

补阳还五汤对慢性脑缺血大鼠脑组织形态学的影响

翁闪凡¹, 张继平², 文凤妮³, 姚晖², 李齐欢⁴

1. 佛山科学技术学院医学院, 广东 佛山 528000
2. 佛山市第二人民医院, 广东 佛山 528000
3. 佛山市第五人民医院, 广东 佛山 528211
4. 佛山市南海区桂城医院, 广东 佛山 528000

[摘要] 目的: 探讨补阳还五汤对慢性脑缺血大鼠脑组织形态学的影响。方法: SD 大鼠, 采用双侧颈总动脉结扎法复制慢性脑缺血大鼠模型。大鼠随机分为 5 组, 即假手术组 (给予等体积的生理盐水)、模型组 (给予等体积的生理盐水)、补阳还五汤低剂量组 [中药低剂量组, 剂量为 20 g/(kg·d)]、补阳还五汤高剂量组 [中药高剂量组, 剂量为 40 g/(kg·d)]、阳性对照组 [金纳多组, 剂量为 0.045 g/(kg·d)], 每组 10 只大鼠, 连续给药 4 周。结果: HE 染色及焦油紫染色显示慢性脑缺血大鼠模型脑组织疏松, 顶叶皮质轻度缺血性改变, 神经元减少, 细胞排列松散, 海马 CA1 区神经细胞数目明显减少, 排列紊乱; 而各给药组大鼠脑组织损伤程度、细胞减少数目均有所缓解。结论: 补阳还五汤能保护慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区神经细胞, 改善神经细胞的死亡。

[关键词] 脑缺血; 补阳还五汤; 中药疗法; 疾病模型; 形态学

[中图分类号] R285.5; R743.3

[文献标识码] A

[文章编号] 0256-7415 (2014) 10-0200-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.10.081

补阳还五汤出自清·王清任的《医林改错》^[1], 主要用于中风之气虚血瘀证, 临床研究证实其疗效确切。近年来, 不少学者对其作用机理进行了大量的实验及临床研究, 证明其在缺血性脑损伤、脊髓及周围神经损伤方面有着广泛的应用价值^[2-3]。本课题组前期也对补阳还五汤进行了大量的动物实验药理研究^[4-8], 本研究从脑组织神经细胞病理形态学观察了补阳还五汤对慢性脑缺血大鼠脑组织形态学的影响, 以探讨其治疗缺血性脑血管病的作用机制, 现报道如下。

1 材料与方

1.1 主要试剂与仪器 灭菌结晶磺胺(批号: 081114), 由安徽新世纪药业有限公司生产; 肝素钠注射液(批号: 0705102), 由江苏万邦生化医药股份有限公司生产; 多聚甲醛(批号: 050705), 分析纯, 由天津市科密区化学试剂开发中心生产。

1.2 药物与制剂 金纳多片(40 mg/片), 由德国威玛舒培博士药厂生产; 补阳还五汤饮片颗粒剂水溶液按《医林改错》原方所载的药味用量制备, 处方: 生黄芪 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 4.5 g, 地龙、桃仁、红花、川芎各 3 g, 取相当于饮片等量的各味药颗粒剂(由广东一方制药有限公司提供)混合后, 用 100℃蒸馏水配制成补阳还五汤水溶液备用。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体重 180~220 g, 广州

中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(粤)2008-0020。

1.4 大鼠慢性脑缺血模型复制^[9] 大鼠禁食 12 h(禁食不禁水)后, 经水合氯醛麻醉(0.35 g/kg, 腹腔注射), 将大鼠仰卧固定于手术台上, 颈部皮肤剪毛备皮, 碘酒、体积分数 75% 乙醇消毒, 颈前正中切开皮肤及皮下组织, 长度约 1.5 cm, 在颈前肌肉和侧方肌肉间隙分离双侧颈总动脉、迷走神经, 双重丝线结扎双侧颈总动脉, 缝合, 伤口撒磺胺灭菌粉预防感染。假手术组不做结扎其它步骤同模型组。

1.5 分组与给药 大鼠术后 3 周进入慢性缺血期, 因此在术后 4 周进行 Morris 水迷宫初筛, 根据水迷宫结果按完全随机法分为 5 组, 即假手术组(给予等体积的生理盐水)、模型组(给予等体积的生理盐水)、补阳还五汤低剂量组[中药低剂量组, 剂量为 20 g/(kg·d)]、补阳还五汤高剂量组[中药高剂量组, 剂量为 40 g/(kg·d)]、阳性对照组[金纳多组, 剂量为 0.045 g/(kg·d)], 每组 10 只动物, 连续给药 4 周。

