

· 论著 ·

积雪草酸对颅脑损伤的保护作用及其机制研究

顾申勇^{1,2}, 朱秋珍¹, 王静³, 刘玉兰¹, 张悦³, 芮耀诚¹, 章超凡¹, 李铁军¹ (1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 复旦大学附属中山医院青浦分院药剂科, 上海 201700; 3. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的 研究积雪草酸对颅脑损伤的保护作用及其机制。方法 采用落重法建立大鼠闭合性颅脑损伤模型和液压冲击颅脑损伤模型,测定大鼠脑组织含水量、血脑屏障通透性、以及观察脑组织病理形态学变化,研究积雪草酸对颅脑损伤的保护作用;用酶联免疫吸附测定(ELISA)和聚合酶链式反应(PCR)检测炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)的表达,探讨其作用机制。结果 积雪草酸可显著减少颅脑损伤后脑组织含水量,减轻血脑屏障通透性,改善脑组织细胞形态;并且可以显著抑制颅脑损伤后炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达。结论 积雪草酸具有保护颅脑创伤的作用,其作用机制可能与其抑制炎症作用有关。

[关键词] 积雪草酸;颅脑损伤;炎症

[中图分类号] R285

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)03-0206-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.004

Protective effects and mechanism of Asiatic Acid on traumatic brain injury

GU Shenyong^{1,2}, ZHU Qiuzhen¹, WANG Jing³, LIU Yulan¹, ZHANG Yue³, RUI Yaocheng¹, ZHANG Yuefan¹, LI Tiejun¹ (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital Qingpu Branch Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China; 3. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effects and mechanism of Asiatic Acid (AA) on traumatic brain injury. **Methods** The closed craniocerebral injury model made by the weight-drop method and fluid percussion brain injury model were used in the study. Brain water content, blood brain barrier permeability and brain tissue pathology morphology were measured to study the neuroprotective effect of AA on traumatic brain injury. Moreover, the inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 were examined by PCR and ELISA to study the mechanism of AA. **Results** Brain water content and permeability of blood brain barrier were significantly decreased, the traumatic brain injury was ameliorated by AA. Moreover, the expressions of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 were inhibited by AA. **Conclusion** AA has the protective effects on traumatic brain injury and the mechanism is related to the anti-inflammatory effect.

[Key words] Asiatic Acid; traumatic brain injury; inflammatory cytokines

颅脑损伤是外力作用于头部致颅骨、脑膜、脑血管和脑组织的机械变形造成的神经组织损伤,伴有脑缺血、脑水肿、颅内压升高、血脑屏障通透性改变等病理改变^[1]。目前,颅脑损伤的药物特异性不强,治疗效果不佳,而部分药物(如激素、白蛋白)的大剂量使用还存在增加患者死亡率的风险。因此,寻找有效的颅脑损伤防治药物具有非常重要

的意义。

积雪草酸是积雪草中提取的三萜酸,目前临床上多用于治疗跌打损伤、皮肤病等。现代研究表明,积雪草酸有抗炎、护肤、护肝、降糖、降脂、抗肿瘤、抗抑郁、抗阿尔茨海默症、保护心血管、保护神经等作用^[2-6]。积雪草酸对颅脑损伤影响的实验研究未见文献报道。本文通过落重法和液压冲击颅脑损伤法建立的两种颅脑损伤模型观察积雪草酸对颅脑损伤的保护作用,并从抗炎角度初步探讨其作用机制,为积雪草酸的应用提供理论基础。

1 材料

1.1 动物 雄生 SD 大鼠(200~220 g)280 只[上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物合格证:

[基金项目] 上海市青浦区卫生和计划生育委员会科研课题(W2015-02)

[作者简介] 顾申勇,硕士研究生,主管药师。E-mail:gusy5555@163.com

[通讯作者] 李铁军,副教授,硕士生导师。研究方向:心脑血管药理学。E-mail:ltj204@163.com

SCYK(沪)2013-0016],均为SPF级。

1.2 药物 积雪草酸(AA,上海源叶生物科技有限公司,批号:20140524),临用前用0.9%氯化钠注射液配制成所需浓度。

1.3 试剂与仪器 伊文思蓝(EB,国药集团化学试剂有限公司,批号:20130218);甲酰胺(国药集团化学试剂有限公司,批号:20140402);半自动生化分析仪(SCREEN MASTER 3000,北京富利泰医学科技有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(型号L-907712,太仓精宏仪器设备有限公司);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒(美国R&D);Real time PCR仪(美国,ABI公司)。

