

bFGF 在老龄急性脑梗死小鼠大脑皮层内的表达及祛瘀生新中草药对其的影响

★ 许旭伟 何立人 张秋娟 汪涛 赵虹 (上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 上海 200437)

★ 夏玉叶 闵畅 (上海市医药工业研究院药理所 上海 200437)

摘要:目的:观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在老龄急性脑梗死(AIS)小鼠大脑皮层内的表达及祛瘀生新中草药对其的影响。方法:将 26 周龄的昆明小鼠随机分为假手术组、造模后 1 天组、造模后 7 天组、中药 8 天给药组及中药 14 天给药组。用电凝法在小鼠右侧脑部制备 AIS 模型,在两个不同的时间节点取材,通过苏木素-伊红染色及免疫组织化学方法来观察梗死区内大脑皮层组织的缺血性形态学改变及皮层内 bFGF 蛋白颗粒表达的水平,并和中药给药组及假手术组作比较。结果:经药物浓度为 60g/kg 的祛瘀生新中草药干预,在形态学方面:中药 8 天给药组的缺血性病理改变较造模后 1 天组未见明显改善。但中药 14 天给药组较造模后 7 天组有不同程度改善;在免疫组化方面:中药 8 天及 14 天给药组 bFGF 阳性颗粒均明显高于造模后 1 天及 7 天组($P < 0.05$)。结论:在发生 AIS 后,梗死区内 bFGF 的蛋白表达会明显增高,并保持一段时间;在超早期治疗窗中,祛瘀生新中草药对 AIS 老龄小鼠梗死区内 bFGF 蛋白表达具有明显促进作用,这可能是其保护及改善梗死区大脑皮层缺血性病理状态的又一作用途径。

关键词:大脑中动脉;脑缺血;碱性成纤维细胞生长因子;免疫组织化学

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

近年来发现的血管新生(Angiogenesis)现象是急性脑梗死(Acute Ischemic Stroke, AIS)一系列病理生理发展过程中一个重要的环节^[1],而碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是这一环节中最重要细胞因子之一,具有促进梗死区内血管新生的作用,这对梗死区内脑细胞的缺血性病理改变及预后具有重要意义^[2],目前该类西药的研发仍主要处于实验阶段。本实验以临床应用有效的“化瘀”、“泄浊”、“利湿”相结合的祛瘀生新中草药来干预经电凝法制备的 26 周龄的大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小鼠模型,旨在探讨其对梗死区内大脑皮层组织的缺血性病理改变及其组织内 bFGF 蛋白颗粒表达水平的可能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 近交系昆明小鼠,清洁级,50 只,26 周龄,体健,雄性,体重(50.0 ± 5.5)g,购自上海医药工业研究院实验动物中心,批号:沪动合字 107 号。根据随机数字表法,将动物分为:(1)造模后 1 天组(即造模后饲养 1 天,自由饮食,不用任何药物,然后处死取材);(2)造模后 7 天组(即造模

后饲养 7 天,余同前);(3)中药给药 8 天组(即在造模前给药 7 天,及造模后再给药 1 天,余同前);(4)中药给药 14 天组(即在造模前给药 7 天,及造模后再给药 7 天,余同前);(5)假手术组(仅手术开颅,而不电凝大脑中动脉,术后 1 天处死取材,期间不用任何药物,自由饮食)。每组动物 10 只。

1.2 实验仪器与试剂 手术显微镜(上海医用光学仪器厂),SN-30 射频双极电凝仪(上海市检测技术所检测仪器厂),台式牙科钻(上海齿科机械厂),立体定位仪。PBS 溶液(1 000 mL 蒸馏水中含 NaCl 9g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, pH 值为 7.2~7.4),以 PBS 溶液配的 4% 的多聚甲醛溶液,以 PBS 溶液配的 30% 的蔗糖溶液, bFGF-抗 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德公司),中性福尔马林(KH_2PO_4 4.0 g, Na_2HPO_4 6.5 g, 加蒸馏水 900 mL,完全溶解后,加 40% 甲醛溶液 300 mL,调 pH 值为 6.8~7.0),纯丙酮,甲醛,双蒸水,苏木素,70% 乙醇,95% 乙醇,无水乙醇,二甲苯,树脂,经防脱片剂处理的载玻片等。

1.3 MCAO 模型制备 小鼠用 12% 水氯合醛以 40 mg/kg 浓度,腹腔内注射麻醉,取左侧卧位将小

作者简介:许旭伟,2001 级在读博士,研究方向为心脑血管类疾病。

鼠固定于立体定位仪上;在手术显微镜下,于右眼外眦与右外耳道连线的中点处做一弧形切口,分离颞肌,避开面神经,沿颞弓向下分离至蝶骨大翼,充分暴露鳞状骨,从半透明头骨表面可见其下大脑中动脉走行,然后用牙科钻开一 $1.2\text{ mm}\times 1.2\text{ mm}$ 的骨窗,用镰状钩轻轻划开硬脑膜暴露大脑中动脉,可见大脑中动脉自嗅束向外延伸,取大脑中动脉靠近起始点处作为电凝点,用双极电凝仪凝闭动脉,若有出血,以明胶海绵压迫,止血后,逐层缝合颞肌和皮肤,然后放回笼中,自由饮食。

