

本文引文格式:陈维,陈玉珍,方子文,等.三七总皂苷对缺血性脑卒中肠道功能影响的探讨[J].
右江民族医学院学报,2023,45(2):213-217.

【论著与临床报道】

三七总皂苷对缺血性脑卒中肠道功能影响的探讨

陈维^{1,2}, 陈玉珍^{1,2}, 方子文^{1,2}, 杨林幅^{1,2}, 王国燮^{1,2}, 徐海平^{1,2}, 牙红连^{1,2}, 彭浩强^{1,2}, 蒙兰青²

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院神经内科, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨三七总皂苷对缺血性脑卒中后肠道相关蛋白及肠道功能的影响。方法 将36只SPF级SD大鼠随机分为3组:假手术组、模型组和治疗组,3组继续分为7d和14d两个亚组。通过苏木素和伊红染色观察肠道病理学变化;采用Chiu病理评分评估肠道的组织学改变程度;通过免疫组织化学检测肠道Occludin和ZO-1蛋白的表达量。结果 在假手术组中,肠黏膜正常,绒毛排列整齐,上皮完整;模型组肠道绒毛数量减少、形态破坏,治疗组与模型组的Chiu病理评分相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。模型组肠道的Occludin和ZO-1蛋白表达量减少,治疗后肠道Occludin和ZO-1蛋白表达量有所恢复,在不同时间点,治疗组的Occludin蛋白表达量与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);在不同时间点,治疗组的ZO-1蛋白表达量与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 三七总皂苷在治疗缺血性脑卒中时可以通过改善肠道的Occludin和ZO-1蛋白表达量,改善肠道功能,从而达到治疗目的。

关键词:三七总皂苷;卒中;紧密连接蛋白;肠道功能

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2023)02-0213-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.008

Effect of panax notoginseng saponins on intestinal function in patients with ischemic stroke

Chen Wei^{1,2}, Chen Yuzhen^{1,2}, Fang Ziwen^{1,2}, Yang Linfu^{1,2}, Wang Guoxie^{1,2},
Xu Haiping^{1,2}, Ya Honglian^{1,2}, Peng Haoqiang^{1,2}, Meng Lanqing²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical
University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of panax notoginseng saponins on intestinal related proteins and intestinal function of patients after ischemic stroke. **Methods** Thirty-six specific-pathogen-free (SPF) SD rats were randomly divided into three groups: the sham operation group, the model group and the treatment group. The three groups were further divided into 7-day and 14-day subgroups. Intestinal pathological changes were observed by hematoxylin and eosin staining. Chiu pathological scoring was used to evaluate the degree of intestinal histological changes. The expressions of intestinal Occludin and ZO-1 protein were detected by immunohistochemical assay. **Results** In the sham operation group, the intestinal mucosa was normal, the villi were neatly arranged, and the epithelium was intact. In the model group, the number of intestinal villi decreased and their morphology was damaged. The difference in Chiu pathological scoring between the treatment group and the model group was statistically significant ($P < 0.05$). The protein expressions of intestinal Occludin and ZO-1 decreased in the model group, and they recovered a bit after treatment. At different

基金项目:国家自然科学基金项目(82160895)

第一作者简介:陈维(1992-),女,在读硕士研究生,研究方向:脑血管病的基础与临床研究,E-mail:417402737@qq.com

通讯作者简介:蒙兰青(1972-),男,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:脑血管病的基础与临床研究,E-mail:menglanqingsj@qq.com

time points, the difference in Occludin expression between the treatment group and the model group was statistically significant ($P < 0.05$), and the difference in ZO-1 protein expression between the treatment group and the model group was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Panax notoginseng saponins can improve intestinal function by regulating protein expressions of intestinal Occludin and ZO-1 in the treatment of ischemic stroke.