2 方法

2.1 模型建立

2.1.1 落重法建大鼠闭合性颅脑损伤模型^[7] 大鼠用乙醚轻度麻醉后,实验者用手将大鼠头颅朝上固定于水平桌面,将50 g砝码从一根80 cm PVC-U绝缘难燃电工套管自由垂直坠落砸大鼠大脑,建立大鼠闭合性颅脑损伤模型。

2.1.2 液压冲击建大鼠颅脑损伤模型^[8] 以10%水合氯醛生理盐水溶液(3 ml/kg)腹腔注射将大鼠麻醉后,于中线切开头皮,剥离骨膜,在前凶与人字缝尖中点偏左4 mm处用牙科钻将颅骨钻孔,开一直径约4.8 mm的骨窗,暴露硬脑膜,埋置及固定打击管,连接液压打击仪,实施液压打击致伤,致伤能量为(170.33 \pm 11.34) kPa。

2.2 实验分组及给药方法 实验分5组,即正常对照组、模型组、AA低、中、高剂量组(5、10、20 mg/kg),每组10只大鼠。各组大鼠颅脑损伤后1 h开始尾静脉注射给药,一天一次,连续给药3 d。正常对照组和模型组的大鼠尾静脉注射0.9%氯化钠注射液。所有大鼠均未次给药1 h后进行各项指标测定。

2.3 指标测定

2.3.1 脑组织含水量的测定 末次给药1 h后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,取各组大鼠脑组织,称取脑组织的湿重后,将脑组织置于电热恒温鼓风干燥箱中110 $^{\circ}$ C烘烤24 h至恒重,称取脑组织的干重。按公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 \times 100%。

2.3.2 脑组织病理形态学检查 末次给药1 h后,10%水合氯醛生理盐水溶液麻醉各组大鼠后取脑。取损伤部位脑组织,切成1 mm³大小组织,4%多聚甲醛保存,透射电镜检查脑组织的超微结构。并通

过常规脱水、石蜡包埋切片、HE染色,光学显微镜观察脑组织形态。

2.3.3 血脑屏障通透性的测定 采用伊文思蓝法测定血脑屏障的通透性。末次给药1 h后,大鼠经尾静脉注射2%伊文思蓝生理盐水溶液(4 ml/kg)。注射2 h后,腹腔注射10%水合氯醛生理盐水溶液麻醉动物,打开胸腔,0.9%氯化钠注射液对心脏进行灌注,使残存于血管内的伊文思蓝生理盐水溶液被充分排出。打开颅腔取脑,沿正中中线称取脑损伤部位脑组织约100 mg,加入3 ml甲酰胺中,50 $^{\circ}$ C水浴72 h,1 500 r/min离心10 min,取上清液,半自动生化分析仪测定其上清液吸光度(A)值(630 nm)。根据标准曲线计算1 g脑组织中依文思蓝的含量。

2.3.4 ELISA检测脑组织炎症因子 取大鼠脑组织,切取损伤侧脑组织匀浆收集蛋白。按照TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒说明书将各组样品加入测试孔中,通过一系列抗原抗体结合反应,在450 nm处检测各组样品的A值。根据标准曲线计算炎症因子蛋白的表达量。

2.3.5 Real time PCR检测脑组织炎症因子 提取各组脑组织的RNA,并逆转录为cDNA,采用Real time PCR仪对TNF- α 、IL-1 β 、IL-6基因进行半定量分析。各组之间的表达差异通过相对定量的方法即比较Ct值法(2^{- $\Delta\Delta$ Ct})计算^[9],计算时应将原始Ct值进行2^{-Ct}转换,从而达到线性关系来比较基因表达差异。Ct为荧光显著高于背景时的循环数: $\Delta\Delta$ Ct=(Ct靶基因-Ct内参)_{实验处理组}-(Ct靶基因-Ct内参)_{正常对照组},其中靶基因代表TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的基因,内参代表的是 β -actin基因。各个炎症因子引物序列如下:

TNF- α :

Forward: 5'-GCCACCACGCTCTTCTGTCTACTG-3'

