

· 论著 ·

川芎嗪与外源性 β -神经生长因子对缺氧大鼠 海马神经元活性影响的研究

赵永华¹, 罗小星², 刘煜德²

(1. 澳门科技大学中医药学院, 澳门; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

【摘要】 目的: 探讨川芎嗪和外源性 β -神经生长因子(NGF)对缺氧大鼠海马神经元活性的影响。方法: 选取 24 h 内出生 SD 乳鼠, 进行体外原代培养大鼠海马神经元 14 d 后分为 6 组进行相应处理, 每组设 16 个复孔。空白对照组为无细胞生长, 每孔加磷酸盐缓冲液(PBS)100 μ l; 模型对照组每孔加无血清基础培养液 100 μ l; 川芎嗪高、中、低剂量组每孔分别加盐酸川芎嗪注射液 4、1 和 0.25 μ l(终浓度分别为 800、200 和 50 mg/L); β -NGF 组每孔加含 β -NGF 终浓度为 25 μ g/L 基础培养液至 100 μ l。继续培养后在终止培养前 2.5 h 模拟缺氧环境, 以四甲基偶氮唑盐(MTT)微量酶反应比色法检测各组缺氧 2.5 h 后海马神经元活性, 测量波长 595 nm 处的吸光度(A)值。光镜下观察各组海马神经元形态。结果: 与模型对照组相比, 川芎嗪高剂量组 A 值显著降低($P < 0.05$), 川芎嗪中剂量组和 β -NGF 组显著升高(P 均 < 0.05), 而川芎嗪低剂量组无明显变化($P > 0.05$)。川芎嗪中剂量组与 β -NGF 组相比差异无显著性($P > 0.05$)。光镜下观察, 随缺氧时间的延长, 川芎嗪中剂量组与 β -NGF 组海马神经元可见不同程度胞体肿大、晕光减弱, 以轴突水肿断裂为主, 而其他组海马神经元以胞核内容物浓缩甚至胞核破裂、胞质进行性浓缩改变为主。结论: 外源性 β -NGF 与一定剂量范围的川芎嗪具有保持缺氧海马神经元活性的效果, 而且川芎嗪的剂量与神经元活性之间存在一定的量-效关系。

【关键词】 川芎嗪; β -神经生长因子; 海马神经元活性

中图分类号: R285.5; Q813.11 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)03-0142-04

Study on effects of ligustrazine (川芎嗪) and exogenous β -nerve growth factor therapy on activity of hippocampal neurons in rats after anoxia ZHAO Yong-hua¹, LUO Xiao-xing², LIU Yu-de². 1. Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau, China; 2. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

【Abstract】 **Objective:** To explore the effect of ligustrazine (Lig, 川芎嗪) and exogenous β -nerve growth factor (β -NGF) on activity of hippocampal neurons in rats after anoxia. **Methods:** Hippocampal neurons taken from newborn SD rats within 24 hours were subjected to cultures in vitro. After the 14th day, they were separated into six groups with 16 duplicated pores in each group, and given the corresponding treatment. The phosphate buffer solution (PBS) 100 μ l was applied in each duplicated pore. In the model group, the hippocampal neurons of SD rats were treated with non-albumin culture solution 100 μ l. The hippocampal neurons were treated with different doses (high, medium, low) of Lig injection with 4, 1 and 0.25 μ l in final concentrations of 800, 200 and 50 mg/L, respectively. In β -NGF group, β -NGF (final concentration 25 μ g/L, basic cultral solution 100 μ l) was added into the culture medium. The neuronal cultures were continued and subsequently subjected to deprivation of oxygen for 2.5 hours before the end of the experiment. The activity of hippocampal neurons was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay 2.5 hours after anoxia in each group, and the absorbency (A value) was measured at 595 nm wavelength. Morphological changes of hippocampal neurons in each group were observed under optical microscope. **Results:** Compared with the model group, the A value of the high dose of Lig group was decreased significantly ($P < 0.05$), whereas the values in middle dose of Lig and β -NGF groups were increased significantly (both $P < 0.05$). There was no significant difference between model group and low dose of Lig group and between the middle dose of Lig group and β -NGF group (both $P > 0.05$). Under optical microscope, along with the prolongation of hypoxia time, neurons in middle dose of Lig and β -NGF groups swelled at various degrees, and nerve axons became edematous and fragmented, while in other groups the content in cell nucleus was condensed and even the nucleus broken down. Besides, the cytoplasm was progressively condensed. **Conclusion:** Exogenous β -NGF and Lig within certain range of dose may improve the activity of hippocampal neurons after anoxia, moreover there is a kind of dose-effect relation between the dose of Lig and the activity of neurons.

