

回药扎里奴思方对脑缺血再灌注大鼠脑内 ICAM-1 与 TNF- α 表达的影响

甘佳乐¹, 刘敬霞², 黑长春¹, 刘超¹, 顾玉宝¹, 王枫¹

1. 宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004
2. 宁夏医科大学回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

[摘要] 目的: 研究扎里奴思方对脑缺血急性期再灌注大鼠脑内细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和肿瘤细胞坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响。方法: 将 180 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组、扎里奴思方组, 每组 45 只, 在第 1 天、第 3 天、第 7 天每个时间点各 15 只。除假手术组外, 其余各组采用线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞 (MCAO) 模型, 所有动物于手术前 3 天预防性给药, 造模清醒后 2 h 按相应分组灌胃给药直至取材, 给药剂量为尼莫地平组 10.8 mg/kg, 扎里奴思方组 1.54 g/0.1 kg, 模型组和假手术组以生理盐水灌胃, 每天 1 次。采用 ELISA 法检测脑内 ICAM-1 和 TNF- α 的含量; RT-PCR 法检测脑内 ICAM-1 mRNA、TNF- α mRNA 的表达。结果: 与假手术组比较, 模型组 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 和 TNF- α 、TNF- α mRNA 的表达明显增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 尼莫地平组和扎里奴思方组 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 和 TNF- α 、TNF- α mRNA 的表达均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与尼莫地平组比较, 扎里奴思方 1 天、7 天组 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 和 TNF- α 、TNF- α mRNA 的表达显著降低, 扎里奴思方 3 天组 ICAM-1、ICAM-1 mRNA、TNF- α 的表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 扎里奴思方对脑缺血再灌注大鼠脑神经元起保护作用, 其机制可能与抑制大鼠脑内 ICAM-1 和 TNF- α 的表达有关。

[关键词] 脑缺血再灌注; 扎里奴思方; 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1); 肿瘤细胞坏死因子- α (TNF- α); 动物实验; 大鼠
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 02-0015-05
DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.005

Effect of Zhali Nusi Prescription of Hui Ethnic Medicine on the Expression of ICAM-1 and TNF- α in Brains of Cerebral Ischemia-Reperfusion Rats

GAN Jiale, LIU Jingxia, HEI Changchun, LIU Chao, GU Yubao, WANG Feng

Abstract: Objective: To study the effect of Zhali Nusi prescription of Hui ethnic medicine on the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICMA-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in brains of cerebral ischemia-reperfusion rats. Methods: One hundred and eighty SD rats were randomly divided into shame operation group, model group, Nimodiping group and Zhali Nusi group, 45 rats in each, and at the first, third and seventh days with 15 rats selected in each time point. Except shame operation group, other groups were employed suture method to establish middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat models. All rats received preventive administration 3 days before operation. Rats in different groups were administrated respectively 2 hours following model establishment. Administration dosage was 10.8 mg/kg in Nimodiping group and 1.54 g/0.1 kg in Zhali Nusi group. Model group and shame operation group received normal saline by gavage until the time for drawing materials. Used ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method to determine contents of ICAM-1 and TNF- α in brains, and determined the expression of ICAM-1 mRNA, TNF- α mRNA in brains with real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Results: The expression of ICAM-1, ICAM-1 mRNA, TNF- α and TNF- α mRNA were increased in model group, comparing with those in shame operation group ($P < 0.01$). The expression of ICAM-1, ICAM-1 mRNA, TNF- α and TNF- α mRNA were evidently declined in Nimodiping group and Zhali Nusi group, comparing with those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Comparing with those in Nimodiping

[收稿日期] 2016-08-05

[基金资助] 国家“十二五”科技支撑项目 (SQ2013SF12E02181); 国家自然科学基金项目 (8156150355)

[作者简介] 甘佳乐 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治老年病。

[通讯作者] 刘敬霞, E-mail: ljx199566@163.com。

group, the expression of ICAM-1, ICAM-1 mRNA, TNF- α and TNF- α mRNA were significantly decreased in first-day Zhali Nusi group and seventh-day Zhali Nusi group, and the expression of ICAM-1, ICAM-1 mRNA and TNF- α were declined obviously in third-day Zhali Nusi group, differences being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion: Zhali Nusi prescription has protective effect on neurons in cerebral ischemia-reperfusion rats. Its mechanism may be related to the inhibition of expression of ICMA-1 and TNF- α in rats' brains.

