

补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响

田兆华¹, 刘柏炎²

(1. 广州市白云区中医医院内二科, 广东省广州市 510470 2 湖南中医药大学中医内科实验室, 湖南省长沙市 410007)

[关键词] 补阳还五汤; 脑缺血; 血管新生; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷; 大鼠

[摘要] 目的 探讨补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响。方法 采用大脑中动脉线栓法建立右侧局灶性脑缺血大鼠模型, 将动物随机分为正常组、假手术组、模型组、中药组、重组人血管内皮抑制素(ED)组和中药+ED组, 腹腔注射 5-溴脱氧尿嘧啶核苷, 给予不同处理, 分别于 1、7、14天和 28天处死动物, 采用免疫组织化学法观察血管新生情况。结果 正常脑内存在一定的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷、血管性血友病因子阳性细胞, 脑缺血后表达迅速增加, 7天达高峰, 然后逐渐下降; ED组 5-溴脱氧尿嘧啶核苷、血管性血友病因子阳性细胞数量明显少于同期各组($P < 0.05$); 补阳还五汤可显著增强 5-溴脱氧尿嘧啶核苷、血管性血友病因子的表达, 在第 7天和 14天明显多于其它各组($P < 0.05$), 7天时补阳还五汤+ED组 5-溴脱氧尿嘧啶核苷、血管性血友病因子阳性细胞数多于模型组和 ED组($P < 0.05$), 但少于补阳还五汤组($P < 0.05$)。用药 7天和 14天, 补阳还五汤组降低神经功能积分作用与其它用药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。补阳还五汤+ED组降低积分作用强于模型组和 ED组($P < 0.05$), 但较补阳还五汤组作用弱($P < 0.05$)。结论 补阳还五汤可促进局灶性脑缺血大鼠缺血区血管新生, 并可部分拮抗重组人血管内皮抑制素阻断的血管新生, 提示其可能通过其他途径影响血管新生。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Buyang Huanwu Decoction on Angiogenesis in Rats after Focal Cerebral Ischemia

TIAN Zhao-Hua and LIU Bo-Yan

(Department of Medicine Two, the Baiyun District Hospital of Chinese Medicine of Guangzhou, Guangzhou 510470 China)

[KEY WORDS] Buyanghuanwu Decoction; Cerebral Ischemia; Angiogenesis; BrdU; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Buyanghuanwu decoction (BYHWD) on angiogenesis in rats after focal cerebral ischemia. **Methods** The model of focal cerebral ischemia in rats was reproduced by middle cerebral artery occlusion. Rats were randomly divided into naive, sham-operated, ischemia, Buyanghuanwu decoction (BYHWD), ED and BYHWD+ED group. Animals were received BrdU-labeled and killed at 1, 7, 14 and 28 day point after operation. BrdU and WVF were measured by immunohistochemical staining. **Results** There was a certain BrdU or WVF positive cells in normal brain, after cerebral ischemia BrdU positive cells were increased and reached the peak at 7 day. The expression of BrdU or positive cells of ED group were less than the others remarkably at the same time point ($P < 0.05$). BYHWD can significantly increase the expression of BrdU or WVF. The increase was statistically significant at 7 and 14 day point after ischemia ($P < 0.05$). The expression of BYHWD+ED groups was more than model and ED group at 7 day time point ($P < 0.05$), but less than BYHWD group ($P < 0.05$). Compared to the other groups, there was statistical significance on BYHWD for decreasing the number of nerve function at 7 and 14 day points ($P < 0.05$). The effect of decreasing nerve function number on BYHWD+ED was better than model and ED groups ($P < 0.05$), but less than BYHWD ($P < 0.05$). **Conclusion** BYHWD may promote the angiogenesis in rats after focal cerebral ischemia. BYHWD can partly promote the angiogenesis which ED restrained. The result shows that it affects ischemia by other ways.

