

病发病机制中的作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(11): 994-999.

[10] 王 娜, 邹大威. 糖尿病肾病足细胞损伤机制的研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(20): 4087-4092.

[11] 杨祖飞, 沈 颖. 氧化应激、三七皂苷与糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国医学工程, 2020, 28(1): 28-32.

[12] 安文蓉, 徐云生, 黄延芹. mTORC1 在糖尿病致病机理探析[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 92-95.

[13] 于柏松, 刘 冰. mTOR 在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 广东医学, 2020, 41(2): 204-207.

[14] 黎池健, 黄玉香, 许伟成, 等. mTOR 信号通路在糖尿病肾病发病机制中作用的研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(3): 284-288.

[15] 赵长英, 孙 楠, 杨洁珂, 等. 肾舒胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏 mTOR、beclin-1 自噬通路的表达及意义[J]. 广西中医药, 2019, 42(6): 55-58.

[16] 吴 冰, 刘 睿, 黄 慧, 等. 白藜芦醇通过 AMPK-P53 途径调节糖尿病心肌线粒体自噬的研究[J]. 兰州大学学报(医学版), 2020, 46(1): 67-71.

# 蒲金口服液对宫内感染/炎症致早产脑损伤大鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响

张 晰, 马丙祥\*, 张建奎, 王怡珍, 陈恬恬, 李华伟, 党伟利, 周荣易  
(河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

**摘要:** **目的** 观察蒲金口服液对宫内感染/炎症致早产脑室旁白质软化大鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响。**方法** 制备宫内感染致脑损伤模型。30 只孕鼠于妊娠第 16、17 天连续 2 d 给予腹腔注射 LPS (350 μg/kg), 1 次/d, 设为 LPS 组; 6 只注射同等剂量的生理盐水设为对照组。造模成功后选取 LPS 组孕鼠所产脑损伤仔鼠 80 只随机分为蒲金口服液高、低剂量组 (24、12 g/kg)、银杏叶提取物组、模型组, 每组 20 只, 4 组各随机分为早期、晚期干预组各 10 只, 早期组于生后第 1 天给药, 晚期组于第 8 天给药, 连续 7 d, 每日 1 次。IHC、Western blot 检测 21 日龄 4 组早、晚期干预仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 的表达。**结果** 与 0 日龄对照组仔鼠相比, LPS 可致仔鼠脑组织中 NgR、p75NTR 的表达升高 ( $P<0.05$ ); 与 21 日龄模型组相比较, 高、低剂量蒲金口服液、银杏叶提取物均能抑制仔鼠脑组织中 NgR、p75NTR 表达 ( $P<0.05$ ); 高剂量蒲金口服液下调 NgR、p75NTR 的表达作用优于蒲金口服液低剂量和银杏叶提取物 ( $P<0.05$ )。**结论** 蒲金口服液对早产 PVL 仔鼠受损神经有保护作用, 其机制可能是通过下调 NgR、p75NTR 的表达, 从而抑制髓鞘相关抑制因子与其受体结合形成受体复合体, 降低 NgR、p75NTR 介导的信号通路活性, 抑制生长锥的塌陷, 促进损伤神经修复。

**关键词:** 蒲金口服液; 宫内感染/炎症; 脑损伤; NgR; p75NTR

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2021)06-1602-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.041

随着现代医学技术的发展, 早产儿存活率较前有大幅提高<sup>[1]</sup>, 但早产儿脑损伤发生的风险并无下降, 一项 Meta 分析表明, 早产、低体质量、宫内感染、缺氧等因素均是我国早产儿脑损伤的危险因素<sup>[2]</sup>, 其中宫内感染显著提高了早产儿脑损伤发病率<sup>[3-4]</sup>, 是造成胎膜早破引发早产、低体重的主要原因之一<sup>[5]</sup>, 故早产儿脑损伤与宫内感染关系密切<sup>[6]</sup>。早产儿神经系统发育不完善, 其主要损伤类型包括脑室周围白质软化 (periventricular leukomalacia, PVL)、脑室周围-脑室内出血、蛛网膜下腔出血、缺氧缺血性脑病等<sup>[1,7]</sup>, 遗留神经后遗症的风险较高, 这同时也增加了脑

性瘫痪 (cerebral palsy, CP) 发生的几率<sup>[8]</sup>。CP 是早产儿脑损伤最常见的神经系统后遗症, 临床表现为姿势发育障碍、活动受限, 常伴有感知觉异常、认知障碍等多种问题<sup>[9]</sup>。CP 的治疗并无特效药物, 需要多专业联合终身康复, 这给家庭及社会带来了沉重的负担<sup>[10]</sup>。故探索宫内感染致早产脑损伤的早期干预药物, 尽可能在疾病早期减轻神经系统的损伤, 显得尤为重要。

蒲金口服液为河南中医药大学第一附属医院儿科马丙祥教授的经验方, 由石菖蒲、郁金、丹参、红花四味中药组成, 本方经过大量的临床应用, 临床验证有效。方中石

收稿日期: 2019-09-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473727)

作者简介: 张 晰 (1989—), 女, 硕士生, 研究方向为中医药防治小儿神经系统疾病。E-mail: 752401038@qq.com

\* 通信作者: 马丙祥 (1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治小儿神经系统疾病研究。E-mail: mbx1963@126.com

