

# 疏血通对脑梗死小鼠侧支循环形成及脑血管储备能力的影响

杨佳 邱占东 邓刚 方瑜 李大勇 张苏明

100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院神经内科(杨佳);430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(邱占东、邓刚、张苏明),重症医学科(方瑜、李大勇)

通信作者:张苏明,Email:suming\_zhang@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2018.01.002

**【摘要】 目的** 探讨疏血通对脑梗死小鼠侧支循环形成及脑血管储备能力的影响。**方法** 将 58 只 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为空白对照组( $n=6$ )、疏血通组( $n=26$ )及对照组( $n=26$ ),后 2 组用血管电凝法构建小鼠远端大脑中动脉阻塞模型(dMCAO),造模后 30 min 分别经腹腔给予疏血通注射液( $1.5\text{ mL/kg}$ )和等量生理盐水,每 12 小时给药 1 次,连续 3 d。采用 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色评估脑梗死后 1 d 时小鼠梗死灶体积;采用粘条去除实验评估小鼠脑梗死前及脑梗死后第 1、3、7、14、21、28 天的感觉运动功能;采用激光散斑衬比成像系统监测脑梗死前及脑梗死后第 1、3、7 天脑血流变化及侧支循环形成情况(以标准化区域脑血流值(SrCBF)为评估指标);采用免疫荧光染色检测脑梗死后第 7 天侧脑室下区和梗死灶周边区 5- 溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)/ 血管性血友病因子(vWF)及 BrdU/ 人层黏连蛋白(Laminin)双标阳性细胞数目、微血管密度;采用 Western blotting检测脑梗死后第 1 天总蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)、血管内皮生长因子(VEGF)及髓过氧化物酶(MPO)表达水平。**结果** 与对照组相比,疏血通组小鼠脑梗死后第 1 天的梗死体积明显缩小;脑梗死后第 3 天、第 7 天 SrCBF 值显著增高;脑梗死后第 7 天侧脑室下区和梗死周边区 BrdU、BrdU/vWF 及 BrdU/Laminin 双标阳性细胞数目、小血管密度显著增高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。行为学实验表明,2 组小鼠接触及移除黏附物能力逐渐恢复,脑梗死后第 1 天起疏血通组接触时间及移除时间均显著低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。脑梗死后第 1 天,与对照组比较,疏血通组小鼠梗死灶周边组织 p-AKT 及 VEGF 的表达均显著增高,MPO 表达水平显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 疏血通能够促进小鼠脑梗死后侧支循环形成,增强脑血管储备能力。

**【关键词】** 疏血通; 脑梗死; 血管生成; 侧支循环; 脑血管储备能力

**【中图分类号】** R743.31 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2018)01-0010-09

**Shuxuetong promotes collateral circulation formation and cerebrovascular reserve capacity in mouse models after ischemic stroke** Yang Jia, Qiu Zhandong, Deng Gang, Fang Yu, Li Dayong, Zhang Suming

Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China (Yang J); Department of Neurology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Qiu ZD, Deng G, Zhang SM); Department of Emergency Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Fang Y, Li DY)

Corresponding author: Zhang Suming, Email: suming\_zhang@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Shuxuetong (SXT) on promoting collateral circulation formation and enhancing cerebrovascular reserve capacity in mouse models after ischemic stroke. **Methods** Fifty-eight C57BL/6 mice were randomly divided into blank control group ( $n=6$ ), SXT group ( $n=26$ ) and control group ( $n=26$ ). The mice in the SXT group and control group were subjected to distal middle cerebral artery occlusion (dMCAO) by electrocoagulation, and intraperitoneal administration of SXT ( $1.5\text{ mL/kg}$ ) or equal volume of saline was given 30 min after stroke and repeated

every 12 h for the next 3 d. TTC staining was used to assess the volume of infarction one d after ischemic stroke. Adhesive removal tests were performed to evaluate sensorimotor function of the mice before and one, 3, 7, 14, 21 and 28 d after stroke. Standardized regional cerebral blood flow (SrCBF) was measured by laser speckle contrast imaging before and one, 3, and 7 d after stroke. Immunofluorescence was used to evaluate the numbers of deoxyuridine 5'-monophosphate disodium (BrdU)<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup>/von Willebrand factor (vWF)<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup>/Laminin<sup>+</sup> cells and vessel density 7 d after stroke. The expression levels of total protein kinase (AKT), phosphorylated (p)-AKT, vascular endothelial growth factor (VEGF) and myeloperoxidase (MPO) were explored by Western blotting one d after stroke. **Results** As compared with those in the control group, the infarction volume of SXT group was significantly smaller one d after stroke, SrCBF was significantly higher 3 and 7 d after stroke, and vessel density was significantly increased and numbers of BrdU<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup>/laminin<sup>+</sup> cells in the subventricular zone and peri-infarction region were statistically larger 7 d after stroke ( $P<0.05$ ). The results of SXT group in behavior experiments were significantly better than those of control group one d after stroke ( $P<0.05$ ). The levels of p-AKT and VEGF of SXT group were significantly up-regulated, while MPO level was significantly decreased in peri-infarction tissues as compared with those in the control group one d after stroke ( $P<0.05$ ). **Conclusion** SXT can promote the formation of collateral circulation and enhance the cerebrovascular reserve capacity.