脑缺血后由于脑组织缺血、缺氧引起缺血半暗区神经元变性、坏死, 而导致神经功能缺损, 因此, 尽快恢复缺血区的血液供应对缺血后神经功能的恢复至关重要, 而缺血半暗区血流的恢复有赖于侧支循

环的建立。血管新生是改善脑组织血流供应的一种有效方法, 对中风患者的预后十分关键, 是近年来中风研究的热点之一^[1]。补阳还五汤是中医治疗缺血性脑损伤的有效经典方剂, 前期研究表明, 补阳还五汤能显著提高局灶性脑缺血模型大鼠神经功能, 增强脑缺血后血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体 Flk1 的表达^[2], 那么补阳还五汤是否可以促进血管新生进而抗脑缺血损伤? 本研究通过免疫组织化学方法观察脑缺血后血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 的表

[收稿日期] 2009-12-08 [修回日期] 2010-03-10

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (06JJ20054) 资助

[作者简介] 田兆华, 硕士, 医师, 研究方向为脑血管疾病的研究, Email 为 tianzhaohua@sina.com。刘柏炎, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管疾病的研究。

达,探讨脑缺血是否可以诱发缺血周围区的血管新生,以及补阳还五汤是否可以促进脑缺血大鼠缺血区血管新生,为脑缺血后循环重建和功能恢复提供一个新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 100 只,体重 250~300 g 雌雄各半,购于上海实验动物中心。

1.2 药物

补阳还五汤处方来源于清·王清任《医林改错》按原方组成:黄芪 120 g 赤芍 10 g 川芎 10 g 当归尾 10 g 地龙(研末)10 g 红花 10 g 桃仁 10 g 中药饮片购自湖南省中医研究院,为同一批药材,经鉴定符合 2005 年《中国药典》的规定。补阳还五汤传统汤剂制备:传统饮片先用清水浸泡 30 min,第一煎加药材 5 倍体积水,煎汁 30 min,二煎 5 倍体积水,煎汁 30 min,两煎混合,每毫克含生药 1.5 g 置于 4℃ 下冷藏备用。

1.3 试剂

wF 单克隆抗体、罗丹明红 (rhodamine red)、异硫氰酸荧光黄 (FITC) 均购自美国 Sigma 公司; BrU 单克隆抗体购自美国 Chemico 公司;重组人血管内皮抑制素 (endostatin, ED) 购自湖南中医药大学第一附属医院; SABC 试剂盒、AEC 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司; TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)、PBS 磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 值 7.2~7.4) 均购自武汉博士德生物工程有限公司;水合氯醛、双氧水均购自北京鼎国生物工程有限公司。

1.4 仪器

英国 Thermo 公司 E60 冰冻切片机;日本 Olympus 公司 BX51 光学显微镜及 Image-Pro Plus 5.1 (IPP5.1) 图像分析系统;上海玻璃仪器一厂自动双重纯水蒸馏器;杭州蓝天化验仪器厂 ZD-600 电热恒温水浴箱;上海台之衡电子衡器有限公司 FA 型电子天平。

1.5 动物分组与给药方法

90 只大鼠造模成功后随机分为模型组、补阳还五汤组、ED 组和补阳还五汤 + ED 组,另设正常对照组、假手术组各 5 只,假手术组只打开颈部皮肤,暴露颈部血管后不做其它任何处理即缝合。造模成功动物术后分别存活 1、7、14 天和 28 天后处死,每组每个时间点各 5 只。补阳还五汤组动物于术后苏

醒 2 h 后起按 4 mL/kg 灌服补阳还五汤药液,每日 1 次;ED 组动物于术后按 2.5 mg/kg 腹腔注射 ED,前 3 天每天 1 次,之后每周 2 次;补阳还五汤 + ED 组动物同时进行上述两组动物的操作;上述 3 组按 50 mg/kg 腹腔注射 5-溴脱氧尿嘧啶核苷进行累积标记,前 3 天每天 1 次,之后每周 2 次,动物若死亡则随机补充。其他各组动物均给予等体积无菌蒸馏水,自由饮食、活动。