Key words: panax notoginseng saponins; stroke; tight-junction protein; intestinal function

脑卒中是常见的脑血管疾病,分为缺血性卒中和出血性卒中,其中缺血性卒中占 80%^[1],其发病机制复杂,不仅对中枢神经系统有影响,而且还影响胃肠道,如胃肠动力改变、便秘或大便性状改变、肠道黏膜受损等肠道结构功能损害^[2]。胃肠道不仅受自身肠道信号调节,同时也受到中枢神经的调控;肠脑轴是肠道和大脑之间的双向信号传递和关联,在缺血性脑卒中的进展中肠脑轴具有重要作用,其中肠道屏障也是不可或缺的^[3],因此保护肠道结构和功能对缺血性卒中治疗具有重要意义。

三七总皂苷是中草药三七的主要活性成分,实验及临床研究表明,三七总皂苷通过抗炎、抗氧化,保护血脑屏障等作用改善缺血性脑卒中再灌注损伤^[4-5],发挥脑保护作用。三七总皂苷在缺血性脑卒中治疗中是否作用于肠道,保护肠道结构,改善肠道功能,目前少见报道。为此,本试验将探讨三七总皂苷对缺血性脑卒中后肠道结构和功能的影响,为三七总皂苷治疗缺血性脑卒中提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠(体重 250~300 g, SPF 级别)购自长沙天勤[动物合格证号:SCXK(湘)2019-0014]。将大鼠饲养在维持 12 h 光照/黑暗循环,环境温度保持在(24±2)℃,湿度(55±15)%的屋子里,所有大鼠每天可自由饮水和进食,在实验开始前适应性的喂养大鼠 7 d。

1.2 动物卒中模型和分组 将 36 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组、模型组和治疗组,3 组继续分为 7 d 和 14 d 两个亚组,每个亚组 6 只。将大鼠麻醉后,颈正中切开皮肤,分离肌肉及筋膜,分离右侧颈总动脉和颈内外动脉,结扎颈总动脉远端及颈外动脉近分叉口处,在颈总动脉开小口放入线栓栓塞颈内动脉,固定线栓,缝合颈部皮肤,2 h 后取出线栓,观察大鼠。假手术组只开颈部皮肤,分离颈总动脉和颈内外动脉,不穿刺,然后缝合颈部皮肤。治疗组腹腔注射三七总皂苷(100 mg/kg 剂量,每天 1 次,分别给药 7 d 和 14 d),其他两组给予相同剂量的生理盐水。每天记录大鼠的体重和神经评分,神经功能评分按照 Longa 评分^[6]:0 分,无缺陷,活动正常,或提尾倒挂时大鼠双前肢对称伸向地面;1 分,提尾时不能完全伸展病灶对

侧前肢;2 分,行走向对侧转圈;3 分,站立不稳、向偏瘫侧倾倒;4 分,不能主动行走,意识丧失。1~3 分视为制模成功。

1.3 组织学检查 取出大鼠小肠 1 cm,用多聚甲醛固定并包埋在石蜡中,切成 3 μm 切片,然后用苏木素和伊红染色,在光学显微镜下由病理医生在不知情的情况下评分,小肠黏膜损伤以 Chiu's 为评分标准^[7]。黏膜损伤的 Chiu 病理评分量表用于评估每个 1 mm 的 10 个切片的组织学改变程度,然后取平均值。量表由 0~5 的值组成,其中 0 为正常小肠黏膜绒毛;1 为在绒毛中轴出现肠黏膜上皮下的间隙,常常伴随毛细血管充血;2 为来自固有膜的肠黏膜上皮抬高以及肠上皮间隙的扩张;3 为大片肠黏膜上皮抬高,绒毛向两侧倒伏,偶有裸露的绒毛尖端;4 为裸露的绒毛有外露的固有层和扩张的毛细血管,可看到固有膜细胞成分构成增加;5 为固有膜蜕变或被消化,出血或溃疡形成。