Reverse: 5'-TGGGCTACGGGCTTGTCACTC-3'

IL-1 β :

Forward: 5'-ATAGCAGCTTTCGACAGTGAGG-3'

Reverse: 5'-GGAGAATACCACTTGTGGCTTA-3'

IL-6:

Forward: 5'-CAGCCACTGCCTTCCCTACTTC-3'

Reverse: 5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

2.4 统计处理 实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS17.0软件进行统计处理,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行检验差异的显著性。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠脑组织含水量的影响 模型组大鼠的

脑组织含水量显著高于正常对照组 ($P < 0.01$); 与模型组相比, AA 低、中、高剂量组的脑组织含水量均显著降低, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见表 2。

表 1 AA 对大鼠颅脑损伤脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑组织含水量 (%)	
	闭合性颅脑损伤	液压冲击颅脑损伤
正常对照组	73.50 ± 1.57	75.94 ± 0.31
模型组	77.90 ± 0.29**	78.03 ± 0.24**
低剂量组	76.50 ± 1.12##	77.28 ± 1.06#
中剂量组	76.21 ± 2.55#	76.61 ± 1.25##
高剂量组	74.93 ± 0.30##	76.13 ± 0.83##

** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与模型组比较

3.2 对大鼠血脑屏障的影响 模型组大鼠脑组织 EB 含量显著高于正常对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, AA 3 个剂量组的脑组织 EB 含量均发生降低; 其中, 闭合性颅脑损伤模型中, AA 中、高剂量组的脑组织 EB 含量降低具有统计学意义 ($P < 0.01$), 液压冲击颅脑损伤模型中, AA 高剂量组的脑组织 EB 含量降低具有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2。

3.3 脑组织病理形态学检查

3.3.1 透射电镜检查结果 正常对照组大鼠脑组织细胞结构正常, 细胞核染色质分布均匀, 以常染色质为主, 胞浆内线粒体不肿胀, 内质网不扩张。闭合性颅脑损伤模型组脑组织细胞均出现血管腔有红血球阻塞, 周围有大的空白区 (水肿典型症状), 神经元细胞核染色质聚集、内质网扩张, 部分线粒体有空

表 2 AA 对大鼠颅脑损伤血脑屏障通透性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	EB 含量 ($\omega_B / \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	
	闭合性颅脑损伤	液压冲击颅脑损伤
正常对照组	17.93 ± 7.31	17.71 ± 8.47
模型组	35.05 ± 7.32**	37.46 ± 18.91*
低剂量组	34.28 ± 9.00	32.03 ± 7.59
中剂量组	24.24 ± 5.37##	27.26 ± 8.49
高剂量组	19.47 ± 6.17##	24.84 ± 6.11#

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与模型组比较

泡, 突触泡扩张。AA 3 个剂量组大部分脑组织细胞结构基本正常, 其中 AA 低剂量组少数神经元细胞核染色质分布不均匀, 神经元细胞的突触泡轻度扩张; 中剂量组神经元细胞的突触泡轻度扩张, 血管周围无明显空白区; 高剂量组少数神经元细胞的突触泡轻度扩张, 血管基本正常。大鼠液压冲击颅脑损伤模型组脑组织细胞血管周围有大的空白区及细胞碎片, 结构稀疏, 神经元细胞内线粒体肿胀, 有空泡, 突触泡扩大, 基质变淡, 小泡消失。AA 3 个剂量组脑组织细胞结构基本正常, 神经元细胞线粒体不肿胀, 突触泡不扩张, 血管周围有轻微空白区或者未见空白区。见图 1, 图 2。

3.3.2 光镜检查结果 正常对照组: 大鼠脑组织正常, 细胞排列有序, 染色均匀, 无出血、肿胀及损伤, 未见炎细胞浸润及血管扩张现象。闭合性颅脑损伤以及液压冲击颅脑损伤模型组大鼠脑组织有出血且出血灶周围血管扩张, 星形胶质细胞和组织间隙水肿明显, 出现炎细胞浸润现象。AA 3 个剂量组星形胶质细胞水肿现象明显减轻, 炎细胞浸润现象减少。见图 3, 图 4。

