

· 论著 ·

补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响

刘芳, 白雪松, 刘柏炎, 蔡光先

(湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的 通过观察补阳还五汤对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响,探讨补阳还五汤抗脑缺血的作用机制。方法 将 85 只大鼠(体重 280~300 g)随机分为正常对照组、假手术组、模型组、传统补阳还五汤饮片组和超微补阳还五汤饮片组,后 4 组又按术后 1、3、5 和 7 d 分为亚组,每组 5 只。采用线栓法制备脑缺血大鼠模型。传统饮片组和超微饮片组术后 2 h 起每日灌服传统补阳还五汤或超微补阳还五汤 2 ml(按体表面积计算,相当于 70 kg 成人用量的 3 倍),于术后不同时间点处死大鼠,取脑组织制备标本。用免疫组化方法观察脑组织 bFGF 阳性细胞变化;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测脑组织 bFGF 蛋白含量。结果 bFGF 阳性细胞主要见于梗死灶周围,中心区仅见少量 bFGF 阳性细胞,在缺血对侧区未见 bFGF 阳性细胞;bFGF 阳性细胞从 1 d 开始增加,3 d 达高峰,7 d 减少明显;传统饮片组与超微饮片组缺血灶周围脑组织 bFGF 阳性细胞数在 3、5 和 7 d 较模型组均明显增加,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。传统饮片与超微饮片组 bFGF 蛋白含量变化的规律与模型组基本一致,除 1 d 外,在 3、5 和 7 d 均显著高于模型组(P 均 <0.05)。超微饮片组与传统饮片组比较,5 d 和 7 d bFGF 阳性细胞数及蛋白含量差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。结论 脑缺血可致脑组织中 bFGF 阳性细胞和 bFGF 蛋白含量增加;补阳还五汤能维持脑缺血后 bFGF 的高水平表达,这是其抗脑损伤的可能机制之一;补阳还五汤超微饮片较传统煎剂效果更佳。

【关键词】 补阳还五汤; 碱性成纤维生长因子; 脑缺血; 免疫组化; 酶联免疫吸附法

中图分类号:R285.5;R255.2 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)01-0009-04

Effect of Bu Yang Huan Wu decoction (补阳还五汤) on basic fibroblast growth factor in rats with cerebral ischemia LIU Fang, BAI Xue-song, LIU Bai-yan, CAI Guang-xian. *Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China*

Corresponding author: CAI Guang-xian (Email: lby1203@sina.com)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Bu Yang Huan Wu decoction (BYHWD, 补阳还五汤) on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and its mechanism of anti-cerebral ischemia. **Methods** Eighty-five Sprague-Dawley rats (body weight 280-300 g) were randomly divided into five groups: normal control group ($n=5$), sham-operated group, model group ($n=20$), traditional BYHWD group and ultra-fine powder BYHWD group. Then the latter four groups were further divided into four subgroups of 1, 3, 5 and 7 days (each $n=5$). The cerebral ischemic rat model was made by occluding the middle cerebral artery (MCA) with a thread. The traditional decoction and ultra-fine powder decoction groups were ingested with the liquid medicine of BYHWD after 2 hours of the operation [2 ml per rat per day, according to the surface area, it was equivalent to three times the dosage of 70 kg adult (human)]. All groups were executed at the 1, 3, 5 and 7 days after the operation. At the same time there were 5 rats as the normal control group. The brain tissue was taken for the preparation of specimens. The distribution and expression difference of bFGF in the ischemic brain tissues of rats in different groups had been investigated with immunohistochemistry technique. The contents of bFGF in the brain tissue were detected with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The positive expression of bFGF at peri-infarct area after ischemia increased obviously, but at central-infarct area there was less such positive expression. There was no expression at contra-lateral side to the ischemic area. The expression of bFGF immune positive cell increased at 1 day, peaked at 3 days, and returned to baseline at 7 days. The positive cells of bFGF in tradition decoction and ultra-fine powder decoction groups were obviously more than those in the model group at 3, 5 and 7 days (all $P<0.05$). The regularity of the change of bFGF protein content in traditional decoction and ultra-fine powder decoction groups was basically the same as that in the model group, and except at 1 day, the contents at all the other time points in the decoction groups were higher than the content in the model group (all $P<0.05$). The comparisons between the traditional decoction and ultra-fine powder groups showed the positive bFGF cell number and its protein content had significant differences at 5 and 7 days (all $P<0.05$). The positive cells and

regularity of expression of bFGF in ultra-fine powder decoction groups were more than those in tradition decoction at 5 and 7 days (all $P < 0.05$). **Conclusion** ① After brain ischemia, the bFGF positive cell number and its protein content in the brain tissue are increased. ② BYHWD can maintain high level expression of bFGF after cerebral ischemia, that might be one of the mechanisms of BYHWD to antagonize the brain injury. ③ The therapeutic effect of ultra-fine powder decoction is better than that of tradition decoction.

