

血塞通注射液及 NEP1-40 对脑梗死大鼠大脑皮层及血清炎症因子表达的影响

何慧君, 刘志娟

兰州大学附属第二医院定西医院, 甘肃 兰州 743000

[摘要] 目的: 分析血塞通注射液及 Nogo 胞外肽端残基 1-40 (NEP1-40) 对 SD 大鼠脑梗死大鼠大脑皮层及血清中促炎因子与抑炎因子表达的影响。方法: 25 只雄性健康 SD 大鼠, 依据随机数字表法分成模型组、NEP1-40 组、血塞通组、假手术组及 NEP1-40 联合血塞通组 (P+N 组), 每组 5 只。依据改良 Longa 线栓栓塞法建立脑梗死模型, 各给药组分别给予相应药物, 干预 28 天后处死大鼠, 观察大鼠术后体质量和神经功能评分改变状况及血清、脑组织内白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、白细胞介素-10 (IL-10) 的水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠术后 7、14、28 天体质量明显下降; 神经功能评分明显上升; 血清 TNF- α 、TGF- β 1 含量上升, IL-10 含量下降; 脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1 蛋白表达上升, IL-10 蛋白表达下降; 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, NEP1-40 组、血塞通组及 P+N 组大鼠术后 7、14、28 天体质量显著上升, 神经功能评分明显下降, 血清 TNF- α 含量下降, IL-10 含量上升; P+N 组大鼠血清 IL-1 β 含量下降; 血塞通组及 P+N 组大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达下降, TGF- β 1、IL-10 蛋白表达上升; NEP1-40 组大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达下降, IL-10 蛋白表达上升; 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 血塞通注射液及 NEP1-40 通过调整促炎、抑炎因子表达来加快脑梗死大鼠神经功能恢复。

[关键词] 局灶性脑梗死; 血塞通注射液; 炎症因子; Nogo 胞外肽端残基 1-40 (NEP1-40); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R743 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 06-0010-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.06.003

Xuesaitong Injection and NEP1-40 Has Effect on Cerebral Cortex and Expression of Serum Inflammatory Factors in Rats with Cerebral Infarction

HE Huijun, LIU Zhijuan

Abstract: Objective: To analyze the effect of Xuesaitong injection and Nogo extracellular peptide residue 1-40 (NEP1-40) on cerebral cortex and expression of serum pro-inflammatory factors and anti-inflammatory factors in SD rats with cerebral infarction. Methods: Selected 25 healthy male SD rats, and divided them into the model group, NEP1-40 group, Xuesaitong group, the sham operation group and NEP1-40 combined with Xuesaitong group (P+N group) according to the random number table method, 5 SD rats in each group. Established a model of cerebral infarction according to the therapy of modified suture and embolization of Longa. Each group was given corresponding drugs. Killed the rats on the 28th day after intervention. Observed the changes of body mass and scores of neurological function of rats, and observed the level and expression of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and interleukin-10 (IL-10) in serum and brain tissues. Results: When compared with those in the sham operation group, the body mass of rats on the 7th, 14th, and 28th day after operation in the model group was obviously decreased, scores of neurological function were obviously increased, the content of serum TNF- α and TGF- β 1 was increased, while the content of IL-10 was decreased; the protein expression of TNF- α , IL-1 β and TGF- β 1 in brain tissues was increased, while the protein expression of IL-10 was decreased, differences were significant ($P < 0.05$). When compared with that in the model group, the body mass on the 7th, 14th, and 28th day after operation in the rats of NEP1-40 group, Xuesaitong group and P+N group was obviously increased, scores of neurological function were obviously decreased, the content of serum TNF- α was

[收稿日期] 2017-10-18

[作者简介] 何慧君 (1978-), 女, 主治医师, 研究方向: 神经内科疾病诊治。

decreased, while the content of IL-10 was increased ($P < 0.05$). When compared with that in the model group, the content of serum IL-1 β in rats of P+N group was decreased; the protein expression of TNF- α and IL-1 β in brain tissues of rats in Xuesaitong group and P+N group was decreased, while the protein expression of TGF- β 1 and IL-10 was increased; the protein expression of TNF- α and IL-1 β in brain tissues of rats in NEP1-40 group was decreased, while the protein expression of IL-10 was increased; differences were significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xuesaitong injection and NEP1-40 can accelerate the recovery of neurological function in rats with cerebral infarction by adjusting the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors.

