

·基础研究·

当归多糖与川芎嗪配伍对大鼠脑缺血再灌注后血管生成的影响*

方 针¹ 廖维靖^{1,4} 雷 涛² 王珊珊³ 蔺俊斌¹

摘要

目的:研究当归多糖(分子量 < 5ku)与川芎嗪配伍治疗对大鼠中动脉阻断(MCAO)再灌注大鼠模型神经功能恢复和血管生成的作用。

方法:制作大鼠MCAO再灌注模型,治疗组分别腹腔注射当归多糖、川芎嗪、当归多糖-川芎嗪配伍制剂,并设立对照组。观察造模术后4h、24h、7d三个时间点行为学评分。激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察缺血侧脑组织的血流量、微血管密度。

结果:治疗组行为学评分值较对照组均有降低,其中当-川配伍组差异最具显著性($P<0.05$)。LSCM见脑组织中微血管呈绿色荧光充盈,治疗组脑血流量和微血管密度计数较对照组均有增高,当-川配伍组差异最具显著性($P<0.05$)。

结论:当归多糖、川芎嗪、当-川配伍治疗对于大鼠MCAO再灌注模型的神经功能恢复及血管生成均有促进作用,其中当-川配伍治疗效果最佳。

关键词 当归多糖;川芎嗪;大鼠中动脉阻断;神经功能缺损;激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号:R793,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-11-1006-04

Effects of compatibility of angelica polysaccharide and tetramethylpyrazine on angiogenesis in cerebral ischemia-reperfusion rats/FANG Zhen, LIAO Weijing, LEI Tao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(11): 1006—1009

Abstract

Objective:To study the effects on neurological function and angiogenesis in middle cerebral artery occlusion (MCAO)/reperfusion rats using the drug compatibility of angelica polysaccharide(APS) molecular weight(MW) < 5ku and tetramethylpyrazine(TMP).

Method:Models of MCAO/reperfusion were established with modified thread embolism method. Three treatment groups were given intraperitoneal injection of APS, TMP and drug compatibility of LMW(low molecular weight)-APS and TMP, a control group was also established. Behavior scoring was proceeded to all groups of rats. Laser scanning confocal microscopy(LSCM) was used to observe the plasma perfusion and microvessel density(MVD) in ischemic brain of rats.

Result:The behavior scores of three treatment groups were lower than the control group, the treatment of compatibility of LMW-APS and TMP showed significant difference ($P<0.05$). Microvessels in brain tissue were filling with green fluorescence under LSCM. Cerebral blood volume(CBV) and microvessel density(MVD) in three treatment groups were higher than those in the control group, and the APS-TMP group showed significant difference ($P<0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.11.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(81072917)

1 武汉大学中南医院康复医学科,430071(现工作单位:澳门镜湖医院康复科,澳门); 2 武汉大学人民医院康复医学科; 3 湖北省襄阳市中心医院康复医学科; 4 通讯作者

作者简介:方针,女,住院医师; 收稿日期:2014-01-18

Conclusion: In this study all the drug therapies were valid on the improvement of behavior scores and angiogenesis of rats' focal ischemic brain injury. Among these therapies, the treatment of compatibility of LMW-APS and TMP provided the best effect.

Author's address Department of Rehabilitation, Hospital Kiang Wu of Macau, Macau, 999078

Key word angelica polysaccharide; tetramethylpyrazine; middle cerebral artery occlusion; neurologic impairment; laser-scanning confocal microscope

缺血性脑卒中约占全部脑卒中的80%,是发病率、病死率及致残率均高的一类疾病,给人类健康和生命造成极大威胁,给患者带来极大痛苦^[1]。急性脑卒中引起的脑梗死病灶是由急性脑缺血形成中心坏死区和周围缺血半暗带组成。能否及早恢复缺血半暗带的血流灌注挽救濒死的神经元细胞是影响脑卒中预后的关键。早在20世纪,Krupinski等^[2]在研究脑卒中患者缺血半暗带血管生成作用中,发现微血管的密度增高,长时间存活率也随之增高,即说明血管再生与预后有明显相关性。治疗性血管生成(therapeutic angiogenesis, TAG)^[3]指采用药物治疗、基因工程等方法促进缺血区域新毛细血管的生成,形成的侧支循环以达到改善血供的目的,其出现为缺血性脑血管病治疗及预后开辟了一条新途径^[4],是研究缺血性脑卒中预防及治疗的重要方向。然而,目前临床上尚无机理明确及疗效肯定的药物或方法可促进脑缺血半暗带区域血管生成。川芎嗪在临床上被广泛用于缺血性脑血管病的治疗,疗效较好。当归多糖为当归非挥发成分之一,因显著的生血造血、免疫调节、抗肿瘤、抗辐射等作用日渐受到关注^[5]。本文提取分子量(molecular weight, MW) < 5ku的当归多糖,观察其自身及与川芎嗪配伍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,旨在阐明两者配伍的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性斯泼累格·多雷(Sprague-Dawley, SD)成年大鼠40只,体重(220±20)g,无菌级,购自武汉大学动物实验中心。计算机随机数字法分为模型对照组(G1)、当归多糖组(G2)、川芎嗪组(G3)和当-川配伍组(G4),每组10只。

