

芍甘木瓜汤通过BDNF/TrkB/CREB信号通路改善脑卒中偏瘫痉挛状态大鼠神经行为学研究

韩珂¹, 张郅涛¹, 王晓鹏¹, 许辛寅², 罗涛^{1*}

1. 湖北省十堰市妇幼保健院, 湖北 十堰 442000

2. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 观察芍甘木瓜汤对脑卒中偏瘫痉挛状态大鼠神经行为学的影响, 并探讨对脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶B(TrkB)/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)信号通路的调控机制。方法 取50只SD大鼠采用改良线栓法制作大脑中动脉梗死模型, 选取建模成功大鼠随机分为模型组、巴氯芬(0.008 g/kg)组和芍甘木瓜汤低、中、高剂量(0.05、0.10、0.15 g/kg)组。另取10只SD大鼠不栓塞大脑中动脉作为假手术组, 于再灌注2 h后ig给药, 每天1次, 连续2周, 假手术组和模型组ig等量生理盐水。干预前后分别采用Zea Longa量表、改良Ashworth量表评价神经行为学、肌张力变化, 采用大鼠多导生理记录仪测定上肢伸直幅度; 酶联免疫法检测大鼠干预前后血清BDNF、TrkB水平; 苏木素-伊红(HE)染色观察缺血半暗带脑组织病理变化, 透射电镜下观察缺血半暗带脑组织神经元超微结构; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测缺血半暗带脑组织BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB mRNA表达; Western blotting检测BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB蛋白表达及p-CREB水平。结果 干预后巴氯芬组和芍甘木瓜汤各剂量组的Zea Longa量表、改良Ashworth量表分级均较干预前和模型组(干预后)显著改善($P<0.05$), 上肢伸直幅度均较干预前和模型组(干预后)均显著增加($P<0.05$), 血清BDNF、TrkB水平均较干预前和模型组(干预后)显著升高($P<0.05$), 缺血半暗带脑组织病理变化和神经元超微结构均较模型组明显改善。模型组缺血半暗带脑组织BDNF、TrkB-FL mRNA与蛋白表达, p-CREB蛋白水平均显著低于假手术组($P<0.05$), 巴氯芬组和芍甘木瓜汤各剂量组均较模型组显著升高($P<0.05$); 模型组缺血半暗带脑组织TrkB-T1 mRNA与蛋白表达显著高于假手术组($P<0.05$), 巴氯芬组和芍甘木瓜汤各剂量组均较模型组显著下降($P<0.05$)。各组缺血半暗带脑组织CREB mRNA表达差异无统计学意义。结论 对脑卒中偏瘫痉挛状态大鼠ig予以芍甘木瓜汤可改善其神经行为学, 降低肌张力, 增加血清BDNF、TrkB水平, 减轻缺血半暗带脑组织病理和神经元超微结构变化, 推测与激活BDNF/TrkB/CREB通路, 上调BDNF、TrkB-FL mRNA与蛋白表达, 下调TrkB-T1 mRNA与蛋白表达, 增加p-CREB水平有关。

关键词: 芍甘木瓜汤; 脑卒中; 偏瘫; 痉挛状态; 神经行为学; 脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶B(TrkB)/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)10-2161-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.018

Effect of Shaogan Mugua Decoction on neuroethology and regulation mechanism of BDNF/TrkB/CREB pathway in rats with spastic hemiplegia after stroke

HAN Ke¹, ZHANG Yuntao¹, WANG Xiaopeng¹, XU Xinyin², LUO Tao¹

1. Maternal and Child Health Hospital of Shiyan, Shiyan 442000, China

2. College of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To observe the effect of Shaogan Mugua Decoction on neuroethology in rats with hemiplegia spasticity after stroke, and to explore the regulation mechanism of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine protein kinase B (TrkB)/cAMP effector element binding protein (CREB) signal pathway. **Methods** Totally 50 SD rats were randomly divided into model group, baclofen group, low, medium and high concentration groups of Shaogan Mugua decoction. Another 10 SD rats were taken without

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2018098)

第一作者: 韩珂(1985—), 女, 汉族, 本科, 住院医师, 研究方向为疼痛与卒中康复研究。Tel: 15036266734 E-mail: daylinecc@sohu.com

*通信作者: 罗涛(1982—), 男, 汉族, 本科, 主治医师, 研究方向为针灸、疼痛、卒中康复。E-mail: daylinecc@sohu.com

middle cerebral artery embolization, which were recorded as sham group. The baclofen group was given 0.008 g/kg baclofen by gavage, and the low, medium and high concentration groups of Shaogan Mugua Decoction were given 0.05, 0.1 and 0.15 g/kg Shaogan Mugua Decoction respectively, and the sham group and the model group were given the same amount of normal saline, lasted for two weeks. Before and after intervention, Zea longa scale and modified Ashworth scale were used to evaluate neurobehavior and muscle tension. The range of upper limb extension was measured by multi-channel physiological recorder. The serum levels of BDNF and TrkB were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the histopathology of ischemic penumbra brain tissues. The ultrastructure of neurons of histopathology of ischemic penumbra brain tissues was observed under transmission electron microscope. Real time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expressions of BDNF, TrkB-FL, TrkB-T1 and CREB mRNA. The expressions of BDNF, TrkB-FL, TrkB-T1, CREB and p-CREB were detected by Western blotting. **Results** After intervention, the scores of Zea longa scale and modified Ashworth scale in baclofen group and three dose groups of Shaogan Mugua Decoction were improved compared with those before intervention and model group ($P < 0.05$), the extents of upper limb extension were increased compared with those before intervention and model group ($P < 0.05$), serum BDNF and TrkB levels were increased compared with those before intervention and model group ($P < 0.05$), the pathological changes of ischemic penumbra tissues and ultrastructure of neurons in infarcted area were improved compared with those in the model group. The expressions of BDNF, TrkB-FL mRNA and proteins, and the level of p-CREB in the model group were lower than those in the sham operation group ($P < 0.05$), while those in the baclofen group and three dose groups of Shaogan Mugua Decoction were increased compared with those in model group ($P < 0.05$). The expression of TrkB-T1 mRNA and protein in the model group was higher than that in the sham group ($P < 0.05$), while those in the baclofen group and three dose groups of Shaogan Mugua Decoction were decreased compared with that in the model group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of CREB mRNA in the ischemic penumbra tissues among the three groups. **Conclusion** Shaogan Mugua Decoction can improve neurobehavior, decrease muscle tension, and increase serum BDNF and TrkB levels in rats with hemiplegic spasticity after stroke. It is speculated that it is related to activating BDNF/TrkB/CREB pathway, up regulating the mRNA and protein expressions of BDNF and TrkB-FL, down regulating the mRNA and protein expressions of TrkB-T1, and increasing the level of p-CREB.

