

猪牙皂皂苷对痰瘀互结型缺血性中风模型大鼠的保护作用及机制研究^Δ

董娜娜*,陈晓兰#,邓铤莉,万静,谢树才,胡娟,罗晨月,曹国琼(贵州中医药大学药学院,贵阳 550025)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)09-1068-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.09.08



摘要 目的 研究猪牙皂皂苷对痰瘀互结型缺血性中风(ISPBS)模型大鼠的保护作用,并探究其作用机制。方法 将119只大鼠随机分为正常组(生理盐水)、假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、尼莫地平组(阳性对照组,5 mg/kg)和猪牙皂皂苷低、中、高剂量组(3.21、6.42、12.84 mg/kg),每组17只。除正常组外,其余各组大鼠均采用高脂饲料饲养+线栓法复制ISPBS模型。测定或观察大鼠神经功能评分、脑组织含水量、脑组织病理形态学变化和血清中血液流变学指标[全血黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度]、血脂四项[三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]、炎症因子[白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]及脑组织中氧化应激指标[丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)]变化情况,并测定脑组织中B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)蛋白表达情况。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠神经功能评分、5项血清指标(TC、TG、LDL-C、TNF- α 、IL-1 β)、血液流变学指标和脑组织中MDA、NO含量以及Bax、caspase-3蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),血清中HDL-C、IL-10水平和脑组织中SOD活性、Bcl-2蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),脑组织出现核固缩、胞膜碎裂等明显病变。与模型组比较,各给药组上述指标均不同程度改善,其中猪牙皂皂苷高剂量组大鼠的上述指标变化差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 猪牙皂皂苷对ISPBS模型大鼠具有较好的保护作用,其机制可能与减少氧化损伤、减少促炎介质的产生和抑制神经元凋亡有关。

关键词 猪牙皂皂苷;痰瘀互结型缺血性中风;氧化损伤;机制

Protective effect and mechanism of saponins from *Gleditsia sinensis* on ischemic stroke with phlegm and blood stasis model rats

DONG Nana, CHEN Xiaolan, DENG Bili, WAN Jing, XIE Shucui, HU Juan, LUO Chenyue, CAO Guoqiong (School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the protective effects of saponins from *Gleditsia sinensis* on ischemic stroke with phlegm and blood stasis (ISPBS) model rats, and to explore its mechanism. **METHODS** Totally 119 rats were randomly divided into normal group (normal saline), sham operation group (normal saline), model group (normal saline), nimodipine group (positive control group, 5 mg/kg), *G. sinensis* saponin low-dose, medium-dose and high-dose groups (3.21, 6.42 and 12.84 mg/kg), with 17 rats in each group. Except for normal group, other groups were all given high-fat diet+suture-occluded method to induce ISPBS model. The neurological function score, water content of brain tissue, pathological morphology of brain tissue, the changes of hemorheology indexes (whole blood viscosity, erythrocyte aggregation index, Casson-viscosity), four items of blood lipid [triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] and inflammatory factors in serum and oxidative stress indexes [malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD)] in brain tissue were determined or observed in rats. The protein expressions of B lymphocytoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and caspase-3 in cerebral tissue were also detected. **RESULTS** Compared with normal group, the score of nerve function, 5 kinds of serum indexes (TC, TG, LDL-C, TNF- α , IL-1 β), hemorheology indexes, the contents of MDA and NO and protein expressions of Bax and caspase-3 in cerebral tissue were all increased significantly in model group ($P<0.01$). The levels of HDL-C and IL-10 in serum, SOD activity and protein expression of Bcl-2 in cerebral tissue were decreased significantly ($P<0.01$), and obvious lesions such as nuclear pyknosis and cell membrane fragmentation occurred in brain tissue. Compared with model group, above indexes of administration groups were improved to different extents, among which there was statistical significance in above indexes of *G. sinensis* saponin high-dose group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** Saponin from *G. sinensis* has a good protective effect on ISPBS model rats. Its mechanism may be associated with reducing oxidative damage,

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860705);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2017]5655)

* 硕士研究生。研究方向:中药及民族药新剂型与新技术。E-mail:1258510890@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药、民族药新剂型与新技术及中药二次开发。E-mail:929237490@qq.com

reducing the production of pro-inflammatory mediators and resisting neuronal apoptosis.

