

黄芪甲苷对短暂性前脑缺血模型大鼠海马神经再生的影响

王 畅,张艳军*,冯 英,庄朋伟,王 静,刘 慧,王林林

(天津中医药大学中药学院,天津 300193)

摘要:目的 观察黄芪甲苷对短暂性前脑缺血大鼠海马神经干细胞增殖、分化的影响,探讨其促进神经发生和分化的作用。方法 雄性 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,黄芪甲苷高、低剂量组(4、2 mg/kg),每组 10 只。短暂性前脑缺血后黄芪甲苷 ip 给药,模型组和假手术组 ip 给予生理盐水,1 次/d,ip BrdU 10 mg/kg,2 次/d,标记增殖细胞。各组分别于第 7、14 天后取脑组织,冰冻切片,行 BrdU 免疫荧光染色显示海马区域增殖的细胞,BrdU 与 MAP-2、GFAP 等免疫荧光双标染色显示海马区域干细胞来源的成熟神经细胞和星形胶质细胞;取海马组织,Real Time RT-PCR 法检测基本成纤维细胞生长因子(bFGF)、神经生长因子(NGF)、脑源神经营养因子(BDNF)、血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 的表达。结果 黄芪甲苷高、低剂量,作用 7 d 后,可增加海马 DG 和 CA1 区 BrdU 阳性细胞数量和海马 CA1 区 BrdU/GFAP 阳性细胞数量;作用 14 d 后,可显著增加海马 DG 区 BrdU/MAP-2 双阳性细胞数量。其中,黄芪甲苷低剂量(2 mg/kg)作用 7 d 后可显著上调 NGF mRNA 表达。结论 黄芪甲苷能够促进海马区神经干细胞增殖、分化,很可能与其上调 NGF mRNA 表达有关。

关键词:黄芪甲苷;神经再生;神经干细胞;增殖;分化

中图分类号:R286.10

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0754-05

Effect of astragaloside on neurogenesis in adult hippocampus of rats after transient forebrain ischemia

WANG Chang, ZHANG Yar-jun, FENG Ying, ZHUANG Peng-wei,
WANG Jing, LIU Hui, WANG Lin-lin

(College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of astragaloside on proliferation and differentiation of neural stem cells in adult hippocampus after transient forebrain ischemia. **Methods** The SD rats were randomly divided into Sham group, model group, astragaloside high dosage treatment group (4 mg/kg), and astragaloside low dosage treatment group (2 mg/kg). After transient forebrain ischemia, astragaloside was ip administration, Sham group and model group were ip administration of saline once per day. 5-Bromodeoxyuridine (BrdU, 10 mg/kg) was ip administration to label proliferating cells twice per day. The rats were sacrificed to be broken out brain tissues as specimens after which they were treated by medicine for 7 and 14 d. By immunohistochemical immunofluorescence technique, the effect of every group on the immunoreactivity of BrdU, BrdU/microtubule-associated protein-2 (MAP-2) and BrdU/glial fibrillary acidic protein (GFAP) after transient forebrain ischemia were observed for proliferation and differentiation of neural stem cells in the adult hippocampus. Simultaneity, Real Time polymerase chain reaction (Real Time-PCR) was used to detect expression of bFGF, NGF, BDNF, and VEGF mRNA of adult hippocampus. **Results** Astragaloside, high and low dosage treatment groups, could increase the quantity of BrdU positive cells in DG and CA1 and BrdU/GFAP both positive cells in CA1 after administration 7 d, and could increase the quantity of BrdU/MAP-2 both positive cells in DG after administration 14 d. Among them, astragaloside, low dosage treatment group (2 mg/kg), could up-regulate the expression of NGF mRNA of adult hippocampus after administration 7 d. **Conclusion** Astragaloside could promote proliferation and neuronal differentiation of the neural stem cells, it may relate to up-regulation of the expression of NGF mRNA of adult hippocampus.