1.2 主要试剂和仪器

当归多糖(MW < 5ku)由课题组在前期工作中使

用水煮-醇沉法提取并超滤截取分子量5ku以下的多糖,川芎嗪购自Aladdin Chemistry Co. Ltd,当归多糖+川芎嗪配伍溶液由100ml 0.9%氯化钠溶液中加入2g低分子量当归多糖和1g川芎嗪配制而成,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的右旋糖苷购自美国Sigma公司,激光扫描共聚焦显微镜购自德国LEICA公司。

当归多糖(MW < 5ku)制作方法:当归药材平摊置于电热鼓风干燥箱中,恒温保持50℃,48h。手动将干燥当归药材掰成小块后用万能粉碎机粉碎,粉碎的颗粒过24孔目筛,并称重当归颗粒。分别用10倍、8倍、6倍及4倍体积的95%乙醇回流提取4次,每次2h,提取脂溶性物质和小分子色素。非脂溶性颗粒静置挥发乙醇,分别用10倍、8倍及6倍体积一级水回流提取3次,每次2h,提取水溶性物质。汇总三次的水溶性提取液,减压浓缩,加入1/4倍体积Sevage试剂(三氯甲烷:正丁醇=4:1)去除蛋白质,恒温振荡12h,5000r/min离心10min,取上清液,弃沉淀,反复除蛋白直至无沉淀产生。上清液经4℃冷处理后缓慢加入5.3倍体积95%乙醇,边加入乙醇边搅拌,产生大量絮状白色沉淀,取上清液继续加95%乙醇,直至无沉淀产生,4℃静置过夜。5000r/min离心10min,收集沉淀,加适量一级水溶解,冻干法得到当归总多糖。当归总多糖粉末加适量一级水充分溶解,室温20℃,0.09MPa下操作中空纤维膜超滤膜(截取MW<5ku)纯化当归多糖液,减压浓缩,5000rpm离心10min,取上清,弃小分子肽沉淀,再通过孔径为0.45μm的针孔过滤器过滤去除杂质(大分子蛋白质和大分子糖类),保存-80℃过夜后,经冷冻干燥后得到米白色低分子量(MW < 5ku)的当归多糖粉剂。

1.3 实验方法

1.3.1 动物处理:建立大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注大鼠模型,手

术方法参照廖维靖等^[6]的线栓改良法。各组大鼠均在建模手术中拔线栓即刻行腹腔注射给药,术后连续给药7天。模型对照组(G1)给予0.9%氯化钠溶液5ml/kg,当归多糖组(G2)给予2%的当归多糖(MW<5ku)溶液5ml/kg,川芎嗪组(G3)给予1%的川芎嗪溶液5ml/kg,当-川配伍组(G4)给予3%的当归多糖(MW<5ku)+川芎嗪配伍溶液5ml/kg。

1.3.2 行为学评分:行为学评分项目,由6项相加求和:Zea Longa评分^[7]、自发运动能力评分^[8]、翻正反射评分^[9]、水平杆测试评分^[10]、抓握测试评分^[9]和放置反应评分^[9]。由3名已经接受严格培训的实验员同时对大鼠的行为学表现进行讨论评分,评分时间为四组大鼠手术后4h、24h和7d三个时间点。

Zea Longa评分项:无任何神经功能缺损,计0分;左前肢不可伸展,计1分;向左侧行走,计2分;向左侧转圈成追尾状,计3分;意识障碍,不可自主行走,计4分。

自发运动能力评分项:将大鼠放置在手术前的居住笼,期望出现自发移动和探索,10s内出现自发探索活动计0分,10s内不出现自发探索活动计1分。

翻正反射评分项:将大鼠仰卧放置,可立即翻转恢复成正常俯卧姿势,计0分,无法翻转恢复成正常俯卧姿势,计1分。

水平杆测试评分项:将大鼠双前肢置于约距地面30cm高的水平杆上,正下方铺有海绵垫,期望可抓握并悬吊3s,顺利抓握并保持超过3s,计0分,不能抓握保持3s,计1分。

