

. 实验研究 .

醒脑静注射液对大鼠蛛网膜下腔出血后
早期脑损伤的影响

焦继超 孙林林

【摘要】目的 探讨醒脑静注射液对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后早期脑损伤(EBI)的影响。**方法** 将 36 只成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、醒脑静组,各 12 只。颈内动脉血管刺破法制备 SAH 模型,对照组不刺破血管而其余操作同模型组,醒脑静组造模成功后腹腔注射醒脑静注射液[10 ml/(kg·d)],模型组和对对照组给予同等量生理盐水。造模后 24 h, Garcia JH 评分评估大鼠神经功能,干湿重法评估脑水含量,ELISA 检测海马组织 IL-1 β 及 IL-18 水平,免疫组化染色和免疫印迹法检测海马组织 NLRP3 及 Caspase-1 的表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠 Garcia JH 评分明显降低($P<0.05$)、脑水含量明显升高($P<0.05$)、海马组织 IL-1 β 、IL-18、NLRP3、Caspase-1 水平明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,醒脑静组 Garcia JH 评分显著增高($P<0.05$)、脑水含量明显降低($P<0.05$)、海马组织 IL-1 β 、IL-18、NLRP3、Caspase-1 水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 醒脑静注射液可改善大鼠 SAH 后 EBI,可能与减轻神经细胞焦亡水平有关。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;大鼠;细胞焦亡;醒脑静注射液

【文章编号】 1009-153X(2023)09-0585-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Effects of Xingnaojing injection on early brain injury in rats after subarachnoid hemorrhage

JIAO Ji-chao, SUN Lin-lin. Department of Neurosurgery, Zhengzhou Seventh People's Hospital, Zhengzhou 450000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Xingnaojing injection on early brain injury (EBI) in rats after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Thirty-six adult male SD rats were randomly divided into control group, model group, and Xingnaojing group, with 12 rats in each group. The SAH model was established by puncturing the internal carotid artery. The control group did not undergo vascular puncture, while the rest of the procedures were the same as in the model group. After successful modeling, the rats in the Xingnaojing group received intraperitoneal injection of Xingnaojing injection (10 ml/kg/d), while the rats in the model and control groups received an equal amount of normal saline. At 24 hours post-modeling, neurological function of rats was evaluated using the Garcia JH score, brain water content was assessed using the wet-dry method, IL-1 β and IL-18 levels in the hippocampal tissues were measured by ELISA, and the expression levels of NLRP3 and Caspase-1 in the hippocampal tissues were detected by immunohistochemistry and immunoblotting. **Results** Compared to the control group, the rats in the model group showed a significant decrease in Garcia JH score ($P<0.05$), a significant increase in brain water content ($P<0.05$), and a significant increase in IL-1 β , IL-18, NLRP3, and Caspase-1 levels in the hippocampal tissues ($P<0.05$). Compared to the model group, the rats in the Xingnaojing group had a significant increase in Garcia JH score ($P<0.05$), a significant decrease in brain water content ($P<0.05$), and a significant decrease in IL-1 β , IL-18, NLRP3, and Caspase-1 levels in the hippocampal tissues ($P<0.05$). **Conclusion** Xingnaojing injection can improve EBI in rats after SAH, possibly by reducing the level of neuronal pyroptosis.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Rats; Pyroptosis; Xingnaojing injection

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)占脑卒中的 5%~10%,是一种脑血管疾病问题引起的一种复杂临床综合征。SAH 后早期脑损伤(early brain injury, EBI)是影响脑缺血和神经功能变化的关键因素^[1,2],多发生在 SAH 后 72 h 内,可导致

多种病理生理改变,进而引起整个脑组织损伤。这些病生改变包括颅内压的急性升高、脑灌注压的降低、氧化应激等^[3]引起神经细胞的死亡(自噬^[2]或凋亡^[4]),进一步改变脑组织微血管内皮细胞的功能,导致脑水肿,加重脑损伤,其中细胞死亡在 EBI 中发挥重要作用。细胞焦亡是一种程序性的新型细胞死亡方式,由内毒素释放激活的炎症形式,伴随细胞肿胀、细胞膜破裂溶解、炎症小体的激活,进一步引起炎症递质引起严重的炎症反应^[5,6]。细胞焦亡的经典途径是由 Caspase-1 介导的^[7],而 Caspase-1 又由 NOD 样

