地平组比较, 扎里奴思方 14 d 组神经功能评分和 NGF 表达明显升高($P<0.05$)。**结论:**扎里奴思方可对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织神经元起保护作用, 扎里奴思方 14 天组的脑保护作用更强, 其脑保护作用机制可能与调节大鼠脑组织 NGF 表达有关。

[关键词] 扎里奴思方; 脑缺血再灌注; 神经生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0123-04

[doi] 10.11653/syjf2014050123

Effects of Zhali Nusi Fang on Nerve Growth Factor Expression in
Rat Brain after Cerebral Ischemia Reperfusion

LIU Yang¹, LIU Hui-xian¹, LI Juan¹, REN Fei-fei¹, HU Xi-cheng¹, LIU Jing-xia^{2*}

(1. Graduate School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Traditional Chinese Medicine School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Zhali Nusi fang (ZLNSF) on nerve growth factor (NGF) expression in the rat brain after cerebral ischemia reperfusion. **Method:** Rat focal cerebral ischemia reperfusion model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with nylon thread. The animal models were randomized into sham-operation, model, nimodipine (NMDP) and ZLNSF 4 groups to receive treatment with normal saline, NMDP and ZLNSF 30 min after the reperfusion. To do neurological score before take material. To take material at 1, 3, 7, 14 days. Immunohistochemistry was employed to detect the expressions of nerve growth factor at rat brain cortex. **Result:** The neurological scores of model group rats are reduce, the number of nerve cells are cut down with unequal size and pathological damage significant. compared with model groups, the neurological scores of ZLNSF and NMDP groups are raise, the number of nerve cells are raise, pathological damage brain tissue are reduce significantly and NGF expression are enhance ($P<0.05$). Compared with NMDP groups, the level of NGF expression was significantly higher in ZLNSF 14 days group ($P<0.05$). **Conclusion:** ZLNSF show protective effects against global ischemia-reperfusion injury, ZLNSF 14 days group has the highist cerebral

[收稿日期] 20130421(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260569);宁夏科技支撑计划(NXIC2012)

[第一作者] 刘洋, 硕士, 从事中医、回医药防治脑缺血性疾病的研究, Tel:15209581721, E-mail:531729111@qq.com

[通讯作者] * 刘敬霞, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治老年病研究, Tel: 13519216687, E-mail: ljx199566@163.com

protective effects, and its cerebral protection mechanism may be related to regulate NGF expression in rat brain.

[**Key words**] Zhali Nusi fang; cerebral ischemia and reperfusion; nerve growth factor

脑缺血具有高发病率、高致残率和高死亡率的特点,严重威胁着人类的健康,脑血管疾病已成为我国最首要的死亡原因,目前我国脑卒中后的存活患者 700 多万人,每年新发病例 150 ~ 200 万人,2/3 人会留下残疾,给家庭及社会带来了巨大的经济负担,其中脑缺血占脑卒中的 75% 以上,开展脑缺血防治研究具有重要意义^[1-2]。神经生长因子(NGF)是神经营养因子家族(NTF)中非常重要的细胞因子,对神经系统的正常分化、发育、成熟、维持功能和存活、损伤修复等均具有重要的生物学作用。已有研究证实 NGF 可以有效预防脑缺血后神经元的死亡^[3]。《回回药方》中扎里奴思方具有芳香开窍、化痰祛瘀、补肾益髓等作用,已有研究证实扎里奴思方对脑缺血损伤后的神经元具有保护作用^[4],本研究从缺血再灌注损伤后大鼠神经运动功能评分变化、缺血区脑组织病理变化及 NGF 的表达变化方面探讨扎里奴思方的脑保护作用及其机制,为进一步应用扎里奴思方提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 雄性大鼠,清洁级,月龄 3 个月,190 只,体重(300 ± 50) g,由宁夏医科大学实验动物中心提供。所有大鼠在同一房间中饲养,温度(25 ± 1)℃,湿度(50 ± 10)%,光暗周期 12 h/12 h,自由饮水和进食,常规环境适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.2 试验药品和试剂 扎里奴思方:出自《回回药方》,由宁夏医科大学附属回医中医医院制备,方药组成:石菖蒲(哈咱卜咱里刺)12 g,安息香(阿你松)3 g,小茴香(法理公)12 g,乳香(兀沙吉)12 g,没药(木里叶)12 g,当归(法忒刺撒里荣)12 g,怀牛膝(干祖伐)24 g,番红花(撒法郎)12 g,牡丹皮12 g,芦荟(拆不牙刺)12 g,水龙骨(伯思八牙)12 g,肉桂(萨底知)12 g,海狗肾(膈膈脐)12 g,菟丝子(阿夫忒蒙)12 g,尼莫地平片:规格 30 mg/片,拜耳医药保健有限公司,批号 H20003010;苏木素染液和伊红染液(宁夏医科大学免疫组化教研室提供)。NGF(Rabbit Anti-NGF):北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PR-0305。兔二抗及 DAB 显色剂均购买自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 分组及用药 按随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、尼莫地平组、扎里奴思方组,术后 1,3,7,14 d 取材。假手术组 10 只大鼠,其余各组大

