

文章编号:1003-2754(2007)01-0038-03

# 三七三醇皂苷对大鼠脑缺血/再灌注脑损伤保护作用的实验研究

刘宗超<sup>1</sup>, 周官恩<sup>1</sup>, 赵克建<sup>2</sup>, 饶明俐<sup>1</sup>

**摘要:** **目的** 观察三七三醇皂苷(PTS)对大鼠脑缺血/再灌注损伤的脑保护作用,并初步探讨其作用机制。**方法** 采用Longa改良的线栓法制备大鼠中动脉阻塞(MACO)2h、再灌注6h、24h、72h的大鼠短暂局灶性脑缺血/再灌注模型,动物随机分假手术组、生理盐水对照组、三七三醇皂苷组。免疫组化法检测IL-1 $\beta$ 和ICAM-1,流式细胞仪检测细胞凋亡,同时利用TTC染色法测脑梗死体积。**结果** 三七三醇皂苷组大鼠再灌注72h时脑梗死体积显著减小,6h、24h、72h各时间点IL-1 $\beta$ 和ICAM-1阳性细胞数及凋亡细胞数亦明显减少。**结论** 三七三醇皂苷可抑制脑缺血/再灌注后炎症因子分泌及细胞凋亡,从而起到脑保护作用。

**关键词:** 三七三醇皂苷; 脑梗死体积; IL-1 $\beta$ ; ICAM-1; 凋亡

**中图分类号:**R743.3 **文献标识码:**A

**Protective effects of PTS on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats** LIU Zong-chao, ZHOU Guan-en, ZHAO Ke-jian, et al. (Department of Neurology, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract:** **Objective** To study the protective effects of PTS on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** The model of acute ischemia reperfusion injury in rats was made by middle cerebral artery occlusion for 2h. Just after reperfusion, the rats received intraperitoneally PTS (100mg/kg) or normal saline injection respectively, then all the animals were sacrificed after different durations of reperfusion (6h, 24h, 72h). The volume of the cerebral infarction were estimated by 2% TTC staining, the IL-1 $\beta$  and ICAM-1 positive cells were detected by immunohistochemistry staining and flow cytometry was performed to examine the apoptotic cells. **Results** The data showed significant difference on the volume of the cerebral infarction between the control and PTS-treated groups at 72h after reperfusion. Further more, the IL-1 $\beta$  and ICAM-1 positive cells and apoptotic cells also significantly decreased in PTS-treated groups at 6h, 24h and 72h after reperfusion. **Conclusion** PTS possesses cerebral protective effects against ischemia-reperfusion injury by inhibiting the secretion of cytokines and apoptosis.

**Key words:** PTS; Infarct cerebral volume; IL-1 $\beta$ ; ICAM-1; Apoptosis

三七三醇皂苷(PTS)为新研发出的三七类新药,其主要活性成分Rg1含量达60%以上,Rg1、R1、Re三者的含量约达80%,是三七类药物中的佼佼者。本研究欲通过动物实验,研究三七三醇皂苷对脑缺血的脑保护作用,并探讨其作用机制,为三七三醇皂苷在缺血性脑血管病中的临床应用奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

1.1 动物模型制备及分组 健康雄性Wistar大鼠,体重250~300g,由长春高新技术动物中心提供。采用Longa改良的线栓法制备大鼠脑缺血/再灌注模型:以10%水合氯醛腹腔内注射麻醉(350mg/kg),置仰卧位,颈部常规纵行切口,暴露并钝性游离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),分离ECA分支,结扎并游离ECA主干,结扎ICA的颅外分支翼腭动脉。直径0.25mm尼龙线一端加热使之呈光滑球面,沿ECA残端插入,经CCA分叉部沿ICA入颅至大脑前动脉(ACA),从而

阻断大脑中动脉(MCA)的血液供应,尼龙线插入深度由分叉部计18.5 $\pm$ 0.5mm,缺血2h后拔出尼龙线实现再灌注。将动物随机分成3组:(1)三七三醇皂苷(由成都华神药业股份有限公司提供)干预组,于再灌后立即腹腔注射给药(100mg/kg);(2)生理盐水对照组,药物由等量生理盐水代替;(3)假手术组除不插尼龙线外其余步骤同模型组;(1)、(2)每组又分6h、24h、72h时间点,每个时间点各5只,(3)组4只。

