

. 实验研究 .

黄芪甲苷对大鼠蛛网膜下腔出血后迟发性 脑血管痉挛的影响

黄昌恒 于耀宇 赵文可 何一川 姚自同

【摘要】目的 探讨黄芪甲苷对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后迟发性脑血管痉挛的影响及机制。**方法** 将 40 只成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、黄芪甲苷组(腹腔注射用 0.1% 二甲基亚砷助溶的黄芪甲苷溶液)、模型组和溶媒组(腹腔注射等体积 0.1% 二甲基亚砷),每组 10 只。采用颈内动脉刺破法制作 SAH 模型。SAH 后 24 h 根据改良 Garcia 神经功能评分评定大鼠神经功能。SAH 后 6 d, HE 染色测量基底动脉横截面积评估血管痉挛,免疫组化染色检测基底动脉 p-Akt 表达,免疫荧光染色检测基底动脉 C-myc 和 α -SMA 表达。**结果** 与假手术组相比,模型组和溶媒组改良 Garcia 神经功能评分明显降低($P<0.05$),基底动脉横截面积明显减小($P<0.05$),基底动脉 α -SMA 表达水平明显降低($P<0.05$),基底动脉 p-Akt 和 C-myc 表达水平明显增加($P<0.05$);而模型组和溶媒组均无统计学差异($P>0.05$)。与溶媒组相比,黄芪甲苷组改良 Garcia 神经功能评分明显提高($P<0.05$),基底动脉横截面积明显增加($P<0.05$),基底动脉 α -SMA 表达水平明显增加($P<0.05$),基底动脉 p-Akt 和 C-myc 表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 黄芪甲苷可能通过抑制 Akt 信号通路下调 C-myc 的表达、促进 α -SMA 表达,影响 SAH 大鼠基底动脉血管平滑肌表型转换和增殖,增加基底动脉横截面积,从而缓解基底动脉痉挛。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;基底动脉;黄芪甲苷;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2019)02-0098-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Effect of astragaloside A on delayed cerebral vasospasm in rats after subarachnoid hemorrhage

HUANG Chang-heng, YU Yao-yu, ZHAO Wen-ke, HE Yi-chuan, YAO Zi-tong. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, Logistics College, Armed Police Command, Tianjin 300162, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of astragaloside A on the delayed cerebral vasospasm in rats after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Forty adult male SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group, vehicle group (intraperitoneal injection of equal volume 0.1% dimethyl sulfoxide) and astragalin A group (intraperitoneal injection of astragaloside A dissolved in 0.1% dimethyl sulfoxide), with 10 rats in each group. The SAH model was made by the method of internal carotid artery puncture. The neurological function of rats in each group was evaluated by the modified Garcia neurological function score 24 hours after SAH. Six days after SAH, the cross sectional area of basilar artery was measured by HE staining, the expression of p-Akt in basilar artery was detected by immunohistochemical staining, and the expressions of C-myc and alpha smooth muscle actin (α -SMA) in basilar artery were detected by immunofluorescence staining. **Results** Compared with the sham-operation group, the modified Garcia neurological function scores, the cross sectional areas of basilar artery and the expressions of α -SMA in basilar artery significantly decreased ($P<0.05$), and the expressions of p-Akt and C-myc in basilar artery significantly increased in model and vehicle groups ($P<0.05$). There was no statistical difference between model and vehicle groups ($P>0.05$). Compared with the vehicle group, the modified Garcia neurological function score, the cross sectional area of the basilar artery and the expression level of α -SMA in the basilar artery were significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of p-Akt and C-myc in basilar artery was significantly decreased in astragalin A group ($P<0.05$). **Conclusion** Astragaloside A can relieve the spasm of the basilar artery in rats after SAH by increasing the cross sectional area of the basilar artery which may involve in the inhibition of the Akt signaling pathway.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Astragaloside A; Basilar artery; Rat

约 85% 的蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)由动脉瘤破裂导致^[1]。SAH 后迟发

性脑血管痉挛(delay cerebral vasospasm, DCVS)引起的迟发性脑缺血,是导致病人残疾和死亡的主要原因之一^[2]。血管平滑肌表型转换和增殖在 DCVS 发生、发展中起着重要的作用。本文采用颈内动脉刺破法制作大鼠 SAH 模型,经腹腔注射黄芪甲苷单体,观察其对大鼠基底动脉血管平滑肌细胞的表现转换和增殖的影响。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.02.011

作者单位:300162 天津,武警后勤学院附属医院神经外科(黄昌恒、于耀宇、赵文可、何一川、姚自同)

