

## 三七三醇皂苷和胞二磷胆碱联用对局灶脑缺血再灌注大鼠的脑保护作用

张利军 白宇 侯郁青 陆蕴菊 张曦华

作者单位: 上海中医药大学附属普陀医院神经内科 200062

**【摘要】** 目的 研究三七三醇皂苷(PTS)、胞二磷胆碱(CDP-c)联用对大鼠局灶脑缺血/再灌注的神经保护作用。方法 用大脑中动脉栓塞法制作短暂性(90min)局部脑缺血/再灌注模型,观察PTS、CDP-c单用及联用7d后,大鼠脑梗死体积、caspase-3表达及凋亡细胞数。结果 和对照组相比,PTS组、CDP-c组及两药联用组脑梗死体积较小,caspase-3表达、凋亡细胞数均较少,并有统计学意义。两药联用组和PTS组、CDP-c组相比,脑梗死体积较小、caspase-3表达、凋亡细胞数较少( $P<0.05$ )。PTS组和CDP-c组相比各指标无统计学意义。结论 PTS和CDP-c单用对短暂脑缺血/再灌注模型可能具有神经保护作用。PTS与CDP-c联用对短暂性局灶脑缺血/再灌注的神经保护可能有协同作用。

**【关键词】** 三七三醇皂苷 胞二磷胆碱 缺血再灌注 脑梗死体积 caspase-3

Cerebral Protective effects of combine PTS and CDP-c on transient focal cerebral ischemia-reperfusion in rats(ZHANG Lijun, BAI Yu, HOU Yuqing, LU Yunju, ZHANG Xihua, Department of Neurology, Putuo Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200062, China)

**【Abstract】** Objective To investigate the neuroprotective effects of PTS and CDP-c in rat model of transient focal cerebral ischemia-reperfusion. Methods The model of acute reperfusion injury after transient cerebral ischemia in rat was made by middle cerebral artery occlusion. Expression of caspase-3 and apoptotic cells in infarction were detected, and infarct volumes were assessed after PTS, CDP-c and their combined administration for 7 days. Results Compared to placebo group, infarct volume of PTS, CDP-c and combination groups were significantly reduced, and the number of caspase-3 positive cells and apoptotic cells were significantly fewer as well, respectively( $P<0.05$ ). Meanwhile compared to both PTS group and CDP-c group infarct volume of combination group were significantly reduced, and the number of caspase-3-positive cells and apoptotic cells

的评价。本研究表明,QTVI技术测定的二尖瓣环6个位点的平均Ds亦是反映左室收缩功能的指标,丰富了评价左室收缩功能的方法。

另外,QTVI技术测量的是心肌组织多普勒的频移信号,图像信息相对不受组织衰减的影响,不依赖心内膜轮廓的显示清晰与否,对二维图像质量差的患者也能进行准确分析,从而弥补了常规超声方法的不足。

因此,QTVI技术具有简便、安全、受图像质量影响小的优点。使用QTVI技术测定的二尖瓣环6个位点平均Vs及平均Ds,可定量评价老年心衰患者左室的收缩功能并能监测心功能的变化,对二维图像质量差的老年患者更有帮助,具有临床应用价值。

### 参 考 文 献

- 1 黄佐,译.心力衰竭的临床[A].见:Eugene Braunwald [美]主编.心脏病学[M].陈灞珠,主译.第五版.北京:人民卫生出版社,2000,407-429.
- 2 张贵灿,编著.现代超声心动图学.第1版[M].福州:福建科学技术出版社,2003,53-73.
- 3 Alam M, Wardell J, Andersson E, et al. Characteristics of mitral and tricuspid annular velocities determined by pulsed wave

Doppler tissue imaging in healthy subjects[J]. J Am Soc Echocardiogr, 1999, 12: 618-628.

- 4 Garcia MJ, Thomas JD. Tissue Doppler to Assess Diastolic Left Ventricular Function[J]. Echocardiography, 1999, 16: 501-508.
- 5 Vinereanu D, Khokhar A, Tweddell AC, et al. Estimation of global left ventricular function from the velocity of longitudinal shortening[J]. Echocardiography, 2002, 19: 177-185.
- 6 Alam M, Wardell J, Andersson et al. Assessment of left ventricular function using mitral annular velocities in patients with congestive heart failure with or without the presence of significant mitral regurgitation[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2003, 16: 240-245.
- 7 曹敏,施仲伟,胡厚达,等.定量组织速度显像技术测定二尖瓣环运动与左室整体收缩功能的评价[J].中国医学超声杂志,2002,18: 669-671.
- 8 陈孝义,郭瑞强,郝力丹,等.定量组织速度成像评价阿霉素性心脏病心脏收缩功能的研究[J].中华超声影像学杂志,2006,15: 220-222.
- 9 邓劲松,王洁.定量组织速度成像对左心室心肌运动异常的研究[J].中华超声影像学杂志,2003,12: 337-340.

