

川芎赤芍干预脑缺血再灌注大鼠血管新生的实验研究

马进¹ 甘雨¹ 袁媛¹ 黄赫¹ 乔铁² 崔英海¹ 刘曼玉² 褚丽² 田森森²

(1 辽宁中医药大学附属第二医院脑一科,沈阳,110034; 2 辽宁中医药大学,沈阳,110032)

摘要 目的:观察川芎赤芍对大鼠脑梗死再灌注后血管生成素-1(Ang-1)、缺氧诱导因子-1a(HIF-1a)的影响。方法:线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,将SD大鼠随机分为空白组、模型组、川芎赤芍低、高剂量组、银杏叶片组。ELISA法测定大鼠血清Ang-1,实时荧光定量PCR方法检测缺血脑组织HIF-1a mRNA表达。结果:大鼠血清Ang-1测定:给药3 d、7 d、14 d模型组与空白组相比升高,具有统计学意义($P < 0.05$);给药3 d、7 d、14 d模型组与川芎赤芍低剂量组、高剂量组、银杏叶组相比水平低,具有统计学意义($P < 0.05$);实时荧光定量PCR检测HIF-1a mRNA:给药3 d、7 d、14 d模型组与空白组相比表达升高,具有统计学意义($P < 0.05$);给药3 d、7 d、14 d模型组与川芎赤芍低剂量组、高剂量组、银杏叶组相比表达水平低,具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:川芎赤芍可升高缺血再灌注大鼠血清中Ang-1的水平及缺血脑组织中HIF-1a mRNA的表达,提示川芎赤芍治疗脑梗死机制可能与促进血管新生有关。

关键词 脑缺血再灌注;血管新生;Ang-1;HIF-1a

Study of Sichuan Lovage Rhizome and Red Peony Root on Intervening Angiogenesis of Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion

Ma Jin¹, Gan yu¹, Yuan yuan¹, Huang He¹, Qiao Tie², Cui Yinghai¹, Liu Manyu², Chu Li², Tian Miaomiao²

(1 The Second Hospital affiliated to Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China;

2 Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Sichuan Lovage Rhizome and Red Peony Root on angiogenin-1 (Ang-1), ischemia induced factor-1 a (HIF-1 a) on rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Methods:** The model of rat with middle cerebral artery ischemia-reperfusion was established with suture-occluded method. SD rats were randomly divided into control group, model group and Sichuan Lovage Rhizome and Red Peony Root low and high dose groups, Ginkgo group. Ang-1 in rat serum was tested with ELISA method. HIF-1a mRNA expression in ischemia brain tissue was detected with real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (rt-PCR). **Results:** Ang-1 in rat serum in model groups increased on days 3, 7 and 14 compared with the control group ($P < 0.05$). HIF-1a expression with Rt-PCR increased in model groups on day 3, 7 and 14 compared with control group ($P < 0.05$). HIF-1a expression in model group on day 3, 7 and 14 was lower than Sichuan Lovage Rhizome and Red Peony Root low and high dose groups, Ginkgo group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sichuan Lovage Rhizome and Red Peony Root could enhance Ang-1 in rats with cerebral ischemia-reperfusion and HIF-1a mRNA expression in ischemic brain tissue, suggesting that the mechanism of Sichuan Lovage Rhizome and Red Peony Root on treating cerebral ischemia may be related with promoting angiogenesis.

Key Words Cerebral ischemia reperfusion; Angiogenesis; Ang-1; HIF-1a

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.033

脑梗死(Cerebral Infarction, CI)是指由于脑部血液供应障碍导致脑组织发生缺血缺氧性变性或死亡,出现相应的神经功能受损表现^[1]。近年来研究发现^[2]如果能尽快促进缺血区的血管新生,增加新的侧枝循环,恢复局部血流,不仅可以阻止这些可逆性损伤的神经元进一步加重出现不可逆变性,而且可以为神经结构的重塑性创造良好的微环境,有利于神经功能的恢复,改善患者预后。川芎、赤芍是传统名方经常一起使用的药对,具有行气活血化瘀功效。本研究探讨两药配伍应用对大鼠脑缺血再灌注