通讯作者:于耀宇, E-mail: yuyaoYu666@aliyun.com

1 材料和方法

1.1 动物及分组 雄性 SD 大鼠 40 只, 体重为 320~350 g, 由北京华阜生物科技股份有限公司提供。按随机数字表法随机分为假手术组、黄芪甲苷组、模型组、溶媒组, 每组 10 只。

1.2 大鼠模型建立 采用单侧颈内动脉穿刺法制作 SAH 模型^[3]。经腹腔注射 5% 水合氯醛 (8 ml/kg) 麻醉大鼠, 然后将大鼠取仰卧位、四肢固定并颈部备皮。行颈部正中偏左侧切口, 充分暴露并分离左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。将颈外动脉的远心端结扎, 使用动脉夹暂时阻断颈总动脉、颈内动脉, 于颈外动脉结扎处的近心端剪一小口, 插入直径为 0.2 mm 尼龙线, 剪断颈外动脉并牵拉使其与颈内动脉成一条直线, 将尼龙线插入颈内动脉至分叉处, 遇到阻力后, 稍用力插入尼龙线, 有突破感后立即拔出尼龙线并结扎颈外动脉近心端 (假手术组不用插入尼龙线刺破颈内动脉), 松开动脉夹, 缝合切口。

1.3 药物配制与给药方法 将黄芪甲苷单体 (天津万象恒远生物科技有限公司)、生理盐水、二甲亚砜配制成黄芪甲苷混悬液 (2 mg/ml), 其中 0.1% 二甲基亚砜作为助溶剂。造模成功后 30 min, 黄芪甲苷组大鼠经腹腔注射黄芪甲苷混悬液 (20 mg/kg)^[4]; 溶媒组大鼠经腹腔注射等体积的 0.1% 二甲基亚砜; 假手术组、模型组大鼠分别经腹腔注射等体积的生理盐水; 每天注射 1 次, 直到大鼠被处死。

1.4 神经行为学评分 造模后 24 h, 根据改良 Garcia 评分评定神经功能^[5]。评分原则: 从自发性活动、四肢运动对称、前脚伸展、攀登、对双侧躯干的接触反应以及触须反应 6 个方面进行神经功能评分, 每项最低为 0 分, 最高为 3 分, 满分为 18 分。该评分的完成是由一位不知情者独立完成。

1.5 基底动脉横截面积的测定 大鼠造模后第 6 天, 水合氯醛麻醉, 4% 多聚甲醛灌注, 分离基底动脉连同脑干, 固定 24 h 后, 常规石蜡包埋。将包埋好的石蜡块以层厚 5 μ m 连续切片, 将切片分为四组, 一组进行 HE 染色, 光镜下观察, 使用 ImagePro-Plus6.0 软件测量基底动脉横截面积; 其余三组石蜡切片分别进行免疫组化、免疫荧光检测。

1.6 基底动脉 p-Akt 免疫组化染色 将上述基底动脉石蜡切片进行烤片、脱蜡、水化等常规处理后, 按照兔抗大鼠磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt; 美国 Abcam 公司) 抗体说明书和 SP-9000 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 的说明书操作。光

镜下观察, 使用 ImagePro-Plus6.0 软件计算 p-Akt 单位面积光密度均值。

1.7 基底动脉 C-myc、 α -平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle actin, α -SMA) 免疫荧光染色 将上述基底动脉石蜡切片进行烤片、脱蜡、水化等常规处理后, 去离子水冲洗 5 min, 加入 0.1% Triton-100 破膜液, 破膜 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。然后高压锅高压抗原热修复 5 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min。山羊血清封闭 20 min。加入 1:200 稀释后的兔抗大鼠 C-myc 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司) 和鼠抗 α -SMA 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 16 h 过夜。PBS 摇洗 3 次, 每次 5 min, 避光分别加入 1:100 羊抗兔异硫氰酸荧光素标记和羊抗小鼠四甲基异硫氰酸罗丹明标记二抗稀释液, 孵育 1 h。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 避光加入 DAPI 稀释液, 孵育 10 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。50% 碳酸缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察, 拍摄保存图片。应用 Image-Pro.Plus6.0 软件分别重复测量后求出平均单位面积阳性细胞数值。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验和单因素方差分析; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经行为学评分 黄芪甲苷组、模型组、溶媒组神经行为学评分均明显低于假手术组 ($P < 0.05$); 溶媒组和模型组明显低于黄芪甲苷组 ($P < 0.05$); 模型组和溶媒组无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 基底动脉横截面积 黄芪甲苷组、模型组和溶媒

