

• 基础研究 •

通心络对糖尿病大鼠脑缺血后神经生长因子及
脑源性神经营养因子表达的影响田沈¹, 张朝东², 康志伟¹

[摘要] 目的 探讨通心络对改善局灶性脑缺血糖尿病大鼠的神经功能的作用,并探讨其分子机制。方法 线栓法复制糖尿病大鼠大脑中动脉栓塞模型,干预组通心络胶囊 1.0 g/kg·d 连续灌胃。进行神经功能缺损评分;采用 TUNEL 染色计数脑缺血周边区神经细胞凋亡数,免疫组织化学方法检测神经生长因子(NGF)及脑源性神经营养因子(BDNF)的蛋白表达。结果 干预组神经功能缺损评分低于对照组($P < 0.05$);缺血周边区 TUNEL 阳性细胞数均少于对照组($P < 0.05$);NGF、BDNF 蛋白免疫阳性细胞多于对照组($P < 0.05$)。结论 通心络可增加糖尿病脑缺血后缺血周边区 NGF、BDNF 蛋白的表达,拮抗神经细胞凋亡,改善神经功能。

[关键词] 糖尿病;脑缺血;通心络;凋亡;神经生长因子(NGF);脑源性神经营养因子(BDNF);大鼠

Effects of Tongxinluo on Nerve Growth Factor and Brain Derived Neurotrophic Factor after Cerebral Ischemia in Diabetic Rats TIAN Shen, ZHANG Chao-dong, KANG Zhi-wei. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Tongxinluo, a Chinese medicine, on neurological deficits, neuron apoptosis and the expression of nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) after cerebral ischemia in diabetic rats. **Methods** Wistar diabetic rats ($n=36$) were subjected to middle cerebral artery occlusion and randomly divided into 2 groups: control group ($n=18$) and Tongxinluo group ($n=18$). Tongxinluo group received Tongxinluo 1.0 g/kg·d after cerebral ischemia. Neurological severity scores, TUNEL staining and immunohistological assessments were performed to evaluate the effects. **Results** Compared with the control, the neurological score significantly improved ($P < 0.05$), the expression of NGF and BDNF increased ($P < 0.05$), and cell apoptosis decreased ($P < 0.05$) in the tongxinluo group. **Conclusion** Tongxinluo can improve the neurological function through inhibition of neuron apoptosis and increasing the expression of NGF and BDNF after cerebral ischemia in diabetic rats.

Key words: diabetes; cerebral ischemia; Tongxinluo; apoptosis; nerve growth factor (NGF); brain derived neurotrophic factor (BDNF); rats

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)05-0433-02

[本文著录格式] 田沈,张朝东,康志伟.通心络对糖尿病大鼠脑缺血后神经生长因子及脑源性神经营养因子表达的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(5):433-434.

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,而并发缺血性卒中的病死率可增高 3 倍^[1]。脑梗死易给患者造成较严重的神经功能缺损。目前研究证明,神经细胞凋亡是其重要的病理环节,抑制凋亡的发生可以减轻神经损伤。神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)是一类小分子多肽物质,在神经系统损伤的情况下具有神经保护与修复的作用^[2],同时抑制细胞凋亡。本研究观察通心络干预后,局灶性脑缺血糖尿病大鼠的神经功能和缺血周边区神经细胞凋亡数及 NGF、BDNF 蛋白表达的变化,探讨通心络对糖尿病合并脑缺血的神经营养作用及其机制。

1 对象及方法

1.1 实验动物及分组 体重 200~250 g Wistar 大鼠,雌雄不限,购自中国医科大学实验动物部。大鼠连续腹腔注射四氧嘧啶 120/100 mg/kg 2 d,采用葡萄糖氧化酶法测末次给药后 72 h 空腹血糖,以空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠;6 周后采用线栓法^[3]建立大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。大鼠苏醒后

表现为提尾时右侧前肢内收屈曲、爬行时向右侧划圈者入选。模型建立后,选取 36 只大鼠随机分成对照组、通心络组,每组又分 1 d、7 d、14 d 3 个时间点,每一时间点均为 6 只大鼠。

通心络组大鼠给予通心络胶囊 1.0 g/kg·d,药物溶于生理盐水,以 4 ml/kg 灌胃;对照组每天灌胃等量的生理盐水。

1.2 观测指标及方法

1.2.1 神经功能缺损评分 采用 Chen 等制定的神经功能评分标准(modified Neurological Severity Scores, mNSS)^[4]分别于术后 1 d、7 d 及 14 d 对大鼠进行神经功能评分。NSS 为一种运动、感觉、反射和平衡功能的综合性评分指标,评分范围 0~18 分,分数越高表明大鼠的神经功能缺损越重。

1.2.2 免疫组化检测 各组于术后 1 d、7 d、14 d 分别取 6 只大鼠,用 10%水合氯醛麻醉,先后用肝素化生理盐水及 4%多聚甲醛心内灌注,迅速断头取脑,以前囟为中心、冠状面 ± 1 mm 切取脑片,置于 4%多聚甲醛中后固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,每隔 100 μ m 连续作 6 μ m 厚脑冠状面石蜡切片。石蜡切片进行兔抗 NGF 多克隆抗体、兔抗 BDNF 多克隆抗体免疫组化染色,具体步骤按照即用型 SABC 免疫组化试

作者单位:1.中国医科大学第四临床医院神经内科,辽宁沈阳市 110032;2.中国医科大学第一临床医院神经内科,辽宁沈阳市 110001。
作者简介:田沈(1969-),女,河北黄骅县人,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向:缺血性脑血管病。

