

· 论 著 ·

七叶皂苷钠对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

汪 雷 胡火军 马金阳 黄 松 董元训 王旭光 周有东

【摘要】目的 探讨七叶皂苷钠对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用及机制。**方法** 60 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和七叶皂苷钠组,各 20 只。采用线栓法建立大鼠局灶性大脑中动脉闭塞再灌注损伤模型,七叶皂苷钠组建模成功后 1 h 腹腔注射七叶皂苷钠(2.8 mg/kg),假手术组和模型组腹腔注射等量生理盐水。造模后 24 h,使用 Longa 评分评估大鼠神经功能损伤程度,使用称重法检测大鼠脑水肿程度,使用 ELISA 法测定大鼠损伤脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)及白细胞介素 1 β (IL-1 β)的含量,使用 TUNEL 法检测损伤脑组织神经元凋亡率,使用蛋白免疫印迹法检测损伤脑组织双特异性磷酸酶 1(DUSP1)、核转录因子- κ B(NF- κ B)p65、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠 Longa 评分显著增加($P<0.01$),脑含水量显著升高($P<0.01$),损伤脑组织 MDA、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著增高($P<0.001$),损伤脑组织 SOD 和 CAT 水平显著降低($P<0.001$),损伤脑组织神经元凋亡率显著升高($P<0.01$),损伤脑组织 DUSP1 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),损伤脑组织 NF- κ B p65 和 Bax 蛋白表达水平显著增高($P<0.05$)。七叶皂苷钠显著逆转大鼠上述反应($P<0.05$)。**结论** 七叶皂苷钠显著改善大鼠脑缺血再灌注损伤,机制可能与减轻炎症反应、氧化应激反应、神经元凋亡等有关。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤;七叶皂苷钠;炎症反应;氧化应激反应;细胞凋亡

【文章编号】 1009-153X(2021)08-0616-06 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Protective effect of sodium aescinate on adult rats after cerebral ischemia-reperfusion injury

WANG Lei, HU Huo-jun, MA Jin-yang, HUANG Song, DONG Yuan-xun, WANG Xu-guang, ZHOU You-dong. Institute of Neurology, China Three Gorges University; Department of Neurosurgery, Yichang Central People's Hospital, Yichang 441021, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of sodium aescinate on the adult rats after cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **Methods** Sixty adult SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and aescinate group, with 20 rats in each group. A rat model of focal middle cerebral artery occlusion and reperfusion injury was established by the modified Zea-Longa method. The aescinate group was intraperitoneally injected with sodium aescinate (2.8 mg/kg) 1 hour after the injury, and the sham operation and model groups were intraperitoneally injected with saline. Twenty-four hours after the injury, the Longa score was used to evaluate the neurological damage, the weighing method was used to detect the degree of brain edema, the ELISA method was used to detect the levels of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and IL-1 β in the injured brain tissues, the TUNEL method was used to detect the neuronal apoptosis rate in the injured brain tissues, and the Western blotting was used to detect the expression levels of dual-specific phosphatase 1 (DUSP1), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) p65, Bcl-2 and Bax in the damaged brain tissues. **Results** after CIRI, the Longa score was significantly increased ($P<0.01$), the brain water content, the neuronal apoptosis rate, the levels of MDA, TNF- α , IL-1 β , IL-6 NF- κ B p65 and Bax were significantly increased in the injured cerebral tissues ($P<0.001$), and the levels of SOD, CAT, DUSP1 and Bcl-2 were significantly reduced in the injured cerebral tissues ($P<0.001$). Sodium aescinate significantly reversed the above reactions in the CIRI rats ($P<0.05$). **Conclusions** Sodium aescinate significantly improves the CIRI in adult rats, and the mechanism may be related to reducing inflammation, oxidative stress, and neuronal apoptosis.

