

三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究

唐婧姝¹,裴清华^{2*}

(1. 北京大学医学部,北京 100191;2. 北京中医药大学第三附属医院,北京 100029)

[摘要] 目的:探讨三七总皂苷对脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制。方法:SD 大鼠分成假手术组,模型组,三七总皂苷组。模型组和三七总皂苷组采用线栓法建立大鼠大脑中动脉局灶缺血再灌注损伤模型,三七总皂苷组在缺血前 15 min 和缺血后 6 h 分别 ip 三七总皂苷 100 mg·g⁻¹,模型组 ip 等量生理盐水。术后 24 h 评价神经行为学变化,测定脑梗死体积,脑组织中伊文思蓝含量及白介素-β(IL-1β),肿瘤坏死因子 α(TNF-α),白介素-6(IL-6),白介素-8(IL-8)水平。结果:三七总皂苷可有效降低脑缺血再灌注损伤大鼠的脑梗死体积,明显减轻脑缺血区血脑屏障破坏的程度。三七总皂苷组脑组织中细胞因子及伊文思蓝的含量较缺血再灌注组显著降低(P<0.05)。结论:三七总皂苷对脑缺血再灌注损伤有显著的脑保护作用,其作用机制与降低脑缺血再灌注损伤中脑部细胞因子的表达和降低血脑屏障通透性有关。

[关键词] 三七总皂苷;脑缺血再灌注;细胞因子;血脑屏障

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)15-0210-04

Neuroprotective Role of Panax Notoginseng Saponins on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

TANG Jing-shu¹, PEI Qing-hua^{2*}

(1. Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;

2. The 3rd Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of panax notoginseng saponins (PNS) on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. Method: SD rats were divided into sham operation group, model group, PNS group. Model group and PNS group were established ischemia-reperfusion injury by using ligation of middle cerebral artery. PNS was given 15 min before ischemia and 6 h after ischemia, respectively, ip PNS 100 mg·kg⁻¹ for rats in PNS group. Rats in model group and sham group were given at the same time ip with normal saline. The neurologic deficit score, brain infarction size and the levels of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and content of Evans blue in brain tissue were examined. Result: PNS could reduce infarct volume of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, reduce the extent of the damage in blood-brain barrier

[收稿日期] 2011-03-31

[第一作者] 唐婧姝,医学生,从事神经药理的研究,Tel:15010249967,E-mail:tangjingshu@263.net

[通讯作者] *裴清华,博士,副主任医师,从事中医药防治脑病的研究,Tel:13801273357,E-mail:peiqh333@yahoo.com.cn

[5] Ikeda Y, Long D M. The molecular basis of brain injury and brain edema; the role of oxygen free radicals[J]. Neurosurgery, 1990, 27(1):1.

[6] Nishi T, Maier C M, Hayashi T, et al. Superoxide dismutase 1 over expression reduces MCP-1 and MIP-1 alpha expression after transient focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(10): 1312.

[7] Pettmann B, Henderson C E. Neuronal cell death[J]. Neuron, 1998, 20(4):633.

[8] 陈荣林,李宏,刘建辉. 关键蛋白酶激活因子 Apaf-2/Cyt C 在细胞凋亡中的作用[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(3):89.

[责任编辑 何伟]

significantly. The levels of cytokines and content of Evans blue in PNS group were successively decreased as compared with those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** PNS has a significant brain protection on ischemia-reperfusion injury. PNS has significant effect of reducing the levels of cytokines, PNS can also reduce the permeability of blood-brain barrier.