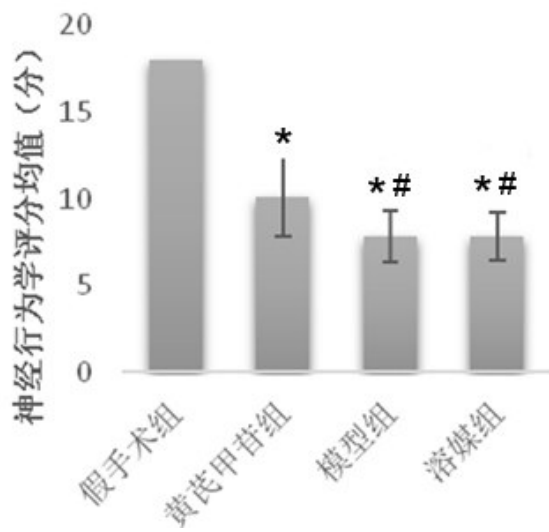
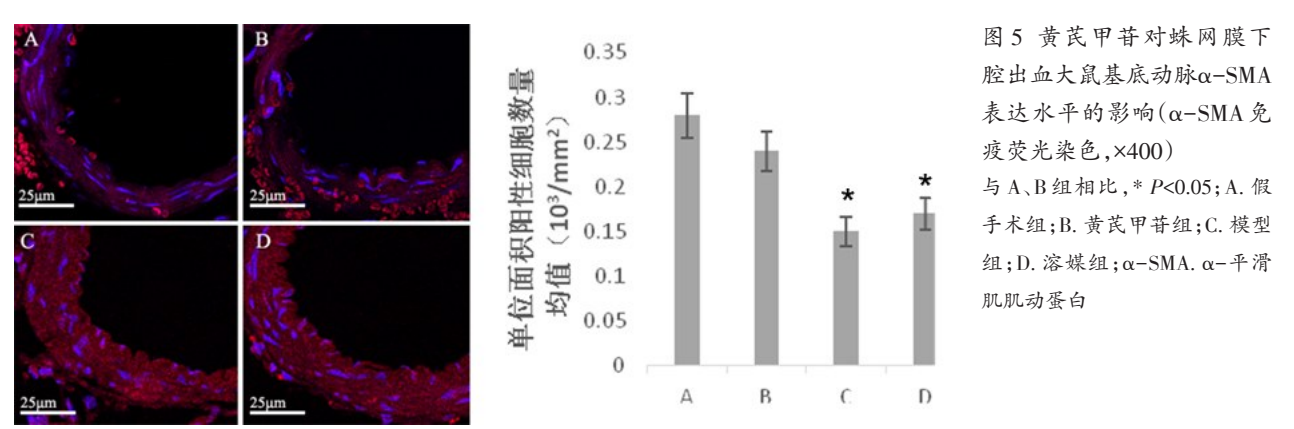
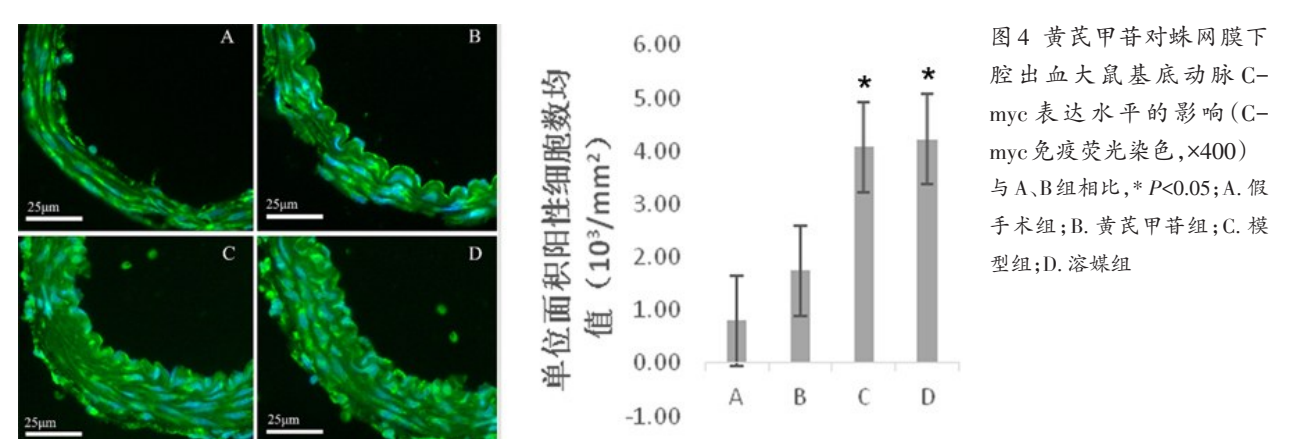