菖蒲为君药，宣气豁痰开窍，醒神益智；臣以丹参，以活血祛瘀生新；辅以红花、郁金二味，加强君臣活血行气通络破积之功。临床观察发现，蒲金颗粒治疗小儿痉挛型脑瘫痰瘀阻窍证，可有效改善脑瘫患儿粗大运动功能、肌张力、智力、言语、中医证候评分<sup>[11]</sup>。实验证实，蒲金口服液能有效降低缺氧缺血性脑损伤大鼠脑组织一氧化氮合酶（NOS）水平，对抗氧自由基<sup>[12-13]</sup>，降低宫内感染致早产 PVL 大鼠脑组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 炎症因子表达，抑制少突胶质细胞（OL）及其前体细胞（OPC）的凋亡，下调髓鞘轴突生长抑制因子（Nogo）-A、少突胶质细胞髓鞘糖蛋白（OMgp）等髓鞘相关抑制因子（myelin-associated inhibitor factors, MAIFs）的表达<sup>[14-16]</sup>，改善神经损伤症状。为进一步探索本药的作用机制，本实验采用宫内感染致早产 PVL 仔鼠模型，通过高、低剂量蒲金口服液在不同时期干预，检测仔鼠脑组织勿动蛋白受体（nogoreceptor, NgR）和神经营养受体（p75 neurotrophin receptor, p75NTR）的表达量，观察蒲金口服液对 NgR、p75NTR 表达的影响，进一步探索其可能的作用机制。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级成熟 SD 雌性大鼠 36 只，体质量（250±50）g；成熟 SD 雄性大鼠 18 只，体质量（300±50）g，分笼喂养，自由饮水进食，按时通风，实验室温度控制在 20~27℃，相对湿度控制在 40%~70%，定期更换垫料，清洗笼具，消毒，保持动物房的安静环境，由郑州大学动物实验中心提供，动物生产许可证号 SCXK（豫）2015-0004。实验通过河南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会的批准（编号 YFYDW2016022）。

1.2 药物及试剂 蒲金口服液含石菖蒲、郁金、丹参、红花四味中药，成药制作工艺由河南中医药大学第一附属医院制剂研究室提供，低剂量组含生药 1.2 g/mL，高剂量组含生药 2.4 g/mL；银杏叶提取物（德国威玛舒培博士药厂，批号 7140315）；脂多糖（LPS 血清型 O55：B5，北京索莱宝科技有限公司，批号 530F035）；兔多抗 NgR（北京博奥森生物技术有限公司，批号 bs-20486R）；兔多抗 p75NTR（武汉三鹰生物技术有限公司，批号 55014-1-AP）；小鼠单抗  $\beta$ -actin（武汉博士德生物工程有限公司，批号 BM0627）。

1.3 仪器 EG1150 型全自动石蜡包埋机、2016 型轮转式切片机（德国 Leica 公司）；BX53 型生物显微镜（日本 Olympus 公司）；HI650 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；DYCZ-24DN 型垂直电泳槽（北京六一仪器厂）；Muliskan MK3 型酶标仪（美国 Thermo 公司）等。

## 2 方法

2.1 模型制备与分组 将 36 只 SD 雌性大鼠与 18 只雄性大鼠以 2：1 比例于下午 17：00 合笼，次日上午 08：00 将雌雄大鼠分笼，受孕成功后孕鼠另笼饲养。将受孕大鼠随机分为 LPS 组（30 只）与对照组（6 只）；参照李晓捷等<sup>[17]</sup>制作宫内感染致早产鼠脑性瘫痪动物模型的方法，LPS 组于妊娠第 16、17 天连续 2 d 每日腹腔注射 LPS

（350  $\mu$ g/kg），对照组注射同等剂量的生理盐水；以孕期  $\leq$  21 d 判定为早产造模成功。随机选取 LPS 组早产模型仔鼠 80 只，随机分为 4 组，每组 20 只，分为蒲金口服液高剂量（24 g/kg）组、蒲金口服液低剂量（12 g/kg）组、银杏叶提取物（30 mg/kg）组、模型组，分别给予高剂量蒲金口服液、低剂量蒲金口服液、银杏叶提取物及生理盐水灌胃。4 组各随机分为早期、晚期干预组各 10 只。

2.2 药物干预 早期干预组于生后第 1 天灌胃给药；晚期干预组生后第 8 天灌胃给药；灌胃容量为 0.1 mL/10 g，连续 7 d，每日 1 次。同条件喂养至 21 日龄。剂量换算方法根据徐淑云《药理实验方法学》所述人与动物间体表面积折算，按照说明书用药剂量折算出大鼠用量，把人的等效剂量记为低剂量，2 倍等效剂量记为高剂量。

### 2.3 模型病理学观察及组织病理学评分

2.3.1 孕鼠宫内感染 仔鼠出生即刻随机选取 LPS 组 and 对照组孕鼠各 4 只，取子宫及胎盘，组织固定，常规脱水、透明、浸蜡、包埋，HE 染色，观察孕鼠宫内感染情况。对孕鼠子宫组织参照刘国生等<sup>[18]</sup>的方法进行病理学评分，①腔壁结构病变，“-”各层结构正常记 0 分，“+”黏膜固有层腺体结构消失记 1 分，“++”肌层与黏膜层分界不清记 2 分，“+++”分层结构不清记 3 分；②上皮细胞变性坏死，“-”单层柱状上皮记 0 分，“+”上皮细胞扁平或脱落 $<1/3$ 记 1 分，“++”上皮细胞扁平或脱落 $1/3\sim2/3$ 病变记 2 分；“+++”全层上皮细胞变性坏死记 3 分；③炎细胞浸润，“-”无炎细胞浸润记 0 分，“+”少数散在或灶性且仅在黏膜固有层内记 1 分，“++”散在或灶性但深入肌层记 2 分，“+++”多数散在或层状浸润并累及全层记 3 分；④内膜充血水肿，“-”无内膜充血水肿记 0 分，“+”固有膜轻微充血水肿记 1 分，“++”明显充血水肿记 2 分，“+++”全层充血水肿记 3 分。