1.6 动物造模

采用文献 [3] 改良的大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,10% 水合氯醛 (4 mL/kg) 腹腔注射麻醉,固定后颈部正中消毒,然后做一长约 2.5~3.0 cm 的切口,钝性分离出右侧颈总动脉,在其远心端分叉处分离出颈内动脉和颈外动脉,结扎颈总动脉和靠近气管的颈外动脉,然后在颈总动脉分叉处近心端作一小切口,将一段一端钝圆的 4-0 尼龙线由颈总动脉插入至颈内动脉,感觉到有轻微阻力为止,大约进入 17.0 ± 0.5 mm,然后结扎固定,缝合切口,在切口及周围涂抹抗生素。假手术组仅切开皮肤,分离右侧颈总动脉后即缝合。正常组不做任何特殊处理。手术过程中室温保持在 20~30℃ 并使用加热垫或白炽灯照射。术后将动物放入清洁的饲养盒中,若死亡则随机补充造模。

1.7 成功模型标准

行为学改变表现为动物苏醒后提尾时左侧前肢内收屈曲;同侧 Homer 征 (颈交感神经麻痹综合征:瞳孔缩小、眼睑下垂及眼裂狭小、眼球内陷和患侧颈部无汗);爬行时向左划圈;站立时左侧倾倒^[4]。TTC 染色后梗死区域呈白色,位置在皮层下,大脑的一侧,对侧大脑半球正常脑组织则被染成红色。

1.8 神经功能评分

待清醒 2 h 后按文献 [5] 的五级评分标准进行神经功能评分,0 级:行为无明显变化 (0 分);1 级:左前肢屈曲,左后肢伸展 (1 分);2 级:有左侧追尾现象 (2 分);3 级:行走困难,摇摆不定 (3 分);4 级:无自发性活动,有意识障碍 (4 分)。将第 1、2、3 级 (1~3 分) 大鼠确定为成功模型分入各组。

1.9 标本处理

将待取材大鼠腹腔注射水合氯醛 (4 mL/kg) 麻醉固定,打开胸腔并充分暴露心脏,将注射用 6 号针头由心尖插入至主动脉并固定好针头,剪开右心耳,快速滴入 0.01 mol/L PBS (100 mL),同时夹闭腹主动脉,待无血污流出或前爪和肺部颜色变白后改滴 4℃ 的 4% 多聚甲醛 (大约 200 mL) 固定,先快后慢,开颅取脑并去除小脑只保留大脑,放入 4% 多聚甲

醛中 4℃下固定 24 h, 然后依次放入 20% 和 30% 蔗糖溶液中沉底 48 h 进行梯度脱水, OTC 包埋, 冰冻切片, 取视交叉向前 5 mm 向后 8 mm 大脑中动脉供血区域即海马部位做冠状切片, 25 μm/片, 每隔 2 片切 3 片取作标本, 分别用于免疫组织化学 BrdU、vWF 酶学染色及 BrdU/vWF 荧光双标染色。

1.10 TTC 染色

参照文献 [6] 将合格大鼠麻醉, 从背面剪下头部并取出大脑, 用 0.01 PBS 冲洗后立刻放入 -34℃ 冰箱内快速冷冻 30 min, 自脑前极与视交叉连线中点处和漏斗柄与尾极之间, 作冠状切片, 每隔 2 mm 切 1 片, 一般切 5~6 片, 置于 2% TTC 中, 37℃ 避光水浴 20~30 min, 并做正常大鼠大脑 TTC 染色以对比观察缺血程度。

1.11 单标酶学免疫组织化学法

OTC 包埋, 冰冻切片; 切片放入 3% H₂O₂ 去离子水中浸 10 min, 灭活源性过氧化物酶活性; 0.01 mmol/L PBS 洗 5 min × 3, 滴加 10 μL 正常山羊血清室温下封闭 30 min, 加入 vWF 抗体 (1:100) 10 μL, 37℃ 水浴 3 h 或 4℃ 过夜; 0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3, 加入通用生物素化二抗 10 μL, 37℃ 水浴 30 min; 0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3, 加入辣根酶标记链霉卵白素 10 μL, 37℃ 水浴 30 min; 0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3, 滴加 AEC 显色剂 10 min; 0.01 mol/L PBS 洗 3 min × 2, 贴片并用水溶性封片剂封片; 同时用 0.01 mol/L PBS 代替一抗作空白对照以检查免疫反应的特异性并排除假阳性结果。