**[Keywords]** Shuxuetong; Ischemic stroke; Angiogenesis; Collateral circulation; Cerebrovascular reserve capacity

脑卒中是世界范围内成年人的第一大致残因素及第二大致死因素,其中急性缺血性脑卒中约占 80%<sup>[1-2]</sup>。我国脑卒中的发病率由 1993 年的 0.40% 上升至 2013 年的 1.23%,每年约有 250 万新发脑卒中病例,其中因脑卒中死亡者约有 160 万<sup>[3]</sup>。

研究已证明静脉注射重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)及机械取栓用于缺血性脑卒中超急性期的治疗是有效的,但因受治疗时间窗所限,多数患者不能从中受益<sup>[4]</sup>。中国国家卒中登记数据表明,发病后 3 h 内到达医院的急性缺血性脑卒中患者仅为 11.3%,住院患者溶栓率低至 1.23%<sup>[5]</sup>。在此情况下,寻求其他的有效治疗手段对超出静脉溶栓时间窗或无机会接受机械取栓的急性缺血性脑卒中患者显得尤为重要。

脑血管储备能力是机体的内源性抗缺血能力,指在生理或病理状态下,通过自身调节维持正常稳定脑血流的能力,具体包括脑结构储备、脑血流储备、脑功能储备及脑代谢储备,其中侧支循环形成属于脑结构储备。研究表明,侧支循环的开放和建立可有效减少梗死灶范围,改善预后,降低脑卒中复发风险<sup>[6-7]</sup>。侧支循环评分越高,介入治疗(包括支架植入术、动脉溶栓等)后梗死区域的血管再通、血流再灌注及临床结局越好<sup>[8-9]</sup>。

疏血通注射液(国药准字 Z20010100)是水蛭和地龙经合理组方制成的静脉注射药,其主要化学成分为多肽类、游离单糖类、寡糖类、寡糖肽类和内源

性小分子等。研究显示疏血通注射液具有抗凝、溶栓、抗血小板聚集、调节血脂、细胞保护等作用。研究表明,疏血通能够促进脑外伤后恢复期新生血管形成,提高皮瓣移植区域超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平,进而促进微血管生成及移植皮瓣的存活<sup>[10-11]</sup>。体内及体外动物实验均已证实疏血通能够刺激 rt-PA 分泌,增强纤维蛋白溶解<sup>[12]</sup>。临床研究也表明,疏血通可阻止冠状动脉支架植入术后再狭窄发生,保护脑梗死急性期神经功能,降低患者致残率及改善生活质量<sup>[13-14]</sup>。但是,上述效应的实现是否与疏血通促进侧支循环形成进而增强脑血管储备能力相关目前尚不清楚。因此,本研究拟动态观察小鼠脑梗死后血管生成及侧支循环形成情况,评估疏血通对脑血管储备能力的影响,相关内容报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验动物

58 只 8~10 周雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 18~24 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。小鼠生活在 21~24 ℃、湿度为 40%~50% 环境中,维持 12 h 昼夜节律。研究获得华中科技大学同济医学院动物保护与使用委员会批准。

### 二、实验器材、药品及试剂

微型电凝器、激光散斑衬比成像系统(华科技

大学国家光电实验室),小鼠立体定位仪、负反馈加热垫(深圳瑞沃德生命科技有限公司),手术显微镜(德国 Zeiss 公司),数码相机(日本索尼公司, ILCE-6000L 型),荧光显微镜(日本奥林巴斯公司, BX51 型)。疏血通注射液(牡丹江友搏药业有限责任公司),山羊血清、兔抗蛋白激酶 B(AKT)、小鼠抗 GAPDH(武汉赛维尔生物科技有限公司),BCA 蛋白定量检测试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司),兔抗血管性血友病因子(vWF)多克隆抗体(美国 EMD Millipore 公司),兔抗层黏连蛋白(Laminin)多克隆抗体(德国 Sigma-Aldrich 公司),山羊抗兔 IgG Alexa Fluor<sup>®</sup>594、山羊抗小鼠 IgG(H+L)Alexa Fluor<sup>®</sup>488、兔抗磷酸化 AKT(p-AKT)、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(H+L)(美国 CST 公司),小鼠抗 BrdU 单克隆抗体、兔抗血管内皮生长因子(VEGF)(美国 Santa Cruz 公司),兔抗髓过氧化物酶(MPO)(美国 Abcam 公司)。

### 三、远端大脑中动脉阻塞模型制备及分组处理

将 58 只 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为空白对照组( $n=6$ )、疏血通组( $n=26$ )及对照组( $n=26$ ),空白对照组大鼠不做任何处理。后 2 组用血管电凝法构建小鼠远端大脑中动脉阻塞模型(dMCAO),过程简述如下:小鼠腹腔注射 100 g/L 水合氯醛(35 mg/kg)麻醉,沿颅顶正中切开头皮,长度约 1.5 cm,充分暴露颞肌;显微镜下判明右侧大脑中动脉走行位置,用微型电钻在右侧大脑中动脉远端上方颅骨钻取直径 1 mm 左右的小孔;用微型电凝器阻断远端大脑中动脉,造模完成用牙科骨水泥封堵颅骨小孔,缝合消毒缝皮。其中疏血通组于造模后 30 min 经腹腔注射给予疏血通注射液(1.5 mL/kg),对照组则给予等量生理盐水,均为每 12 小时给药 1 次,连续 3 d。同时在疏血通组和对照组小鼠中随机各选择 6 只于模型制备后即刻腹腔注射 BrdU(50 mg/kg),连续 7 d,2 次/d,用于后续激光散斑衬比成像监测及免疫荧光染色。

### 四、MRI 检查

造模后 24 h 对所有小鼠行头颅 MRI 检查,验证造模效果。采用美国 GE 公司 Signa HDxT 3.0T 磁共振成像仪,应用小鼠专用线圈扫描,层厚 1 mm,轴位,成像序列主要为 T2WI 序列、DWI 序列。

### 五、梗死灶体积评估

MRI 检查后,疏血通组及对照组各随机选择 6 只小鼠行水合氯醛麻醉后断头取脑,于 0℃生理盐水中漂洗,-20℃冰冻后置于小鼠脑模每隔 1 毫米作冠状切片,共切取 8 片。将切片置于 1%2,3,5-氯

化三苯基四氮唑(TTC)溶液(0.01 mol/L PBS 配置)中,37℃孵育 30 min。正常脑组织呈深红色,缺血脑组织呈白色,使用数码相机拍照后利用 Image J 软件并依据相关公式计算梗死灶体积。

### 六、行为学实验

参考文献[15],采用粘条去除实验评估小鼠的感觉运动功能。在 dMCAO 模型制备前以相同的压力先后将粘条(3 mm×4 mm)粘附在每只小鼠的两侧脚掌,评估小鼠嘴巴接触、移除两侧脚掌粘条的时间,即接触时间、移除时间,以排除两侧表现不对称的小鼠。于脑梗死前及脑梗死后第 1、3、7、14、21、28 天时,随机选择疏血通组及对照组各 8 只小鼠并将粘条粘于其左侧脚掌,记录接触时间、移除时间。