KEYWORDS saponins from *Gleditsia sinensis*; ischemic stroke with phlegm and blood stasis; oxidative injury; mechanism

中风是全球致残和致死的主要原因之一,人口老龄化的加剧将导致中风发生率的升高^[1]。据全球疾病负担研究数据显示,我国总体中风发病风险为39.9%,位居全球首位^[2]。中医理论认为,中风是在内伤的基础上加上饮食不规律、情志不畅、过度疲劳等引起的脏腑阴阳失调^[3];痰瘀互结是中风的主要病机和致病因素,痰浊、瘀血贯穿了中风发生发展的全过程^[4]。因此,目前中医治疗中风的方法主要为祛痰和开窍。

猪牙皂为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥不育果实,具有祛痰开窍、消肿散结之功效^[5]。据2020年版《中国药典》(一部)记载,以猪牙皂为主药、配以鹅不食草和细辛制成的通关散,吹鼻可治疗痰浊阻窍所致的气闭神昏、牙关紧闭、不省人事等症^[6]。研究表明,经鼻给药是药物到达大脑最快、最直接的途径,以该方式给药后药物可以无创方式通过血脑屏障^[6]。本课题组前期研究了猪牙皂不同萃取部位经鼻给药后对缺血缺氧模型小鼠血脑屏障通透性的影响,发现芳香类成分和皂苷类成分具有较好的“通关开窍、醒脑复神”作用^[7]。因此,本研究在前期研究基础上考察猪牙皂皂苷对痰瘀互结型缺血性中风(ischemic stroke with phlegm and blood stasis, ISPBS)模型大鼠的保护作用和可能机制,为猪牙皂皂苷鼻内给药制剂的研制和应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 Multiskan Mk3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),BA200Digita 型显微摄像系统(麦克奥迪实业集团有限公司),DZKW-4 型恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),LG-R-80B 型血液黏度仪(北京中科富邦医疗设备有限公司),AUW12D 型分析天平(日本 Shimadzu 公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:猪牙皂皂苷(本实验室按文献[7]方法自制,1 g 猪牙皂生药可以得到 57 mg 皂苷),尼莫地平片(亚宝药业集团股份有限公司,批号 170606,规格 20 mg/片),三酰甘油(triacylglycerol, TG)试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A110-1-1、A111-1-1、A113-1-1、A112-1-1、A001-1、A003-1、A012),大鼠白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,批号分别为 ZC-

36391、ZC-36379、ZC-37624),兔源 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-492),兔源 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体、兔源半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)抗体(美国 CST 公司,批号分别为 2772s、9662s),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔/小鼠免疫球蛋白 G(Ig G)二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BST13J17B16G56),苏木精染液、伊红染液(武汉赛维尔生物技术有限公司,批号分别为 G1005-1、G1001),磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司,pH 7.2~7.4),多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为 SPF 级 SD 雄性大鼠,共 119 只,体质量为 250~280 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(湘)2019-0014,合格证号为 430726210100322185。所有大鼠均饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗、温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C、相对湿度(50 \pm 10)%的动物房内,饲养期间自由摄食、饮水。实验前先适应性喂养 7 d。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将 119 只大鼠按照随机数字表法分成正常组(生理盐水)、假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、尼莫地平组(阳性对照组,5 mg/kg,剂量按药品说明书中成人剂量换算后制定)和猪牙皂皂苷低、中、高剂量组[3.21、6.42、12.84 mg/kg;剂量参考 2020 版《中国药典》(一部)猪牙皂成人每日用量(1~1.5 g),并按照体表面积法^[8]换算成大鼠的每日用量],每组 17 只。正常组大鼠采用普通饲料喂养;其余各组大鼠均给予高脂饲料(由 3.5%胆固醇、10%猪油、0.2%丙硫尿嘧啶、0.5%胆酸钠、10%白糖、75.8%基础饲料组成)喂养^[4,9]。大鼠饲养 28 d 后,眼眶取血,检测血液流变学指标及血脂四项的变化,若发现各指标均异常则认为痰瘀互结型大鼠造模成功^[4]。正常组、假手术组、模型组和猪牙皂皂苷组大鼠通过鼻腔给予等体积生理盐水或相应药物,尼莫地平组大鼠灌胃给药,每天给药 1 次,连续 7 d。末次给药 1 h 后,大鼠禁食不禁水 12 h,采用线栓法建立 ISPBS 模型^[10]。具体造模方法为:将大鼠麻醉,然后将其仰卧固定,从颈正中切口,继而分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),结扎 CCA 近心端以及 ECA,在 CCA 距离 ICA 和 ECA 分叉口 4 mm 处剪小口;将鱼线插入 ICA,缺血 2 h 后,将鱼线轻轻拔至分叉口,再灌注 24 h。正常组大鼠不进行任何处理;假手术组大鼠仅分离血管,不插入鱼线及结扎,其余操作与各造模大鼠相同。在 ISPBS 模型制备过程中,有部分组别的少数大鼠造模不成功,故本研究最终每组筛选 12 只大鼠进行各指标测定。

