

[科研报道]

益母草碱对慢性脑缺血大鼠认知功能的影响

郑志君¹, 王贤英¹, 梁 辉^{2*}

(1. 浙江省横店文荣医院, 浙江 金华 322118; 2. 浙江大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: 目的 探讨益母草碱对慢性脑缺血大鼠认知功能的影响。方法 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 益母草碱低、高剂量组 (4、8 mg/kg), 通过结扎双侧颈总动脉建立慢性脑缺血模型。然后, 进行新事物识别、Morris 水迷宫实验, 免疫荧光法检测腓胝体腺瘤性结肠息肉 (APC) 蛋白表达, Western blot 法检测腓胝体受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3)、炎性小体 (NLRP3) 蛋白表达。结果 与模型组比较, 益母草碱高剂量组大鼠新事物识别能力显著上升 ($P < 0.05$), 逃避潜伏期显著降低 ($P < 0.05$), 穿越平台次数显著增加 ($P < 0.01$)。同时, 益母草碱组 APC 表达增加, RIP3、NLRP3 蛋白表达较模型组显著下降 ($P < 0.05$)。结论 益母草碱可有效改善慢性脑缺血大鼠认知功能, 其机制可能调控缺血后炎症有关。

关键词: 益母草碱; 慢性脑缺血; 认知功能

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)09-2045-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.033

慢性脑缺血又称为慢性大脑低灌注损伤, 是引起脑白质损害、行走障碍、认知功能下降甚至痴呆的重要原因^[1]。减轻慢性脑缺血引起的脑白质损害可有效缓解大脑运动、认知功能下降, 但目前仍缺乏有效治疗。中药具有作用缓和持久、疗效稳定等特点, 在预防及治疗慢性缺血性脑血管疾病方面显示出一定的优越性^[2]。益母草是传统治疗妇科疾病的重要药, 具有活血消肿的作用, 其主要成分益母草碱可减轻缺血大鼠脑梗塞体积, 降低神经功能缺损评分, 具有较好的神经保护作用^[3], 同时还具有减轻慢性脑缺血白质损伤的作用, 可减少大鼠腓胝体白质损害, 增加少突胶质细胞表达^[4]。目前, 有关益母草碱对慢性脑缺血相关认知障碍作用的研究报道较少, 本实验旨在探讨该成分对慢性脑缺血大鼠认知功能的影响。

1 材料

1.1 动物 6 周龄 SD 雄性大鼠, 体质量 250 ~ 260 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号 SCXK(沪)2013-0016。室温 20 ~ 25 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 大鼠给予颗粒饲料喂养, 自由进食饮水, 适应 3 d 后开始实验。

1.2 试剂 益母草碱 (安徽新星药业有限公司, 批号 20131209), 含量 98%, 溶于生理盐水。受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3)、炎性小体 (NLRP3) 抗体 (英国 Abcam 公司); 腺瘤性结肠息肉 (APC) 抗体 (美国 Proteintech 公司)。Morris 水迷宫系统 (上海欣软信息科技有限公司); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); SDS-PAGE 凝胶电泳转膜装置 (美国 Bio-

Rad 公司)。试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 分组及给药 大鼠随机分为 4 组, 分别为假手术组, 模型组, 益母草碱低、高剂量组 (4、8 mg/kg), 每组 8 只。手术后 2 h 药物组腹腔注射相应剂量益母草碱, 假手术组、模型组腹腔注射相同体积生理盐水, 1 次/d, 连续 2 周。

2.2 模型建立^[1] 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (25 mg/kg) 麻醉, 固定后, 暴露大鼠颈部皮肤, 常规消毒, 沿颈部正中位置切开皮肤, 逐步分离颈部肌肉和软组织, 暴露双侧颈总动脉, 分离颈总动脉和迷走神经, 结扎双侧颈总动脉后缝合皮肤, 碘伏外涂; 假手术组不结扎颈总动脉血管, 其余步骤相同。大鼠苏醒后放入笼中, 常规饲养。

2.3 Morris 水迷宫实验^[5] 在造模后 28 d、正式实验前 1 d, 大鼠在无逃逸平台的水池中适应性游泳 2 min, 次日将其随机从 4 个象限入水, 以 60 s 为时限, 计算大鼠从入水至爬上平台的游泳距离, 即隐匿平台逃避路程, 若在规定时间内未找到平台则加以引导, 大鼠在平台上停留 30 s, 每天训练 4 次, 每个象限只使用 1 次。第 5 天完成逃避路程测试后撤去平台, 将大鼠从平台所在的对面象限中放入水池, 记录 1 min 内穿越隐匿平台所在象限的次数。