Key words: astragaloside; neurogenesis; neural stem cells (NSCs); proliferation; differentiation

* 收稿日期:2008-09-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472177)

作者简介:王 畅(1984→),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,从事中药药理研究。

Tel: 13652136081 E-mail: wangchang313@163.com

*通讯作者 张艳军

人们通过不断实践证明神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 的存在,并分离培养成功,对于中枢神经系统发育成熟后不可能再生的理论提出了挑战,为神经系统损伤修复和神经退行性疾病的中枢神经功能重建带来了希望。NSCs 不仅具有自我更新的能力,还具有多分化潜能,能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。NSCs 增殖、分化、成熟是神经再生的 3 个阶段。动员内源性 NSCs, 为中枢神经结构和功能的重建提供了新的策略。本实验室前期体外实验研究表明,具有补气作用中药黄芪的提取物黄芪甲苷(黄芪苷),可以明显提高成熟神经元比例^[1],提示黄芪有可能用于神经系统疾病的治疗。本研究观察黄芪甲苷对短暂性前脑缺血模型大鼠海马神经干细胞增殖、分化及基本成纤维细胞生长因子 (bFGF)、神经生长因子 (NGF)、脑源神经营养因子 (BDNF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 基因表达的影响,探讨黄芪甲苷是否通过促进神经再生,发挥神经损伤修复作用。

1 材料

1.1 动物:雄性 SD 大鼠,体质量 250~300 g,购于北京维通利华实验动物有限公司,合格证号 SCXK (京) 2007-0001。

1.2 仪器:射频双极电凝器、脑立体定位仪、ABI 7300 型实时定量 PCR 仪、微型动脉夹等。

1.3 药品与试剂:黄芪甲苷(质量分数 95%),购于泰安中荟植物生化有限公司。抗体:鼠抗 α -tubulin (tuj) 单克隆抗体、兔抗鼠多克隆抗体 MAP-2 (Santa);鼠抗 BrdU 单克隆抗体、兔抗鼠多克隆抗体 GFAP、羊抗鼠-FITC、羊抗兔-FITC、羊抗兔-TRITC (北京中杉金桥生物技术有限公司);羊抗鼠-Cy3 (Sigma); TritonX-100、多聚甲醛、4, 6-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma)。TRNzol 总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time) TaKaRa 批号 BK601; SYBR^R Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) TaKaRa 批号 BK5603;Real Time-PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,引物序列见表 1。

2 方法

2.1 大鼠前脑缺血模型复制:参照 Nakatomi 等^[2]方法,稍作改进复制大鼠前脑短暂性缺血模型。10%水合氯醛 ip 麻醉 (350 mg/kg) 大鼠,分离出颈总动脉,用棉线套扣埋于皮下,缝合切口。大鼠转移到立体定位仪上,俯卧。头向下倾斜 30° 固定。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primer

基因	引物序列
α -actin	正向:AGA GGGAAATCGTGC 反向:CGA TAGTGATGACCT
NGF	正向:GGACGCA GCTTCTATCCTGG 反向:CCCTCTGGGACATTGCTATCTG
bFGF	正向:GGAA GGA GAAA GTTGCA TTTAAAC 反向:CCGTTCGGCGGAGCTT
BDNF	正向:CA GGGGCA TAGACAAAAG 反向:CTTCCCTTTTAAATGGTC
VEGF	正向:ACGAA GCGCAA GAAA TCCC 反向:TTAACTCAA GCTGCCTCGCC

在枕骨下沿背正中分离肌肉,找到第一颈椎后弓上的横突孔,用电凝针插入 2~3 mm 灼断孔中的椎动脉。大鼠放回饲养笼中,禁食过夜,自由饮水。缺血 24 h 后,清醒状态下拆开颈部缝线,用动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成四血管关闭 6 min,然后放开动脉夹再灌注。实验过程中,保持肛温 (37 ± 0.5) °C,以大鼠出现意识消失、眼球苍白、瞳孔散大、翻正反射消失为模型成功标志。模型不成功或出现惊厥癫痫状态的大鼠弃除。

2.2 动物分组、给药及标本采集:雄性 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,黄芪甲苷高、低剂量 (4、2 mg/kg) 组,每组 10 只。除假手术组外其余各组按 2.1 项方法造模,模型成功后给药组 ip 黄芪甲苷,模型组和假手术组 ip 等量生理盐水,1 次/d。各组动物 ip 给予 BrdU 10 mg/kg,2 次/d,标记增殖细胞^[3]。各组分别于第 7、14 天后取脑组织,冰冻切片,行 BrdU 免疫荧光染色显示海马区域增殖的细胞,BrdU 与 MAP-2,GFAP 等免疫荧光双标染色显示海马区域干细胞来源的成熟神经细胞和星形胶质细胞,计算阳性双标阳性细胞数;取海马组织,Real Time RT-PCR 法检测 bFGF、NGF、BDNF 和 VEGF mRNA 的表达。