Keywords: Cerebral ischemia-reperfusion; Zhali Nusi prescription; Intercellular adhesion molecule-1 (ICMA-1); Tumor necrosis factor- α (TNF- α); Animal experiment; Rats

脑缺血后一定时间血液恢复供应后, 大脑机能不但未恢复, 而且出现更加严重的功能障碍, 称为脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIR)。炎症因子在脑缺血再灌注损伤后的一系列复杂病理反应中发挥着极其重要的作用^[1]。在脑缺血再灌注早期, 致炎细胞因子、黏附分子及趋化因子的上调会引起中性粒细胞、单核细胞及巨噬细胞浸润在脑微血管内皮细胞及其基底膜, 导致相应部位的损害, 从而诱发血管源性水肿和出血, 而在这一过程中, 黏附分子起着基础和核心作用, 它并非直接致炎因子, 而是介导致炎因子黏附于血管内皮细胞的中介因子, 因此黏附分子与炎症反应关系极为密切^[2]。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)已成为近年来的研究热点, 而肿瘤细胞坏死因子- α (TNF- α)作为功能广泛的细胞因子参与机体的免疫应答和炎症反应也与脑缺血再灌注损伤密切相关。扎里奴思方出自《回回药方》残卷十二中风门, 原文谓此方: “治口眼歪斜痰胜, 弱病净其浑身、厚浊风痰, 开窍, 治频频淋下, 半身不遂, 脑病头疼”^[3], 该方是回药治疗中风的经典方剂。本研究拟采用大鼠脑缺血再灌注模型, 进一步探讨扎里奴思方发挥脑保护的作用机制, 为深入研究回医药防治脑病及其应用提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 180 只, SPF 级, 3~4 个月龄, 体重(300 \pm 50)g, 由宁夏医科大学实验动物中心提供, 合格证号 2013-0001。所有大鼠饲养于同一房间。房间温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C, 湿度(50 \pm 10)%。光暗周期 12 h/12 h, 大鼠自由饮水和进食, 常规环境适应性饲养 1 周后开始进行实验。动物实验通过了宁夏医科大学动物伦理委员会的审查。

1.2 实验药物 扎里奴思方(药方出自《回回药方》), 处方: 安息香 3 g, 干祖伐(怀牛膝)24 g, 法里公(小茴香)、兀沙吉(乳香)、法忒刺撒里荣(当归)、木里叶(没药)、撒法郎(番红花)、芦荟、伯思八牙(水龙骨)、膈膈脐(海狗肾)、阿夫忒蒙(菟丝子)、石菖蒲、肉桂、牡丹皮各 12 g, 由宁夏医科大学附属回医中医医院制剂室提供, 方中所用生药材均去除杂质, 按药物配比煎煮后滤取煎液浓缩至药液含生药 3.0 g/mL, 4 $^{\circ}$ C 保存备用, 用前稀释至生药材含量为 1.5 g/mL, 尼莫地平片(由拜耳医药保健有限公司提供, 30 mg/片, 批号: H20003010), 用蒸馏水配成混悬液 1.08 g/L。

1.3 主要试剂和仪器 蒸馏水(宁夏医科大学实验动物中心提供); 水合氯醛(天津市福晨化学试剂厂); 局灶性脑缺血 A4 尼龙栓线(北京诚林生物技术有限公司, 批号: 3043-A4); 电子天平(BT224S, Sartorius 公司)。TaKaRa RNA PCR 试剂盒(TaKaRa 公司); ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 分组与给药 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、尼莫地平组、扎里奴思方组, 每组 45 只, 在第 1 天、第 3 天、第 7 天每个时间点各 15 只。所有动物于手术前 3 天预防性给药, 造模清醒后 2 h 按相应分组灌胃给药直至取材, 给药剂量均按动物与人体表面积折算: 尼莫地平组 10.8 mg/kg, 扎里奴思方组 1.54 g/0.1 kg, 模型组和假手术组以生理盐水灌胃, 每天 1 次。