2.2 神经功能评分

大鼠再灌注 24 h 后,采用 Berderson 评分法对大鼠神经功能进行评分:0分为正常,表示无神经功能缺陷;1分为提尾时左前肢弯曲;2分为向左侧转圈;3分为向左侧倾倒;4分为不能行走,即在无意识但疼痛刺激下会出现肢体活动。若评分为 1~3分,则表示造模成功^[1]。

2.3 脑组织含水量检测

大鼠再灌注 24 h 后,每组随机取 6 只大鼠,处死后,立即取出其脑组织,精密称定脑组织湿质量,然后置于 105 °C 电热鼓风干燥箱内烘干,待干燥至恒重后再称定脑组织质量,并按公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%)=(脑组织湿质量-脑组织干质量)/脑组织湿质量×100%。

2.4 血清中血脂四项、炎症因子和血液流变学指标检测

大鼠再灌注 24 h 后,各组取剩余 6 只大鼠,麻醉后自眼眶取血 2 mL,4 °C 静置 30 min,以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清。根据试剂盒说明书方法测定血清中血脂四项(TC、TG、LDL-C、HDL-C)和炎症因子(IL-1 β 、IL-10、TNF- α)水平。另外,于大鼠腹主动脉取血 5 mL,4 h 内用血液黏度仪进行血液流变学指标检测。

2.5 脑组织中氧化应激指标水平检测

采用 ELISA 法进行测定。取“2.4”项下取血后的大鼠,处死后,立即取出其缺血侧脑组织,一部分保存于-80 °C 冰箱中,待用;另一部分于冰浴下制成 10% 脑组织匀浆,在 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,根据相应试剂盒说明书方法测定缺血侧脑组织中 MDA、NO 含量及 SOD 活性。

2.6 脑组织病理形态学变化观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法进行观察。取“2.5”项下冷冻的脑组织适量,固定于 4% 多聚甲醛中,常规制备石蜡切片(4~6 μ m)并行常规 HE 染色,然后将切片置于显微镜下观察脑组织的病理形态学变化。

2.7 脑组织中 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达检测

采用免疫组化法进行测定。取“2.5”项下冷冻的脑组织适量,固定于 4% 多聚甲醛中,经脱水、修剪、包埋、切片(4~6 μ m)及二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,以过氧化氢浸泡;湿盒中加入 Bax、Bcl-2、caspase-3 一抗(稀释比例均为 1:200),4 °C 孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 二抗(稀释比例均为 1:200),37 °C 孵育 20 min;PBS 冲洗,二氨基联苯胺(DAB)显色,蒸馏水洗涤,苏木精复染,二甲苯透明,中性树胶封片。最后采用显微摄像系统对切片进行图片采集,通过 Image J 1.42 软件分析样本的平均光密度值(平均光密度值越高表示蛋白表达越强)。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。符合正态分布

的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.01$ 。

3 结果

3.1 猪牙皂苷对模型大鼠神经功能评分的影响

与正常组比较,假手术组大鼠神经功能评分差异无统计学意义($P > 0.01$),模型组大鼠神经功能评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平组和猪牙皂苷高剂量组大鼠的神经功能评分均显著降低($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠的神经功能评分和脑组织含水量测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	神经功能评分/分($n=12$)	脑组织含水量/%($n=6$)
正常组	0	70.61 \pm 1.12
假手术组	0	70.01 \pm 1.27
模型组	3.00 \pm 0.00 ^a	86.09 \pm 0.76 ^a
尼莫地平组	0.20 \pm 0.44 ^b	72.74 \pm 1.46 ^b
猪牙皂苷低剂量组	2.80 \pm 0.44	82.30 \pm 1.27 ^b
猪牙皂苷中剂量组	2.60 \pm 0.54	77.76 \pm 2.48 ^b
猪牙皂苷高剂量组	0.80 \pm 0.83 ^b	73.93 \pm 1.13 ^b

a:与正常组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.01$

3.2 猪牙皂苷对模型大鼠脑组织含水量的影响

与正常组比较,假手术组大鼠脑组织含水量差异无统计学意义($P > 0.01$),模型组大鼠脑组织含水量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠脑组织含水量均显著降低($P < 0.01$)。结果见表 1。