Key words: Shaogan Mugua Decoction; stroke; hemiplegia; spasticity; neuroethology; brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine protein kinase B (TrkB)/camp effector element binding protein (CREB) signal pathway

脑卒中偏瘫痉挛状态是指脑卒中患者由于中枢神经系统功能受损所致的半身不遂、肢体肌张力增高的后遗症。调查显示^[1],我国脑卒中年龄标化患病率约为1 114.8/10万,其中高致残率是该病重要的特点,约有80%的患者出现对侧偏瘫,而在脑卒中偏瘫患者中有高达80%~90%的患者存在不同程度的痉挛状态。目前我国脑卒中后偏瘫痉挛状态发病率高,且仍不断增长^[2],但临床上仍缺乏高效、安全的治疗方案。巴氯芬属于一种骨骼肌松弛剂,对脊髓损伤所致的下肢痉挛、脑卒中后偏瘫痉挛状态均有疗效,但其效果与作用仍不能令人满意^[3]。脑卒中后偏瘫痉挛状态属于中医“筋病”“痉证”范畴,多因脏腑亏虚、痰浊血瘀阻塞脉络所致,引发痰蒙上窍、肢体不利、经筋失养、关节挛缩等症,应以活血行气、化痰通络、舒筋解痉为中医治疗原则^[4]。芍甘木瓜汤善用养血调经、祛痰行气、解痉止痛的中药材,配以强筋健骨、舒筋解痉的中药,被证实可有效治疗脑卒中后痉挛大鼠,且还可改善其神经递质水平^[5]。但该方剂的具体作用机制尚不清

楚。脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶B(TrkB)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)可调控脑组织神经元的活性,可参与脑缺血神经元损伤和组织病理改变过程^[6-7]。但芍甘木瓜汤是否可通过调控此通路治疗脑卒中偏瘫痉挛状态仍需进一步研究。鉴于此,本研究建立脑卒中后偏瘫痉挛状态大鼠模型并设置对照实验,探讨上述问题,以期为此类疾病提供一种临床可行的、高效的治疗方案。

1 材料

1.1 实验动物

60只成年SD大鼠,清洁级,雌雄各半,7~9周龄,体质量180~220 g,购自上海医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2019-0001,常规、适应性喂养1周。

1.2 实验药品与试剂

巴氯芬(宁波天衡药业股份有限公司,规格10 mg,批号HC2019001);芍甘木瓜汤(白芍、木瓜、甘草、川芎、川牛膝粉碎后过40目筛,按照5:3:2:2:1配

制,以1:10比例加水煎煮2次,每次90 min,滤过浓缩,每毫升药液相当于1 g生药,主要成分质量分数:氧化芍药苷8.5%、苯甲酰芍药苷7.6%、异芍药苷8.2%、4-O-没食子酸芍药内酯苷6.3%、4'-O-苯甲酰芍药苷5.1%、黄芪苷4.9%、山柰酚类9.2%、没食子鞣质类8.5%、甘草酸单铵盐4.9%、甘草次酸4.8%、甘草黄酮5.6%、甘草多糖6.2%、木瓜多糖4.4%、水溶性维生素4.8%、熊果酸5.3%、齐墩果酸4.9%、其他0.8%)。

鼠血清 BDNF、TrkB 酶联免疫法检测试剂盒(均购自美国 Gibco 公司,批号 190403A、190201C);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(购自武汉博士德生物科技有限公司,批号 201902191);Trizol 试剂盒(购自美国 Invitrogen 公司,批号 20190114A);BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB、 β -actin 基因上下游序列委托宝生物(大连)科技有限公司合成,引物序列见表1;蛋白定量试剂盒(购自美国 Pierce 公司,批号 1902135Y);兔抗鼠 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB、p-CREB、 β -actin,过氧化物酶标记的山羊抗兔单克隆抗体(均购自北京中山生物工程公司)。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	长度/ bp
BDNF 上游	TGCTAGAGATCGAGAGCTAG	220
下游	ACCTCTCGAGAGAGGCTAGC	
TrkB- 上游	TCGATATGCGCGTATAGCTAG	340
FL 下游	ATGCTTAGAGCTTAGGAGGCTAG	
TrkB- 上游	ATGCGTATAGGCGTAGAGGCTAG	266
T1 下游	TCGGATATGGCGATATGCGATAGCTAG	
CREB 上游	AAAGAGAGAGAGTAGCTAGAGT	280
下游	CTCTCGGCTGCGCTAGAGCGAC	
β -actin 上游	TAGAGCTATATAGCCGCG	118
下游	TAATTAGCTATAGCTAGG	

