三七三醇皂苷对脑梗死后不同时点 Nogo-A表达的影响

翟建英, 崔方圆, 邹蔚萌, 朱陵群, 邹忆怀*
(北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700)

大脑可塑性研究一直是脑科学研究的热点,影响脑血管病后功能重塑的因素十分复杂,包括促进因素和抑制因素,在诸多抑制因素中,Nogo引人注目,其发现是中枢神经创伤性损伤修复分子机制研究的重大突破。Nogo-A,是目前发现的最为强烈的神经纤维再生抑制因子,在神经功能恢复过程中起着重要作用,Nogo-A通过与其受体结合而发挥抑制神经再生的作用[1,2]。中药三七在脑血管病的治疗中具有疗效,本研究首次通过给予三七三醇皂苷,观察局灶性脑缺血模型大鼠不同时点脑组织中 Nogo-A含量的变化,探讨中药三七在脑缺血后脑功能重塑中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物和分组

雄性 SD大鼠,体重 (300 ±20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京) 2002-0003。大鼠随机分为假手术组、模型组、三七三醇皂苷组和尼莫地平组,各组再按术后不同时间点随机分为 3, 7, 28 d 3个亚组。

1.2 药物与试剂

三七通舒胶囊 (成都华神集团股份有限公司制药厂,批号 061002XH021,每粒装 200 mg,含三七三醇皂苷 100 mg)。尼莫地平片 (天津市中央药业有限公司,批号 060608,每片 30 mg)。Nogo-A一抗、SP试剂盒 (北京博奥森公司)。

1.3 大脑中动脉阻塞 (MCAO)模型的制备

采用改良的 Longa方法,大鼠术前禁食不禁水过夜,腹腔注射 3.5%水合氯醛麻醉,仰卧位固定,颈部手术区备皮,络合碘消毒,于颈正中纵行切开皮肤,约 25 mm,钝性分离肌群,游离颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉,结扎颈外动脉近分叉处和颈总动脉近心端,用动脉夹暂时夹闭颈总动脉,在颈总动脉结扎与夹闭两处之间用显微剪剪一小口,用浸于肝素生理盐水中的尼龙线栓 (已在距线头 18 mm处作标记。2534型尼龙栓线:线身直径 0.25 mm,线头直径 (0.34 ± 0.02) mm,线长 35 mm,购自北京沙东生物技术有限公司)沿颈总动脉插入颈内动脉,并顺其推进 18～22 mm (自颈总动脉分叉处计算),稍遇阻力停止,即可造成大脑中动脉的阻断。然后结扎颈总动脉固定栓线,伤口给予青霉素钠 40万 U防止感染,缝合皮肤。

MCAO模型成功的判断标准采用 EZ Longa评分标准[3]。0分,无神经缺损表现; 1分,对侧前爪不能充分伸展; 2分,向外侧转圈; 3分,行走时向对侧倾倒; 4分,不能行走,意识丧失。动物清醒后进行神经功能评分, 1至 3分者为纳入标准, 0分和 4分者剔除。

1.4 分组、给药方法和标本采集

于 MCAO术后按 EZ Longa评分标准进行评分,根据大鼠神经功能评分高低随机分为模型组、三七三醇皂苷组、尼莫地平组,各组内的大鼠神经功评分 1, 2, 3分的大鼠数目大致一样。给药剂量按大鼠与人体表面积等效剂量折算,尼莫地平片按照成人用量 (2 mg·kg^{-1}·d^{-1}) 8倍,计算大鼠用量 (0.017 3 mg·g^{-1}·d^{-1})。三七通舒胶囊按照成人用量 (5 mg·kg^{-1}·d^{-1}) 10倍,计算大鼠用量 (0.054 mg·g^{-1}·d^{-1})。中药组和西药组动物于术后当日开始分别灌胃给三七通舒混悬液和尼莫地平混悬液;正常组和模型组动物亦于术后当日开始灌胃给去离子水。各组均是每天给药 1次,每 3 d称体重 1次,重新计算每只动物药量,直至取材时。在取材的各时间点, 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉后, 4%多聚甲醛 PBS灌注固定取脑,然后将其浸于 4%多聚甲醛中后固定。取视交叉前后 2 mm脑组织常规脱水浸蜡包埋,切片厚 5 μm。

1.5 免疫组织化学染色

切片常规脱蜡至水, Nogo-A一抗 (1∶50) 4 ℃孵

[收稿日期] 2007-11-15
[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30472214)
[通讯作者] *邹忆怀, Tel: (010) 84013130, E-mail: zouyihuai2004@yahoo.com.cn

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

育过夜,二抗 37 ℃孵育 30 min,辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液 37 ℃孵育 30 min,DAB显色,常规脱水透明封片。阴性对照以 0.01 mol·L^{-1} PBS代替一抗,余皆相同。