### 七、激光散斑衬比成像实验

选择疏血通组及对照组各 6 只小鼠,于脑梗死前及脑梗死后第 1、3、7 天时,利用激光散斑衬比成像系统监测小鼠缺血区域脑血流变化及侧支循环形成<sup>[16]</sup>,选定感兴趣区域测量其标准化脑血流量值(standardized regional cerebral blood flow, SrCBF),SrCBF 为右侧脑血流量与左侧脑血流值的比值。

### 八、免疫荧光染色检测 vWF、Laminin

在脑梗死后第 7 天行激光散斑成像后,将上述 2 组 12 只小鼠行水合氯醛深度麻醉,断颈处死后快速取脑,在冰冻切片机中预冷后用 OCT 胶包埋,沿冠状位切片(层厚 10 μm),贴片后用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,5%山羊血清封闭 1 h;加入一抗兔抗 vWF 多克隆抗体(1:1000)/兔抗 Laminin 多克隆抗体(1:400),4℃孵育过夜,PBS 冲洗 6 次×5 min;加入二抗山羊抗兔 IgG Alexa Fluor<sup>®</sup>594(1:400)室温避光孵育 1 h,后 15 min 加入 DAPI 共孵育,PBS 冲洗 6 次×5 min,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,2 mol/L HCl 37℃避光孵育 30 min,PBS 冲洗 6 次×5 min;40 g/L 多聚甲醛固定 10 min,PBS 冲洗 3 次×10 min;5%山羊血清封闭 30 min;加入小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:100)4℃孵育过夜,PBS 冲洗;加入二抗山羊抗小鼠 IgG(H+L)Alexa Fluor<sup>®</sup>488(1:400)室温避光孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次×10 min;甘油封片,荧光显微镜下拍照,采用 Image J 软件计数细胞。

九、Western blotting 检测 AKT、VEGF 及 MPO 蛋白表达

随机选择空白对照组、疏血通组及对照组各 6 只小鼠,于脑梗死后 1 d 时取梗死灶核心周边 1 mm 范围内脑组织,蛋白质上样后在 12 g/LSDS-PAGE 中进行电泳,恒压湿转至 PVDF 膜,5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后行 TBST 洗膜,加入一抗[分别为兔

抗总 AKT(1:500)、兔抗 p-AKT(1:1000)、兔抗 VEGF (1:500)、兔抗 MPO (1:1000) 及小鼠抗 GAPDH (1:5000)]后 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次×10 min; 加入二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:2000)孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次×10 min, ECL 发光, 以 Image J 软件分别计算灰度值, 以各条带灰度值 /GAPDH 条带灰度值的值表示各蛋白的相对表达量。

十、统计学分析

采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量资料采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 比较采用两样本 *t* 检验、单因素方差分析及重复测量的方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。  $P<0.05$  示差异有统计学意义。

结 果

一、疏血通显著减小脑梗死小鼠梗死灶体积

脑梗死后 1 d 时, MRI 检查显示疏血通组及对照组小鼠均出现明确梗死灶, 证实造模成功, TTC 染色中白色区域为脑梗死灶范围(图 1、2)。

统计分析显示疏血通组梗死灶体积为  $(0.135\pm$

$0.007)$   $\text{cm}^3$ , 对照组为  $(0.236\pm 0.021)$   $\text{cm}^3$ , 差异有统计学意义( $t=11.304, P=0.000$ )。

二、疏血通显著改善脑梗死小鼠感觉运动功能  
脑梗死后第 1 天起, 2 组小鼠均表现出明显的感觉运动功能缺损, 接触或移除对侧粘条时间均显著长于脑梗死前, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。脑梗死后各时间点, 疏血通组小鼠接触及移除对侧粘条时间均显著短于对照组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。具体内容见表 1。

三、疏血通促进脑梗死小鼠缺血区侧支循环形成及脑血流恢复

激光散斑衬比成像监测结果显示, 随着脑梗死时间延长, 对照组及疏血通组梗死灶区域皮质脑血流均逐渐恢复, 均有新的侧支血管形成; 同时, 疏血通组侧支血管数目显著多于对照组, 局部血流图显示疏血通组新生侧支构成新的血管网(图 3)。

统计分析显示, 脑梗死后第 1 天时对照组及疏血通组 SrCBF 值差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 但在脑梗死第 3、7 天, 疏血通组 SrCBF 值显著高于对照组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。具体内容见表 2。

四、疏血通促进脑梗死小鼠梗死灶周边区血管生成

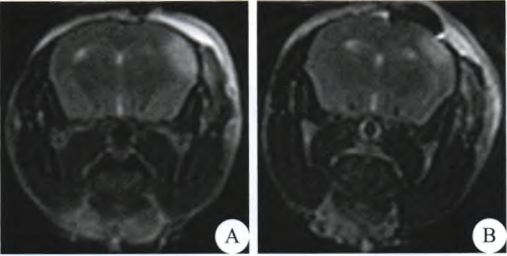
免疫荧光染色及统计分析显示, 疏血通组梗死灶周边区、侧脑室下区 (SVZ) Brdu<sup>+</sup> 细胞数、Brdu<sup>+</sup>/vwF<sup>+</sup> 细胞数均显著高于对照组; 梗死灶周边区 Brdu<sup>+</sup>/Laminin<sup>+</sup> 细胞数显著高于对照组, 梗死灶周边区小血管密度也显著高于对照组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。具体内容见图 4、5 和表 3、4。

五、疏血通促进细胞增殖相关蛋白表达

AKT 是调节细胞生存及增殖的关键因子, p-AKT 表达量及 p-AKT/AKT 比值反映细胞活化程度。Western blotting 结果显示, 在脑梗死后 1 d, 3 组小鼠 p-AKT/AKT 比值及 VEGF 表达量差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 其中疏血通组及对照组 p-AKT/AKT 比值、VEGF 表达量均显著高于空白对照组, 疏血通组显著高于对照组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。具体内容见图 6 和表 5。