抓握测试评分项:将一小根棉签的木棒段靠近置于大鼠前肢下,双前肢同时抓握木棒,计0分,双前肢不能同时抓握木棒,计1分。

放置反应评分项:将大鼠放置在实验台,推其一侧肢体使其靠近实验台的边缘,实验台边缘下垫有海绵垫,缓慢地将边缘一侧的肢体拉下平台,可迅速重新恢复肢体放置,计0分,无法恢复肢体放置而摔下实验台,计1分。

1.3.3 血浆灌注量和血管密度的观察:术后7d, FITC-右旋糖苷(50mg/ml,分子量 2×10^6)2ml心脏灌注标记血浆,肝脏表面均匀充盈绿色荧光后断头,取出脑组织,4℃生理盐水清洗,10%多聚甲醛溶液固定,4℃保藏。48h后取出,振动切片机上行冠状切

片,片厚300 μ m。取视交叉平面切片,激光扫描共聚焦显微镜(laser-scanning confocal microscope, LSCM)下观察缺血侧皮质和纹状体,激发波长488nm,40 $\times$ 镜下,x-y平面采用512 $\times$ 512像素,2 $\times$ 面平均,2 $\times$ 线平均,z轴方向每1 μ m扫一层,共扫描100个平面,获得图像体积为(750 $\times$ 750 $\times$ 100) μ m³,绿色荧光所占体积表示血浆灌注量,皮质和纹状体的灌注量总和即脑血流量(cerebral blood volume, CBV)。计数微血管密度(microvessel density, MVD)采用weidner微血管计数方法^[11],微血管经荧光剂充盈在激光扫描共聚焦显微镜下呈绿色网络状,结构上相连,视为同一根血管,结构上不相连,其分支另作为一根血管计数,管腔直径大于8 μ m的血管不参与计数。低倍视野下选取微血管密集区,再在40 $\times$ 视野下由3个不知道实验分组的观察者同时计数同一视野,每张切片各数3个高倍视野,取3人计数3个视野的单个视野即平均微血管密度。

1.4 统计学分析

所有实验数据采用SPSS17.0软件统计分析。符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析的方法进行方差分析。检验后, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 行为学评分

局灶性脑缺血的神经功能损伤可不完全的自行恢复。随着时间推移,四组行为学评分均呈好转趋势。行为学4h评分四组大鼠间无显著性差异;行为学24h评分,当-川配比组(G4)和对照组之间有显著性差异($P=0.04$),其他实验组与对照组之间及各实验组之间无显著性差异;7天后行为学评分,G3及G4均与对照组之间有显著性差异($G1>G3$, $P=0.018$, $G1>G4$, $P=0.03$),G2与对照组之间及各实验组之间均无显著性差异(表1)。

表1 药物治疗实验部分各组大鼠行为学评分情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	4h	24h	7d
模型对照组(G1)	6.00 $\pm$ 1.66	7.00 $\pm$ 1.07	2.29 $\pm$ 0.49
当归多糖组(G2)	6.30 $\pm$ 1.64	6.11 $\pm$ 1.36	1.71 $\pm$ 0.76
川芎嗪组(G3)	6.00 $\pm$ 1.05	6.00 $\pm$ 1.41	1.13 $\pm$ 1.00 ^①
当-川配比组(G4)	6.00 $\pm$ 1.00	5.11 $\pm$ 0.78 ^①	1.00 $\pm$ 0.58 ^①