剂盒(博士德)说明书操作。

1.2.3 TUNEL 染色 石蜡切片按照 TUNEL (Roche)试剂盒说明书操作,进行细胞凋亡染色。

1.3 图像分析及统计学处理 每个标本取 2 张切片,分别在高倍镜(400×)下随机观察缺血侧额顶叶及纹状体区不重叠的 5 个高倍视野,显微图像分析系统采集图像,计数阳性细胞数,取其平均数。

各组计量资料数据均($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行两样本均数的 t 检验, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 神经功能评分 术后 1 d 时各组神经功能评分无显著性差异;7 d、14 d 后通心络组神经功能评分明显低于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组神经功能评分比较

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	6	8.60±0.89	8.58±0.34	5.50±0.35
通心络组	6	8.80±0.84	7.18±1.06	4.06±1.12
P		>0.05	<0.05	<0.05

2.2 TUNEL 染色 两组大鼠在缺血周边区均有 TUNEL 免疫阳性细胞存在,并与坏死细胞相互混杂。通心络组 TUNEL 阳性细胞数低于对照组($P < 0.05$)。

表 2 各组凋亡细胞数比较(/mm²)

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	6	51.06±2.26	23.12±3.71	20.12±2.17
通心络组	6	44.80±1.98	18.62±0.82	15.40±1.42
P		<0.01	<0.05	<0.01

2.3 BDNF 的表达 BDNF 免疫阳性细胞主要分布于皮层 III~V 层,主要是锥体细胞。梗死灶周边仍可见到 BDNF 免疫阳性细胞,但细胞数量明显减少,梗死灶中心无 BDNF 免疫阳性细胞。BDNF 免疫阳性颗粒主要位于胞浆和细胞膜表面。胞浆和突起被染成棕黄色,胞核周围染色较浅。BDNF 在局灶性脑缺血 1 d 达高峰,在以后的时间点逐渐下降。通心络组缺血周边区 BDNF 蛋白免疫阳性细胞数高于对照组($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 BDNF 阳性细胞计数比较(/mm²)

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	6	22.90±2.90	14.38±2.52	9.36±1.55
通心络组	6	29.38±4.80	17.98±1.89	12.96±1.11
P		<0.05	<0.05	<0.05

2.4 NGF 的表达 NGF 免疫阳性细胞主要分布于皮层 II~V 层,NGF 于神经元内表达部位的分布比较广泛,在神经元的胞膜、胞浆、核膜、核质和轴突上均可见到。其免疫阳性颗粒主要分布在神经元胞浆内,胞浆染色呈深棕色而且均匀,而主干树突染色较浅。在皮层缺血 1 d NGF 即达高峰,在以后的时间点逐渐下降。通心络组缺血周边区 NGF 蛋白免疫阳性细胞高

于对照组($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 NGF 阳性细胞计数比较(/mm²)

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	6	27.92±1.66	13.74±1.35	7.40±2.38
通心络组	6	31.98±2.09	17.94±2.16	10.14±1.12
P		<0.01	<0.01	<0.05

3 讨论

糖尿病患者容易合并脑梗死,由于其血管损伤严重,同时存在代谢障碍,使其合并脑梗死时神经功能缺损严重,治疗更为棘手。通心络胶囊具有益气活血、通络止痛之功效^[5],是临床常用的心脑血管病治疗药物。

近年来大量的研究表明,脑缺血再灌注损伤后半暗区神经元凋亡是造成迟发性神经元死亡的重要原因。现已明确,细胞凋亡的发生是由基因调控的过程,神经营养因子对细胞凋亡有明显的抑制作用。

神经营养因子(neurotrophic factors,NTFs)是一类小分子多肽物质,在神经系统发生、发育过程中能够促进细胞的增殖、生长、分化、存活及功能表达,在成熟的神经系统中具有维持神经细胞生存的作用。神经营养因子通过与特异性受体结合而发挥生物学效应。目前发现的受体有 2 类,即低亲和性 p75 和高亲和性 TrK^[6-7],2 类受体常在同一神经元同时表达,共同调节神经元对神经营养因子的反应。p75 转导可以是负性信号,如凋亡^[8],也可以是正性信号;而 TrK 受体转导一般是正性信号,如维持神经元存活、生长。这 2 类受体产生的效应可相互促进或相互拮抗,在多个水平调节神经元的存活与凋亡。p75 和 TrK 信号途径之间的相互交叉是确定神经系统如何发育和损伤后修复的一个关键过程。

本研究结果显示,应用通心络能够有效改善局灶性脑缺血糖尿病大鼠的神经功能,减少脑缺血周边区脑组织细胞凋亡;其机制可能与增加缺血灶周边区 NGF、BDNF 蛋白表达,从而减少脑缺血周边区脑组织细胞凋亡有关。

[参考文献]

[1]陈光辉.2004 年脑血管病研究进展[J].国外医学脑血管病分册,2005,1:261-273.
[2]张润平.神经营养因子的作用研究进展[J].山东医药工业,2002,21(2):20.
[3]Zea LE, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
[4]Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4):1005-1011.
[5]陈可冀,廖家桢.心脑血管病研究[M].上海:上海科学技术出版社,1988.
[6]Kraemer R, Baker PL, Kent KC, et al. Decreased neurotrophin in TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E null mutant mouse[J]. Circulation, 2005, 112:3644-3653.
[7]Mutoh T, Tachi M, Yano S, et al. Impairment of Trk neurotrophin receptor by the serum of a patient with subacute sensory neuropathy[J]. Arch Neurol, 2005, 62:1612-1615.
[8]Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, et al. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 2005, 25:9989-9999.

(收稿日期:2007-12-19 修回日期:2008-04-29)