

· 基础研究 ·

# 阿魏酸钠促进局灶性脑缺血再灌注后神经功能恢复和血管生成作用的研究\*

周 琴<sup>1</sup> 廖维靖<sup>1,2</sup> 杨万同<sup>1</sup> 胡小琴<sup>1</sup> 程明高<sup>1</sup> 任兰芬<sup>1</sup> 毕 博<sup>1</sup>

**摘要** 目的:研究阿魏酸钠(SF)对局灶性脑缺血再灌注后促进神经功能恢复和血管生成的作用。方法:制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,随机分为治疗组和对照组,观察术后不同时间点大鼠神经功能、脑梗死体积、脑含水量的变化。用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的右旋糖苷标记血浆,激光扫描共聚焦显微镜下观察缺血后 7d 脑血浆灌注量,脑血管形态和脑微血管直径的变化。结果:阿魏酸钠治疗组在术后 2d、7d、14d 的神经功能恢复均优于对照组。两组脑梗死体积均在术后第 7d 达到高峰,SF 组梗死体积在各个时间点上均小于对照组,差异有显著性意义( $P<0.05$ )。SF 组脑含水量在术后 2d 高于缺血对照组和假手术组,随后逐渐下降,到术后 14d 低于缺血对照组和假手术组,差异有显著性意义( $P<0.05$ )。术后 7d,SF 组脑血浆灌注量明显高于对照组,直径 $<3\mu\text{m}$ 的血管约占 47%,新生血管增多,呈不规则迂曲形态。结论:SF 能促进脑缺血后神经功能的恢复,减小梗死体积,减轻脑水肿,其机制可能与促进血管生成的作用有关。

**关键词** 缺血性脑损伤;血管生成;阿魏酸钠;局灶性脑缺血;缺血再灌注;神经功能

**中图分类号**:R743,R493 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-1242(2006)-03-0200-04

**Effects of sodium ferulate on neurological function and angiogenesis after reperfusion of focal cerebral ischemia in rats**ZHOU Qin, LIAO Weijing, YANG Wantong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(3):200—203

**Abstract Objective:**To study the effects of sodium ferulate on neurological function and angiogenesis after reperfusion of cerebral ischemic in rats.**Method:**The change of neurological function, infarct volume and brain water content were measured at different time point after cerebral ischemia. The vessel diameters, morphology and volumes of plasma perfusion were analyzed on cerebral microvessels perfused with FITC-dextran 7 days after ischemia using LSCM.**Result:**The SF-treated group recovered better than saline-treated group at 2, 7, 14 days after surgery. The brain infarct volume was peaked on day 7 in both groups. The infarct volumes of SF-treated group were significantly small compared with saline-treated group in each time point( $P<0.05$ ). The brain water contents of SF-treated group were much higher than control group at 2 day, then diminished gradually, and were significantly lower in 14 day than saline-treated group and sham group( $P<0.05$ ). The volumes plasma perfusion of SF-treated group were significantly increased compared with the control group. 47% of plasma perfused vessels in the penumbra had diameters within  $3\mu\text{m}$ . The newly grown vessels were increased and had an irregular pattern of tortuosity.**Conclusion:**Sodium ferulate can improve functional neurological recovery, diminish infarct volumes and brain water contents. The possible mechanism is that the SF can enhance angiogenesis.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, 430071

**Key words** cerebral ischemia; angiogenesis; sodium ferulate; perfusion; neurological function

缺血性脑血管疾病是导致死亡和残疾的重要原因,随着溶栓治疗的开展,脑缺血再灌注损伤已受到广泛重视,缺血一定时间的脑组织重新恢复氧合血的灌注后,组织损伤反而加重,即“脑缺血再灌注损伤”。临床研究发现,缺血半暗带中血管密度较高的患者恢复得更好并能存活更长时间<sup>[1]</sup>。治疗性血管生成(therapeutic angiogenesis,TAG)是指通过药物、基因或其他方法促使缺血组织在原有微血管基础上形成新的毛细血管,并与原有的血管网相交汇以改善血供的一种方法<sup>[2]</sup>,这种方法的出现,为缺血性脑血

