

红景天苷对急性脑出血大鼠神经功能缺损评分与脑含水量的影响及其作用机制研究



赵 辉,白玉彦,温桂莲,赵 艺

摘要:目的 探讨红景天苷对脑出血(ICH)大鼠神经功能缺损评分与脑含水量的影响,并探讨其可能的机制。方法 将75只大鼠随机分为5组,假手术组(Sham)、脑出血组(ICH)、药物低剂量组(Sal-L)、药物中剂量组(Sal-M)和药物高剂量组(Sal-H),每组15只,建立脑出血大鼠模型,药物低剂量组、药物中剂量组和药物高剂量组分别给予红景天苷灌胃10 mg/kg、20 mg/kg和40 mg/kg,每日1次,共给药10 d。对各组大鼠进行神经功能缺损评分;称重法计算脑含水量;商业试剂盒检测脑组织中髓过氧化物酶(MPO)活性;免疫印迹法与RT-PCR分别检测脑血肿组织周围缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白与mRNA表达。结果 采用红景天苷处理后,脑出血大鼠的神经功能缺损评分明显低于无药物处理的大鼠,脑含水量明显下降,脑组织中MPO活性明显下降;脑血肿组织周围的HIF-1 α 和VEGF蛋白与mRNA表达明显上调。结论 红景天苷具有保护急性脑出血大鼠脑组织的作用,可能与红景天苷能够上调脑血肿组织周围HIF-1 α 和VEGF因子表达有关。

关键词:脑出血;红景天苷;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;神经功能缺损评分;脑含水量

中图分类号: R743 R285.5 **文献标识码:** A **doi:** 10.12102/j.issn.1672-1349.2019.03.012

Effect of Salidroside on Neurological Deficit Score and Brain Water Content in Rats with Acute Intracerebral Hemorrhage and Its Mechanism

ZHAO Hui, BAI Yuyan, WEN Guilian, ZHAO Yi

Nanyang City Central Hospital, Nanyang 473000, Henan, China

Abstract: Objective To investigate the effect of salidroside on intracerebral hemorrhage (ICH) and to explore the possible mechanism. **Methods** Seventy-five rats were randomly divided into 5 groups: sham group, ICH group, low dosage treatment group, medium dosage treatment group and high dosage treatment group. After establishing ICH model, rats were received 10 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg Salidroside by gavage once a day for 10 days. The neuronal function impairment of rats was scored and the brain water content was measured. The myeloperoxidase (MPO) activity in brain was determined. Moreover, the protein and mRNA expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in brain hematoma tissues were detected by western blotting and RT-PCR, respectively. **Results** After Salidroside treatment, the score of neuronal function impairment was lower than ICH rats without treatment. In addition, the brain water content and MPO activity were significantly decreased after Salidroside administration, whereas the protein and mRNA expression of HIF-1 α and VEGF in brain hematoma tissues were increased. **Conclusion** Salidroside can exert protective effects on brain tissues in ICH rats. These effects may be through increasing HIF-1 α and VEGF expression in brain hematoma tissues.

Keywords: intracerebral hemorrhage; salidroside; hypoxia inducible factor 1 α ; vascular endothelial growth factor; neurological deficit score; brain water content

脑出血(ICH)是一种发病急,病情危重的疾病,其致残率和致死率非常高,严重影响人类的健康和生存质量。脑出血后再血肿形成过程中以及形成后,均存在水肿和炎症反应,对脑组织造成了进一步的损伤^[1]。目前脑出血治疗缺乏有效手段,临床上主要采用降颅压、神经营养药物或者手术清除血肿等方式,但是由于脑出血后血肿周围组织损伤机制尚未清晰,所以尚未有特异的治疗方法。

红景天苷是中药红景天中最重要的有效成分之一。近年来人们对红景天进行了广泛的研究,发现其具有多种药理作用,如抗疲劳,防癌,促进血液循环,清除体内毒素等^[2]。国内学者研究发现,红景天苷能够增加缺血脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽

过氧化物酶(GSH)的含量,加速清除超氧阴离子自由基,降低脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量,具有减轻缺血脑组织乳酸中毒的作用^[3]。本研究通过建立脑出血大鼠模型,研究红景天苷对脑出血大鼠脑组织是否具有保护作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠75只,雄性,SPF级,体重230~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于恒温恒湿环境中,常规饲料,自由饮水进食,昼夜各12 h,进行适应性饲养1周。

1.2 实验试剂 红景天苷(Salidroside)购自上海晶都生物技术有限公司;髓过氧化物酶(MPO)活性测定试剂盒购自Sigma-Aldrich公司;缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)与血管内皮生长因子(VEGF)抗体购自Santa cruz公司; β -actin抗体购自碧云天技术公司。

1.3 实验分组 按随机数字表法将大鼠分为5组,每组15只。假手术组(Sham)、脑出血组(ICH)、药物低剂量组(Sal-L)、药物中剂量组(Sal-M)和药物高剂

作者单位 南阳市中心医院(河南南阳 473000), E-mail: 3163067814@qq.com

引用信息 赵辉,白玉彦,温桂莲,等.红景天苷对急性脑出血大鼠神经功能缺损评分与脑含水量的影响及其作用机制研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(3):368-371.