Keywords: Focal cerebral infarction; Xuesaitong injection; Inflammatory factors; Nogo extracellular peptide residue 1-40 (NEP1-40); Animal experiment; Rats

脑卒中为临床较为常见疾病, 依据其发病机制可分为出血性卒中与缺血性卒中两类。随着人们生活方式和饮食习惯的改变, 其发病率呈逐年上升趋势。人类大脑在缺氧缺血受损时, 其神经细胞会结合周边支持细胞发生一系列生理与病理的连锁反应, 其中最快出现的是免疫炎症反应, 它在患者疾病发展中有两面性, 即在神经受损结局中既有保护作用也有损害作用^[1-2]。患者脑梗死后, 机体脑组织不仅受到缺氧缺血等损害, 炎症介质所分解的炎症因子对脑部的伤害在患者预后和疾病严重程度方面有重要影响。相关研究显示, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-1 β (IL-1 β)等促炎因子会加重脑组织损伤, 而转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)及白细胞介素-10 (IL-10)等抑炎因子则能够促进受损脑神经功能恢复, 对脑组织起保护作用^[3-4]。因此, 本文通过探究血塞通注射液及 Nogo 胞外肽残基 1-40 (Nogo extra cellular peptide residues 1-40, NEP1-40)对脑梗死大鼠大脑皮层及血清中促炎因子与抑炎因子表达的影响, 探讨其作用机制, 为临床患者治疗提供一定的参考。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 选取雄性健康 SD 大鼠 25 只, 体质量 (245.6 ± 15.8)g, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(京)2015-2016, 生产批号: 20160472。饲养条件: 屏障环境动物实验室室温 $20 \sim 24^\circ\text{C}$, 相对湿度在 40%~50% 之间, 明暗交替 12 h/12 h, 自由获取食物和水。依据随机数字表法将大鼠分成 5 组, 分别是模型组、NEP1-40 组、血塞通组、假手术组及 NEP1-40 联合血塞通组(P+N 组), 每组 5 只。

1.2 主要试剂及仪器 试剂: 丙烯酰胺(美国 Amresco 公司, 批号: 0614); 过硫酸铵(美国 Sigma 公司, 批号: A6910); 医用 X 光胶片(日本富士公司, 批号: Super RX); DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司, 批号: ZLI-9645); IL-1 β 一抗(英国 Abcam 公司, 批号: ab8611); TGF- β 1 一抗(英国 Abcam 公司, 批号: ab06418); TNF- β 1 及 IL-10 试剂盒(武汉博士德公司, 批号: EK1672、EK0591); TNF- α 及 IL-1 β 试剂盒(上海 Ameko 公司, 批号: AE8152Ra、AE8159Ra); 氯化钠(北京双鹤药业公司); 血塞通(昆明制药公司, 批号: 13JB10);

NEP1-40(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

仪器: 低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司, 型号: Fresco17); 超净工作台(苏州净化设备厂, 型号: SW-CJ-1F); 酶标仪(美国 Thermo 公司, 型号: MK3); 摇床(江苏其林贝尔公司, 型号: TS-8); 微波炉(中国格兰仕公司, 型号: P6951)。

1.3 模型建立 在相对湿度 45%、温度为 25°C 室内饲养, 自由取水、饮食, 喂养 3 天后, 除假手术组外, 其余 4 组大鼠依据改良 Longa 线栓栓塞法进行手术。手术前大鼠禁食 12 h, 按照 1 mL/100 g 的剂量腹腔注入 3.5%水合氯醛, 取仰卧位置固定, 正中位置切开, 肌肉组织钝性分离, 右侧颈总动脉(CCA)分离在视野外部, 颈内动脉(ICA)与颈外动脉(ECA)清楚显现; 夹闭 ICA 并结扎 CCA 与 ECA 近心端, 以形成“Y”字封闭血管, 剪一小口在 CCA 远心端插入尼龙栓线, 沿血管方向进入 ICA 动脉夹处, 结扎一圈“活结”在开口上方, 动脉夹松开, 沿血管将栓线插入遇阻力停止, 而后缝合皮肤、消毒。假手术组将皮肤切开, 仅把颈部肌肉钝性分离不栓塞线栓, 缝合皮肤、消毒。