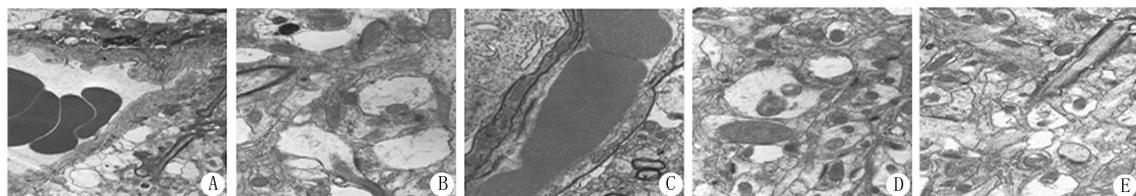


图 1 透射电镜观察大鼠闭合性颅脑损伤脑组织病理形态学变化 ($\times 5000$)

A. 正常对照组; B. 模型组; C. AA 低剂量组 (5 mg/kg); D. AA 中剂量组 (10 mg/kg); E. AA 高剂量组 (20 mg/kg)

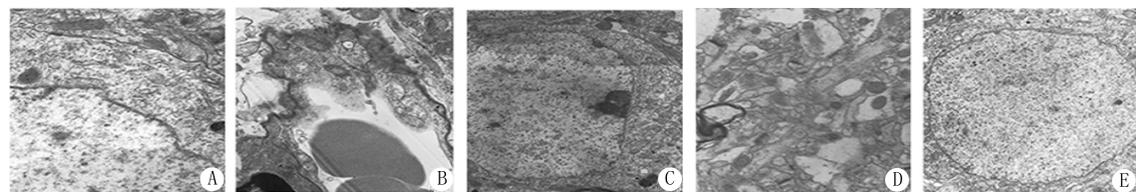


图 2 透射电镜观察大鼠液压冲击颅脑损伤脑组织病理形态学变化 ($\times 5000$)

A. 正常对照组; B. 模型组; C. AA 低剂量组 (5 mg/kg); D. AA 中剂量组 (10 mg/kg); E. AA 高剂量组 (20 mg/kg)

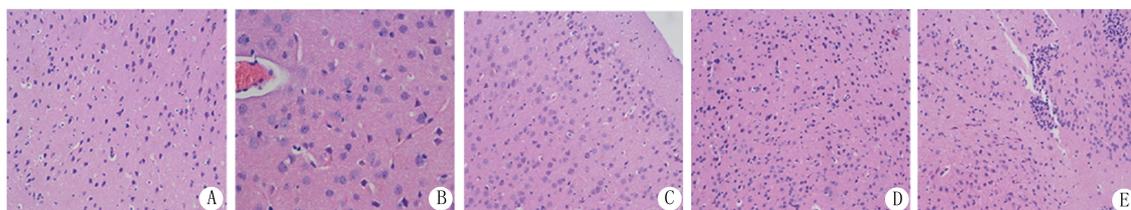


图 3 光镜检查大鼠闭合性颅脑损伤脑组织病理形态学变化(×100)

A.正常对照组;B.模型组;C.AA 低剂量组(5 mg/kg);D.AA 中剂量组(10 mg/kg);E.AA 高剂量组(20 mg/kg)

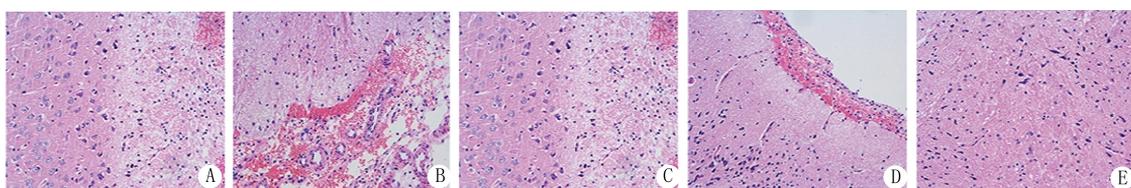


图 4 光镜检查大鼠液压冲击颅脑损伤脑组织病理形态学变化(×100)

A.正常对照组;B.模型组;C.AA 低剂量组(5 mg/kg);D.AA 中剂量组(10 mg/kg);E.AA 高剂量组(20 mg/kg)

3.4 ELISA 结果 模型组大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量较正常对照组明显升高($P < 0.05$),而给予 AA(10 mg/kg)后,脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 5。