1.4 实验用药及处理 祛瘀生新中药由景天三七、灵芝草、生蒲黄、苦参、虎杖、生槐花、汉防己、玉米须、猪苓等组成,中药饮片出自上海华浦中药饮片有限公司,由岳阳医院药剂科煎制。动物用药浓度以生药 60 g/kg 计,相当于人体用量10倍,每天上午8点,下午4点以灌胃法各给药1次,每次2 mL。

1.5 免疫组织化学 取材:动物先以12%水氯合醛 40 mg/kg 浓度,腹腔内注射麻醉,打开胸腔,在其右心房上剪一小口,然后以4号静脉注射针头刺入左心室,灌以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 100 mL生理盐水,然后再灌以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4%的多聚甲醛溶液100 mL,灌流压力保持在 $80\sim 100\text{ cm}$ 水柱,灌流效果以动物四肢及肢体坚硬如实木质地为佳。然后迅速断头取材,可见脑组织色如白蜡,置于30%的蔗糖溶液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。次日在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻切片机上切片,每张切片厚度在 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。

免疫组织化学:病理切片以风扇吹干,在纯丙酮内固定30分钟,以PBS冲洗2分钟 $\times 3$ 次,在含0.5% H_2O_2 的甲醇内处理30分钟,然后以双蒸水充分冲洗3次,滴加50 μL 正常山羊血清(效价1:10),静置20分钟,滴加50 μL 一抗(效价1:200),在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中静置1小时,以PBS冲洗2分钟 $\times 3$ 次,滴加50 μL 二抗(效价1:100),在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中静置20分钟,以PBS洗2分钟 $\times 3$ 次,滴加50 μL 试剂SABC(效价1:100),在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中静置20分钟,以PBS洗5分钟 $\times 4$ 次,以DAB室温显色,镜下控制反应时间20分钟,而后以双蒸水洗涤,以苏木素轻度复染,梯度脱水(70%乙醇 $\times 1$ 次、95%乙醇 $\times 2$ 次、无水乙醇 $\times 2$ 次,5分钟/次),二甲苯中浸泡15分钟 $\times 2$ 次,以中性树脂封片,最后在放大200倍的显微镜下取像并以数码相机摄像,经CAMIA3多功能真彩病理图像分析软件作半定量分析所选图像中免疫阳性颗粒数目;另外每次实验设立替代对照组(以兔血清替代一抗)及空白对照组(以PBS替代一抗)。

1.6 形态学分析 病理切片及染色主要由上海中医药大学附属岳阳医院病理科制备,大致过程为:动物迅速断头处死,取脑组织后,脑组织经中性福尔马林固定,石蜡包埋,脱脂,脱水,取脑组织的矢状面Junk切片机切片,温水展平,烘干,脱脂,梯度脱水,苏木素-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色,中性树脂封片;最后在放大200倍的显微镜下取像并摄像,由外院病理科专家读片,出报告。

1.7 数据处理 数据以均数 $\pm$ 标准差描述,选用SPSS11.0统计软件中单因素方差分析,以SNK法作两两比较。

2 结果

2.1 各组bFGF免疫组化阳性颗粒数目 测定结果见表1。

表1 各组成bFGF免疫组化阳性颗粒数目

组别	个数	免疫组化
中药给药14天组	10	$286.70\pm 79.35^{*\Delta\star}$
中药给药8天组	10	$215.90\pm 60.81^{*\Delta\star}$
造模后7天组	10	$174.30\pm 55.42^{*\Delta\star}$
造模后1天组	10	$118.30\pm 39.36^{*\Delta\star}$
假手术组	10	21.80 ± 16.01

注:和假手术组相比, $*P<0.01$;和中药给药14天组相比, $\Delta P<0.01$;和造模后7天组相比, $\star P<0.01$;和造模后1天组相比, $\star P<0.05$ 。

2.2 形态学表现 总体上较正常脑组织,AIS的早期缺血性形态学表现为:脑细胞的肿胀、水肿,细胞之间分界不清,序列紊乱,可伴有弥散或局灶软化、出血,肉眼可见苍白区;其中皮层部分主要表现为:脑细胞变性坏死,星形细胞有不同程度的变性,毛细血管扩张、充血,炎症细胞浸润、液化等。本实验中中药给药8天组的缺血性形态学表现较造模后1天组来看,未见明显改善;而中药给药14天组的缺血性形态学表现较造模后7天组来看,在细胞肿胀、水肿、坏死及细胞序列等方面有不同程度的改善。