【Key words】 ligustrazine; β -nerve growth factor; activity of hippocampal neurons

神经生长因子(NGF)由 α 、 β 、 γ 3种多肽链组成,其生物学活性集中体现在 β 亚基上。研究表明,在脑缺血早期内源性 β -NGF表达减少时适量补充外源性 β -NGF,可能会对减少海马缺血敏感区神经元的凋亡以及改善患者预后发挥积极的治疗作用^[1]。而以往动物实验及临床研究结果发现,川芎嗪可对抗脑缺血和脑水肿,增加缺血后神经元存活率,对急性脑缺血患者所致脑损伤有保护作用^[2,3]。为此我们采用体外原代培养大鼠海马神经元方法,模拟缺氧环境,观察川芎嗪和外源性 β -NGF对缺氧大鼠海马神经元活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:马血清、Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)为美国 GIBCO 公司产品;特级小牛血清由上海实生细胞生物技术有限公司提供;L-谷氨酰胺、多聚赖氨酸、胰蛋白酶均为美国 Sigma 公司产品; β -NGF 为英国 PeproTech EC 公司产品。四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均为美国 MDBio 公司产品。盐酸川芎嗪注射液由江苏省常州制药厂有限公司生产。

1.2 大鼠海马神经元体外原代培养:取 24 h 内出生的 SD 清洁级乳鼠(实验动物合格证;粤检证字第 2003A010 号),在超净工作台上无菌条件下分离出海马组织,剪碎、洗涤,加入质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶 2 ml,37℃ 水浴消化 12 min。加完全培养基(各含体积分数为 10% 的马、牛血清,2 mmol/L L-谷氨酰胺,100 U/L 青、链霉素)8 ml 终止消化,离心,弃去上清后加完全培养基混匀,200 目不锈钢筛网过滤。将滤过的细胞悬液种植在 96 孔细胞培养板上(事先用多聚赖氨酸包被隔夜处理),将培养板放入 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,接种当天为 1 d。培养 24 h 后全部吸除种植液,加入等量维持培养基(各含 5% 马、牛血清,2 mmol/L L-谷氨酰胺,100 U/L 青、链霉素)继续培养。3 d 加入含有阿糖胞苷(5 mg/L)的维持培养基作用 24 h,抑制神经胶质细胞过度生长。每 3 d 换 1/2 培养液,直至培养 14 d 神经元已发育良好,进行实验处理。

1.3 海马神经元培养观察方法:采用苏木素-伊红(HE)染色。将生长 14 d 的海马神经元以体积分数

为 4% 的多聚甲醛固定 15 min 后,自来水冲洗 1~2 min,室温下哈瑞苏木素染色 30 s,流水冲洗后用体积分数为 0.5% 盐酸乙醇分化 10 s,快速水洗后加伊红水溶液染色 30~45 s,蒸馏水洗后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光镜下观察培养的海马神经元结构。

1.4 实验分组:于培养第 14 日将 96 孔培养板的每孔维持培养基吸去,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 遍。分为 6 组,每组设 16 个复孔。模型对照组每孔加无血清的基础培养液 100 μ l;川芎嗪高剂量组每孔加盐酸川芎嗪注射液 4 μ l,并补足基础培养液至 100 μ l,使川芎嗪终浓度为 800 mg/L;川芎嗪中剂量组每孔加盐酸川芎嗪注射液 1 μ l,并补足基础培养液至 100 μ l,使川芎嗪终浓度为 200 mg/L;川芎嗪低剂量组每孔加盐酸川芎嗪注射液 0.25 μ l,并补足基础培养液至 100 μ l,使川芎嗪终浓度为 50 mg/L; β -NGF 组每孔加含 β -NGF 终浓度为 25 μ g/L 基础培养液至 100 μ l;空白对照组无细胞生长,每孔加 PBS 100 μ l。