2.3 荧光免疫组织化学染色检测 BrdU 单标、BrdU 和 MAP-2 双标的阳性细胞数:各组心脏灌注,4%多聚甲醛 (0.1 MPB) 固定,分别用 10%、20%、30%蔗糖溶液 (0.1 MPB) 逐级沉降,冰冻切片,PBS 洗,枸橼酸 (pH 6.0) 水浴 95 °C 热修复 5 min,50%甲酰胺 × 2SSC 65 °C 孵育脑片 2 h,2 mol/L HCl 37 °C 孵育脑片 30 min,0.1 mol/L 硼酸缓冲液室温中和 10 min,胃酶消化液室温孵育 5 min,0.05% Triton 15 min,正常羊血清室温封闭 30 min,小鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (1:100) 孵育脑片 4 h 过夜[或 BrdU 和 MAP-2 (GFAP) (各 1:100) 孵育脑片 4 h 过 2 夜],复温 30 min,羊抗小

鼠二抗 CY3 (1 : 400) 孵育 1 h [或羊抗小鼠二抗 CY3 (1 : 400) 和羊抗兔 FITC (1 : 50) 孵育 1 h], 50 % 甘油封片, 镜下观察并照相。

2.4 Real-Time PCR 检测目的基因: 按试剂盒提供的方法提取脑组织 RNA, 检测总 RNA 质量, 将总 RNA 合成单链 cDNA, 最后以 cDNA 进行定量 PCR。Real-Time PCR 反应: 以 β -actin 作为内参, 取各组 RT 反应产物按试剂盒配制 PCR 反应液。Real-Time PCR 反应: 1 \times (95 $^{\circ}$ C, 30 s); 40 \times (95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 31 s); 1 \times (72 $^{\circ}$ C, 10 min)。在 Real-Time PCR 仪上检测各样本基因表达, 根据 Ct 值, 以假手术组作为标准, 计算各组基因表达为假手术组的倍数, 以此倍数作统计。计算公式如下: 表达倍数 = 2^{-(Ct 用药 - β -actin - Ct 用目的基因) - (Ct 假手术 - β -actin - Ct 假手术目的基因)}}

3 结果

3.1 黄芪甲苷作用 7 d 的实验结果

3.1.1 对短暂性前脑缺血 7 d 后大鼠海马 BrdU 和 BrdU/GFAP 的免疫荧光组织化学染色阳性细胞数的影响: 荧光组织化学染色结果可见, 在荧光显微镜下 BrdU 阳性细胞可在细胞核内见到红色特异性荧光染色, GFAP 阳性细胞可在细胞胞浆内见到绿色特异性荧光染色。与假手术组比较, 模型组 7 d 后海马 DG 和 CA1 区 BrdU 阳性细胞数量无显著性差异, 在 DG 区 BrdU 和 GFAP 双阳性细胞明显增加; 黄芪甲苷高、低剂量均可增加海马 DG 和 CA1 区 BrdU 阳性细胞数量和海马 CA1 区 BrdU/GFAP 阳性细胞数量。结果见表 2。

表 2 短暂性前脑缺血 7 d 后各组大鼠海马区域 BrdU 和 BrdU/GFAP 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Number of positive cells of BrdU and BrdU/GFAP of adult hippocampus of rats 7 d after transient forebrain ischemia in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	DG 区		CA1 区	
		BrdU	BrdU/GFAP	BrdU	BrdU/GFAP
假手术	-	5.50 \pm 6.14	0.25 \pm 0.50 *	3.00 \pm 2.58	0
模型	-	15.50 \pm 7.05	4.50 \pm 5.69	5.50 \pm 4.43	0
黄芪甲苷	2	41.50 \pm 9.17	*5.00 \pm 2.45	26.75 \pm 6.40	*1.00 \pm 0.00
	4	55.50 \pm 7.78	*6.00 \pm 1.41	51.00 \pm 14.14	*5.00 \pm 1.41

与假手术组比较: $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.05$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

3.1.2 对短暂性前脑缺血 7 d 后大鼠海马 bFGF、NGF、BDNF mRNA 表达的影响: 与假手术组比较, 模型组 bFGF mRNA 表达显著性降低, NGF、BDNF mRNA 表达无显著性差异。黄芪甲苷低剂量可显著性增加 NGF mRNA 表达, 结果见表 3。