【Key words】 Cerebral ischemia-reperfusion injury; Aescinate; Adult rat; Inflammation; Oxidative stress; Neuronal apoptosis

缺血性脑卒中是常见的脑血管疾病,约占脑卒

中的 80%^[1,2]。当缺血性脑卒中发生后,在一定时间内恢复血液供应,反而造成更严重的脑功能障碍,这种现象称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)。研究表明,抑制缺血性脑卒中炎症反应和氧化应激,可有效改善 CIRI^[3]。七叶皂苷钠具有抗炎、消除肿胀、改善微循环、清除自由基等作用。研究表明,七叶皂苷钠可以抑制炎症介

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.08.013

作者单位:441021 湖北宜昌,三峡大学神经病学研究所/宜昌市中心人民医院神经外科(汪 雷、胡火军、马金阳、黄 松、董元训、王旭光、周有东)

通讯作者:马金阳, E-mail:514632999@qq.com

质的释放,减轻高原脑损伤及脑水肿^[4]。本文探讨七叶皂苷钠大鼠CIRI的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 60只成年雄性SD大鼠,8周龄,体重220~250 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司。按随机数表法将大鼠分为假手术组、模型组和七叶皂苷钠组,每组20只。

1.2 建立CIRI大鼠模型 按参考文献[5]报道的方法建立CIRI。腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后,在颈部正中切开皮肤并钝性分离各层组织,暴露颈总动脉及分支,尼龙线结扎右颈外动脉,动脉夹夹闭颈内动脉。右颈外动脉、右颈内动脉以及大脑左前动脉残端处插入栓线并固定,松开动脉夹。缺血2 h后,取出栓线结扎颈外动脉残端实现再灌注。假手术组大鼠进行上述手术,但不插入栓线。CIRI大鼠造模成功的标准为:大鼠不能直线行走,向右转圈或向右倾倒,提尾时右前肢弯曲。

1.3 给药方法 按参考文献[6]报道的方法,七叶皂苷钠组建模1 h后一次性腹腔注射七叶皂苷钠(2.8 mg/kg;武汉爱民制药股份有限公司),假手术组和模型组腹腔注射等量生理盐水。

1.4 大鼠神经功能评分 造模后24 h,采用Longa评分评估大鼠神经功能^[7]:0分,大鼠行为完全正常;1分,大鼠右前肢不能完全伸直;2分,大鼠爬行时有向右盘旋的行为;3分,大鼠爬行时向右倾倒;4分,大鼠丧失行走能力,意识丧失。

1.5 大鼠脑含水量的测定 造模后24 h,每组取5只大鼠,脱椎处死取出脑组织,用滤纸吸干表面水分后称其湿重,然后放置在恒温干燥箱烘干,称其干重。脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.6 ELISA检测损伤脑组织氧化应激和炎症反应指标 造模后24 h,每组取5只大鼠分离损伤脑组织,加入RIPA裂解液均浆,4℃离心25 min(2 500转/min),取上清液。按ELISA试剂盒(武汉赛培生物科技有限公司)说明书操作,检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α、白细胞介素(interleukin, IL)-6及IL-1β的含量。

1.7 TUNEL染色检测损伤脑组织神经元凋亡率 造模后24 h,每组取5只大鼠,灌注固定后分离损伤脑组织,石蜡切片,常规脱蜡至水,加入胰蛋白酶K工作液,37℃处理25 min,洗涤3次,酒精脱水,按照

TUNEL试剂盒(美国Invitrogen公司)说明书进行操作,用抗荧光淬灭封片后,在荧光显微镜下观察细胞数目。随机选取5个视野,观察并计算细胞凋亡率。

1.8 免疫印迹法检测损伤脑组织凋亡相关蛋白的表达 造模后24 h,每组取5只大鼠分离损伤脑组织,加入RIPA裂解液提取蛋白,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳,并转至PDVF膜。5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h, PBS洗涤3次,加入一抗NF-κB p65抗体(1:1 000;美国Invitrogen公司)、双特异性磷酸酶1抗体(dual-specific phosphatase 1, DUSP1; 1:1 000;美国GeneTex公司)、Bcl-2抗体(1:1 000;美国Invitrogen公司)和Bax抗体(1:1 000;美国Invitrogen公司),4℃下孵育过夜。TBST洗膜3次,加入二抗(1:5 000;美国Invitrogen公司),37℃下孵育1 h, TBST洗膜3次。用ECL试剂盒进行显影。采用图像分析软件ImageJ进行灰度值分析,以β-actin作为内参。