造模成功标准: 术后对大鼠进行 TTC 染色, 若大脑切片右侧出现连续白色梗死, 对侧为鲜红色则说明造模成功。

1.4 干预方式 模型组和假手术组腹腔注射 10 mg/(kg·d)的 0.9%氯化钠。血塞通组, 把血塞通溶在 0.9%氯化钠内, 腹腔注入剂量为 71 mg/(kg·d); NEP1-40 组, 把 NEP1-40 溶在 0.9%氯化钠内, 腹腔注入剂量为 85 g/(kg·d); P+N 组为血塞通和 NEP1-40 联合剂量, 各组大鼠均连续干预 28 天。

1.5 样本采集 干预 28 天后, 3.5%水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉, 取腹主动脉血, 室温静置 1 h, 4°C 离心机 15 000 rmp 离心 15 min, 取上清液, 而后断头、剥脑, 取梗死侧大脑皮层液氮冻存备用, 后半全脑 4%多聚甲醛固定以备用。

1.6 检测指标及方法 ①观察大鼠术后体质量和神经功能评分改变状况(依据 Longa 法: 正常活动, 没有相关症状为 0 分; 左侧前肢体不能自由展开为 1 分; 爬行时左侧转圈为 2 分; 爬行时向左侧倾倒为 3 分; 丧失意识, 不能行走为 4 分); ②ELISA 法检测术后 28 天大鼠血清促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 和抑炎因子 TGF- β 1、IL-10 含量, 具体步骤依据说明书进

行；③免疫组化：常规脱水石蜡包埋，脑切片厚度为 5 μm，60℃烤片 30 min，酒精水化 5 min，加入枸橼酸钠行微波法组织抗原修复，PBS 缓冲液冲洗，羊血清封闭，加入一抗 NgR1、RhoA 和 ROCK II 4℃过夜，DAB 显色，检测大鼠脑组织内 IL-1β、TNF-α、TGF-β1、IL-10 蛋白表达，使用 Image pro plus 分析，累积光密度值(IOD)进行比较。

1.7 统计学方法 使用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析，计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，正态分布和方差齐性数据单因素方差分析，组间比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠各时间点体质量比较 见表 1。假手术组大鼠随着时间体质量逐渐增大，与假手术组比较，模型组大鼠术后 7、14、28 天体质量明显下降，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较，NEP1-40 组、血塞通组及 P+N 组大鼠术后 7、14、28 天体质量显著上升，差异均有统计学意义($P < 0.05$)，其中 P+N 组效果最佳。

表 1 各组大鼠各时间点体质量比较($\bar{x} \pm s$) g

组别	n	体质量		
		手术后 7 天	手术后 14 天	手术后 28 天
假手术组	5	285.46 ± 11.37	329.48 ± 23.19	411.86 ± 20.51
模型组	5	145.82 ± 12.09 ^①	143.72 ± 15.61 ^①	210.33 ± 40.67 ^①
NEP1-40 组	5	166.81 ± 9.73 ^②	209.38 ± 40.65 ^②	330.71 ± 33.66 ^②
血塞通组	5	173.59 ± 19.84 ^②	178.50 ± 20.26 ^②	273.49 ± 45.22 ^②
P+N 组	5	175.97 ± 10.26 ^②	263.51 ± 20.97 ^②	342.72 ± 30.35 ^②

与假手术组比较，① $P < 0.05$ ；与模型组比较，② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠各时间点神经功能评分比较 见表 2。与假手术组比较，模型组大鼠术后 7、14、28 天神经功能评分明显上升，差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较，NEP1-40 组、血塞通组及 P+N 组术后 7、14、28 天神经功能评分明显下降，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠各时间点神经功能评分比较($\bar{x} \pm s$) 分

组别	n	手术后 7 天	手术后 14 天	手术后 28 天
假手术组	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	5	2.20 ± 0.39 ^①	1.31 ± 0.48 ^①	0.99 ± 0.10 ^①
NEP1-40 组	5	1.16 ± 0.39 ^②	0.82 ± 0.39 ^②	0.63 ± 0.37 ^②
血塞通组	5	1.16 ± 0.38 ^②	0.81 ± 0.37 ^②	0.71 ± 0.38 ^②
P+N 组	5	1.48 ± 0.48 ^②	0.65 ± 0.48 ^②	0.61 ± 0.39 ^②