1.5 动物模型的制备 采用改进线栓法^[4]制备大鼠中动脉闭塞脑缺血模型(MCAO)。大鼠用 10%的水合氯醛腹腔注射, 待麻醉后仰卧固定, 于颈部正中做一切口, 钝性分离颈总动脉穿线备用, 结扎翼腭动脉, 于颈外动脉与颈内动脉分叉处剪一约 0.2 mm 小口, 将栓线插入经颈总分叉部进入颈内, 缓慢推进, 直至出现轻微阻力, 进线长度约为 18~20 mm, 结扎栓线, 2 h 后抽出栓线。大鼠中动脉闭塞模型造模成功的标准为大鼠清醒后提尾离地时右前肢向内收屈曲; 在地板爬行时向右侧转圈; 站立时向右侧倾倒。假手术组只分离颈总、颈内及颈外动脉, 不插入栓线。手术过程中使用加热垫保持大鼠肛温(37.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C。

1.6 ELISA 法检测 ICAM-1 和 TNF- α 于冰盘上快速断头取脑, 小心剥离大脑, 用冰磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 滤纸拭干; 取患侧脑组织天平称重后制成 100 g/L 匀浆, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min; 取上清液, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。ELISA 检测按照各试剂盒说明书操作。

1.7 RT-PCR 法检测脑组织 ICAM-1 mRNA 和 TNF- α mRNA
①脑组织总 RNA 提取: 脑组织匀浆, 加氯仿, 离心, 吸取上层的无色液, 加入异丙醇, 离心后移去上清液, 再加入乙醇, 清洗 RNA 沉淀, 离心, 弃上清, 真空干燥 RNA 沉淀, 溶解 RNA。测 A260/A280, 比值在 1.9~2.1 范围之间, 计算总 RNA 含量, 取 1 μ g 用于反转录。②引物的设计: β -actin F: 5'-ACTCTGTGTGGATTGGTGGC-3', β -actin R: 5'-AGAAAGGGTGTAAACGCAGC-3', 产物长度为 155 bp;

ICAM-1 F: 5'-TGTCAGCCACCATGCCTTAG-3', ICAM-1 R: 5'-CAGCTTGCACGACCCTTCTA-3', 产物长度为 132 bp; TNF- α F: 5'-GATCGGTCCCAACAAGGAGG-3', TNF- α R: 5'-GCTTGGTGGTTTGTACGAC-3', 产物长度为 138 bp。③RNA 的提取: 向每 0.1 g 样品中加入 2 mL RNAAiso Plus, 静置 5 min 后 4℃、12 000 rpm 离心 5 min。以 1 mL: 200 μ L 的比例将 RNAAiso Plus 加入氯仿, 剧烈振荡 15 s, 使溶液充分乳化, 无分相现象, 室温静置 5 min 后离心, 样品分层, 将上层红色有机相移至新离心管, 加入等体积异丙醇混匀。室温静置 10 min 后, 离心, 去上清, 加入 1 mL、-20℃ 预冷的 75%乙醇, 清洗沉淀。再次离心, 移去上清。室温放置干燥 2~3 min。用 RNase free H₂O 溶解沉淀, 并将 RNA 溶液保存于 -80℃ 冰箱中。④RNA 完整性检测: 取 5 μ L RNA 用 1%琼脂糖凝胶进行电泳, 以检测 RNA 的完整性。⑤RNA 消化: 用反转录试剂盒中的 gDNA Eraser(TaKaRa code DRRO47A)对 RNA 中残留的基因组 DNA 进行消化处理。反应体积 20 μ L, 反应产物 42℃, 2 min, 4℃保存。⑥反转录: 取细胞总 RNA 2 μ L, 加双蒸水 2 mL, 于分光光度计 260 nm 和 280 nm 处测吸光度(A), A260/A280 在 1.9~2.1 范围之间方可使用。总 RNA(g/L)=A260 \times 40/1000 \times 稀释倍数。⑦实时荧光定量 PCR 检测: 加入 5 \times PCR Buffer 10 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, TaKaRa Ex TaqTMHS 0.25 μ L, 灭菌蒸馏水 28.75 μ L, 将其混匀。ICAM-1 的 PCR 过程: 94℃变性 30 s, 53.9℃退火 45 s, 72℃延伸 50 s, 38 个循环后, 72℃再延伸 10 min。TNF- α 的 PCR 过程: 94℃变性 30 s, 53.9℃退火 45 s, 72℃延伸 50 s, 40 个循环后, 72℃再延伸 10 min。 β -actin 的 PCR 过程: 94℃变性 30 s, 53.9℃退火 45 s, 72℃延伸 50 s, 35 个循环后, 72℃再延伸 10 min。所有的样本均重复检测 3 次, 得出各组 Ct 值, $\Delta\Delta Ct=(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})_{实验组}-(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})_{对照组}$, 本实验以 β -actin 为内参基因, 各基因 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算分析。

