

肾脑复元汤对 MCAO 大鼠 HGF 及 TGF- β 表达的影响

胡国恒¹ 刘 侃² 王瑾茜² 李映辰² 曾 勇² 刘旺华³

(1 湖南中医药大学第一附属医院,长沙,410007; 2 湖南中医药大学研究生院,长沙,410208; 3 湖南中医药大学中医诊断研究所,长沙,410007)

摘要 目的:探究肾脑复元汤对 MCAO 大鼠脑保护作用及其机制。方法:72 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、肾脑复元汤组,根据处死时间每组再随机分为 3 d、7 d、14 d 3 个亚组。比较各组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、神经营养因子 HGF 及 TGF- β 表达。结果:与模型组比较,肾脑复元汤组大鼠神经功能缺损评分明显下降($P < 0.01$),脑梗死体积明显缩小($P < 0.01$),缺血侧脑组织 HGF 及 TGF- β 表达明显增加($P < 0.01$)。结论:肾脑复元汤可以明显改善 MCAO 大鼠神经功能缺损症状,并促进脑梗死组织修复,其机制可能是通过促进 HGF、TGF- β 的表达。

关键词 肾脑复元汤;缺血性中风;肝细胞生长因子;转化生长因子- β

The Effects of Shennao Fuyuan Decoction on Expression of HGF and TGF- β in Middle Cerebral Artery Occlusion Rats

Hu Guoheng¹, Liu Kan², Wang Jinxi², Li Yingchen², Zeng Yong², Liu Wanghua³

(1 Neurology Department of the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2 Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3 Institute of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract Objective: To investigate the neuroprotective mechanisms of Shennao Fuyuan Decoction. **Methods:** Total 72 SD rat were randomly assigned into three groups: sham operation group (sham group), middle cerebral artery occlusion model group (model group), Shennao Fuyuan Decoction group (SFD group). According to the executing time of 3, 7, 14 days, rats in every group were divided into three sub groups. Comparison of all groups were performed based on Neurological Severity Scores (NSS), the volume of cerebral infarction, the expression of HGF and TGF- β . **Results:** NSS and the volume of cerebral infarction of SFD group were significantly lower ($P < 0.01$), the expression of HGF and TGF- β were obviously higher ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shennao Fuyuan Decoction can alleviate the neurological defects and improve the reparation of injured brain, this neuroprotective effect is probably due to the suppression of inflammatory and promotion of HGF and TGF- β expression.

Key Words Shennao Fuyuan Decoction; Ischemia stroke; HGF; TGF- β

中图分类号:R255.2;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.005

缺血性中风又称脑梗死,是指各种原因所致脑部血液供应障碍,导致局部脑组织缺血、缺氧性坏死,而出现相应神经功能缺损的一类临床综合征^[1]。目前,临床上尚缺乏有效的脑保护制剂,而以“肾脑同病、肾脑同治”理论为指导的研究发现中医药能有效促进中风后神经功能恢复,提高神经营养因子的表达,抑制炎症反应^[2-3]。本研究以上述理论为指导,从神经功能评分、脑梗死体积、肝细胞生长因子(Hepato-cyte Growth Factor, HGF)及转化生长因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β)的表达等方面探讨肾脑复元汤对大鼠中动脉缺血(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)大鼠模型神经保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级雄性 SpragueDawley (SD)大鼠,体重(280 $\pm$ 20)g,购于湖南省斯莱克景达实验动物有限公司(实验动物生产许可证号 SYXK(湘)2011-0003);动物饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心(许可证号 SYXK(湘)2009-0001)。

1.1.2 药品试剂 兔抗大鼠 HGF 试剂盒与兔抗大鼠 TGF- β 试剂盒(武汉博士德生物公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(Sigma);通用 pv9000 试剂盒(上海瑞齐生物科技有限公司);水合氯醛(武汉市法迪斯公司)。

1.1.3 主要仪器 精密电子天平(OHAUS),石蜡切片机(Reichert-histoSTAT),光学显微镜(Olympus),电子体温计。

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81273751;81573941;81373702;81473567);湖南省研究生科研创新项目(编号:CX2015B315;CX2015B326)