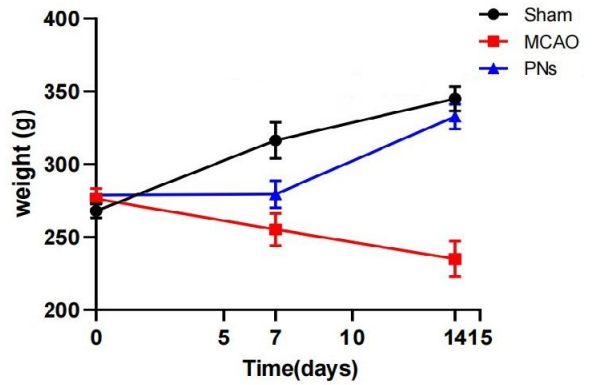
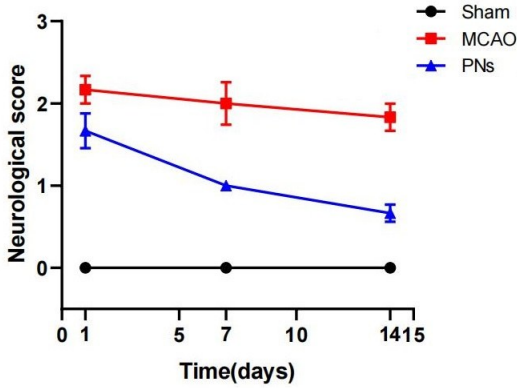
1.4 免疫组织化学 切取 3 μm 的切片在 60℃ 烤箱烘烤 1~2 h,再经过二甲苯(10 min)—二甲苯(10 min)—二甲苯(10 min)—无水酒精(5 min)—90%酒精(5 min)—80%酒精(5 min)—70%酒精(5 min),取出切片用蒸馏水冲洗 1 min,置于 PBS 缓冲液中。柠檬酸钠缓冲液中进行高温抗原修复(100℃,20 min),修复后冷却至常温,用 PBS 洗涤(3 min×3 次),滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min,用 PBS 洗涤,将配制好的一抗滴加在组织上放置于 4℃ 过夜,用 PBS 洗涤(3 min×3 次),滴加酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物,37℃ 孵育 20 min;用 PBS 洗涤(3 min×3 次),用新鲜配置的 DAB 室温孵育 5 min,自来水冲洗,苏木素染色液孵育 20 s;分化、冲洗返蓝;脱水、透明、中性树脂封片,光学显微镜观察(×200),随机选取 6 个视野并拍照,棕色颗粒即为阳性表达。Image pro-plus 软件测定每个视野下的棕色颗粒的光密度(OD)值,计算平均值。

1.5 统计学方法 用 SPSS 20.0 软件进行数据统计,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。三组之间的统计显著性通过单因素方差分析(ANOVA)确定,对所有数据方差齐性检验。若方差相等,采用 LSD 检验;若方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠神经评分和体重监测的变化 记录每只大鼠不同天数的体重及神经评分,并绘制成图,造模成功

大鼠的神经功能评分维持在较高水平且体重呈下降趋势;治疗组与模型组比较,用药后大鼠神经功能评分降低,神经功能改善且体重下降改善,见图 1。



注:Sham 为假手术组,MCAO 为模型组,PNs 为三七总皂苷组 (n=6)。

图 1 记录大鼠造模成功后 7 d 和 14 d 的神经功能评分和体重变化

2.2 肠道病理学的变化 通过苏木素和伊红染色后观察肠道病理学变化(放大倍数×100),结果显示,在假手术组中,大鼠小肠绒毛排列整齐,上皮完整。模型组在 7 d 和 14 d 的肠道破坏、受损且恢复不佳,用药后大鼠的肠道绒毛数量和形态都有所恢复,见图 2。在病理科医生不知情的情况下进行评分,记录每个图片的分值并进行统计学计算,7 d 和 14 d 模型组与假手术组比较,差异具有统计学意义(P<0.05);治疗组和模型组在 7 d 和 14 d 分别进行比较,差异亦具有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 不同时间点大鼠肠道 HE 染色 Chiu 评分