量组(Sal-H)。建立脑出血大鼠模型成功后,药物低剂量组、药物中剂量组和药物高剂量组分别给予红景天苷灌胃 10 mg/kg、20 mg/kg 和 40 mg/kg,每日 1 次,共给药 10 d,假手术组与脑出血组分别给予等量生理盐水灌胃,每日 1 次,共给予 10 d。

1.4 脑出血大鼠模型建立 所有大鼠术前 12 h 禁食,6 h 禁水,腹腔注射 1% 氯胺酮(30 mg/kg)进行麻醉,俯卧固定在立体定位仪上,大鼠前囟点与人字点在同一水平面,暴露颅骨,以前囟为原点,往后 0.2 mm,左 3 mm 为穿刺点,牙科钻垂直钻穿颅骨,用微量进样针吸取 2.5 μL VII 型胶原酶,从钻孔点进针,深度约为 6 mm,缓缓注入后,留针约 5 min,推针,缝合。假手术组除不注射 VII 型胶原酶,其他操作同上。

1.5 神经功能缺损评分 建模成功的评分标准参照 Longa 方法^[4],分为 5 级:正常活动,无神经功能缺损记 0 分;瘫痪侧前肢不能充分伸展计 1 分;大鼠有向瘫痪侧旋转的行为计 2 分;向瘫痪侧倾倒计 3 分;无法自发行走,意识丧失计 4 分;对麻醉清醒后的大鼠进行神经功能评分。1~3 分为造模成功,0、4 分为造模不成功。

1.6 脑含水量 给药结束后,戊巴比妥腹腔注射过量麻醉,断头,快速取脑,去除嗅球、小脑、脑干和软脑膜后,迅速称量湿重,在 95~100 °C 烤箱烘烤 24 h 至恒重,称量干重,计算脑组织脑含水量。

1.7 MPO 活性测定 给药结束后,过量麻醉,断头,快速取脑组织,匀浆,取上清液,严格按照 MPO 试剂盒说明书要求,在 25 °C 分光光度计 460 nm 波长处测定 MPO 活性,即每分钟降解 1 μmol 时所需要过氧化物的量。

1.8 免疫印迹法检测相关蛋白表达 末次给药后,过量麻醉处死大鼠,剪取大鼠血肿周围脑组织,加入裂解液于冰上裂解 30 min,12 000 r/min,4 °C 离心 5 min,

收集细胞,提取细胞总蛋白并定量,调整蛋白量。取等量裂解产物,上样,进行 12% SDS-PAGE 电泳。转膜,5% 脱脂奶粉室温放置 1 h,将膜于一抗中孵育 4 °C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入对应二抗,37 °C 孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,ECL 化学发光法显色,运用 Image J 图像分析系统对每个条带进行灰度分析。

1.9 实时荧光定量 PCR 获得大鼠血肿周围脑组织后,匀浆,严格按照说明书操作,加入 1 mL Trizol 试剂,室温放置 5 min,12 000 r/min,4 °C 离心 10 min,提取总 RNA,逆转录酶催化合成 cDNA,以 cDNA 为模板在聚合酶催化下进行 PCR 反应,HIF-1α 引物:上游 5'-CTTTCTTGAAACGAGTGAAAGG-3',下游 5'-TGAGTAATTCTTCACCCTGCAG-3';VEGF 引物:上游 5'-ATGAACTTTCTGCTGTCTTGG-3',下游 5'-TCACCG CCTCGGCTTGTGACA-3';GADPH 引物:上游 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3',下游 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。94 °C 43 s,61 °C 40 s,72 °C 50 s,共 34 个循环,实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比,目标基因的相对定量用^{2-ΔΔCT}计算。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据间比较采用单因素方差分析,两组间数据采用 Benferoni 校正的 t 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分 造模完成后,仅脑出血组出现 2 只大鼠死亡,已补充。脑出血组与给药组大鼠神经功能缺损评分均明显高于假手术组(P < 0.05);红景天苷各剂量组神经功能缺损评分低于脑出血组(P < 0.05),但高于假手术组。详见表 1。