1.6 大鼠脑组织病理形态学观察

1.6.1 标本采集 给药结束后, 沿大鼠腹中线剪开胸骨, 暴露心脏, 用 16 号针头穿刺通过左心室至升主动脉, 用大弯钳夹住针头固定, 再用剪刀剪破右心耳, 随即用每 1 000 mL 含

[收稿日期] 2014-03-12

[基金项目] 广东省中医药局资助课题 (编号: 20121067); 佛山市科技局科技攻关项目 (编号: 201208079)

[作者简介] 翁闪凡 (1975-), 女, 高级实验师, 主要从事药理学实验研究。

[通讯作者] 张继平, E-mail: fszjping@163.com。

5 000 U 肝素及 0.5 g/L 普鲁卡因的生理盐水溶液快速冲洗，直至流出的液体为无色澄清液。再灌注 40 g/L 多聚甲醛 500 mL (每只大鼠)灌注固定，取脑组织。放入预冷 10% 甲醛固定液中 2 天。

1.6.2 大鼠脑组织病理切片染色

1.6.2.1 HE 染色 参照《病理学技术》临床技术操作规范，进行石蜡的切片及 HE 染色。完整分离大鼠脑组织，用福尔马林固定，酒精逐级脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切片，HE 染色，光学显微镜下观察大鼠脑组织病理损伤情况。HE 染色步骤如下：①取材组织块，经固定后，常规石蜡包埋，4 μm 切片；②切片常规用二甲苯脱蜡，经各级乙醇至水洗；③苏木素染色 5 min，自来水冲洗；④盐酸乙醇分化 30 s(提插数下)；⑤自来水浸泡 15 min 或温水(约 50℃)5 min；⑥置伊红液 2 min；⑦常规脱水，透明，封片。

1.6.2.2 焦油紫染色 焦油紫染色具体步骤：①脱蜡，至第二次纯酒精；②纯酒精内 2 h；③坚牢焦油紫工作液内 40~60 min；④95% 酒精中快速分化；⑤无水酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。

2 结果

2.1 HE 染色结果 肉眼观察：与模型组比较，假手术组：新鲜脑组织颜色、形态正常，无苍白和肿胀感；细胞周围间隙正常，形态规则，海马 CA1 区细胞层次排列整齐，见图 1；模型组：脑组织疏松，顶叶皮质轻度缺血性改变，神经元减少，细胞排列松散，细胞外空隙增大，毛细血管周围出现明显间隙，海马 CA1 区神经细胞数目明显减少，排列紊乱，无层次感，部分细胞固缩深染，见图 2；阳性对照组和补阳还五汤低、高剂量组大鼠皮层神经元数目稍有增加，形态不规则，海马 CA1 区神经细胞层次排列稍混乱，神经细胞体积略缩小，见图 3~5。

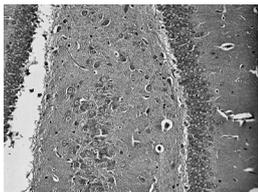


图 1 假手术组 CA1×200

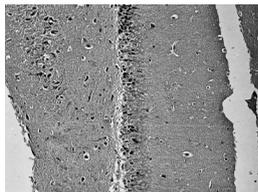


图 2 模型组×200

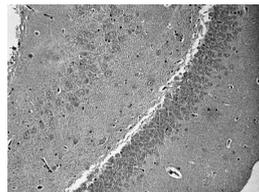


图 3 阳性药对照组×200

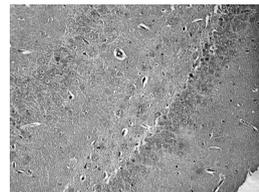


图 4 补阳还五汤高剂量组×200

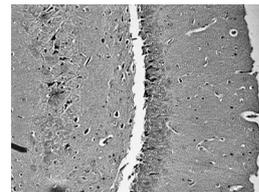


图 5 补阳还五汤低剂量组×200

2.2 焦油紫染色 假手术组：细胞形态规则，细胞质内焦油紫丰富，着色均匀，周边尼氏体着蓝色，细胞核空不着色，核仁着色，海马 CA1 区细胞层次排列整齐，分为 4~5 层，细胞外周围组织间隙正常，见图 6；模型组：皮层锥体细胞体积缩小，形态不规则，固缩呈深紫色，细胞和血管周围间隙明显增