1.12 双标荧光免疫组织化学法

3% H₂O₂ 去离子水中浸 10 min; PBS 洗 5 min × 3, 2 mol/L HCl 37℃ 浸 15 min; PBS 洗 5 min × 3, 5% 山羊血清室温下封闭 30 min, 吸去勿洗; 加入 BrdU 单克隆抗体 (1:100) 10 μL, 37℃ 水浴 3 h 或 4℃ 过夜; PBS 洗 5 min × 3, 罗丹明 (发射光波长 570~590 nm, 红光) 染色, 37℃ 水浴 30 min; PBS 洗 5 min × 3, 5% 山羊血清室温下封闭 30 min, 吸去勿洗; vWF (1:100) 10 μL 37℃ 水浴 3 h 或 4℃ 过夜; PBS 洗 5 min × 3, FITC (发射光波长 520~530 nm, 黄绿色光) 染色, 37℃ 水浴 30 min; PBS 洗 5 min × 3, 贴片待自然风干后用甘油封片。

1.13 阳性细胞与新生血管计数

AEC 显色为红色, 单标免疫组织化学时, 红色为阳性表达。FITC 标记在皮层波长呈绿色, rhodamine 标记在皮层波长呈红色, 然后用软件进行重叠, 染色为黄色为双标阳性细胞。每只动物取海马部位不同断面切片 5 张, 置于 10×20 倍光镜下, 每

张切片随机选取 5 个视野^[7], 用 Olympus Image-Pro Plus 5.1 图象处理系统自动计数阳性细胞和新生血管数, 计算其平均值。每张切片选择 3 个血管最多的区域, 在 10×20 倍光镜下进行计数。

1.14 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 14.0 统计软件对数据进行统计分析, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响

正常组和苏醒 2 h 后假手术组动物未见神经功能缺损, 造模后各手术组动物都存在有明显神经功能缺损, 提示造模成功, 但神经功能评分差异无统计学意义。随着存活时间延长, 各组动物积分逐步减少。用药 7 天和 14 天, 补阳还五汤组降低神经功能积分作用与其它用药组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。补阳还五汤 + ED 组降低积分作用强于模型组和 ED 组 ($P < 0.05$), 但较补阳还五汤组作用弱 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	造模后时间点			
	1天	7天	14天	28天
假手术组	-	0.00 ± 0.00	-	-
模型组	2.14 ± 0.33	1.81 ± 0.16	1.21 ± 0.14	0.80 ± 0.35
补阳还五汤组	2.11 ± 0.48	1.35 ± 0.10 ^a	0.73 ± 0.22 ^a	0.43 ± 0.37
ED组	2.16 ± 0.13	1.96 ± 0.03	1.81 ± 0.05 ^a	1.70 ± 0.11 ^a
补阳还五汤 + ED组	2.12 ± 0.41	1.62 ± 0.16	0.94 ± 0.19	0.57 ± 0.44 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与同期各组比较; b 为 $P < 0.05$ 与模型组比较。

2.2 动物情况

造模后模型组、补阳还五汤组和 ED 组各死亡 5 只, 另取同样情况大鼠补足数目。术后 2 h 模型组神经功能评分 1 级 2 只, 2 级 10 只, 3 级 6 只, 4 级 2 只; 补阳还五汤组 1 级 4 只, 2 级 10 只, 3 级 6 只, 4 级 0 只; ED 组 1 级 2 只, 2 级 11 只, 3 级 5 只, 4 级 2 只, 假手术组无明显神经功能缺损。取出造模成功 7 天后的大鼠脑组织, 与正常大脑相比, 肉眼可以清晰地观察到右侧大脑半球明显肿胀, 梗死区域面积与体积均大于对侧半球, 颜色苍白, 可见白色的梗死灶, 梗死区域为松果体上上下下 5 mm~视交叉上上下下 6 mm。右侧颈静脉注射兑入生理盐水的 2% 伊万斯