与假手术组比较，① $P < 0.05$ ；与模型组比较，② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠血清促炎及抑炎因子含量比较 见表 3。与假手术组比较，模型组大鼠血清 TNF-α、TGF-β1 含量上升，IL-10 含量下降，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较，P+N 组大鼠血清 IL-1β 含量下降；NEP1-40 组、血塞通组及 P+N 组 TNF-α 含量下降，IL-10 含量上升，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠血清促炎及抑炎因子含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α (ng/L)	IL-1β (ng/L)	TGF-β1 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
假手术组	5	9.84 ± 8.43	6.16 ± 1.78	1 048.20 ± 225.41	17.40 ± 2.89
模型组	5	27.04 ± 9.65 ^①	7.10 ± 1.98	1 610.75 ± 159.64 ^①	13.97 ± 2.31 ^①
NEP1-40 组	5	21.10 ± 10.59 ^②	6.69 ± 1.64	1 649.76 ± 350.19	16.62 ± 3.91 ^②
血塞通组	5	20.05 ± 12.88 ^②	6.18 ± 1.25	1 729.52 ± 300.47	18.02 ± 3.67 ^②
P+N 组	5	13.97 ± 9.75 ^②	4.39 ± 1.62 ^②	1 770.47 ± 70.56	21.04 ± 9.82 ^②

与假手术组比较，① $P < 0.05$ ；与模型组比较，② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠脑组织炎症因子蛋白表达比较 见表 4。与假手术组比较，模型组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、TGF-β1 蛋白表达上升，IL-10 蛋白表达下降，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较，血塞通组及 P+N 组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β 蛋白表达下降，TGF-β1、IL-10 蛋白表达上升；NEP1-40 组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β 蛋白表达下降，IL-10 蛋白表达上升；差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠脑组织炎症因子蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$) IOD

组别	n	TNF-α	IL-1β	TGF-β1	IL-10
假手术组	5	140 593.61 ± 77 942.19	68 102.15 ± 33 204.64	11 267.91 ± 24 261.30	129 872.64 ± 45 117.23
模型组	5	4 266 971.55 ± 129 472.01 ^①	144 029.29 ± 30 227.51 ^①	150 692.55 ± 51 790.62 ^①	90 572.61 ± 33 472.15 ^①
NEP1-40 组	5	123 475.01 ± 62 097.41 ^②	61 749.38 ± 16 007.45 ^②	152 788.55 ± 29 741.32	130 578.52 ± 59 723.11 ^②
血塞通组	5	148 005.15 ± 59 712.03 ^②	93 157.20 ± 19 473.22 ^②	170 869.40 ± 26 448.29 ^②	140 159.21 ± 58 423.84 ^②
P+N 组	5	136 972.49 ± 62 003.44 ^②	64 397.10 ± 16 201.94 ^②	172 984.53 ± 13 572.92 ^②	131 454.29 ± 63 752.08 ^②

与假手术组比较，① $P < 0.05$ ；与模型组比较，② $P < 0.05$

3 讨论

本研究显示，干预 28 天，模型组大鼠大脑皮层 TNF-α 和 IL-1β 表达比假手术组上升，说明大鼠大脑皮层在梗死进展中有 TNF-α 和 IL-1β 参加，同时也验证了其在永久性梗死内所产生的负面影响。相关研究证明，大鼠脑梗死后会造成

IL-1β 表达迅速上升，在大鼠全身或者局部注入 IL-1β 会使大鼠脑受损程度加深^[5-6]。TNF-α 在脑梗死发生前期，其表达含量比较低，有研究显示拮抗 TNF-α 能够有效降低大鼠脑梗死面积^[7]。Tarkowski E 等^[8]研究显示，脑梗死患者血清内 IL-1β 含量明显低于脑脊液内，说明梗死大脑可能直接分泌 IL-1β

并参加脑损伤。另外,刘卫芳等^[9]研究显示,脑梗死患者神经能力受损状况与TNF- α 和IL-1 β 上升紧密相关。IL-10有抑制促炎因子分泌作用,既往研究显示,脑梗死患者体内IL-10含量下降,而且和脑损伤情况呈正相关,相关动物实验也证明了IL-10可使大鼠脑梗死面积下降^[10-12]。TGF- β 1对缺血性的脑受损也有保护作用,正常脑组织内TGF- β 1含量一般较低,脑梗死后血清内TGF- β 1含量上升,相关研究显示拮抗TGF- β 1后大鼠受损状况会加重^[13]。

