

# 补阳还五汤及其四类有效部位对脊髓损伤大鼠大脑运动皮质的神经保护作用

黄胜<sup>1,3</sup>,袁莉<sup>1</sup>,陈安<sup>2</sup>,殷坚<sup>2</sup>,潘波<sup>2</sup>,谷陟欣<sup>1</sup>,李亮<sup>2\*</sup>

(1.九芝堂股份有限公司,湖南长沙 410021;2.湖南中医药大学人体解剖学教研室,湖南长沙 410208;

3.海南九芝堂药业有限公司,海南海口 570311)

**[摘要]** **目的** 观察补阳还五汤(BYHWD)及其四类有效部位(生物碱、苷、多糖、苷元)对脊髓损伤(SCI)大鼠大脑运动皮质神经元的影响,探究其神经保护作用的可能机制。**方法** SD雄性大鼠48只,随机分为8组:正常组、假手术组、SCI组、BYHWD组、生物碱组、苷组、多糖组、苷元组。通过在T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub>之间横断右侧半脊髓制备SCI模型,分别于术前1d及术后1d、1w、4w、8w运用BBB评分评定大鼠后肢运动功能;术后8w用TUNEL法检测神经细胞凋亡。**结果** SCI组与药物干预各组BBB评分均明显低于同期正常组、假手术组( $P<0.01$ );术后4w,BYHWD组和生物碱组大鼠的BBB评分高于SCI组( $P<0.05$ );术后8w,BYHWD组、生物碱组和苷组大鼠的BBB评分高于SCI组( $P<0.05$ )。术后8w,SCI组及药物干预各组大鼠细胞凋亡率明显高于正常组和假手术组( $P<0.01$ )。BYHWD组、生物碱组和苷组大鼠的细胞凋亡率低于SCI组( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );生物碱组、苷组、多糖组、苷元组的细胞凋亡率高于BYHWD组( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。**结论** BYHWD具有改善SCI大鼠后肢运动作用,其有效部位中的生物碱、苷可能为起效的主要物质基础,该作用机制可能与拮抗SCI大鼠运动皮质神经元凋亡有关。

**[关键词]** 脊髓损伤;补阳还五汤;运动功能;细胞凋亡

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标识码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.009

## The Neuroprotective Effect of Buyang Huanwu Decoction and its Four Kinds of Active Fractions on Cerebral Motor Cortex in Spinal Cord Injury Rats

HUANG Sheng<sup>1,3</sup>, YUAN Li<sup>1</sup>, CHEN An<sup>2</sup>, YIN Jian<sup>2</sup>, PAN Bo<sup>2</sup>, GU Zhixin<sup>1</sup>, LI Liang<sup>2\*</sup>

(1. Jiuzhitang Co., Ltd, Changsha, Hunan 410021, China; 2. Department of Anatomy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hainan Pharmaceutical Co., Ltd, Haikou, Hainan 570311, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) and its four kinds of active fractions (alkaloid, glycoside, polysaccharide and aglycone) on cerebral motor cortex in spinal cord injury (SCI) rats, and then explore the proper mechanism of the neuroprotection. **Methods** A total of 48 adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into eight groups: control group, sham-operation group, SCI group, BYHWD group, alkaloid group, glycoside group, polysaccharide group and aglycone group ( $n=6$ ). SCI model was performed by cutting the right half spinal cord at the level of T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub>. Motor function of lower limb was assessed with Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale at the following moments respectively: 1 d before operation, and 1 d, 1 w, 4 w and 8 w after operation. Ratio of cell apoptosis in cerebral motor cortex was detected by TUNEL staining after 8w treatment. **Results** Compared with the control group and sham-operation group, the BBB scores in SCI and all medicine intervention groups decreased significantly ( $P<0.01$ ). After four weeks of operation, the BBB scores in BYHWD and alkaloid groups were significantly higher than the SCI group ( $P<0.05$ ). After eight weeks of operation, the BBB scores in BYHWD, alkaloids and glycoside groups were higher than that in SCI group ( $P<0.05$ ). After eight weeks of operation, the ratio of cell apoptosis in SCI and all medicine intervention groups was significantly higher than the normal and sham-operation groups ( $P<0.01$ ). The ratio of cell apoptosis in BYHWD, alkaloid and glycoside groups was lower than that in SCI group ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ); while ratio of cell apoptosis in alkaloid, glycoside, polysaccharide and