【Key words】 Bu Yang Huan Wu decoction; basic fibroblast growth factor; cerebral ischemia; immunohistochemistry; enzyme linked immunosorbent assay

脑梗死是神经系统的多发病,约占急性脑血管病的 70%~80%,有较高的病死率和致残率。研究表明,碱性成纤维生长因子(bFGF)具有广泛的生物学活性,能促进创伤愈合,特别是对来自中胚层的神经系统修复作用很强,其能透过血脑屏障,是一种重要的神经营养因子,并能抑制神经元凋亡^[1]。补阳还五汤是治疗缺血性脑损伤的经典方,能够降低患者的致残率,提高生存质量。本实验在既往对补阳还五汤治疗脑缺血的作用机制的研究基础上,采用线栓法制模,观察补阳还五汤对脑缺血后大鼠脑内 bFGF 蛋白含量及阳性细胞数的影响,以探讨补阳还五汤对局灶性脑缺血新的治疗机制,并分析中药的超微剂型与传统剂型在疗效上有什么不同。

1 材料与方

1.1 实验材料:①动物:清洁级 Wistar 大鼠 85 只,雌雄各半,体重 280~300 g(由湖南中医药大学实验动物中心提供)。②试剂:小鼠抗大鼠 bFGF 单克隆抗体(单抗)为美国 Neomarker 公司产品;卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC)免疫组化试剂盒和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂为美国 Zymed 公司产品;人 bFGF 试剂酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒由上海森雄公司提供;水合氯醛、磷酸盐缓冲液(PBS)、曲拉通 X-100(Triton-X100)、双氧水、甲醇均由北京鼎国生物公司提供。

1.2 药物制备:补阳还五汤按《医林改错》原方所记载的药方和比例,以每钱 3 g 换算而成,组方:黄芪 120 g,归尾 6 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,干地龙 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g,药材购自湖南中医药大学第一附属医院,经鉴定为地道药材。另取相同剂量饮片,由湖南省中药超微技术工程中心加工为超微补阳还五汤饮片。传统饮片一煎加水 500 ml,煎汁 150 ml;二煎加水 300 ml,煎汁 150 ml,两煎混合。超微饮片先用 60℃的开水 1 000 ml 搅拌后静止 10 min,取上清

液,再加水 1 000 ml,如前法取上清液,两次液体混合,文火煎成膏状(1 ml 含生药 2 g),冷藏备用。

1.3 动物分组与给药方法:85 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组、补阳还五汤传统饮片组和补阳还五汤超微饮片组,后 4 个组再按动物存活时间分为 1、3、5 和 7 d 4 个时间点组,每组 5 只。传统饮片组与超微饮片组分别于术后 2 h 灌服补阳还五汤 2 ml,药液按体表面积计算,相当于 70 kg 成人用量的 3 倍,每日分 2 次灌服;其他各组动物给予等量生理盐水。

1.4 动物制模方法:参照文献[2]栓线法进行制模;假手术组仅切开皮肤,分离右侧颈总动脉后即缝合。室温保持在 20~30℃,手术时使用加热垫。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒内,自由饮水、进食,必要时用滴管给动物喂水。