血塞通主要成分是三七总皂苷,多用于胸痹心痛、脑络瘀阻、脑血管类疾病和中风偏瘫等治疗,临床效果较好。唐婧姝等^[14]研究显示,三七总皂苷可使脑梗死大鼠上升的IL-8、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量下降,对血脑屏障受损状况改善显著。多数相关研究对促炎因子研究较多,而抑炎因子研究较少,本研究表明血塞通可使脑梗死大鼠促炎因子TNF- α 及IL-1 β 含量下降,同时使抑炎因子TGF- β 1及IL-10含量上升。Nogo-66氨基酸肽端(Neurite outgrowth inhibitor-66, Nogo-66)为髓鞘抑制因子,它和特异性受体Nogo受体1(Nogo receptor 1, NgR1)亲合性最高,NgR1受体为一种GPI锚定蛋白,缺乏胞内域,需要借助其他受体形成NgR受体复合物才可将信号转导入胞内。Nogo-66和NgR1受体复合物结合以后,信号转导入胞内,进而激活下游重要通路,造成轴突生长椎塌陷。NEP1-40为Nogo-66受体拮抗剂,可以和NgR1结合发挥作用,且不会使下游信号通道激活^[15-16]。本研究显示,血塞通注射液、NEP1-40都可降低促炎因子TNF- α 、IL-1 β 的表达,升高抑炎因子IL-10和TGF- β 1的表达,而联合用药通过调节炎症因子表达,抑制促炎因子对机体损伤作用,进而发挥出神经保护作用,效果更佳。

综上所述,血塞通注射液及NEP1-40是通过调整促炎、抑炎因子的表达,来加快脑梗死大鼠神经功能恢复。

[参考文献]

- [1] 刘丽星,朱陵群,刘炜,等. 血塞通注射液对局灶性脑梗死大鼠不同恢复时点大脑皮层Syp和PSD-95蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(2): 217-219.
- [2] 黄希艳,魏小琴,李倩,等. 血塞通注射液对局灶性脑梗死大鼠NgR mRNA及蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(8): 1711-1713.
- [3] 李若林,叶子明,凌志安. 血塞通注射液对急性脑梗死患者细胞免疫功能和超敏C反应蛋白影响的研究[J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(5): 758-760.
- [4] Zhang JS, Zhang BX, Du MM, et al. Chinese preparation Xuesaitong promotes the mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with cerebral infarction[J]. Neural Regeneration Research, 2016, 11(2): 292-297.
- [5] 张翼,付万发,路琴,等. 血塞通注射液治疗急性脑梗塞的疗效与安全性系统评价[J]. 药品评价, 2014, 12(16): 19-23.
- [6] 刘宓宓. 急性脑梗死应用血塞通或丹红注射液治疗的比较研究[J]. 中国实用医药, 2015, 8(4): 10-12.
- [7] Liu JJ, Pan SY. Protective effects of estrogen combined with sevoflurane in an experimental model of cerebral infarction and focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. European Review for Medical Pharmacological Sciences, 2016, 20(9): 1839-1842.
- [8] Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, et al. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke[J]. Stroke, 1995, 26(8): 1393-1398.
- [9] 刘卫芳,艾敏,张俊豪,等. 急性脑梗死血清IL-1 β 、TNF- α 的变化与意义[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(23): 24-25.
- [10] 史晓伟. 血塞通调节脑梗死大鼠及OGD/R损伤SH-SY5Y细胞NgR/RhoA/ROCK II通路和炎症因子的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [11] 陆小平. 血塞通注射液对急性脑梗死患者CD62 P分子表达的影响[J]. 临床医学, 2014, 11(8): 13-14.
- [12] 朱燕,卢桂兰,周经霞. 血塞通注射液联合丁苯酞对急性脑梗死疗效及对患者神经功能的影响[J]. 血栓与止血学, 2016, 22(6): 618-620.
- [13] 兰修文. 血塞通注射液与复方丹参注射液比较治疗急性脑梗死的系统评价[D]. 成都:成都中医药大学, 2014.
- [14] 唐婧姝,裴清华. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 210-213.
- [15] Minami N, Mizukawa K, Iwahashi H, et al. Two cases of cerebral infarction due to focal irradiation for glioma in adults[J]. No Shinkei Geka, 2015, 43(4): 344-351.
- [16] 林岭海,陈莹. 血塞通注射液辅助治疗急性脑梗死的效果及对神经功能的影响[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(13): 17-19.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)