3.3 猪牙皂苷对模型大鼠血脂四项的影响

与正常组比较,假手术组和模型组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高($P < 0.01$),HDL-C 水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组、猪牙皂苷高剂量组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平均显著降低($P < 0.01$),HDL-C 水平均显著升高($P < 0.01$);猪牙皂苷中剂量组大鼠血清中 TG、LDL-C 水平均显著降低($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠血脂四项的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mmol/mL}$)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常组	9.09 \pm 1.12	6.06 \pm 0.70	16.69 \pm 2.84	3.29 \pm 0.50
假手术组	11.02 \pm 0.97 ^a	9.52 \pm 0.49 ^a	25.69 \pm 0.61 ^a	2.57 \pm 0.19 ^a
模型组	11.50 \pm 1.54 ^a	9.51 \pm 0.74 ^a	25.33 \pm 0.47 ^a	2.26 \pm 0.11 ^a
尼莫地平组	9.25 \pm 0.98 ^b	7.01 \pm 0.63 ^b	18.40 \pm 0.22 ^b	3.13 \pm 0.19 ^b
猪牙皂苷低剂量组	10.34 \pm 0.74	8.50 \pm 0.79	23.73 \pm 0.41	2.56 \pm 0.10
猪牙皂苷中剂量组	10.66 \pm 1.51	8.08 \pm 0.71 ^b	20.30 \pm 4.22 ^b	2.63 \pm 0.60
猪牙皂苷高剂量组	9.67 \pm 0.85 ^b	7.52 \pm 1.13 ^b	19.33 \pm 1.27 ^b	2.86 \pm 0.33 ^b

a:与正常组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.01$

3.4 猪牙皂苷对模型大鼠血液流变学的影响

与正常组比较,假手术组和模型组大鼠在各切变率下的全血黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠在各切变率下的全血黏度、红细胞聚集指数(除猪牙皂苷低剂量组外)、卡松黏度均显著降低($P < 0.01$)。结果见表 3。

表3 各组大鼠的血液流变学指标测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	全血黏度/mPa·s					红细胞聚集指数	卡松黏度/mPa·s
	1 s ⁻¹	5 s ⁻¹	50 s ⁻¹	50 s ⁻¹	100 s ⁻¹		
正常组	22.36 ± 6.64	9.68 ± 3.01	4.92 ± 1.64	4.4 ± 1.49	4.05 ± 1.39	5.77 ± 1.10	3.55 ± 0.30
假手术组	80.23 ± 3.25 ^a	27.52 ± 1.18 ^a	10.05 ± 0.52 ^a	7.93 ± 0.41 ^a	7.27 ± 0.54 ^a	10.98 ± 0.62 ^a	6.96 ± 0.57 ^a
模型组	79.04 ± 6.35 ^a	27.07 ± 1.71 ^a	10.03 ± 0.58 ^a	8.35 ± 0.51 ^a	7.26 ± 0.48 ^a	10.70 ± 0.86 ^a	6.98 ± 0.19 ^a
尼莫地平组	27.42 ± 6.60 ^b	11.86 ± 2.23 ^b	6.03 ± 0.77 ^b	5.39 ± 0.62 ^b	4.96 ± 0.53 ^b	5.47 ± 0.77 ^b	3.99 ± 0.34 ^b
猪牙皂苷低剂量组	56.20 ± 15.96 ^b	19.50 ± 6.60 ^b	7.77 ± 1.14 ^b	6.59 ± 0.91 ^b	5.82 ± 0.76 ^b	9.26 ± 2.04	4.16 ± 0.55 ^b
猪牙皂苷中剂量组	30.88 ± 8.76 ^b	13.14 ± 2.78 ^b	6.52 ± 0.89 ^b	5.80 ± 0.72 ^b	5.32 ± 0.63 ^b	5.75 ± 1.08 ^b	4.25 ± 0.43 ^b
猪牙皂苷高剂量组	29.04 ± 8.98 ^b	12.38 ± 2.92 ^b	6.19 ± 0.97 ^b	5.51 ± 0.79 ^b	5.21 ± 0.64 ^b	5.30 ± 0.35 ^b	4.05 ± 0.44 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$

3.5 猪牙皂苷对模型大鼠血清中炎症因子的影响

与正常组比较,假手术组大鼠血清中TNF- α 、IL-10、IL-1 β 含量差异均无统计学意义($P > 0.01$);模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高($P < 0.01$),IL-10含量显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组、猪牙皂苷高剂量组大鼠血清中TNF- α 含量均显著降低($P < 0.01$),IL-10含量均显著增加($P < 0.01$);各给药组大鼠血清中IL-1 β 含量均显著降低($P < 0.01$)。结果见表4。

表4 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-10、IL-1 β 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-10	IL-1 β
正常组	332.96 ± 23.56	98.35 ± 12.25	43.27 ± 4.99
假手术组	334.84 ± 18.90	97.95 ± 18.85	42.63 ± 4.78
模型组	470.53 ± 74.68 ^a	76.23 ± 6.55 ^a	61.93 ± 5.86 ^a
尼莫地平组	369.34 ± 80.72 ^b	102.76 ± 10.72 ^b	47.75 ± 7.48 ^b
猪牙皂苷低剂量组	426.87 ± 24.57	95.53 ± 12.84	50.80 ± 3.60 ^b
猪牙皂苷中剂量组	398.03 ± 60.77	85.65 ± 6.75	49.83 ± 2.73 ^b
猪牙皂苷高剂量组	370.46 ± 61.16 ^b	100.12 ± 9.21 ^b	48.27 ± 4.91 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$