1.8 统计学方法 用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 符合正态分布且方差齐采用完全随机设计的方差分析, 多个样本均数间的多重比较采用 LSD 法检验; 不符合正态分布且方差不齐的资料采用秩转换的非参数检验。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示, 显著性取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠各时间点 ICAM-1 比较 见表 1。与假手术组比较, 模型组各时间点 ICAM-1 表达显著升高, 差异有统计学意义($P<0.01$); 与模型组比较, 尼莫地平组和扎里奴思方组 ICAM-1 表达显著降低, 差异均有统计学意义($P<0.01$); 与尼莫地平组比较, 扎里奴思方组 ICAM-1 表达均降低, 尤其扎里奴思方 7 天组降低最明显, 差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 1 各组大鼠各时间点 ICAM-1 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ICAM 1 (g/L)		
		1 d	3 d	7 d
假手术组	15	188.65 \pm 2.30	180.94 \pm 2.54	167.77 \pm 2.78
模型组	15	584.87 \pm 8.25 ^①	555.87 \pm 8.13 ^①	519.15 \pm 5.28 ^①
尼莫地平组	15	465.83 \pm 13.24 ^②	439.59 \pm 15.06 ^②	412.69 \pm 10.28 ^②
扎里奴思方组	15	379.05 \pm 12.85 ^{③④}	274.57 \pm 19.87 ^{③④}	214.71 \pm 12.84 ^{③④}

与假手术组比较, ① $P<0.01$; 与模型组比较, ② $P<0.01$; 与尼莫地平组比较, ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

2.2 各组大鼠各时间点 TNF- α 比较 见表 2。与假手术组比较, 模型组 TNF- α 含量显著增多, 在 1 天时达到高峰, 随后含量有所下降, 但仍明显高于假手术组, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较, 尼莫地平组和扎里奴思方组 TNF- α 含量明显降低, 其中扎里奴思方组下降更为显著, 差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。与尼莫地平组比较, 扎里奴思方组 TNF- α 含量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠各时间点 TNF- α 比较($\bar{x}\pm s$) g/L

组别	n	TNF- α		
		1 d	3 d	7 d
假手术组	15	140.20 \pm 6.10	123.98 \pm 2.98	132.09 \pm 10.41
模型组	15	418.28 \pm 3.53 ^①	383.16 \pm 8.99 ^①	365.58 \pm 8.63 ^①
尼莫地平组	15	330.60 \pm 7.42 ^②	322.83 \pm 10.77 ^②	302.18 \pm 9.30 ^②
扎里奴思方组	15	221.39 \pm 17.38 ^{③④}	200.03 \pm 10.71 ^{③④}	179.94 \pm 17.88 ^{③④}

与假手术组比较, ① $P<0.01$; 与模型组比较, ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$; 与尼莫地平组比较, ④ $P<0.05$

2.3 各组大鼠各时间点 ICAM-1 mRNA 表达比较 见表 3。与假手术组比较, 模型组各时间点 ICAM-1 mRNA 的表达显著升高, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较, 尼莫地平组与扎里奴思方组 ICAM-1 mRNA 的表达均显著降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。与尼莫地平组比较, 扎里奴思方组 ICAM-1 mRNA 含量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠各时间点 ICAM-1 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$) g/L

组别	n	ICAM 1 mRNA		
		1 d	3 d	7 d
假手术组	15	1.04 \pm 0.01	1.02 \pm 0.02	1.01 \pm 0.03
模型组	15	2.27 \pm 0.05 ^①	2.26 \pm 0.11 ^①	2.08 \pm 0.04 ^①
尼莫地平组	15	1.87 \pm 0.12 ^②	1.74 \pm 0.09 ^③	1.64 \pm 0.06 ^③
扎里奴思方组	15	1.38 \pm 0.06 ^{③④}	1.28 \pm 0.02 ^{③④}	1.18 \pm 0.07 ^{③④}

与假手术组比较, ① $P<0.01$; 与模型组比较, ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$; 与尼莫地平组比较, ④ $P<0.05$