1.6 图像分析

使用 Diagnostic Instruments公司 SPOT-Ⅱ数码成像系统进行图像采集,用 Vniversal Imaging公司 Meta Morph图像分析系统进行图像分析。

1.7 统计学分析

各组各时间点的免疫组织化学图像分析采用阳性信号光密度值作为参数进行统计分析。所得数据经正态分布及方差齐性检验后进行方差分析,统计分析工具为 SPSS10.0软件包,数据用 $\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 各组大鼠 MCAO术后神经功能评分 MCAO术后大鼠于 1～2 h内清醒。与模型组比较,术后 24,48 h三七三醇皂苷组和尼莫地平组 EZ Longa评分呈下降趋势,术后 72 h三七三醇皂苷组和尼莫地平组 EZ Longa评分显著低于模型组,有显著的统计学差异。见表 1。

2.2 各组大鼠 MCAO术后 Nogo-A蛋白表达的变化

表 1 大鼠 MCAO后神经功能评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	术后 5 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h
假手术	15	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	1.33 ±0.48[1)]
模型	30	2.67 ±0.61	2.43 ±0.73	2.20 ±0.71	1.73 ±0.64
三七三醇皂苷	30	2.63 ±0.61	2.37 ±0.72	2.07 ±0.69	0.00 ±0.00
尼莫地平	30	2.60 ±0.67	2.33 ±0.80	1.93 ±0.69	1.27 ±0.45[1)]

注:[1)]与同时间点的模型组比较 $P<0.01$

Nogo-A免疫阳性产物呈棕黄色,在胞浆表达。术后第 3天模型组 Nogo-A表达显著高于正常组 ($P<0.05$),三七三醇皂苷组和尼莫地平组 Nogo-A表达亦有所升高,但与模型组和假手术组比较均无统计学差异。术后第 7天,三七三醇皂苷组 Nogo-A表达显著低于模型组 ($P<0.05$),尼莫地平组 Nogo-A表达亦低于模型组,但未见统计学差异。术后第 28天,三七三醇皂苷组和尼莫地平组 Nogo-A表达均进一步下降,且显著低于模型组 ($P<0.01$和 $P<0.05$) (表 2)。Nogo-A蛋白表达变化见图 1～9。

表 2 术后不同恢复时点 nogo-A蛋白表达的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	术后第 3天	术后第 7天	术后第 28天
假手术	5	0.082 ±0.020	0.086 ±0.019	0.083 ±0.009
模型	7	0.099 ±0.012[1)]	0.114 ±0.031[1)]	0.110 ±0.009[2)]
三七三醇皂苷	7	0.095 ±0.005	0.093 ±0.007[3)]	0.088 ±0.016[4)]
尼莫地平	7	0.096 ±0.010	0.095 ±0.009	0.093 ±0.008[3)]

注:与同时间点假手术组比较[1)] $P<0.05$;[2)] $P<0.01$;与同时间点模型组比较[3)] $P<0.05$;[4)] $P<0.01$

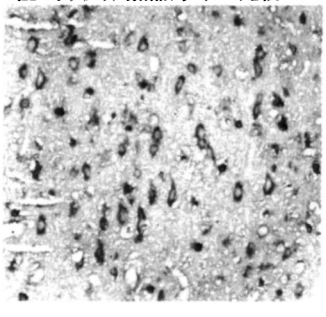

图 1 Nogo-A 第 3 天模型组 (×400)

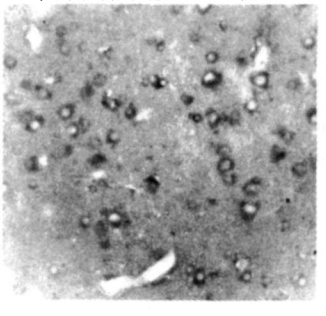

图 2 Nogo-A 第 3 天三七三醇皂苷组(×400)

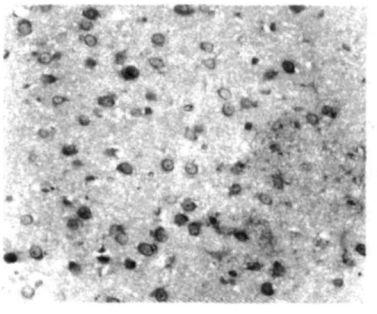

图 3 Nogo-A 第 3 天尼莫地平组 (×400)

3 讨论

用线栓阻断大脑中动脉造成脑缺血的方法是目前应用最广泛的局灶性脑缺血模型制备方法[4]。且此模型对评价药效较好[5]。但诸多因素可以影响此模型的成功。本次 MCAO模型的制备所用栓线是经激光技术打磨制成,直径一致,动物体重与栓线匹配合适,保证了模型的成功率与均一性。本研究结果显示,造模当日各组 EZ longa评分无统计学