胎盘组织从血管充血、水肿及炎性细胞浸润程度方面进行评分，0 分为无损伤，1 分为病变范围 $<25\%$ ，2 分为病变范围 $25\%\sim50\%$ ，3 分为病变范围 $51\%\sim75\%$ ，4 分为病变 $>75\%$ ，总分 8 分。

2.3.2 新生仔鼠脑组织脑室旁白质区损伤 随机选 LPS 组早产仔鼠及对照组仔鼠各 10 只，断头取脑组织，进行组织固定，常规脱水、透明、浸蜡、包埋，HE 染色，观察新生仔鼠脑组织脑室旁白质区损伤情况。采用孔雷等<sup>[19]</sup>的方法每张切片随机选择 10 个高倍视野（ $\times 200$ ），光镜下对脑组织神经元、胶质细胞和血管分别作组织学评分。出现少量神经元、神经纤维水肿等计 1 分，散在星形胶质细胞水肿计 1 分，部分毛细血管扩张、水肿计 1 分；出现广泛神经元水肿、神经纤维疏松化，胞核形态不规则，核固缩、神经元凋亡，神经纤维网结构破坏计 2 分；广泛胶质细胞水肿计 2 分；广泛毛细血管扩张及水肿、毛细血管内皮细胞破坏计 2 分；出现核固缩、神经元凋亡计 3 分；嗜神经元现象，脑脓肿计 3 分；毛细血管坏死，脑实质内点、片状出血计 3 分，总分为 18 分。

2.4 脑组织 NgR、p75NTR 表达的检测 随机取 LPS 组及对  
照组新生仔鼠各 10 只断头取脑，取一侧脑组织进行组织固  
定、脱水、透明、浸蜡、包埋。取另一侧脑组织放置于 2  
mL 冻存管内，并快速放入液氮罐内冻存储备用，分别进行免  
疫组化染色及 Western blot 检测。同样方法取 21 日龄 80 只  
模型仔鼠脑组织，分别进行免疫组化及 Western blot 检测。

2.4.1 免疫组化检测 石蜡切片常规脱蜡至水，热抗原修  
复，过氧化氢灭活内源性过氧化物酶，5% BSA 封闭，滴  
加稀释的兔抗大鼠 NgR 多克隆 IgG 一抗/兔抗大鼠 p75NTR  
多克隆 IgG 一抗（1：50/1：50），生物素标记山羊抗兔  
IgG/p75NTR 二抗，37℃ 恒温箱孵育 20 min；试剂 SABC，  
DAB 显色试剂盒显色，苏木素复染，自来水冲洗，脱水，  
透明，封片，光学显微镜观察。光镜下细胞浆有棕黄色颗  
粒沉着为阳性细胞。400 倍视野下，白质部位随机取 3 个  
视野拍照，采用美国 Image-Pro Plus 软件对免疫组化染色图  
片进行吸光度（A）测定，取均值。

2.4.2 Western blot 检测 取脑组织加 RIPA 裂解混合液  
200 μL 冰上裂解 30 min，离心取上清，BCA 法提取蛋白、  
测定浓度、蛋白变性。制胶、上样、电泳、转膜，封闭。  
分别加入一抗 NgR（1：300）、p75NTR（1：200），4℃ 孵  
育 8 h。加羊抗兔二抗孵育 2 h（1：5 000），洗涤，显影，  
曝光。Bio-Red Image Lab 5.1 软件分析各泳道条带灰度值，  
以 β-actin 为参照，以目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值表述  
目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学分析，数据以  
（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。若各组样本数据符合正态分布，且符合方差  
齐性（采用 Levene 检验方法验证），则采用单因素方差分  
析，两两比较采用 SNK-q 检验，两样本均数比较采用独立  
样本 *t* 检验。若各组样本数据符合正态分布，但不符合方  
差齐性（采用 Levene 检验方法验证），则两两比较采用  
Dunnett's 检验，两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验。以  
*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。若样本数据不符合正态  
分布，则采用非参数检验。

3 结果

3.1 一般情况观察

3.1.1 LPS 对雌鼠孕产情况的影响 造模孕鼠 11 只流产，  
1 只死亡，其余 18 只孕鼠均提前分娩，产出 102 只活仔鼠，  
可见死产仔鼠。对照组 6 只孕鼠全部足月分娩，共产出 62  
只仔鼠，无死产仔鼠。较对照组相比，造模孕鼠产仔数量  
减少（*P*<0.01）。见表 1。

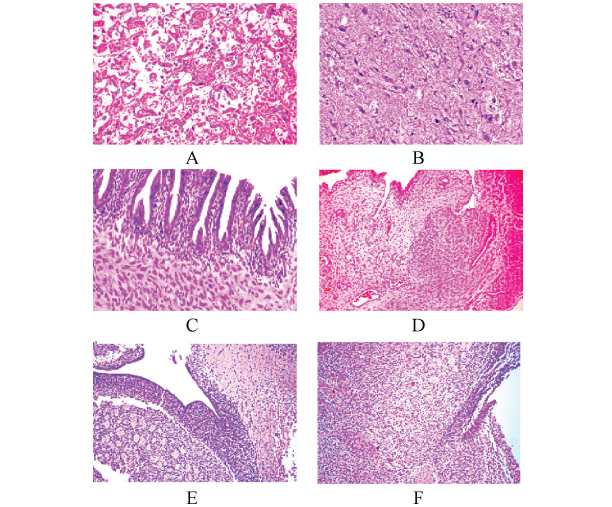
3.1.2 LPS 对新生仔鼠出生情况的影响 与对照组比较，  
LPS 组仔鼠出生时皮肤颜色紫暗，主动活动少，对刺激反  
应弱，体质量低（*P*<0.01）。见表 1。