1.9 统计学处理 采用SPSS 22.0软件分析;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用单因素方差分析和LSD-*t*检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七叶皂苷钠对CIRI大鼠神经功能的影响 与假手术组相比,模型组大鼠Longa评分显著增加($P<0.01$);与模型组相比,七叶皂苷钠组大鼠Longa评分显著降低($P<0.01$)。见图1。

2.2 七叶皂苷钠对CIRI大鼠脑含水量的影响 与假手术组相比,模型组大鼠脑含水量显著增加($P<$

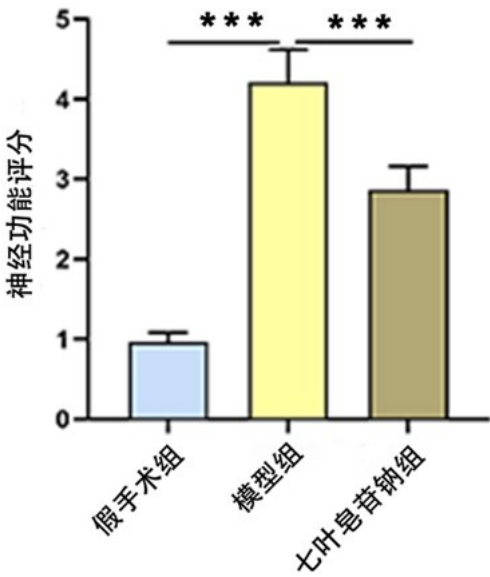


图1 七叶皂苷钠对大鼠CIRI后神经功能的影响
*** $P<0.001$; CIRI. 脑缺血再灌注损伤

0.01);与模型组相比,七叶皂苷钠组大鼠脑含水量显著降低($P<0.01$)。见图2。

2.3 七叶皂苷钠对CIRI大鼠氧化应激和炎症反应的影响 与假手术组相比,模型组大鼠损伤脑组织MDA、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平显著增高($P<0.001$),SOD和CAT水平显著降低($P<0.001$)。与模型组相比,七叶皂苷钠组大鼠损伤脑组织MDA、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平显著降低($P<0.001$),SOD和CAT水平显著增高($P<0.001$)。见图3。

2.4 七叶皂苷钠对CIRI大鼠损伤脑组织神经元凋亡的影响 与假手术组相比,模型组大鼠损伤脑组织神经元凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组相比,七叶皂苷钠组大鼠损伤脑组织神经元凋亡率显著下降($P<0.01$)。见图4。

