

## · 药理与临床 ·

## 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体 Flk1 的影响

刘柏炎<sup>1</sup>, 蔡光先<sup>1\*</sup>, 刘 维<sup>2</sup>, 陈雪梅<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学 内科实验室, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**目的 探讨补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体 (Fetal liver kinase 1, Flk1) 的影响。方法 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组、补阳还五汤组, 大脑中动脉线栓法复制局灶性脑缺血模型, 采用免疫组织化学法和酶联免疫法检测各组动物脑内 VEGF、Flk1 的表达和蛋白水平, 同时评价动物神经功能。结果 在正常大鼠脑内有少量 VEGF 和 Flk1 阳性细胞, 脑缺血后 VEGF 和 Flk1 阳性细胞增加, 与模型组比较, 尼莫地平、补阳还五汤均能改善模型大鼠的神经功能缺失症状, 增强 VEGF 和 Flk1 的表达, 提高 VEGF 蛋白水平 ( $P < 0.05$ ); 于 7、14 d 补阳还五汤作用强于尼莫地平 ( $P < 0.05$ )。结论 补阳还五汤增强大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 及 Flk1 的表达和提高 VEGF 蛋白水平, 是其抗脑缺血的可能作用机制之一。

**关键词:** 补阳还五汤; 局灶性脑缺血; 血管内皮生长因子 (VEGF); 血管内皮生长因子受体 (Flk1)

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)03-0394-04

### Effect of Buyang Huanwu Decoction on vascular endothelial growth factor and its receptor Flk1 in rats after focal cerebral ischemia

LIU Bai-yan<sup>1</sup>, CAI Guang-xian<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, CHEN Xue-mei<sup>1</sup>

(1. Internal Medical Laboratory, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract; Objective** To explore the effect of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, Fetal liver kinase 1 (Flk1) in rats after focal cerebral ischemia. **Methods** Rats were randomly divided into following groups including Sham group, model group, Nimodipine group, and BYHWD group. The model of focal cerebral ischemia in rats was reproduced by middle cerebral artery occlusion. Rats were ig administered and killed after operated, then the expression of VEGF and Flk1 and protein level of VEGF in brain tissue of every groups were measured by immunohistochemistry and enzyme linked immunosorbent assay, and the nervous function deficit scores were evaluated. **Results** There were a few VEGF and Flk1 positive cells in normal brain tissue of rats. After focal cerebral ischemia the VEGF and Flk1 positive cells were increased. Compared to model group, Nimodipine and BYHWD significantly improved the neurological behavior performance, increased the numbers of VEGF and Flk1 positive cells, and enhanced the VEGF protein level ( $P < 0.05$ ). There were more potential effect of BYHWD than Nimodipine ( $P < 0.05$ ) on VEGF and Flk1 at 7 and 14 d. **Conclusion** BYHWD can enhance the VEGF expressions and Flk1 level in rats after focal cerebral ischemia, which is one of possible anti-ischemic mechanism of BYHWD.

**Key words:** Buyang Huanwu Decoction (BYHWD); focal cerebral ischemia, vascular endothelial growth factor (VEGF); Fetal liver kinase 1 (Flk1)

缺血性中风是临床常见的急性脑血管疾病, 有较高的死亡率和致残率, 改善缺血半影区的血液供应是治疗的关键。血管内皮生长因子 (vascular

endothelial growth factor, VEGF) 是一种特异性作用于血管内皮细胞的多功能因子, 参与了脑缺血后脑组织的病理修复过程。VEGF 及其受体 (Fetal

收稿日期: 2006-07-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300470, 30472217); 湖南省教育厅优秀青年项目 (04B046)

作者简介: 刘柏炎 (1970—), 男, 湖南隆回人, 中西医结合博士, 湖南中医药大学内科实验室主任, 副教授, 从事中医药防治心脑血管疾病与细胞研究。Tel: (0731) 5381065 E-mail: liubaiyan@126.com