蓝 24 h后 (4 mL/kg), 处死大鼠并取出大脑亦可清晰观察到白色的梗死灶 (图 1)。

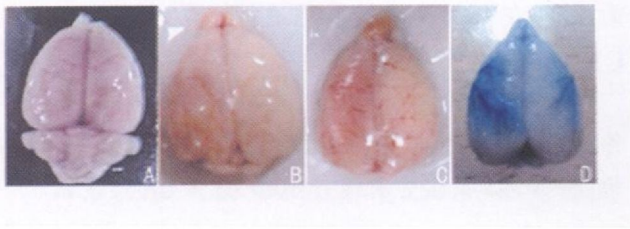


图 1 正常大脑与缺血 7 天大脑直视图 A 为正常大脑, B 为缺血 1 天大脑, C 和 D 为缺血 7 天大脑。

2.3 TTC 染色情况

随机各组取 5 只动物进行 TTC 染色, 正常组织染成红色, 梗死区域颜色苍白。正常组和假手术组均未见梗死灶, 其它各组均见皮层、皮层下及海马 CA1 区白色片状梗死区域。1 天时各组梗死区域均较大, 且差异无显著性 ($P > 0.05$)。随着时间的推移, 各组白色梗死区域面积均逐渐减小, ED 组梗死面积大于同期各组 ($P < 0.05$), 28 天时 ED 组与各组差异最大 ($P < 0.05$); 7、14 天和 28 天时补阳还五汤组梗死面积明显小于其它各组 ($P < 0.05$); 而补阳还五汤 + ED 组梗死面积小于模型组和 ED 组 ($P < 0.05$), 其它各组之间差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 2 和表 2)。



图 2 缺血 1 天与 7 天大脑 TTC 染色比较 上为缺血 1 天, 下为缺血 7 天。

2.4 补阳还五汤对脑缺血后新生细胞的影响

免疫组织化学结果显示的 BrdU 阳性细胞内呈棕红色深染, 为细胞核染色, 形态多样, 胞核多为实性, 呈圆形、椭圆形、梭形或不规则形, 甚至有部分融合成团。正常组可见少量 BrdU 阳性细胞散在分布于各脑区, 但数量少且排列比较稀疏。脑缺血后即可见 BrdU 阳性细胞增加, 主要集中在梗死周围区、室旁区、皮质或脉络膜, 排列不规整, 胞体形状不一,

7 天时达高峰, 而且排列紧密, 然后逐渐下降, 14 天仍高于正常 (图 3)。ED 组 BrdU 阳性细胞数量明显少于同期模型组和其他组 ($P < 0.05$); 补阳还五汤组细胞增殖规律与模型组一致, 7 天和 14 天时补阳还五汤组在阳性细胞数目上与同期各组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$); 7 天时补阳还五汤 + ED 组阳性细胞数量多于模型组和 ED 组 ($P < 0.05$), 但少于补阳还五汤组 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 2 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 TTC 梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	造模后时间点			
	1 天	7 天	14 天	28 天
正常对照组	-	0.00 ± 0.00		
假手术组	-	0.00 ± 0.00		
模型组	42.35 ± 7.51	35.65 ± 4.16	23.52 ± 1.91	7.84 ± 0.75
补阳还五汤组	40.24 ± 11.28	20.21 ± 1.26 ^a	9.20 ± 4.25 ^a	1.12 ± 0.29 ^a
ED 组	42.89 ± 1.44	41.25 ± 0.62	39.74 ± 0.14	36.20 ± 1.91 ^a
补阳还五汤 + ED 组	41.58 ± 8.43	31.85 ± 3.57	19.45 ± 2.64 ^a	5.98 ± 0.37

a 为 $P < 0.05$ 与同期各组比较。

表 3 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 5-溴脱氧尿嘧啶核苷表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	造模后时间点			
	1 天	7 天	14 天	28 天
正常对照组	-	12.28 ± 0.00		
假手术组	15.15 ± 0.38	17.22 ± 0.66	16.04 ± 0.07	15.20 ± 0.35
模型组	16.15 ± 2.28	25.53 ± 2.41	23.16 ± 1.23	17.99 ± 1.36
补阳还五汤组	17.36 ± 4.33	38.82 ± 6.40 ^a	28.52 ± 1.25 ^a	19.36 ± 3.33
ED 组	16.13 ± 0.72	20.64 ± 1.54 ^a	18.20 ± 0.32 ^a	15.32 ± 1.13
补阳还五汤 + ED 组	16.92 ± 2.95	31.43 ± 4.31 ^b	24.74 ± 0.48	18.15 ± 2.33

