

三七总皂苷对脑缺血大鼠神经血管单元的影响^①

蒙兰青, 陆婉杏, 黄建敏, 黄晓华, 黄清, 袁胜山^②

(右江民族医学院附属医院神经内科, 广西 百色 533000 E-mail: menglanqing@sina.com)

摘要: **目的** 观察三七总皂苷对脑缺血再灌注后大鼠神经血管单元(NVU)的影响,进一步探讨三七总皂苷在脑缺血中作用特点。**方法** Wistar大鼠60只随机分为对照组(20只),假手术组(20只)和三七总皂苷组(20只),每个组又按再灌注后24 h、7 d分为2个亚组,每个亚组大鼠10只。制作右大脑中动脉阻断(MCAO)再灌注模型后,三七总皂苷组大鼠立即腹腔注射三七总皂苷,以后每日1次直至相应时间点,对照组在相同时间内腹腔注射同体积的生理盐水。采用Longa法进行神经功能缺损评分,免疫组织化学染色法检测层黏连蛋白(Laminin)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元核抗原(NeuN)蛋白表达。**结果** 再灌注后24 h,三七总皂苷组和对照组大鼠神经功能缺损均比术后2 h加重,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。再灌注后7 d,三七总皂苷组和对照组大鼠神经功能缺损评分均有改善,但三七总皂苷组大鼠神经功能缺损评分改善比对照明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。再灌注后24 h,三七总皂苷组和对照组均有NeuN、GFAP和Laminin蛋白表达,三七总皂苷组比对照组增多,但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。再灌注后7 d,对照组NeuN、GFAP和Laminin蛋白的表达增多,三七总皂苷组明显增多,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);假手术组NeuN、GFAP和Laminin蛋白表达无明显变化。**结论** 三七总皂苷促进脑缺血后NVU组分神经元、胶质细胞和微血管的修复,在脑梗死中具有多靶点、多方位作用特点。

关键词: 三七总皂苷;脑缺血;再灌注;神经血管单元

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)01-0007-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.01.003

Effects of Panax Notoginseng Saponins on neurovascular unit in rats with brain ischemia

Meng Lanqing, Lu Wanxing, Huang Jianmin, Huang Xiaohua, Huang Qing, Yuan Shengshan

(Department of Internal Neurology, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: menglanqing@sina.com)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Panax Notoginseng Saponins (PNS) on neurovascular unit (NVU) in rats with ischemia-reperfusion and to further study the role that PNS plays in treatment of cerebral ischemia. **Methods** Sixty Wistar rats were randomized to a control group ($n = 20$), a sham-operation group ($n = 20$) and a PNS group ($n = 20$). Each group was subdivided into two subgroups according to time points of 24 h and 7 d after reperfusion. After the right middle cerebral artery occlusion (MCAO)-reperfusion models were developed, rats of PNS group were given intra-peritoneal injection of PNS immediately, afterwards, once daily till the corresponding time points. Rats of control group received intra-peritoneal injection of the same volume normal saline at the same time. A Longa neurological deficit score was used to evaluate the neurological deficit grade. An immunohistochemistry staining method was used to measure the expressions of Laminin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuronal nuclei (NeuN). **Results** At 24h after reperfusion, rats neurological deficit in PNS group and control group were more serious than those at 2 h after operation, compared PNS group to control group, there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). At 7 d after reperfusion, neurological deficit scores in the PNS group and control group had been improved, the PNS group was superior to the control group, there was statistically significant difference ($P < 0.05$). At 24 h after reperfusion, both PNS group and control group had positive-expressions of NeuN, GFAP and Laminin, and PNS group had more positive-expressions of NeuN, GFAP and Laminin than control group, but compared PNS group to control group, there were no statistically significant differences ($P > 0.05$). At 7 d after reperfusion, the positive-expressions of NeuN, GFAP and Laminin in the control group elevated, the positive-expressions of NeuN, GFAP and Laminin in the PNS group elevated more obviously, and compared PNS group to control group, there were statistically significant differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The positive-expressions of NeuN, GFAP and Laminin in the sham-operation group remained the same. **Conclusion** PNS can

① 基金项目:广西自然科学基金(2060203246);广西壮族自治区卫生厅重点课题(Z2009270)

② 通讯作者,E-mail:shan5212@163.com

enhance the repair of NVU neurons, glial cells and microvessels in cerebral ischemia, which has the characteristics of multi-target and -location function in treatment of brain infarction.