1.3 主要仪器

MP150 型大鼠多导生理记录仪(购自美国 BIOPAC 公司);ALLEGRA X-12 型台式离心机(购自美国 Beckman Coulter 公司);SM2000r 型组织切片仪(购自德国 Leica 公司);CX41 型光学显微镜(购自日本 Olympus 公司);SIGMA 500 型透射电镜(购自德国 Zeiss 公司);Veriti 型聚合酶链反应(PCR)仪(购自美国 ABI 公司);The Trans-Blot Turbo 型转膜仪(购自美国 Bio-Rad 公司);E-Gel® SizeSelect™ 蛋白凝胶电泳系统(购自美国 Invitrogen

公司)。

2 方法

2.1 建模与分组

从60只实验大鼠中随机取50只采用改良线栓法制作大鼠中动脉梗死模型^[8]。腹腔麻醉,仰卧位固定大鼠,备皮消毒,切开左侧颈部皮肤,分离左侧颈总动脉、颈外动脉,取丝线结扎。将颈内动脉分离后在其近端备线,在其远端放置动脉夹,在颈内与颈外动脉分叉处切口,插入鱼线,缓慢送入鱼线直至大脑前动脉近端,深度18~20 mm,结扎并消毒缝合。2 h后拔出鱼线,进行再灌注。余10只SD大鼠操作基本同上,但不结扎颈内动脉和插入鱼线,记为假手术组。常规预防感染。建模大鼠苏醒后见同侧 Horner 征阳性和对侧前肢为重的偏瘫,且3 h后 Zea Longa 量表在1~3分者认为建模成功(0分:无神经损伤表现;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向对侧转圈;3分:向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失)。

将建模成功大鼠采用随机数字表分为模型组、巴氯芬(阳性药,0.008 g/kg)组和芍甘木瓜汤低、中、高剂量(0.05、0.10、0.15 g/kg)组,芍甘木瓜汤低剂量相当于临床等效剂量。再灌注2 h给药,每天ig给药1次,连续给药2周,假手术组和模型组予以等体积生理盐水。

2.2 干预前后神经行为学变化

①采用 Zea Longa 量表评价神经行为学情况;②采用改良 Ashworth 量表^[9]评价肌张力变化,其中0级:无肌张力增高;1级:肌张力轻微增高,抓握中被动屈伸至最后有小的阻力;1⁺级:肌张力轻度增高,抓握中被动屈伸至1/2关节活动度阻力增加;2级:在大部分关节活动度中肌张力均有增加,但肢体被动运动无阻力;3级:肌张力明显增高,肢体被动活动难度大;4级:患肢强直性屈伸;③采用大鼠多导生理记录仪测定上肢伸直幅度,将大鼠固定到刻度板上,取电刺激针的一端插入痉挛侧上肢肱三头肌内,另一端插入其尾部,在痉挛侧下端系上丝线,经传感器连接多导生理记录仪,刺激电流2 mA,记录上肢伸直幅度。

2.3 干预前后血清 BDNF、TrkB 水平变化

分别于干预前后取大鼠尾静脉血5 mL,3 500 r/min 离心10~15 min,取上清液采用酶联免疫法试剂盒测定血清 BDNF、TrkB 水平。

2.4 脑梗死组织病理变化

①HE 染色观察病理改变:干预后采用脊髓脱

白法处死各组大鼠,迅速剥离缺血区域周围半暗带部位的脑组织,置于冰上。甲醛溶液固定、石蜡包埋、修整组织块、切片(层厚4 μm)、脱蜡水化,按HE染色试剂盒说明书染色,中性树胶封片。高倍光镜下观察。②透射电镜下观察缺血半暗带组织神经元超微结构:20 000倍透射电镜下操作,主要观察线粒体、细胞膜等结构变化。

2.5 脑组织缺血半暗带 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB mRNA 表达检测

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法,将缺血半暗带脑组织研磨匀浆,提取总RNA,并反转录。配制PCR反应体系,程序:95℃、5 min;95℃、60 s,59℃、60 s,72℃、60 s,40个循环,最后54℃、5 min。绘制熔解曲线,以β-actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

2.6 脑组织缺血半暗带 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB 蛋白表达和磷酸化-CREB(p-CREB)水平检测

取缺血半暗带脑组织研磨匀浆,加裂解液,摇床孵育,4℃过夜。12 000 r/min离心10 min,取上清,定量总蛋白。添加上样缓冲液,上样并实施蛋白凝胶电泳,转膜仪转膜,以脱脂奶粉摇床孵育,4℃过夜。添加一抗,摇床孵育,室温2 h;添加二

抗,摇床孵育,室温2 h。显色,采用Image J软件分析条带灰度值,β-actin为内参。

2.7 统计学分析

采用SPSS 22.0进行统计学检验,多样本计量资料($\bar{x} \pm s$)进行ONE WAY ANOVA检验,以SNK-*q*检验每2样本差异;等级分布资料以秩和检验。

3 结果

3.1 干预前后各组大鼠神经行为学变化

50只建模大鼠中共有42只成功,成功率为84.00%,模型组8只、巴氯芬组9只、芍甘木瓜汤低、中、高剂量组分别为9、8、8只,干预期间模型组有1只、芍甘木瓜汤低剂量组有1只由于ig不慎穿破食管死亡,芍甘木瓜汤中剂量组有1只不明原因死亡,解剖、尸检发现切口感染。

经秩和检验,干预后各给药组Zea Longa评价和Ashworth量表分级与干预前比较均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。干预后,与假手术组比较,模型组Zea Longa评价和Ashworth量表分级均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,巴氯芬组、芍甘木瓜汤3个剂量组Zea Longa评价和Ashworth量表分级均显著降低($P < 0.05$)。芍甘木瓜汤作用呈剂量相关性,且巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组对比差异均无统计学意义。见表1、2。