[**Key words**] panax notoginseng saponins; brain ischemia-reperfusion injury; cytokines; blood-brain barrier

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根,是我国特产的珍贵药材,具有散瘀止血、消肿定痛之功效。临床上广泛应用于脑血管病的治疗。现代药理研究证实三七的主要活性成分——三七总皂苷(saponins of panax notoginseng, PNS)具有抗自由基、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环及抗炎等作用^[1-2]。本文观察了三七总皂苷对脑缺血再灌注后动物血脑屏障(BBB)、脑损伤及炎性细胞因子的影响,旨在为其临床防治脑血管病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 80 只,体重(280 ± 20)g,合格证号 SCXK(京)2006-0009,由北京维通利华实验动物中心提供。均提前 1 周购入,放置在动物饲养室内喂养。

1.2 药物及试剂 白介素- β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8) ABC-ELISA 检测盒(Sigma 公司批号 57K129517K0702),伊文思蓝(Evans Blue, Fluka 进口分装,批号 050602);甲酰胺(天津外环化工公司批号 20100912);2% 四氮唑红(TTC, Sigma 公司,批号 066k0698),PBS 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司),三七总皂苷(血塞通注射剂,昆明制药集团股份有限公司,批号 100706)。

1.3 仪器 CR-412 低温常速离心机(法国 Jouan),721 分光光度计(上海第三仪器厂),EB-2800-22 电子天平(日本 Shimadzu),计算机图像分析系统(上海医科大学生产)。

2 方法

2.1 栓线制备 直径为 0.25 mm 的尼龙线(日本株式会社生产),剪成 6.5 cm,在放大镜下将前端加热塑成光滑圆钝状,直径 0.3 mm,在距离前端 1.8 cm 处标记备用。

2.2 脑缺血再灌注模型的建立 SD 大鼠分为假手术组,模型组和三七总皂苷组。假手术组 24 只,模型组和三七总皂苷组各 28 只。参照 Koizumi 等^[3]

和 Nagasawa 等^[4]方法将模型组和三七皂苷组制成大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。ip 10% 水合氯醛($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,仰卧固定,分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),结扎 ECA 与 CCA,用动脉夹夹闭 ICA 远心端后,迅速于距 ECA 与 ICA 分叉处约 0.5 cm 的颈总动脉处作一切口,插入一端圆钝的尼龙线(直径为 0.3 mm),插入深度为(18.0 ± 2.0)mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。结扎入口处,尼龙线外留约 1 cm,缝合皮肤。2 h 后轻轻提拉所留线头至略有阻力以实现大脑中动脉再灌注。在缺血 2 h 和再灌注 22 h 内用电热毯维持大鼠肛温在 $36.5 \sim 37.5^\circ\text{C}$ 。假手术组 24 只分离颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉(同造模组),但不结扎 CCA。

2.3 动物给药及处理 三七总皂苷组在缺血前 15 min 和缺血后 6 h 经 ip 三七总皂苷 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。假手术组与模型组予等量生理盐水。手术过程中模型组与三七总皂苷组各有 4 只死亡,造模成功 48 只大鼠,每组 24 只。实验动物分 3 批取材,每批每组 8 只,用于测定脑梗死体积、脑组织中 Evans 蓝的含量及细胞因子的表达。

2.4 神经行为学评分^[5] 麻醉苏醒后,将动物放回鼠笼,自由进食,术后 24 h 进行神经行为学评分。参照 Zea Longa 的 5 分制评分标准,无神经损伤症状为 0 分,不能完全伸展健侧前爪为 1 分,向健侧转圈为 2 分,向健侧倾倒是 3 分,不能自发行走,意识丧失为 4 分。

2.5 梗死体积测定 大鼠脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后断头取脑,用脑切片器按 2 mm 厚度,在距额极 1, 3, 5, 7 mm 处冠状切开大脑。将脑切片浸入 37°C 的 2% 四氮唑红染色,30 min 后取出置于 10% 甲醛中固定,24 h 后拍照。采用图像分析系统计算梗死面积,将各脑片的梗死面积与厚度的乘积进行累加,获得梗死体积。

2.6 脑组织伊文思蓝定量测定 大鼠取脑前 30

min,在 10% 水合氯醛($3.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉下,由左心室用生理盐水灌注,至流出液无色为止,由右侧股静脉注入 2% 伊文思蓝, $1\text{ mL}/\text{只}$ 。摘取脑组织用电子天平精确称其湿重后,投入中号试管中,分别加入 3 mL 甲酰胺,加盖后于 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴箱孵育 48 h ,轻轻摇匀,离心 15 min ($3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液测吸光度(A)($\lambda=632\text{ nm}$)。