2.5 七叶皂苷钠对CIRI大鼠损伤脑组织DUSP1、NF- κ B p65、Bcl-2及Bax蛋白表达的影响 与假手术

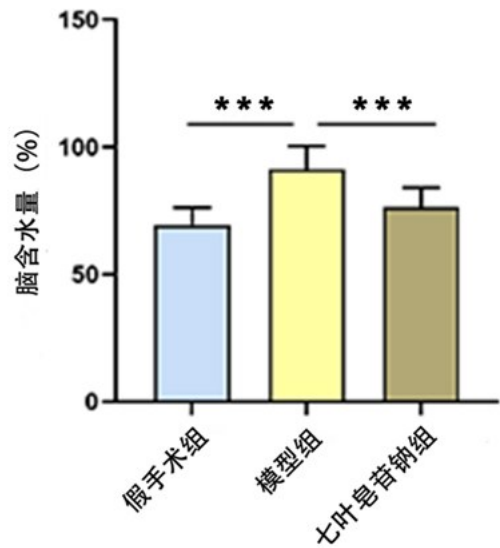


图2 七叶皂苷钠对大鼠CIRI后脑含水量的影响
*** $P<0.001$;CIRI. 脑缺血再灌注损伤

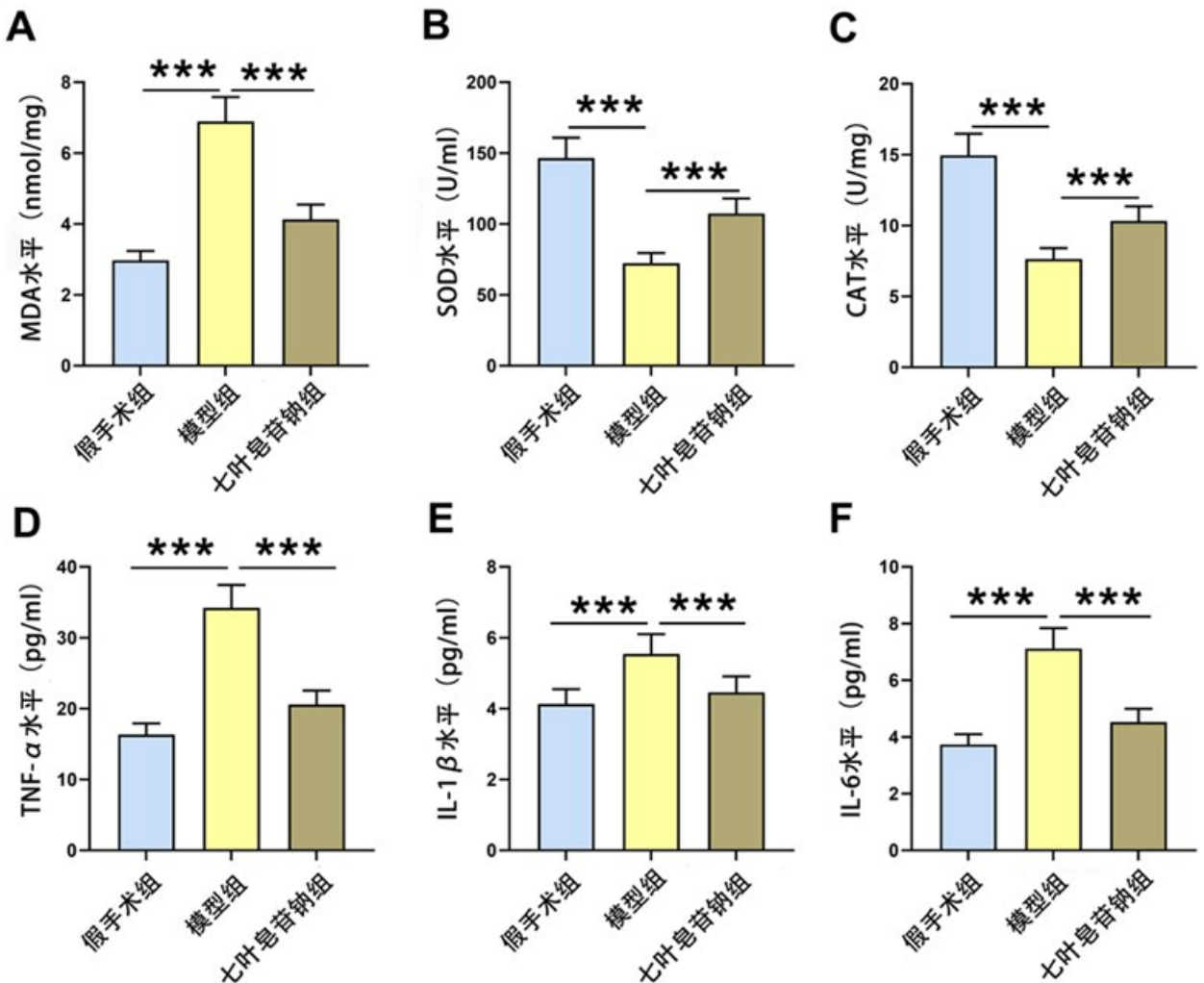


图3 七叶皂苷钠对大鼠CIRI后损伤脑组织炎症反应和氧化应激反应的影响
*** $P<0.001$;CIRI. 脑缺血再灌注损伤

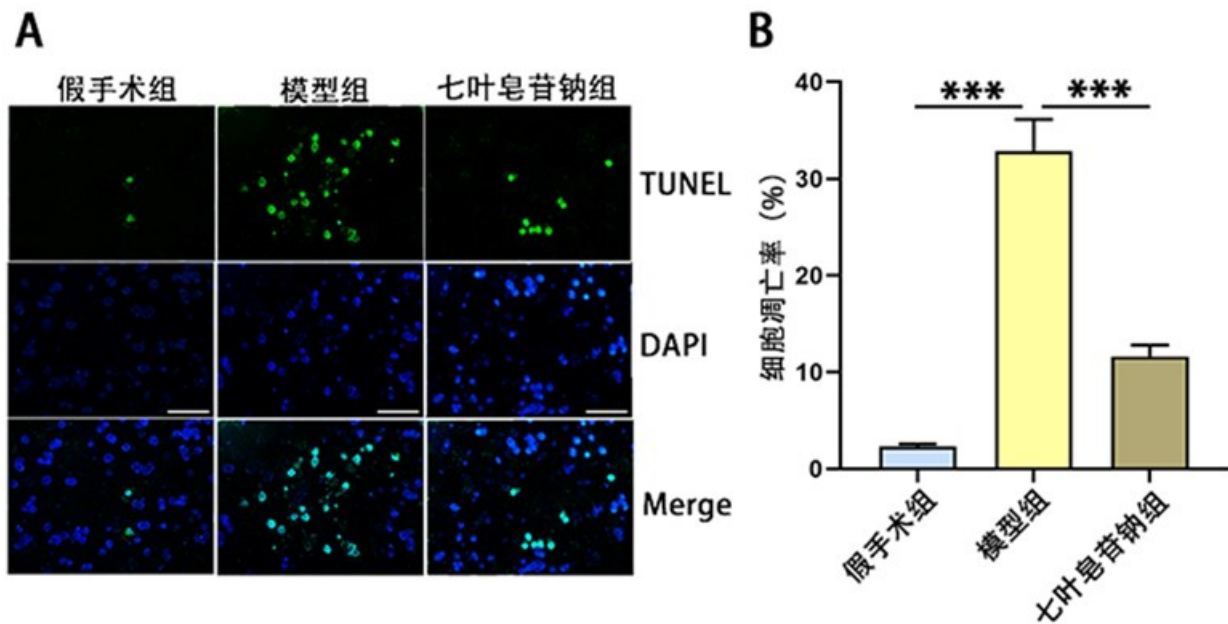


图4 七叶皂苷钠对大鼠CIRI后损伤脑组织神经元凋亡的影响
*** $P<0.001$;CIRI. 脑缺血再灌注损伤

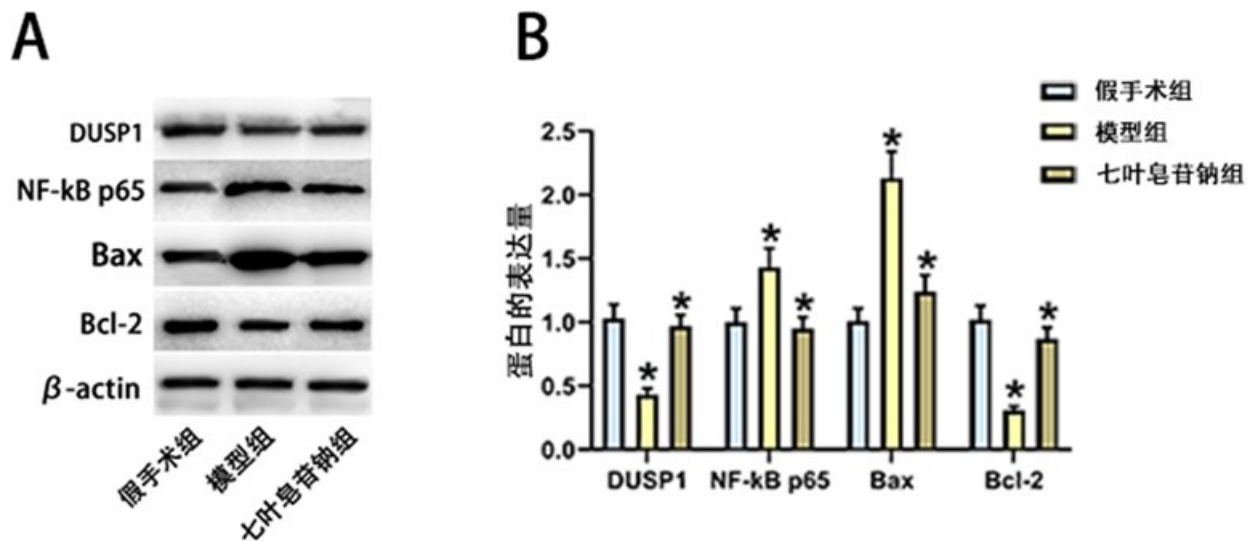


图5 七叶皂苷钠对大鼠CIRI后损伤脑组织细胞凋亡相关蛋白表达的影响
* $P<0.05$;CIRI. 脑缺血再灌注损伤