作者简介:胡国恒(1961.09—),男,博士,二级教授,博士生导师,心脑血管疾病的中医药防治研究,E-mail:hugh9198@163.com

通信作者:刘侃(1988.07—),男,博士,在读,从事心脑血管疾病的中医药防治研究,E-mail:375476814@qq.com

1.1.4 药物制备 肾脑复元汤组成:熟地黄 10 g、黄芪 30 g、山茱萸 10 g、山药 15 g、川芎 10 g、红景天 20 g、丹参 10 g、牡丹皮 10 g、赤芍 10 g、当归尾 10 g、地龙 10 g。所用均为道地药材,购于湖南省中医药大学第一附属医院。采用自动煎药壶煎煮,煎煮方法:第一煎加水 500 mL,煎取 200 mL 汤汁;第二煎加水 300 mL,煎取 150 mL 汤汁;2 次汤药混合后置于 60 ℃ 水浴锅内蒸发浓缩至含生药 2 g/mL,待冷却后置于 4 ℃ 冰箱冷藏备用。

1.2 实验方法

1.2.1 分组与给药 所有 SD 大鼠参照随机数字表法分为假手术组、MCAO 模型组、肾脑复元汤组,各组再根据处死时间分为 7、14、21 d 3 个亚组,每个亚组 8 只大鼠。造模 24 h 后,肾脑复元汤组予中药汤剂灌胃,假手术组及 MCAO 模型组予等量蒸馏水灌胃。大鼠灌胃中药剂量根据成人每日服用 145 g 生药剂量进行体表面积比值换算^[4],灌药体积均为 20 mL/kg,每组每日灌胃 1 次。经过预实验已证明本方中药剂量因素对药效的影响无统计学意义,因此实验中只选用临床常规使用的中药剂量。

1.2.2 动物造模 采用改良 Zea Longa 线栓法制作大鼠 MACO 模型^[5]。大脑中动脉阻断成功 2 h 后拔除线栓,造成脑缺血再灌注模型。实验中使用恒温垫加温,电子体温计监测,使大鼠体温维持在(37.0±0.5)℃。再灌注后 2 h 后采用 Zea Longa5 分制进行神经功能评分,分值在 1~3 分者为造模成功。

1.2.3 神经功能缺损评分 选取造模前 24 h、造模成功后 24 h、处死前等 3 个时间点,采用改良大鼠神经功能缺损严重程度评分量表(m-NSS)^[6]进行神经功能缺损评分,各指标评分 3 次取均值纳入结果。

1.2.4 脑梗死体积计算 大鼠处死后用生理盐水

从心尖处灌注 2 min,取出脑组织,从前囟前 2 mm 处,每隔 2 mm 做一冠状切片,厚 10 m,共选取 5 个层面。将 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC)用蒸馏水配成 2% 溶液,将切片在 37 ℃ 下浸泡 15 min,每 5 min 轻轻震荡数次。采用 ImageJ 图像分析软件计算脑梗死面积(红色区域为正常区域,白色区域为梗死区),各脑片梗死面积乘以厚度(2 mm)为梗死体积。

1.2.5 HGF 及 TGF-β 表达检测 取前囟后 1.0~1.5 mm 区域做冠状切片,厚 5 m,常规脱蜡,水化组织,1:100 稀释一抗、37 ℃ 孵育 2 h 后,滴加聚合物辅助剂和辣根酶标记二抗,37 ℃ 孵育 30 min, DAB 显色,常规脱水,透明及封片。阴性对照滴加 PBS 代替一抗。采用 Olympus 光学显微镜下观察,每组每个指标检测 5 张切片,每张切片选取缺血海马区 3 个互不重叠的视野,观察棕黄色样阳性细胞数目。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数采用 *t* 检验进行 2 组间比较,多组比较采用单因素方差分析比较,*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠神经功能缺损评分 脑缺血造模后,模型组及肾脑复元汤组大鼠神经功能均明显下降,而肾脑复元汤组在缺血再灌注后 3 d、7 d 及 14 d 神经功能评分明显低于模型组,2 组相比具有显著统计学意义(*P*<0.01),说明肾脑复元汤能促进脑缺血再灌注后神经功能恢复。见表 1。