六、疏血通抑制中性粒细胞的活化增殖

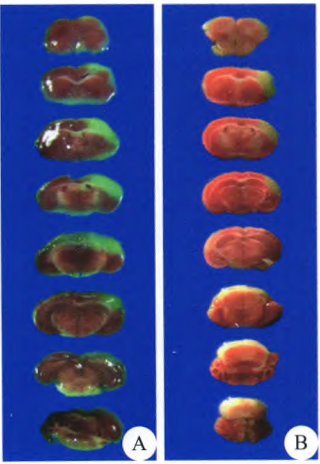
以 MPO 作为中性粒细胞标志物。Western blotting 结果显示, 在脑梗死后 1 d, 与对照组相比, 疏血通组梗死侧 MPO 表达量显著减少, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 2 组对侧相应脑组织 MPO 表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。具体内容见图 7 和表 6。



A: 疏血通组; B: 对照组

图 1 2 组小鼠脑梗死后 1 d 梗死灶体积比较

Fig.1 Comparison of infarct volumes 24 h after ischemic stroke between the two groups



A: 对照组; B: 疏血通组

图 2 2 组小鼠脑梗死后 1 d TTC 染色结果比较

Fig.2 Comparison of TTC staining results 24 h after ischemic stroke between the two groups



表 1 2 组小鼠脑梗死前后不同时间点感觉运动功能比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.1 Comparison of sensorimotor functional recovery at different time points after ischemic stroke between the two groups ( $Mean\pm SD$ )

项目	组别	只数	脑梗死前	脑梗死后第 1 天	脑梗死后第 3 天	脑梗死后第 7 天	脑梗死后第 14 天	脑梗死后第 21 天	脑梗死后第 28 天	F 值	P 值
接触时间(s)	疏血通组	8	1.13±1.12	11.00±1.69 <sup>a</sup>	11.50±1.92 <sup>a</sup>	9.50±2.13 <sup>a</sup>	7.88±1.55 <sup>a</sup>	6.13±1.12 <sup>a</sup>	5.75±1.03 <sup>a</sup>	92.612	0.000
	对照组	8	1.00±1.06	14.00±1.92 <sup>a</sup>	16.13±1.64 <sup>a</sup>	15.13±1.80 <sup>a</sup>	12.88±1.55 <sup>a</sup>	11.25±1.03 <sup>a</sup>	10.00±1.19 <sup>a</sup>	109.248	0.000
	t 值		0.161	3.886	5.991	7.287	6.477	6.639	5.506		
	P 值		0.824	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
移除时间(s)	疏血通组	8	18.00±2.33	35.00±2.77 <sup>a</sup>	35.50±2.87 <sup>a</sup>	32.63±2.66 <sup>a</sup>	29.63±2.32 <sup>a</sup>	28.13±2.35 <sup>a</sup>	26.50±1.41 <sup>a</sup>	97.054	0.000
	对照组	8	18.75±2.25	38.50±2.07 <sup>a</sup>	40.50±2.07 <sup>a</sup>	39.13±1.95 <sup>a</sup>	37.38±2.20 <sup>a</sup>	36.50±2.07 <sup>a</sup>	35.13±2.58 <sup>a</sup>	245.556	0.000
	t 值		0.648	3.028	4.326	5.623	6.705	7.245	7.462		
	P 值		0.522	0.013	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000		

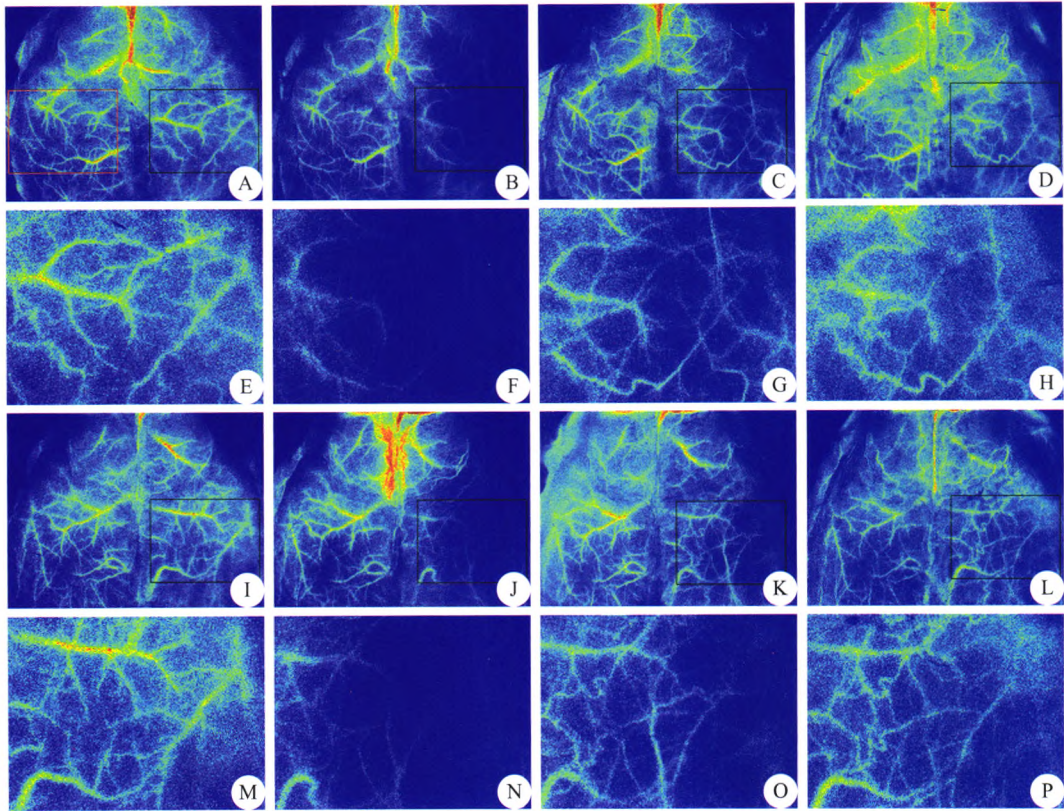
与脑梗死前比较,<sup>a</sup>P<0.05

表 2 2 组小鼠脑梗死前后不同时间点标准化脑血流值比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.2 Comparison of standardized regional cerebral blood flow at different time-points after ischemic stroke between the two groups ( $Mean\pm SD$ )