组相比,模型组大鼠损伤脑组织 DUSP1 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),NF-kB p65 和 Bax 蛋白表达水平显著增高($P<0.05$)。与模型组相比,七叶皂苷钠组大鼠损伤脑组织 DUSP1 和 Bcl-2 蛋白表达表达显著增高($P<0.05$),NF-kB p65 和 Bax 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。见图5。

3 讨论

缺血性脑卒中是一种具有高发病率、高致残率

和高病死率特点的急性脑血管疾病,是血管性疾病导致病人残疾和死亡的主要原因之一^[18,9]。目前,治疗缺血性脑卒中最有效的方法就是及时进行溶栓治疗,然而药物溶栓受到严格的时间限制(4.5 h 内),且容易诱发 CIRI^[10,11]。CIRI 是大脑短暂供血不足后又快速恢复供血,从而使氧化应激、炎症反应加重,导致细胞自噬、凋亡增加等一系列的病理过程^[12,13]。CIRI 后小胶质细胞激活释放炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等引发炎症反应,导致继发性损伤^[14]。

此外,在 CIRI 过程中,会产生 MDA,下调包括 SOD、CAT 在内的内源性抗氧化酶的活性,干扰细胞内的离子稳态并诱发炎症反应,从而引起缺血组织的进一步损伤^[15,16]。本研究发现,大鼠 CIRI 后,损伤脑组织 MDA、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著增高,SOD 和 CAT 水平显著降低,同时神经元细胞凋亡率显著增加,神经功能损伤和脑水肿显著加重。

七叶皂苷钠是一种七叶树科植物中提取的含酯键的三萜皂苷,临床上用于脑水肿、创伤及手术所致的肿胀,同时也用于静脉回流障碍性疾病^[17]。研究表明,七叶皂苷钠通过上调细胞因子信号传导抑制因子 1 的表达,发挥抗炎作用,减轻大鼠脑出血损伤^[18]。另外,七叶皂苷钠可通过调节 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路,降低炎症因子水平,减轻氧化应激损伤,改善小鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障及神经功能障碍^[6]。本研究发现七叶皂苷钠能够显著降低 CIRI 后炎症因子水平,降低 MDA 水平,提高 SOD 和 CAT 水平,促进 Bcl-2 表达,抑制 Bax 表达,减少细胞凋亡。