2.2 大鼠脑梗死体积比较 肾脑复元汤组大鼠脑梗死体积较模型组明显减小,差异有显著统计学意义(*P*<0.01),说明肾脑复元汤能有效减小缺血灶体积,保护脑组织。见表 2、图 1。

表 1 不同时间点各组神经功能缺损分值比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	造模前 24 h	造模后 24 h	给药 3 d	给药 7 d	给药 14 d
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	0.00±0.00	9.75±0.98	8.76±1.67	7.1±1.98	5.78±2.54
肾脑复元汤组	0.00±0.00	9.81±1.35	5.97±1.68**	4.38±1.69**	3.18±1.30**

注:与模型组比较,***P*<0.01。

表 2 大鼠脑梗死体积比较(mm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	梗死体积		
		3 d	7 d	14 d
假手术组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	8	90.52±12.54	61.35±12.35	32.67±8.55
肾脑复元汤组	8	71.24±10.15**	40.58±9.24**	20.03±6.43**

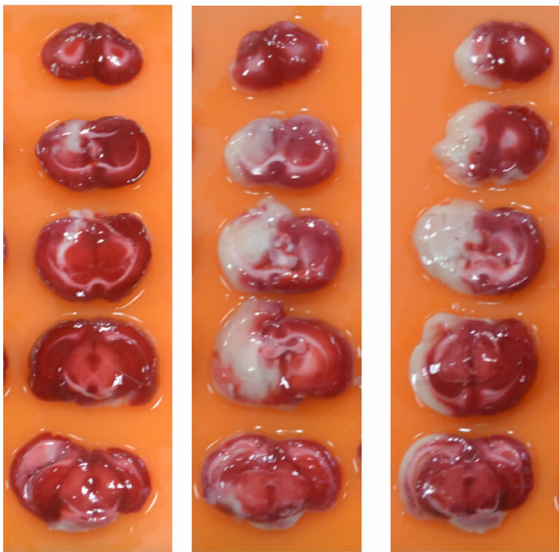
注:与模型组相比,***P*<0.01。

2.3 缺血侧脑组织 HGF 及 TGF-β 阳性细胞数比较 模型组及肾脑复元汤组脑缺血侧脑组织 HGF 及 TGF-β 阳性细胞数明显升高,且肾脑复元汤组阳性细胞数明显高于模型组,差异有显著统计学意义(*P*<0.01)。见表 3、图 2。

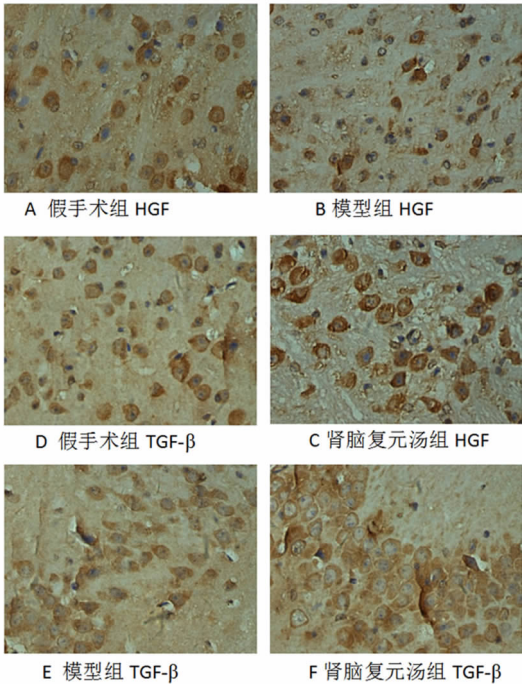
表 3 各组大鼠 HGF 及 TGF-β 表达比较

组别	HGF			TGF-β		
	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	15.79 ± 2.38	16.10 ± 2.41	15.77 ± 2.23	22.79 ± 3.44	22.80 ± 2.42	23.77 ± 3.39
模型组	18.16 ± 2.43	26.52 ± 2.32	30.33 ± 3.64	30.10 ± 4.67	38.50 ± 4.32	44.41 ± 5.28
肾脑复元汤组	25.12 ± 3.82 **	36.65 ± 4.12 **	44.73 ± 3.94 **	40.3 ± 4.23 **	60.45 ± 3.43 **	75.76 ± 4.45 **