2.4 各组大鼠各时间点 TNF- α mRNA 表达比较 见表 4。与

假手术组比较,模型组各时间点 TNF- α mRNA 表达显著升高,差异均用统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平组和扎里奴思方组 TNF- α mRNA 表达显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与尼莫地平组比较,扎里奴思方 1天、7天组 TNF- α mRNA 表达均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠各时间点 TNF- α mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$) g/L

组别	n	TNF- α mRNA		
		1 d	3 d	7 d
假手术组	15	1.06 \pm 0.03	1.06 \pm 0.09	1.04 \pm 0.01
模型组	15	1.95 \pm 0.08 ^①	1.97 \pm 0.11 ^①	1.75 \pm 0.08 ^①
尼莫地平组	15	1.64 \pm 0.08 ^②	1.53 \pm 0.08 ^②	1.40 \pm 0.12 ^②
扎里奴思方组	15	1.44 \pm 0.09 ^③	1.36 \pm 0.11 ^③	1.20 \pm 0.08 ^③

①与假手术组比较,②与模型组比较,③与模型组比较, $P < 0.05$;与尼莫地平组比较,③ $P < 0.05$

3 讨论

黏附分子的作用主要是介导细胞与细胞间及细胞与基质间的相互作用,是一类具有多种生物活性的跨膜糖蛋白。ICAM-1 是免疫球蛋白超家族中的一员,在体内分布较广,也是中枢神经细胞中表达最广泛的黏附分子,大脑中几乎所有的细胞如小胶质细胞、星形胶质细胞、神经细胞中均有 ICAM-1 的表达。研究表明,ICAM-1 在正常脑血管内皮表达极低,发生脑损伤后其表达开始上调,72 小时达到高峰,其高表达还可诱发白细胞释放 TNF- α 、白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6) 等大量炎性介质,造成缺血区神经细胞的损伤,并引起更多的白细胞进入脑组织,形成恶性循环^[5-6]。炎性细胞因子及炎症介质的过度表达又能刺激 ICAM-1 在数量和功能上的高表达,从而引起正反馈式的炎症级联反应,促进炎症的发展^[7-8]。因此,抑制 ICAM-1 的表达可显著减少再灌注后梗死的体积,改善微循环障碍^[9]。TNF- α 是一种前炎症因子,具有多效促炎性及神经毒性的作用,是炎症反应的起始因子,TNF- α 在脑缺血后可诱发白细胞浸润和组织损伤等一系列炎症级联反应,研究发现 TNF- α 和脑梗死的相关性与其基因的多态性有关^[10-11]。因此通过各种方法和途径阻断 TNF- α 的表达可减少脑组织缺血性损伤^[12],改善脑缺血后神经元的损伤程度,促进神经功能恢复。

缺血性中风是由风、火、痰、瘀等病理因素导致脑脉痹阻,脑髓受损,而痰、瘀又可形成热、毒损伤脑之神机,从而加重缺血性中风病情。回医扎里奴思方由芳香开窍的安息香、茴香、乳香、没药、石菖蒲;补肾益髓的海狗肾、怀牛膝、菟丝子;活血化瘀的红花、当归、芦荟等药物组成,恰与缺血性中风急性期风、痰、瘀病理特点相符合。前期研究发现,扎里奴思方能够调控血脑屏障的通透性,改善脑部血流供应,下调神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平,调节血脑屏障,抑制血小板黏附和聚集,改善血液流变,调节血脂代谢及调节氧自由

基^[13-15]。本实验结果显示扎里奴思方可以显著降低脑缺血再灌注损伤后大鼠脑组织中 ICAM-1 和 TNF- α 的含量,下调 ICAM-1 mRNA 和 TNF- α mRNA 的表达,其机制可能是通过抑制缺血区炎症反应,从而发挥其神经元保护作用。

[参考文献]