\* 通讯作者 蔡光先 Tel: (0731) 5381000 Fax: (0731) 5504879 E-mail: lby1203@sina.com

liver kinase 1, Flk1) 的表达上调能促进内皮细胞的增殖,诱导新生血管形成及侧支循环建立<sup>[1,2]</sup>。补阳还五汤是中医治疗缺血性脑损伤的有效经典方,能够降低患者的致残率。近年来,大量实验研究表明补阳还五汤具有降低内皮细胞黏附分子表达,减轻脂质过氧化反应,抑制脑水肿,缩小梗死面积等抗脑缺血作用<sup>[3~5]</sup>,但尚未见补阳还五汤对 VEGF 表达影响的研究报道。本实验拟从补阳还五汤对 VEGF 及 Flk1 的影响方面探讨其抗脑缺血的作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂:补阳还五汤处方来源于《医林改错》,由黄芪 120 g、赤芍 10 g、川芎 10 g、当归 10 g、干地龙 10 g、红花 10 g、桃仁 10 g 组成,药材均购自湖南省中医研究院,经鉴定为道地药材,按标准方法煎煮熬膏(含生药 2 g/mL),冷藏备用。尼莫地平片购自济南东方制药厂,规格每片 20 mg,批号 050102,用无菌蒸馏水溶解为 0.1 mg/mL 溶液;小鼠抗大鼠 VEGF 单克隆抗体、小鼠抗大鼠 Flk1 单克隆抗体购自 Neomarker 公司,SABC 免疫组化试剂盒、AEC 显色剂购自 Zymed 公司,VEGF ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,水合氯醛、Triton-X100、双氧水、甲醇均购自北京鼎国生物公司。

1.2 主要仪器:E60 冰冻切片机,英国 Thermo 公司;BX51 光学显微镜及 Image-Pro Express 图像分析系统,日本 Olympus 公司。

1.3 动物分组与给药:清洁级 Wistar 大鼠,280~300 g,雌雄各半,湖南中医药大学实验动物中心提供。大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组、补阳还五汤组,动物术后分别存活 1、3、7、14 d,每组每个时间点各 16 只;另设正常对照组 16 只。根据预实验结果,补阳还五汤组动物于手术后 2 h 起 ig 14.2 g/kg 补阳还五汤药液(按体表面积计算相当 60 kg 成人用量的 3 倍),每日 1 次;尼莫地平组 ig 给予尼莫地平溶液 1 mg/kg,给药体积均为 10 mL/kg;其他各组动物均给予等体积无菌蒸馏水,自由饮食、活动。

1.4 动物造模:参照文献方法<sup>[6]</sup>,采用大脑中动脉线栓法复制局灶性脑缺血大鼠模型。大鼠 10% 水合氯醛(1.0 g/kg) ip 麻醉后,将大鼠固定于手术操作台上,取颈正中切口,游离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。结扎颈总动脉、颈外动脉。于颈总动脉分叉部下方剪一小口,将一预先烧成圆头的尼龙线插入颈内动脉,直到遇到轻微阻力为止,插入深度由分叉部计为(18.5±0.5) mm。固定尼龙线,依次

关闭切口。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。动物于清醒后 2 h 参照文献方法<sup>[7]</sup>进行神经功能评分,分值在 1~3 分者入组,死亡等不足动物随机替补。

1.5 神经功能评分:参照文献方法<sup>[7]</sup>进行 5 级评分。0 分为无神经损伤症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为向瘫痪侧转圈;3 分为向对侧倾倒;4 分为不能自发行走,意识丧失。各组动物在处死前 2 h 进行评分。

1.6 组织处理:大鼠以 10% 水合氯醛(4.0 mL/kg) 麻醉后,一半大鼠沿胸骨左侧剪开胸腔,从左心室进针,插入到主动脉,固定针头,剪开右心耳,快速滴入预冷生理盐水(10 mL/min),无血污后改滴入 4% 多聚甲醛(5~10 mL/min),先快后慢,约 250 mL,开颅取脑,去额极、小脑,4% 多聚甲醛后固定 1 h,依次放入 15%、20%、30% 蔗糖沉底 24 h。OTC 包埋,冰冻切片机冠状连续切片,15 μm 厚,每隔 20 张取 4 张切片。另一半大鼠迅速断头取脑,预冷 PBS 冲洗血污,立即放于液氮中保存。