2.7 标本采集与测定 术后 24 h 处死大鼠,于冰盘上快速剥离脑部组织,以冰冷 PBS 冲洗,滤纸吸干,立即于电子天平称重,制成 10% 脑组织匀浆,匀浆于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清液,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法在波长 492 nm 检测 IL- 1β ,TNF- α ,IL-6,IL-8 的含量。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对缺血再灌注大鼠神经症状的影响 模型组大鼠在缺血后 2 h ,再灌注 22 h 均出现偏瘫样症状,主要表现为手术对侧前肢内收,肩内旋,前肢肌张力降低,肩抗力下降,向健侧倾倒。三七总皂苷组在再灌注 22 h 后可明显改善大鼠神经症状 ($P<0.05$)。见表 1。

3.2 对缺血再灌注大鼠脑梗死范围的影响 术后 24 h ,模型组、三七总皂苷组大鼠均有不同程度梗死灶,三七总皂苷组大鼠的脑缺血梗死体积明显小于模型组 ($P<0.05$)。见表 2。

3.3 对缺血再灌注大鼠脑组织伊文思蓝含量的影

表 4 三七总皂苷对大鼠脑组织 IL-1β,TNF-α,IL-6,IL-8 含量的影响 ($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-1β	TNF-α	IL-6	IL-8
假手术	—	$37.86\pm8.53^{(1)}$	$54.21\pm9.84^{(1)}$	$50.22\pm10.02^{(1)}$	$224.67\pm25.42^{(1)}$
模型	—	55.73 ± 8.94	90.38 ± 9.22	90.48 ± 8.05	331.96 ± 20.19
三七总皂苷	100	$32.78\pm8.44^{(1)}$	$57.28\pm9.62^{(1)}$	$45.25\pm9.78^{(1)}$	$210.33\pm28.53^{(1)}$

4 讨论

脑缺血后再灌注损伤在作用机制上不同于缺血损害,可以引起更严重的损害,比如细胞肿胀、自由基损害甚至发生凋亡。但再灌注损伤的具体作用机制还不明确。研究发现血脑屏障 (blood-brainbarrier,BBB)破坏是脑缺血再灌注性脑损伤的重要病理生理基础。伊文思蓝系小分子,是常见的 BBB 指示剂。Evans 蓝能与血浆蛋白结合,正常时不能通过血脑屏障。而脑缺血再灌注时,BBB 破坏,

表 1 三七总皂苷对缺血再灌注大鼠神经症状的影响 ($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	神经症状评分
假手术	—	$0\pm0^{(2)}$
模型	—	2.72 ± 0.85
三七总皂苷	100	$1.68\pm0.87^{(1)}$

注:与模型组相比¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 三七总皂苷对缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响 ($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	脑梗死体积/ mm^3
假手术	—	$0\pm0^{(2)}$
模型	—	123.3 ± 19.8
三七总皂苷	100	$67.8\pm19.2^{(1)}$

响 模型组脑部伊文思蓝含量明显高于假手术组 ($P<0.01$)。三七总皂苷组比模型组脑 Evans 蓝含量明显下降 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 三七皂苷对缺血再灌注大鼠脑组织伊文思蓝含量的影响 ($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	伊文思蓝含量/ $\mu\text{g}\cdot(100\text{ mg})^{-1}$
假手术	—	$10.12\pm3.26^{(2)}$
模型	—	62.87 ± 9.37
三七总皂苷	100	$45.62\pm7.34^{(1)}$

3.4 对缺血再灌注大鼠脑组织中 IL-1β,TNF-α,IL-6,IL-8 含量的影响 三七总皂苷组 IL- 1β ,TNF- α ,IL-6,IL-8 明显低于模型组 ($P<0.05$)。模型组与假手术组相比,细胞因子含量显著增加 ($P<0.05$)。见表 4。