表 1 脂多糖对孕鼠产仔数和仔鼠出生体质量的影响（ $\bar{x}\pm s$ ）

| 组别    | 孕鼠产仔数/只        | 仔鼠出生体质量/g      |
|-------|----------------|----------------|
| LPS 组 | 5.667±1.085 ** | 4.942±0.279 ** |
| 对照组   | 10.000±1.414   | 6.113±0.491    |

注：与对照组比较，\*\* *P*<0.01。

3.2 LPS 对孕鼠子宫、胎盘及新生仔鼠脑组织病理学的影响 LPS 组孕鼠胎盘组织可见血管充血水肿，大量炎性细  
胞浸润，子宫组织可见组织结构紊乱，上皮细胞变性坏死，  
炎细胞浸润及充血水肿；对照组孕鼠子宫及胎盘组织未见  
炎性细胞及充血水肿等病理改变。与对照组比较，LPS 组  
孕鼠胎盘及子宫组织病理评分升高（*P*<0.05）；LPS 组仔  
鼠脑白质区组织结构稀疏，细胞排列紊乱，结构不清，间  
隙增宽，组织间隙出血、水肿。对照组仔鼠脑组织结构完  
整，细胞排列均匀整齐，胞核较大，未见组织出血水肿，  
与对照组比较，LPS 组仔鼠病理评分升高（*P*<0.05）。见  
图 1、表 2。



注：A 为 LPS 组孕鼠胎盘，B 为对照组孕鼠胎盘，C 为 LPS 组孕  
鼠子宫，D 为对照组孕鼠子宫，E 为 LPS 组仔鼠脑，F 为对照  
组仔鼠脑。

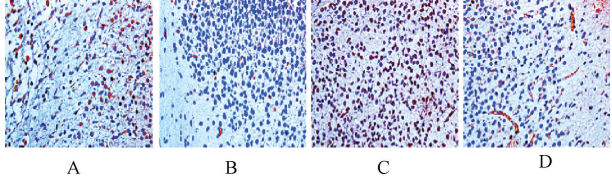
图 1 LPS 对孕鼠子宫、胎盘及新生仔鼠脑组织病理学  
的影响（A~D，HE，×200；E~F，HE，×100）

表 2 孕鼠子宫、胎盘及新生仔鼠脑组织病理学评分比较  
（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=4）

| 组别    | 胎盘/分          | 子宫/分          | 脑组织/分         |
|-------|---------------|---------------|---------------|
| LPS 组 | 4.750±1.258 * | 8.000±1.414 * | 6.250±0.957 * |
| 对照组   | 0             | 0             | 0.500±0.577   |

注：与对照组比较，\* *P*<0.05。

3.3 LPS 对新生仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 水平的影响  
与对照组仔鼠比较，LPS 组仔鼠脑组织中 NgR、p75NTR 的  
表达上调（*P*<0.05，*P*<0.01）。见图 2~3、表 3~4。



注：A 为 LPS 组 NgR，B 为对照组 NgR，C 为 LPS 组 p75NTR，  
D 为对照组 p75NTR。

图 2 脂多糖对仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响  
（IHC，×400）



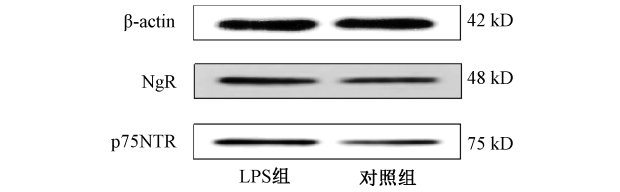


图 3 脂多糖对仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响

表 3 免疫组化法检测 LPS 对仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别    | NgR                 | p75NTR               |
|-------|---------------------|----------------------|
| LPS 组 | 0.028 $\pm$ 0.007 * | 0.032 $\pm$ 0.003 ** |
| 对照组   | 0.021 $\pm$ 0.003   | 0.024 $\pm$ 0.004    |

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

表 4 脂多糖对仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

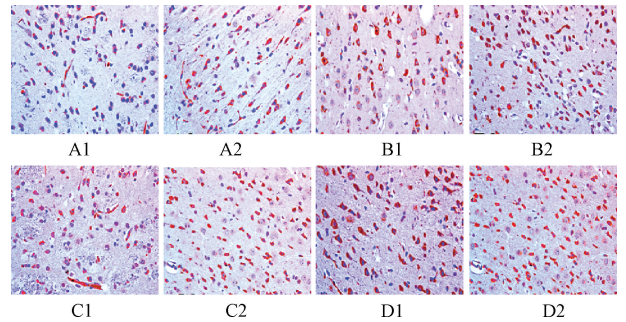
| 组别    | 剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | NgR                 | p75NTR               |
|-------|-----------------------------------------|---------------------|----------------------|
| LPS 组 | 350                                     | 0.646 $\pm$ 0.014 * | 0.366 $\pm$ 0.006 ** |
| 对照组   | 350                                     | 0.468 $\pm$ 0.026   | 0.279 $\pm$ 0.011    |

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

3.4 蒲金口服液对仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响 与同时相模型组相比,蒲金口服液高、低剂量组及银杏叶提取物组 NgR、p75NTR 的表达均减少 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与银杏叶提取物组相比较,高剂量蒲金口服液组 NgR、p75NTR 表达下降 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与药物不同时相比较,高、低剂量蒲金口服液、银杏叶提取物早期干预下调 NgR、p75NTR 的表达均较晚期 ( $P<0.05$ )。见图 4~6、表 5~6。