1.7 VEGF 及 Flk1 免疫组化检测:免疫组化采用 SABC 法,AEC 显色,其中 VEGF 浓度为 1:300,Flk1 浓度为 1:1 000,阳性细胞呈紫红色。每只动物取海马部位切片 5 张,置于 100 倍物镜下,每张切片随机选 3 个视野,用 Olympus Micro Image 4.0 图像处理系统自动计数免疫阳性细胞数。

1.8 VEGF 蛋白水平检测:用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法。准确称取缺血海马区脑组织 10 mg,按体积比为 10:1 加入 0.01 mol/L PBS,匀浆离心,收集上清液,按操作说明测定脑组织 VEGF 蛋白水平。

1.9 统计学方法:所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行统计分析,组间比较用单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响:结果见表 1。用药 7、14 d,尼莫地平组、补阳还五汤组神经功能评分均显著低于模型组( $P < 0.05$ ),且补阳还五汤组与尼莫地平组比较差异亦有显著性( $P < 0.05$ );各组 7、14 d 与 3 d 比较差异显著( $P < 0.05$ )。结果提示:补阳还五汤能改善大鼠局灶性脑缺血神经功能缺失症状,且随着时间延长,其对神经功能缺失症状的改善作用越明显。

表 1 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺失症状的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of BYHWD on nervous function deficit symptom in focal cerebral ischemia of rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	神经功能缺失症状评分			
		1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	-	-	-	0.00±0.00	-
模型	-	2.38±0.10	2.25±0.34	1.94±0.31	0.98±0.35
尼莫地平	0.001	2.41±0.13	2.16±0.31	1.62±0.35*	0.62±0.28*
补阳还五汤	14.2	2.38±0.15	2.17±0.39	1.15±0.31**	0.30±0.21**

与模型组比较: \*P<0.05; 与尼莫地平组比较: #P<0.05  
\*P<0.05 vs model group; #P<0.05 vs Nimodipine group

2.2 VEGF 与 Flk1 蛋白表达的分布规律: VEGF 及其受体 Flk1 在正常组和假手术组均有少量表达, VEGF 主要分布在皮层和室旁区, Flk1 则在室旁区和脉络膜表达, 皮层未见阳性细胞。脑缺血后, VEGF 在缺血半球皮层、室旁区明显增多, 健侧有少量阳性细胞, 细胞呈胞浆染色, 细胞形态多样, 可

表 2 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 VEGF 及 Flk1 阳性细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of BYHWD on numbers of VEGF and Flk1 positive cells in focal cerebral ischemia of rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	VEGF 阳性细胞数/(个·mm <sup>-2</sup> )				Flk1 阳性细胞数/(个·mm <sup>-2</sup> )			
		1 d	3 d	7 d	14 d	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	-	9.1±1.5	12.3±1.2	10.8±0.9	10.1±1.0	5.3±0.7	9.5±1.0	8.2±1.3	6.8±0.9
模型	-	13.1±1.6 <sup>△</sup>	32.9±2.1 <sup>△</sup>	43.1±1.8 <sup>△</sup>	27.1±1.2 <sup>△</sup>	14.3±1.0 <sup>△</sup>	20.3±1.5 <sup>△</sup>	33.4±1.4 <sup>△</sup>	21.9±1.4 <sup>△</sup>
尼莫地平	0.001	14.8±1.4 <sup>△</sup>	36.1±1.8 <sup>△*</sup>	53.6±2.5 <sup>△*</sup>	41.5±1.8 <sup>△*</sup>	15.3±0.7 <sup>△</sup>	23.5±1.3 <sup>△</sup>	41.2±1.8 <sup>△*</sup>	28.5±1.5 <sup>△*</sup>
补阳还五汤	14.2	17.5±1.6 <sup>△*</sup>	45.3±2.4 <sup>△*</sup>	72.4±2.1 <sup>△*</sup>	61.8±2.0 <sup>△*</sup>	15.1±0.9 <sup>△</sup>	24.8±1.4 <sup>△</sup>	48.6±2.1 <sup>△*</sup>	35.6±1.0 <sup>△*</sup>

与假手术组比较: <sup>△</sup>P<0.05; 与模型组比较: \*P<0.05; 与尼莫地平组比较: #P<0.05 (下表同)

\*P<0.05 vs Sham group; #P<0.05 vs model group; #P<0.05 vs Nimodipine group (following Table is same)