表 1 各组神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模后 0 d	给药后 5 d	给药后 10 d	给药后 15 d
Sham 组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ICH 组	10	2.90±0.13 ¹⁾	2.80±0.14 ¹⁾	2.80±0.16 ¹⁾	2.70±0.17 ¹⁾
Sal-L 组	10	2.70±0.16 ¹⁾²⁾	2.40±0.10 ¹⁾²⁾	2.30±0.14 ¹⁾²⁾	2.10±0.12 ¹⁾²⁾
Sal-M 组	10	2.80±0.16 ¹⁾²⁾	2.20±0.11 ¹⁾²⁾	2.00±0.13 ¹⁾²⁾	1.80±0.12 ¹⁾²⁾
Sal-H 组	10	2.70±0.17 ¹⁾²⁾	2.10±0.13 ¹⁾²⁾	1.80±0.14 ¹⁾²⁾	1.60±0.11 ¹⁾²⁾

与 Sham 组比较,1) P < 0.05;与 ICH 组比较,2) P < 0.05

2.2 各组大鼠脑含水量的变化 脑出血组大鼠脑含水量(85.25±0.68)%明显高于假手术组的(73.82±0.49)%;给予红景天苷处理后的大鼠脑含水量明显低

于脑出血组大鼠(P < 0.05),药物低剂量组大鼠为(81.77±0.72)%,药物中剂量组大鼠为(78.29±0.68)%,药物高剂量组为(75.97±0.51)%,随药物剂

量增大脑含水量逐渐下降。

2.3 各组大鼠脑组织中 MPO 活性变化 脑出血组与给药组大鼠脑组织中的 MPO 活性在给药 5 d 后达到峰值, 随时间延长而略有下降, 红景天苷处理后的大鼠脑组织中 MPO 活性显著低于脑出血组 ($P < 0.05$), 并随药物剂量增大, 而 MPO 活性降低。详见表 2。

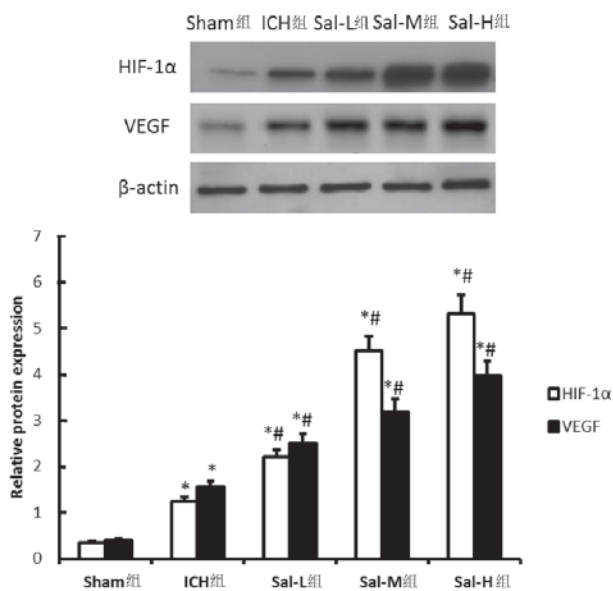
表 2 各组大鼠脑组织中 MPO 活性比较 ($\bar{x} \pm s$) U/g

组别	只数	给药后 10 d
Sham 组	10	0.37 ± 0.02
ICH 组	10	3.93 ± 0.45 ¹⁾
Sal-L 组	10	3.28 ± 0.31 ¹⁾²⁾
Sal-M 组	10	2.77 ± 0.22 ¹⁾²⁾
Sal-H 组	10	2.21 ± 0.32 ¹⁾²⁾

与 Sham 组比较, 1) $P < 0.05$; 与 ICH 组比较, 2) $P < 0.05$

2.4 脑血肿周围组织 HIF-1 α 和 VEGF 的蛋白表达

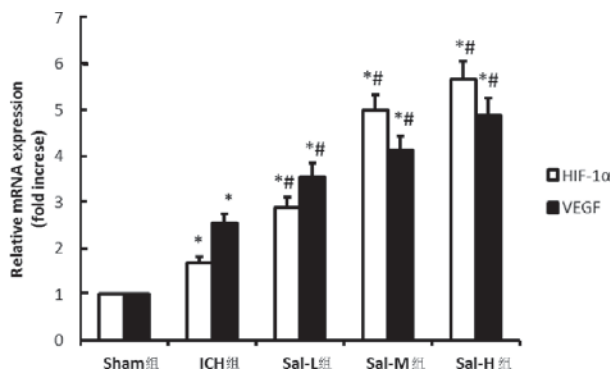
脑出血组大鼠脑血肿组织的 HIF-1 α 和 VEGF 的蛋白表达明显高于假手术组 ($P < 0.05$), 采用红景天苷干预后的 HIF-1 α 和 VEGF 的蛋白表达显著高于脑出血组, 差异具有统计学意义, 并随药物剂量增加而表达上调。详见图 1。