表 3 短暂性前脑缺血 7 d 大鼠海马 bFGF、NGF、BDNF mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Expression of bFGF, NGF, and BDNF mRNA in adult hippocampus of rats 7 d after ischemia in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	bFGF	NGF	BDNF
假手术	-	0.97 \pm 0.07 *	1.04 \pm 0.31	1.05 \pm 0.34
模型	-	0.72 \pm 0.08	1.33 \pm 0.20	0.80 \pm 0.06
黄芪甲苷	2	0.71 \pm 0.24	3.14 \pm 0.22 *	0.96 \pm 0.45
	4	0.59 \pm 0.02	1.37 \pm 0.13	0.63 \pm 0.07

与假手术组比较: $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.05$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

3.2 黄芪甲苷作用 14 d 后实验结果

3.2.1 对短暂性前脑缺血 14 d 后大鼠海马 BrdU/MAP-2 和 BrdU/GFAP 免疫荧光化学染色阳性细胞数的影响: 荧光组织化学染色结果可见, 在荧光显微镜下 BrdU 阳性细胞可在细胞核内见到红色特异性荧光染色, MAP-2 阳性细胞可在细胞胞浆内见到绿色特异性荧光染色。

与假手术组比较, 模型组 14 d 大鼠海马 DG 和 CA1 区 BrdU/MAP-2 和 BrdU/GFAP 双阳性细胞数均无明显差异。黄芪甲苷高、低剂量可显著增加海马 DG 区 BrdU/MAP-2 双阳性细胞数量。结果见表 4。

表 4 短暂性前脑缺血 14 d 后各组大鼠海马区域 BrdU 和 BrdU/GFAP 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Number of positive cells of BrdU and BrdU/GFAP of adult hippocampus of rats 14 d after transient forebrain ischemia in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	DG 区		CA1 区	
		BrdU/MAP-2	BrdU/GFAP	BrdU/MAP-2	BrdU/GFAP
假手术	-	11.00 \pm 2.94	2.25 \pm 1.26	3.00 \pm 0.82	1.25 \pm 0.50
模型	-	23.00 \pm 3.16	3.00 \pm 1.63	6.50 \pm 5.92	0.50 \pm 0.58
黄芪甲苷	2	34.25 \pm 5.61	*4.00 \pm 1.41	7.25 \pm 2.87	0.50 \pm 1.00
	4	35.25 \pm 2.22	*6.50 \pm 2.52	26.25 \pm 12.38	5.50 \pm 6.40

与假手术组比较: $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.05$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

3.2.2 对短暂性前脑缺血 14 d 后各组海马 VEGF、NGF、BDNF mRNA 表达的影响: 各组间 VEGF、NGF、BDNF mRNA 的表达均无明显差异, 结果见表 5。

4 讨论

成年海马是学习和记忆的重要中枢, 而且对缺血等损伤极其敏感, 一旦海马等结构受到缺血等不可逆性损伤, 随之出现痴呆症状。尽管海马是公认的具有神经再生活性的区域, 但通常只有齿状回颗

表 5 短暂性前脑缺血 7 d 各组大鼠海马 VEGF、NGF、BDNF mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Table 5 Expression of VEGF, NGF, and BDNF mRNA in adult hippocampus of rats 7 d after ischemia in different groups ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	VEGF	NGF	BDNF
假手术	-	0.95 ± 0.18	1.01 ± 0.20	0.83 ± 0.08
模型	-	0.92 ± 0.58	0.80 ± 0.34	0.86 ± 0.37
黄芪甲苷	2	0.88 ± 0.20	0.74 ± 0.36	0.75 ± 0.19
	4	0.90 ± 0.48	0.54 ± 0.14	1.06 ± 0.40

与假手术组比较: P < 0.05

P < 0.05 vs Sham group

粒细胞一种神经细胞能够持续发生,而占海马神经细胞总数 92% ~ 95% 的锥体细胞在正常成年脑中一般认为不能被置换,但缺血性损伤可以刺激其再生。Nakatomi 使用的大鼠短暂性前脑缺血模型即四血管阻断法模型是目前国际上研究迟发性神经再生机制普遍采用的模型之一。研究表明,短暂性前脑缺血可以特异性引起海马 CA1 区锥体细胞变性,在大鼠前脑短暂性缺血模型,短暂性脑缺血即可导致该区 CA1 区锥体细胞的迟发性死亡 (delayed neuronal death, DND),即脑缺血再灌 2 ~ 3 d 后在光镜下才见到 CA1 区锥体细胞的死亡。但随后即可引起内源性的神经干细胞增殖并分化成功能性锥体细胞,尽管数量较少^[2]。通过研究神经干细胞增殖并分化的机制,并寻找在 DND 发生后能够促进海马区功能性神经再生的有效途径,以治疗中风恢复期、中风后遗症、血管性痴呆是脑缺血研究领域亟待解决的重要问题之一。