a 为 $P < 0.05$ 与同期各组比较; b 为 $P < 0.05$ 与同期模型组比较。

2.5 补阳还五汤对脑缺血后血管性血友病因子表达的影响

vWF 标记阳性细胞在正常脑组织内有一定量的表达, 主要见于皮层, 以条索状或“Y”型为主。脑缺血后表达迅速增加, vWF 阳性细胞表达部位与 BrdU 阳性细胞大部分相似, 主要见于皮层、海马区及室旁区, 7 天时达到高峰, 然后逐渐下降, 健侧稍有表达 (图 4)。ED 组阳性细胞少于同期模型组和其他各组 ($P < 0.05$); 补阳还五汤组在 7 天和 14 天时, 阳性细胞数量和密度明显多于其他各组 ($P < 0.05$); 补阳还五汤 + ED 组与模型组和 ED 组比较, 在 7 天和 14 天两个时间点上 vWF 表达差异具有显著性 ($P < 0.05$, 表 4)。

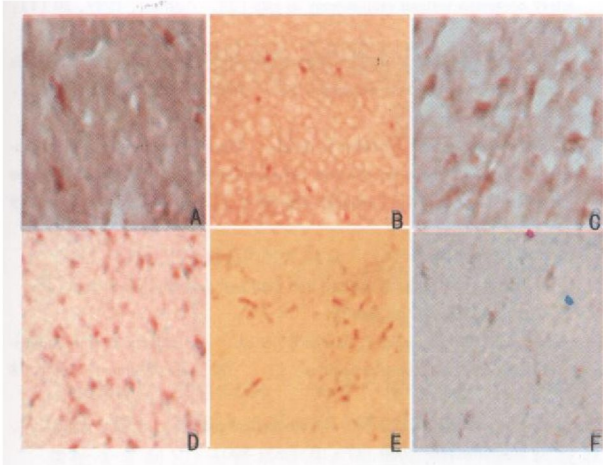


图 3 各组脑内 5-溴脱氧尿嘧啶核苷细胞表达 ($\times 200$)

A 为正常组, B 为假手术组, C 为模型组, D 为补阳还五汤组, E 为 ED 组, F 为补阳还五汤 + ED 组。

表 4 补阳还五汤对脑缺血后血管性血友病因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	造模后时间点 (个/mm ²)			
	1天	7天	14天	28天
正常对照组	-	12.63 ± 0.00		
假手术组	15.27 ± 0.07	16.44 ± 0.52	15.80 ± 0.20	14.12 ± 0.65
模型组	16.58 ± 2.42	28.17 ± 3.38	23.50 ± 1.05	17.37 ± 2.02
补阳还五汤组	17.87 ± 4.52	39.58 ± 6.34 ^a	29.33 ± 1.21	20.86 ± 3.03
ED 组	16.17 ± 1.25	23.31 ± 2.32	20.08 ± 0.71	15.12 ± 1.78
补阳还五汤 + ED 组	16.96 ± 3.03	30.25 ± 3.62 ^b	25.41 ± 1.20 ^b	19.46 ± 1.78

a 为 $P < 0.05$ 与同期各组比较; b 为 $P < 0.05$ 与同期 ED 组比较。

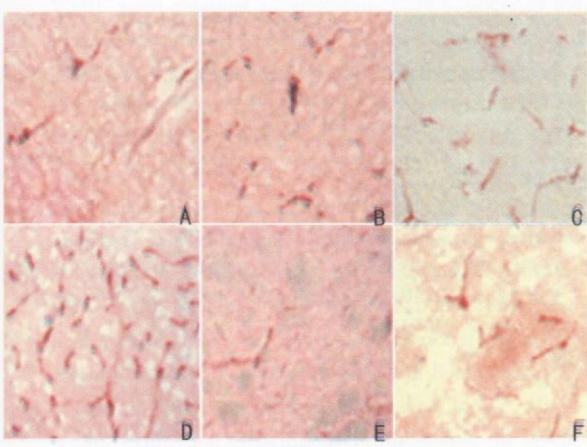


图 4 各组脑内血管性血友病因子细胞表达 ($\times 200$)