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

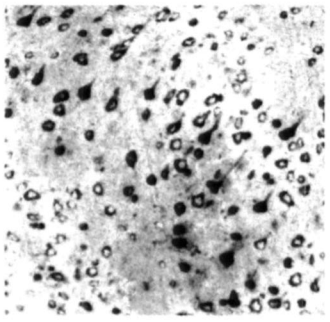

图 4 Nogo-A 第 7 天模型组 (×400)

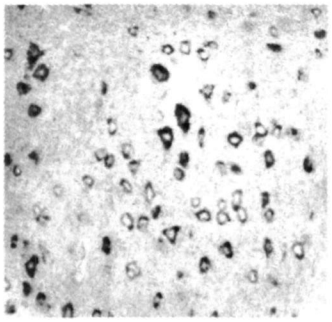

图 5 Nogo-A 第 7 天三七三醇皂苷组(×400)

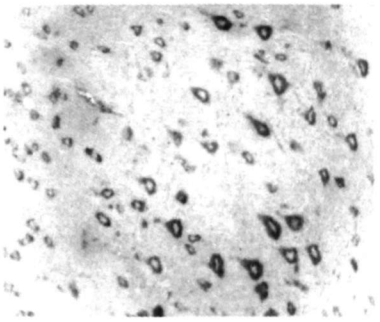

图 6 Nogo-A 第 7 天尼莫地平组 (×400)

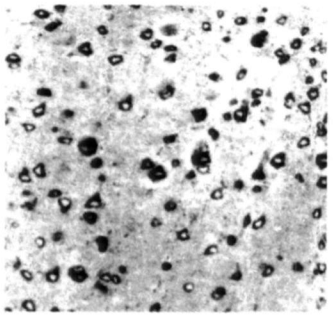

图 7 Nogo-A 第 28 天模型组 (×400)

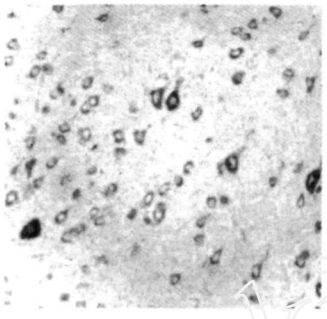

图 8 Nogo-A 第 28 天三七三醇皂苷组(×400)

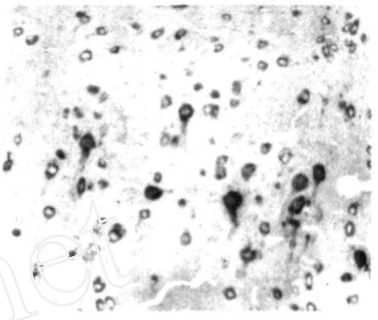

图 9 Nogo-A 第 28 天尼莫地平组 (×400)

差异,在术后 24, 48 h三七三醇皂苷组和尼莫地平组 EZLonga评分呈下降趋势,术后 72 h三七三醇皂苷组和尼莫地平组 EZLonga评分显著低于模型组,有显著的统计学差异。说明三七三醇皂苷与尼莫地平都能够改善大鼠脑梗死后的神经功能。

抑制轴突再生蛋白的存在是中枢神经系统再生的主要障碍之一。目前相继发现了数个具有抑制轴突再生的蛋白,其中 Nogo-A引人注目。在正常情况下 Nogo-A起着限界和防止形成异常联系的作用[5],在脑损伤后,Nogo-A可以抑制轴突再生[6]。它含有两个完全独立的抑制结构域,一个是位于氨基端的 amino-Nogo和另一个位于羧基端的 Nogo-66。amino-Nogo是如何其发挥抑制作用目前尚不清楚,Nogo-66能通过与其特异性受体 NgR结合发挥抑制轴突生长的作用。研究发现[7],脑缺血再灌注后,Nogo-A mRNA的表达在早期即有增加,所以 Nogo-A可能通过 CNS损伤点周围的完整组织表达的增加来发挥纤维再生抑制作用。

目前 Nogo-A在脑损伤治疗中的研究还处于基础阶段。主要通过敲除 Nogo基因使其不表达、或应用 Nogo-66的特异性抗体或者者疫苗的方法中和 Nogo的抑制作用、或采用 Nogo-66功能性受体 NgR的竞争性拮抗剂的方法来消除 Nogo的抑制作用,观察脑组织受损后功能恢复的情况及轴突再生的情况。采用中药干预 Nogo-A表达的报道则较为少见。