表1 干预前后各组Zea Longa评价

Table 1 Comparison of Zea Longa evaluation of groups before and after intervention

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	n/ 只	干预前/只					干预后/只					干预后各组统计 学符号
			0分	1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分	
假手术	—	10	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	—
模型	—	7	0	1	4	2	0	0	0	2	4	1	*
巴氯芬	0.008	9	0	2	4	3	0	2	4	2	1	0	△#
芍甘木瓜汤	0.05	8	0	2	4	2	0	1	3	4	0	0	△#
	0.10	7	0	2	4	1	0	1	5	1	0	0	△#
	0.15	8	0	1	5	2	0	3	4	1	0	0	△#

与同组干预前比较:△ $P < 0.05$;与假手术组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:# $P < 0.05$

△ $P < 0.05$ vs same group before intervention; * $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group

表2 干预前后各组改良 Ashworth 量表评价

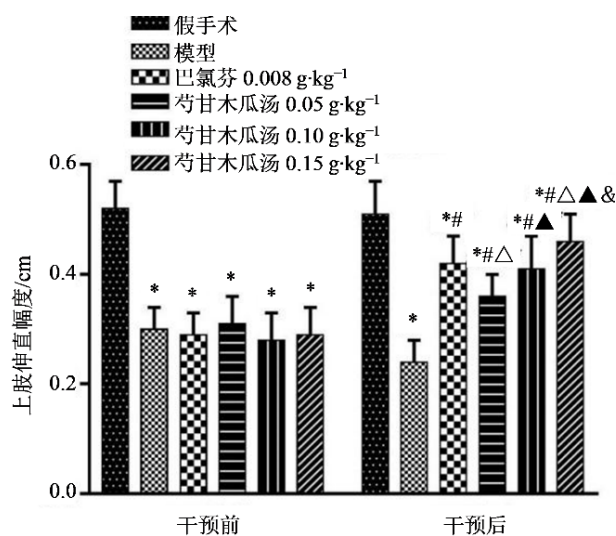
Table 2 Evaluation of modified Ashworth scale in groups before and after intervention

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	n/只	干预前/只							干预后/只							干预后各组 统计学符号
			0级	1级	1 ⁺ 级	2级	3级	4级	0级	1级	1 ⁺ 级	2级	3级	4级			
假手术	—	10	9	1	0	0	0	0	9	1	0	0	0	0	—		
模型	—	7	0	0	1	2	3	1	0	0	0	1	4	2	*		
巴氯芬	0.008	9	0	0	2	4	3	0	0	2	3	3	1	0	△#		
芍甘木瓜汤	0.05	8	0	0	2	4	2	0	0	1	3	3	1	0	△#		
	0.10	7	0	0	2	2	3	0	0	2	3	2	0	0	△#		
	0.15	8	0	0	2	4	2	0	1	4	2	1	0	0	△#		

与同组干预前比较:△ $P < 0.05$;与假手术组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:# $P < 0.05$

△ $P < 0.05$ vs same group before intervention; * $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group

干预前假手术组上肢伸直幅度均显著高于其余各组($P<0.05$);干预后,与假手术组比较,模型组上肢伸直幅度显著减小($P<0.05$);与模型组比较,巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组上肢伸直幅度均显著增大($P<0.05$),且芍甘木瓜汤作用呈剂量相关性,巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组差异无统计学意义。见图1。



与假手术组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: # $P<0.05$;与巴氯芬组比较: $\Delta P<0.05$;与芍甘木瓜汤低剂量组比较: $\Delta P<0.05$;与芍甘木瓜汤中剂量组比较: $\& P<0.05$

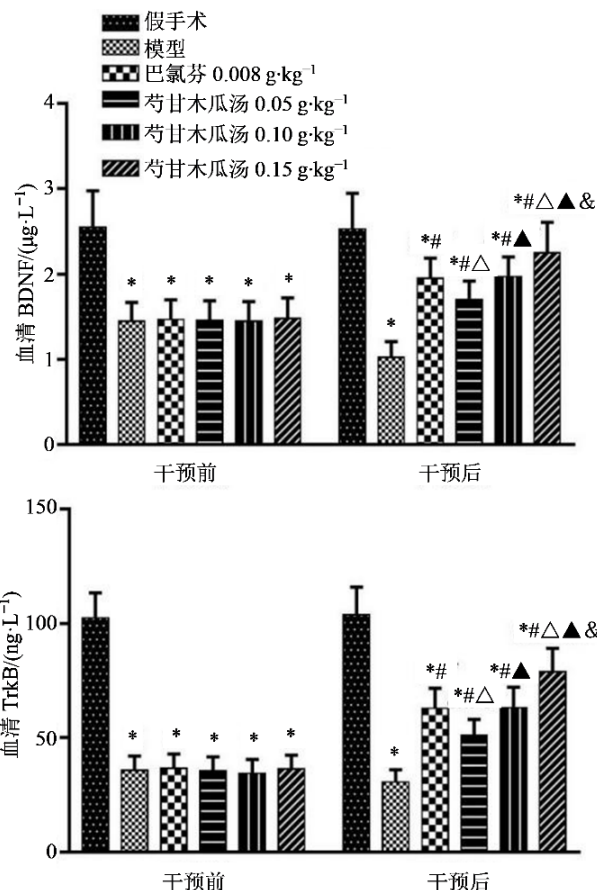
* $P<0.05$ vs sham group; # $P<0.05$ vs model group; $\Delta P<0.05$ vs baclofen group; $\Delta P<0.05$ vs SMD low concentration group; $\& P<0.05$ vs SMD middle concentration group