A 为正常组, B 为假手术组, C 为模型组, D 为补阳还五汤组, E 为 ED 组, F 为补阳还五汤 + ED 组。

3 讨论

脑缺血后, 受损的脑细胞产生大量炎性介质, 释

放自由基等细胞毒性物质, 诱导中性粒细胞与内皮细胞黏附, 介导炎症瀑布反应^[8], 阻塞微血管, 释放大谷氨酸, 并激活其受体, 导致神经细胞迟发性损伤^[9, 10], 致使大量花生四烯酸释放, 使细胞肿胀, 引起脑血管痉挛, 血管通透性增加, 产生血管源性脑水肿^[11]等。血管新生是指在原有血管基础上通过血管内皮细胞增殖、游走、芽生, 血管分裂、分支而形成新的毛细血管网, 使其功能与局部需要相适应的生物学过程^[12]。主要包括三个连续环节: (16) 内皮细胞激活, 通透性增加, 基底膜溶解, 细胞外基质降解、重塑; 内皮细胞增殖、迁移; (20) 管壁和管腔的形成、再塑, 新生血管网络形成。同时, 血管新生又是一个复杂的多步过程, 并受到多种血管生长因子、细胞因子及其抑制因子之间的调控, 反映了正、负血管新生调节物的消长平衡。

补阳还五汤是临床治疗缺血性脑中风的常用方剂, 本研究初步证实: 补阳还五汤可促进局灶性脑缺血大鼠缺血区血管新生, 并可部分拮抗 ED 阻断的血管新生。研究结果显示 ED 可有效抑制 BrdU 及 vWF 的表达, 其作用机理可能是 ED 与 VEGF 竞争细胞表面的硫酸肝素粘蛋白类受体, 并抑制 VEGF2 型受体磷酸化^[13], 进而阻断血管内皮细胞有丝分裂生长因子的信号传导^[14], 提高血管内皮细胞的定向迁移而抑制血管新生^[15], 或通过信号通路抑制对方的作用, 如整合素样金属蛋白酶与凝血酶 1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS1) 是已知的血管新生抑制因子, 但在视网膜血管生成过程中, VEGF 通过蛋白激酶 C 通路显著地诱导 ADAMTS1 在血管内皮细胞表达, 说明两者可能存在一种负反馈调节机制^[16]。而 BrdU 标记的内皮细胞是新生血管的基础, 补阳还五汤 + ED 组促细胞增殖的作用较单独补阳还五汤组要弱, 但强于模型组, 也就是说补阳还五汤能部分拮抗 ED 的抑制血管新生的作用, 并且被 ED 抵消后的剩余的作用仍强于机体自身的恢复能力。

补阳还五汤促血管新生的作用机制可能是: (1) 保护内皮细胞。补阳还五汤能有效解除 ED 对血管内皮细胞有丝分裂生长因子信号传导的阻断, 降低其对血管内皮细胞定向迁移的促进作用, 改善细胞外环境, 使内皮细胞在一个相对稳定并且干扰较少的环境下逐步形成新生血管, 说明补阳还五汤不仅有直接保护内皮细胞的作用, 而且还可以通过改善细胞外环境、拮抗血管新生抑制剂 (如 ED 等) 的作用来间接保持内皮细胞的完整, 并使其最终形成新的血管。(2) 调节血管再生因子: 如 VEGF、NO