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.09.011
基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210744)
作者单位:450000,郑州市第七人民医院神经外科(焦继超、孙林林)
通讯作者:孙林林, E-mail: sl201509@163.com

受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 调控, 因此 Caspase-1、NLRP3 是细胞焦亡的标志物。研究表明细胞焦亡在神经系统疾病的发生发展过程中起着至关重要的作用^[8]。醒脑静注射液具有疏通经络、开窍醒脑功效^[9], 还有神经功能修复、降低颅内压及抵御炎症因子的作用^[10]。本文探讨醒脑静注射液对大鼠 SAH 后 EBI 的影响, 为 SAH 的临床救治提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物分组及干预 成年雄性 SD 大鼠 36 只 (270~330 g; 郑州市华兴实验动物养殖场 [SCXK-(豫)2019-0002]), 按随机数字表法分为对照组 (n=12)、模型组 (n=12)、醒脑静组 (n=12)。醒脑静组造模成功后腹腔注射醒脑静注射液 [10 ml/(kg·d); 河南天地药业公司]^[11], 模型组和对照组给予同等量生理盐水。

1.2 模型制作 按参考文献 [12] 描述的颈内动脉血管刺破法制备 SAH 模型。大鼠用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于固定板上, 剪开皮肤, 钝性分离皮下组织, 分离颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉, 距离颈总动脉分叉处 0.8 cm 离断颈外动脉, 侧切小口, 穿刺纤芯沿颈外动脉插入颈内动脉 2.0 cm, 慢慢刺破血管, 停留 5 s, 撤出纤芯, 结扎颈外动脉切开近心端。造模成功标准: 剥离脑组织时可见血块分布于蛛网膜下腔。对照组未刺破血管, 其余操作同模型组。

1.3 大鼠神经功能评分 造模成功后 24 h 进行 Garcia JH 评分评估神经功能情况^[12]: 自主运动 (笼中观察 5 min)、体态对称性 (提起尾部使之悬空观察四肢)、前肢伸展运动 (提起尾部使之悬空前肢行走观察)、身体触觉感觉、胡须触觉反射、攀爬实验。

1.4 脑水含量的检测 各组随机选取 4 只大鼠, 麻醉后断头取脑, 去除皮质表面血渍后, 高精度电子天平上称重, 为脑组织湿重; 恒温烘烤箱内烘烤 (100℃) 24 h, 再次称重为干重。脑水含量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.5 免疫组化染色 各组随机选取 4 只大鼠, 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 4% 多聚甲醛灌注固定, 取海马组织石蜡包埋, 冠状位切片 (厚度为 4 μm), 脱蜡脱水, 抗原修复, 3% H₂O₂ 灭活, 滴加一抗 NLRP3 (1:200)、Caspase-1 (1:200) 恒温孵育 2 h, DAB 显色, 冲洗、脱水、封片, 400 倍光镜下观察, 随机取 6 个视野, 分析阳性细胞数。

1.6 ELISA 检测 各组大鼠随机选取 4 只, 麻醉断头取海马脑组织并剪碎, 分为两部分, 一部分进行免疫印迹法检测, 一部分进行 ELISA 检测。用生理盐水进行匀浆, 3500 转/min 离心 15 min, 取上清液, 按 ELISA 试剂盒 (美国 Biofine 公司) 标准步骤检测白细胞介素 (interleukin, IL) 1β、IL-18 的浓度。

1.7 免疫印迹法检测 取海马组织, 加入裂解缓冲液, 用超声裂解仪充分裂解, 离心取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 电泳、转 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, NLRP3 (1:1 000; 美国 Affinity 公司)、Caspase-1 (1:1 000; 美国 Affinity 公司)、GAPDH (1:1 000; 上海江莱生物科技有限公司) 一抗 4℃ 孵育过夜, 洗膜后二抗 (北京西美杰科技有限公司) 孵育 1 h, ECL 底物发光, 采集图片。GAPDH 为内参对照, Image J 软件分析目的条带灰度值。