图1 干预前后各组上肢伸直幅度对比

Fig. 1 Comparison of upper limb extension before and after intervention

3.2 干预前后各组大鼠血清BDNF、TrkB水平

干预前假手术组血清BDNF、TrkB水平均显著高于其余各组($P<0.05$)。干预后,与假手术组比较,模型组BDNF、TrkB水平均显著下降($P<0.05$);与模型组比较,巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组BDNF、TrkB水平均显著升高($P<0.05$),且芍甘木瓜汤作用呈剂量相关性,巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组差异无统计学意义。见图2。



与假手术组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: # $P<0.05$;与巴氯芬组比较: $\Delta P<0.05$;与芍甘木瓜汤低剂量组比较: $\Delta P<0.05$;与芍甘木瓜汤中剂量组比较: $\& P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham group; # $P<0.05$ vs model group; $\Delta P<0.05$ vs baclofen group; $\Delta P<0.05$ vs SMD low concentration group; $\& P<0.05$ vs SMD middle concentration group

图2 干预前后各组大鼠血清BDNF、TrkB水平对比

Fig. 2 Comparison of serum BDNF and TrkB levels of rats in groups before and after intervention

3.3 各组大鼠缺血半暗带病理和神经元超微结构变化

假手术组结构清晰、完整,神经元形态完整、排列有序,细胞膜完整,细胞质和细胞核染色清晰;模型组结构模糊、层次紊乱、细胞疏松且间隙宽,多呈碎片状、灶状,可见严重水肿、炎性浸润,胞浆疏松、胞核固缩。巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组病理改变均较模型组减轻。见图3。

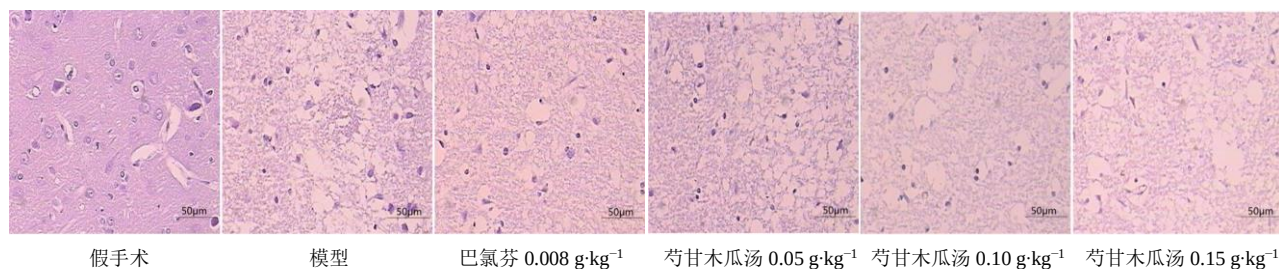


图3 各组大鼠缺血半暗带病理变化(HE染色, ×200)

Fig. 3 Pathological changes of ischemic penumbra of rats in each group (HE staining, ×200)

透射电镜下假手术组线粒体和突触正常,细胞结构完整;模型组神经元不完整,线粒体肿胀,粗面内质网扩大,嵴数目减少;巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组神经元超微结构均好转。见图4。

3.4 各组大鼠缺血半暗带脑组织 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB mRNA 表达

模型组大鼠缺血半暗带脑组织 BDNF、TrkB-FL mRNA 表达水平均显著低于假手术组 ($P < 0.05$);巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组 BDNF、TrkB-FL mRNA 表达均显著高于模型组 ($P < 0.05$),且芍甘木瓜汤作用呈剂量相关性,巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组差异均无统计学意义。各组大鼠缺血半暗带脑组织 CREB mRNA 表达对比差异无

统计学意义。模型组大鼠缺血半暗带脑组织 TrkB-T1 mRNA 表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$),巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组 TrkB-T1 mRNA 表达均显著低于模型组 ($P < 0.05$),且芍甘木瓜汤作用呈剂量相关性,巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组差异均无统计学意义。见表3。

3.5 各组大鼠缺血半暗带脑组织 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB 蛋白表达和 p-CREB 水平

如图5和表4所示,模型组大鼠缺血半暗带脑组织 BDNF、TrkB-FL 蛋白表达和 p-CREB 水平均显著低于假手术组 ($P < 0.05$);巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组 BDNF、TrkB-FL 蛋白表达和 p-CREB 水平均显著高于模型组 ($P < 0.05$),且芍甘木瓜汤作用

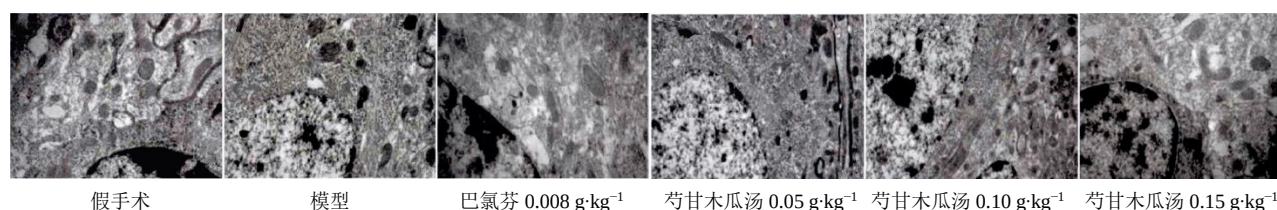


图4 各组大鼠缺血半暗带神经元超微结构($\times 20\ 000$)

Fig. 4 Ultrastructure of neurons in ischemic penumbra of rats in each group ($\times 20\ 000$)