1.5 神经元活性检测:采用 MTT 微量酶反应比色法检测缺氧 2.5 h 海马神经元线粒体琥珀酸脱氢酶的活性。各组经相应处理后,培养 18 h,每组每孔加 MTT 20 μ l(5 g/L)孵育 4 h。在终止培养前 2.5 h 时将 96 孔培养板放入含 5% CO₂ 和 95% N₂ 的培养箱中开放培养,培养结束时将 96 孔板培养液全部吸出,每孔加 DMSO 100 μ l 溶解 MTT 结晶,振荡 10 min,待沉淀充分溶解后,在酶标仪上测量波长 595 nm 处样品的吸光度(A)值,参考波长 630 nm。

1.6 统计学处理:各组数值以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS11.0 软件包中单因素方差分析(one-way ANOVA)程序进行方差齐性检验及组间方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马神经元形态学观察:海马神经元培养 4 h 后,以倒置相差显微镜观察,部分细胞开始贴壁,贴壁细胞呈椭圆形、三角形、菱形等形状,极个别细胞伸出 1~2 个细小突起;24 h 后细胞多数贴壁,突起亦相应延长(彩色插页图 1);培养 3 d,神经细胞突起进一步增多并延长,以多个突起的锥体细胞(多极神经元)为主,胞体呈三角形或椭圆形,体积变大,分支交错形成稀疏的网络(彩色插页图 2),培养的海马神经元随着时间的延长,胞体逐渐增大,神经网络变得稠密,细胞主干和分支明显延长、变粗;培养 14 d,神经元胞体形态多呈锥形和不规则形,核内有

基金项目:国家中医药管理局基金资助项目(AKI98031)

作者简介:赵永华(1973-),男(汉族),辽宁省人,医学博士,助理教授,主治医师,主要从事中西医结合心脑血管病急症的临床与基础研究,主持及参与基金资助课题 6 项,发表学术论文 21 篇(Email: yhzhaoh@must.edu.mo)。

一个大的核仁,细胞核被苏木素染成鲜明的蓝色,细胞胞浆被伊红染成不同程度的粉红色,多数胞质组可见尼氏小体,胞核对比明显(彩色插页图 3),此时的神经元最丰满且晕光明显。随着缺氧时间的延长,川芎嗪中剂量组和 β -NGF 组海马神经元在倒置相差显微镜下可见不同程度胞体肿大、晕光减弱,以轴突水肿断裂为主,而其他组海马神经元以胞核内容物浓缩甚至胞核破裂,胞质进行性浓缩改变为主(彩色插页图 4~8)。

2.2 各组缺氧 2.5 h 海马神经元活性比较(表 1):与模型对照组相比,川芎嗪高剂量组 A 值显著降低($P < 0.05$),川芎嗪中剂量组和 β -NGF 组显著升高(P 均 < 0.05),而川芎嗪低剂量组无明显变化($P > 0.05$)。川芎嗪中剂量组 A 值与 β -NGF 组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 缺氧 2.5 h 各组海马神经元活性比较($\bar{x} \pm s, n=16$)

Table 1 Comparison of hippocampal neuron activity at 2.5 hours after anoxia in each group($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	药物剂量	海马神经元活性(A 值)
模型对照组	0	0.036 \pm 0.005
川芎嗪高剂量组	800 mg/L	0.025 \pm 0.006 [#]
川芎嗪中剂量组	200 mg/L	0.053 \pm 0.003 ^{#*Δ}
川芎嗪低剂量组	50 mg/L	0.038 \pm 0.005 [*]
β -NGF 组	25 μ g/L	0.053 \pm 0.001 ^{#*Δ}
空白对照组	0	0.002 \pm 0.001

注:与模型对照组比较:[#] $P < 0.05$;与川芎嗪高剂量组比较:

* $P < 0.05$;与川芎嗪低剂量组比较: ^{Δ} $P < 0.05$

3 讨论

NGF 作为一种神经营养因子,能加快神经系统损伤后的修复。有研究表明,创伤性脑损伤大鼠伤后 1 d、大脑皮质、海马、丘脑及小脑神经元胞浆 NGF 呈强阳性反应,伤后 1 个月其表达仍上调,说明 NGF 参与了创伤性脑损伤与恢复的全过程,尤其在早期急性期起重要的调节作用^[4]。但目前应用外源性 β -NGF 治疗中枢神经系统疾病因操作困难、复杂,患者创伤性大,使其应用受到一定程度的限制。近年来研究发现,川芎嗪不仅可减轻缺血性脑血管内皮细胞的损伤,而且对缺血、缺氧神经元及神经胶质细胞的损伤具有保护作用。孙建华^[3]研究结果表明,给予川芎嗪注射液后,患者相对平均血流量、最大血流速度、最小血流速度、平均血流速度及脑血管动态阻力等指标均显著升高,脑血管周围阻力、临界压力等指标则显著降低,提示川芎嗪注射液可明显

改善局部微循环,从而发挥保护神经元的作用。

本研究中采用 MTT 检测神经元活性,作为衡量神经元生命力和活性的一个指标。分析发现,川芎嗪中剂量组海马神经元活性与 β -NGF 组相类似,说明外源性 β -NGF 与一定剂量范围的川芎嗪都具有保持缺氧海马神经元活性,增加其耐缺氧能力的效果,而川芎嗪作用机制是启动内源性 NGF 的合成,还是影响 NGF 受体 trkA₂ 和 p75 NGFR 基因表达将是下一步研究的重要内容。

同时本研究也发现,川芎嗪高剂量组海马神经元活性降低,而在应用川芎嗪治疗肿瘤的研究结果中,张振玉等^[5]发现 500 mg/L 川芎嗪对 MKN45 细胞有直接杀伤作用。因此可以间接说明,临床上并非应用大剂量川芎嗪就会取得治疗脑缺血的最好疗效,川芎嗪的剂量与神经细胞活性之间存在一定的量-效关系。李建生等^[6]的实验研究已证实,有活血化瘀作用的川芎嗪对老龄大鼠脑缺血/再灌注有明显的保护作用。虽然本研究结果未能直接给临床应用川芎嗪治疗老年脑缺血患者提供明确剂量的佐证,但解决这些问题则是实验研究为临床研究提供的依据和切入点,使实验研究与临床研究的相关性或一致性不断提高^[7]。

参考文献:

- [1] 崔瑾,于士柱,张天林,等.急性脑缺血大鼠海马和齿状回神经元 β -NGF 与 NGFRs 基因表达变化对其生存影响的研究[J].现代神经疾病杂志,2003,3(3):137-141.
- [2] Luo X X, Ogata H, Xu X, et al. Protective effect of tetramethylpyrazine on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus[J]. No To Shinkei, 1994, 46(9):841-846.
- [3] 孙建华.脑梗死患者脑循环动力学改变和川芎嗪对急性缺血性脑损伤的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(4):248-250.
- [4] 彭瑞云,高亚兵,肖兴义,等. bFGF 和 NGF 基因在大鼠脑震荡脑损伤中的表达研究[J].中国危重病急救医学,2003,15(4):213-216.
- [5] 张振玉,王崇文,祝金泉,等.川芎嗪及联用化疗药物对胃癌细胞杀伤作用的研究[J].中国现代医学杂志,1999,9(1):68-69.
- [6] 李建生,李建国,赵君玫,等.川芎嗪和参麦注射液对老龄大鼠脑缺血/再灌注多器官损伤的作用[J].中国危重病急救医学,2000,7(5):289-294.
- [7] 李建生,刘敬霞.老年脑缺血实验研究与临床研究相关性的问题与思考[J].中国危重病急救医学,2006,18(5):257-259.