收稿日期:2007-07-16

were significantly fewer, respectively. However, there was no significant difference between PTS group and CDP- c group. ( $P > 0.05$ ). Conclusion PTS and CDP- c may be respectively exert a neuroprotective effect during the transient experimental focal cerebral ischemia- reperfusion model. The results of this article demonstrates a possible synergistic neuroprotection effect of PTS and CDP- c after transient experimental focal cerebral ischemia- reperfusion.

【Key words】 PTS, CDP- c, ischemia- reperfusion, infarct volume, caspase- 3

目前溶栓治疗仍是急性缺血性中风有效的治疗方法, 但由于治疗时间窗很短, 不能广泛使用。大量研究证实神经保护药对改善急性缺血性中风患者脑损伤有很大的潜能, 但多数在动物中风模型中有效。缺血性脑损伤是一系列复杂、多因素过程, 脑缺血后会出现多种病理生理改变, 探讨有效的卒中联合治疗似在情理之中。已有研究显示, 尼莫地平 and 胞二磷胆碱 (cytidine 5 - diphosphate choline, CDP- c) 联用可减少脑梗死体积<sup>[1]</sup>。近年来, 中药在脑缺血治疗中的作用逐渐得到重视, 三七为五加科人参属植物三七 (Panaxnotogin- seng (Burk) F.H.Chen) 的干燥根, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效。三七三醇皂苷 (PTS) 主要活性成份人参三醇皂苷 Rg1 的含量达 60% 以上, Rg1、R1、Re 三者的含量约达 80%。已经证实 PTS 和 CDP- c 对局灶性脑缺血有神经保护作用<sup>[2,3]</sup>, 但两药合用是否加强神经保护作用还未见报道。本试验观察 PTS、CDP- c 联用对脑梗死体积、Caspase- 3 的影响, 研究两药有无协同作用。

### 1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 红四氮唑 (2, 3, 5- triphenylte trazolium chloride TTC, 中国医药集团上海化学试剂公司); CDP- c (上海太平洋生物高科技有限公司, 批号 060204); 三七三醇皂苷 (成都华神集团股份有限公司制药厂); 细胞凋亡检测试剂盒 (Boster 生物工程技术有限公司); caspase- 3 mRNA 原位杂交试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 图像分析仪 (HMIAS- 2000 医学图文分析系统)。BMJ- III 型包埋机 (常州中威电子仪器厂), 切片机 (LEICA- RM2235), 生物显微镜 (OLYMPUS CX31), 4/0 型尼龙手术缝线。

1.2 动物模型建立 雄性 SD 大鼠 90 只, 体重 (260 ± 10) g (中科院啮齿类实验动物中心提供)。7% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 采用 Longa 线栓法阻塞大鼠大脑中动脉, 建立急性局部脑缺血模型, 模型以麻醉清醒后评分 2 分或 2 分以上为制作成功。1.5h 后将尼龙线轻柔拉回致颈外动脉处, 即为再灌注开始。将尼龙线仅留在颈内动脉而不入颅, 1.5h 后将尼龙线拉回致颈外动脉处, 为假手术组。假手术组 10 只, 其余 80 只随机分 3 组, 对照组 (NS) (0.9% 氯化钠 1ml /kg · d<sup>-1</sup>)、CDP- c 组 (250mg / kg · d<sup>-1</sup>)、PTS 组 (50mg / kg · d<sup>-1</sup>)、两药联用组 (CDP- c 250mg / kg · d<sup>-1</sup>, PTS 50mg / kg · d<sup>-1</sup>), 每组 20 只, 其中一半用于测定脑梗死体积。造模成功后 CDP- c 组每天静脉注射 1 次, PTS 组和 NS 组每天灌胃两次, 连续 7d。