3.5 Real time PCR 检测结果 模型组脑组织 TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA 含量显著高于正常对照组($P < 0.01$, $P < 0.001$),而给 AA(10mg/kg)后,各炎症因子 mRNA 水平显著下降($P < 0.05$),结果见图 6。

4 讨论

目前研究发现,及时抑制大脑炎症反应,可以为治疗颅脑损伤赢得时间,最大限度减少颅脑损伤引起的一系列并发症^[10]。所以开发抑制炎症反应的药物可能成为今后治疗颅脑损伤的一个方向。落重法被认为是一种简单易行、控制好、可定量闭合性颅脑损伤(closed head injury, CHI)的经典方法。1987年,美国 Dixon 博士建立了大鼠的液压颅脑损

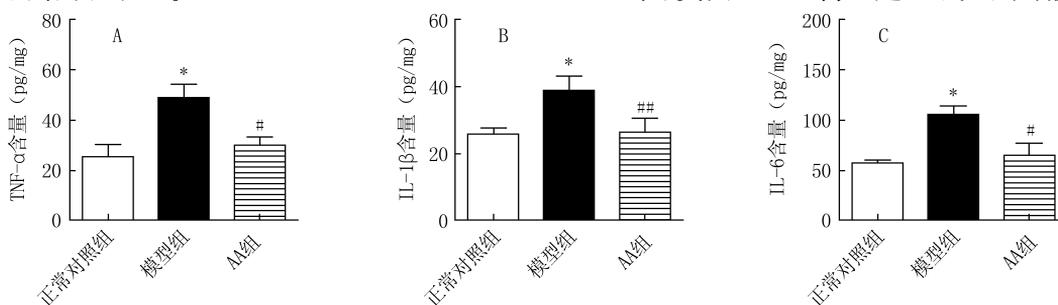


图 5 ELISA 检测大鼠脑组织中不同炎症因子含量

* $P < 0.05$,与正常对照组比较;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与模型组比较