DUSP1 是 MAPK 家族成员,可参与 T 细胞的活化,对免疫性疾病有保护作用^[19]。研究表明,DUSP 可使 MAPK 失活,对心肌损伤起到保护作用^[20,21]。此外,DUSP1 在心脏缺血再灌注损伤后显著下调,上调 DUSP1 可减轻 Mif/Binp3 活化,并使 JNK 信号通路失活,保护缺血再灌注应激后的心肌组织^[22]。还有研究表明 DUSP1 能够抑制 NF- κ B 向细胞核内转移,从而抑制 NF- κ B 的活性^[23,24]。NF- κ B 是一种能激活多种基因表达的二聚体转录因子,参与炎症过程。本研究发现七叶皂苷钠能够显著促进 DUSP1 的表达,抑制 NF- κ B p65 的表达。

总之,七叶皂苷钠对大鼠 CIRI 具有神经保护作用,机制可能是通过促进 DUSP1 的表达,抑制 NF- κ B 活性,发挥抗炎、抗氧化应激,抑制凋亡的作用。

【参考文献】

[1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(3): e28-e292.
[2] Nilupul Perera M, Ma HK, Arakawa S, *et al.* Inflammation following stroke [J]. *J Clin Neurosci*, 2006, 13(1): 1-8.
[3] Mizuma A, Yenari MA. Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke [J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 467.
[4] 贺斌峰,海 乐,魏征华,等. 七叶皂苷钠对模拟高原低氧

大鼠脑损伤的干预作用及对水通道蛋白 4 表达的影响 [J]. *中国急救医学*, 2012, 32(1): 47-50.
[5] 刘士民. 大鼠局灶脑缺血/再灌注模型缺血神经元损伤和胶质细胞反应以及 TGF β 表达的时空关系 [D]. 中国协和医科大学, 1997.
[6] Wang YK, Han J, Xiong WJ, *et al.* Evaluation of in vivo anti-oxidant and immunity enhancing activities of sodium aescinate injection liquid [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10267-10275.
[7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
[8] Khadir A, Tiss A, Abubaker J, *et al.* MAP kinase phosphatase DUSP1 is overexpressed in obese humans and modulated by physical exercise [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 308(1): E71-83.
[9] Kapoor D, Trikha D, Vijayvergiya R, *et al.* Conventional therapies fail to target inflammation and immune imbalance in subjects with stable coronary artery disease: a system-based approach [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2): 623-631.
[10] Wu R, Li X, Xu P, *et al.* TREM2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1): 20.
[11] Fonarow GC, EE Smith, Saver JL, *et al.* Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes [J]. *Circulation*, 2011, 123(7): 750-758.
[12] Wu H, Tang C, Tai LW, *et al.* Flurbiprofen axetil attenuates cerebral ischemia reperfusion injury by reducing inflammation in a rat model of transient global cerebral ischemia reperfusion [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20171562.
[13] Khandelwal P, Yavagal DR, Sacco RL. Acute ischemic stroke intervention [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(22): 2631-2644.
[14] Zhu Y, Guan YM, Huang HL, *et al.* Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(5): 585-591.
[15] Letteria M, Domenico P, Mariagrazia R, *et al.* ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2016, 2016: 2183026.
[16] Maslov LN, Naryzhnaia NV, Podoksenov IK, *et al.* Reactive

oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia–reperfusion [J]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova, 2015, 101(1): 3–24.

[17] 王大贵,李 梅,李 竣,等. 七叶皂苷钠对小鼠变应性接触性皮炎作用研究[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(1): 8–12.

[18] 范永会,王星利,张永丽,等. 七叶皂苷钠通过上调SOCS-1 表达抑制脑内出血诱发的炎症反应[J]. 实用药物与临床, 2018, 21(6): 632–636.

