

三七三醇皂苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注后不同恢复时期脑梗死体积和 Nogo-A 表达的影响

严永兴 梁丽贞 周智林 陈 涛 李鹏 吴春丽 刘慧丽

(浙江省杭州市第三人民医院·杭州 310009)

摘要 目的:探讨三七三醇皂苷(PTS)在大鼠局灶性脑缺血/再灌注后脑功能重塑中的作用机制。方法:采用改良的线栓法制备大鼠短暂大脑中动脉栓塞再灌注模型,检测缺血再灌注后不同恢复时期(3、7、28天)大鼠神经功能恢复、脑梗死体积、Nogo-A mRNA及蛋白的表达。结果:与同时间点模型组相比,PTS治疗组神经功能缺损评分、脑梗死体积、Nogo-A mRNA及蛋白表达均减少,差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$),Nogo-A表达与梗死体积变化呈正相关。结论:PTS可抑制脑缺血再灌注后Nogo-A表达,从而起到脑梗死后神经功能恢复、脑功能重塑的作用。

关键词 脑缺血/中医药疗法 再灌注损伤/中医药疗法 三七三醇皂苷/治疗应用 大鼠

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治疗中具有肯定疗效,三七三醇皂苷(PTS)主要活性成份Rg1的含量达60%以上,Rg1、R1、Re三者的含量约达80%。本研究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间点(3、7、28天)脑组织中Nogo-A mRNA和蛋白表达的变化,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 主要药品、试剂和仪器 三七三醇皂苷:成都华神集团股份有限公司制药厂;红四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride TTC):中国医药集团上海化学试剂公司;原位杂交试剂盒:Booster生物工程技术有限公司;Triton X-100试剂:GBCO BRC公司;MetaMorph图像分析系统等。

1.2 动物、模型建立与分组给药 雄性SD大鼠108只,体重(260±10)g浙江中医药大学实验动物中心提供。7%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,采用Longa^[3]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。1.5小时后,将尼龙线轻柔拉回至颈外动脉处,即为再灌注开始。将尼龙线仅留在颈内动脉而不入颅,1.5小时后,将尼龙线拉回至颈外动脉处,为假手术组。造模后大鼠随机分为模型组(0.9%氯化钠 1ml/kg·d⁻¹)、PTS组(50mg/kg·d⁻¹),分两次灌胃,假手术组予等量生理盐水。每组各36只,分别于术后3、7、28天不同时间点处死大鼠,其中每组一半测定脑梗死体积,另一半用于Nogo-A表达的检测。

1.3 神经功能缺损评分 治疗3、7、28天后,处死前采用Bederson^[4]神经功能评分法进行评分。

1.4 脑梗死体积测定 治疗3、7、28天后断头取脑,冷冻后等分切成2mm厚脑片,浸入37℃ TTC生理盐水溶液中染色

30分钟。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图像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,计算大脑梗死体积百分比。

1.5 Nogo-A mRNA和蛋白检测 原位杂交法检测Nogo-A mRNA,免疫组织化学法检测Nogo-A蛋白。

用Leica 500W图像分析系统采集各组原位杂交和免疫组化切片图像,用Universal Imaging公司MetaMorph图像分析系统进行图像分析。各组不同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。

1.6 统计方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用SPSS10.0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。

2 结果 见表1。

表1 不同时间点各组大鼠脑梗死体积(%),神经功能评分、Nogo-A mRNA及蛋白表达的测定($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	时间	脑梗死体积(%)	神经功能评分	Nogo-A mRNA	Nogo-A蛋白
假手术组	3d	0	0	5.3±1.2	0.079±0.016
	7d	0	0	5.0±1.5	0.081±0.021
	28d	0	0	4.9±1.3	0.075±0.011
模型组	3d	39.4±6.7	6.1±1.3	10.1±2.6 [#]	0.095±0.015 [#]
	7d	37.9±4.8	5.6±1.1	16.7±3.5 ^{##}	0.116±0.029 ^{##}
	28d	36.8±5.3	5.2±1.3	12.5±2.7 ^{##}	0.113±0.018 ^{##}
PTS组	3d	36.5±5.9 [*]	5.0±1.4 [*]	6.2±1.4 [*]	0.089±0.007 [*]
	7d	29.4±6.1 ^{**}	4.0±1.2 ^{**}	5.8±1.1 ^{**}	0.084±0.008 ^{**}
	28d	25.4±4.3 ^{**}	3.1±1.0 ^{**}	4.7±1.5 ^{**}	0.081±0.007 ^{**}

与假手术组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论 有研究显示PTS具有增强预缺血诱导的脑缺血耐受作用,并上调GFAR、bFGF表达^[5],抑制脑缺血再灌注后炎症因子分泌,减少脑梗死体积,从而起到脑保护作用^[6,7]。本研究证实大鼠局灶性脑缺血再灌注后3、7、28天PTS治疗组梗死体积、神经功能缺损评分均减小,与同时间点模型组

相比, 差异有显著性 ($P < 0.05, P < 0.01$); 各组神经功能缺损评分与脑梗死体积的变化无相关性 ($P > 0.05$), 说明 PTS 能够改善大鼠局灶性脑缺血再灌注后的神经功能, 促使其神经功能恢复。