2.4 新事物识别实验^[6] 实验中设置 1 个不透明的正方形盒子 (80 cm × 80 cm × 80 cm) 和 3 个不同颜色及形状的事物。第 1 天大鼠在空盒子中适应 10 min, 第 2 天分为 2 个阶段, 第 1 阶段将 2 个不同事物放在盒子的相反位置, 事物之间放入大鼠, 适应 5 min; 第 2 阶段其中 1 个事物被第

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 浙江省金华市科技局项目 (2015A33049)

作者简介: 郑志君 (1974—), 男, 主治医师, 从事脑血管疾病临床研究。Tel: (0579) 86550858, E-mail: gzwsyys@163.com

* 通信作者: 梁 辉 (1975—), 男, 博士, 主任医师, 从事中药脑保护研究。Tel: (0571) 87235101, E-mail: wen1937@163.com

3个事物取代,位置不变,再放入大鼠探索5 min,记录在不同物体上的累积探测时间,探索标准为大鼠鼻子距离事物小于2 cm或大鼠直接用鼻子接触事物,记录新事物探索时间(N)和旧事物探索时间(F),计算识别分数 $[(N-F)/(N+F)]$ 。

2.5 免疫荧光染色 取2只大鼠常规福尔马林灌注,冰冻切片^[7],各取3张浸入4%多聚甲醛固定液中,室温下固定20 min, PBS浸洗3次,每次3 min,每张切片滴加2滴3% H₂O₂-甲醇溶液,室温(15~25℃)下封闭10 min, PBS浸洗3次,滴加50~100 μL即用型山羊血清,室温下孵育20 min后封闭,滴加APC一抗(1:200稀释)100 μL, 37℃下湿盒孵育2 h, PBS浸洗3次,滴加二抗(1:200稀释)100 μL, 37℃下避光孵育1 h, PBS浸洗3次,封片,显微镜下观察胼胝体蛋白表达。

2.6 Westernblot检测 应用RIP3、NLRP3抗体,效价1:1 000。大鼠快速麻醉后,0.01 mol/L PBS灌注冲洗血管,分离胼胝体组织, PBS漂洗3次,每次5 min,加入1 mL蛋白裂解液,玻璃匀浆器匀浆脑组织,冰上静置30 min后,4℃下10 000 r/min离心30 min,取上清液,Bradford法测定蛋白浓度。取蛋白样品80 g,聚丙烯酰胺变性凝胶分离后,电转膜法将其转移到硝酸纤维膜上,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗,4℃下杂交过夜,洗涤液(PBS,含0.05% Tween-20)洗涤3次,每次10 min,加入二抗,室温下孵育1.5 h,洗涤液洗涤3次,ECL法显影。以β-Actin为内标,分析各条带的相对光密度。

2.7 统计学分析 通过SPSS 17.0软件进行处理,结果以($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

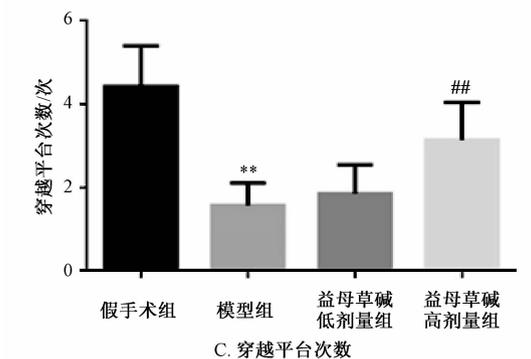
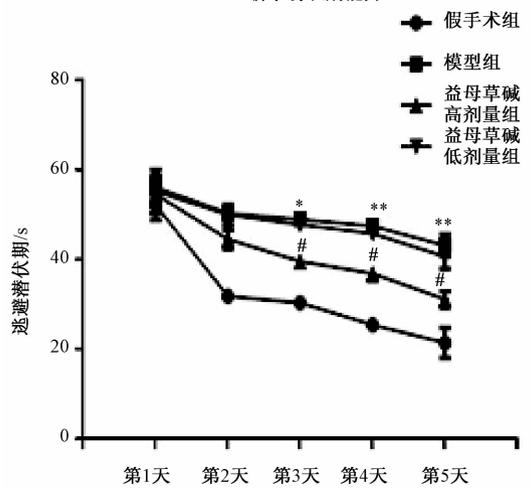
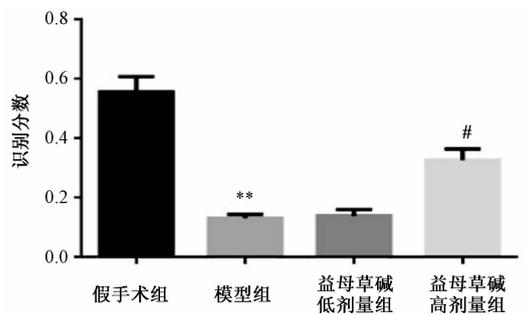
3.1 益母草碱对大鼠认知功能的影响 图1 A显示,模型组大鼠识别分数(0.13 ± 0.01)较假手术组(0.57 ± 0.05)显著下降($P < 0.01$);益母草碱高剂量组(0.33 ± 0.04)显著提高($P < 0.05$),低剂量组无显著差异($P > 0.05$)。