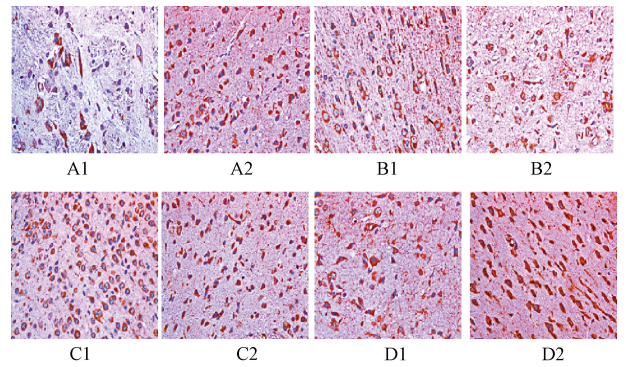
4 讨论

早产儿脑发育不成熟,具有易损伤的特点,围产期感染、缺氧缺血等高危因素导致炎症因子大量激活、兴奋氨基酸堆积、氧自由基释放,容易发生早产儿脑病,不仅引起脑组织的损伤,还造成以后的发育障碍<sup>[20]</sup>。研究表明,



注: A1 为高剂量蒲金口服液早期干预组, A2 为高剂量蒲金口服液晚期干预组, B1 为低剂量蒲金口服液早期干预组, B2 为低剂量蒲金口服液晚期干预组, C1 为银杏叶提取物早期干预组, C2 为银杏叶提取物晚期干预组, D1 为早期干预模型组, D2 为晚期干预模型组。

图 4 蒲金口服液对仔鼠脑组织 NgR 表达的影响 (IHC,  $\times 400$ )



注: A1 为高剂量蒲金口服液早期干预组, A2 为高剂量蒲金口服液晚期干预组, B1 为低剂量蒲金口服液早期干预组, B2 为低剂量蒲金口服液晚期干预组, C1 为银杏叶提取物早期干预组, C2 为银杏叶提取物晚期干预组, D1 为早期干预模型组, D2 为晚期干预模型组。

图 5 蒲金口服液对仔鼠脑组织 p75NTR 表达的影响 (IHC,  $\times 400$ )

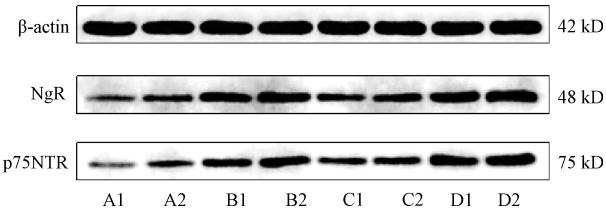
表 5 蒲金口服液对仔鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | 剂量/( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | 干预年龄/d | 动物数/只 | NgR                      | p75NTR                   |
|---------|--------------------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------------------|
| 模型组     | -                                    | 0~7    | 8     | 0.028 $\pm$ 0.006        | 0.030 $\pm$ 0.005        |
|         |                                      | 7~14   | 8     | 0.030 $\pm$ 0.006        | 0.033 $\pm$ 0.006        |
| 蒲金口服液组  | 24                                   | 0~7    | 9     | 0.006 $\pm$ 0.001 *** §§ | 0.008 $\pm$ 0.001 *** §§ |
|         |                                      | 7~14   | 9     | 0.007 $\pm$ 0.001 * #    | 0.012 $\pm$ 0.004 * #    |
|         | 12                                   | 0~7    | 9     | 0.016 $\pm$ 0.004 *** §§ | 0.020 $\pm$ 0.005 *** §  |
|         |                                      | 7~14   | 8     | 0.025 $\pm$ 0.005 * #    | 0.028 $\pm$ 0.005 * #    |
| 银杏叶提取物组 | 0.03                                 | 0~7    | 9     | 0.011 $\pm$ 0.002 ** §   | 0.014 $\pm$ 0.003 **     |
|         |                                      | 7~14   | 8     | 0.016 $\pm$ 0.005 *      | 0.020 $\pm$ 0.005 *      |

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与银杏叶提取物组比较,§ $P<0.05$ ,§§ $P<0.01$ ;与晚期组比较,§ $P<0.05$ ,§§ $P<0.01$ 。

宫内感染致早产脑损伤的发生不仅与炎症反应有关,同时与血管因素、胶质细胞损伤、神经损伤的修复和功能重组障碍、内源性保护机制不完善等多种因素密切相关<sup>[21]</sup>。脑神经受损后可以再生,但受损神经元所处的局部微环境及其内在特性是轴突再生失败的主要原因,外源性的抑制轴

突的因子有 MAIFs,胶质瘢痕,炎症等<sup>[22]</sup>。受损神经产生的 MAIFs 以少突胶质细胞产生的 Nogo-A、髓鞘相关糖蛋白(MAG)、OMgp 为经典代表,通过与抑制分子受体结合,激活下游信号分子 RhoA,导致神经生长锥崩溃,可引起中枢神经再生失败。研究证实,NgR 是 MAIFs 的高亲和力受



注：A1~D2 含义见图 4~5 注解。

图 6 蒲金口服液对大鼠脑组织 NgR、p75NTR 蛋白表达的影响

表 6 蒲金口服液对大鼠脑组织 NgR、p75NTR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | 剂量/<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | 干预年<br>龄/d | NgR                       | p75NTR                    |
|---------|------------------------------|------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型组     | -                            | 0~7        | 0.582±0.085               | 0.750±0.123               |
|         |                              | 7~14       | 0.624±0.029               | 0.755±0.081               |
| 蒲金口服液组  | 24                           | 0~7        | 0.138±0.030 <sup>*#</sup> | 0.232±0.053 <sup>*#</sup> |
|         |                              | 7~14       | 0.260±0.074 <sup>##</sup> | 0.347±0.062 <sup>##</sup> |
|         | 12                           | 0~7        | 0.409±0.085 <sup>*#</sup> | 0.496±0.067 <sup>*#</sup> |
|         |                              | 7~14       | 0.528±0.041 <sup>##</sup> | 0.633±0.097 <sup>##</sup> |
| 银杏叶提取物组 | 0.03                         | 0~7        | 0.302±0.072 <sup>*#</sup> | 0.369±0.056 <sup>*#</sup> |
|         |                              | 7~14       | 0.429±0.050 <sup>*</sup>  | 0.512±0.090 <sup>*</sup>  |