鼠为 15 只。假手术和模型组用生理盐水灌胃,药物治疗组分别用相应的药物灌胃。大鼠灌胃用量根据生药材含量按等效剂量换算关系计算,灌胃体积为 1 mL·100 g⁻¹,扎里奴思方为 1.50 g·mL⁻¹;尼莫地平 1.08 g·L⁻¹。大鼠术后 1 h 开始用药,每日用药 1 次。所有组大鼠均于术前 12 h 禁食不禁水。

1.4 模型制备 改良 Longa 法制备局灶性脑缺血再灌注损伤模型,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,待完全麻醉后,固定大鼠使之呈仰卧位,颈前正中切口,左侧钝性分离颈总动脉(CCA);分离颈内外动脉,穿线备用,结扎翼腭动脉,于颈外动脉近动脉分叉处剪口,栓线穿入颈内动脉,缓慢推进,栓线插入 18 mm 或有阻力感为止,插线成功后缝合皮肤,缺血 2 h 后拔出线栓进行再灌注。假手术组不穿入栓线和再灌注外,其余操作相同。手术过程中保持大鼠肛温(37.0 ± 0.5)℃,保持室温(26 ± 1)℃。术后大鼠模型采用 Zea longa 评分法进行神经功能评分^[5]。4 分:不能自行走,意识丧失;3 分:行走时身体向右侧偏瘫侧倾倒;2 分:出现左侧 Horner 征,爬行时出现向右转圈;1 分:不能完全伸展对侧前爪;0 分:无神经系统缺失症状,活动正常自如。1 ~ 3 分为合格模型。

1.5 标本制备 分别在 1,3,7,14 d 各时间点取材,取材前进行神经功能评分,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,经心尖或升主动脉插管,先用 37℃ 生理盐水冲洗,待流出液清晰后,再用 4% 多聚甲醛灌注固定,断头取脑,在蜡板上自额极向后至枕极剔除脑组织 3 mm,再向后冠状切取 2 mm 厚的脑组织做免疫组化指标测定和 HE 染色病理观察。

1.6 指标检测

1.6.1 神经功能评分 神经功能评测方法按 Garcia J H 评分^[6]从自发运动、四肢对称实验、前肢伸展运动检测、攀登运动、痛觉、位置觉 6 个方面进行,总分为 18 分,神经功能恢复越好,得分越多。

1.6.2 脑组织病理学观察 采用 HE 染色方法,光学显微镜下观察脑组织结构变化。

1.6.2.1 NGF 检测方法 采用免疫组织化学方法如下,切片常规脱蜡至水;切片置于枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)中微波炉中高火加热进行抗原修复 15 min,自然冷却至室温;3% 过氧化氢室温避光灭活 10 min;放于 0.1% TritonX-100 中进行细胞膜通

透 10 min;5% 山羊血清室温封闭 1 h,滤纸吸干,滴加 NGF 抗体(1:100),4 ℃ 孵育过夜,室温放置 30 min;滴加生物素标记兔二抗,37 ℃ 孵育 1 h;滴加新鲜配制的 DAB 显色剂,显微镜下控制显色时间,PBS 终止显色。以上各步骤间均以 0.01 mol·L⁻¹ (pH 7.4)清洗 5 min×3。最后乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照采用 PBS 缓冲液代替一抗,余相同。