大；海马 CA1 区神经细胞稀疏，排列紊乱无层次感，部分胞质尼氏体明显减小，甚至消失，部分细胞固缩成紫色，见图 7；阳性对照组和补阳还五汤低、高剂量组大鼠海马 CA1 区神经细胞约 2~3 层，层次排列稍紊乱，神经细胞体积略缩小，形态不规则，着色不均匀，尼氏体减少，见图 8~10。

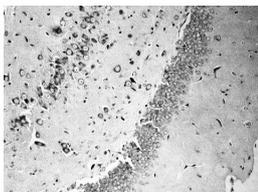


图 6 假手术组 CA1×200



图 7 模型组×200

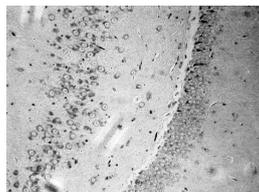


图 8 阳性药对照组×200

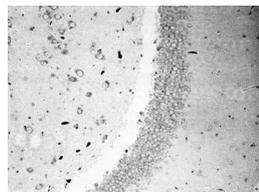


图 9 补阳还五汤高剂量组×200

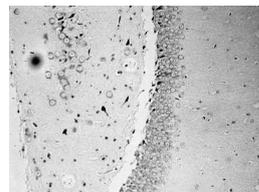


图 10 补阳还五汤低剂量组×200

3 讨论

双侧颈总动脉永久性结扎法(2-VO)^[10]是目前研究慢性脑缺血模型中最为常用的一类方法。因制作方法简单、效果肯定，有利于慢性病程的研究观察。本模型早期可造成急性脑缺血，而后可通过基底动脉和基底动脉环(Willis' circle)血流调节以及逐渐形成的侧枝循环所改善和代偿造成的一种慢性脑低灌注状态，从而使脑组织产生缺血缺氧性损害。这种方法实质上是以慢性低灌注引起脑缺血缺氧，最终导致神经细胞功能下降、学习记忆能力障碍，较好的模拟了人类因动脉粥样硬化、动脉管腔狭窄等因素导致的脑缺血梗死。因慢性脑缺血其主要的病

理学改变包括皮质萎缩、皮质和海马神经元变性、白质疏松、胶质细胞增生和毛细血管床改变等。慢性脑缺血时，最容易受累的部位是脑白质，而白质损伤最明显的表现为白质疏松、神经胶质细胞增生以及海马区的神经纤维脱损伤和髓鞘改变，这些变化在缺血早期就能表现出来。

本研究从 HE 染色结果可看到，2-VO 术后，海马 CA1 区神经细胞数目明显减少，排列紊乱，无层次感，提示慢性脑缺血大鼠海马区神经细胞损伤及凋亡明显。比较各实验组发现，模型组脑组织疏松，顶叶皮质轻度缺血性改变，神经元减少，细胞排列松散，细胞外空隙增大，毛细血管周围出现明显间

隙, 海马 CA1 区神经细胞数目明显减少, 排列紊乱, 无层次感; 补阳还五汤低、高剂量组大鼠皮层神经元数目稍有增加, 形态不规则, 海马 CA1 区神经细胞层次排列稍混乱, 神经细胞体积略缩小。提示补阳还五汤能减低慢性脑缺血大鼠海马 CA1 神经细胞的损伤及凋亡, 从而起到改善慢性脑缺血状态。

从焦油紫染色结果发现, 2-VO 术后, 由于脑组织缺血造成脑细胞损伤、凋亡及尼氏体流失明显, 比较各组结果看到模型组皮层锥体细胞体积缩小, 形态不规则, 固缩呈深紫色, 细胞和血管周围间隙明显增大。海马 CA1 区神经细胞稀疏, 排列紊乱无层次感, 部分胞质尼氏体明显减小, 甚至消失; 补阳还五汤低、高剂量组大鼠海马 CA1 区神经细胞约 2~3 层, 层次排列稍紊乱, 神经细胞体积略缩小, 形态不规则, 着色不均匀, 尼氏体减少。提示补阳还五汤给药组能减少神经细胞死亡, 减少尼氏体的流失, 降低慢性脑缺血脑损伤。

[参考文献]