与模型对照组比较^① $P<0.05$

2.2 脑血浆灌注量和微血管密度的检测

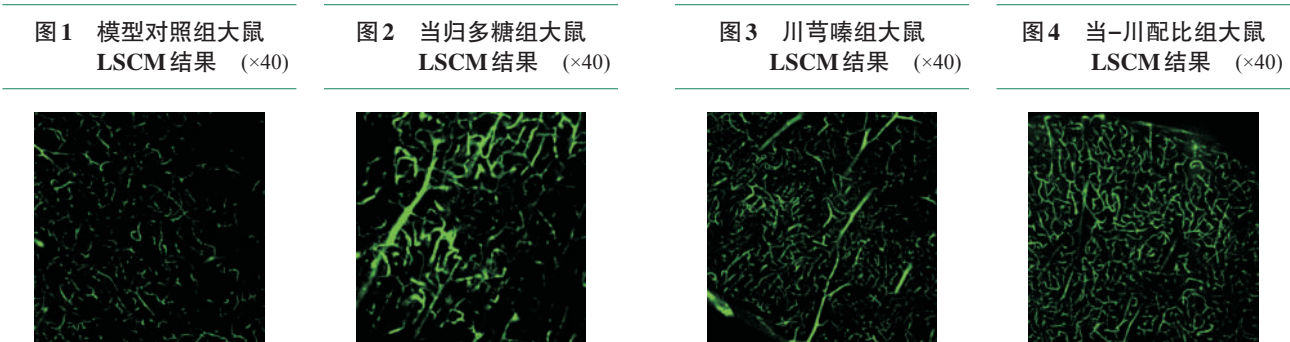
LSCM下可见各组大鼠脑组织中微血管呈绿色荧光充盈(图1—4)。CBV:G4与对照组之间有显著性差异($P=0.01$),其他两组与对照组之间无显著性差异,三个实验组之间 $G2 < G4$ ($P=0.011$), $G3 <$

$G4$ ($P=0.049$)。MVD:G2、G3、G4与对照组之间有显著性差异($PG2.G1=0.04$, $PG3.G1=0.00$, $PG4.G1=0.00$),三个实验组之间 $G2 < G4$ ($P=0.000$), $G3 < G4$ ($P=0.000$)(表2)。

表2 四组大鼠缺血侧脑血流情况 (x±s)

组别	例数	缺血侧脑血流量(CBV)	缺血侧微血管密度(MVD)
模型对照组	7	3143673.43±1094020.500	18.86±2.268
当归多糖组	7	5334708.29±1295728.828 ^③	26.86±5.398 ^{①④}
川芎嗪组	8	6539000.63±2551734.632 ^③	27.38±4.373 ^{②④}
当-川配比组	7	10435582.57±4328939.387 ^①	39.14±2.673 ^②

与G1组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与G4组比较:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$



3 讨论

川芎嗪可减轻缺血性脑损伤,促进细胞增殖和分化^[12],对于脑血管的保护作用已得到肯定。当归及其注射液对大鼠缺血性脑损伤有保护作用,促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体 Flt-1、Flk-1 的表达^[13]、缺血半暗带区血管的再生^[14]及神经功能的恢复^[15]。当归多糖可促进缺血性脑损伤大鼠 Ang-2 的表达^[16], MW < 50ku 的当归多糖具有显著促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的作用^[17]。MW < 5ku 的当归多糖和川芎嗪配伍治疗对脑缺血的皮质及纹状体区域的脑血浆灌注和微血管密度的作用尚不明确。

研究通过 Zea Longa 评分、自发运动能力评分、翻正反射评分、水平杆测试评分、抓握测试评分和放置反应评分汇总对神经功能缺损进行判断。发现,川芎嗪治疗及当-川配伍治疗一周均可促进脑缺血后神经功能改善。当归多糖治疗作用不显著,可能与纯度及治疗周期有关。

LSCM 观察血浆灌注量和微血管密度,三个治

疗组的血浆灌注量均高于模型对照组,其中当-川配伍组血浆灌注量最高,这可能与恢复神经功能的作用有关。微血管密度计数可见,模型对照组的视野黑暗,几乎不可见绿色荧光充盈,而三个治疗组可明显见绿色荧光充盈的血管走形,血管直径多在 5μm,走形迂回曲折,分支较多,表明缺血半暗带区域增加的血管为新生的微血管。对比 G2、G3、G4 的微血管密度可见,当-川配伍组的微血管密度计数最高,促血管生成作用最为显著。

综合以上可见, MW < 5ku 当归多糖治疗、川芎嗪治疗和当-川配伍治疗均有助于神经功能恢复、促进血管生成,其中当-川配伍治疗作用最显著,川芎嗪治疗组作用次之,低分子量当归多糖的治疗效果最次。分析低分子量当归多糖的疗效最次有以下原因:首先,治疗剂量偏低,2%浓度的当归多糖溶液, 5ml/kg/只,相当于 100mg/kg/只,在多糖类对于大鼠的治疗剂量中为中等水平;再者,治疗周期为一周,时间较短。

(下转第 1015 页)