管疾病的治疗开辟了一条新途径。目前已经证实中药当归对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用<sup>[3]</sup>,阿魏酸是当归、川芎等中药的主要有效单体成分,其钠

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(30271671)

1 武汉大学中南医院康复医学科,武汉大学医学院脑血管病研究中心,武汉市东湖路 169 号,430071

2 通讯作者:廖维靖(武汉大学中南医院康复医学科,武汉大学医学院脑血管病研究中心,武汉市东湖路 169 号,430071)

作者简介:周琴,女,硕士在读

收稿日期:2006-01-24

盐为阿魏酸钠(sodium ferulate, SF), 临床初步证实对缺血性脑血管疾病有一定疗效, 但对血管生成的作用目前未见报道。本研究阿魏酸钠对局灶性脑缺血再灌注后神经功能恢复和血管生成的影响, 旨在阐明 SF 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物造模与分组

雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 160—180g, 购于湖北省实验动物研究中心。缺血组大鼠(n=45)经腹腔注射 5%水合氯醛(0.6ml/100g)麻醉后, 手术步骤参照 Zea Longa 等<sup>[4]</sup>介绍的线栓造模方法并进行部分改良<sup>[5]</sup>。假手术组(n=15)线栓插入深度为 1.0cm, 其余步骤同缺血组。待动物清醒后采用 Bederson 标准初步评分进行筛选。0 级: 未见行为缺陷; 1 级: 前肢屈曲(提尾悬空实验阳性); 2 级: 侧推抵抗力下降(侧向推力实验阳性), 伴前肢屈曲, 无转圈行为; 3 级: 同 2 级行为, 伴自发性旋转。选择评分为 1、2、3 级的大鼠随机分为 2 组: SF 治疗组和缺血对照组。SF 组于再灌注后即刻(即拔线栓时)腹腔注射阿魏酸钠 100mg/kg(购于重庆药友制药有限责任公司), 以后每 24h 注射药物 1 次, 给药方式与剂量同上。缺血对照组腹腔注射相同剂量的生理盐水, 假手术组不予任何治疗。线栓购自上海申丁实业有限公司, 直径约 0.15mm。实验前在电烙铁上将线栓加热使之末端成为光滑球形, 每根线栓长约 4cm。术后大鼠在武汉大学实验动物中心 SPF 级实验室饲养, 置于放有清洁垫料的饲养盒中, 自由进水、取食。

### 1.2 神经功能评分

**1.2.1 横木行走测试:** 对大鼠运动, 尤其是后肢运动的协调和整合能力的缺陷进行评估<sup>[6]</sup>。术前进行 3 天的预训练, 使动物学会此项任务。横木行走的装置包括一个方形的横木(宽 2.5cm, 长 122cm, 高 42cm), 横木离地面 1m 高, 在大鼠的出发点上方放一灯, 以刺激动物爬行, 横木的末端连接一个黑色的管道。记录走完横木所用时间和失足次数。正常情况下, 大鼠可将四肢平放在横木表面行走。若后肢放在横木边缘或者从横木表面滑下, 称为 1 次失足。评分标准: 0 分, 大鼠无法呆在横木上; 1 分, 大鼠可以呆在横木上, 但是不动; 2 分, 大鼠尝试走过横木, 但没有成功; 3 分, 大鼠成功走过横木, 但受损后肢有 >50% 的失足率; 4 分, 大鼠成功走过横木, 出现失足, 但失足率 <50%; 5 分, 大鼠成功走过横木, 后肢仅出现 1 次失足; 6 分, 大鼠成功走过横木, 未出现 1 次失足。每次测试 3 次, 取平均值。