**[收稿日期]**2015-12-29

**[基金项目]**国家自然科学基金资助项目(81302899);湖南省科技厅科技计划重点项目(2013SK2023);湖南省中医药科研计划项目(20131111);湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金(2014-37)。

**[作者简介]**黄胜,男,硕士,工程师,从事新药研究与开发。

**[通讯作者]**\*李亮,男,硕士,副教授,E-mail: liliang@hnctcm.edu.cn。

aglycone groups were significantly higher than that in BYHWD group ( $P < 0.01$  or  $< 0.05$ ). **Conclusion** BYHWD can promote the recovery of the motor function in SCI rats. The alkaloids and glycoside may be the most important material base of BYHWD. Its mechanism may be associated with inhibiting neuronal apoptosis of SCI rats

[**Keywords**] spinal cord injury; Buyang Huanwu decoction; motor function; cell apoptosis

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指在各种因素作用下,脊髓内部的传导束出现中断,影响神经信号的上下传递,导致相应躯体运动和感觉功能丧失,是一种严重的中枢神经系统损伤疾病。SCI发生后往往造成损伤节段以下肢体严重的功能障碍<sup>[1]</sup>,受损轴突的修复一直以来是临床治疗和神经科学研究的难点。SCI所致的偏瘫、截瘫或肢体痿软等症,中医上认为属于督脉受损,瘀血阻络,加之患者元气大伤且久卧伤气,多见气虚血瘀之证。文献报道使用益气活血通络名方补阳还五汤(buyang huanwu decoction, BYHWD)治疗SCI有良好的疗效。研究表明,该方中的生物碱、苷、多糖、苷元是其主要有效部位<sup>[2]</sup>,但这四类有效部位在治疗SCI过程中如何发挥神经保护作用尚待进一步研究。本研究通过制作脊髓半横断模型,观察BYHWD及其四类有效部位对SCI大鼠后肢运动功能以及运动皮质神经元凋亡的影响,探讨BYHWD及其有效部位对SCI的神经保护作用,为进一步探索中医药修复SCI的机制提供实验依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 动物 成年清洁级健康雄性SD大鼠48只,体质量200~220 g(湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号:SYXK[湘]2009-0001),饲养环境温度22~25℃,相对湿度50%,自由饮食进水,分笼喂养。

1.1.2 药物 BYHWD制备方法:参照《医林改错·瘫痿论》原方,由黄芪120 g,当归尾9 g,赤芍4.5 g,川芎3 g,地龙3 g,桃仁3 g,红花3 g组成。上述药材符合《中华人民共和国药典》2010年版一部质量要求。原方加水回流提取2次,第一次加10倍水提取2 h,第二次加8倍水提取1.5 h,药液过滤、合并浓缩成浸膏每g含生药2 g,蒸馏水溶解成浓度1 g/mL,4℃保存备用。四类有效部位制备方法:制备原方提取液,采用酸碱沉淀、离子交换树脂层析等方法提取生物碱、苷、多糖和苷元4类有效部位,各有效部位分离完全,相互之间无混杂,纯度70%以上。以高效液相色谱法和化学分析方法测定各有效部位中质控物的含量,对各有效部位进行质量控制。用时以蒸馏水配成质量浓度为生物碱6.63 mg/mL,苷42.17 mg/mL,多糖25.87 mg/mL,苷元2.08 mg/mL(均为相同生药量)。

1.1.3 试剂及仪器 BYHWD以及4类有效部位(由九芝堂股份有限公司制备);细胞凋亡TUNEL原位检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);振动切片机(德国徕卡公司)。

1.1.4 动物分组及给药 大鼠随机分为8组:正常组、假手术组(等体积生理盐水)、SCI组(等体积生理盐水)、BYHWD组(12.82 g生药/kg)、生物碱组(66.3 mg/kg)、苷组(421.7 mg/kg)、多糖组(258.7 mg/kg)和苷元组(20.8 mg/kg)。假手术组、SCI组、BYHWD组、生物碱组和苷组腹腔注射给药;苷元组和多糖组灌胃给药(苷元和多糖不溶于水)。给药体积均为10 mL/kg,1次/d,连续8 w。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠SCI模型的制备 大鼠以10%水合氯醛0.3 mL/100 g腹腔注射麻醉,俯卧位固定在手术台上,剪去项背部毛大约5 cm×3 cm。皮肤消毒后作长约4 cm的纵行切口,依次切开各层皮下组织,显微器械分开棘突两侧竖脊肌,确定T<sub>2</sub>棘突,在其右侧充分暴露T<sub>3</sub>和T<sub>4</sub>椎板。用虹膜剪轻轻剪开T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub>之间的黄韧带,成功暴露椎管内的脊髓硬膜,剪开硬膜,暴露脊髓,用12号手术刀片横断脊髓右侧半<sup>[3]</sup>,动物苏醒后右侧下肢瘫痪作为造模成功的标志。假手术组只在T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub>之间剪开黄韧带,保留硬脊膜的完整性,缝合伤口。