注:与模型组相比,**P<0.01。



A 假手术组 B 模型组 C 肾脑复元汤组
图 1 第 7 天时各组脑梗死情况比较



A 假手术组 HGF B 模型组 HGF
C 肾脑复元汤组 HGF D 假手术组 TGF-β
E 模型组 TGF-β F 肾脑复元汤组 TGF-β
图 2 HGF 及 TGF-β 第 7 天各组表达情况 (×400)

3 讨论

肝细胞生长因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) 最先通过肝切除手术大鼠的血浆离心提纯后得到,具有广泛的生物学效应,对于肝细胞的 DNA 合成起到促进作用。研究表明,肝细胞生长因子对

于短暂性脑缺血后中枢神经系统神经元的生长、分化、修复和再生起到强大的刺激作用^[7]。作为一种新发现的重要神经营养因子,HGF 的表达在脑缺血性损伤后反应性升高,能有效营养神经,保护中枢神经元^[8]。在体和离体实验均证实,HGF 可以减少一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素-1β (IL-1β)、TNF-α 的表达,降低一氧化氮 (NO) 含量,同时促进抗炎性因子 IL-10 的表达,从而起到脑保护作用^[9]。HGF 还能通过抑制细胞凋亡和细胞自噬以减少死亡细胞数,显著降低脑缺血梗死面积^[10]。亦有研究显示,缺血性中风后轻偏瘫患者接受康复训练能明显提高 HGF 的表达,且 HGF 的血清浓度与的恢复能力密切相关^[11]。

转化生长因子-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) 属于 TGF 超家族成员,对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用。Kana Sugimoto 研究发现,TGF-β 在脑缺血核心区域表达最明显,它的受体 mRNA 的表达则在缺血再灌注后 3 d 达到顶峰,与此同时,作为对 TGF-β 升高的回应,缺血灶内 NG2⁺ 小胶质细胞的数量明显上升,而后者则能有效清除退化和凋亡的神经元^[12]。TGF-β 信号通路是胶质细胞限制神经炎性反应的分子机制,在中风后亚急性期梗死皮层周围组织上调 TGF-β 的蛋白表达,降低炎性反应以保护脑功能^[13]。有研究报告指出间充质干细胞通过分泌 TGF-β,降低单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的水平,阻止 CD68⁺ 免疫细胞通过受损的血脑屏障渗透进入脑组织,从而抑制缺血后免疫炎性反应,促进缺血后大脑功能恢复^[14]。研究也发现活化 TGF-β-MEK/ERK 信号通路能够上调紧密连接蛋白的表达,减少基底膜降解,以此增加血脑屏障的紧密性,降低血脑屏障被破坏和脑梗死后出血转化概率^[15-16]。

肾脑复元汤的组方原则基于“肾脑同病、肾脑同治”理论,药物组成主要有熟地黄、山茱萸、山药、黄芪、红景天、牡丹皮、当归尾、赤芍、地龙、丹参、川芎。方中以熟地黄、黄芪为君药,熟地黄能养阴填精益髓,黄芪能大补元气,两者合用,精聚而生髓,气行

则瘀去。山药,补脾胃而养气阴,山茱萸益肝肾而填精髓,共为臣药;山茱萸与熟地合用助其补养肝肾,取“肝肾同源”之意。牡丹皮、赤芍、红景天、当归尾皆为活血之药,且以牡丹皮、赤芍之凉血活血制山茱萸之性温,以当归尾养血活血之力助黄芪补气行血之功,红景天既能健脾益气,又可活血化瘀,以上四味皆为佐药。地龙入经络能搜风邪,入血脉能行气血,帅诸药通行全身,活血通络。全方诸药合用,共奏填精益髓、益气活血之效。

本研究结果显示,肾脑复元汤可以降低脑缺血后大鼠神经功能评分,改善其运动、感觉及平衡功能,对于肢体功能的恢复起到积极的促进作用。同时,肾脑复元汤能明显缩小脑梗死体积,说明肾脑复元汤能够减少梗死后脑组织损伤、促进损伤后组织修复。在相关神经营养因子的表达方面,肾脑复元汤可以显著增加 HGF 及 TGF- β 阳性细胞数,促进相关蛋白的表达。因此,本实验从动物实验的角度证明肾脑复元汤能够在缺血性中风后有效地起到脑保护的作用,其作用机制可能与促进神经营养因子 HGF 及 TGF- β 的表达有关。