1.8 统计学方法 用 SPSS 20.0 软件分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Garcia JH 评分的比较 与对照组比较, 模型组大鼠 Garcia JH 评分明显降低 (*P* < 0.05; 图 1); 与模型组比较, 醒脑静组 Garcia JH 评分显著增高 (*P* < 0.05; 图 1)。

2.2 各组大鼠脑含水量的比较 与对照组比较, 模型组脑水含量明显升高 (*P* < 0.05; 图 2); 与模型组比较, 醒脑静组脑水含量明显减少 (*P* < 0.05; 图 2)。

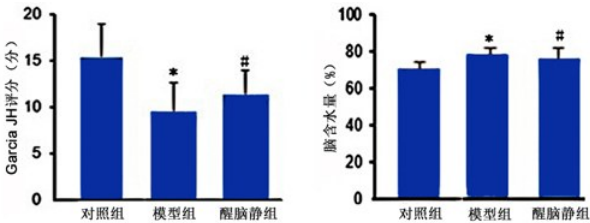


图 1 各组大鼠 Garcia JH 评分和脑含水量的比较
与对照组相比, * *P* < 0.05; 与模型组相比, # *P* < 0.05

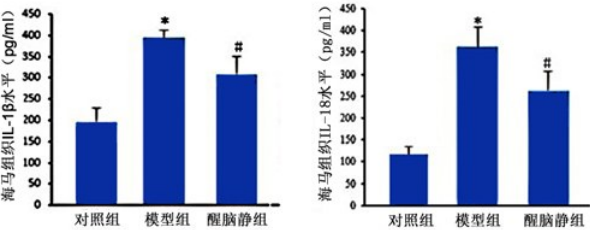


图 2 各组大鼠海马组织 IL-1β、IL-18 水平的比较
与对照组相比, * *P* < 0.05; 与模型组相比, # *P* < 0.05

2.3 各组大鼠海马组织蛋白表达水平比较 与对照组比较,模型组海马组织 IL-1 β 、IL-18、NLRP3、Caspase-1 水平明显升高($P<0.05$;图 2~5);与明显组比较,醒脑静组海马组织 IL-1 β 、IL-18、NLRP3、Caspase-1 水平明显降低($P<0.05$;图 2~5)。

3 讨论

SAH 后 EBI 影响病人的预后,早期调控氧化应激、炎症反应是改善 SAH 病人神经功能预后的关键措施。EBI 是 SAH 后 72h 内发生的脑组织损伤,在迟发性脑血管痉挛发生之前发生的变化。新近研究表明 SAH 后 EBI 的主要的病理生理机制有颅内压升高导致血流量减少,皮层去极化导致细胞水肿,神经炎

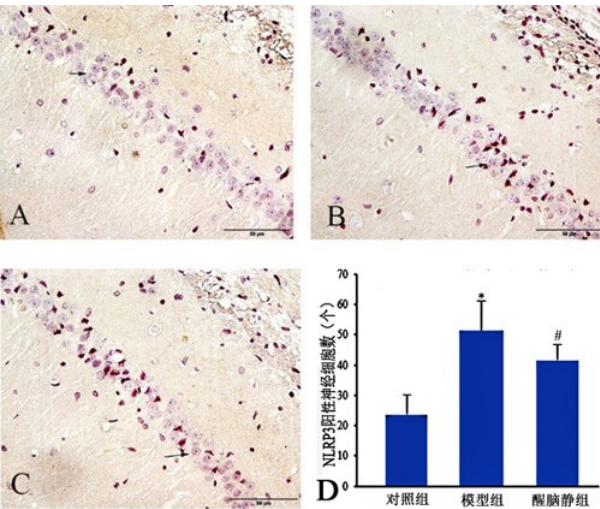


图3 各组大鼠海马区 NLRP3 阳性神经细胞数的比较(免疫组化染色,×400)
与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