组别	n	第 7 天	第 14 天
假手术组	6	0.17±0.18	0.28±0.25
模型组	6	2.65±0.61 ^a	2.53±0.46 ^c
治疗组	6	0.90±0.23 ^b	1.22±0.46 ^d
F		65.163	46.942
P		<0.001	<0.001

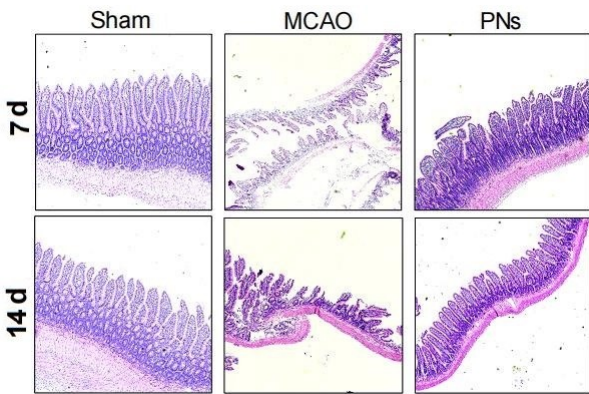
注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。②组内之间两两比较,与假手术组相比,a: P<0.05,c: P<0.05;与模型组相比,b: P<0.05,d: P<0.05。

表达增加;ZO-1 主要在肠上皮细胞中,假手术组中 ZO-1 分布均匀,模型组可见 ZO-1 蛋白表达减弱,分布不均,三七总皂苷治疗后,ZO-1 蛋白表达信号增强,见图 3。在不同时间点,模型组和假手术组比较,差异具有统计学意义;在不同时间点治疗组和模型组两两比较,差异具有统计学意义,见表 2。

3 讨论

肠道是人体最大的消化系统,包含消化、代谢调节和免疫等功能^[8],同时肠也是创伤后应激的核心器官,在某些严重应激事件(烧伤、中暑、创伤、脑事件和移植等)中,可能会引发一系列肠道事件,包括肠道黏膜破坏、屏障功能障碍、肠道细菌和内毒素移位以及上消化道出血^[2]。有实验表明,缺血性中风不仅会改变肠道微生物,还会增加肠道屏障的渗透性^[3]。

缺血性脑卒中后,自主神经系统失调降低肠动力,破坏肠黏膜屏障的完整性^[9],导致卒中预后不良^[10]。同时肠道微生物与肠道屏障密切接触,肠道细菌在肠上皮的黏膜层栖息,当黏膜层破坏时会导致致病菌的入侵,在破坏肠道屏障同时激活肠道淋巴细胞,启动免

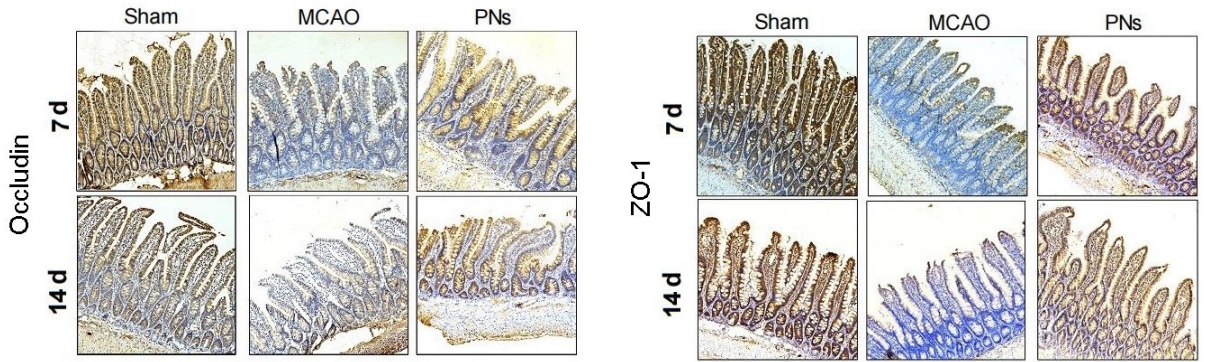


注:Sham 为假手术组,MCAO 为模型组,

PNs 为三七总皂苷组 (n=6)。

图 2 肠道 HE 染色图(光镜×100)