参考文献

- [1] 贾建平,陈生弟. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013, 175.
- [2] 胡国恒,李映辰,程齐来,等. 肾脑复元汤对脑缺血大鼠 BDNF 及 bFGF 表达的影响[J]. 中成药,2015,10(10):2275-2279.
- [3] 胡国恒,李映辰,邹婷,等. 肾脑复元汤对 MCAO 大鼠炎症因子及神经营养因子表达的影响[J]. 中药药理与临床,2015,31(2):81-84.
- [4] 翁维良. 中药临床药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 256.
- [5] Lin YC, Ko TL, Shih YH, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke [J]. Stroke, 2011, 42(7):2045-53.
- [6] Zhang L, Li Y, Zhang C, et al. Delayed administration of human um-

bilical tissue-derived cells improved neurological functional recovery in a rodent model of focal ischemia[J]. Stroke, 2011, 42(5):1437-1444.

- [7] Shang J, Deguchi K, Ohta Y, et al. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(1):86-95.
- [8] 李国前,王杰华,杨小霞,等. 骨髓间充质干细胞移植大鼠脑缺血区微血管密度和肝细胞生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15:6007-6011.
- [9] 贺芳,叶蓓,陈建珍,等. HGF 对脑缺血/再灌注大鼠脑 iNOS, NO 及 IL-1 β 的影响[J]. 中南大学学报:医学版,2014,39(1):23-29.
- [10] Shang J, Deguchi K, Yamashita T, et al. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(10):2197-206.
- [11] Okazaki H, Beppu H, Mizutani K, et al. Changes in serum growth factors in stroke rehabilitation patients and their relation to hemiparesis improvement[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(6):1703-1708.
- [12] Sugimoto k, Nishioka R, Lkeda A, et al. Activated Microglia in a Rat Stroke Model Express NG2 Proteoglycan in Peri-Infarct Tissue Through the Involvement of TGF- β 1[J]. GLIA, 2014, 62:185-198.
- [13] Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, et al. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice[J]. Glia, 2014, 62(8):1227-1240.
- [14] Yoo SW, Chang DY, Lee HS, et al. Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- β [J]. Neurobiology of Disease, 2013, 58:249-257.
- [15] Seo JH, Maki T, Maeda M, et al. Oligodendrocyte Precursor Cells Support Blood-Brain Barrier Integrity via TGF- β Signaling[J]. PloS ONE, 2014, 9(7):e103174.
- [16] Cai YY, Liu XF, Chen WX, et al. TGF- β 1 prevents blood-brain barrier damage and emorrhagic transformation after thrombolysis in rats [J]. Experimental Neurology, 2015, 266:120-126.

(2016-03-24 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 582 页)

参考文献

- [1] 李松. 缺血性脑血管病二级预防浅述[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(6):121.
- [2] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南[S]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2):146-153.
- [3] 王拥军. 卒中单元[M]. 北京:科学技术与文献出版社, 2004:372-421.
- [4] 卓大宏. 中国康复医学[M]. 北京:华夏出版社, 2003:563-653.
- [5] 高树中. 针灸治疗学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:66-69.
- [6] 全国第四届脑血管病学术会. 脑卒中患者临床神经功能缺损程

度评分标准(1995)[S]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6):381-383.

- [7] 恽晓平. 康复疗法评定学[M]. 北京:华夏出版社, 2009:216-235.
- [8] 任新光. 缺血性脑血管疾病的药物治疗进展[J]. 中国社区医师:医学专业, 2012, 27(14):7.
- [9] 王淑兰,倪光夏. 针刺治疗中风后运动功能障碍进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(4):112-113.
- [10] 高琼琰. 醒神启闭针刺法对脑梗死患者血中 EPCs 含量及其神经功能缺损程度的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2014.
- [11] 李梦瑶. 醒神启闭针刺法配合归蛭温胆汤对脑梗死患者血中 EPCs 含量及患肢运动功能的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2014.

(2016-03-24 收稿 责任编辑:洪志强)