Key words: Panax Notoginseng Saponins; brain ischemia; reperfusion; neurovascular unit

2008年中国第三次死因回顾抽样调查资料表明,脑卒中已上升为中国的首位死因,幸存者中残疾率高达75%^[1]。脑卒中中缺血性卒中占60%~80%,缺血性脑损伤机制繁多复杂又相互联系,脑缺血不仅导致脑神经元损伤,而且还损伤胶质细胞和作为供给胶质细胞、神经元氧和营养物质的微血管,即神经血管单元(neurovascular unit, NVU)的均受损^[2]。我们前期研究和目前的研究已发现三七总皂苷具有抑制脑卒中后的细胞凋亡、脑水肿和炎症反应等多种作用。但是三七总皂苷对脑缺血后 NVU 的影响目前报道较少。因此,我们基于 NVU 整体概念,观察三七总皂苷对脑缺血后神经元、胶质细胞、微血管的影响,进一步探讨其在脑缺血中的作用特点。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar 大鼠 60 只,体重(240±20)g,清洁级,购自右江民族医学院实验动物中心。

1.1.2 药物与试剂 三七总皂苷(血塞通注射液,昆明兴中制药有限公司,批号:20051102),小鼠抗大鼠 NeuN 单克隆抗体和兔抗鼠 GFAP 多克隆抗体购自美国 Millipore 公司,兔抗鼠 Laminin 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模 所有大鼠随机分为对照组(20只),假手术组(20只)和三七总皂苷组(20只),每个组又按术后24h、7d分为2个亚组,每个亚组大鼠10只。参照 Longa 等^[3]大鼠大脑中动脉缺血模型的造模方法。大鼠以10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉,颈正中切开逐层分离暴露右颈总动脉大、颈外动脉,线栓沿颈总动脉经颈内动脉入颅阻断大脑中动脉,遇到阻力即停止,从颈总动脉分叉处计算插入深度(18±2)mm,假手术组插入深度小于10mm。阻断2h后拔出线栓造成再灌注。手术后2h采用 Longa 等^[3]神经功能缺损评分标准对造模情况进行评价(具体见下的评分标准),1~3分为造模成功,及时差额补充保证每组的实验动物例数。

1.2.2 造模后的干预措施 大鼠成功造模后,立即给三七总皂苷组大鼠腹腔注射三七总皂苷(血塞通注射液,昆明兴中制药有限公司,批号:20051102)30 mg·kg⁻¹,以后每日一次直至相应时间点。对照组在相同时间内腹腔注射同体积的生理盐水。假手术组未做任何干预。

1.2.3 指标检测

1.2.3.1 神经功能缺损评定 在再灌注后2h、24h和7d采用 Longa 等^[3]的神经功能缺损评分标准进行肢体功能评估,即0分,无神经功能缺损症状;1分,大鼠提尾倒挂时,病灶左侧前肢呈屈曲、不能伸展;2分,向左侧转圈;3分,向左侧跌倒的征象,即行走困难并向右侧倾倒;4分,不能自行行走,意识水平呈下降状态。

1.2.3.2 NVU 相关指标检测 在时间点24h和7d对各亚组大鼠用10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后,先后以生理盐水及4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液经心脏灌注固定,断头取脑,脑组织置于冰冻切片机上做冰冻切片,片厚8 μm。每只大鼠取含缺血灶的3张脑片(假手术组则为相对应区域)用于检测层黏连蛋白(Laminin)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)的表达,免疫组织化学染色采用 SP 法,具体方法按试剂盒说明书进行。每张脑片选取5个不同的高倍视野镜(×400),计算

单位面积内的阳性细胞(棕黄色)数,取其均数。

1.2.4 统计学分析 检测结果以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理,各组间差异采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损情况 再灌注后2h,三七总皂苷组和对照组大鼠神经功能评分差异无统计学意义($P > 0.05$),假手术组不出现神经功能缺损。再灌注后24h,三七总皂苷组和对照组大鼠神经功能缺损均比再灌注后2h加重,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。再灌注7d,三七总皂苷组和对照组大鼠神经功能缺损评分均有改善,但三七总皂苷组大鼠神经功能缺损评分改善比对照组明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。假手术组大鼠神经功能缺损评分均为0。见表1。