1.2.2 BBB评分法评定后肢运动功能 参照Basso等<sup>[4]</sup>提出的大鼠SCI后功能评判标准(BBB评分法),于术前1 d及术后1 d、1 w、4 w、8 w对各实验动物后肢的运动功能进行评分。后肢全部瘫痪为0分,完全正常行走为21分。为尽量避免评分的主观性,分别由掌握评分标准的3人进行盲评,取其均值进行统计学处理。

1.2.3 脑片的制备 大鼠存活8 w后再次麻醉,开胸灌注固定,快速取脑。在视交叉和大脑后极处各做一冠状切面,弃两头,留中间部分竖立粘于振动切片机的样品托上,5 min后将样品托固定于盛满PBS的切片台中,确保标本全部浸泡于PBS中。调整刀片角度至18°,通过控制台调整刀片前进速度为0.5 mm/s,振幅2 mm,切片厚度30 μm,选择自动切片。将所有脑片收集于24孔板中用于TUNEL染色检测。

1.2.4 TUNEL染色检测细胞凋亡 将切片加入1% Triton X-100通透液5 min室温促渗,PBS清洗

5 min×3次;3%过氧化氢封闭10 min,PBS清洗5 min×3次;滴加TdT酶反应液37℃避光反应1 h,PBS清洗5 min×3次;Streptavidin-HRP 37℃避光反应30 min,PBS清洗5 min×3次;DAB显色,复染,观察神经元凋亡情况。凋亡细胞结果判定:胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。计数方法:每只动物取4张切片,每张切片在大脑运动皮质M1区高倍视野(×200)下计算每个视野计数阳性细胞占总细胞的比例,取平均值代表该张切片细胞凋亡率。

1.2.5 统计学方法 统计各组数据,结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。实验数据用SPSS 17.0统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析。数据均进行方差齐性检验,若方差齐采用Fisher法,若方差不齐采用近似F检验。以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别表示差异有统计学意义和高度统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠后肢肢体BBB评分结果

SCI后大鼠都伴有大便困难、硬结等情况。假手术组大鼠术后行走轻度异常,术后1 d完全恢复正常;SCI组及药物干预各组大鼠损伤平面以下右侧后肢完全瘫痪。SCI组与药物干预各组BBB评分均明显低于同期正常组与假手术组,差异有统计学意义( $P<0.01$ );术后1 d、1 w药物干预各组与SCI组大鼠BBB评分相比未见明显差异( $P>0.05$ );术后4 w,BYHWD组和生物碱组大鼠的BBB评分高于SCI组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );术后8 w,BYHWD组、生物碱组和苷组大鼠的BBB评分高于SCI组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 各组大鼠不同时间点后肢体BBB评分比较

| 组别     | n | 术前1 d      | 术后1 d       | 术后1 w       | 术后4 w                | 术后8 w                |
|--------|---|------------|-------------|-------------|----------------------|----------------------|
| 正常组    | 6 | 21.00±0.00 | 21.00±0.00  | 21.00±0.00  | 21.00±0.00           | 21.00±0.00           |
| 假手术组   | 6 | 21.00±0.00 | 21.00±0.00  | 21.00±0.00  | 21.00±0.00           | 21.00±0.00           |
| SCI组   | 6 | 21.00±0.00 | 2.69±0.76** | 3.54±0.43** | 3.66±0.65**          | 3.98±0.86**          |
| BYHWD组 | 6 | 21.00±0.00 | 2.77±0.81** | 3.89±0.72** | 4.61±0.59** $\Delta$ | 5.12±0.76** $\Delta$ |
| 生物碱组   | 6 | 21.00±0.00 | 2.97±0.72** | 3.87±0.69** | 4.42±0.42** $\Delta$ | 4.86±0.98** $\Delta$ |
| 苷组     | 6 | 21.00±0.00 | 2.89±0.63** | 3.65±0.61** | 3.87±0.50**          | 4.66±0.61** $\Delta$ |
| 多糖组    | 6 | 21.00±0.00 | 2.65±0.85** | 3.77±0.59** | 3.76±0.43**          | 4.12±0.33**          |
| 苷元组    | 6 | 21.00±0.00 | 2.84±0.69** | 3.43±0.79** | 3.90±0.63**          | 4.08±0.45**          |