- [1] 清·王清任. 医林改错[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1966: 31.
- [2] 陈维. 补阳还五汤对缺血性脑损伤及神经损伤作用机理研究进展[J]. 现代临床医学, 2005, 31(2): 121.
- [3] 彭祖年, 姚晓勃. 补阳还五汤对大鼠脊髓损伤后神经功能影响的实验研究[J]. 中医药导报, 2008, 14(5): 109.
- [4] 姚晖, 吴勇杰, 张继平, 等. 补阳还五汤体外对家兔血小板 PAF 受体活性影响的拆方研究[J]. 新中医, 2005, 37(12): 82-84.
- [5] 姚晖, 张继平, 陈芝喜, 等. 补阳还五汤及黄芪体外对家兔血小板活化因子受体活性的影响[J]. 中医杂志, 2006, 47(8): 613-615.
- [6] 张继平, 林爱华, 李蜀光, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓组织血小板活化因子受体 mRNA 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(3): 256-259.
- [7] 张继平, 宫丽, 姚晖, 等. 补阳还五汤大鼠含药血清对家兔血小板 PAF 受体活性的影响[J]. 临床医学工程, 2009, 16(9): 14-16.
- [8] 张继平, 王志彬, 林爱华, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓组织血小板活化因子含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(11): 46-48.
- [9] 王丽, 章军建, 刘涛. PKA-CREB 信号转导通路在大鼠慢性脑缺血所致认知功能障碍中的作用[J]. 中国临床神经科学, 2006, 14(5): 449.
- [10] 柯荔宁, 王玮, 张更, 等. 不同脑缺血方式对大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(10): 879-881.

(责任编辑: 马力)

内病外治新疗法常年招生(教社证字 G03005 号)

一、鼻炎头痛学习班: 重点讲解为什么鼻炎、鼻窦炎、过敏性鼻炎不在鼻部肺部治疗能快速神奇治愈。顽固性正偏头痛、头晕、三叉神经痛、牙痛、口腔溃疡, 结膜炎, 失眠神经衰弱, 不在头部治疗的新理论和快速治愈方法。二、颈肩腰腿痛学习班: 重点讲解为什么腰痛不治腰, 腿疼不治腿, 足跟痛不治脚, 肩周炎有真假, 骨质增生能软化, 治股骨头坏死与膝关节炎取穴一样等关节软组织疼痛的新理论和快速治愈方法。三、内科病学习班: 讲解 2 型糖尿病, 胃病, 结肠炎, 冠心病, 胆囊炎, 小儿腹泻, 厌食同治一个病根新理论。四、男科妇科病学习班: 讲解男女乳腺增生, 痛经, 前列腺炎, 阳痿, 早泄, 慢性肾炎, 同治一个病根的外治新理论。五、皮肤病科: 讲解点耳穴, 根治青春痘, 湿疹, 皮炎, 各种癣疮等皮肤病的外治方法。六、快速查病诊断班: 患者无需开口, 看一眼患者的双腿便知道患者的病根在哪里, 超前诊断患者现在或将来易患什么病。让患者心服口服, 是大夫接诊快速准确诊断不可少的绝招技术。七、特效针法学习班: 一秒钟埋线法治疗各种慢性疑难病。泻血法, 六针法、X 针法、穿针法一次性治疗肱骨外上髁炎, 急性腰扭伤, 牙痛, 尾骨痛, 足跟痛, 踝关节扭伤, 棘上韧带损伤等症收效神速, 大多患者入针即效, 拔针即愈。以上各科明确全身慢性疑难病原发病因和继发病症的鉴别诊断治疗, 本疗法防治结合治未病, 可作为大夫本人即家庭治疗保健康复之首选。本校为学员可代为办理劳动和社会保障部门颁发的全国通用高级按摩师证书, 中医康复保健证书, 高级针灸师证书, 网上可查, 凭证可开业。每月 1 号, 15 号开班。本疗法把疑难病的诊断治疗简单化。有无医学基础 7~10 天即可学会, 学校有实习门诊, 患者很多, 不熟练可多学几天, 学会为止。七个科学费 5000 元。地址: 河北省石家庄市健康路省第四人民医院西 200 米, 石家庄内病外治新疗法培训学校, 联系人: 王卫平。手机 13930962015。详情登陆 www.nbwzxf.com, 农行卡号: 6228481250018026419, 邮政账号: 601331001200114327, 乘车路线: 石家庄火车站乘 131 路省四院下西行 200 米即到或石家庄北站乘 5 路省四院下西行 200 米即到。