**1.2.2 网格行走测试:** 对大鼠运动中前肢放置的协调性进行评估。术前进行 3 天的预训练, 使大鼠熟悉这项任务。动物放置在升高的网格平台上, 设备见文献描述<sup>[7]</sup>, 正常情况下大鼠通过将前肢放在网格的栏杆上爬行, 当通过网格时前肢滑落称为 1 次失足。记录大鼠在平台上爬行 2min 的前肢失足次数。每次测试 3 次, 取平均值。

### 1.3 脑梗死体积及脑含水量的测定

在各相应时间点处死动物, 5%水合氯醛(0.6ml/100g)麻醉后, 断头取脑, 用数码相机(Nikon4500 型)拍照后沿脑桥上界面切断, 去除嗅球, 称全脑重, 立即放入 -20℃冰箱, 20min 后取出。由前向后间隔 2mm 做连续冠状切片, 共 7 片。将切片置入 2%TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, 购自 Amresco 公司)溶液中, 37℃避光染色 30min。染色后正常组织呈红色, 缺血区域呈白色。据此将列入研究的动物进行第二次筛选, 将只有皮层缺血或同时有皮层和纹状体缺血的动物列入本研究。切片放入 4%多聚甲醛中固定 12h 后取出, 数码相机拍照。用 Image J 图像分析软件, 分别计算出每张切片的苍白区面积和整个脑片的面积, 总和后乘以切片厚度(2mm)分别得到梗死体积和全脑体积。梗死百分比(%)=(梗死体积/全脑体积)×100%。拍照后的脑组织放入 100℃烤箱中烘烤 24h 后取出称干重。脑含水量=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%。

### 1.4 脑血浆灌注量、脑微血管直径及形态的观察

取雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 160—180g, 造模和分组方法同上, SF 治疗组和缺血对照组各 5 只。用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的右旋糖苷标记血浆, 在激光扫描共聚焦显微镜(laser-scanning confocal microscope, LSCM, Leica TCS-SP2-AOBS-MP 型)观察脑血浆灌注量、微血管直径及形态, 缺血再灌注后 7 天将动物麻醉, FITC-右旋糖苷 0.1ml (50mg/ml, 分子量  $2 \times 10^6$ , Sigma 公司)股静脉注射, 1min 后断头, 快速取出脑组织, 置于 4%多聚甲醛 4℃固定 48h, 振动切片机冠状切片, 取视交叉部位, 片厚 150μm。用激光扫描共聚焦显微镜观察, 激发波长 488nm, 20×镜下, x-y 平面采用 512×512 像素, 2×面平均, 2×线平均, 观察皮层缺血半暗带, z 轴方向每 0.5μm 扫一层, 共扫 100 个层面, 获得图像体积为 (750×750×50)μm<sup>3</sup>, 将所获得的图像进行三维重建, 用绿色荧光所占体积表示血浆灌注量(volumes of plasma perfusion), 用 40×镜下获得的图像分析血管直径小于 8μm 的血管, 观察数目和血管形态。

## 1.5 统计学分析

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,脑含水量数据用单因素方差分析,神经功能评分、脑梗死体积和脑血浆灌注量用两个独立样本的 $t$ 检验分析,脑血管直径用 $\chi^2$ 检验,数据用SPSS11.5统计软件处理。

## 2 结果

### 2.1 大体观察

假手术组大脑外观左右两侧对称,大脑腹侧、背侧及左右两侧血管分布一致。缺血组大鼠缺血侧皮层血管密度在术后2d略有增加,到7d达到高峰,14d血管密度较7d略有下降。与缺血对侧相比,在术后2d,缺血侧脑组织略有水肿,到7d消失,14d略有萎缩。见图1。

### 2.2 神经功能评分

SF 2d

SF 7d

SF 14d

脑缺血后神经功能损伤可以不完全自发恢复。

随着时间点的推移,两组的神经功能评分呈逐渐好转的趋势,在横木行走测试与网格行走测试中,SF组在各时间点的神经功能恢复均较对照组好,并有显著性差异( $P<0.05$ )。见表1。