注:与正常组、假手术组相比,\*\* $P<0.01$ ;与SCI组相比, $\Delta P<0.05$ 。

### 2.2 大鼠大脑运动皮质M1区神经细胞凋亡率结果

术后8 w正常组与假手术组大鼠大脑运动皮质M1区可见少量散在的TUNEL阳性细胞;SCI组及药物干预各组大鼠可见较多TUNEL阳性细胞(图1),与正常组和假手术组相比细胞凋亡率有统计学意义( $P<0.01$ )。BYHWD组、生物碱组和苷组大鼠的细胞凋亡率低于SCI组,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );但生物碱组、苷组、多糖组、苷元组的细胞凋亡率高于BYHWD组,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。见表2。

表2 术后8 w各组大鼠神经细胞凋亡率比较 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

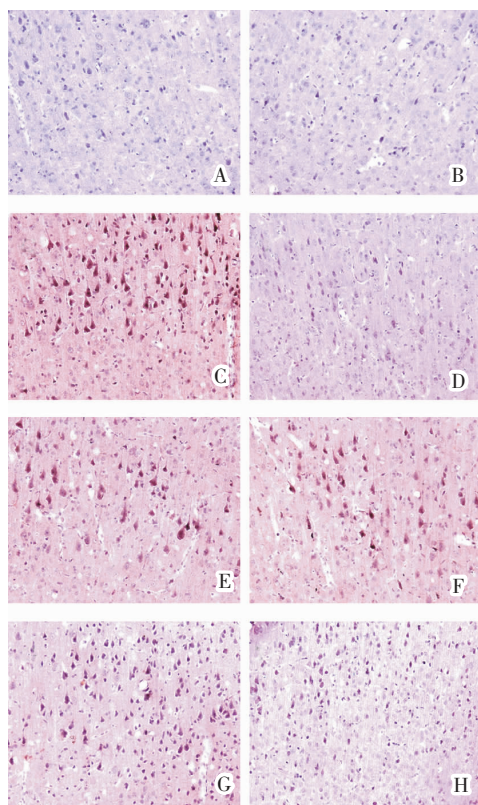
| 组别     | n | 术后8 w                                   |
|--------|---|-----------------------------------------|
| 正常组    | 6 | 1.66±0.32                               |
| 假手术组   | 6 | 1.73±0.30                               |
| SCI组   | 6 | 30.13±5.65**                            |
| BYHWD组 | 6 | 15.22±4.72** $\Delta\Delta$             |
| 生物碱组   | 6 | 20.13±6.63** $\Delta\Delta\Delta\Delta$ |
| 苷组     | 6 | 25.75±5.87** $\Delta\Delta\Delta\Delta$ |
| 多糖组    | 6 | 28.34±4.98** $\Delta\Delta$             |
| 苷元组    | 6 | 29.30±6.65** $\Delta\Delta$             |

注:与正常组、假手术组相比,\*\* $P<0.01$ ;与SCI组相比, $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$ ;与BYHWD组相比, $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$ 。

## 3 讨论

SCI通常伴有终身残疾,严重影响患者的生活质量。这既给患者本人带来身体和心理的严重伤害,还会对整个社会造成巨大的经济负担<sup>[5]</sup>。外伤性SCI的发展会经历2个阶段,即原发性损伤和继发性损伤。有报道证实,细胞凋亡在动物模型和人类组织中的继发性损伤中起着举足轻重的作用<sup>[6]</sup>。但

关于SCI后相应大脑运动皮质神经元发生何种病理变化却存在不同观点<sup>[6-7]</sup>。在SCI后大脑运动皮质神经元发生继发性逆行性病理改变(如凋亡、死亡等),即使脊髓中受损轴突能够再生或结构功能重建,损伤平面以下的运动功能也不可能完全恢复,因此诸多学者对此进行大量研究。刘亚东等<sup>[8]</sup>应用TUNEL法对SCI后大脑运动皮质区神经元凋亡检查,并检



注:正常组(A)、假手术组(B)偶见神经凋亡细胞,SCI组(C)可见大量神经凋亡细胞,BYHWD组(D)神经凋亡细胞明显减少,生物碱组(E)、苷组(F)神经凋亡细胞比SCI组减少,多糖组(G)、苷元组(H)仍可见大量神经凋亡细胞。