1.3 脑梗死体积测定 治疗 7d 后断头取脑, 冷冻后等分切成 2mm 厚脑片, 浸入 37 TTC 生理盐水溶液中染色 30min。染色后将脑片浸入 4% 中性多聚甲醛固定保存, 拍照后用 Ulead Photo Express 2.0 图象分析软件进行脑梗死轮廓勾画,

法医损伤测量软件测量脑缺血面积, 算出每个大脑梗死体积百分比。

1.4 caspase- 3 mRNA 原位杂交及 TUNEL 法检测细胞凋亡 治疗 7d 后, 麻醉大鼠固定取材。按试剂盒提供的步骤进行, DAB 显色, 细胞浆着棕黄色者为阳性细胞。按试剂盒提供的步骤进行, 苏木精轻度复染, 细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞, 即凋亡细胞。

1.5 图象采集和图象分析 每只大鼠均取 3 张切片, 在每张脑切片的缺血梗死部边缘 (假手术组大鼠脑切片在假手术侧部分) 随机选取 5 个高倍镜 (400 倍) 不重叠视野, 在图象分析仪下, 计数阳性细胞数。

1.6 统计方法 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理, 对所有结果进行正态性及方差齐性检验后, 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有显著差异。

## 2 结果

2.1 脑梗死体积 假手术组没有梗死组织。各治疗组与对照组相比脑梗死体积较小 ( $P < 0.05$ )。两药联用组脑梗死体积比 PTS 组、CDP- c 组小 ( $P < 0.05$ )。PTS 组和 CDP- c 组相比, 脑梗死体积无显著意义 ( $P > 0.05$ )。

2.2 caspase- 3 表达及细胞凋亡数 各治疗组 caspase- 3 表达及凋亡细胞均较对照组少 ( $P < 0.05$ ), 两药联用组与 PTS 组、CDP- c 组相比, caspase- 3 表达及凋亡细胞数较少, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PTS 组和 CDP- c 组相比, 无明显差别 ( $P > 0.05$ )。caspase- 3、凋亡细胞数均与脑梗死体积的变化呈正相关 ( $P < 0.05$ ), Caspase- 3 与凋亡细胞数的变化无相关性 ( $P > 0.05$ )。

表 1 大鼠脑缺血再灌注后各组 Caspase- 3 阳性细胞、细胞凋亡数及脑梗死体积 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	caspase- 3 (阳性细胞数)	凋亡细胞数	脑梗死体积 (%)
对照组	83.07 ± 7.2	4.03 ± 1.02	36.75 ± 4.7
CDP- c 组	63.49 ± 10.2*	3.16 ± 0.59*	26.45 ± 3.2*
PTS 组	65.69 ± 9.2*	3.02 ± 0.79*	27.75 ± 4.4*
两药联用组	51.12 ± 5.9	2.12 ± 0.38	20.33 ± 3.1

\* 与对照组比较  $P < 0.05$ ; 与对照组, PTS 组及 CDP- c 组比较  $P < 0.05$

## 3 讨论

试验中, PTS 和 CDP- c 可使短暂脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积明显缩小, 和对照组相比有显著意义。这一结果与近年动物局灶性脑缺血模型显示 CDP- c、PTS 能减少脑梗死体积的结果<sup>[4,5]</sup>相似。脑缺血再灌注损伤的病理生理是一个多环节、多因素、多途径损伤的酶促级联反应。已知导致再灌注损

伤的因素包括自由基、脂质过氧化、细胞内Ca<sup>2+</sup>超载、兴奋性递质的神经毒性效应及炎症损害等多重病理机制。CDP-c是一种内源性复合物,是磷脂酰胆碱膜生物合成的重要媒介,在卒中过程中有膜稳定作用并且减少自由基的释放<sup>[6]</sup>,其脑保护作用可能与抑制脑缺血诱导的谷氨酸浓度升高、阻止缺血所致ATP水平下降、稳定细胞膜、抑制自由脂肪酸的释放和减少自由基的产生有关<sup>[7]</sup>。三七是传统中药之一,现代药理研究证实具有抗自由基作用,同时还具有抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环及抗炎等作用<sup>[8]</sup>。有报道三七皂苷对缺血再灌注损伤还有减轻钙超载、减轻脑水肿、促进再灌注时的神经修复、减轻超微结构损伤和降低缺血再灌注期间死亡率等作用<sup>[9]</sup>。本实验中单用CDP-c和PTS均能缩小脑梗死体积,但两者相比无统计学意义。