图1 B显示,第1天各组大鼠逃避潜伏期无明显差异($P > 0.05$),随着训练天数增加而逐渐减少。第5天模型组 $[(43.3 \pm 2.4) s]$ 较假手术组 $[(21.5 \pm 3.3) s]$ 显著增加($P < 0.01$);益母草碱高剂量组 $[(31.2 \pm 1.8) s]$ 较模型组显著下降($P < 0.05$),低剂量组无显著差异($P > 0.05$)。

图1 C显示,模型组大鼠穿越平台次数 $[(1.57 \pm 0.53) 次]$ 显著少于假手术组 $[(4.43 \pm 0.97) 次]$ ($P < 0.01$);益母草碱高剂量组 $[(3.14 \pm 0.89) 次]$ 显著多于模型组($P < 0.01$),低剂量组无明显差异($P > 0.05$)。

根据以上结果,选择益母草碱高剂量组进行后续实验。

3.2 APC蛋白表达 图2显示,假手术组胼胝体APC蛋白表达较强,阳性细胞较多;模型组APC蛋白表达明显减弱,阳性细胞数明显减少;益母草碱高剂量组APC蛋白表



注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$

图1 益母草碱对大鼠认知功能的影响

达上升,阳性细胞数增多。

3.3 RIP3、NLRP3蛋白表达 图3显示,与假手术组比较,模型组胼胝体NLRP3、RIP3蛋白表达显著上升,相对光密度显著增加($P < 0.05$);益母草碱高剂量组两者蛋白表达下降,其相对光密度较模型组显著降低($P < 0.05$)。

4 讨论

长期低灌注引起的慢性脑供血不足会导致明显的脑白质损害,包括少突胶质细胞减少、髓鞘密度下降、郎飞结异常。正常认知功能依赖复杂的神经纤维环路,脑白质损害可破坏其正常信息联络,认知功能发生变化,如脑室旁的缺血灶可引起丘脑前核-乳头体-海马之间的边缘系统环路损害^[8]。神经心理检查发现,临床上慢性脑缺血白质损

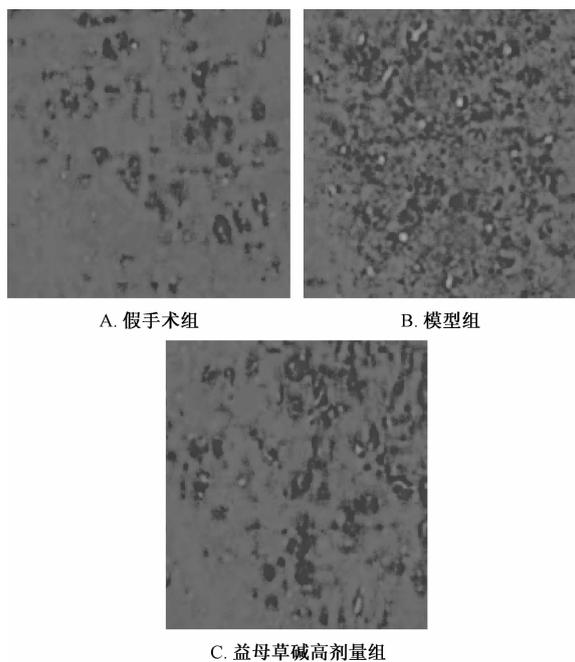


图2 益母草碱对 APC 蛋白表达的影响 (×400)