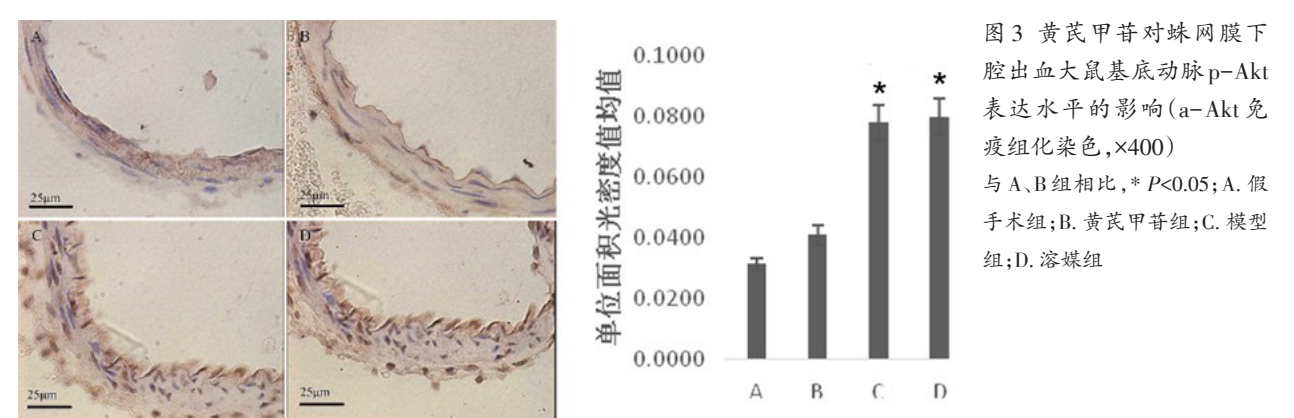
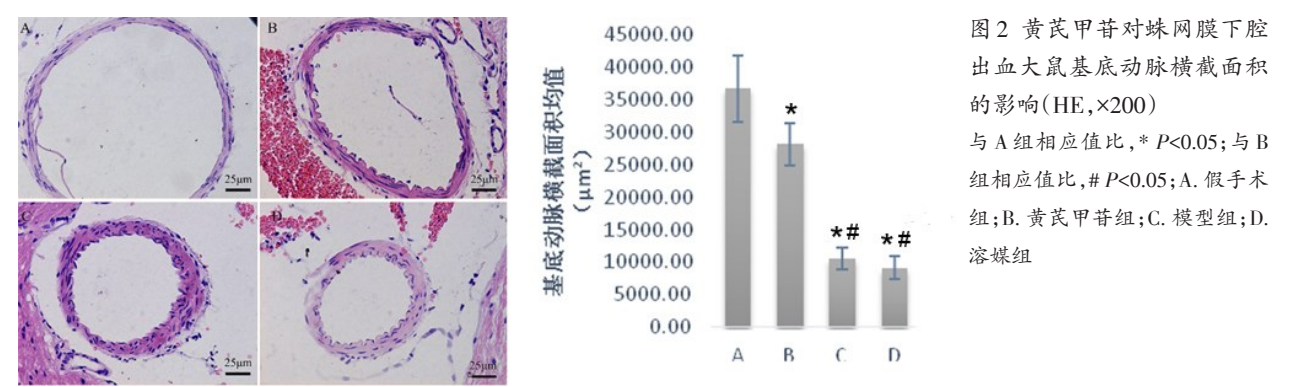