caspase-3是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶,正常情况下caspase-3以无活性的酶原形式存在,只有当细胞凋亡时才被激活。caspase参与了缺血性脑损伤过程,使用caspase抑制剂可缩小大鼠脑梗死体积,改善神经功能缺损,有利于脑组织的恢复<sup>[10,11]</sup>。有研究显示,脑动脉梗死后不久便在梗死区神经细胞的胞浆与胞核中发现激活的caspase-3,可能与脑梗死后细胞内钙超载所介导的细胞毒性和死亡有一定的关系<sup>[1,12]</sup>。Chen J等<sup>[13]</sup>发现,大鼠短暂性脑缺血后8-72h时,在海马和尾状核处检测到caspase-3样蛋白酶活性物质,caspase-3mRNA和蛋白质在海马CA1区锥体神经元内明显增加;脑室内注入caspase-3抑制剂Z-DEVD-FMK可降低海马caspase-3活性,显著减少CA1区细胞死亡和DNA片断形成,上述作用一直持续到缺血后第7天。

本实验结果显示,大鼠脑缺血再灌注7d后,PTS组与CDP-c组大鼠脑梗死部位caspase-3表达、凋亡细胞比对照组明显减少(P<0.05)。与近年研究所显示的CDP-c可以减少前caspase-3的表达,并且清除半暗区细胞中caspase-3的结果<sup>[14]</sup>相似。据研究,Rg1能增强纤溶系统活性,促进血管内皮一氧化氮的释放而发挥抗血栓作用<sup>[15]</sup>,因而有助于Rg1对缺血后软脑膜微循环的改善,保护血脑屏障。最近发现,PTS可使缺血再灌注大鼠的Nestin表达上调<sup>[3]</sup>,还可促进缺血再灌注后细胞的增殖水平<sup>[16]</sup>。结合本实验中PTS组与CDP-c组都缩小了脑梗死体积,且Caspase-3、凋亡细胞数均和脑梗死体积呈正相关,提示PTS、CDP-c可能通过减少caspase-3表达、神经细胞凋亡等多种途径达到缩小脑梗死体积的神经保护作用。

实验中,两药合用组分别与PTS组与CDP-c组相比,脑梗死体积较小,并有显著意义。caspase-3表达、细胞凋亡数也均较少(P<0.05)。这说明PTS与CDP-c联用对脑缺血/再灌注神经保护可能有协同作用。提示,多种神经保护剂治疗可能通过不同途径相互增强神经保护作用,从而更好地阻止缺血损害的发展,具体机制有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

1 Sobrado M, Lopez MG, Carceller, et al. Combined nimodipine

and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2003, 118(1): 107-113.

- 2 Ataus SA, Onal MZ, Ozdem SS, et al. The effects of citicoline and lamotrigine alone and in combination following permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Int J Neurosci, 2004, 114(2): 183-196.
- 3 赵红念,胡晓松,周东,等.三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织Nestin表达的影响[J]. 华西医学, 2005, 20(2) 297-299.
- 4 Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport [J]. Neurobiol Dis, 2005, 18(2): 336-345.
- 5 胡晓松,周东,周德明.三七三醇皂苷对脑缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(4) 354-356
- 6 Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection[J]. J Neurochem, 2000, 75(6): 2528-2535.
- 7 Schabitz WR, Weber J, Takano K, et al. The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia[J]. J Neurol Sci, 1996, 138 (1-2): 21-25.
- 8 侯安会.三七的临床运用和实验研究概要[J]. 中医药信息, 1999, 6(1): 21-24.
- 9 张英鸽,刘天培.人参皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(1): 12-18.
- 10 Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, et al. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(3): 238-247.
- 11 Krupinski J, Lopez E, Marti E, et al. Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2000, 7(4): 332-342.
- 12 Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat [J]. Neuroscience, 2002, 115(1): 125-36.
- 13 Chen J, Nagayama T, Jin K, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 1998, 18(13): 4914-4928.
- 14 Krupinski J, Ferrer I, Barrachina M, et al. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Neuropharmacology, 2002, 42(6): 846-854.
- 15 徐陪亮,刘宛斌,饶曼人.三七皂苷Rg1对实验性血栓形成的影响及其机制探讨[J]. 药学报, 1997, 32(7): 502-505.
- 16 胡晓松,周德明,周东,等.三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠细胞增殖的影响[J], 2004, 19(3) 458-459.

收稿日期: 2007-07-06