表3 各组大鼠缺血半暗带脑组织 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expressions of BDNF, TrkB-FL, TrkB-T1 and CREB mRNA in ischemic penumbra of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	mRNA 相对表达水平			
			BDNF	TrkB-FL	TrkB-T1	CREB
假手术	—	10	1.45±0.14	1.32±0.14	0.45±0.07	0.91±0.10
模型	—	7	0.50±0.04*	0.48±0.05*	1.52±0.20*	0.90±0.11
巴氯芬	0.008	9	0.79±0.09* [#]	0.74±0.09* [#]	0.81±0.11* [#]	0.89±0.10
芍甘木瓜汤	0.05	8	0.64±0.08* ^{#△}	0.61±0.06* ^{#△}	1.16±0.19* ^{#△}	0.92±0.12
	0.10	7	0.81±0.10* ^{#▲}	0.72±0.10* ^{#▲}	0.83±0.15* ^{#▲}	0.91±0.11
	0.15	8	1.02±0.12* ^{#△▲&}	0.95±0.13* ^{#△▲&}	0.76±0.09* ^{#△▲&}	0.94±0.14

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与巴氯芬组比较: [△] $P < 0.05$; 与芍甘木瓜汤低剂量组比较: [▲] $P < 0.05$; 与芍甘木瓜汤中剂量组比较: [&] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs baclofen group; [▲] $P < 0.05$ vs SMD low concentration group; [&] $P < 0.05$ vs SMD middle concentration group

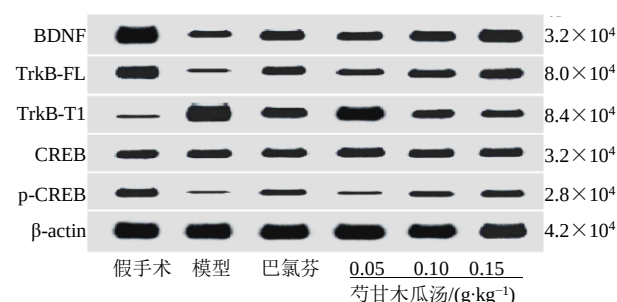


图5 各组大鼠缺血半暗带脑组织 BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB 蛋白表达和 p-CREB 水平检测

Fig. 5 Detection of BDNF, TrkB-FL, TrkB-T1, CREB protein expressions and p-CREB level in ischemic penumbra of rats in each group

呈剂量相关性,巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组比较差异均无统计学意义。各组大鼠缺血半暗带脑组织 CREB 蛋白表达对比差异无统计学意义。模型组大鼠缺血半暗带脑组织 TrkB-T1 蛋白表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$),巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组 TrkB-T1 蛋白表达均显著低于模型组 ($P < 0.05$),且芍甘木瓜汤作用呈剂量相关性,巴氯芬组与芍甘木瓜汤中剂量组差异均无统计学意义。

4 讨论

脑卒中患者由于高级运动调控中枢神经系统受损,导致脊髓等低位运动中枢的调控作用中断或

表4 各组大鼠缺血半暗带脑组织BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1、CREB蛋白表达和p-CREB水平($\bar{x} \pm s$)Table 4 BDNF, TrkB-FL, TrkB-T1, and CREB protein expressions and p-CREB level in ischemic penumbra of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	BDNF/ β -actin	TrkB-FL/ β -actin	TrkB-T1/ β -actin	CREB/ β -actin	p-CREB/ β -actin
假手术	—	10	1.41±0.12	0.92±0.12	0.30±0.05	0.66±0.07	0.56±0.05
模型	—	7	0.32±0.04 [*]	0.15±0.03 [*]	1.26±0.20 [*]	0.64±0.08	0.10±0.03 [*]
巴氯芬	0.008	9	0.72±0.07 [#]	0.52±0.07 [#]	0.71±0.11 [#]	0.65±0.07	0.32±0.04 [#]
芍甘木瓜汤	0.05	8	0.41±0.05 ^{#△}	0.24±0.05 ^{#△}	1.04±0.19 ^{#△}	0.67±0.08	0.15±0.03 ^{#△}
	0.10	7	0.74±0.08 ^{#▲}	0.54±0.07 ^{#▲}	0.73±0.12 ^{#▲}	0.65±0.07	0.33±0.04 ^{#▲}
	0.15	8	1.05±0.11 ^{#△▲&}	0.84±0.09 ^{#△▲&}	0.60±0.09 ^{#△▲&}	0.66±0.08	0.47±0.05 ^{#△▲&}

与假手术组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与巴氯芬组比较:[△] $P < 0.05$;与芍甘木瓜汤低剂量组比较:[▲] $P < 0.05$;与芍甘木瓜汤中剂量组比较:[&] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs baclofen group; [▲] $P < 0.05$ vs SMD low concentration group; [&] $P < 0.05$ vs SMD middle concentration group

减弱,从而使得低级中枢的原始功能释放,不仅可增强运动环路的兴奋性,同时还可引发肢体痉挛状态^[10-11]。巴氯芬属于 γ -氨基丁酸活性,降低脊髓突触反射的兴奋性,从而可以缓解肌强直和痉挛状态^[12]。巴氯芬在脑卒中后偏瘫痉挛状态患者中常用,但可能由于作用强度不够,在药品安全剂量内的效应并不理想^[13]。另有文献报道^[14],巴氯芬并未减少脑卒中模型大鼠的死亡率及缺血脑区的神经元死亡,其对脑卒中引起的神经元死亡无保护作用,本研究结果与该报道不符,可能是由于巴氯芬用药剂量和方法差异、检测方法不同、仪器设备和试剂的灵敏度不同等所致。而探讨新的治疗脑卒中偏瘫痉挛状态的可行方案对促进其康复意义重大。