组别	只数	脑梗死前	脑梗死后第 1 天	脑梗死后第 3 天	脑梗死后第 7 天	F 值	P 值
疏血通组	6	1.00±0.04	0.45±0.02	0.63±0.03	0.91±0.03	405.210	0.000
对照组	6	1.00±0.02	0.43±0.02	0.56±0.03	0.83±0.02	652.710	0.000
t 值		0.094	1.521	2.431	4.947		
P 值		0.940	0.051	0.039	0.000		

组内任意两时间点比较,P<0.05



A~D: 对照组脑梗死前、梗死后 1 d、3 d、7 d 全景血流图; E~H: 对照组脑梗死前、梗死后 1 d、3 d、7 d 局部血流图( $\times 4$ ); I~L: 疏血通组脑梗死前、梗死后 1 d、3 d、7 d 全景血流图; M~P: 疏血通组脑梗死前、梗死后 1 d、3 d、7 d 局部血流图( $\times 4$ )

图 3 激光散斑对比成像监测 2 组小鼠脑梗死前后不同时间点缺血区域皮层脑血流及侧支循环情况

Fig.3 Comparison of regional cerebral blood flow and collateral circulation at different time points after ischemic stroke between the two groups



讨 论

脑血管储备能力降低可使脑动脉狭窄或者闭塞患者的缺血性脑卒中发病风险显著增加<sup>[17]</sup>。既往研究证实疏血通能够促进外伤后恢复期血管生成、提高皮瓣移植成功率,但尚少见研究探索其对侧支循环形成及脑血管储备能力的影响及效应机制。本研究深入探究了疏血通对小鼠脑梗死后侧支循环建立的影响及对脑血管储备能力的增强作用。

本研究采用的小鼠 dMCAO 模型与人血管阻塞致脑梗死病理机制相符,较传统 MCAO 模型相比,

表 4 2 组小鼠脑梗死灶周边区 BrdU<sup>+</sup>/Laminin<sup>+</sup> 细胞数及小血管密度比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.4 Comparison of numbers of BrdU<sup>+</sup>/laminin<sup>+</sup> cells and vessel density in the peri-infarction region between the two groups (Mean±SD)

组别	只数	BrdU <sup>+</sup> /Laminin <sup>+</sup>	小血管密度
对照组	6	72.50±12.16	195.17±17.10
疏血通组	6	268.67±25.83	243.83±10.81
t值		423.200	99.370
P值		0.000	0.000

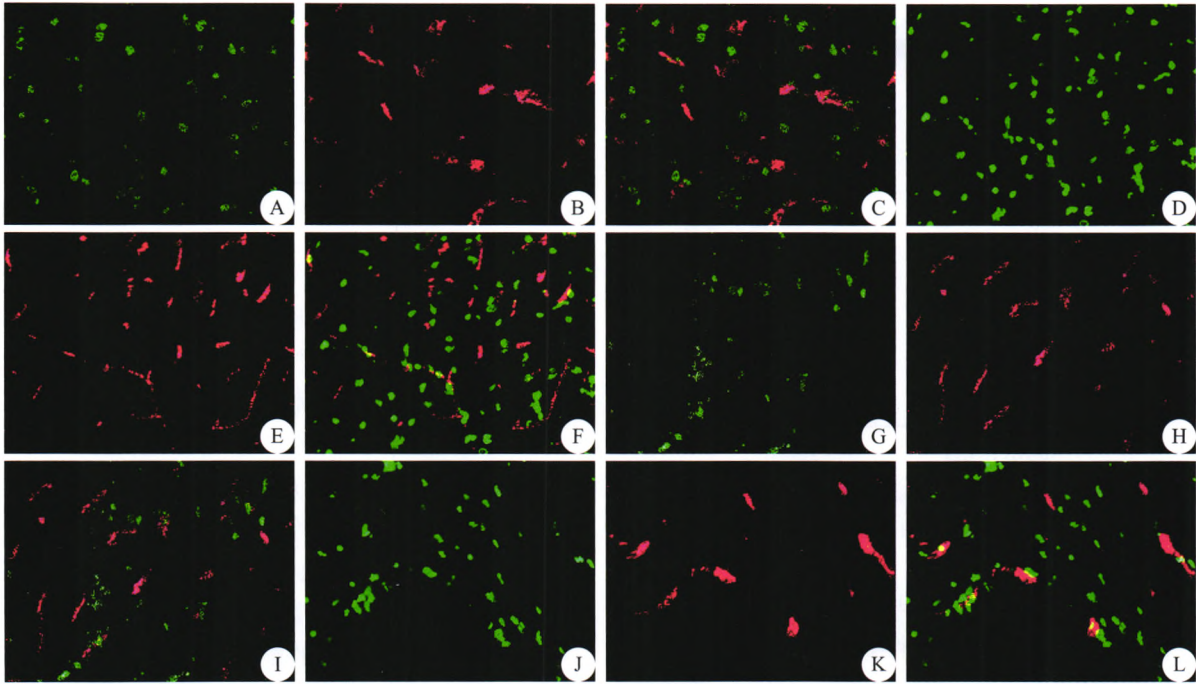
BrdU:5- 溴脱氧尿嘧啶核苷;Laminin:层粘连蛋白

表 3 2 组小鼠脑梗死灶周边区及 SVZ 区 BrdU<sup>+</sup> 及 BrdU<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup> 细胞数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.3 Comparison of numbers of deoxyuridine 5'-monophosphate disodium (BrdU)<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup>/von Willebrand factor<sup>+</sup> in the peri-infarction region and subventricular zone after ischemic stroke between the two groups (Mean±SD)