血管新生的影响,并与银杏叶片进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料 选用健康雄性SD大鼠120只,体重240~260g,购自辽宁长生生物技术有限公司(许可证编号:SYXK(辽)2012-0003)。川芎和赤芍,购于辽宁中医药大学附属第二医院,中药阳性对照药银杏叶片:安徽圣鹰药业有限公司,批号:150806。血管生成素-I(Ang1)ELISA试剂盒(北京诚林生物科技有限公司,批号:E-30570)。罗氏cDNA合成试剂盒 04896866001 Transcriptor First Strand cDNA

基金项目:辽宁省教育厅科学技术计划项目(编号:L2013362);辽宁中医药大学杏林学者青蓝工程杰出青年项目

作者简介:马进(1976.08—),女,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,主要从事中医脑病研究,E-mail:majin760702@163.com

Synthesis Kit(100 units);03358941001 组织匀浆仪用 镉盖管;03542394001 MagNa Pure LC RNA Isolation Kit-High Performance 罗氏全自动核酸纯化试剂盒 (RNA 提取)。

1.2 分组与给药方法 健康雄性 SD 大鼠,每组 24 只。按照随机数字表法随机分为:1)空白组:正常大鼠不手术;2)模型组:参照文献采用线栓法制备大鼠中动脉局灶性脑缺血模型;3)川芎赤芍低剂量组;4)川芎赤芍高剂量组;5)银杏叶片组。银杏叶片配制浓度为 0.027 片/mL。各组大鼠于 3 d、7 d、14 d 进行取材,每次取材各组 8 只大鼠,进行 ELISA 法测定大鼠血清 Ang-1(血管生成素),实时荧光定量 PCR 方法检测大鼠缺血脑组织 HIF-1a mRNA。

1.3 主要仪器 MCAO 栓线(280~350 g):北京西浓科技有限公司,型号:2838-A4。罗氏 MPLC2.0 全自动核酸提取系统,罗氏 LC480 实时荧光定量 PCR 仪,罗氏组织匀浆仪。TD5A-WS 低速台式离心机:长沙湘仪离心机仪器有限公司。电热恒温培养箱:厦门医疗电子仪器厂,出厂编号:82062。ThermoScientificMultiskan FC 酶标仪:北京平利洋经贸有限公司。

1.4 模型制备 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型^[3];SD 大鼠腹腔注 3% 水合氯醛麻醉后,仰卧固定于手术台,颈部正中切开,暴露出右侧颈总动脉,分离出颈内、外动脉,在颈内外动脉分叉处结扎颈外动脉,右侧颈总动脉处剪口,插入头端圆钝直径为 0.28 mm 的 MCAO 栓线,进栓线长度约 18~19 mm,在大脑中动脉起始端线栓大鼠大脑中动脉,然后将颈总动脉连同栓线一起结扎。栓塞 2 h 后取出 MCAO 栓线。动物清醒 2 h 后参照 Zea Longa^[4]的 5 分制法进行神经功能评分,分值在 1~3 分者入组。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。神经功能评分分数越高,神经功能缺损越严重,反之亦然。未到时间点死亡等不足动物随机替补。

1.5 实验方法 1)分别于给药第 3 天、7 天、14 天处死各组大鼠。处置方法:3% 水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉取静脉血,取血 5 mL/次,全血在室温中静置 30 min 左右,然后以 3 000 r/m 离心 10 min,取血清放入 -20 ℃ 冰箱中冻存备用。取血后将各组大鼠断头处死,取出右侧缺血脑组织,置 -80 ℃ 冰箱进行冻存。2)ELISA 法测定大鼠血清血管生成素(Ang-1)。用实时荧光定量 PCR 方法检测缺氧诱导