### 2.3 脑梗死体积及脑含水量的测定

术后7—8d是梗死体积发展到最大的时间,对照组和SF组的脑梗死体积均在术后7d达到高峰,SF组在各个时间点上的梗死体积都比对照组小,有显著性差异( $P<0.05$ )。SF组脑含水量在术后2d高于对照组和假手术组,有显著性差异( $P<0.05$ )。随后对照组脑含水量逐渐上升,SF组逐渐下降。术后7d SF组脑含水量低于缺血对照组,但无显著性差异( $P>0.05$ ),术后14d脑含水量继续降低,低于缺血对照组和假手术组,有显著性差异( $P<0.01$ )。见表2。

表1 对照组与SF组各时间点神经功能测试结果的比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 时间点 | 横木行走测试       |                           | 网格行走测试         |                            |
|-----|--------------|---------------------------|----------------|----------------------------|
|     | 对照组          | SF组                       | 对照组            | SF组                        |
| 2d  | 1.267±0.2517 | 4.325±1.3720 <sup>①</sup> | 10.8500±9.6873 | 3.2000±0.7071 <sup>①</sup> |
| 7d  | 2.300±1.0000 | 5.067±1.2097 <sup>①</sup> | 5.6767±0.8618  | 1.9850±1.8597 <sup>①</sup> |
| 14d | 2.567±1.0263 | 5.500±0.5000 <sup>①</sup> | 2.7833±1.3042  | 1.0000±0.4243 <sup>①</sup> |

①与同时时间点对照组比较 $P<0.05$

图1 SF组各时间点的大体形态观察及TTC染色

表2 对照组与SF组各时间点脑梗死体积比和脑含水量结果的比较

( $\bar{x}\pm s$ )

| 时间点 | 脑梗死体积比(%)    |                           | 脑含水量(%)      |                           |                           |
|-----|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
|     | 对照组          | SF组                       | 假手术组         | 对照组                       | SF组                       |
| 2d  | 17.36±0.0408 | 12.03±0.0164 <sup>①</sup> | 76.35±0.3510 | 76.77±0.5762              | 78.56±0.0311 <sup>②</sup> |
| 7d  | 27.95±0.0230 | 22.75±0.0375 <sup>①</sup> | 76.63±0.0158 | 78.35±0.7324 <sup>②</sup> | 78.11±0.1107 <sup>②</sup> |
| 14d | 17.81±0.0325 | 5.57±0.0049 <sup>①</sup>  | 77.70±0.0396 | 79.47±0.3036 <sup>②</sup> | 77.20±0.0633 <sup>②</sup> |

①与对照组比较 $P<0.05$ ; ②与假手术组比较 $P<0.05$

### 2.4 脑血浆灌注量、脑微血管直径及形态的观察

术后第7d,与对照组相比,SF能显著促进缺血半暗带脑微血管的血浆灌注量(图2-A、B、G),SF组对侧的血浆灌注量也高于对照组对侧(图2-C、D、G)。高倍放大图像显示,与缺血对侧皮层相比,缺血侧脑组织微血管出现迂曲的不规则形状(图5-E、F)。血管直径分析的数据表明,SF组缺血侧直径在3 $\mu\text{m}$ 以下的血管占47%明显多于对侧(占14%),对侧脑组织绝大多数(72%)血管直径在3—5 $\mu\text{m}$ 之间(图5-H)。SF组缺血侧为直径为(3.3302±1.3893) $\mu\text{m}$ ,对侧为(4.11±1.1491) $\mu\text{m}$ ,缺血侧平均血管直径比对侧小,有显著性差异( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

临床研究发现,卒中患者的神经功能可以部分自

发恢复,但通常为不完全恢复,伴有较高血管密度的卒中患者,其发病率降低,生存时间延长,卒中患者的功能成像表明,局灶性脑梗死周围组织的脑血流和代谢都增高<sup>[8]</sup>,这些资料表明,脑微循环的恢复对卒中后神经功能的恢复十分重要。而脑循环的恢复可能包括缺血半暗带侧支循环的增加和血管生成。当归可促进缺血性脑组织VEGF的表达,促进血管生成<sup>[9]</sup>。阿魏酸是当归的主要单体成分,临床初步验证对缺血性脑血管疾病有一定疗效,但其具体作用机制仍不明确。