害患者的记忆力、注意力、执行功能、视空间功能、轻度认知功能下降,进而发展为血管性痴呆^[9]。

益母草碱抗脑缺血损伤的神经保护作用可能与减轻线粒体损害和抗氧化作用有关^[3],并具有良好的抗炎作用^[10],前期课题组也报道它可减轻慢性脑缺血白质损伤^[4]。本实验发现,各成分可改善慢性脑缺血大鼠的空间学习能力和记忆能力,而且 NLRP3 表达下降,推测可能是通过抗炎作用来达到神经保护目的。

慢性脑缺血相关白质损害与炎症密切相关,免疫荧光发现反应炎症的小胶质细胞免疫荧光染色数目明显增加(CD11b 和 Iba1),在白质甚至海马中可见小胶质细胞的炎性标志物 OX-6 表达明显升高,星型细胞活化^[11]。NLRP3 又称为冷炎素,是由寒冷诱导自身炎症综合征-1 基因编码,在大脑和免疫细胞中大量表达,其激活可促进 Capase-1 前体转化为 Capase-1,促进 IL-1b、IL-18 产生;脑缺血后其表达明显升高,主要集中在小胶质细胞与内皮细胞中,从而引起一系列炎性反应^[12];将该基因敲除后,大鼠梗塞体积、水肿、血脑屏障明显改善。同时,IL-1b 增多可以促进兴奋性氨基酸毒性和氧化毒性,进一步加剧脑缺血和脑白质损害^[13]。本实验发现,慢性脑缺血大鼠胼胝体 NLRP3 蛋白表达增多,支持炎症参与慢性脑缺血和脑白质损害。

RIP3 被认为是程序性坏死的分子标志物^[14],如未受阻止,则细胞损伤持续加重,细胞膜破裂,导致细胞内容物释放,启动下游损伤相关模式分子(DAMP),促进炎性小体(尤其是 NLRP3 小体)生成和炎症发生发展,进一步引起相邻细胞损害^[15]。本实验发现,益母草碱组 RIP3 蛋白表达下调,推测其抗炎作用可能是通过调控该蛋白来减轻炎性小体表达。

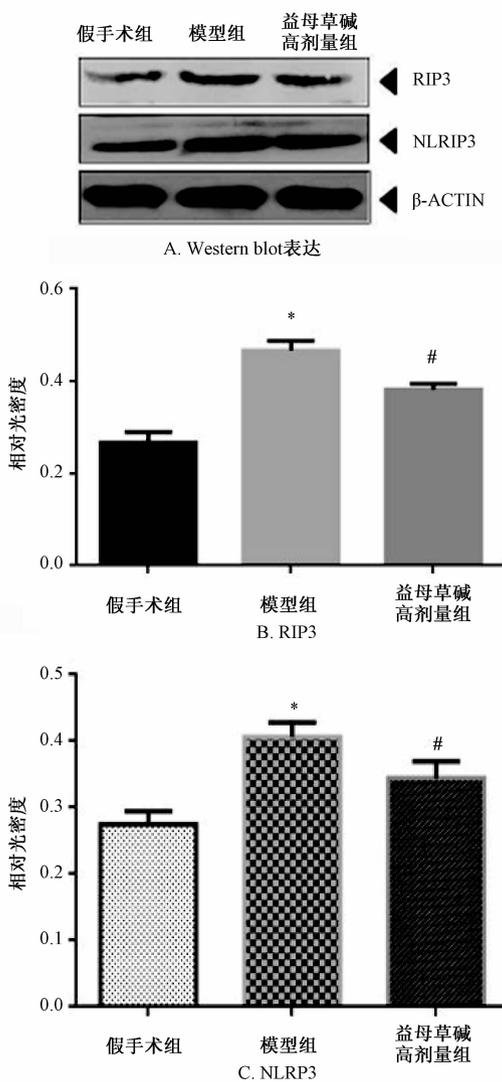


图3 益母草碱对 RIP3、NLRP3 蛋白表达的影响

参考文献:

[1] Watanabe T, Zhang N, Liu M, et al. Cilostazol protects against brain white matter damage and cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Stroke*, 2006, 37 (6): 1539-1545.

[2] 余 敏, 詹 青, 徐晓芸. 中药对慢性脑缺血所致认知功能障碍的治疗价值探讨[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2013, 11(19): 155-157.

[3] Loh K P, Qi J, Tan B K, et al. Leonurine protects middle cerebral artery occluded rats through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function [J]. *Stroke*, 2010, 41 (11): 2661-2668.

[4] 王贤英, 郑志君, 梁 辉. 益母草碱对慢性脑缺血大鼠白质损伤的神经保护研究[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33 (11): 2583-2585.