因子-1a(HIF-1a)。

1.6 统计学方法 数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 17.0 统计分析软件进行数据处理。经正态性和方差齐性检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 法大鼠血清血管生成素(Ang-1)测定 给药 3 d、7 d、14 d 模型组与空白组、相比升高,具有统计学意义($P < 0.05$);给药 3 d、7 d、14 d 模型组与低剂量组、高剂量组、银杏叶组相比水平低,具有统计学意义($P < 0.05$),提示川芎、赤芍对脑神经功能缺失有治疗作用,可能是通过调节与血管新生有关因子的变化,促进了神经功能修复。见表 1。

表 1 各组血清中 ANG-1 的含量变化情况($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

组别	只数	3 d	7 d	14 d
空白组	8	229.63 ± 44.58 *	243.25 ± 42.65 *	251.75 ± 41.17 *
模型组	8	371.00 ± 65.17	401.13 ± 39.19	376.00 ± 70.84
低剂量组	8	489.63 ± 78.72 *	506.75 ± 59.75 *	468.63 ± 51.64 *
高剂量组	8	463.88 ± 89.42 *	481.00 ± 42.24 *	455.25 ± 52.54 *
银杏叶组	8	448.50 ± 70.28 *	460.50 ± 54.39 *	441.13 ± 54.37 *

注:和模型组比较: * $P < 0.05$ 。

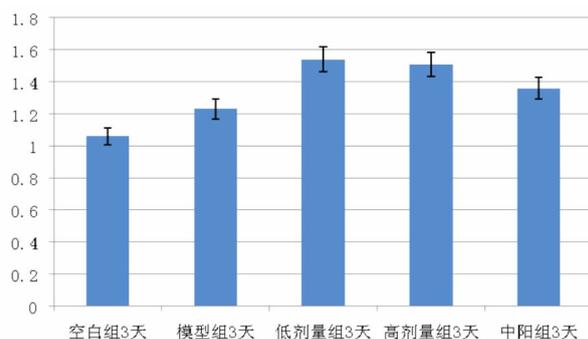


图 1 给药 3 d 各组缺血脑组织中 HIF-1a mRNA 表达水平变化情况

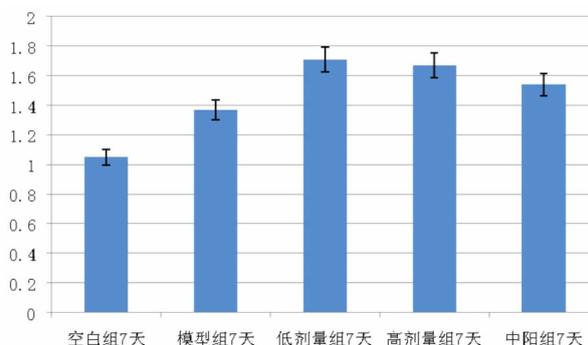


图 2 给药 7 d 各组缺血脑组织中 HIF-1a mRNA 表达水平变化情况

2.2 实时荧光定量 PCR 检测 HIF-1a mRNA 给药 3 d、7 d、14 d 模型组与空白组相比表达升高,具有统计学意义($P < 0.05$);给药 3 d、7 d、14 d 低剂量组、

高剂量组、银杏叶组与模型组相比表达水平高,具有统计学意义($P < 0.05$),提示川芎、赤芍对脑缺血损伤后 HIF-1a mRNA 表达水平有影响,提示川芎、赤芍可能增加血管新生和具有脑保护作用。见图 1 - 图 3。