2.3 肠道 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达量的变化情况 对肠道切片进行免疫组织化学,检测紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的蛋白含量,Occludin 蛋白主要在黏膜绒毛下连续均匀分布,假手术组 Occludin 蛋白分布均匀、连续,模型组分布减少,治疗后 Occludin 蛋白



注:Sham 为假手术组,MCAO 为模型组,PNs 为三七总皂苷组 ($n=6$)。

图 3 光镜下($\times 200$)肠道 Occludin 和 ZO-1 的组织化学图

表 2 大鼠肠道不同时间段 Occludin 和 ZO-1 蛋白的组织免疫化学 OD 值

组别	n	Occludin		ZO-1	
		第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	6	0.88±0.26	0.51±0.06	0.91±0.20	0.68±0.12
模型组	6	0.42±0.06 ^a	0.21±0.04 ^e	0.33±0.10 ^e	0.22±0.05 ^g
治疗组	6	0.63±0.07 ^b	0.40±0.07 ^d	0.63±0.10 ^f	0.47±0.08 ^h
F		12.223	44.508	24.276	39.793
P		0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。②与假手术组相比,a: $P<0.05$,c: $P<0.05$,e: $P<0.05$,g: $P<0.05$;与模型组相比,b: $P<0.05$,d: $P<0.05$,f: $P<0.05$,h: $P<0.05$ 。

疫反应,进一步破坏肠道屏障。细菌的代谢物也会对肠道屏障产生影响,当缺血性脑卒中发生后肠道的致病菌增多并伴代谢产物的变化,而细菌代谢产物也参与了中风后肠道屏障的破坏^[11]。肠屏障主要分为机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障^[12],肠上皮细胞及细胞之间的紧密连接构成肠道的物理屏障。肠道的紧密连接形成蛋白质膜是细胞间连接的一个重要形式,是构成黏膜机械屏障的最重要结构,调节哺乳动物细胞间离子和溶质的扩散。紧密连接包括跨膜蛋白,如 Claudin、Occludin 和连接黏附分子-A(JAM-A),以及细胞内斑块蛋白,如闭塞带(ZOs)和扣带蛋白^[9,13]。Occludin 是跨膜蛋白的胞内结构域,与细胞质斑块蛋白相关,为紧密连接提供了结构支架。紧密连接中的支架分子包括 ZOs 和 Cinglin。Occludin 和许多 Claudin 亚型与 ZOs(ZO-1,ZO-2,ZO-3)的 N 端的多结构域结合,而 ZO 的 C 端区域与肌动蛋白细胞骨架相互作用,而细胞骨架与紧密连接结构的关联对紧密连接功能的调节和维持至关重要^[14]。

紧密连接对于肠道屏障的通透性非常重要,破坏后肠道内外稳态失衡,菌群发生移位,有害物质能够穿透肠壁,由肠道转移至血液中,导致免疫炎症反应激活,释放大量炎症因子,这些炎症因子随血液循环穿过血脑屏障,加重缺血性脑损伤^[2,15-16]。本实验发现:缺血性脑卒中后肠道绒毛数量减少、形态破坏,肠道屏障

受损,Occludin 和 ZO-1 蛋白的表达量减少,动物神经功能评分增加、体重下降,且肠道屏障受损严重程度和神经评分呈正相关。经三七总皂苷治疗后肠道 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达有所增加,肠道形态趋于正常,绒毛数量明显增加,提示三七总皂苷治疗缺血性脑卒中作用机制可能与保护肠道功能,维持肠道内外稳态有关,防止有毒有害物质吸收入血,减轻脑缺血后炎症反应,改善症状及神经功能,达到治疗疾病的目的。