图1 TUNEL染色显示细胞凋亡情况( $\times 200$ )

测该区域神经元诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,发现大鼠SCI后大脑运动皮质区神经元凋亡增加,这可能与iNOS的表达增加有关。团队前期<sup>[9]</sup>通过横断红核脊髓束(rubrospinal tract,RST)制作SCI模型,发现SCI后受损部位在轴突,但其对应的神经元胞体会发生萎缩甚至坏死,当使用黄芪注射液干预后,红核神经元的数目和平均截面积显著提高,说明黄芪注射液能够提高RST横断后红核神经元胞体的存活率。

SCI可归属中医“气虚血瘀”证范畴<sup>[10]</sup>。中医理论认为中枢神经系统损伤所致的功能障碍,如半身不遂、口眼歪斜、语言蹇涩、口角流涎等,多为督脉受损,正气亏虚,瘀血阻滞,经络气血不通,筋脉肌肉失养所致。既有正气亏虚之征,又有气虚血瘀之象<sup>[11]</sup>。治疗上,自古医家多运用益气活血、扶正祛邪、祛瘀通络之法。补阳还五汤由生黄芪、川芎、地龙、当归尾、桃仁、红花、赤芍等7味药物组成,具有补气活血、祛瘀通络功效,原用于气虚血瘀型中风,近来发现对SCI疗效较好<sup>[12]</sup>。随着研究的深入,发现BYHWD中生物碱、苷、多糖和苷元可通过抑制Caspase-1、Caspase-3蛋白的表达,拮抗脑缺血后神经元凋亡,为其抗缺血性脑损伤的主要物质基础<sup>[13]</sup>。既然如此,

那这四类物质是否能在SCI后起到神经保护的作用?因此本研究采用BYHWD及其有效部位对SCI进行干预。结果显示术后4w,BYHWD组和生物碱组大鼠的BBB评分高于SCI组;术后8w,BYHWD组、生物碱组和苷组大鼠的BBB评分高于SCI组,表明BYHWD及其有效部位中的生物碱、苷可以改善SCI后大鼠后肢功能。且术后8w将动物处死后,BYHWD组、生物碱组和苷组大鼠的运动皮质细胞凋亡率低于SCI组,这说明其神经保护作用的机制可能与拮抗SCI大鼠运动皮质神经元凋亡有关,由此证实生物碱、苷可能为其改善后肢运动功能的主要物质基础。然而本研究仍需对BYHWD及其有效部位对细胞凋亡具体机制进行进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Dimitrijevic MR, Danner SM, Mayr W. Neurocontrol of Movement in Humans With Spinal Cord Injury[J]. *Artif Organs*, 2015, 39(10): 823-833.
- [2] Zheng J, Wan Y, Chi J, et al. The active principle region of Buyang Huanwu decoction induced differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neural-like cells: Superior effects over original formula of Buyang Huanwu decoction[J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(4): 261-267.
- [3] Chen A, Wang H, Zhang JW, et al. BYHWD rescues axotomized neurons and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 117(3): 449-454.
- [4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [5] Liu D, Huang Y, Jia C, et al. Administration of antagomir-223 inhibits apoptosis, promotes angiogenesis and functional recovery in rats with spinal cord injury[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(4): 483-491.
- [6] Zhang H, Wu F, Kong X, et al. Nerve growth factor improves functional recovery by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 130.
- [7] Lee BH, Lee KH, Kim UJ, et al. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain [J]. *Brain Res*, 2004, 1020(1/2): 37-44.
- [8] 刘亚东,陈学明,于振山,等.大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质神经元凋亡的观察[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2013,23(6):546-551.
- [9] 李亮,杨萍,张薇,等.黄芪注射液对大鼠红核神经元逆行演变的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2014,27(6):446-449.
- [10] 董贤慧,谢红林,贺小平,等.补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓组织caspase-3表达的影响[J]. *广东医学*, 2015,36(1):55-56.
- [11] 钟诚,李宇明.脊髓损伤的中医认识与实验研究概况[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015,35(10):66-69.
- [12] 贺小平,董贤慧,赵静怡,等.不同剂量补阳还五汤对脊髓损伤大鼠后肢运动功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014,34(22):6391-6393.
- [13] 陈瑞芬,邓常青,陈北阳,等.补阳还五汤四类有效部位对大鼠脑缺血再灌注后Caspase表达的作用[J]. *中医药导报*, 2009,15(6):5-7.