- [1] 王杰华,许秀秀,潘莹.瑞舒伐他汀对大鼠脑缺血再灌注 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的抑制作用[J].免疫学杂志,2016,32(1):56-59.
- [2] 颜建云,吴伟康.脑缺血损伤的分子机制研究进展[J].中国病理生理杂志,2003,19(3):423-426.
- [3] 宋岷.回回药方考释[M].北京:中华书局出版社,2001.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Grady MS, Cody RF Jr, Maris DO, et al. P-selectin blockade following fluid-percussion injury: behavioral and immunochemical sequelae [J]. J Neurotrauma, 1999, 16(1): 13-25.
- [6] Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat [J]. Brain Res, 1995, 682(1-2): 182-188.
- [7] Kostula N, Li HL, Xiao BG, et al. Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. Stroke, 2002, 33(4): 1129-1134.
- [8] Montaner J, Molina CA, Monasterio J, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke [J]. Circulation, 2003, 107(4): 598-603.
- [9] Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat [J]. Stroke, 2004, 35(1): 179-184.
- [10] 吕敬雷,王鹏,隋雪琴,等.缺血后处理对脑缺血再灌注大鼠 TNF- α 和 IL-1 β 表达影响[J].齐鲁医学杂志,2012,27(4):319-322.
- [11] Hoppe C, Klitz W, Cheng S, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia [J].

- Stroke, 2007, 38(8): 2241-2246.
- [12] Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action[J]. Am J Physiol, 1992, 263: C1-C16.
- [13] 李娟, 刘敬霞, 吴鹏, 等. 扎里奴思方对急性脑梗死患者血清 NSE 水平的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1750-1751.
- [14] 李娟, 吴鹏, 刘敬霞, 等. 扎里奴思方对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 P-糖蛋白的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1319-1321.
- [15] 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.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

滚针结合左旋维 C 对小鼠老化皮肤超微结构的影响

金红梅, 柏亚萍

浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310009

[摘要] 目的: 观察分析滚针疗法结合左旋维生素 C 对于小鼠老化皮肤超微结构影响, 探讨滚针疗法结合外用药物治疗皮肤老化的可能作用机制。方法: 3 月龄昆明种雌性小鼠 50 只, 采用随机数字法将小鼠分为正常对照组、模型组、滚针治疗组、滚针加维 C 治疗组、维 C 治疗组, 各 10 只。除正常对照组外, 其余各组颈背部连续皮下注射 D-半乳糖, 短波紫外线灯、金属钨灯照射背部皮肤, 建立亚急性皮肤老化模型。观察分析老化皮肤超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA) 以及皮肤总羟脯氨酸含量等与衰老相关的生化指标及组织病理学变化。结果: 治疗前, 与正常对照组比较, 其他各组的 SOD 含量和总羟脯氨酸水平显著降低, MDA 显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与同组治疗前比较, 滚针治疗组、维 C 治疗组、滚针加维 C 组的 SOD 和总羟脯氨酸水平显著升高, MDA 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后, 滚针治疗组、维 C 治疗组、滚针加维 C 组的 SOD 含量和总羟脯氨酸水平显著高于模型组, MDA 含量显著低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 滚针加维 C 组的 SOD 含量和总羟脯氨酸水平显著高于滚针治疗组和维 C 治疗组, MDA 含量显著低于滚针治疗组和维 C 治疗组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 滚针疗法结合外用抗氧化药物能够改善小鼠老化皮肤超微结构, 升高 SOD 和总羟脯氨酸水平, 降低 MDA 水平, 为滚针疗法联合外用药物防治皮肤老化提供了理论基础。

[关键词] 衰老皮肤; 滚针疗法; 左旋维 C; 超微结构; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R-33; R339.3+8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 02-0019-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.006

Effect of Needle Roller Combined with L-ascorbic Acid on Ultrastructure of Aging Skin of Mice

JIN Hongmei, BAI Yaping

Abstract: Objective: To observe the effect of needle roller combined with L-ascorbic acid on ultrastructure of aging skin of mice, and to explore possible mechanism of the therapy of needle roller combined with external drug for skin aging. Methods: Divided 50 cases of three-month old female Kunming mice into normal control group, model group, needle roller treatment group, needle roller plus vitamin C (VC) treatment group, and VC treatment group randomly, 10 cases in each group. Except normal control group, other groups were all given subcutaneous injection of D-galactose on the dorsal and cervical skin continuously, and were given irradiation of short wave ultraviolet lamp and tungsten lamp on the dorsal skin to establish the model of subacute skin aging. Observed and analyzed the activity of superoxide dismutase (SOD), the total content of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline, and some other

[收稿日期] 2016-08-12

[基金项目] 浙江省教育厅科研项目 (Y200907547)

[作者简介] 金红梅 (1981-), 女, 主治中医师, 研究方向: 皮肤病及性病的中医治疗。

[通讯作者] 柏亚萍, E-mail: 1132242878@qq.com。