1.5 检测指标及方法:①神经功能缺损程度评分(NDS):参照文献[3]方法进行 5 级评分。②组织样本处理:按文献[4]进行处理。手术后不同时间点处理大鼠,取缺血区脑组织约 1 g,用液氮迅速冷却保存备用。标本融化后仍然保持 2~8℃的温度,加入 PBS (pH7.4)匀浆,2 000~3 000 r/min(离心半径 7 cm)离心 20 min 左右,取上清液用于检测。③ABC 免疫组化法检测 bFGF 阳性细胞数:按试剂盒说明书进行操作。④ELISA 检测 bFGF 蛋白含量:按试剂盒说明书进行操作。⑤图像分析和数据处理:所有切片均采用同一光强度和同一放大倍数(10×40),每只动物取相应平面的 4 张脑片,光镜下计数阳性细胞数,计算其平均值。各组数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 11.0 统计软件包对数据处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物的神经功能评价(表 1):线栓法制模后 2 h 动物即出现精神不振、少食、跛行、行走倾斜、肌力减退、同侧眼睑下垂,不能完全伸展对侧前爪,向瘫痪侧转圈,向对侧倾斜,不能自发行走,意识丧失。假手术组无神经功能缺损,大鼠精神状态良好,毛色正常。正常对照组 NDS 评分为 0 分。两种中药

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472217)

通讯作者:蔡光先,博士生导师,Email:lby1203@sina.com

作者简介:刘芳(1970-),女(汉族),湖南省人,医学硕士,副主任医师,Email:liufang2008.com@163.com。

干预后 1 d 动物 NDS 与模型组比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 但 3 d 后药物组以上情况明显改善, 至 7 d 时与模型组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); 超微饮片组在 5 d 和 7 d 与传统饮片组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

表 1 补阳还五汤不同饮片对 NDS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$) 分

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d
假手术组	0.60 ± 0.55	0.40 ± 0.55	0.20 ± 0.45	0.00 ± 0.00
模型组	2.80 ± 0.45 ^a	2.60 ± 0.55 ^a	2.00 ± 0.00 ^a	1.60 ± 0.45 ^a
传统饮片组	2.80 ± 0.45 ^a	1.80 ± 0.45 ^{ab}	1.40 ± 0.55 ^{ab}	1.00 ± 0.00 ^{ab}
超微饮片组	3.00 ± 0.00 ^a	1.60 ± 0.55 ^{ab}	0.80 ± 0.45 ^{abc}	0.40 ± 0.55 ^{bc}

注: 与假手术组同期比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组同期比较, ^b $P < 0.05$; 与传统饮片组同期比较, ^c $P < 0.05$

2.2 脑缺血后 bFGF 表达规律 (表 2): bFGF 阳性细胞表达集中在缺血周围区的神经元和神经胶质细胞。模型组和中药组脑组织 bFGF 阳性细胞主要分布在梗死灶周围皮质, 梗死灶中心表达较少。假手术组大鼠大脑皮质仅见 bFGF 少量表达, bFGF 阳性细胞呈棕黄色。正常对照组 bFGF 阳性细胞数为 (5.20 ± 0.84) 个。模型组缺血半球皮质 bFGF 表达于 1 d 开始增加, 3 d 达高峰, 各时间点与假手术组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。传统饮片组与超微饮片组缺血皮质 bFGF 表达更强, 3、5 和 7 d 与模型组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。超微饮片组在 5 d 和 7 d 与传统饮片组比较差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

表 2 补阳还五汤不同饮片对 bFGF 阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$) 个

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d
假手术组	5.60 ± 1.14	6.80 ± 0.84	6.00 ± 0.71	5.80 ± 0.84
模型组	8.60 ± 0.55 ^a	13.60 ± 0.89 ^a	12.00 ± 1.58 ^a	9.60 ± 1.67 ^a
传统饮片组	8.80 ± 0.84 ^a	19.60 ± 1.14 ^{ab}	15.80 ± 1.64 ^{ab}	11.80 ± 1.30 ^{ab}
超微饮片组	9.00 ± 1.23 ^a	20.00 ± 1.58 ^{ab}	17.40 ± 0.55 ^{abc}	13.40 ± 0.55 ^{abc}

注: 与假手术组同期比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组同期比较, ^b $P < 0.05$; 与传统饮片组同期比较, ^c $P < 0.05$

2.3 脑缺血后脑组织 bFGF 蛋白含量的变化 (表 3): 正常对照组脑组织 bFGF 蛋白含量为 (62.66 ± 8.95) ng/L。模型组脑组织 bFGF 蛋白含量于术后 1 d 开始增加, 3 d 达高峰, 各时间点与假手术组比较差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。两种饮片组 bFGF 蛋白含量变化规律与模型组基本一致, 除 1 d 外, 3、5 和 7 d 均显著高于模型组 (P 均 < 0.05)。超