与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 ICH 组相比, # $P < 0.05$

图 1 各组大鼠脑血肿周围组织 HIF-1 和 VEGF 的蛋白表达 ($n = 6$)

2.5 脑血肿周围组织 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 表达 脑出血组大鼠脑血肿组织的 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 表达明显高于假手术组 ($P < 0.05$), 采用红景天苷干预后的 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 表达明显高于脑出血组, 差异具有统计学意义。详见图 2。



与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 ICH 组相比, # $P < 0.05$

图 2 各组大鼠脑血肿周围组织 HIF-1 和 VEGF 的 mRNA 表达 ($n = 6$)

3 讨论

本实验通过注射 VII 型胶原酶成功建立脑出血大鼠模型, 采用给予不同剂量的红景天苷, 发现大鼠的神经功能缺损评分明显低于不给药的大鼠, 同时脑含水量下降, 推断红景天苷对急性脑出血大鼠脑组织具有一定的保护作用。

髓过氧化物酶又称过氧化物酶, 是血红素辅基的血红素蛋白酶, 具有还原过氧化氢的作用, 在成熟的粒细胞中, 约占总蛋白质含量的 5%, 因此 MPO 活性可以用来测定中性粒细胞的数目。急性脑出血的早期会出现白细胞与中性粒细胞含量的升高, 而研究表明白细胞与中性粒细胞计数的增高提示病情严重, 预后差^[5]。本研究结果显示, 急性脑出血大鼠脑组织中 MPO 的活性显著上升, 并随时间延长而略有下降, 经过红景天苷处理后, 大鼠脑组织中 MPO 明显低于脑出血大鼠, 提示红景天苷可能对于脑出血炎症具有一定程度的抑制作用。

缺氧诱导因子-1 α 是受乏氧调节的亚基, 对缺氧和常氧产生不同的生物效应, 在正常状态下组织几乎不表达, 但在低氧状态下, HIF-1 α 的表达增高, 并与缺氧程度与缺氧时间相关^[6]。HIF-1 α 的阳性表达率随脑出血时间延长而增加^[7], 另外有调查指出缺氧诱导生成的 HIF-1 α 具有保护脑组织损害的作用^[8]。本实验结果显示, 脑出血大鼠脑组织中 HIF-1 α 的表达明显增加, 而采用红景天苷处理后, 血肿周围脑组织中 HIF-1 α 的表达显著高于脑出血组, 推测出现脑出血后机体中的 HIF-1 α 会上调, HIF-1 α 具有保护脑组织免受损害的作用, 提示红景天苷对脑出血后脑组织的损伤具有保护作用。

血管内皮生长因子是 HIF-1 α 的目的基因, 能增加微血管与小静脉血管的通透性。在血管形成之前, VEGF 对神经系统具有直接的保护作用, 研究表明具有一定的促神经再生作用, 在脑缺血灶周脑组织中

VEGF 的表达显著上升,微血管密度显著增加,有效改善缺血半暗带的血块^[9]。本实验结果显示,采用红景天苷处理后,脑出血大鼠血肿周围脑组织的 VEGF 表达明显高于未处理大鼠,推测红景天苷通过上调 VEGF 的表达,改善微血管与小静脉血管的通透性,促进微血管新生,从而保护脑出血损伤的脑组织。

参考文献:

[1] ARSIONW T D, LU A G, WANG K R, et al. Glutamate receptor blockade attenuates glucose hypometabolism in perhematomal brain after experimental intracerebral hemorrhage in rat [J]. Stroke, 2004, 35(11): 2587 - 2591.

[2] 韩雪娇, 郭娜, 朱美宣, 等. 红景天苷药理作用及其作用机理研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 171 - 175.

[3] 郭芳, 吕平, 李树民. 大鼠全脑缺血再灌注损伤神经元 Na⁺, K⁺ ATP 酶亚基的变化 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(18): 1675 - 1678.

[4] LONGA Z, WEINSTEIN P R, CARVLSON S, et al. Reversible mid-

dle cerebral artery occlusion without cranialotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 17.

[5] 王金娥. 急性脑出血患者白细胞增高的临床意义 [J]. 卒中与神经疾病, 1999, 6(1): 54 - 55.