1.6.2.2 NGF 阳性表达观察及测定 每组取 6 张免疫组化切片,每张切片选取 5 个视野,利用图像采集系统(奥林帕斯 DP Ctrroller 3.1.1.267)拍照,固定自然光。采用图像全自动分析系统(Image Pro Plus 6.0)分析免疫组化结果。得出 iod sum 和 area sum,用平均吸光度表示每张切片的结果,平均吸光度 = iod sum/area sum,同一组 6 张切片平均吸光度的平均值,反映 NGF 的表达。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计软件,采用单因素方差分析,其中组间两两均数比较采用最小显著差法(LSD-t);方差不齐,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学观察 假手术组大鼠脑组织结构完整,神经元细胞丰富,排列紧密,层次清晰,细胞大小均匀一致。模型组大鼠梗死区可见神经元细胞大部分萎缩,空泡样变,排列疏松,层次不清晰,细胞大小不一致,脑组织水肿,同时见较多细胞核呈三角形或锥形,缺血脑组织细胞损伤明显。尼莫地平

组大鼠梗死区周围大部分神经元细胞也是呈恢复状态,但其随着时间的延长恢复的状态变化不大。扎里奴思方组大鼠可见梗死区周围大部分神经元细胞呈恢复状态,正常细胞和萎缩神经元细胞同时可见,细胞形态较完整,核浆比例正常,胞浆丰富,仅见少量胶质细胞。且随着时间的延长在正常细胞占的比例越来越大,尤以扎里奴思方 14 d 组恢复的最好。

2.2 大鼠神经功能评分变化 模型组各时间点大鼠的神经功能评分较假手术组均降低明显($P < 0.01$);与模型组比较,药物组大鼠各时间点神经功能评分均显著增高($P < 0.01$);与尼莫地平组比较,扎里奴思方 14 d 组神经功能评分增高($P < 0.05$);与 1 d 组比较,尼莫地平 14 d 组神经功能评分增高($P < 0.05$),扎里奴思方 3 d 组神经功能评分增高($P < 0.05$),扎里奴思方 7,14 d 组神经功能评分均显著增高($P < 0.01$);与 3 d 组比较,扎里奴思方 14 d 组神经功能评分均显著增高($P < 0.01$),见表 1。

2.3 各组大鼠脑组织中 NGF 表达变化 与假手术组比较,模型组各时间点 NGF 表达均增高($P < 0.05$);与模型组比较,尼莫地平各组、扎里奴思方 1,3 d 组,NGF 表达均增高($P < 0.05$),扎里奴思方 7,14 d 组,NGF 表达显著增高($P < 0.01$);与尼莫地平组比较,扎里奴思方 14 d 组,NGF 表达明显增高($P < 0.05$);与 1 d 和 3 d 组比较,扎里奴思方 14 d 组,NGF 表达明显增高($P < 0.05$),见表 2。

表 1 各组大鼠神经功能评分比较($\bar{x} \pm s$) 分

分组	<i>n</i>	剂量	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	10	—	18.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00
模型	15	—	7.50 ± 1.87 ²⁾	8.83 ± 1.16 ²⁾	9.16 ± 0.98 ²⁾	9.33 ± 0.81 ²⁾
尼莫地平	15	10.8 mg·kg ⁻¹	11.66 ± 1.03 ⁴⁾	12.66 ± 1.03 ⁴⁾	12.83 ± 0.75 ⁴⁾	13.00 ± 0.63 ^{4,7)}
扎里奴思方	15	15.0 g·kg ⁻¹	11.33 ± 1.21 ⁴⁾	12.66 ± 1.36 ^{4,7)}	13.66 ± 0.82 ^{4,8)}	14.50 ± 1.04 ^{4,5,8,10)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与 1 d 组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$;与 3 d 组比较⁹⁾ $P < 0.05$,¹⁰⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 各组大鼠脑组织皮层 NGF 表达水平比较($\bar{x} \pm s$) %

分组	<i>n</i>	剂量	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	10	—	25.56 ± 2.51	25.56 ± 2.51	25.56 ± 2.51	25.56 ± 2.51
模型	15	—	28.99 ± 3.30 ¹⁾	28.87 ± 2.09 ¹⁾	28.70 ± 1.76 ¹⁾	28.71 ± 3.49 ¹⁾
尼莫地平	15	10.8 mg·kg ⁻¹	31.95 ± 2.55 ³⁾	32.29 ± 2.74 ³⁾	31.89 ± 2.08 ³⁾	32.12 ± 2.29 ³⁾
扎里奴思方	15	15.0 g·kg ⁻¹	31.87 ± 2.25 ³⁾	31.90 ± 1.65 ³⁾	33.42 ± 2.05 ⁴⁾	35.50 ± 1.60 ^{4,5,7,9)}