等。VEGF是一种特异性作用于血管内皮细胞的内皮生长因子,它可以促血管内皮细胞分裂增殖、增生和转移,它在血管生成的各个阶段均发挥着重要作用,是目前公认的血管新生中最关键的因子^[17]。NO是一种自由基气体,参与中性粒细胞淋巴细胞和巨噬细胞的细胞毒性作用,它与O₂结合可生成过氧亚硝基,后者可直接或通过分解成许多小分子毒性物质损伤细胞,并可诱导细胞凋亡^[18]。郭氏^[19]得出补阳还五汤能有效降低大鼠血清及脑组织中NO的含量。其作用机制可能是补阳还五汤能阻断NO损伤细胞、诱导细胞凋亡的过程,并通过其抗氧自由基作用,改善线粒体功能,进而改善脑组织的能量代谢,使NO的合成减少;也可能是通过防止细胞内钙超负荷的作用来控制脑组织中NO含量升高,进而起到保护细胞的作用^[20]。(3)促进血管出芽。本研究已证实补阳还五汤可以增强对血管内皮细胞的刺激与趋化作用,使其增殖、移行和分化,这也与国内其它研究结果相符合,又如前述补阳还五汤可以促VEGF表达增强,促进血管内皮细胞的有丝分裂;降低脑组织NO含量,起到抗氧自由基、保护脑组织的作用;并且改变细胞的细胞外基质,促进管状结构的形成,有利于新血管的出芽与生长,促进新血管的形成以及血管网络的建立^[21,22],国内其它研究也证实补阳还五汤可以通过调控促血管生成素-1及其受体的表达,来促进脑出血大鼠血肿吸收,改善脑组织循环,对血管的重建起到一定的作用^[23]。本研究在上述研究成果的基础上得出补阳还五汤促血管新生的途径之一便是通过调控VEGF的表达来实现的。

[参考文献]

- [1] Knapinski J, Kalza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. *Stroke* 1994 **25** (9): 1794-798
- [2] 刘柏炎,蔡光先. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体Flk1的影响[J]. *中草药*, 2007 **38** (3): 394-397.
- [3] 刘柏炎,蔡光先. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞影响的初步研究[J]. *中国临床康复*, 2004 **8** (22): 4532-533
- [4] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain [J]. *Stroke* 2005 **36** (7): 1533-537.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke* 1989 **20** (1): 84-91.
- [6] Xie YC, Li CY, LIT, et al. Effect of mild hypothermia on angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett* 2007 **422** (2): 87-90.
- [7] Haqqani AS, Nestic M, Preston E, et al. Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and CAT-nanoLCMSMS [J]. *FASEB J*, 2005 **19** (13): 1809-821.
- [8] 陈主初. 病理生理学[M]. 北京,人民卫生出版社, 2005 138
- [9] Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia [J]. *Science* 2001 **69** (4): 369-381.
- [10] Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E, et al. Excitotoxicity in neurological disorders—the glutamate paradox [J]. *Int J Dev Neurosci* 2000 **18** (23): 281-287.
- [11] Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury [J]. *J Neurotrauma*, 2000 **17** (10): 871-890.
- [12] Ghajar CM, Blevins KS, Hughes CC, et al. Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation [J]. *Tissue Eng*, 2006 **12** (10): 2875-888.
- [13] Kim YM, Hwang S, Pyun BJ, et al. Endostatin blocks VEGF-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1 [J]. *J Biol Chem*, 2002 **277** (31): 27872-879.
- [14] Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, et al. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution [J]. *EMBO J*, 1998 **17** (6): 1656-664.
- [15] Dhanabal M, Ramchandran R. Endostatin yeast production mutants and antitumor effect in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res* 1999 **59** (1): 189-197.
- [16] Zhenhua Xu, Yilin Yu, Elia J. Vascular Endothelial Growth Factor Upregulates Expression of ADAMTS1 in Endothelial Cells through Protein Kinase C Signaling [J]. *Invest Ophthalmol Visual Science* 2006 **47**: 4059-066.
- [17] Belizon A, Balk E, Feingold DL, et al. Major abdominal surgery increases plasma levels of vascular endothelial growth factor open more so than minimally invasive methods [J]. *Ann Surg*, 2006 **244** (5): 792-798.
- [18] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社, 1999 104-109.
- [19] 郭平,王浩,王晶. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠脑组织NO和NOS作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2001 **7** (5): 47-48.
- [20] 邓常青,刘志龙,葛金文,等. 补阳还五汤抗脑缺血再灌注损伤作用机理的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 1998 **4** (8): 32-35.
- [21] Byme AM, Bouchier-Hayes D, Hamey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor [J]. *J Cell Moll Med*, 2005 **9** (4): 777-794.
- [22] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature* 1997 **386** (6626): 671-674.
- [23] 魏灿杰,唐涛,罗杰坤,等. 益气活血法对脑出血大鼠脑组织促血管生成素-1及其受体表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007 **14** (3): 138-141.

(此文编辑 李小玲)