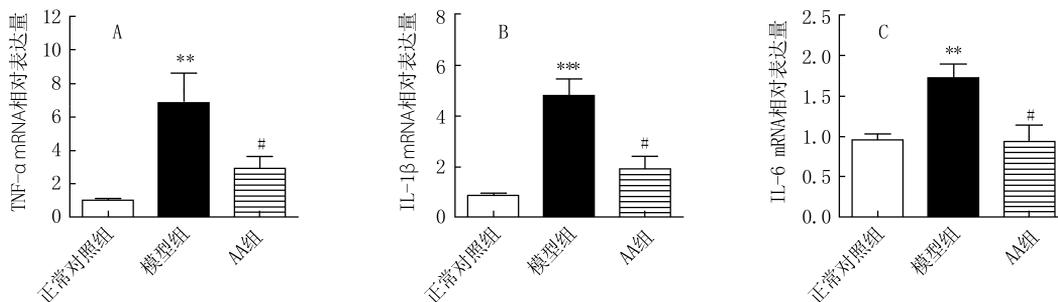


图 6 Real time PCR 检测大鼠脑组织中不同炎症因子 mRNA 水平的变化

** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,与正常对照组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较

- url = aF0pVdqa_AhpLKQd6vx930-7gcPe96VYzAnLhBsRubH7JVQ7skfT0L645K-h20Tt0UsNMsxP5TZYcCV- -qg7qGkSgSHuRTSBpkV2zCe2XQy .
- [3] 中华医学会, 中华医院管理学会药事管理专业委员会, 中国药学会医院药学专业委员会. 抗菌药物临床应用指导原则[S]. 北京: 卫生部公报, 2004: 40.
- [4] 沈东超, 吴硕琳, 吴佳, 等. 美国临床内分泌协会: 血脂异常管理和动脉粥样硬化预防指南(节选第1部分)[J]. 中国卒中杂志, 2012, 7(9): 733-739.
- [5] 沈东超, 吴硕琳, 吴佳, 等. 美国临床内分泌协会: 血脂异常管理和动脉粥样硬化预防指南(节选第2部分)[J]. 中国卒中杂志, 2012, 7(10): 807-812.
- [6] 吕树铮. 冠心病治疗指南更新[J]. 中国医药导报, 2009, 6(6): 5.
- [7] 国家卫生部办公厅. 卫生部临床路径[DB/OL]. 百度文库, 2009, 256-259 [2016-04-01]. http://wenku.baidu.com/link?url=aF0pVdqa_AhpLKQd6vx930-7gcPe96VYzAnLhBsRubH7JVQ7skfT0L645K-h20Tt0UsNMsxP5TZYcCV- -qg7qGkSgSHuRTSBpkV2zCe2XQy.
- [8] 李兆申, 梅长林. 内科学及野战内科学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2009: 234-236.
- [9] ESC Clinical Practice Guidelines, Stable coronary artery disease[S]. Bloomington (MN): Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI), 2007.
- [10] 国家卫生部办公厅. 卫生部临床路径[DB/OL]. 百度文库, 2009, 7-10 [2016-04-01]. http://wenku.baidu.com/link?url=aF0pVdqa_AhpLKQd6vx930-7gcPe96VYzAnLhBsRubH7JVQ7skfT0L645K-h20Tt0UsNMsxP5TZYcCV- -qg7qGkSgSHuRTSBpkV2zCe2XQy.
- [11] 李兆申, 梅长林. 内科学及野战内科学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2009: 28-31.
- [12] 国家卫生部办公厅. 卫生部临床路径[DB/OL]. 百度文库, 2009, 113-116 [2016-04-01]. http://wenku.baidu.com/link?url=aF0pVdqa_AhpLKQd6vx930-7gcPe96VYzAnLhBsRubH7JVQ7skfT0L645K-h20Tt0UsNMsxP5TZYcCV- -qg7qGkSgSHuRTSBpkV2zCe2XQy.
- [13] 李兆申, 梅长林. 内科学及野战内科学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2009: 707-711.
- [14] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南2013[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(7): 457.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会统计信息中心. 中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2013: 126.
- [收稿日期] 2016-04-06 [修回日期] 2016-04-25
[本文编辑] 顾文华

(上接第209页)

伤模型, 由于稳定性和重复性好, 伤情可以分级, 可以测定致伤能量, 是目前较为理想的颅脑外伤动物模型。本实验分别采用落重法建大鼠闭合性颅脑损伤模型和液压冲击建大鼠颅脑损伤模型来评估 AA 对颅脑损伤的保护作用。我们研究发现 AA 可以有效降低两种颅脑损伤动物模型脑组织的含水量, 改善受损的血脑屏障通透性, 保护脑组织。我们还发现, AA 可以有效降低颅脑损伤脑组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达, 提示 AA 可能是通过抑制炎症来发挥对颅脑损伤的保护。本实验的研究结果对进一步开发 AA 为治疗颅脑损伤的药物提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Tweedie D, Rachmany L, Kim DS, *et al*. Mild traumatic brain injury-induced hippocampal gene expressions: The identification of target cellular processes for drug development [J]. *J Neurosci Methods*, 2016, S0165-0270(16)00055-8.
- [2] 赵宇新, 李曼玲, 冯伟红, 等. 积雪草的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(8): 81-84.
- [3] 陈军, 华维一, 孙宏斌. 积雪草酸及其衍生物的生物活性研究概况[J]. 中草药, 2006, 37(3): 458-460.
- [4] Li TJ, Li B, Qin Y, *et al*. The application of asiatic acid and its derivatives in the preparation of antidepressants [P]. CN, 1543964. 2004-11-10.
- [5] Kim SR, Koo KA, Lee MK, *et al*. Asiatic acid derivatives enhance cognitive performance partly by improving acetylcholine synthesis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(10): 1275-1282.
- [6] Cui FG. The application of asiatic acid and its derivatives in treatment of cardio-cerebrovascular disease [P]. CN, 1582946. 2005-02-23.
- [7] 谭福源, 李耀华. 闭合性机械脑损伤实验动物模型[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1994, 21(2): 80-82.
- [8] 方加胜, 袁贤瑞, 刘运生. 实验性大鼠血压分级颅脑损伤模型的建立与研究[J]. 湖南医科大学学报, 1996, 21(5): 385-389.
- [9] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, 4(20): 598-600.
- [10] Savitz SI, Cox CS Jr. Concise review: cell therapies for stroke and traumatic brain injury: targeting microglia [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(3): 537-542.
- [收稿日期] 2016-03-18 [修回日期] 2016-04-01
[本文编辑] 顾文华