缺血性脑血管病的大鼠实验模型制备方法有多种,除了 Nakatomi 使用的四血管阻断法和线栓法外大多数为不可再通模型,线栓法是目前比较公认的局灶性脑缺血模型。造模动物均存在缺血侧尾壳核及背外侧皮层梗塞。线栓法尤其适用于基底节缺血再灌注的病理生理机制的研究和观察。而本实验目的是研究神经干细胞的增殖、分化,重点研究中药单体对海马 CA1 区影响机制,因此本实验选用大鼠前脑短暂性缺血模型,其中四动脉阻断法模型手术简单,缺血过程容易掌握,效果确实,可在清醒状态下进行缺血再灌注,符合临床的发病特征,并且能够保证较高的成模率,可根据实验的需要通过夹闭双侧颈总动脉时间的长短控制脑缺血的程度,并能进行再灌流,也是研究脑缺血再灌注损伤比较常用的动物模型之一。

大量实验研究发现大鼠全脑缺血 5 ~ 10 min 再

灌注后第 2 ~ 4 天海马区域大量神经元死亡,到第 7 天只有少量神经元存活下来,而此时 NSCs 达到增殖高峰,第 11 天左右开始降低,第 28 天时下降到接近正常的水平^[4,5]。目前多数学者认为脑损伤后各类细胞释放的细胞因子可通过细胞受体刺激其分裂增殖,同时又能使增殖的细胞产生和释放细胞因子,这些因子反过来通过邻近、自身或者胞内效应又提高它们的增殖^[6]。神经再生过程需要经过 NSCs 增殖、分化、成熟 3 个阶段,最终形成功能性神经元。因此本实验设计为两个阶段:在大鼠全脑缺血再灌第 7 天后检测大鼠海马 NSCs 增殖,第 14 天后检测大鼠海马 NSCs 分化。

神经元标志物微管相关蛋白 (microtubule-associated protein-2, MAP-2) 是组成神经元细胞骨架的重要组成成分^[7]。免疫组化检测 MAP-2 其抗体表达于神经元的轴突和胞体。采用荧光免疫组化的方法同时检测 BrdU/MAP-2 双阳性细胞,其细胞双阳性代表干细胞来源的增殖成熟神经元^[8]。本实验结果显示,大鼠短暂性前脑缺血在第 14 天后检测海马区 BrdU/MAP-2 双阳性细胞数量,模型组均多于假手术组,但无统计学差异。

胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是脑内成熟星形细胞的主要中间丝蛋白,是星形胶质细胞的一种标志蛋白,在星形细胞中有丰富的、唯一的表达^[9]。脑损伤后脑组织星形胶质细胞功能异常活跃,可通过分泌生长因子、细胞因子、识别分子等修复损伤的神经元,促进轴突再生及诱导再生神经元的迁移,从而恢复神经系统正常功能^[10]。星形胶质细胞还能释放某些神经营养因子,作为神经元生长的调节信号,调节控制神经元构筑及神经元的可塑性,促进中枢和周围神经轴索的生长和存活^[11,12]。采用荧光免疫组化的方法同时检测 BrdU⁺/GFAP⁺ 细胞,其双阳性细胞代表干细胞来源增殖的胶质细胞。

前期研究发现,黄芪甲苷对大鼠缺血再灌注的损伤有保护作用^[13]。本实验结果发现:黄芪甲苷高、低剂量作用短暂性前脑缺血模型大鼠 7 d 后可增加海马 DG 和 CA1 区 BrdU 阳性细胞数量和海马 CA1 区 BrdU/GFAP 阳性细胞数量,黄芪甲苷低剂量可显著性增加 NGF mRNA 表达。提示黄芪甲苷能够促进神经干细胞增殖,诱导其向胶质细胞分化。其机制可能是通过促进胶质细胞生长并使其分泌 NGF 生长因子等,NGF 能够修复损伤的神经元和促进 NSCs 分化成神经元,对新生神经元进行