1.2 脑梗死体积测定 术后72h断头取脑,置于冷盐水中浸泡10min后行冠状切片,每片厚约2mm,共6片,置于2%氯化2,3,5-三苯四氮唑(2,3,

收稿日期:2006-07-15;修订日期:2006-12-18

作者单位:(1. 吉林大学第一医院神经内科,吉林 长春 130021;2. 北京燕化凤凰医院神经外科,北京 102500;刘宗超,博士生,现在青岛大学医学院附属医院,山东 青岛 266003;周官恩,博士生,现在天津环湖医院神经内科,天津 300060;饶明俐,通信作者)

5-Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)中避光染色30min,正常组织染成深红色,梗死灶呈白色,染色后的切片置于4%多聚甲醛液中过夜待测。利用Luzex-F图像分析仪测定每个脑片后表面梗死灶面积,并计算出每只大鼠脑梗死体积。

1.3 免疫组织化学 采用免疫组织化学SABC法,DAB显色。石蜡切片常规脱蜡至水,3% $H_2O_2$ 孵育,正常山羊血清封闭,滴加一抗工作液(IL-1 $\beta$ /ICAM-1一抗1:100);二抗工作液,辣根过氧化物酶标记的连霉卵白素工作液,DAB显色剂。复染、脱水、透明、封片后在光镜下观察。每片取选取3个视野进行阳性细胞计数,取平均值。

1.4 流式细胞仪检测方法 FACSsan440型流式细胞仪,PI、RNase为Sigma公司产品。脑组织制成单细胞悬液,乙醇固定,PI染色。应用波长488nm激光,检测红色荧光,每个样本检测10000个细胞,绘制细胞数-DNA分布图。

1.5 统计学处理 所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS11.0版统计学软件进行处理,组内比较采用方差分析,组间比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑梗死体积

TTC染色结果表明,假手术组2例脑片均红染,无白色梗死灶形成。再灌注72h时,三七三醇皂苷干预组脑梗死体积为 $84.75 \pm 12.26 \text{mm}^3$ ,生理盐水组为 $126.48 \pm 13.42 \text{mm}^3$ ,两者比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。

### 2.2 免疫组化

2.2.1 IL-1 $\beta$ 免疫组化结果 脑缺血/再灌注6h时,在缺血侧海马部位、大脑皮层和基底节区均可检测到大量IL-1 $\beta$ 阳性细胞,其中以大脑皮层最为明显,随着再灌注时间的延长,表达逐渐增强,高峰出现在再灌注后72h,阳性染色主要位于神经细胞和部分胶质细胞胞浆,三七三醇皂苷干预后,24h、72h时的IL-1 $\beta$ 阳性细胞数明显减少。

表1 脑缺血/再灌注后IL-1 $\beta$ 阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	再灌注时间		
	6h	24h	72h
生理盐水组	18.66 $\pm$ 3.89	28.89 $\pm$ 3.94	70.59 $\pm$ 7.02
PTS干预组	14.10 $\pm$ 4.06	19.50 $\pm$ 4.04 <sup>Δ</sup>	50.42 $\pm$ 3.19 <sup>Δ</sup>

与生理盐水组比较  $\Delta P < 0.01$

### 2.2.2 ICAM-1免疫组化结果 大鼠大脑冠

状切面缺血侧在再灌注后6h即可见大量ICAM-1阳性微血管内皮细胞,24h时除微血管内皮细胞外,尚可见ICAM-1表达于部分神经细胞,72h时表达最强,治疗组免疫阳性微血管和神经细胞数较对照组显著减少。

表2 脑缺血/再灌注后ICAM-1阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	再灌注时间		
	6h	24h	72h
生理盐水组	28.94 $\pm$ 2.95	47.21 $\pm$ 3.08	75.63 $\pm$ 3.23
PTS干预组	22.93 $\pm$ 3.20*	31.50 $\pm$ 3.84 <sup>Δ</sup>	50.25 $\pm$ 34.42 <sup>Δ</sup>