3 讨论

NGF 是 1952 年 Levi-Montalcini 首先发现的第 一种神经营养因子,研究表明 NGF 具有促进脑缺血 后受损神经元的再生,改善神经元的病理状态,抑制 再灌注损伤后神经细胞凋亡的作用^[7-8]。当脑缺血 损伤发生时,在早期 NGF 即反应性表达,以发挥对 神经元的保护作用^[9]。本实验结果显示,脑缺血后 模型组呈现了针对损伤的反应性表达增加趋势。但是,脑缺血引起的 NGF 表达量少且持续时间短,难 以对缺血损伤的神经元起到全面而持久的保护作用。因此,采用可持续促进 NGF 表达的治疗措施, 对缺血后神经元损伤的保护具有重要的意义。已有 大量研究发现中医中药可以促进缺血损伤后神经生 长因子的表达^[10-11]。本研究结果显示:扎里奴思方 可以促进大鼠脑缺血再灌注损伤后 NGF 的表达,且 随着时间的延长,其促进作用逐步增强。

《回回药方》是融汇了阿拉伯医学和祖国医学 的专著,极具有研究价值。《回回药方》对中风从生 理病理、方药诊治均有记述,卷十二《左瘫右瘓》认 为“头是脑之集”,指明中风多在头、手之筋(神经), 从而阐明了半身不遂的内在发病机制是出之于脑。 《回回药方》中的扎里奴思方由石菖蒲、水龙骨、安 息香、乳香、没药、当归、牛膝、红花、海狗肾、菟丝子、 芦荟、萆拔、牡丹皮等药组成,“可开窍,净其浑身厚 浊风痰,治疗痰盛弱病”,具有开窍化痰、补肾活血 作用,用于中风后口眼歪斜、半身不遂,脑病头痛^[12]。已有研究表明扎里奴思方对脑缺血大鼠脑 组织具有脑保护作用^[4]。本研究结果也显示扎里 奴思方可以有效改善术后大鼠脑组织病理损伤和促 进大鼠神经功能恢复,且其作用随着用药时间的延 长逐步增强,其变化趋势与 NGF 变化趋势一致,由 此可以认为扎里奴思方对脑缺血再灌注后脑组织的 保护作用可能是通过促进 NGF 的表达来实现的。

[参考文献]

[1] 陈竺. 全国第 3 次死因回顾抽样调查报告[M]. 北

京:中国协和医科大学出版社,2008:15.

[2] 吴蕴华,张金玲. 2005 ~ 2007 年上海市闵行区城乡居 民脑卒中发病率及危险因素[J]. 中国慢性病预防与 控制,2009,17(4):407.

[3] Luk Y O, Chen W Y, Wong W J, et al. Treatment of focalcere bralis chemia with liposomal nerve growth factor[J]. Drug Deliv,2004,11(5):319.

[4] 刘敬霞,李建生,牛阳,等. 扎里奴思方和蜜煎菖蒲方 对脑缺血大鼠神经元损伤的影响[J]. 宁夏医科大学 学报,2011,33(11):1101.

[5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84.

[6] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke, 1995,26(4):627.

[7] Tang X Q, Cai J, Nelson K D, et al. Functional repair after dorsal root rhizotomy using nerve conduits andneurotrophic molecules[J]. Eur J Neurosci,2004, 20(5):1211.

[8] 周宏珍,吕田明,申鹏,等. 神经生长因子与丹参对脑 缺血再灌注海马神经元的保护作用[J]. 南方医科大学 学报,2011,31(6):965.

[9] DING Y, LI J, LUAN X, et al. Exercise pre- conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin[J]. Neuroscience, 2004 (124):583.

[10] 刘万里,董文毅,陈苏宁,等. BDNF,NGF 在大鼠局灶 性脑缺血的表达变化及加减补阳还五汤对其影响的 实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(1):29.

[11] 段新芬,李文英,谢宁,等. 加减地黄饮子预处理对局 灶性脑缺血大鼠脑组织神经生长因子表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(29):3537.

[12] 宋岷. 《回回药方》考释[M]. 北京:中华书局出版 社,2007:165.

[责任编辑 邹晓翠]