组别	只数	BrdU <sup>+</sup>		BrdU <sup>+</sup> /vWF <sup>+</sup>	
		梗死周边区	SVZ区	梗死周边区	SVZ区
对照组	6	528.83±102.17	234.33±37.19	92.83±14.82	19.50±3.50
疏血通组	6	898.50±70.04	336.33±20.20	158.67±22.64	37.67±9.91
t值		7.309	5.903	5.959	4.232
P值		0.000	0.000	0.000	0.001

BrdU:5- 溴脱氧尿嘧啶核苷;vWF:血管性血友病因子;SVZ:侧脑室下区

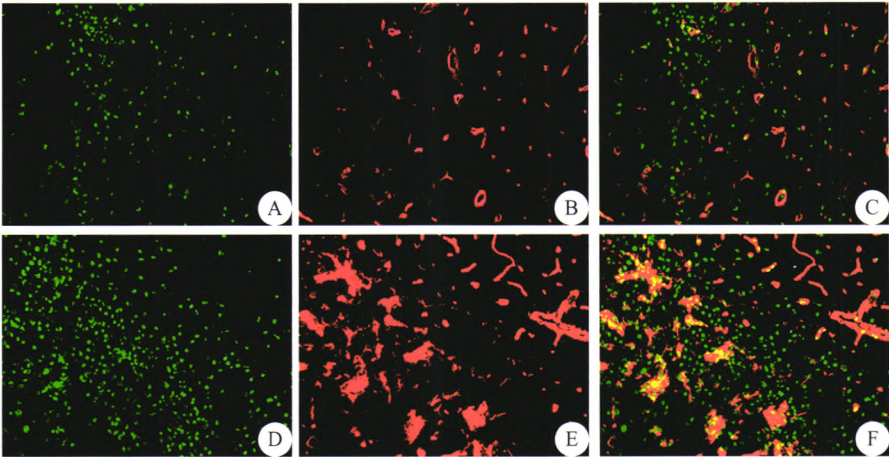


A:对照组梗死周边区 BrdU 阳性表达;B:对照组梗死周边区 vWF 阳性表达;C:A、B 融合图;D:疏血通组梗死周边区 BrdU 阳性表达;E:疏血通组梗死周边区 vWF 阳性表达;F:D、E 融合图;G:对照组 SVZ 区 BrdU 阳性表达;H:对照组 SVZ 区 vWF 阳性表达;I:G、H 融合图;J:疏血通组 SVZ 区 BrdU 阳性表达;K:疏血通组 SVZ 区 vWF 阳性表达;L:J、K 融合图

BrdU:5- 溴脱氧尿嘧啶核苷;vWF:血管性血友病因子;SVZ:侧脑室下区

图 4 2 组小鼠脑梗死灶周边区及 SVZ 区内皮细胞增殖及血管生成比较(x400)

Fig.4 Comparison of endothelial cells proliferation and angiogenesis in the peri-infarction region and subventricular zone between the two groups(x400)

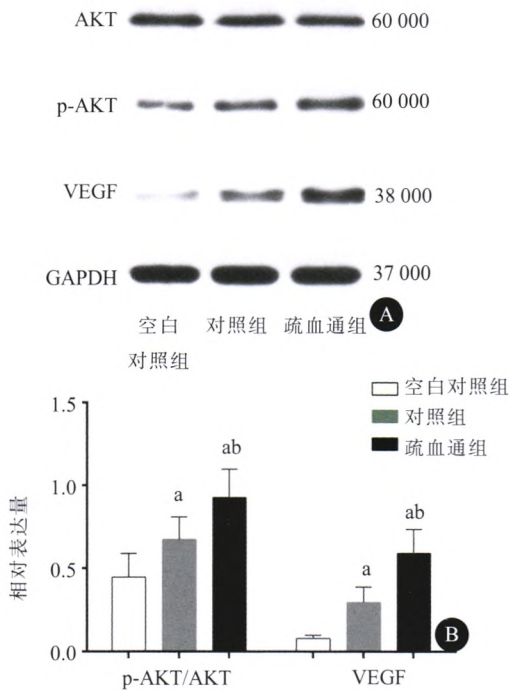


A:对照组梗死周边区 BrdU 阳性表达;B:对照组梗死周边区 Laminin 阳性表达;C:A、B 融合图;D:疏通组梗死周边区 BrdU 阳性表达;E:疏通组梗死周边区 Laminin 阳性表达;F:D、E 融合图

BrdU:5- 溴脱氧尿嘧啶核苷;Laminin:层粘连蛋白

图 5 2 组小鼠脑梗死灶周边区层粘连蛋白阳性表达比较(x200)

Fig.5 Comparison of basement membrane formation in the peri-infarction region between the two groups (x200)



A:AKT 蛋白、p-AKT、VEGF 蛋白 Western blotting 条带;B:量化比较结果;AKT:蛋白激酶 B;p-AKT:磷酸化蛋白激酶 B;VEGF:血管内皮生长因子

与空白对照组比较,\*P<0.05;与对照组比较,<sup>b</sup>P<0.05

图 6 AKT、p-AKT、VEGF 蛋白检测结果及量化分析

Fig.6 Western blotting results and quantitative analysis of total protein kinase, phosphorylated-protein kinase, and vascular endothelial growth factor

小鼠死亡率显著降低,为深入观察及探索疏通对脑梗死的效应机制提供了理想的动物模型<sup>[18]</sup>。我们采用激光散斑对比成像系统直观评估疏通对脑梗死区域脑血流及侧支循环形成的影响,其时间空间

表 5 3 组小鼠脑梗死灶周边组织 p-AKT 及 VEGF 表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.5 Comparison of expressions of phosphorylated- protein kinase and vascular endothelial growth factor in the peri-infarction tissue between the three groups ( $Mean\pm SD$ )

组别	只数	p-AKT/AKT	VEGF
空白对照组	6	0.46±0.16	0.07±0.02
对照组	6	0.69±0.15*	0.32±0.05*
疏通组	6	0.88±0.09 <sup>ab</sup>	0.62±0.12 <sup>ab</sup>
F值		12.720	72.490
P值		0.000	0.000