[5] Chen J, Zuo S, Wang J, et al. Aspirin promotes oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation after white matter lesion[J]. *Front Aging Neurosci*, 2014(6): 7.

- [6] Ma J, Xiong J Y, Hou W W, *et al.* Protective effect of carnosine on subcortical ischemic vascular dementia in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(9): 745-753.
- [7] Wu J, Zhang Y, Yang P, *et al.* Recombinant osteopontin stabilizes smooth muscle cell phenotype via integrin receptor/integrin-linked kinase/rac-1 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2016, 47(5): 1319-1327.
- [8] Tomimoto H. White matter integrity and cognitive dysfunction; Radiological and neuropsychological correlations [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2015, 15(S1): 3-9.
- [9] Van Dijk E J, Prins N D, Vrooman H A, *et al.* Progression of cerebral small vessel disease in relation to risk factors and cognitive consequences: Rotterdam Scan study [J]. *Stroke*, 2008, 39(10): 2712-2719.
- [10] Liu H, Zhang X, Du Y, *et al.* Leonurine protects brain injury by increased activities of UCP4, SOD, CAT and Bcl-2, decreased levels of MDA and Bax, and ameliorated ultrastructure of mitochondria in experimental stroke[J]. *Brain Res*, 2012, 1474: 73-81.
- [11] Choi B R, Kim D H, Back D B, *et al.* Characterization of white matter injury in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 542-547.
- [12] Gao L, Dong Q, Song Z H, *et al.* NLRP3 inflammasome: promising target in ischemic stroke[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(1): 17-24.
- [13] Lénárt N, Brough D, Dénes Á. Inflammasomes link vascular disease with neuroinflammation and brain disorders[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(10): 1668-1685.
- [14] Conrad M, Angeli J P, Vandenabeele P, *et al.* Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 348-366.
- [15] Wallach D, Kang T B, Dillon C P, *et al.* Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules [J]. *Science*, 2016, 352(6281): 154.

独一味总环烯醚萜苷胶囊的主要药效学及急性毒性

张泉龙¹, 马晓花², 邱建国^{3*}, 贾正平³

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市萧山区第四中等职业学校, 浙江 杭州 311200; 3. 中国人民解放军兰州军区总医院药剂科, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 考察独一味总环烯醚萜苷胶囊的主要药效学及急性毒性。方法 50只BALB/c小鼠随机分为5组,即模型组,独一味胶囊高剂量组(1756 mg/kg),独一味总环烯醚萜苷胶囊低、中、高剂量组(86、172、430 mg/kg),每组10只,采用二甲苯致耳肿胀、冰醋酸致扭体、热板法镇痛实验考察抗炎、镇痛作用;50只Wistar大鼠随机分为相同5组,每组10只,连续灌胃给药1周,末次给药后1h,测定凝血酶原时间(PT)、部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)。采用经典的急性毒性实验法,比较独一味胶囊、独一味总环烯醚萜苷胶囊、总黄酮、大极性部分的急性毒性作用。结果 与对照组比较,独一味总环烯醚萜苷胶囊中、高剂量组能显著抑制耳肿胀($P < 0.05$);各剂量组均能显著降低扭体次数($P < 0.05$),但痛阈值无明显变化($P > 0.05$);高剂量组能显著缩短TT,抑制APTT,增加FIB($P < 0.05$),但对PT无显著影响($P > 0.05$)。不同剂量胶囊均未引起小鼠死亡,仅高剂量组使小鼠轻度腹泻和活动下降。结论 独一味总环烯醚萜苷胶囊具有良好的抗炎、镇痛、止血作用,而且急性毒性较低。

关键词: 独一味总环烯醚萜苷胶囊; 抗炎; 镇痛; 止血; 急性毒性

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)09-2048-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.034

独一味为唇形科独一味属植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的地上部分,是我国藏、蒙等少数民族

常用药之一,始载于2005年版《中国药典》,具有活血止痛、化瘀止血之功效,用于治疗外科手术后的刀口疼痛和

收稿日期: 2017-09-09

基金项目: 国家科技部重大专项(2008ZXJ09004-XXX); 甘肃省科技重大专项(1102FKDA012); 全军中医药研发推广项目(2006032001)

作者简介: 张泉龙(1982—),男,硕士,助理研究员,从事中药新药临床前评价, Tel: (0571) 86613531, E-mail: 13484207@qq.com

*通信作者: 邱建国(1971—),女,主任药师,从事高原植物药和新药研究。Tel: (0931) 8994676, 13609354193, E-mail: qjianguo@163.com