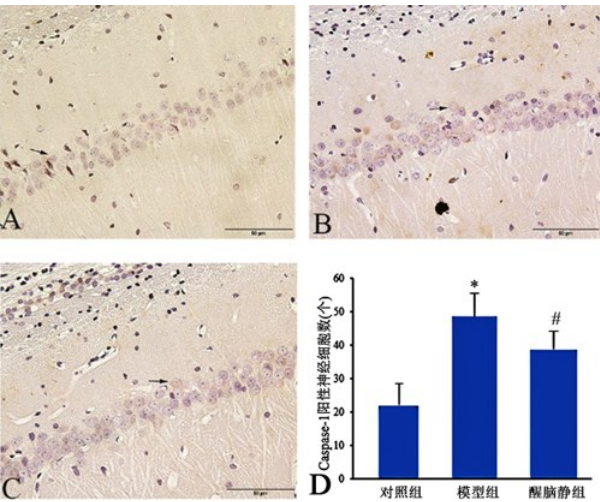


图4 各组大鼠海马区 Caspase-1 阳性神经细胞数的比较(免疫组化染色,×400)
与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

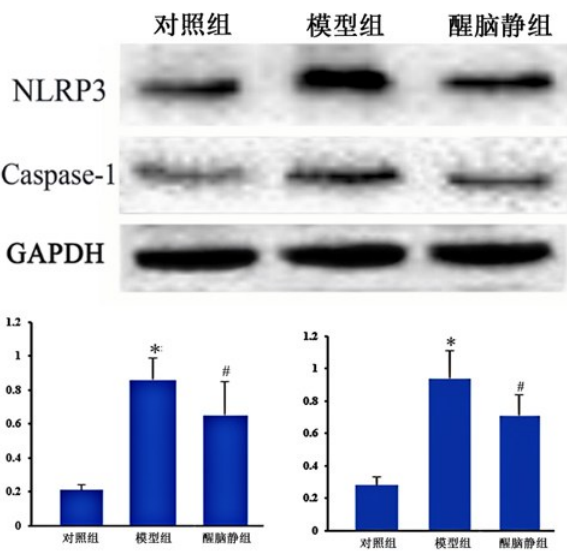


图5 免疫印迹法检测各组大鼠海马区 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平的比较
与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

症因子影响神经修复等^[13-15]。细胞死亡在 EBI 过程中发挥重要作用。

SAH 后血液流入蛛网膜下腔,血液成分降解,各种炎症因子引入蛛网膜下腔,进入脑表面,诱导细胞焦亡,引起脑损伤^[8]。细胞焦亡为新近提出的一种 Caspase 依赖的重要的程序性细胞死亡方式^[16],不同于细胞凋亡、坏死、自噬,可通过改变周围环境的炎症改变,进而影响神经功能及其预后。Caspase 家族中 Caspase-1 是细胞焦亡经典途径的关键蛋白,在其活化的过程中炎症小体发挥重要作用^[17]。本研究选用检测细胞焦亡蛋白 NLRP3 及 Caspase-1 的表达反映细胞焦亡水平,结果显示大鼠 SAH 后脑水含量增多,脑组织 IL-1 β 、IL-18 升高,神经功能变差。Cao 等^[18]通过大鼠脑缺血模型发现细胞焦亡相关蛋白 NLRP1、Caspase-1 及 GSDMD 增加,抑制炎症小体 NLRP1 可改善脑缺血导致的神经损伤。Wei 等^[19]通过建立大鼠 SAH 模型研究表明在造模成功后 24 h 细胞焦亡明显增多,脑含水量增多,大鼠神经功能损伤。醒脑静注射液是由安宫牛黄丸改制而成^[15],麝香可抑制炎症血管的通透性,抑制白细胞粘附,减轻脑水肿;冰片开窍,促进药物通过血脑屏障;郁金改善微循环;栀子抑制血清炎症因子。本研究显示大鼠 SAH 后,脑组织 IL-1 β 、IL-18 升高,NLRP3 及 Caspase-1 表达增多,醒脑静注射液干预后,IL-1 β 、IL-18 降低,NLRP3 及 Caspase-1 表达明显减少,大鼠神经功能改善,表明其具有脑损伤保护作用。