与空白对照组比较,\*P<0.05;与对照组比较,<sup>b</sup>P<0.05;AKT:蛋白激酶 B;p-AKT:磷酸化蛋白激酶 B

分辨率均较高,具备实时成像功能,已被用于临床皮肤病学及神经外科学<sup>[19-21]</sup>。研究结果显示,疏通能显著促进脑梗死区血流量的增加、新生血管网的形成及侧支循环的开放。通过标记 Brdu<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup> 及 Brdu<sup>+</sup>/Laminin<sup>+</sup> 细胞数观察某一段时间内血管内皮细胞增殖,能够反映血管生成水平<sup>[22]</sup>。本研究发现,在脑梗死 7 d 内,疏通可以通过促进血管内皮细胞及基底膜增殖分化,影响血管生成及动脉生成,从而为阻塞动脉供血区的脑组织提供血流代偿;与此相一致,疏通显著抑制小鼠脑梗死后梗死体积扩大,使其感觉运动神经功能获得显著改善。

研究表明,脑梗死后数小时内 VEGF 和其他细胞因子如血小板衍生因子(PDGF)等上调,促进缺血区域血运再通及功能恢复<sup>[23-24]</sup>。VEGF 与其受体 VEGFR-2 结合可激活内皮细胞内酪氨酸激酶,进而激活多重下游信号通路如磷脂酰肌醇 3- 激酶



表 6 2 组小鼠脑梗死灶周边组织 MPO 表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.6 Comparison of myeloperoxidase expression in the peri-infarction tissue between the two groups (*Mean±SD*)

组别	只数	对侧大脑半球	梗死侧大脑半球
对照组	6	0.26±0.09	0.82±0.06
疏血通组	6	0.22±0.09	0.62±0.08
t 值		0.727	4.776
P 值		0.483	0.000

MPO:髓过氧化物酶

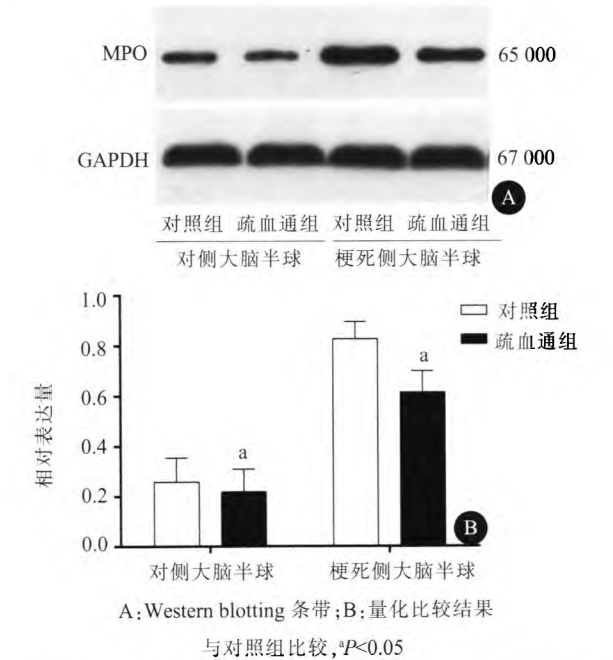


图 7 2 组小鼠脑梗死周边髓过氧化物酶检测结果及量化比较  
Fig.7 Western blotting results and quantitative analysis of myeloperoxidase

(PI3K)/AKT 及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)等,促进血管生成及细胞迁移,同时 PI3K/AKT 也能促进 VEGF 的分泌 [25-26]。也有研究证实通过干预 PI3K/Akt/eNOS/VEGF 信号通路能够促进 eNOS 及 NO 的释放扩张血管,增加血流储备,上调 VEGF 的表达 [27-28]。VEGF/Flt1 介导的细胞迁移也需要 PI3K/Akt 通路的激活[29]。上述研究表明 AKT 在促进血管生成的通路中发挥着重要作用,本研究结果显示,疏血通能够显著促进小鼠脑梗死急性期 AKT 的活化,增加 VEGF 的表达,初步阐释了其影响血管生成及侧支循环形成的机制。

在脑梗死急性期及亚急性期,缺血脑组织中性粒细胞募集增多、活化分泌 MPO,应用 MPO 抑制剂可阻止梗死体积的扩大,促进神经功能恢复,这表明抑制炎症反应同脑梗死临床结局密切相关[30-31]。在本研究中,我们也证实疏血通可显著抑制脑缺血区域中性粒细胞的募集及 MPO 的表达,即抑制中

性粒细胞向脑组织的渗透。

多项研究表明,血管生成与神经再生相互影响、互相依赖,新生血管内皮细胞能够分泌神经营养因子,促进神经干细胞存活及迁移[32]。依据本研究结果推测脑梗死急性期或亚急性期使用疏血通可以促进神经再生,但尚需通过检测神经再生及其与新生血管的关系以进一步证实。本研究表明,疏血通可通过促进血管生成及侧支循环构建增强脑血管储备功能,脑梗死急性期应用疏血通有积极意义。在临床工作中,对于很多短暂性脑缺血发作及新发脑梗死的患者,如能及时给予疏血通治疗,则有可能提高脑血管储备功能,可阻止其发生 / 再发脑梗死或减轻脑梗死严重程度。

参 考 文 献

[1] Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(2): 182-187. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70031-5.

[2] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2012, 125(1): e2-e220. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.

[3] Liu L, Wang D, Wong KS, et al. Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority [J]. Stroke, 2011, 42(12): 3651-3654. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.635755.

[4] Powers WJ, Derdeyn CP, Biller J, et al. 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke regarding endovascular treatment: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. Stroke, 2015, 46(10): 3020-3035. DOI: 10.1161/STR.0000000000000074.

[5] Wang Y, Liao X, Zhao X, et al. Using recombinant tissue plasminogen activator to treat acute ischemic stroke in China: analysis of the results from the Chinese National Stroke Registry (CNSR) [J]. Stroke, 2011, 42 (6): 1658-1664. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.604249.