微饮片组在 5 d 和 7 d bFGF 蛋白含量显著高于传统饮片组 (P 均 < 0.05)。

表 3 补阳还五汤不同饮片对 bFGF 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$) ng/L

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d
假手术组	63.13 ± 6.52	82.46 ± 5.36	73.50 ± 4.17	63.11 ± 4.22
模型组	73.35 ± 6.74 ^a	103.87 ± 12.46 ^a	88.21 ± 11.03 ^a	75.12 ± 2.64 ^a
传统饮片组	75.81 ± 7.03 ^a	177.51 ± 11.38 ^{ab}	132.77 ± 9.96 ^{ab}	101.88 ± 12.23 ^{ab}
超微饮片组	77.79 ± 8.94 ^a	183.46 ± 15.66 ^{ab}	144.63 ± 8.52 ^{abc}	113.59 ± 3.69 ^{abc}

注: 与假手术组同期比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组同期比较, ^b $P < 0.05$; 与传统饮片组同期比较, ^c $P < 0.05$

3 讨论

bFGF 是一种具有强烈促增殖作用的多肽生长因子, 在神经元中含量最为丰富^[5]。研究表明, bFGF 基因表达参与了脑外伤引起的脑组织损伤病理过程, 对神经细胞变性、坏死起重要的调节作用^[6]。本实验中发现, bFGF 蛋白表达在 1 d 时开始增强, 3 d 达高峰; bFGF 阳性细胞主要见于梗死灶周围, 梗死灶中心仅见少量 bFGF 蛋白表达, 与国外研究结果^[7]一致。熊露等^[8]研究也显示, 脑缺血/再灌注损伤后, bFGF 表达即明显增加, 半暗区和新纹状体区于 24 h 达高峰, 海马 CA1~3 区和丘脑、纹状体于 96 h 达高峰; 至 168 h 仍有相当数量的凋亡细胞, 表明脑缺血/再灌注损伤后 bFGF 表达升高, 在一定程度上可抑制神经元凋亡, 促进神经功能状态恢复, 对脑缺血损伤有重要的保护作用。补阳还五汤能维持较长时间 bFGF 蛋白高水平表达, 且动物神经功能症状得到改善。提示影响 bFGF 表达水平是补阳还五汤抗脑缺血损伤的又一机制, 其可能作用有: ①直接保护神经元, 提高神经元对缺血的耐受性; ②通过影响自由基和钙超载调节细胞凋亡; ③影响内皮细胞, 促进血管新生, 增加缺血区血流代偿。

在实验中发现, 超微饮片较传统饮片组有更好的作用, 提示超微饮片较传统饮片在药物浓度、药物溶出度方面更具有优势。超微粉碎技术可提高药物的生物利用度, 降低临床应用剂量^[9], 减少药用资源消耗, 简化制剂工艺, 提高药品附加值, 是促进中药传统产业改造的有效途径之一。

参考文献

- 田京发, 刘达根, 付小兵. 碱性成纤维细胞生长因子的药代动力学研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(8): 509-510.
- Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral

- artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [4] 远正弥一, 盐波贞夫. 神经科学尖端技术-分子组织化学[M]. 北京: 北京科学出版社, 1995: 5.
- [5] 李欣欣, 戴德哉. 碱性成纤维细胞因子对脑缺血的保护作用[J]. 药学进展, 2003, 27(1): 23-26.
- [6] 彭瑞云, 高亚兵, 肖兴义, 等. bFGF 和 NGF 基因在大鼠脑震荡脑损伤中的表达研究[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(4): 213-216.
- [7] Speliotis E K, Caday C G, Do T, et al. Increased expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) following focal cerebral infarction in the rat[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1996, 39(1-2): 31-42.
- [8] 熊露, 田少霞, 范吉平, 等. 脑缺血/再灌注后 BDNF 和 bFGF 表达与神经元凋亡的关系及脑脉康的干预作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(5): 271-275.
- [9] 蔡光先, 杨永华, 李跃辉. 超微粉体技术与中药饮片改革[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 6(2): 67-70.
- (收稿日期: 2007-09-01 修回日期: 2007-12-08)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

向心性穿刺对长期使用动-静脉内瘘透析的效果观察

张淑霞, 姜 艳, 邓红霞, 刘淑林, 马冬梅, 王山艳, 张春芳
(天津市塘沽中医医院, 天津 300451)