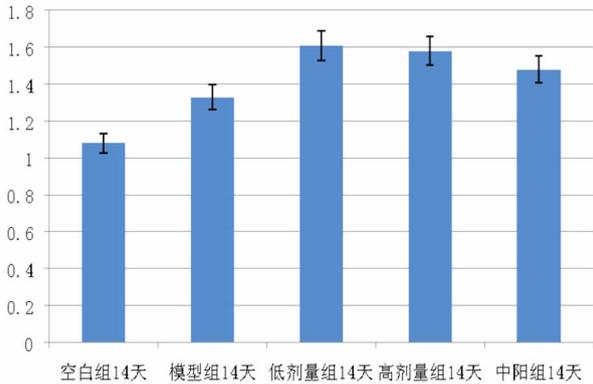


图3 给药 14 d 各组缺血脑组织中 HIF-1a mRNA 表达水平变化情况

3 讨论

缺血性脑血管病遗留的神经功能缺损一直是人类医学史上的难题。脑缺血后神经元的修复不仅与生长相关因子、营养因子表达等有关,而且还取决于脑缺血区血管新生的微环境^[5]。血管新生(Angiogenesis, AG)的概念于1993年由Hockel等首先提出。血管新生是指在原有血管基础上通过血管内皮细胞增殖、芽生、游走、血管分裂和分支而形成新的毛细血管网,使其功能与局部的需要相适应的生物学过程^[6]。血管新生可以影响脑缺血后侧枝循环的建立,从而为神经功能的重塑和神经细胞的修复创造良好的微环境。

Ang 属于特异性血管新生作用因子,由 Ang-1、Ang-2、Ang-3 和 Ang-4 组成。Ang-1 是目前发现的一种能够抵抗血管渗漏的内源性蛋白质因子,缺血再灌注早期 Ang-1 表达升高具有促进血管新生作用。它能抵抗炎性以及血管内皮生长因子(VEGF)引起的血管渗漏,对 VEGF 促血管新生的功能有促进和互补作用,且并不影响血管的正常形态,长期高浓度的 Ang-1 对健康无明显不利影响^[7]。Meng 等^[8]研究发现,Ang-1 能促进大鼠脑缺血后缺血半暗带内源性内皮细胞增殖和血管新生。脑缺血损伤过程中,低氧引起神经元细胞损伤。低氧诱导因子-1(HIF-1)是 $\alpha\beta$ -异型二聚体,对与血管新生相关的基因有重要的调节作用。缺氧细胞-低氧诱导因子-血管内皮生长因子-血管新生可能是主要的调节通路^[9]。缺氧细胞通过激活低氧诱导因子来诱导血

管内皮生长因子等基因的表达,通过此来完成受损区新生血管代偿缺血区血供不足的功能。

近年来,许多学者对中药治疗脑梗死的作用机制进行了大量的临床观察和实验研究,证实了多种中药具有抗凝、防止动脉粥样硬化、改善脑血流、防止缺血性损伤、保护神经细胞,促进血管新生等作用,而且均可通过多种途径发挥协同作用共同治疗脑梗死。有研究结果显示,其中丹参组、川芎组、赤芍组,丹参黄芪组、丹参黄芪组、川芎黄芪组可明显促进人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖能力;可见不同的活血化瘀药和补气活血药配伍应用对 HUVEC 的增殖能力具有不同的促进作用,这可能是这些药物在细胞层面上促进血管生成的作用机制。本研究显示川芎、赤芍配伍应用能够显著上调脑缺血再灌注后 ANG-1 及 HIF-1a mRNA 的表达,提示川芎、赤芍治疗急性脑梗死可能与参与调节促进血管新生因子表达有关,为该药临床治疗脑梗死提供了理论依据。

参考文献

- [1] 贾建平. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:228.
- [2] Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches[J]. NeuroRx, 2006, 3(4):466-473.
- [3] Takaba H, Fukuda K, Yao H. Substrain differences, gender, and age of spontaneously hypertensive rats critically determine infarct size produced by distal middle cerebral artery occlusion[J]. Cell Mol Neurobiol, 2004, 24(5):589-598.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [5] Ding YH, Li J, Zhou Y, et al. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise[J]. Curr Neurovasc Res, 2006, 3(1):15-23.
- [6] Seet RC, Wijedicks EF, Rabinstein AA. Stroke from acute cervical internal carotid artery occlusion: treatment results and predictors of outcome[J]. Arch Neurol, 2012, 69(12):1615-1620.
- [7] Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RA. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(7):443-456.
- [8] Meng Z, Li M, He Q, et al. Ectopic expression of human angiopoietin-1 promotes functional recovery and neurogenesis after focal cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2014, 267:135-146.
- [9] Umschweif G, Alexandrovich AG, Trembovler V, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is essential for spontaneous recovery from traumatic brain injury and is a key mediator of heat acclimation induced neuroprotection[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(4):524-531.