3.6 猪牙皂苷对模型大鼠脑组织中氧化应激指标的影响

与正常组比较,假手术组大鼠脑组织中MDA、NO含量和SOD活性差异均无统计学意义($P > 0.01$);模型组大鼠脑组织中MDA、NO含量显著增加($P < 0.01$),SOD活性显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠脑组织中MDA、NO(除猪牙皂苷低剂量组外)含量均显著降低($P < 0.01$),尼莫地平组、猪牙皂苷高剂量组大鼠脑组织中SOD活性均显著升高($P < 0.01$)。结果见表5。

3.7 猪牙皂苷对模型大鼠脑组织病理形态学变化的影响

正常组、假手术组大鼠脑组织形态结构正常,神经细胞排列规则、核轮廓清晰,神经纤维结构完整、排列紧密。模型组大鼠脑组织形态不完整,细胞核固缩或溶解消失,胞膜碎裂,神经纤维松散、排列杂乱,脑组织病变较严重。猪牙皂苷低、中剂量组大鼠脑组织神经细胞

表5 各组大鼠脑组织中MDA、NO含量和SOD活性测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA/(nmol/mL)	NO/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)
正常组	5.02 ± 0.21	1.01 ± 0.20	512.47 ± 32.65
假手术组	5.04 ± 0.28	1.03 ± 0.09	508.37 ± 33.33
模型组	9.72 ± 0.25 ^a	1.97 ± 0.06 ^a	425.47 ± 35.47 ^a
尼莫地平组	6.05 ± 0.19 ^b	1.17 ± 0.11 ^b	499.84 ± 14.65 ^b
猪牙皂苷低剂量组	8.38 ± 0.20 ^b	1.79 ± 0.10	448.93 ± 7.77
猪牙皂苷中剂量组	7.95 ± 0.35 ^b	1.49 ± 0.12 ^b	454.03 ± 30.69
猪牙皂苷高剂量组	7.27 ± 0.15 ^b	1.32 ± 0.09 ^b	479.81 ± 4.21 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$

结构破坏,部分细胞核固缩或溶解消失,神经纤维较松散。尼莫地平组和猪牙皂苷高剂量组大鼠脑组织病理改变较模型组均明显减轻,神经细胞形态较为完整,神经纤维结构完整、排列紧密,仅可见少量被不同程度破坏的细胞。结果见图1。

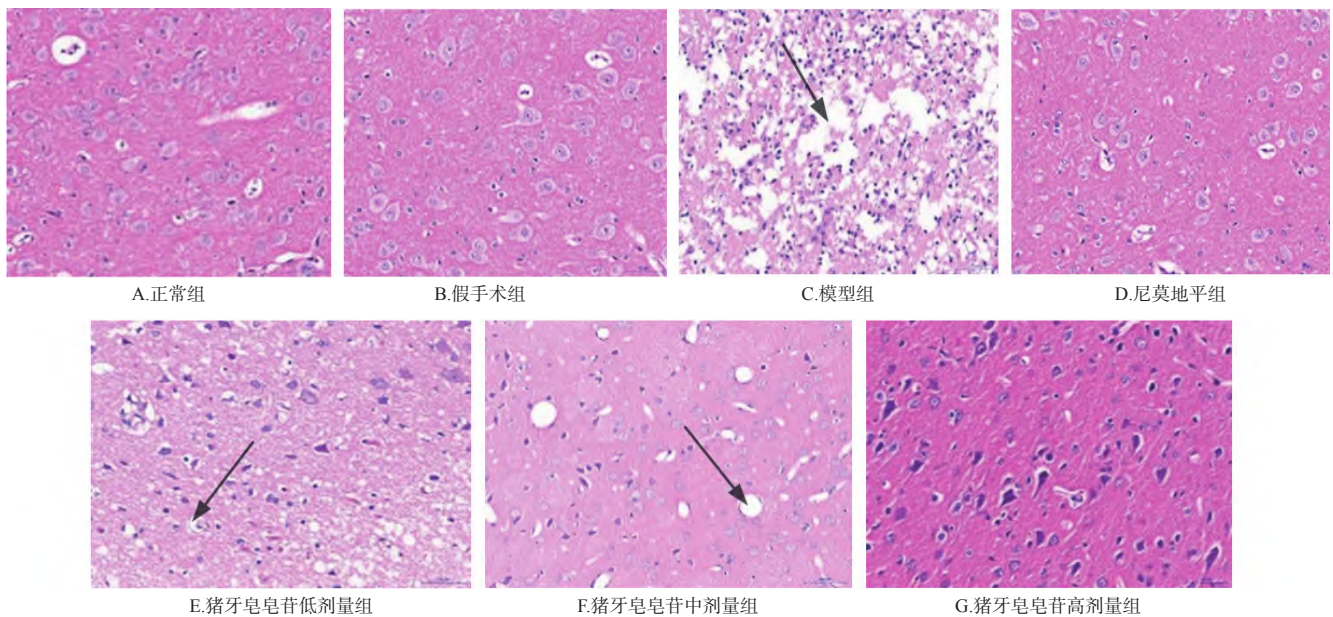
3.8 猪牙皂苷对模型大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的影响