中医学认为,脑卒中偏瘫痉挛状态可归属于“筋病”“痉证”等范畴,主要由于阴阳失调、气血逆乱、上犯于脑、阻滞脑络所致,加之阴虚阳亢、风火痰瘀伤于脑窍,以致筋脉挛缩、四肢痉挛、关节不利^[15]。根据中医学理论,头为“诸阳之会”“清阳之府”,五脏六腑之精血清气均上注于脑,若正气亏虚、情志不遂、痰浊内生、风火横窜经络则可上蒙清窍,伤于脑络,引发肢体麻木、关节拘挛、言语蹇涩、口歪眼斜等症^[16]。因此对于此症,需畅通脉络、濡养筋骨、舒筋解痉,并兼顾养脑醒脑,方可畅达经络、疏利关节。芍甘木瓜汤为芍甘汤加木瓜所制,前者出自《伤寒论》多用于治疗“筋证”,对缓解肌肉痉挛有良效。芍甘木瓜汤中白芍、甘草为君药,白芍可柔肝敛阴、养血调经、平肝镇痛;甘草可解痉止痛、祛痰解毒,兼具调和药性;二者合用,兼具活血行气、舒筋解痉之效;以木瓜、川芎、川牛膝为臣药,

木瓜舒筋镇痛、解毒化湿,川芎祛风行气、活血止痛、畅达经络,川牛膝滋肝补肾、强筋健骨、活血通经。诸药合用,共奏活血行气、通经止痛、舒筋解痉之效。有报道指出,川牛膝可治四肢拘挛、膝痛不可屈伸等,有逐血气、强筋骨之用。现代药理研究指出,白芍总苷可保护脑缺血大鼠海马区的神经元,改善其学习记忆能力,还可改善脑缺血再灌注大鼠的血液流变学指标,保护脑组织^[17-18];甘草酸二胺、甘草甜素对脑缺血大鼠均有脑保护作用^[19-20]。本研究中巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组干预后行为学评价、肌张力分级均改善,上肢伸直幅度均增加,证实芍甘木瓜汤对脑卒中偏瘫痉挛状态大鼠有效,可改善其神经行为学状态,减轻肢体痉挛,且芍甘木瓜汤的作用呈剂量相关性。

BDNF和TrkB是神经系统疾病患者常用的检测指标,BDNF是一种小分子二聚体蛋白质,在神经系统广泛表达,且具有神经营养作用,可促进神经元的分化与生长发育,维持神经元存活,防止神经元受损、凋亡,减轻其病理状态,并且可促进受损的神经元自我修复,增强其再生及分化能力,被认为是维持中枢及周围神经系统正常功能的必需物质^[21];TrkB是BDNF的受体,BDNF主要通过结合TrkB发挥作用。TrkB在神经元中存在TrkB-FL(全长链)和TrkB-T1(短链)形式,有研究^[22]显示对小鼠钙蛋白酶活化可截断TrkB,下调TrkB-FL表达,上调TrkB-T1表达可损害其认知功能。另有报道指出^[23],在脑缺血发病后,BDNF/TrkB信号通路受抑制,使得二者的表达减少,其下游的CREB的磷酸化水平下降,神经元大量受损甚至凋亡,难以满足维持中枢神经系统正常功能的需求。另有报道显

示^[24], BDNF/TrkB通路不仅可参与神经元的修复、再生和分化过程,并且对行为学、认知和记忆功能均有调控作用,也可增强突触的可塑性。临床研究也发现对脑卒中后偏瘫患者提高血清BDNF水平可增强其神经系统功能^[25]。本研究中巴氯芬组和芍甘木瓜汤3个剂量组干预后血清BDNF和TrkB水平均升高,缺血半暗带脑组织病理和神经元超微结构均改善, BDNF和TrkB-FL mRNA与蛋白表达, p-CREB水平均升高,而TrkB-T1 mRNA与蛋白表达均下降,提示芍甘木瓜汤可能通过激活BDNF/TrkB通路,上调BDNF和TrkB-FL mRNA与蛋白表达,下调TrkB-T1表达,增加p-CREB水平,从而可增加血清BDNF和TrkB水平,达到减轻病理损伤、促进神经元修复与再生的。

芍甘木瓜汤可改善脑卒中后偏瘫痉挛状态大鼠的神经行为学状态,增加上肢伸直幅度和血清BDNF、TrkB水平,减轻缺血半暗带脑组织病理改变,改善神经元超微结构,推测很可能是通过激活BDNF/TrkB通路,上调BDNF和TrkB-FL mRNA与蛋白表达,下调TrkB-T1 mRNA与蛋白表达,增加p-CREB水平实现的。但芍甘木瓜汤调控BDNF/TrkB通路的具体机制仍有待深入探讨,可作为后续研究的新方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙海欣, 王文志. 中国60万人群脑血管病流行病学抽样调查报告[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2018, 18(2): 83-88.
- [2] 蔡小娟, 陈艳. 我国脑卒中流行及防控现状[J]. 广东医学, 2019, 40(S1): 212-215.
- [3] Abbateamarco J R, Willis M A, Wilson R G, et al. Case series: intrathecal baclofen therapy in stiff-person syndrome[J]. Neuromodulation, 2018, 21(7): 655-659.
- [4] 宋超, 田鑫, 刘琳, 等. 甘草汤联合强制性运动训练对老年脑卒中偏瘫肢体及基础运动功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 230-233.
- [5] 王小萌, 吴全娥. 芍甘木瓜汤对脑卒中后痉挛大鼠神经递质的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(3): 37-39, 55.
- [6] Ahn S M, Kim Y R, Shin Y I, et al. Therapeutic potential of a combination of electroacupuncture and TrkB-expressing mesenchymal stem cells for ischemic stroke[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(1): 157-173.
- [7] 王静, 郑荣秀. BDNF修饰的骨髓间充质干细胞对缺氧缺血性脑损伤大鼠脑区BDNF/TrkB信号通路表达的影响与意义[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(7): 1656-1659.
- [8] 郭斌, 岳增辉, 谢志强, 等. 电针对脑卒中痉挛状态大鼠大脑皮质中谷氨酸与 γ -氨基丁酸二者受体表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 325-327.
- [9] 魏鹏绪. 关于改良Ashworth量表的探讨[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(1): 67-68.
- [10] Tomida K, Sonoda S, Hirano S, et al. Randomized controlled trial of gait training using gait exercise assist robot (GEAR) in stroke patients with hemiplegia[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(9): 2421-2428.
- [11] Ravichandran H, Janakiraman B, Sundaram S, et al. Systematic review on effectiveness of shoulder taping in hemiplegia[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(6): 1463-1473.
- [12] Kalyvas A V, Drosos E, Korfiatis S, et al. Intrathecal baclofen therapy for painful muscle spasms in a patient with friedreich's ataxia[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 2018, 96(2): 127-130.
- [13] No S W, Im I K, Kim D H. Stiff person syndrome with evidence of nonspecific focal myositis secondary to sustained muscle contraction: A case report[J]. PM R, 2018, 10(12): 1426-1430.
- [14] 李玲, 焦银香, 张菡, 等. 左归丸和巴氯芬联用对脑瘫鼠运动认知的影响[J]. 中国妇幼保健研究, 2015, 26