表1 三组大鼠再灌注后不同时间点神经功能缺损情况比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	2 h	24 h	7 d
三七总皂苷组	20	1.82±0.23	2.23±0.35	0.84±0.12 ^a
对照组	20	1.95±0.25	2.17±0.19	1.48±0.19
假手术组	20	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

注:与对照组比较, a: $P < 0.05$

2.2 再灌注后不同时间点 NVU 指标表达情况 再灌注后24h,三七总皂苷组和对照组大鼠脑组织出现 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达,三七总皂苷组比对照组稍增多,但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。再灌注后7d,对照组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白增多;而三七总皂苷组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达明显增多,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);假手术组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 蛋白表达无明显变化。见表2、图1。

3 讨论

近年来随着对中枢神经系统微观结构和功能认识的深入,人们发现神经元、胶质细胞和微血管在脑组织发育的过程中相互调节、相互作用,关系密切,即血管系统为脑细胞(神经元、胶质细胞)提供氧气、葡萄糖和各种激素,并引导细胞对局部环境做出恰当的应答,脑细胞调节血管的功能以适应局部的需求,胶质细胞参与神经元的营养、支持及电生理活动的调节。在病理过程如脑卒中发生后,这3种成分也互相影响^[4-5]。于是,2003年亚裔美国科学家 Lo 提出了 NVU 的概念,此概念的提出旨在强调神经元、神经胶质细胞和血管之间相互联系及相互作用的重要性。可以认为由微血管、微血管周围的星形细胞突起及由这些突起所支持的神经元以及其轴突共同组成的 NVU 是中枢神经系统基本结构和功能单位。NeuN 为表达在神经系统大多数神经元胞核和胞浆中的特异性蛋白质,是成熟神经元的特异性标志物^[6]。GFAP 为星形胶质细胞合成的重要骨架蛋白,是星形胶质细胞的特征性标记物^[7]。Laminin 与 IV 型胶原特定定位点结合形成复杂立体结构,维持着基底膜正常功能和稳定结构,对维持脑屏障完整性和功能有重要作用, Laminin 是检测血管基底膜完整性的敏感指标^[8]。

表 2 三组大鼠再灌注后不同时间点 NVU 相关指标表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h			7 d		
	NeuN(个)	GFAP(个)	Laminin(支)	NeuN(个)	GFAP(个)	Laminin(支)
三七总皂苷组	6.12±0.78	18.23±2.35	30.84±3.12	14.45±1.25 ^a	40.45±2.53 ^a	62.92±2.58 ^b
对照组	5.65±0.55	16.87±2.19	27.48±2.19	10.91±0.95	31.19±2.25	40.95±2.25
假手术组	10.34±1.59	38.39±1.98	60.25±2.30	11.32±1.45	37.55±2.15	58.95±3.05

注:再灌注后 7 d 时,与对照组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$

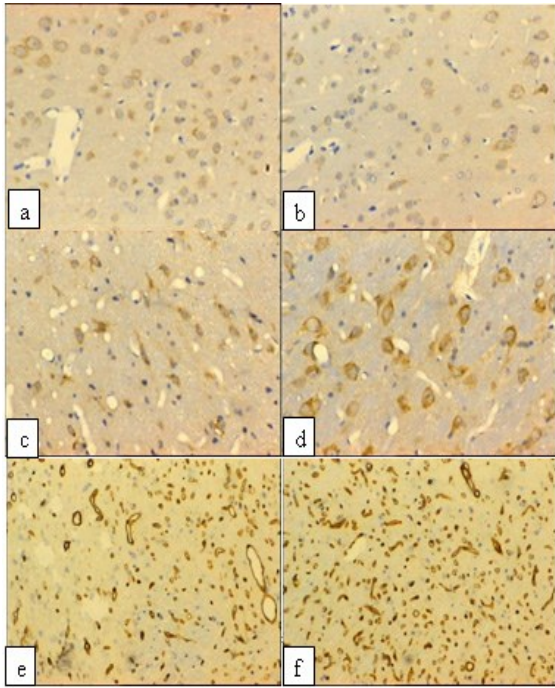


图 1 再灌注后 7 d 时,三七总皂苷组和对照组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 蛋白的表达(SP 法 $\times 400$)