脑组织中的 Evans 蓝含量增加,通过测定脑组织中 Evans 蓝含量可反映血脑屏障的破坏程度。

脑缺血损伤后在受损区有大量细胞因子的表达和炎细胞的浸润。炎症因子的过度表达又可加重脑组织损伤。缺血后短时间内即可发生炎症反应,尤其在再灌注中更加明显。脑缺血发生后,血浆及脑组织 TNF- α ,IL- 1β 含量均出现变化,并且随时间变化而变化^[6-7]。IL- 1β 是免疫和炎症反应中的重要因子。它通过诱导白细胞黏附,介导白细胞向缺血脑

组织浸润,引起脑组织炎症反应,导致脑组织进一步损伤。细胞因子 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 等通过炎症细胞的活化,使 BBB 的通透性增加。实验证明短暂性脑缺血可诱导 IL-1 β 的表达,IL-1 β 通过促进白细胞与内皮细胞黏附而激发炎症反应,造成 BBB 的破坏^[8]。TNF- α 早期主要通过对毛细血管的直接毒性作用,使毛细血管的通透性增加,开放 BBB。TNF- α 还可损伤内皮细胞,上调基质金属蛋白酶的表达式,并且可以与 IL-1 β 协同作用加剧 BBB 的破坏范围^[9]。IL-6 作为单核巨噬细胞的化学趋化因子,在脑缺血再灌注 48 h 后开始增加^[10]。IL-8 是一种多源性细胞因子,在脑缺血时脑血管内外的高 IL-8 浓度差可吸引大量的中性粒细胞通过血-脑屏障进入炎症病灶,进一步加重脑组织的损伤^[11]。

本实验观察到脑缺血再灌注后脑组织细胞因子 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 含量显著高于假手术组 ($P < 0.05$),并与脑部伊文思蓝渗出增多相一致。三七总皂苷组细胞因子含量较模型组显著降低,并与脑部 Evans 蓝渗出减少相一致。结果表明脑缺血再灌注后炎症细胞因子含量增加,而三七总皂苷能降低炎症细胞因子的含量,降低血脑屏障的通透性,发挥其改善脑缺血再灌注损伤的作用。

[参考文献]

- [1] 吴兰鸥,詹琴,闫俊岭,等.三七皂苷 R_{g1} 对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨[J].中草药,2006,37(2):229.
- [2] 何蔚,朱遵平,刘建新,等.三七总皂苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有效治疗时间窗研究[J].中药材,2004,27(1):25.
- [3] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemia brain edema, I: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation

can be introduced in the ischemic area[J]. J Stroke, 1986,8(7):1.

- [4] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(8):1037.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20:84.
- [6] Murakami Y, Saito K, Hara A, et al. Increases in tumor necrosis factor- α following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus[J]. J Neurochem, 2005, 93(6):1616.
- [7] Skifter D A, Allegrini P R, Wiessner C, et al. Similar timecourse of interleukin-1 β production and extracellular-signal-regulated kinase(ERK) activation in permanent focal brain ischemic injury[J]. Metab Brain Dis, 2002, 17(3):131.
- [8] 文华,卞杰勇,王中,等.大鼠永久性脑缺血后 IL-1 β 表达的研究[J].苏州大学学报:医学版,2005, 25(6):986.
- [9] Vakili A, Mojarrad S, Akhavan M M, et al. Pentoxifylline attenuates TNF- α protein levels and edema following temporary focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2011, 1377:119.
- [10] Shenhar-Tsarfaty S, Ben Assayag E, Bova I, et al. Interleukin-6 as an early predictor for one-year survival following an ischaemic stroke/transient ischaemic attack[J]. Int J Stroke, 2010, 5(1):16.
- [11] Villa P, Triulzi S, Cavalieri B, et al. The interleukin-8 (IL-8/CXCL8) receptor inhibitor reparixin improves neurological deficits and reduces long-term inflammation in permanent and transient cerebral ischemia in rats[J]. Mol Med, 2007, 13(3/4):125.

[责任编辑 何伟]