- (2): 210-213.
- Li L, Jiao Y X, Zhang H, et al. Effect of combined application of Zuoguiwan and baclofen on motor and cognition of rats with cerebral palsy [J]. Chin J Women Child Health Res, 2015, 26(2):210-213.
- [15] 田金洲, 时 晶, 倪敬年, 等. 中风临床诊断框架的构建 [J]. 中医杂志, 2018, 59(19):1640-1643.
- Tian J Z, Shi J, Ni J N, et al. Construction of clinical diagnostic framework of stroke [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(19):1640-1643.
- [16] 韩 冰. 加味芍药甘草汤结合康复训练治疗老年脑卒中偏瘫的疗效及对患者运动功能、生活质量的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(5): 1046-1048.
- Han B. Effect of modified Shaoyao Gancao decoction combined with rehabilitation training on elderly stroke hemiplegia and its effect on motor function and quality of life [J]. Chin J Gerontol, 2018, 38(5): 1046-1048.
- [17] 史晴晴, 黄 宁, 郭洋洋. 白芍总苷对脑缺血大鼠学习记忆能力及海马CA1区神经元的保护作用 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(4): 415-420.
- Shi Q Q, Huang N, Guo Y Y. Effect of total glucosides of paeony on learning and memory ability and protective effect of neurons in hippocampal CA1 region of cerebral ischaemia rats [J]. Mod Chin Med, 2018, 20(4): 415-420.
- [18] 杜 欢, 史晴晴. 白芍总苷对脑缺血再灌注大鼠血液流变学的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(24): 42-45.
- Du H, Shi Q Q. The influence of total glucosides of paeony on hemorheology in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis, 2018, 16(24): 42-45.
- [19] 姚自同, 李延良, 于耀宇, 等. 甘草酸二铵对急性脑缺血再灌注损伤后p-38MAPK、NF- κ B和MMP-9表达的影响 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2019, 28(3): 22-25.
- Yao Z T, Li Y L, Yu Y Y, et al. Effect of diammonium glycyrrhizinate on the expression of p-38MAPK, NF- κ B and MMP-9 after acute cerebral ischemia reperfusion injury [J]. J Logist Univ CAPF, 2019, 28(3): 22-25.
- [20] 乔会敏, 陈林玉, 杜媛媛, 等. 甘草甜素对脑缺血大鼠的脑保护作用及机制探讨 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2019, 27(5): 287-292.
- Qiao H M, Chen L Y, Du Y Y, et al. The neuroprotective effects and underlying mechanisms of glycyrrhizin in rat cerebral ischemia [J]. J Brain Nerv Dis, 2019, 27(5): 287-292.
- [21] Lee H W, Ahmad M, Weldrick J J, et al. Effects of exercise training and TrkB blockade on cardiac function and BDNF-TrkB signaling postmyocardial infarction in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315(6): H1821-H1834.
- [22] 罗 丹, 杨娇娇, 邱丽丽. 钙蛋白酶介导的酪氨酸激酶受体B截断对剖腹探查术后小鼠认知功能的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36(11): 68-72.
- Luo D, Yang J J, Qiu L L. Effect of calpain-mediated truncation of tyrosine kinase receptor B on the postoperative cognitive dysfunction of aging mice after laparotomy surgery [J]. J Clin Anesthesiol, 2020, 36(11): 68-72.
- [23] Yang J, Yan H, Li S, et al. Berberine ameliorates MCAO induced cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of the BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway [J]. Neurochem Res, 2018, 43(3): 702-710.
- [24] Luo L, Li C, Deng Y, et al. High-intensity interval training on neuroplasticity, balance between brain-derived neurotrophic factor and precursor brain-derived neurotrophic factor in poststroke depression rats [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(3): 672-682.
- [25] 黄健婷, 罗晓舟, 崔韶阳, 等. 针刺结合康复训练对缺血性脑卒中患者吞咽障碍临床疗效观察及对血清BDNF的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 830-833.
- Huang J T, Luo X Z, Cui S Y, et al. Clinical efficacy observation of acupuncture combined with rehabilitation training on dysphagia and effects of serum BDNF in patients with ischemic stroke [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(2): 830-833.

[责任编辑 兰新新]