[19] Chuang HC, Tan TH. MAP4K family kinases and DUSP family phosphatases in T-cell signaling and systemic lupus erythematosus [J]. Cells, 2019, 8(11): 1433.

[20] Auger–Messier M, Accornero F, Goonasekera SA, *et al.* Unrestrained p38 MAPK activation in Dusp1/4 double–null mice induces cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2013; 112(1): 48–56.

[21] Li S, Hao G, Li J, *et al.* Comparative analysis of dual specificity protein phosphatase genes 1, 2 and 5 in response to immune challenges in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish immunol, 2017, 68: 368–376.

[22] Jin Q, Li R, Hu N, *et al.* DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff–required mitochondrial fission and Bnip3–related mitophagy via the JNK pathways [J]. Redox biology, 2018, 14: 576–587.

[23] Gil–Araujo B, Lobo MT, Gutiérrez–Salmerón M, *et al.* Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF–κB activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism [J]. Mol Oncol, 2014, 8(1): 27–38.

[24] Gaynor RB, Williams NS, Scoggins S, *et al.* Identification of NF–κappaB–regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference [J]. Oncogene, 2004, 22(13): 2054–2064.

(2021–05–19 收稿, 2021–06–23 修回)

(上接第 596 页)

[3] 张小兵,包庆泉,俞学斌. 弥散张量成像对高血压脑出血患者运动功能的预测价值[J]. 浙江医学, 2020, 42(19): 2071–2074.

[4] Gladstone DJ, Danells CJ, Black SE. The fugl–meyer assessment of motor recovery after stroke: a critical review of its measurement properties [J]. Neurorehabil Neural Repair, 2002, 16(3): 232–240.

[5] Sanford J, Moreland J, Swanson LR, *et al.* Reliability of the Fugl–Meyer assessment for testing motor performance in patients following stroke [J]. Physical Ther, 1993, 73(7): 447–454.

[6] Castao Leon AM, Cicuendez M, Navarro B, *et al.* What can be learned from diffusion tensor imaging from a large traumatic brain injury cohort: white matter integrity and its relationship with outcome [J]. J Neurotrauma, 2018, 35(20): 2365–2376.

[7] Koyama T, Tsuji M, Nishimura H, *et al.* Diffusion tensor imaging for intracerebral hemorrhage outcome prediction: comparison using data from the corona radiata/internal capsule and the cerebral peduncle [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2013, 22(1): 72–79.

[8] 陈丽军. 磁共振 DTI 及 DTT 技术在评估高血压脑出血患者术后康复中的应用价值分析[J]. 河南医学研究, 2020, 29(6): 1110–1112.

[9] 管立威. 磁共振 DTI 及 DTT 技术在高血压脑出血术后预后评估中的应用价值[J]. 交通医学, 2019, 33: 176–178.

[10] Bigourdan A, Munsch F, Coupé P, *et al.* Early fiber number ratio is a surrogate of corticospinal tract integrity and predicts motor recovery after stroke [J]. Stroke, 2016, 47(4): 1053–1059.

[11] Jang SH, Lee J, Lee MY, *et al.* Prediction of motor outcome using remaining corticospinal tract in patients with pontine infarct: diffusion tensor imaging study [J]. Somatosens Mot Res, 2016, 33(2): 99–103.

[12] Song SK, Sun SW, Ju WK, *et al.* Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia [J]. Neuroimage, 2003, 20(3): 1714–1722.

[13] 林凌云. 微创手术治疗中少量高血压脑出血的临床疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(13): 120–122.

[14] 梁观钦,黎彩宜,刘北祥,等. 钻孔引流与小骨窗开颅在治疗高血压基底节区少量脑出血的临床疗效分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2020, 41(16): 2021–2022.

[15] 张占阅,张安龙,梅小龙,等. 立体定向技术治疗少量基底节区脑区脑出血的疗效分析[J]. 中国医药科学, 2020, 10(15): 13–15.

(2020–12–18 收稿, 2021–06–30 修回)