与正常组比较,假手术组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.01$);模型组大鼠脑组织中Bax、caspase-3蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠脑组织中Bax蛋白表达水平(除猪牙皂苷低剂量组外)均显著降低($P < 0.01$);尼莫地平组和猪牙皂苷高剂量组大鼠脑组织中Bcl-2蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),caspase-3蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。结果见表6、图2。

4 讨论

尼莫地平是一种选择性较强的二氢吡啶类有机钙拮抗剂,易于透过血脑屏障,临床上主要用于脑血管灌注不足、脑血管痉挛、蛛网膜下腔出血等脑血管疾病的治疗^[12-14],目前被认为是预防和治疗脑血管疾病的首选药物^[15],因此本研究将其作为阳性对照药物。

现代医学认为,ISPBS的发生发展和血脂代谢、血液流变学异常密切相关。血脂代谢异常主要表现为TG、TC、LDL-C水平异常升高和HDL-C水平异常降低,可引



箭头: 神经纤维松散部位

图1 各组大鼠脑组织病理形态学观察的显微图(HE染色, ×400)

表6 各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Bax	Bcl-2	caspase-3
正常组	0.205 1 ± 0.008 9	0.217 6 ± 0.006 1	0.181 7 ± 0.005 7
假手术组	0.208 1 ± 0.005 1	0.210 3 ± 0.008 4	0.180 9 ± 0.003 1
模型组	0.220 2 ± 0.007 6 ^a	0.199 5 ± 0.005 1 ^a	0.199 0 ± 0.009 3 ^a
尼莫地平组	0.211 2 ± 0.004 9 ^b	0.209 7 ± 0.006 9 ^b	0.184 4 ± 0.009 6 ^b
猪牙皂苷低剂量组	0.215 7 ± 0.005 9	0.200 6 ± 0.007 7	0.196 2 ± 0.007 4
猪牙皂苷中剂量组	0.213 9 ± 0.008 9 ^b	0.204 5 ± 0.008 2	0.192 4 ± 0.007 2
猪牙皂苷高剂量组	0.214 1 ± 0.006 4 ^b	0.205 3 ± 0.010 5 ^b	0.186 7 ± 0.004 0 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$

发血液流动性、血液黏度、红细胞膜渗透性等异常改变, 出现中医理论上“痰瘀致病”的病理变化, 进而诱发中风^[16-17]。在本研究中, ISPBS 模型大鼠的血脂和血液流变学指标异常, 符合痰瘀互结证的病理特征; 猪牙皂苷能降低模型大鼠在各切变率下的全血黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度以及血清中 TG、TC、LDL-C 水平, 升高血清中 HDL-C 水平。这提示猪牙皂苷具有改善 ISPBS 模型大鼠血液流变学、调节其血脂代谢的作用。

脑中风患者的脑损伤是一个快速级联反应, 包括炎症反应、氧化应激、凋亡基因激活、细胞内钙离子超载、兴奋性氨基酸毒性增加等^[18]。炎症反应是脑缺血再灌注后继发性损伤的重要诱因和发病机制^[19-20]。脑缺血发生后会引起炎症细胞活化和 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子分泌, 进一步加重炎症反应和神经细胞损伤^[21]。IL-10 作为一种多功能炎症负调控因子, 可抑制炎症反应的扩散, 能一定程度保护神经细胞免受伤害, 具有神经保护作用^[22]。本研究结果显示, 猪牙皂苷能降低 ISPBS 模

型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平, 升高血清中 IL-10 水平。这提示猪牙皂苷可以通过抑制 IL-1 β 、TNF- α 分泌和促进 IL-10 释放, 进而起到抗炎的作用。

氧化应激是脑缺血再灌注后继发性损伤的主要发病机制, 也是该领域研究热点之一^[23-24]。在脑缺血的不同时期, NO 以不同的方式改善脑组织损伤及神经细胞的凋亡^[25]。脑缺血发生后, 缺血区域产生大量自由基, 自由基攻击细胞膜引起脂质过氧化反应, 从而产生大量代谢产物(如 MDA)。因此, 测定脑组织中 MDA 含量可间接反映脑组织损伤程度^[26]。SOD 是重要的过氧化物分解酶, 可有效清除氧自由基, 从而抑制脑组织的过氧化反应, 保护脑组织^[25]。本研究结果显示, 猪牙皂苷能降低 ISPBS 模型大鼠脑组织中 MDA、NO 含量, 升高其脑组织中 SOD 活性。这提示猪牙皂苷可通过抑制 MDA、NO 生成和促进 SOD 产生, 从而减少过氧化反应引发的脑组织损伤。