保护^[14,15];黄芪甲苷高、低剂量作用短暂性前脑缺血模型大鼠 14 d 后可显著增加海马 DG 区 BrdU/MAP-2 双阳性细胞数量,对 NGF mRNA 无明显影响。提示黄芪甲苷能够增加神经干细胞来源的神经元的数量,黄芪甲苷是在短暂性前脑缺血后短期内上调 NGF mRNA,起到修复损伤的神经元和促进 NSCs 增殖的作用,具体的机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张艳军, 范祥, 胡利民, 等. 不同治则中药单体对体外培养神经干细胞分化的影响 [J]. 天津中医药, 2004, 21(2): 156-157.
- [2] Nakatomi H. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors [J]. *Cell*, 2002, 110: 429-441.
- [3] Jiang W, Gu W, Brännström T, et al. Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2001, 32(5): 1201-1207.
- [4] Nakatomi H, Kuriu T. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors [J]. *Cell*, 2002, 23, 110: 429-441.
- [5] Sharp F R, Liu J, Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 31, 134(1-2): 23-30.
- [6] Sato K, Hayashi T, Sasaki C, et al. Temporal and spatial differences of PSA-NCAM expression between young-adult and aged rats in normal and ischemic brains [J]. *Brain Res*, 2001, 922: 135-139.
- [7] Bélard A, Gravel C, Parent A. Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates [J]. *Exp Brain Res*, 2006, 170(4): 501-512.
- [8] Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus [J]. *Stroke*, 2001, 32: 1890-1896.
- [9] Baydas Q, Tuzcu M. Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats [J]. *Exp Neurol*, 2005, 194: 175-181.
- [10] Korzhhevskii D E, Otellin V A, Grigor'ev I P, et al. Structural organization of astrocytes in the rat hippocampus in the post-ischemic period [J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2005, 35: 389-392.
- [11] Tohru K, Henrik A, Par T, et al. Intracerebral infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats [J]. *Stroke*, 2006, 37: 2361-2367.
- [12] Seri B, Garcia-Verdugo J M, McEwen B S, et al. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2001, 21: 7153-7160.
- [13] Luo Y, Qin Z, Hong Z, et al. Astragaloside protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 363(3): 218-223.
- [14] 徐正东, 李贯群, BDNF, NGF 在大鼠局灶性脑缺血的表达变化及葛根素对其影响的实验研究 [J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(4): 578.
- [15] 范郁山, 罗燕. 浅刺针法对脑梗塞大鼠的脑组织缺血半暗带 NGF 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2008, 24(3): 36-39.

地锦草提取物抗真菌作用及对皮肤真菌超微结构的影响

李治建¹, 古力娜·达吾提², 肖威¹, 斯拉甫·艾白^{2,3*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 新疆 乌鲁木齐 830049; 3. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830049)

摘要:目的 研究地锦草提取物体外抗真菌活性, 评价其抗真菌作用, 探讨其抗真菌作用机制。方法 参照美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 推荐的《产孢丝状真菌的液基稀释法抗真菌药物敏感性试验方案》(M38-A), 测定地锦草提取物对 60 株临床常见皮肤癣菌的最小抑菌浓度 (MIC) 值, 扫描电镜和透射电镜下观察其细胞表面形态结构变化和细胞内超微结构变化。结果 地锦草提取物对红色毛癣菌的平均 MIC 为 446 μg/mL, 对石膏样毛癣菌的平均 MIC 为 539 μg/mL; 扫描电镜下观察地锦草提取物作用于皮肤癣菌后, 细胞表面皱缩不平, 有严重皱褶、破裂现象; 透射电镜下可见, 真菌细胞壁不完整, 局部有缺损, 厚薄不均; 细胞膜轮廓不清, 局部有破损; 胞内细胞器损伤严重, 多见空泡化, 细胞内成分聚集成电子密度较高的团块。结论 地锦草提取物对真菌的生长具有显著地抑制作用, 可使其形态和超微结构发生明显的改变。

关键词:地锦草提取物; 抗真菌; 最低抑菌浓度

中图分类号:R286.85

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0758-06

* 收稿日期: 2008-08-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760308)

作者简介: 李治建 (1982—), 男, 河南夏邑人, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: lizhijian0220@126.com

* 通讯作者 斯拉甫·艾白 Tel: (0991) 2563702 13999193503 Fax: (0991) 2557730