各种抑制因素的作用是导致脑梗死后神经纤维再生受限的重要原因, 是造成中枢神经损伤后遗症的重要因素。目前多数学者认为, 如不能有效解除抑制因素的作用, 中枢神经再生难以达到有效的康复水平^[3]。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。神经突起生长抑制因子 Nogo-A 是目前发现的最为强烈的神经纤维再生抑制剂。研究显示, 大鼠大脑皮质、海马、脑干、小脑等部位均有 Nogo-A 阳性表达, 说明 Nogo-A 在脑内神经元中广泛存在^[8]。在正常情况下 Nogo-A 起着限界和防止形成异常联系的作用, 在脑损伤后 Nogo-A 可以抑制轴突再生^[9]。研究发现^[10] 脑缺血再灌注后, Nogo-A mRNA 的表达在早期即有增加, 所以 Nogo-A 可能通过中枢神经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。

本研究结果显示模型组在术后 3 天时缺血周围区 Nogo 表达增加, 术后 7 天增加更为显著, 术后 28 天稍下降; PTS 治疗组在各时点表达均低于模型组, 差异有显著性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。表明 Nogo-A 可能在脑缺血早期即发挥抑制轴突再生作用, 而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 PTS 可以下调 Nogo-A 的表达, 这可能是 PTS 能够促进脑梗死后神经功能恢复的原因之一。术后 28 天, PTS 治疗组 Nogo-A 表达进一步下降, 且显著低于模型组, 提示持续应用 PTS 可以下调 Nogo-A 的表达, 表明在临床上, 脑缺血后持续应用 PTS 可能会有积极意义。

参考文献

- 1 Kuhlmann T, Remington L, Matuschak B, et al Nogo-A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(3): 238
- 2 Weimann 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. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32(1-2): 161
- 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(6): 84
- 4 Bederson Pitts Tsuji et al Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17(8): 472
- 5 周俊英, 刘小利, 罗祖明. 三七三醇皂苷增进大鼠脑缺血耐受的作用及对 GFAP 和 bFGF 表达的影响. *华西药理学杂志*, 2005; 20(6): 489
- 6 刘宗超, 周富恩, 赵克建, 等. 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. *中风与神经疾病杂志*, 2007; 24(2): 38
- 7 严永兴, 梁丽贞, 周智林, 等. 三七三醇皂苷对大鼠局灶性脑缺血后梗死体积、细胞凋亡及 Caspase-3 mRNA 表达的影响. *中国中医药科技*, 2010; 17(3): 211
- 8 程希平, 刘惠玲, 宋朝君, 等. Nogo-A 在成年大鼠脑内神经元的分布. *解剖学报*, 2005; 5(36): 456
- 9 Buff A, Zagrebelsky M, Andrea B, et al Application of neutralizing antibodies against N1E-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of injured purkinje cell axons. *J Neurosci* 2000; 20(6): 2275
- 10 Kim JE, Li S, Grandpre T, et al Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 2003; 38(2): 187

(修回: 2010-08-02)

中药内外合治治疗带状疱疹 20例

高山¹ 高欣宇²

(¹黑龙江省中医研究院·哈尔滨 150036 ²黑龙江中医药大学研究生·哈尔滨 150040)

1 临床资料 20例均系门诊 2008-07~2010-01 就诊的患者, 其中男 11 例, 女 9 例; 年龄 20~76 岁。

2 治疗方法 中药内服: 龙胆草 15g 黄芩 15g 栀子 15g 泽泻 15g 连翘 20g 双花 30g 板蓝根 30g 大青叶 20g 车前子 20g 当归 15g 生地 20g 柴胡 15g 甘草 15g 治疗。每日 1 剂, 水煎两次, 早晚分服, 服 1~2 周。中药外用: 大黄 30g 黄柏 30g 五倍子 20g 姜黄 30g 黄连 30g 苦参 20g 冰片 (单包压面后下) 10g 煎汤外洗。每日 2 次, 外敷 1~2 周。配合静脉注射双黄连注射液。

3 结果 参照国家中医药管理局 1994 年制定的《中医病证诊断疗效标准》评定疗效。结果治愈 15 例 (75%), 显效 5 例 (25%)。

4 体会 带状疱疹属中医“缠腰火龙”“缠腰火丹”, 俗称“蜘蛛疮”范畴, 其发病与情志有关, 或因饮食不节, 脾失健运, 湿蕴化热, 以致毒邪易感, 湿热火毒蕴积肌肤发病; 或因外感风寒湿毒邪未清, 气血不畅所致; 或因肝郁化火外窜皮肤或肝经湿热下注, 后期则因肝肾

阴虚, 气血不通所致。方中龙胆草、黄芩、栀子清肝胆之热, 车前草、泽泻泻肝胆之湿, 板蓝根、大青叶、生地、双花、连翘清热解毒, 诸药共奏清热利湿, 解毒止痛之功。外用洗剂组方中大黄、黄连、黄柏性寒泻火解毒; 冰片辛香走窜, 善散火郁, 疗疮疡肿毒; 姜黄行气止痛; 苦参清热燥湿, 祛风杀虫疗皮肤瘙痒、湿毒疮疡。五倍子敛肺、涩肠、止血、解毒, 治诸热疮毒。中药内服以清肝利湿解毒, 外用以泻火解毒, 疗疮止痛, 并静脉注射双黄连助清热解毒之力, 最大限度地发挥中药的泻火解毒之功。内外合治的方法, 见效快, 明显缩短疗程, 显著降低神经痛后遗症的发生, 且无明显副作用, 具有良好的临床效果, 有临床推广价值。

参考文献

- 1 仇洪. 中西医结合治疗带状疱疹临床体会. *中国中医急症*, 2010; 19(1): 143

(修回: 2010-08-09)