2.4 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 VEGF 蛋白水平的影响: 结果见表 3。在正常组和假手术组大鼠脑内有低水平 VEGF, 脑缺血后其蛋白水平迅速增加, 7 d 达高峰, 14 d 有所下降, 但仍明显高于假手术组, 与 VEGF 阳性细胞表达规律基本一致。补阳还五汤组在各时间点与模型组差异均有显著性 (P<0.05), 与尼莫地平组比较在 3、7、14 d 差异均显著 (P<0.05)。

表 3 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑 VEGF 蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of BYHWD on VEGF protein level in focal cerebral ischemia of rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	VEGF 蛋白水平/(ng·L <sup>-1</sup> )			
		1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	-	10.1±1.5	9.3±1.2	9.8±1.9	9.2±1.4
模型	-	16.3±2.6 <sup>△</sup>	36.2±1.7 <sup>△</sup>	65.4±3.1 <sup>△</sup>	46.2±1.8 <sup>△</sup>
尼莫地平	0.001	20.1±2.8 <sup>△</sup>	64.8±2.5 <sup>△*</sup>	89.5±2.5 <sup>△*</sup>	61.6±2.3 <sup>△*</sup>
补阳还五汤	14.2	25.7±2.1 <sup>△*</sup>	84.1±2.4 <sup>△*</sup>	102.4±3.2 <sup>△*</sup>	78.6±2.5 <sup>△*</sup>

3 讨论

见锥体状、星状、管状表达; Flk1 主要分布于缺血侧皮层, 室旁区有少量表达, 细胞形态以丝状为多, 亦可见圆点状。

2.3 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 VEGF 及 Flk1 阳性细胞数的影响: 结果见表 2。脑缺血 1 d, VEGF 及 Flk1 阳性细胞数即增加, 7 d 达高峰, 14 d 有所下降。各手术组 VEGF 阳性细胞数与假手术组、正常组比较差异均有显著性 (P<0.05); 补阳还五汤组在各时间点与模型组比较差异亦均有显著性 (P<0.05), 与尼莫地平组比较在 3、7、14 d 差异显著 (P<0.05)。脑缺血后 Flk1 阳性细胞增幅不及 VEGF, 3 d 起补阳还五汤、尼莫地平组与模型组差异有显著性 (P<0.05), 在 7、14 d 补阳还五汤组与尼莫地平组差异有显著性 (P<0.05)。以上结果提示, 补阳还五汤、尼莫地平均能提高 VEGF、Flk1 阳性细胞数, 但补阳还五汤能维持 VEGF、Flk1 阳性细胞数高值时间。

脑缺血后, 由于脑组织缺血、缺氧, 缺血中心区细胞迅速死亡, 半暗区神经细胞处于低氧、低灌注状态, 及时恢复该区域血流供应有望改善患者的神经功能。而半暗区血流的恢复有赖于侧枝循环的建立, 血管再生是决定这些细胞存活的关键因素, 与缺血性卒中病人的预后关系密切<sup>[8]</sup>。在血管再生过程中, 众多因子参与调节, VEGF 作为一种特异性作用于血管内皮细胞的多功能因子, 其作用备受关注。VEGF 生理状况下主要存在于内皮细胞, 在脑、肾、子宫内膜等组织亦有表达, 可被低氧、缺血等因素诱导。目前发现 VEGF 主要有 Flk1 和 Flt 两个特异性受体, 其中 Flk1 是发挥生物活性的主要受体<sup>[2]</sup>, 当脑缺血时, VEGF 表达增强, 并特异性与 Flk1 结合发挥作用: ①促进内皮细胞增殖与血管生成, 血管生成是指从前端血管生长的内皮细胞分化形成新的血管, 包括内皮细胞的增殖、移行, 管状结构形成与血管网络的建立<sup>[9]</sup>, VEGF 对血管内皮细胞有生长刺激作用和趋化作用而促进新血管的形成<sup>[10]</sup>; ②

VEGF 可诱导基质金属蛋白酶等表达,改变细胞的细胞外基质,有利于新血管的出芽与生长<sup>[11]</sup>;③ VEGF 还可通过抑制兴奋性毒性作用,直接保护低氧损伤神经元<sup>[12]</sup>,减小脑梗死面积<sup>[13]</sup>;④ VEGF 作为有丝分裂原,能促进脑内神经干细胞增殖分化,提高内源性神经再生<sup>[13]</sup>,可见增强 VEGF 及其受体表达有助于神经功能的恢复。