参考文献:

- [1] WU S M, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(4): 394-405.
- [2] CHENG Y J, ZAN J Y, SONG Y Y, et al. Evaluation of intestinal injury, inflammatory response and oxidative stress following intracerebral hemorrhage in mice[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 2120-2128.
- [3] WEI M P, HUANG Q, LIU Z Y, et al. Intestinal barrier dysfunction participates in the pathophysiology of ischemic stroke[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20(5): 401-416.
- [4] ZENG X S, ZHOU X S, LUO F C, et al. Comparative analysis of the neuroprotective effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 extracted from Panax notoginseng against cerebral ischemia[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(2):

- 102-108.
- [5] LI B Q, CHEN J, WU T X, et al. Fast determination of four active compounds in Sanqi Panax Notoginseng injection samples by high-performance liquid chromatography with a chemometric method[J]. J Sep Sci, 2015, 38(9): 1449-1457.
- [6] 卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 等. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1356-1360.
- [7] WANG J, LU J X, XIE X W, et al. Blend of organic acids and medium chain fatty acids prevents the inflammatory response and intestinal barrier dysfunction in mice challenged with enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 58: 64-71.
- [8] ZHOU B L, YUAN Y T, ZHANG S S, et al. Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract[J]. Front Immunol, 2020, 11: 575.
- [9] SEO K, SEO J, YEUN J, et al. The role of mucosal barriers in human gut health[J]. Arch Pharm Res, 2021, 44(4): 325-341.
- [10] PLUTA R, JANUSZEWSKI S, CZUCZWAR S J. The role of gut microbiota in an ischemic stroke[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 915.
- [11] XIAO S W, JIANG S, QIAN D W, et al. Modulation of microbially derived short-chain fatty acids on intestinal homeostasis, metabolism, and neuropsychiatric disorder [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(2): 589-601.
- [12] KURASHIMA Y, KIYONO H. Mucosal ecological network of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing[J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35: 119-147.
- [13] GWAK M G, CHANG S Y. Gut-brain connection; microbiome, gut barrier, and environmental sensors [J]. Immune Netw, 2021, 21(3): e20.
- [14] SUZUKI T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients; the role of tight junctions [J]. Anim Sci J, 2020, 91(1): e13357.
- [15] ROHR M W, NARASIMHULU C A, RUDESKI-ROHR T A, et al. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: a review [J]. Adv Nutr, 2020, 11(1): 77-91.
- [16] SUNDMAN M H, CHEN N K, SUBBIAN V, et al. The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease [J]. Brain Behav Immun, 2017, 66: 31-44.

收稿日期: 2022-12-22; 修回日期: 2023-01-30

(上接第 212 页)

- [14] 商燕燕, 李滢, 谢新强, 等. 益生菌抑制幽门螺杆菌的作用机制及研究进展 [J]. 微生物学报, 2022, 62(11): 4336-4352.
- [15] WHITESIDE S A, MOHIUDDIN M M, SHLIMON S, et al. *In vitro* framework to assess the anti-*Helicobacter pylori* potential of lactic acid bacteria secretions as alternatives to antibiotics [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5650.
- [16] 张华月. 具有幽门螺杆菌共聚集能力乳杆菌的筛选及临床功效评价 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [17] 张美怡, 翟齐啸, 赵建新, 等. 鼠李糖乳杆菌 JS-SZ-2-1 抗幽门螺杆菌感染的临床效果评价 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 29-34.
- [18] 成虹. 益生菌或可根治幽门螺杆菌 [J]. 健康向导, 2021, 27(4): 12-13.
- [19] DI PIERRO F, BERTUCCIOLI A, SAPONARA M, et al. Impact of a two-bacterial-strain formula, containing bifidobacterium animalis lactis BB-12 and enterococcus faecium L3, administered before and after therapy for *Helicobacter pylori* eradication [J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2020, 66(2): 117-123.

收稿日期: 2023-01-02; 修回日期: 2023-02-08