[6] 刘新通, 王伟, 王丽娟, 等. 伴有颅内动脉狭窄或闭塞的急性脑梗死后侧支循环建立与预后的关系[J]. 中华医学杂志, 2011, 91 (11): 766-768. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.11.013.

Liu XT, Wei W, Wang LJ, et al. Correlation of collateral circulation and prognosis in patients with acute cerebral infarction [J]. Natl Med J China, 2011, 91(11): 766-768. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.11.013.

[7] 张岐平, 陈英道, 李育英, 等. 侧支循环的建立对急性脑梗死患者神经功能及预后的影响 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32 (7): 1040-1043. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.07.002.

Zhang QP, Chen YD, Li YY, et al. Impact of collateral circulation on neurological function and prognosis outcome of patients with acute cerebral infarction [J]. The Journal of Practical Medicine,



- 2016, 32 (7): 1040-1043. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.07.002.
- [8] Bang OY, Saver JL, Kim SJ, et al. Collateral flow predicts response to endovascular therapy for acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2011, 42(3): 693-699. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.595256.
- [9] Liebeskind DS, Tomsick TA, Foster LD, et al. Collaterals at angiography and outcomes in the Interventional Management of Stroke (IMS) III trial[J]. *Stroke*, 2014, 45 (3): 759-764. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004072.
- [10] Jin X, Shen G, Gao F, et al. Traditional Chinese drug ShuXueTong facilitates angiogenesis during wound healing following traumatic brain injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(3): 473-477. DOI: 10.1016/j.jep.2008.02.033.
- [11] Cai L, Huang W, Lin D. Effects of traditional Chinese medicine Shuxuetong injection on random skin flap survival in rats [J]. *Scientific World Journal*, 2014, 2014: 816545. DOI: 10.1155/2014/816545.
- [12] 张璇, 肖兵, 胡长林. 疏血通注射液抗栓、溶栓作用机制的研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(24): 1950-1952. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5302.2005.24.020.
- Zhang X, Xiao B, Hu CL. Study in the mechanism of Shuxuetong injection on antithrombosis and thrombolysis[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(24): 1950-1952. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5302.2005.24.020.
- [13] 李爱华, 龚开政, 严俊峰, 等. 疏血通在防治冠脉内支架植入术后再狭窄中的作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24 (10): 879-881. DOI: 10.3321/j.issn:1003-5370.2004.10.004.
- Li AH, Gong KZ, Yan JF, et al. Effect of Shuxuetong in preventing restenosis after intracoronary stenting [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2004, 24 (10): 879-881. DOI: 10.3321/j.issn:1003-5370.2004.10.004.
- [14] 甄君, 陈涛, 孔梅, 等. 疏血通注射液对急性脑梗死患者血清 NSE 水平及功能恢复的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36 (18): 2584-2587. DOI: 10.4268/cjmm.20111828.
- Zhen J, Chen T, Kong M, et al. Effect of Shuxuetong injection on neuron-specific enolase of serum and recovery of function in patients with acute cerebral infarction[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(18): 2584-2587. DOI: 10.4268/cjmm.20111828.
- [15] Bouet V, Boulouard M, Toutain J, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(10): 1560-1564. DOI: 10.1038/nprot.2009.125.
- [16] Qiu ZD, Deng G, Yang J, et al. A new method for evaluating regional cerebral blood flow changes: Laser speckle contrast imaging in a C57BL/6J mouse model of photothrombotic ischemia [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, 36 (2): 174-180. DOI: 10.1007/s11596-016-1562-2.
- [17] Gupta A, Chazen JL, Hartman M, et al. Cerebrovascular reserve and stroke risk in patients with carotid stenosis or occlusion: a systematic review and meta-analysis[J]. *Stroke*, 2012, 43 (11): 2884-2891. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.663716.
- [18] Doyle KP, Fathali N, Siddiqui MR, et al. Distal hypoxic stroke: a new mouse model of stroke with high throughput, low variability and a quantifiable functional deficit[J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 207(1): 31-40. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.03.003.
- [19] Basak K, Manjunatha M, Dutta PK. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging[J]. *Med Biol Eng Comput*, 2012, 50 (6): 547-558. DOI: 10.1007/s11517-012-0902-z.
- [20] Parthasarathy AB, Weber EL, Richards LM, et al. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study[J]. *J Biomed Opt*, 2010, 15(6): 066030. DOI: 10.1117/1.3526368.
- [21] Ruaro B, Sulli A, Alessandri E, et al. Laser speckle contrast analysis: a new method to evaluate peripheral blood perfusion in systemic sclerosis patients [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73 (6): 1181-1185. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-203514.
- [22] Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, et al. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells[J]. *Circulation*, 2004, 110(13): 1847-1854. DOI: 10.1161/01.CIR.0000142616.07367.66.
- [23] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25 (4): 581-611. DOI: 10.1210/er.2003-0027.
- [24] Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9 (4): 777-794. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00379.x.
- [25] Jesmin S, Mowa CN, Sultana SN, et al. Estrogen receptor alpha and beta are both involved in the cerebral VEGF/Akt/NO pathway and cerebral angiogenesis in female mice[J]. *Biomed Res*, 2010, 31(6): 337-346.
- [26] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 51. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00051.
- [27] Kang Z, Zhu H, Jiang W, et al. Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 113(4): 221-227. DOI: 10.1111/bcpt.12094.
- [28] Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(4): 1749-1753. DOI: 10.1073/pnas.040560897.
- [29] Wang F, Yamauchi M, Muramatsu M, et al. RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (11): 9097-9106. DOI: 10.1074/jbc.M110.165605.
- [30] Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, et al. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(47): 18584-18589. DOI: 10.1073/pnas.0803945105.
- [31] Forghani R, Kim HJ, Wojtkiewicz GR, et al. Myeloperoxidase propagates damage and is a potential therapeutic target for subacute stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(3): 485-493. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.222.
- [32] Ruan L, Wang B, ZhuGe Q, et al. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke [J]. *Brain Res*, 2015, 1623: 166-173. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.02.042.

(收稿日期:2017-08-25)

(本文编辑:张玲)