中药治疗脑血管病有较好特色,针对功能恢复和脑功能重塑阶段的疗效机制尚不清楚。中药三七活血化瘀、化瘀而不伤正气,用于脑血管病的治疗取得较好的疗效[6,7]。目前其作用机制研究主要集中在损伤和保护两方面,能否下调抑制因素的表达,促进缺血后重塑,目前鲜有报道。而探讨中药对主要抑制因子的作用,研究中药对重建过程、重塑过程的作用机制,将为中医药治疗脑血管病的机制研究提供新的思路。

本实验探讨三七对脑梗死后不同恢复时点 Nogo-A变化的影响。结果显示,模型组在术后第 3天时缺血周围区表达增加,术后第 7天增加更为显著,第 28天时稍下降,给药组在各时点均低于模型组。提示 Nogo-A可能在脑缺血早期即发挥其抑制轴突再生的作用,而其在高水平的长时间维持可能是脑损伤后神经元虽可再生但再生困难的原因之一,而应用三七或者尼莫地平可以下调 Nogo-A的表达,这可能是三七能够促进脑梗死后神经功能恢复的原因之一。术后第 28天,三七三醇皂苷组和尼莫地平组

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Nogo-A表达均进一步下降,且显著低于模型组,提示持续应用三七三醇皂苷或尼莫地平可以下调 Nogo-A的表达,提示在临床上,脑缺血后持续应用三七可能会有积极意义。也为研究中医药治疗脑血管病的机制提供了新的思路。

[参考文献]

[1] Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, et al. Nogo-A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions[J]. J Neuropathol Exp Neurol. 2007, 66(3): 238.

[2] Weinmann O, Schnell L, Ghosh A, et al. Intrathecally infused antibodies against Nogo-A penetrate the CNS and downregulate the endogenous neurite growth inhibitor Nogo-A[J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 32(1-2): 161.

[3] Longa E Z, Weinstein P R, S Carlson and R Cummins. eversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.

[4] 吴忧,贾建平. 脑缺血动物模型的制备及影响因素[J]. 中国脑血管病杂志, 2007, 4(1): 42.

[5] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2003: 1067.

[6] Buffo A, Zagrebelsky M, Andrea B, et al. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons[J]. J Neurosci, 2000, 20(6): 2275.

[7] Kim JE, Li S, Grandpre T, et al. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B[J]. Neuron, 2003, 38(2): 187.

[责任编辑 刘 晛]

金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究

林丽美,王智民*,王金华,崔海峰,王维皓,夏伯候,
张小光,宗桂珍,李建荣
(中国中医科学院 中药研究所,北京 100700)

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.的干燥花蕾或带初开的花,连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl的干燥果实[1]。金银花清热解毒,偏于上半身之热;而连翘清热解毒,散结消肿,便于透达全身之热。二药配伍,清热解毒力量倍增,流通气血以消肿散结止痛。银翘药对是临床上公认的常用有效药对,现有中成药中金银花和连翘的常用比例为 3∶1～1∶2,为了探讨银翘药对的最佳配伍比例及其可能的药效物质基础,作者对金银花、连翘单煎和银翘药对不同配伍比例合煎的抗炎、解热作用进行了比较,并以 RP-HPLC分析了其相应的化学成分变化情况。

1 材料

1.1 试药 金银花、连翘购于河北安国药市,经本所生药室何希荣主管技师鉴定分别为忍冬科植物忍冬 *L. japonica*的干燥花蕾或带初开的花和木犀科植物连翘 *F. suspense*的干燥果实。1～6号样品依次为:金银花、连翘单味水煎浓缩液、银翘药对的不同配伍比例(金银花∶连翘 =3∶1, 2∶1, 1∶1, 1∶2)水煎浓缩液。每种供试品均取 500 g生药,分别加水 10倍量,煎煮 2次,每次 45 min,过滤后合并滤液并浓缩至 1 g·mL^{-1},置 4 ℃冰箱保存,备用。取 1～6号样品各 1 mL置 50 mL三角瓶中,加甲醇 50 mL,精密称定,超声 30 min,补足重量,放置 1 h后取上清液,0.22 μm针头滤器滤过,备用。阳性对照药阿司匹林片剂(北京曙光制药厂,批号 050906),醋酸泼尼松注射液(上海第九制药厂,批号 050613)。对照品绿原酸,咖啡酸,木犀草苷,连翘酯苷 A,芦丁,连翘苷和连翘脂素(本课题组自制,纯度 ≥98%)。

1.2 动物 昆明种小鼠,雄性,体重(20±2) g;Wistar大鼠,雄性,体重(180±10) g,均为 SPF级,由北京维通利华实验动物有限公司和中国药品生物制品检定所实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2002-0003。上述动物均以标准颗粒饲料饲养。

[收稿日期] 2007-07-12
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672601)
[通讯作者] *王智民, Tel:(010)84014128, Fax:(010)84014128, E-mail: zhmw123@263.net

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net