在哺乳动物体内发现的 14 种 caspase 中, 有 8 种被认为参与了细胞的凋亡过程, 其中 caspase-3 被认为在凋亡过程中占主导地位, 是最关键的凋亡蛋白酶^[27]。Bcl-2 和 Bax 蛋白是具有调控细胞凋亡作用的一对重要的内源性蛋白, Bax 作为一种转录因子参与诱导细胞凋亡的基因转录过程, Bcl-2 则可抑制 Bax 的作用, 二者共同决定细胞的生存情况^[28]。这提示猪牙皂苷能下调 ISPBS 模型大鼠脑组织中 Bax、caspase-3 蛋白表达并上调 Bcl-2 蛋白表达。上述结果提示, 猪牙皂苷可以抑制神经元凋亡从而改善脑组织损伤。

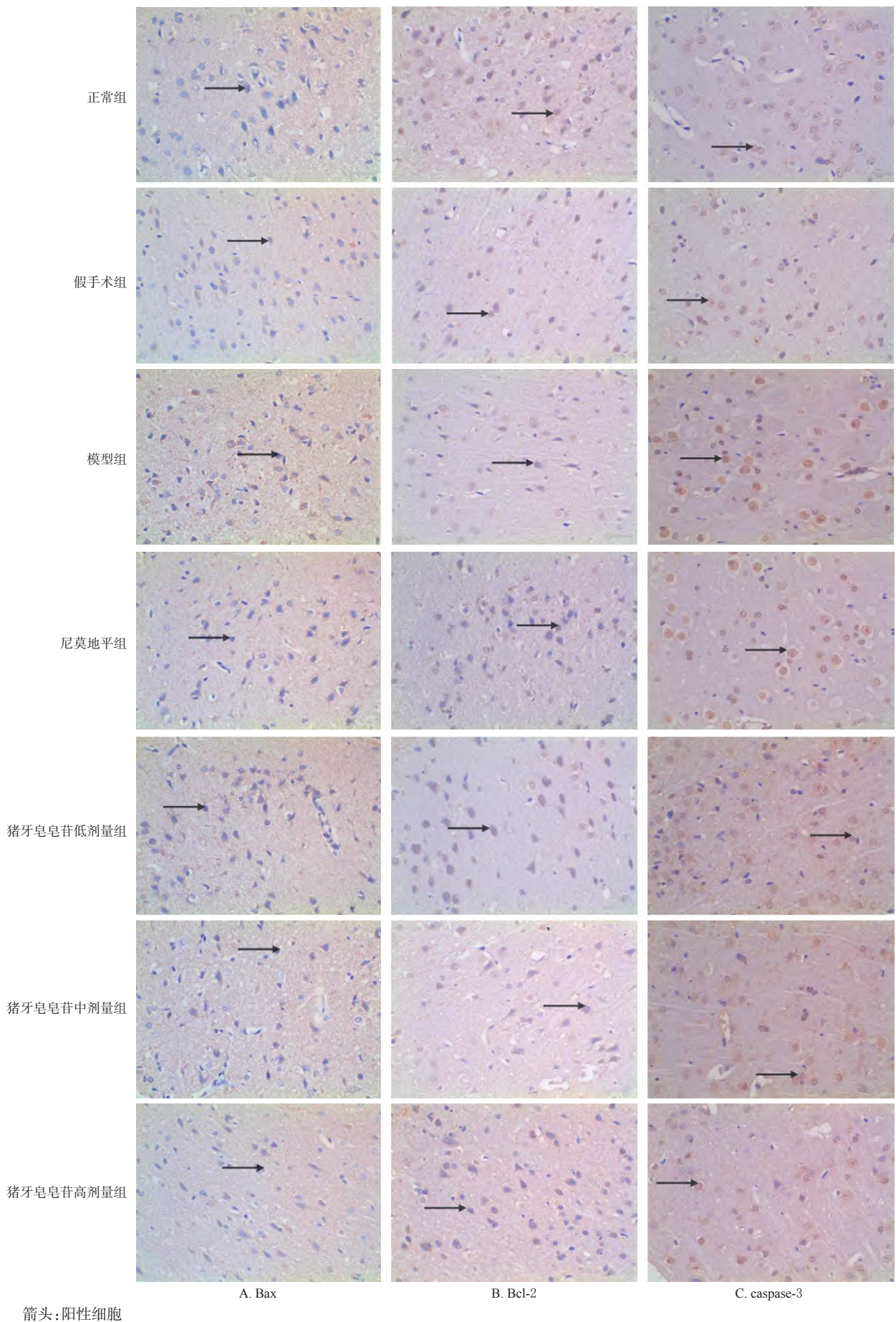


图2 各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的免疫组化图(×400)

5 结语

猪牙皂苷对 ISPBS 模型大鼠具有一定的保护作用,其机制可能与减少氧化损伤、减少促炎介质的产生和抑制神经元凋亡有关。但是,本研究仅初步探讨了猪牙皂苷抗 ISPBS 的作用及可能机制,其更多的作用机制以及具体是哪种成分起作用等问题均需要进一步深入研究。

参考文献

[1] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159):1736-1788.