注：与模型组比较，<sup>\*</sup>  $P<0.05$ ；与银杏叶提取物组比较，<sup>#</sup>  $P<0.05$ ；与晚期组比较，<sup>\*</sup>  $P<0.05$ 。

体，在以少突胶质前体细胞系为主要成分的早产儿 PVL 再生抑制机制中起关键作用<sup>[23-25]</sup>。p75NTR 是结合所有神经营养因子的 TNF-α 受体超家族的成员，参与介导 NgR 的跨膜信号传导，主要调节它们的促凋亡作用<sup>[26-28]</sup>。NgR、p75NTR 的表达上调，使轴突生长被抑制，阻碍神经的结构修复和功能重组。因此，检测脑组织中 NgR、p75NTR 的表达，可进一步明确蒲金口服液可能的作用机制。

研究表明，大鼠童年时期发育迅速，21 日龄即相当于人类 1 岁<sup>[29]</sup>，在 6 周左右即可达到性成熟，而 PVL 的好发时期在大鼠相当于生后第 2~3 天时段，在人类则胎龄 23~32 周，此时在白质部位以晚期 OL 前体占主导地位，髓鞘尚未形成，细胞对免疫攻击具有高度敏感性，而晚期 OLs 是 PVL 病变的主要靶细胞，在 PVL 的发病机理中起着关键作用<sup>[30]</sup>。临床对于脑性瘫痪的诊断年龄通常为 1 岁之后，近年来随着方法学的进展，可以在校正年龄 5 月龄之前做出脑瘫诊断或风险预测<sup>[31]</sup>。对于本病的预防提倡早期发现、早期诊断和早期治疗，高危儿的临床干预多于生后即进行<sup>[32-34]</sup>，故实验时早期干预时间为生后至 7 日龄，观察期限一般不小于 14 天。采用早期干预及晚期干预是相对而言对于治疗时机的探索，以便于寻找蒲金口服液最有效的治疗时机。

本实验采用 LPS 制备早产 PVL 仔鼠动物模型，选用高、低剂量蒲金口服液干预，于不同时间节点进行干预，探讨蒲金口服液对宫内感染致早产脑损伤大鼠脑组织 NgR、p75NTR 表达的影响。实验结果表明，孕鼠注射 LPS 后，可造成宫内感染，导致胎盘及子宫组织炎性细胞浸润，组

织病理学评分增高，有流产及死产现象，且产仔数少、新生仔鼠活力差，皮肤颜色紫绀，出生体质量低，仔鼠脑组织病理评分升高。通过检测仔鼠脑组织中 NgR、p75NTR 表达，验证了 LPS 可致仔鼠脑组织中 NgR、p75NTR 的表达上调。这提示了宫内感染可促使脑组织中 MAIFs 受体表达增多，推测这可能是脑损伤后促使神经再生再生失败的原因之一。药物干预后，各给药组仔鼠脑组织中 NgR、p75NTR 的表达均较模型组减少 ( $P<0.01$ )；各给药组之间两两两比较发现，高剂量蒲金口服液作用更明显，低剂量蒲金口服液组与银杏叶提取物组之间无明显差异。推测高剂量蒲金口服液可能通过下调 NgR、p75NTR 的表达，从而降低 NgR、p75NTR 介导的信号通路活性，抑制下游信号转导，促进生长椎的生长，从而发挥对受损神经的保护作用。通过不同介入时点观察，发现早期干预组均较晚期干预组下调 NgR、p75NTR 的表达作用明显，推测这可能与此时期大脑白质部位以晚期 OL 前体占主导地位，髓鞘尚未形成，且神经系统具有可塑性有关<sup>[32]</sup>，提示了早期干预的重要性和必要性。

从中医方面来讲，血管因素所致“血瘀”为公认的致病因素，临床多采用“活血化瘀”法治疗本病。本课题组通过长期的临床实践及探索发现，“痰”同样是本病的重要致病因素，“痰”和“瘀”是宫内感染所致早产儿脑室周围白质软化的主要病理因素，其病机特点为“痰瘀阻窍，经络不通”。“痰”有有形与无形之分，瘀血阻滞气机，气运失司，水液不布，水停痰生，痰随气行，流注经络，胶着缠绵，痰瘀互阻，从而发病；针对以上病机，本课题组提出采用“化痰活瘀”的治则对早产脑损伤进行干预，这对临床治疗本病提供了新的思路。蒲金口服液是目前课题组运用中医临床思维通过辨证选药，发挥中医特色，且经过临床实践有效的经验方，具有服用简便，痛苦小的优点。本方由石菖蒲、郁金、丹参、红花四味中药组成，全方药物精炼，有活血化瘀、化痰开窍之效，实验结果说明蒲金口服液可使脑损伤仔鼠脑组织中 MAIFs 受体 NgR、p75NTR 表达减少，验证其治疗本病的有效性，推测宫内感染/炎症致早产脑损伤的中医病理因素主要是“痰”和“瘀”，这为活血化瘀、化痰开窍中药临床早期干预治疗本病提供了实验依据。