【关键词】 血液透析; 动-静脉内瘘; 穿刺方法
中图分类号: R278 **文献标识码:** B **文章编号:** 1008-9691(2008)01-0012-01

自体动-静脉内瘘是目前最为理想、最为常用的血液透析方式, 永久性血管通路被称为是维持血液透析患者的“生命线”。如何保护性使用动-静脉瘘, 减少内瘘并发症, 延长其使用寿命, 保证患者透析时的充分性, 提高其生活质量, 是目前需要探讨的问题。我们采用静脉内瘘维持透析将动脉端的穿刺改为向心性穿刺(顺穿)建立动-静脉内瘘, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例与方法: 选择在我院血液净化中心进行维持性透析的患者 16 例, 均为动-静脉内瘘已成熟的透析患者, 透析时间 0.5~16.0 年, 血液透析每周 2~3 次, 时间 8~12 h。穿刺的部位皆为成熟的自体动-静脉内瘘, 16 号内瘘穿刺针进行内瘘血管穿刺, 动脉端穿刺距离内瘘吻合口至少 5 cm 以上, 动-静脉穿刺在同一条血管时, 两点距离在 10 cm 以上。透析时采用全身肝素化、碳酸氢盐透析, 内瘘压迫止血。将 16 例患者按随机原则分为两组, 每组 8 例。第 1 组先按传统穿刺法离心性穿刺(逆向)动脉端 3 个月, 后改为向心性穿刺 3 个月; 第 2 组先按向心性穿刺动脉端 3 个月, 后改为离心性穿刺 3 个月, 共观察半年, 将向心性穿刺作为观察组, 离心性穿刺作为对照组进行分析。两组间性别、年龄、原发疾病以

表 1 两组患者不同穿刺方式的结果比较

组别	例数	穿刺次数	血流量达标数	一次穿刺成功		皮下血肿		内瘘狭窄	内瘘阻塞	动脉端皮下渗血
				动脉端	静脉端	动脉端	静脉端			
观察组	16	1 265	1 260 ^b	1 260 ^a	1 250	2	0	0	0 ^b	9 ^b
对照组	16	1 265	1 031	1 188	1 248	2	0	0	224	28

注: 与对照组比较, ^aP<0.05, ^bP<0.01

及透析方式、时间、材料差异均无统计学意义, 有可比性, 且两组患者交替操作, 避免了护士在操作时由于情绪等原因带来的偏差。

1.2 观察指标: ①比较两种穿刺方法在透析过程中血流量达标(≥ 200 ml/h)结果, 以及内瘘狭窄、内瘘阻塞的发生情况。内瘘狭窄表现为血流量不足或较原来减少, 瘘口处听诊有非连续性的收缩期粗糙及高调的血管杂音。内瘘阻塞表现为血流量不足, 瘘口处听诊杂音减弱或消失, 触诊震颤感减弱或消失。②比较两组患者内瘘使用后并发症发生率、一次穿刺成功率, 以及有无皮下血肿和拔针时有无出血。

1.3 统计学处理: 采用 SPSS 11.0 统计软件包, 率的比较采用 χ^2 检验, 两组透析效果比较用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 结果(表 1): 两组患者不同穿刺方法的血流量达标数、一次性穿刺成功率及内瘘阻塞、动脉端皮下渗血发生情况比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或

$P<0.01$)。

2 讨论

对于自体动-静脉内瘘的穿刺, 传统理论上认为动脉端逆穿可以提高血流量, 减少再循环, 透析效果好^[1]。在复习文献的基础上, 我们对长期用动-静脉内瘘维持血液透析的患者, 改用向心性穿刺, 结果显示, 动脉端向心性穿刺血流量达标率明显优于离心性穿刺, 说明向心性穿刺能够更好地维持有效的血流量, 保证血液透析的顺利完成。向心性穿刺动脉端, 其一次穿刺成功率, 明显高于对照组; 动脉端拔针后压迫止血皮下血肿发生率也明显低于对照组。在半年的观察期中, 两组均未发生狭窄而闭塞的情况。观察组未发生内瘘阻塞情况, 而对照组的发生率为 17.7%。说明动脉端向心性穿刺能有效减少内瘘的并发症。

参考文献

- [1] 王质刚. 血液净化学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 30.
(收稿日期: 2007-12-20)
(本文编辑: 李银平)

作者简介: 张淑霞(1963-), 女(汉族), 天津市人, 副主任医师。