本实验通过横木行走测试和网格行走测试评估SF对神经功能恢复的影响,结果显示,SF具有明显的促进脑缺血后神经功能恢复的作用,并能明显减小脑梗死体积。SF组术后2d脑含水量比缺血对照组和假手术组高可能是因为SF促进血管生成,新生血管增多,伴血管通透性增高,使脑含水量增加,引起血管源

血管直径 $<3\mu\text{m}$ ,可能是由于动物模型的制作方法和给予的治疗不同所致。

#### 4 结论

SF可显著改善脑缺血再灌注损伤后的神经功能恢复,减小脑梗死体积,减轻脑水肿,其机制可能与其促进血管生成有关。

#### 参考文献

- [1] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. Stroke, 1994, 25(9): 1794—1798.
- [2] 黄小玲. 脑血管生成与缺血性脑血管病 [J]. 医学理论与实践, 2005, 18(1): 22—24.
- [3] 廖维靖, 杨万同, 周云峰, 等. 当归对大鼠脑缺血损伤保护作用的实验研究 [J]. 中草药, 1999, 30(4): 273—274.
- [4] Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [5] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 345—348.
- [6] Puurunen K, Jolkonen J, Sirvio J, et al. An  $\alpha 2$ -adrenergic antagonist atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats [J]. Neuropharmacology, 2001, 40(4): 597—606.
- [7] 蒙兰青, 廖维靖, 杨万同, 等. 运动训练对小鼠脑缺血再灌注后功能恢复及 VEGF 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(3): 197—199.
- [8] Cramer SC, Nelles G, Benson RR, et al. A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke [J]. Stroke, 1997, 28(12): 2518—2527.
- [9] 蒙兰青, 廖维靖, 杨万同, 等. 当归对大鼠缺血性脑损伤再灌注后血管生成的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(2): 84—86.
- [10] Lin TN, Sun SW, Cheng WM, et al. Dynamic Changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2002, 33(12): 2985—2991.
- [11] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain [J]. J Clin Invest, 2000, 106(7): 829—883.

①与对照组相比  $P<0.05$ , ②与对照组现比  $P<0.01$

图 A、C、E 为对照组, 图 B、D、F 为 SF 组

图 2 缺血再灌注 7 天 SF 对脑血浆灌注量、脑微血管直径及形态的影响

性水肿的缘故,随后脑含水量逐渐降低,到 14d 低于对照组和假手术组,表明 SF 能导致脑缺血再灌注后早期的脑水肿加重,但到 14d 仍能有效地调节脑含水量,减轻脑水肿。

激光扫描共聚焦显微镜是近年发展起来的医学图像分析仪器,它可以用于观察脑血流灌注、脑血管直径,其三维重建技术也更好地显示血管形态的变化。Lin 等<sup>[10]</sup>的研究发现,缺血侧的脑血流量(cerebral blood volume, CBV)从第 1d 到 14d 都明显增高,第 7d 时达到高峰。本实验观察了治疗组和对照组术后 7d 血浆灌注量的变化。SF 组缺血侧皮层缺血半暗带的血浆灌注量明显高于对照组 ( $P<0.01$ ),表明 SF 能显著改善缺血半暗带的血流灌注,可能是与其促进神经功能恢复的作用有关。缺血侧缺血半暗带 47% 的血浆灌注血管直径 $<3\mu\text{m}$ ,而对侧脑组织绝大多数血管直径为  $3\sim 5\mu\text{m}$ ,表明在缺血半暗带血浆灌注血管的增加为新生血管,且新生血管呈迂曲的不规则形状。Zhang 等<sup>[11]</sup>的研究结果显示 85% 微