图1 黄芪甲苷对蛛网膜下腔出血大鼠神经行为评分影响与假手术组相应比值, * $P < 0.05$; 与黄芪甲苷组相应比值, # $P < 0.05$



组基底动脉横截面积明显小于假手术组($P<0.05$);模型组和溶媒组明显小于黄芪甲苷组($P<0.05$);模型组和溶媒组无明显差异($P>0.05$)。见图 2。

2.3 基底动脉 p-Akt、C-myc、 α -SMA 的表达 假手术组和黄芪甲苷组基底动脉 p-Akt、C-myc、 α -SMA 表达水平均无明显差异($P>0.05$);模型组和溶媒组基底动脉基底动脉 p-Akt、C-myc、 α -SMA 表达水平也均无明显差异($P>0.05$)。但是,模型组和溶媒组基底动脉基底动脉 p-Akt、C-myc 表达水平较假手术组和黄芪甲苷组明显增高($P<0.05$),而 α -SMA 表达水平明显降低($P<0.05$)。见图 3~5。

3 讨论

DCVS 可继发脑梗死,是导致 SAH 病人死亡和残废的主要原因^[6]。早发性脑血管痉挛出现于 SAH 后数分钟或数小时,造成供血区域出现缺血、缺氧,激活细胞凋亡信号通路,引起血管平滑肌细胞增殖^[7],血管结构的改变,导致 DCVS。其病理生理机制复杂,多种机制参与其中,如炎症反应、氧化应激、细胞增殖和凋亡,其中血管平滑肌由收缩型向内分泌型转化和细胞增殖是 DCVS 研究热点^[8]。平滑肌收缩型标志蛋白有钙调素结合蛋白、 α -SMA、平滑肌肌球蛋白重链。以前,在大鼠高血压及衰老模型证实平滑肌肌球蛋白重链转型在动脉起到重要作用^[9],并且抑制平滑肌肌球蛋白重链转型能明显改善血管狭窄及血管增厚。Akt 信号通路在细胞凋亡、生存、增殖、迁移、新陈代谢以及血管生成及结构重塑中起到重要作用。在病理情况下,Akt 与细胞膜相结合后磷酸化而被激活,由胞膜转向进入细胞核内发挥调节作用,促进信号通路下游如 C-myc 等激活,从而促进细胞增殖。

目前,DCVS 并没有很好的治疗药物。美国动脉瘤蛛网膜下腔出血治疗指南中唯一一个 I 级推荐的尼莫地平对 SAH 的致残率和死亡率并没有显著改善^[10]。有研究表明中药单体黄芪甲苷能够有效缓解大鼠基底动脉痉挛^[11],同时黄芪甲苷具有多种药理活性,包括干预细胞增殖的作用。本文结果表明黄芪甲苷可以改善 SAH 大鼠的神经行为学功能,明显增加基底动脉管径,明显抑制 p-Akt 和 C-myc 表达,并上调 α -SMA 表达。因此,我们推测黄芪甲苷可能通过影响平滑肌细胞增殖和表型转化,缓解 SAH 后 DCVS。目前,我们仅初步探索黄芪甲苷对 DCVS 的影响,但 DCVS 机制复杂,具体作用机制还需要进一步去研究。

【参考文献】

[1] Serrone JC, Hidetsugu M, Mardjono T, *et al.* Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: pathobiology, current treatment and future directions [J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15 (4): 367-380.

[2] Angelika E, Christoph S, Johannes W, *et al.* Molsido mine for the prevention of vasospasm-related delayed ischemic neurological deficits and delayed brain infarction and the improvement of clinical outcome after subarachnoid hemorrhage: a single-center clinical observational study [J]. *J Neurosurg*, 2016, 124(1): 51-58.

[3] 李了了,王 玲,冯 楠,等. 种简单可靠的大鼠蛛网膜下腔出血模型的建立[J]. *药理学学报*, 2005, 40: 1096-1098.

[4] Shao A, Guo S, Tu S, *et al.* Astragaloside IV alleviates early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(10): 1073-1081.

[5] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, *et al.* Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-635.

[6] Chen CC, Yi-Chou WA, Chen CT, *et al.* Coadjuvant treatment of vasospasm in ruptured unsecured cerebral aneurysms with aggressive angioplasty, intra-arterial nimodipine, and aneurysm embolization [J]. *World Neurosurg*, 2018, 116: e452-e459.

[7] Zubkov AY, Tibbs RE, Clower B, *et al.* Morphological changes of cerebral arteries in a canine double hemorrhage model [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 326(2): 137-141.

[8] Zhang H, Jiang L, Guo Z, *et al.* PPAR β / δ , a novel regulator for vascular smooth muscle cells phenotypic modulation and vascular remodeling after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45234.

[9] Zhang L, Xu Z, Wu Y, *et al.* Akt/eNOS and MAPK signaling pathways mediated the phenotypic switching of thoracic aorta vascular smooth muscle cells in aging/hypertensive rats [J]. *Physiol Res*, 2018, 67(4): 543-553.

[10] Bauer AM, Rasmussen PA. Treatment of intracranial vasospasm following subarachnoid hemorrhage [J]. *Front Neurol*, 2014, 72(5): 1-7.

[11] 赵建伍,于耀宇,余天奎,等. 黄芪甲苷对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2015, 20(6): 350-352.

(2018-07-03 收稿, 2018-10-12 修回)