与生理盐水组比较 \* $P < 0.05$ ,  $\Delta P < 0.01$

### 2.3 流式细胞仪检测结果

脑缺血/再灌注后6h,就可检测到大量凋亡细胞,各时间点均可见亚二倍体峰,亚二倍体峰细胞数逐渐增加,在72h时形成高峰;三七三醇皂苷干预后,各时间点凋亡细胞百分率均明显降低。

表3 脑缺血/再灌注后凋亡细胞百分率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	再灌注时间		
	6h	24h	72h
生理盐水组	15.94 $\pm$ 1.54	29.92 $\pm$ 2.60	48.85 $\pm$ 3.89
PTS干预组	12.41 $\pm$ 1.72 <sup>Δ</sup>	19.03 $\pm$ 2.59 <sup>Δ</sup>	36.44 $\pm$ 5.38 <sup>Δ</sup>

与生理盐水组比较  $\Delta P < 0.01$

## 3 讨论

脑血管疾病是严重危害人类健康的常见病、多发病,其中尤脑梗死最为常见,目前临床上实行的溶栓疗法,虽能使闭塞血管得以再通,血供恢复,挽救半暗带濒死的神经细胞,但可引起再灌注损伤,影响患者的预后和功能恢复,大量研究表明,脑缺血/再灌注损伤主要与炎症反应、神经细胞凋亡、氧化应激、钙离子超载等有关<sup>[1,2]</sup>。

三七是一种传统中药,具有活血化瘀的功效,其活性成分为三七总皂苷,含人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1,研究发现,三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用<sup>[3,4]</sup>;在临床上将其应用于治疗脑血管病后遗症亦取得一定疗效<sup>[5,6]</sup>。三七总皂苷对缺血性脑损伤的保护作用可能与以下因素有关:(1)钙通道阻断作用;实验证明三七总皂苷能非选择性阻断受体依赖的钙通道开放,抑制细胞外钙内流和细胞内钙释放,防止细胞内钙离子超载,是一种非特异性钙离子通道阻断剂,抑制各种来源激动钙离子所致的平滑肌收缩;(2)抗自由基作

用;三七总皂苷能使脑组织及血浆中的丙二醛显著减少,超氧化物歧化酶活性升高,对黄嘌呤氧化酶氧化黄嘌呤产生的氧自由基有清除作用;(3)三七总皂苷能抑制血小板聚集,降低血液粘稠度,改善血液的高凝状态,改善梗死区的血液供应;(4)保护血脑屏障,减轻其损伤。但有关其对缺血性脑损伤中炎症因子及细胞凋亡影响的研究尚未见报道。

本实验结果显示,用三七三醇皂苷干预后,脑缺血/再灌注 72h 时,脑梗死面积降低了 33%,表明三七三醇皂苷对大鼠脑缺血/再灌注损伤有显著的保护作用。

近年来的研究表明,脑缺血/再灌注后脑组织局部过度的炎症反应是造成再灌注损伤的主要原因之一,尤其是炎性细胞因子在脑缺血/再灌注损伤中的关键性作用已得到充分证实。IL-1 $\beta$  是一种重要的细胞因子,参与免疫及炎症反应,脑缺血/再灌注可诱导 IL-1 $\beta$  产生<sup>[7~10]</sup>,我们在实验中也发现,IL-1 $\beta$  在再灌注 6h 时表达即明显增加,3d 时达高峰,生成的 IL-1 $\beta$  可通过诱导粘附分子表达、促进脑内兴奋性氨基酸和自由基的释放、引起钙超载等途径加重脑损伤。

ICAM-1 是一种单链糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族。脑缺血/再灌注发生后,循环中的炎性细胞要进入脑组织,必须经历黏附、游出和趋化几个阶段,其中炎性细胞黏附于血管内皮细胞是始动和关键环节,而这一环节正是由 ICAM-1 介导的<sup>[11]</sup>。实验结果显示,脑缺血/再灌注损伤可诱导内皮细胞大量表达 ICAM-1,介导炎性细胞进入脑组织,从而启动炎症反应;同时我们还发现,部分神经细胞亦有 ICAM-1 表达,提示 ICAM-1 不仅可以介导炎性细胞进入脑组织,而且可以介导炎性细胞与神经细胞直接结合,并将其直接杀,从而在炎症的发生发展中发挥重要作用。

IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 都是重要的细胞因子,它们互相促进,诱发和加重了脑缺血/再灌注后的炎症反应;再灌注早期腹腔内注射三七三醇皂苷,可显著降低两者的表达,从而抑制炎症反应,减轻再灌注后脑损伤。

众多研究表明凋亡机制参与了脑缺血/再灌注损伤<sup>[12,13]</sup>,因此,抑制细胞凋亡已成为干预脑缺血/再灌注损伤的一个治疗靶点,并试图找到一种效果理想的药物,其中作为中草药的三七三醇皂苷备受关注。如李巾伟<sup>[14]</sup>在实验中发现,三七总皂苷能促进抑制凋亡基因 bcl-2 的表达;体外培养的海马神经细胞在经受缺氧/低糖刺激后,出现明显的凋亡现

象,若给予三七总皂苷干预,凋亡明显减轻,进一步研究发现,三七总皂苷通过减少钙离子内流,从而起到抑制凋亡作用<sup>[15]</sup>。我们在实验中也发现,应用三七三醇皂苷干预后,细胞凋亡在 6h、24h、72h 分别降低了 24.44%、32.85% 和 28.57%,其抑制凋亡的机制可能与上述两种途径有关,但详细机制有待进一步研究。

总之,实验结果显示,脑缺血/再灌注发生后,IL-1 $\beta$ 、ICAM-1 和细胞凋亡表达明显增加,给予三七三醇皂苷干预后,两者均受到显著抑制,同时脑梗死体积明显减小,提示三七三醇皂苷可能通过抑制脑缺血/再灌注后的炎症反应和细胞凋亡而起脑保护作用,从而为探讨三七三醇皂苷药理作用提供了实验理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Gross DR. Stroke. Revolution in therapy[J]. West J Med, 1994, 161(3):288-91.
- [2] Weinstein PR, Hong S, Sharp FR. Molecular identification of the ischemic penumbra[J]. Stroke, 2004, 35(11 Suppl 1):2666-70.
- [3] 许长庆,夏作理,史义菊,等. 脑缺血后脑组织 NO 含量和 NOS 活性变化及三七总皂苷的影响[J]. 中国神经精神科杂志, 1997, 23(2):77.
- [4] 刘建辉,冀风云,王婷,等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注损伤脑保护作用的实验研究[J]. 中国临床神经科学, 2002, 10(1):90.
- [5] 容兆宇. 血栓通治疗缺血性中风量效关系探讨[J]. 中国中医急症, 2000, 9(3):130.
- [6] 李辉,张华明,彭芳,等. 通舒胶囊对缺血性脑损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(9):698-700.
- [7] Liu T, McDonnell PC, Young PR, et al. Interleukin-1 $\beta$  mRNA expression in ischemic rat cortex[J]. Stroke, 1994, 25(6):1481-1488.
- [8] Minami M, Kuraishi Y, Yabuuchi K, et al. Induction of interleukin-1 $\beta$  mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia[J]. J Neurochem, 1992, 58(2):390-392.
- [9] Wang X, Yue TL, Barone FC, et al. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follow early response gene expression in transient focal ischemia[J]. Mol Chem Neuropathol, 1994, 23(1):103-104.
- [10] Wiebner A, Gehrmann J, Lindholm D, et al. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and interleukin-1 $\beta$  mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia[J]. Acta Neuropathol, 1993, 86(2):439-446.
- [11] Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease[J]. Stroke, 2002, 33(8):2115-22.
- [12] Janardhan V, Qureshi AI. Mechanisms of ischemic brain injury[J]. Curr Cardiol Rep, 2004, 6(2):117-23.
- [13] Zador Z, Lacza Z, Benyo Z, et al. Apoptosis in focal brain ischemia[J]. Ideggyogy Sz, 2003, 56(7-8):216-28.
- [14] 李巾伟,朱培纯,司银楚,等. 脑出血大鼠前脑抑制凋亡基因 bcl-2 的表达及三七总皂苷的影响[J]. 中医药学刊, 2003, 21(2):205-206.
- [15] 朱陵群,范吉平,黄启福,等. 三七总皂苷抗缺氧缺糖再给氧诱导大鼠海马神经细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1):52-54.