其中,a 为三七总皂苷组 NeuN 蛋白的表达,b 为对照组 NeuN 蛋白的表达;c 为三七总皂苷组 GFAP 蛋白的表达,d 为对照组 GFAP 蛋白的表达;e 为三七总皂苷组 Laminin 蛋白的表达,f 为对照组 Laminin 蛋白的表达

NVU 与缺血性脑损伤的发生发展关系密切,缺血时不仅神经元,而且胶质细胞、神经轴突和微血管均受到损伤,神经元,胶质细胞和血管内皮之间的损伤存在相互促进的关系,NVU 中任何组分的损伤都会波及到其他组分^[4],这提示脑梗死的治疗目标应从过单一的对神经元保护,扩展为对神经血管单元各组分全面的保护。药物治疗的靶点也应针对缺血损伤中神经血管单元中的各种组成成分,进行多途径、多方位的治疗。

研究已证实一些中成药多具有多靶点、多途径的作用特点。中成药三七总皂苷目前已发现具有减轻脑梗死后的炎症反应、血管内皮的保护作用、促进神经干细胞的增殖分化等多作用靶点^[9-11]。三七总皂苷对缺血性脑损伤后 NVU 影响的研究国内外报道不多。在本研究中,我们发现缺血再灌注后 24 h,不管三七总皂苷组或对照组大鼠脑组织均出现 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达,三七总皂苷组比对照组增多,但两组比较差异无统计学意义,对照组出现 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达是机体对缺血损伤自动修复的表现,由于三七总皂苷对脑缺血的作用需要一个过程,故再灌注后 24 h 时三七总皂苷组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达与对照组相差不大。脑缺血时由于 NVU 各组分均受损伤,所以再灌注

后 24 h 时,三七总皂苷组或对照组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白染色明显比假手术组少。缺血再灌注后 7 d 时,三七总皂苷组或对照组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达增多,与对照组比较,三七总皂苷组大鼠脑组织 NeuN、GFAP 和 Laminin 的蛋白表达明显增多,神经功能缺损评分也比对照组改善,研究结果提示三七总皂苷促进脑缺血后 NVU 组分神经元、胶质细胞和微血管的修复。本研究进一步证实三七总皂苷在脑梗死中具有多靶点、多方位的治疗作用,可同时作用于 NVU 中的神经元、胶质细胞和微血管,其具体机制尚有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王陇德. 脑卒中筛查与防治工程:关注动脉硬化的高危因素——探求尽快降低我国脑卒中发病、死亡和伤残之策[J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2011,3(3):1-3.
- [2] 崔庆宏,陈慧,张拥波,等. 脑缺血机制再认识及神经血管单元的保护[J]. 中华神经医学杂志,2012,11(1):102-104.
- [3] Longa EZ, Weinstdn PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [4] del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2009,158(3):972-982.
- [5] 王娟,张微微,魏微,等. 缺血后大鼠脑内神经血管单元病理损害的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2010,12(9):841-843.
- [6] 王新红,段丽,曹荣,等. 神经元核抗原在大鼠中枢神经系统神经元的不同表达[J]. 解剖学报,2008,39(3):381-385.
- [7] Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein(GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation[J]. Braz J Med Bio Res, 1999,32(5):619-631.
- [8] Sasaki T, Fassler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly[J]. J Cell Biol, 2004, 164(7):959-963.
- [9] 蒙兰青,韦叶生,韦世革,等. 三七总皂甙对急性脑梗死患者血清 TNF- α 和 IL-6 水平的影响[J]. 中国康复医学杂志,2008,23(3):205-207.
- [10] 司银楚,李巾伟,张丽娟,等. PNs 促进脑出血后侧脑室室管膜下神经干细胞的增殖和分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(8):1414-1417.
- [11] 方正旭,朱亮,梁建萍,等. 三七总皂甙对凝血酶诱导血管平滑肌细胞增殖活性的影响[J]. 江西医药,2010,45(1):11-14.

收稿日期:2014-01-20