本实验结果发现,补阳还五汤能显著提高局灶性脑缺血模型大鼠神经功能,增强脑缺血后 VEGF 及 Flk1 的表达,维持阳性细胞数相对高值时间,增加脑内 VEGF 蛋白水平,随着用药时间延长,其作用优于尼莫地平,提示影响 VEGF 及 Flk1 是补阳还五汤抗脑缺血损伤的又一可能机制。

References:

[1] Yan C, Davis G. Vascular specific growth factor and blood vessel formation [J]. *Nature*, 2000, 407: 242-248.  
 [2] Meister B J, Gminek F, Bactj F, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(3): 445-449.  
 [3] Chen L G, Qu Y, Ge H Y, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction on expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells of blood stasis rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 706-709.  
 [4] Wang H T, Wang H, Wu Z C, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction on cerebral ischemia-reperfusion injury in atherosclerosis rats [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志),

2003, 23(2): 117-119.  
 [5] Tang Y H, Deng C Q, Liu W H, et al. Effect of four kinds of active fractions Buyang Huanwu Decoction on cerebral infarction volume in focal cerebral ischemia rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 236-239.  
 [6] 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.  
 [7] 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.  
 [8] Krupinski J, Kaluz J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. *Stroke*, 1994, 25(9): 1794-1798.  
 [9] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671-674.  
 [10] Byrne A M, Bouchier-Hayes D J, Harmey J H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor [J]. *J Cell Moll Med*, 2005, 9(4): 777-794.  
 [11] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiopoitin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain [J]. *Stroke*, 2005, 36(7): 1533-1537.  
 [12] Svensson B, Peters M, Konig H G, et al. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism [J]. *J Cere Blood Flow Metab*, 2002, 22(10): 1170-1175.  
 [13] Sun Y J, Jin K L, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1846-1851.

## 应用大鼠肝微粒体筛选对细胞色素 P4502D6 有抑制作用的中药

于卫江<sup>1,2</sup>, 黄丽军<sup>1</sup>, 朱大岭<sup>1,2\*</sup>

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院临床药学药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学药学院 黑龙江省生物医药工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:**目的 从 17 种中药(单体、提取物和注射液)中快速筛选出对细胞色素 P4502D6 (CYP2D6) 亚型有抑制作用的中药, 建立高通量筛选对 CYP2D6 有抑制作用中药的技术平台。方法 取大鼠空白肝微粒体, 分别加入 17 种中药, HPLC 法测定大鼠肝微粒体中 CYP2D6 的探针药物右美沙芬 (DM) 的代谢率, 通过代谢率降低的现象初步筛选出能抑制肝微粒体中 CYP2D6 代谢的药物。结果 槲皮素、黄芩苷、厚朴提取物、清开灵注射液、盐酸川芎嗪注射液可明显降低 DM 的代谢率 ( $P < 0.01$ )。结论 初步筛选出槲皮素、黄芩苷、厚朴提取物、清开灵注射液、盐酸川芎嗪注射液这 5 种中药可抑制肝微粒体 CYP2D6 酶活性。此方法可作为高通量筛选对 CYP2D6 活性有抑制作用中药的技术平台。

**关键词:** 细胞色素 P4502D6 (CYP2D6); 肝微粒体; 右美沙芬

**中图分类号:** R285.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2007)03-0397-05

收稿日期: 2006-07-15

基金项目: 国家“863”课题 (2002AA2Z3410); 黑龙江省自然科学基金重点资助项目 (ZJY03-08); 哈尔滨医科大学研究生创新基金资助项目

作者简介: 于卫江 (1980—), 河南省安阳市人, 男, 硕士研究生, 从事受试药物对细胞色素 P450 酶影响的技术平台的研究, 获哈尔滨医科大学创新基金一项。Tel: (0451) 86605835 E-mail: daniss@sina.com

\* 通讯作者 朱大岭 Tel: (0451) 86614075 E-mail: dalingz@yahoo.com