本研究的不足:醒脑静注射液对细胞焦亡因子

NLRP3 及 Caspase-1 的影响机制复杂,可能是通过抑制炎症因子发挥作用,炎症反应、氧化应激等损伤可能是激活细胞焦亡的关键途径^[20],其涉及的具体作用机制有待于更进一步研究;此外,颈内动脉血管刺破法制作 SAH 模型^[12],大鼠蛛网膜下腔出血的量不好控制,目前此造模方法尚没有更严谨控制出血量的指标。

综上所述,醒脑静注射液可改善大鼠 SAH 后 EBI,可能与减轻神经细胞焦亡水平有关。

【参考文献】

[1] RASS V, HELBOK R. Early brain injury after poor-grade subarachnoid hemorrhage [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(10): 78.

[2] ZENG HH, CHEN HJ, LI M, *et al*. Autophagy protein NRBF2 attenuates endoplasmic reticulum stress-associated neuroinflammation and oxidative stress via promoting autophagosome maturation by interacting with Rab7 after SAH [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 210.

[3] KAMP MA, STEIGER HJ, VAN LIESHOUT JH. Experimental aneurysmal subarachnoid hemorrhage: tiding over [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(1): 1-3.

[4] 胡俞成,王翔,谭赢,等. 血红蛋白氧载体通过蛋白激酶 B 信号通路抑制细胞凋亡减轻蛛网膜下腔出血后早期脑损伤[J]. *中华实验外科杂志*, 2023, 40(5): 884-887.

[5] XIONG W, MENG XF, ZHANG C. NLRP3 inflammasome in metabolic associated kidney diseases: an update [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 1-9.

[6] LIU P, ZHANG ZD, LI Y. Relevance of the pyroptosis-related inflammasome pathway in the pathogenesis of diabetic kidney disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12(22): 1-11.

[7] DING BZ, MA GP, WANG ZN, *et al*. Mechanisms of kidney cell pyroptosis in chronic kidney disease and the effects of traditional Chinese medicine [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 11(10): 1173324.

[8] XU PF, TAO CR, ZHU YY, *et al*. TAK1 mediates neuronal pyroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 1-18.

[9] 李婧,张斌. 醒脑静注射液结合神经生长因子对老年

重型颅脑损伤预后及血清 MBP、NSE 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(7): 70-72.

[10] 王敏,贾敏,杜琬晴,等. 醒脑静注射液治疗脑出血的系统评价/Meta 分析再评价[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(18): 4633-4643.

[11] 郭丰,陆晓微,徐秋萍. 醒脑静与血塞通联合应用对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(23): 1645-1647.

[12] 孙林林,马玉德,张朋垒,等. 法舒地尔对蛛网膜下腔出血大鼠铁死亡的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(10): 1094-1097.

[13] 杨新宇,韩雨薇,陈立刚,等. C3G 通过 PKA/CREB 信号通路减轻成年小鼠 SAH 后早期脑损伤[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2022, 27(4): 278-282.

[14] ERIKSEN N, ROSTRUP E, FABRICIUS M, *et al*. Early focal brain injury after subarachnoid hemorrhage correlates with spreading depolarizations [J]. *Neurology*, 2019, 92(4): e326-e341.

[15] 李芳君,谢少玲. 醒脑静注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中药材*, 2011, 33(7): 1111-1113.

[16] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON SA, *et al*. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 486-541.

[17] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, *et al*. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3328.

[18] CAN YZ, ZHANG HX, LU XY, *et al*. Overexpression of microRNA-9a-5p ameliorates NLRP1 inflammasome mediated ischemic injury in rats following ischemic stroke [J]. *Neuroscience*, 2020, 444(15): 106-117.

[19] WEI BY, LIU WC, JIN L, *et al*. Dexmedetomidine inhibits gasdermin D-induced pyroptosis via the PI3K/AKT/GSK3 β pathway to attenuate neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16(21): 899484.

[20] 文海韬,陈小燕,安喆妮,等. 醒脑静注射液激活 Nrf2/NLRP3/GSDMD 信号通路抑制氧糖剥夺/再灌注损伤后神经细胞焦亡的研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2023, 22(7): 680-685.

(2023-05-19 收稿, 2023-09-27 修回)