3 讨论

正常状态下血管内皮细胞保持一种静止、非增殖状态,但在缺氧、缺血、炎症等病理条件下可发生新的血管形成。近年来发现在发生急性脑梗死患者的脑内(解剖时间距发病时间由数小时 ~ 10 余天不等),其梗死区中心部位及边缘的半暗区会发生血管新生现象,且和患者的存活时间呈正相关效应^[1],这一现象也在临床实验中得到证实^[2]。而血管新生是受到严格的调控机制的约束,即受到血管新生促进因子及抑制因子调控,其中bFGF是其中最重要的促进因子之一,它是一18 kD的碱性多肽,是一种生物活性较强的促分裂原,对血管内皮细胞起增

增殖作用,能促进大多数来源于中胚叶及神经外胚叶的增殖,通过与其膜受体特异结合而引起广泛的生物学效应。机体在发生急性缺血、缺氧后,它与血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)协同对内皮细胞的增殖分化及血管新生具有效应,并在急性期内对神经细胞具有保护作用^[3,4]。治疗性血管新生的概念首先由 Hockel 等于 1993 年提出,至今各种含 bFGF 生物制剂已广泛应用于实验性心脑血管缺血性疾病研究中,但由于过度表达的血管新生因子与肿瘤发生具有密切关系^[5,6],故目前 bFGF 生物制剂仍主要限于实验观察阶段,但研发安全有效的生物制品仍是治疗缺血性疾病的研究热点。

从中医学角度,结合现代医学研究,我们认为 AIS 的基本病机为“血浊之瘀”、“湿浊之瘀”、“痰浊之瘀”互结,淤塞脑络经脉,加之患者年老,正气虚衰,以致“瘀血不去,新血不生”而致使机体功能丧失,甚至危及生命。从本实验结果可见,对于 AIS 高龄小鼠,经祛瘀生新中草药预防性及治疗性干预,均能在 AIS 急性期内,上调 bFGF 的作用,这可能是

其保护及改善缺血区内大脑皮层组织及细胞的又一作用途径,但具体机制将在以后做进一步研究。

参考文献

- [1]Krupinshi J, Kaluza J, Kumar P, et. al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. Stroke, 1994, 25:1 794
- [2]Song S, Zheng X, Wen S, et. al. Change of serum soluble intercellular adhesion molecule and basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction and its clinical significance [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2002 Nov 10, 82(21):1 447
- [3]Wada K, Sugimori H, Bhide PG, et. al. Effect of basic fibroblast growth factor treatment on brain progenitor cells after permanent focal ischemia in rats[J]. Stroke, 2003 Nov. 34(11):2 722
- [4]Avola R, Cormaci G, Mazzone V, et. al. Effect of growth factors on DNA labeling and cytoskeletal protein expression in 17-beta-estradiol and basic fibroblast growth factor pre-treated astrocyte cultures [J]. Clin Exp Hypertension, 2002 Oct-Nov, 24(7~8):753
- [5]Granato AM, Nanni O, Falcini F, et. al. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? [J]. Breast Cancer Res, 2004, 6 (1):R38
- [6]Lin W, Peng Z, Zheng A, Bi J, et. al. The effect of basic fibroblast growth factor in ovarian cancer growth and angiogenesis [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2003 Dec, 20(6):532

(收稿日期:2004-01-09)

Effect of Quyushengxin Herbal Medicine on the Expression of bFGF in the Cerebral Cortex of the Old Mice with Acute Ischemic Stroke

XU Xu-wei, HE Li-ren, ZHANG Qiu-juan, WANG Tao, ZHAO Hong, XIA Yu-ye, MING Yang
(Yueyang Integrated Medicine Hospital Shanghai 200437)

Abstract: AIM: To observe the effect of Quyushengxin herbal medicine on the expression of bFGF in the cerebral cortex of the old mice with acute ischemic stroke (AIS). METHODS: To randomly separate the 26 weeks old Kun-ming mice into Sham operation group, After surgery 1 day group, After surgery 7 day group, Herb treated 8 day group, Herb treated 14 day group; to establish AIS model by eletrocoagulation on the right side of mice brain; and to observe the ischemic morphological change and the level of protein granule of bFGF in the cerebral cortex of infarcted side by the methods of Hematoxylin-Eosin dye and immunohistochemistry, compared with the Herb treated groups and Sham operation group. RESULTS: After being disposed by the Quyushengxin herb medicine with the concentration of 60 g/kg, in the aspect of morphological change; the ischemic pathological change of the Herb treated 8 day group does not seem to be better than the After surgery 1 day group; while the Herb treated 14 day group seems to be better than the After surgery 7 day group in different degrees; in the aspect of immuno- histochemistry: the positive granule of bFGF of Herb treated 8 day group and 14 day group are both significantly higher than After surgery 1 day and 7 day group ($P < 0.05$). CONCLUSION: After AIS, the expression of bFGF protein will obviously increase and maintain for a period. During the forepart of acute therapeutic window, the Quyushengxin herb medicine can up-regulate the expression of bFGF protein, which might be another way to protect and improve the ischemic pathological condition of infarcted cerebral cortex.

Key Words: Middle cerebral artery; Brain ischemia; Basic fibroblast growth Factor; Immunohistochemistry