[6] FERNÁNDEZ - TORRES J, ZAMUDIO - CUEVAS Y, MARTÍNEZ - NAVA G A, et al. Hypoxia - inducible factors (HIFs) in the articular cartilage: a systematic review [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(12): 2800 - 2810.

[7] 姜季宇, 王爱岳, 李强. 低氧诱导因子-1 α 在大鼠脑出血灶周的表达 [J]. 实用神经疾病杂志, 2005, 8(4): 1 - 2.

[8] 安立新, 王保国, 彭宇明, 等. 停通气缺氧预处理脑出血模型大鼠缺氧诱导因子-1 α 的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2006, 27(5): 576 - 580.

[9] HADJIPANAYI E, CHEEMA U, HOPFNER U, et al. Injectable system for spatio - temporally controlled delivery of hypoxia - induced angiogenic signaling [J]. J Control Release, 2012, 161(3): 852 - 860.

(收稿日期: 2017 - 08 - 28)

(本文编辑 王雅洁)

活血降脂胶囊对高脂血症大鼠血脂和脂肪肝调脂的机制研究

卫 治, 李 涛, 许 瑞, 李小军



摘要:目的 评价复方制剂活血降脂胶囊对高脂血症大鼠血脂水平调节的有效性、对脂肪肝的疗效以及可能的调脂机制。方法 选取 SD 雄性雌性大鼠共 57 只, 分为空白组 (12 只) 和模型组 (45 只)。空白组给予普通饲料喂养, 模型组给予高脂饮食喂养, 建立高脂模型组, 造模成功后将 45 只模型组大鼠随机分为高脂模型组、辛伐他汀片组、活血降脂胶囊组, 给予相应药物。周期结束后取腹主动脉采血测定总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL - C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL - C) 指标, 观察肝脏病理改变, 运用免疫组化测定肝脏载脂蛋白的表达情况。**结果** 活血降脂胶囊组 TC、TG、LDL - C 与模型组相比下降明显 ($P < 0.05$), 且与辛伐他汀片组疗效相当; 活血降脂胶囊对脂肪肝的病理改变有明确的改善作用; 活血降脂胶囊使肝脏载脂蛋白 A 表达增强。**结论** 中药复方制剂活血降脂胶囊调脂效果明确, 对脂肪肝有较好治疗效果, 其调脂机制可能与增强肝脏载脂蛋白 A 表达有关。

关键词: 活血降脂胶囊; 载脂蛋白; 血脂; 脂肪肝; 辛伐他汀; 大鼠

中图分类号: R589 R285.5 **文献标识码:** A **doi:** 10.12102/j.issn.1672-1349.2019.03.013

心脑血管病是危害人类健康的常见病和多发病, 其以高发病率、高复发率、高致残率、高死亡率受到医学界的广泛关注。动脉粥样硬化是导致脑血管疾病的重要原因, 而血脂异常是动脉粥样硬化最重要的危险因素之一, 积极调节血脂可减轻动脉粥样硬化的程度, 最终达到减少心脑血管疾病的发生率、复发率及死亡率的目的, 减轻病人的思想及经济负担, 提高生活质量。目前很多调脂药物的不良反应限制了它们在临床的应用。活血降脂胶囊为山西省中医院中药复方制剂, 应用 20 年来, 临床效果好, 不良反应小。本研究观

察活血降脂胶囊对血脂水平的影响, 为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 高脂饲料 北京华卓康生物科技股份有限公司提供, 主要成分: 78.8% 基础饲料、1% 胆固醇、10% 蛋黄粉、10% 猪油和 0.2% 的胆盐, 批号: 11003800007181, 许可证号: SCXK(京)2014 - 0008。

1.2 主要药物与试剂 活血降脂胶囊, 由山西省中医药研究院制剂室提供; 辛伐他汀片 (杭州默沙东制药有限公司), 规格: 20 mg, 批准文号: 国药准字 J20130068; 正常兔血清封闭液, 武汉博士德生物工程有限公司; 山羊 IgG, 武汉博士德生物工程有限公司; 生物素化兔抗山羊 IgG, 武汉博士德生物工程有限公司; SABC 免疫组化染色试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; DAB 显色试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂包括: 粘片剂 APES (武汉博士德生物工程有限公司); 30% H₂O₂; 蒸馏水; 0.01 mmol/L 枸橼

基金项目 山西省卫生计生委科研课题 (No.2014090)

作者单位 山西省中医院 (太原 030012)

通讯作者 李小军, E-mail: sxswstwt@163.com

引用信息 卫治, 李涛, 许瑞, 等. 活血降脂胶囊对高脂血症大鼠血脂和脂肪肝调脂的机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(3): 371 - 374.