银杏叶提取物是目前临床使用最为广泛的中药提取物之一，现代药理研究表明，其主要含银杏黄酮、银杏内酯和白果内酯等有效成分，具有促进神经突触生长、抑制神经细胞凋亡、拮抗兴奋性氨基酸的神经毒性，清除自由基、抗脂质过氧化、扩张脑部血管、调血脂、拮抗血小板活化因子等多种药理作用<sup>[35-36]</sup>。本课题组对蒲金口服液前期的动物实验研究证实了其具有抑制 OL 及其 OPC 的凋亡，抑制 MAIFs 的表达，及抗氧化、抑制 TNF-α、IL-6 等炎症因子释放，保护受损神经细胞的作用机制，这与银杏叶提取物的药理作用机制相似。动物实验表明，银杏叶提取物能促进新生缺氧缺血性脑损大鼠脑组织 Nestin 蛋白的表达，

诱导神经干细胞增殖，促进神经髓鞘的形成细胞 OL 表达，促进抑制神经细胞凋亡的 Bcl-2 上调和 caspase-3 下调，对脑缺血再灌注后的神经细胞具有显著的保护作用，促进神经损伤修复。银杏叶提取物亦可降低脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中氧化应激及炎症反应，下调 TNF-α、IL-6 表达，抑制相关卷曲螺旋形成蛋白激酶（ROCK）、肌球蛋白轻链激酶（MLCK）、金属基质蛋白酶 2（MMP-2）表达，减小脑梗死体积，减轻血脑屏障损伤。其不同作用机制不同程度的保护了神经系统疾病的发生及发展，减少了疾病对神经系统的损伤<sup>[37-43]</sup>。

宫内感染引起脑损伤的作用机制复杂，涉及炎症反应、血管因素、胶质细胞损伤、神经损伤的修复和功能重组障碍、内源性保护机制不完善等多种因素，但本实验仅从神经再生修复机制方面对蒲金口服液可能的作用机制做了探索，具有一定的局限性，其可能的其他方面的作用机制尚未探明，接下来课题组将进行进一步深入的研究。

参考文献：

[ 1 ] Kim J K, Chang Y S, Sung S, *et al.* Trends in survival and incidence of bronchopulmonary dysplasia in extremely preterm infants at 23~26 weeks gestation[J]. *J Korean Med Sci*, 2016, 31(3): 423-429.

[ 2 ] 朱文敏, 钟文娟, 徐 波, 等. 我国早产儿脑损伤危险因素 Meta 分析[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34 ( 13 ): 3142-3144.

[ 3 ] 李晓云. 宫内感染对早产儿脑损伤的影响及其机制研究 [J]. 广州医科大学学报, 2018, 46(6): 41-43.

[ 4 ] 付成娟, 刘 青, 刘 刚, 等. 产妇宫内感染相关炎症因子与早产儿脑损伤的相关性分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(9): 476-478.

[ 5 ] 张伟新, 黄为民. 宫内感染的参考诊断及对早产儿的影响 [J]. 现代医院, 2016, 16(7): 953-956.

[ 6 ] 莫坤梅, 黎远团, 谢建红, 等. 早产儿脑损伤与宫内感染引起细胞因子网络反应的临床研究[J]. 实用临床医学, 2015, 16(9): 50-53.

[ 7 ] 张 军, 刘 娟, 潘兆军, 等. 275 例早产儿脑损伤的损伤类型和高危因素分析[J]. 医学综述, 2019, 25(16): 3294-3298.

[ 8 ] MacLennan A H, Thompson S C, Gecz J. Cerebral palsy: causes, pathways, and the role of genetic variants[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(6): 779-788.

[ 9 ] 李晓捷, 唐久来, 马丙祥, 等. 脑性瘫痪的定义、诊断标准及临床分型 [J]. 实用儿科临床杂志, 2014, 29 (19): 1520.

[10] 李晓捷. 中国脑性瘫痪康复的现状、挑战及发展策略[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(1): 6-8.

[11] 马丙祥, 张建奎, 陈恬恬, 等. 蒲金颗粒辅助治疗小儿痉挛型脑性瘫痪痰瘀阻窍证 34 例临床观察[J]. 中医儿科杂志, 2018, 14(3): 26-30.

[12] 马丙祥, 赵 向, 琚 玮, 等. 蒲金口服液对缺氧缺血性脑损伤大鼠 NOS 影响的研究[J]. 中国临床康复, 2004,

19(5): 3826-3827.

[13] 马丙祥, 赵 向, 琚 玮, 等. 蒲金口服液对缺氧缺血性脑损伤大鼠自由基的影响研究[J]. 河南中医学院学报, 2004, 19(111): 25-27.

[14] 陈恬恬. 蒲金口服液对宫内感染/炎症致早产脑损伤大鼠脑组织 Nogo-A、OMgp 表达的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.

[15] 谢克功. 蒲金口服液对宫内感染/炎症致早产脑损伤大鼠脑组织 OL 和 OPC 细胞凋亡的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.

[16] 欧阳辉辉. 蒲金口服液对宫内感染/炎症致早产脑损伤大鼠脑组织 IL-6 和 TNF-α 表达的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.

[17] 李晓捷, 高 晶, 孙忠人. 宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(12): 885-889.

[18] 刘国生, 王桐生, 龙子江, 等. 盆腔炎冲剂对大鼠慢性盆腔炎模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10 (3): 24-26.

[19] 孔 雷, 韩天权, 于颖彦, 等. 胰酶、细胞因子、高渗液和感染对大鼠脑损伤的形态学研究[J]. 中华胰腺病杂志, 2004, 4(2): 98-101.

[20] 黄志恒, 孙 轶, 陈 超. 早产儿脑病的研究现状[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(10): 771-775.

[21] 宋淑芬, 马丙祥. 宫内感染致早产儿脑室周围白质软化症机制研究[J]. 中医学报, 2017, 32(11): 2120-2123.

[22] Tedeschi A, Bradke F. Spatial and temporal arrangement of neuronal intrinsic and extrinsic mechanisms controlling axon regeneration[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2017, 42: 118-127.