[2] 《中国脑卒中防治报告》编写组.《中国脑卒中防治报告 2019》概要[J]. *中国脑血管病杂志*, 2020, 17(5):272-281.

[3] 万维海,宋宏妹.从纯内伤和内伤兼外风论治中风[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(15):66-67.

[4] 刘抒雯,刘敬霞,刘超,等.扎里奴思方对痰瘀互结型脑缺血再灌注大鼠血液流变学、血脂及自由基代谢的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(5):884-890, 895, 974.

[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社, 2020:331, 1567.

[6] ALAVIAN F, SHAMS N. Oral and intra-nasal administration of nanoparticles in the cerebral ischemia treatment in animal experiments: considering its advantages and disadvantages[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2020, 15(1):20-29.

[7] 杨敬鸿,陈晓兰,杨晓梅,等.基于信息熵理论和方差分析比较猪牙皂不同组分对小鼠缺血缺氧及血脑屏障通透性影响[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(6):83-86.

[8] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.

[9] 张令霖,方格,连新福,等.痰瘀互结证局部脑缺血再灌注动物模型的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(12):1479-1483.

[10] 田芳,张昊,莫灿龙,等.线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型的改进及评价[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(5):665-669.

[11] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.

[12] 水海峰,王风,刁铁梅,等.尼莫地平及参麦注射液对脑复苏效应的实验研究[J]. *急诊医学*, 1996, 5(3):131-134.

[13] 赛双桥,余海鹏,梁婉如,等.尼莫地平对脑卒中后认知功能障碍的影响[J]. *中国卫生标准管理*, 2021, 12(17):101-104.

[14] 刘显国,李胜利,黄国祥,等.尼莫地平片治疗急性脑出血患者的临床研究分析[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(4):296-299.

[15] 谢志勇,何文. N-三甲基壳聚糖对尼莫地平凝胶透皮吸收促进作用的体外研究[J]. *中国药师*, 2011, 14(10):1420-1422.

[16] 陈文华,饶李亮,尹晟.银杏达莫注射液治疗急性脑梗死的疗效及其对血液流变学的影响[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(6):788-789, 792.

[17] 王冬梅,胡俊,傅冬梅.血浆中血脂类生化指标与脑血管病的相关性研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(3):315-316.

[18] 蔡友德,何前松,樊梓媛,等.基于抗氧化作用探讨大黄游离蒽醌类成分对脑缺血再灌注损伤的脑保护机制[J]. *贵阳中医学院学报*, 2019, 41(4):5-10.

[19] BURROWS F, HALEY M J, SCOTT E, et al. Systemic inflammation affects reperfusion following transient cerebral ischaemia[J]. *Exp Neurol*, 2016, 277:252-260.

[20] 武晓伟,刘聪,李佳,等.芪蛭通络胶囊及其9味活血化痰药拆方对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用[J]. *中国药房*, 2019, 30(19):2674-2678.

[21] ANRATHER J, IADECOLA C. Inflammation and stroke: an overview[J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13(4):661-670.

[22] 杨晓炜,姚立岩,李海红,等.阿托伐他汀对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及炎症机制[J]. *牡丹江医学院学报*, 2021, 42(2):6-10.

[23] SANDERSON T H, REYNOLDS C A, KUMAR R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1):9-23.

[24] 胡跃强,秦红玲,唐农,等.基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨清热化痰方对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14):128-133.

[25] WU L Q, XIONG X X, WU X M, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13:28.

[26] 吴桂甫,王柳萍,凌兰,等.莪术对大鼠缺血性脑中风的保护作用及其机制研究[J]. *中药与临床*, 2013, 4(6):34-36.

[27] 刘春华,刘捷.神经元凋亡与 Caspase 家族及细胞周期研究进展[J]. *人民军医*, 2018, 61(7):641-644.

[28] YU S J, CHO I A, KANG K R, et al. Licochalcone-E induces caspase-dependent death of human pharyngeal squamous carcinoma cells through the extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5):3662-3668.

(收稿日期:2021-10-26 修回日期:2022-04-02)

(编辑:林静)