(收稿日期:2007-01-06 修回日期:2007-03-23)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

- ①天津红日药业:血必净注射液……………(封底)

益气活血法对脑出血大鼠脑组织促血管生成素-1 及其受体表达的影响

(正文见138页)

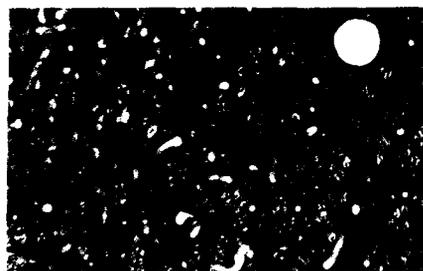


图1 14 d模型组脑组织病理改变(HE, x400)
Figure 1 Pathological change of brain tissues in model group on 14 days (HE, x400)



图2 14 d益气活血组脑组织病理改变(HE, x400)
Figure 2 Pathological change of brain tissues in supplementing Qi and activating blood circulation-treated group on 14 days (HE, x400)

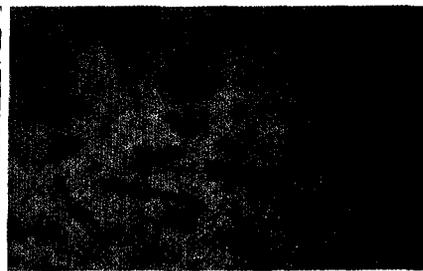


图3 21 d模型组Ang-1阳性表达(免疫组化, x400)
Figure 3 Positive expression of Ang-1 in model group on 21 days (immunohistochemistry, x400)



图4 14 d益气活血组Ang-1阳性表达(免疫组化, x400)
Figure 4 Positive expression of Ang-1 in supplementing Qi and activating blood circulation-treated group on 14 days (immunohistochemistry, x400)



图5 21 d模型组Tie-2阳性表达(免疫组化, x400)
Figure 5 Positive expression of Tie-2 in model group on 21 days (immunohistochemistry, x400)



图6 14 d益气活血组Tie-2阳性表达(免疫组化, x400)
Figure 6 Positive expression of Tie-2 in supplementing Qi and activating blood circulation-treated group on 14 days (immunohistochemistry, x400)

川芎嗪与外源性β-神经生长因子对缺氧大鼠海马神经元活性影响的研究

(正文见142页)



图1 培养24 h模型对照组海马神经元形态学观察(HE, x200)
Figure 1 Observation on morphology of hippocampal neurons at 24 hours after culture (HE, x200)



图2 培养3 d模型对照组海马神经元形态学观察(HE, x200)
Figure 2 Observation on morphology of hippocampal neurons on 3 days after culture (HE, x200)

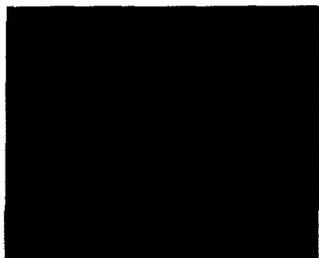


图3 培养14 d模型对照组海马神经元形态学观察(HE, x400)
Figure 3 Observation on morphology of hippocampal neurons on 14 days after culture (HE, x400)



图4 缺氧2.5 h模型对照组海马神经元形态学观察(HE, x200)
Figure 4 Observation on morphology of hippocampal neurons at 2.5 hours after anoxia (HE, x200)



图5 缺氧2.5 h川芎嗪中剂量组海马神经元形态学观察(HE, x400)
Figure 5 Observation on morphology of hippocampal neurons at 2.5 hours after anoxia in middle dose of ligustrazine group (HE, x400)



图6 缺氧2.5 h川芎嗪高剂量组海马神经元形态学观察(HE, x200)
Figure 6 Observation on morphology of hippocampal neurons at 2.5 hours after anoxia in high dose of ligustrazine group (HE, x200)



图7 缺氧2.5 h川芎嗪低剂量组海马神经元形态学观察(HE, x200)
Figure 7 Observation on morphology of hippocampal neurons at 2.5 hours after anoxia in low dose of ligustrazine group (HE, x200)



图8 缺氧2.5 hβ-NGF组海马神经元形态学观察(HE, x200)
Figure 8 Observation on morphology of hippocampal neurons at 2.5 hours after anoxia in β-NGF group (HE, x200)