[23] Fournier A E, Grand P, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. *Nat*, 2001, 409(6818): 341-346.

[24] Dupuis L, Pehar M, Cassina P, *et al.* Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death. [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(2): 740-745.

[25] 唐 军. Nogo-A、NgR 和 RhoA 在未成熟大鼠少突胶质前体细胞的表达和缺氧后的表达变化及意义[D]. 成都: 四川大学, 2007.

[26] Wong S T, Henley J R, Kanning K C, *et al.* A p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein [J]. *Nat*, 2002, 5 ( 12 ): 1302-1308.

[27] Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(5): 461-467.

[28] Elshaer S L, Elremessy A B. Implication of the neurotrophin receptor p75NTR in vascular diseases: beyond the eye[J]. *Expert Rev Ophthalmol*, 2017, 12(2): 149.

[29] Andreollo N A, Santos, E F, Araújo, M R, *et al.* Rat's age versus human's age: what is the relationship[J]. *Arq Bras Cir Dig*. 2012, 25(1): 49-51.



[30]

Volpe J J. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. [J]. *Pediatric Research*, 2001, 50 (5): 553-562.

[31]

中华医学会儿科学分会康复学组. 脑性瘫痪的病因学诊断策略专家共识 [J]. 中华儿科杂志, 2019, 57 (10): 746-751.

[32]

周 蕾, 蔡 勇, 梁少珍, 等. 神经节苷脂联合鼠神经生长因子对早产儿脑损伤后血清神经损伤标志物的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(5): 524-527.

[33]

朱 骏, 赵建华. 神经节苷脂联合神经生长因子对小儿脑损伤患者神经行为功能及临床疗效的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(1): 82-85.

[34]

华仲慰. 神经系统可塑性研究的进展[J]. 生理科学进展, 1986(1): 33-38.

[35]

刘 花, 高 卉. 银杏叶提取物药理作用的研究进展[J]. 湖北科技学院学报 (医学版), 2015, 29(3): 259-262.

[36]

张鹏飞, 廖丽君, 邓 赟, 等. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44 (2): 426-429.

[37]

宋文秀, 卢飞艳, 王艳萍, 等. 银杏叶对新生鼠缺氧缺血性脑损伤后 Nestin 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(12): 1635-1636.

[38]

王淑英, 李 尧, 李 文, 等. 银杏叶提取物对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤少突胶质细胞的保护作用[J]. 黑龙江医药科学, 2019, 42(4): 237-238; 240.

[39]

赵 军, 武月娥, 张健敏, 等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠氧化应激和炎症的治疗作用[J]. 包头医学院学报, 2019, 35(1): 61-63; 92.

[40]

徐 悦, 邓 超, 郑永强. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障的保护作用及 ROCK、MLCK、MMP-2 表达的影响[J]. 四川中医, 2019, 37(7): 44-48.

[41]

吕建国, 孙燕玲. 大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区细胞凋亡及银杏叶提取物的保护作用[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(4): 395-399.

[42]

鲁立颖. 银杏叶提取物防治神经系统疾病的研究进展[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 103-104.

[43]

梁子红, 谢 鹏, 朱润秀, 等. 银杏叶提取物对神经系统疾病作用的研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(5): 570-575.

## 天南星炮制成胆南星的“减毒改性”作用

单丽倩, 刘晓峰, 崔亚晨, 刘 悦, 高 慧\*  
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** **目的** 比较天南星发酵前后抗高热惊厥和解热作用以及毒性。**方法** 建立 45 ℃热水浴诱发的大鼠高热惊厥模型, 随机分成模型组, 天南星中、高剂量组 (1.4、2.8 g/kg), 胆南星中、高剂量组 (1.4、2.8 g/kg), 另设空白对照组, 每组 8 只。灌胃给药后, 观察惊厥发生率、惊厥潜伏期等。皮下注射 20% 干酵母混悬液制备大鼠发热模型, 随机分成模型组、天南星组 (2.8 g/kg)、胆南星组 (2.8 g/kg), 另设空白对照组, 每组 8 只, 灌胃给药后观察肛温变化, 测定前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、钠钾 ATP 酶 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、肝糖原 (Glycogen)、白细胞介素-1 β (IL-1β)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平。小鼠灌胃给予天南星鲜品、天南星和胆南星的不同浓度水煎液, 观察小鼠死亡率。**结果** 与模型组相比, 天南星组与胆南星组均可降低惊厥发生率, 且胆南星作用优于天南星; 与模型组相比, 天南星组未表现出解热作用, 胆南星组能降低高热大鼠的肛温 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 并使 PGE<sub>2</sub>、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase、SDH、IL-6、及 IL-1 β 水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Glycogen 水平升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。毒性强度依次为天南星鲜品、天南星、胆南星。**结论** 天南星经发酵制成胆南星后毒性降低, 增强了抗高热惊厥作用, 产生了解热作用, 验证了天南星发酵炮制成胆南星的“减毒改性”的传统理论。

**关键词:** 天南星; 胆南星; 抗惊厥; 清热; 毒性

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2021)06-1608-05  
**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.042

天南星是天南星科植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott.、异叶天南星 *Arisaema heterophyllum* Blume. 或东北天南星 *Arisaema amurense* Maxim. 的干燥块茎, 有温化寒痰、祛风止痉之功效。胆南星为制天南星细粉与牛、

收稿日期: 2019-10-08

基金项目: 国家发改委中医药行业专项 (201507004-03); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-ZY-45)

作者简介: 单丽倩 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药炮制学。Tel: 13354112850; E-mail: 1260678554@qq.com

\* 通信作者: 高 慧 (1974—), 女, 教授, 研究方向为中药炮制原理。Tel: (0411) 85890155; E-mail: gaohuitem@163.com