

## ·方药研究·

本文引用:欧阳波,刘晓丹,杨筱倩,丁煌,唐三,黄小平,邓常清.冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤神经元的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2020,40(10):1210-1215.

# 冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤神经元的保护作用

欧阳波,刘晓丹,杨筱倩,丁煌,唐三,黄小平\*,邓常清\*

(湖南中医药大学分子病理实验室,中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室,细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室,湖南长沙410208)

**〔摘要〕**目的 探讨冰片配伍黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)和三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)对大鼠脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)后神经元的保护作用。方法 成年雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、冰片组、AST IV组、PNS组、AST IV+PNS组、冰片+AST IV+PNS低剂量组、冰片+AST IV+PNS高剂量组、依达拉奉组。依达拉奉组腹腔注射给药,其他组灌胃给药,2次/d。采用线栓法阻断右侧大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA),缺血2 h再灌注22 h建立CIRI模型。行神经功能缺损评分评定神经功能;尼氏染色计数大鼠缺血侧海马CA1区细胞尼氏体数量;免疫荧光法检测缺血侧海马CA1区神经丝蛋白200(neurofilament-200, NF-200)表达;Western blot法检测 $\alpha$ II-血影蛋白( $\alpha$ II-Spectrin,  $\alpha$ II SP)表达。结果 CIRI后,模型组神经功能缺损评分显著升高( $P<0.01$ ),尼氏体计数显著减少( $P<0.01$ ),海马CA1区NF-200及 $\alpha$ II SP蛋白表达均显著减少( $P<0.01$ )。冰片+AST IV+PNS组可显著降低神经功能缺损评分,增加尼氏体计数及NF-200和 $\alpha$ II SP蛋白表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),冰片+AST IV+PNS配伍的作用强于各药物单用组及AST IV+PNS组。结论 冰片、AST IV、PNS具有抑制CIRI后神经元损伤的作用,3种药物配伍效应增强。

**〔关键词〕** 冰片;黄芪甲苷;三七总皂苷;脑缺血再灌注;神经元

**〔中图分类号〕**R285.5

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.10.007

## Protective Effect of Borneol Combined with Astragaloside IV and Panax Notoginseng Saponins on Neurons after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

OUYANG Bo, LIU Xiaodan, YANG Xiaoqian, DING Huang, TANG San, HUANG Xiaoping\*, DENG Changqing\*

(Molecular Pathology Laboratory of Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Provincial Key Laboratory of Cardio-Brain Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan Provincial University Key Laboratory of Cell Biology and Molecular Technology, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To explore the protective effect of borneol combined with Astragaloside IV and Panax notoginseng saponins on neurons after cerebral ischemia/reperfusion injury (CIRI) in rats. **Methods** The adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, a borneol group, a Astragaloside IV (AST IV) group, a Panax notoginseng saponins (PNS) group, a AST IV + PNS group, a low dose (borneol + AST IV + PNS) group, a high dose (borneol + AST IV + PNS) group and a edaravone group. The edaravone group was intraperitoneally injected and the other groups were

**〔收稿日期〕**2020-07-08

**〔基金项目〕**国家自然科学基金项目(81573875);湖南省高校创新平台开放基金项目(14K068);湖南省自然科学基金项目(2018JJ3382);湖南省教育厅优秀青年项目(18B236);湖南中医药大学“十三五”一级学科基础医学建设项目(No.06)。

**〔作者简介〕**欧阳波,男,在读博士研究生,研究方向:心脑血管疾病防治。

**〔通讯作者〕**\*黄小平,女,教授,硕士研究生导师, E-mail:569229858@qq.com;邓常清,男,教授,博士研究生导师, E-mail:dchangq@sohu.com。

administered by intragastric administration, twice a day. The right middle cerebral artery (MCA) was blocked by wire bolt, and the CIRI model was established after ischemia for 2 hours and reperfusion for 22 hours. The neurological function scores were scored and the number of Nissl bodies in the CA1 area of the right hippocampus of rats were observed by Nissl staining. The protein expressions of neurofilament-200 (NF-200) in the CA1 area of the right brain hippocampus were detected by immunofluorescence. The expressions of  $\alpha$ II-Spectrin ( $\alpha$ II SP) were detected by Western blot. **Results** After CIRI, the score of neural dysfunction in the model group was significantly increased ( $P<0.01$ ), and the number of Nissl body decreased significantly ( $P<0.01$ ). The expressions of NF-200 and  $\alpha$ IISP protein in hippocampus CA1 area were significantly reduced ( $P<0.01$ ). Borneol + AST IV + PNS could significantly reduce the score of nerve function defect, and increased the number of Nissl body, the expression of NF-200 and  $\alpha$ II SP protein ( $P<0.05$  and  $P<0.01$ ). The borneol + AST IV + PNS effect was better than that of single drug and AST IV + PNS. **Conclusion** Borneol, AST IV, and PNS have anti-neuronal damage after cerebral ischemia reperfusion injury, and the effect of the combination of the three drugs was enhanced.

[**Keywords**] borneol; astragaloside IV; panax notoginseng saponins; cerebral ischemia reperfusion; neurons

缺血性脑卒中是严重威胁人类生命健康的疾病,具有高致病率、高致残率和高致死率的特点。中医认为缺血性脑卒中的主要病机是气虚血瘀。中药黄芪配伍三七具有补气活血的功效,能针对脑缺血的主要病机发挥药理作用,是治疗缺血性脑卒中的常用中药。现代药理学研究表明,黄芪的主要有效组分是黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)<sup>[1]</sup>,三七的主要有效组分是三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)<sup>[2]</sup>。在中药复方有效组(成)分配伍研究模式指导下,课题组前期研究表明,AST IV配伍PNS可以通过多环节、多靶点机制发挥抗脑缺血作用<sup>[3-4]</sup>。但是,在脑组织和外周血液之间存在一个复杂的细胞结构屏障——血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)。BBB控制脑脊液与血液之间的物质转运,虽然能阻止大分子有害物质进入脑组织,但是也限制了大分子药物进入脑内发挥药理作用。AST IV及PNS相对分子量均较大,难以透过BBB进入脑组织,这就限制了其发挥药理作用。冰片可“引药上行”,能促进一些大分子药物透过BBB<sup>[5]</sup>。我们以往的研究表明,冰片与AST IV、PNS配伍后,能促进AST IV及PNS的主要成分人参皂苷Rb1、Rg1和三七皂苷R1向大脑皮层富集,尤其是向脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)侧大脑皮层富集<sup>[6]</sup>。进一步研究表明,冰片配伍AST IV和PNS不但增加脑缺血后BBB的通透性,反而对受损BBB具有保护作用,其促进药物透过BBB的作用是通过抑制BBB上药物转运相关的外排蛋白、促进药物摄取蛋白表达而促进药物进入脑组织<sup>[7]</sup>。以上研究提示冰片配伍AST IV和PNS后可促进药物透过BBB入脑,更好地发挥抗脑缺血的作用。本文进一步研究冰片配伍AST IV和PNS对

脑缺血后神经元的保护作用,从而为其合理应用与开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

雄性SPF级SD大鼠,体质量240~260 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产合格证号:43004700037715。饲养于湖南中医药大学动物实验中心,场地许可证号:SKY(湘)2013-0005。实验前适应性喂养5~7 d,给药前禁食12 h,自由饮水。动物的使用符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

### 1.2 主要药物

冰片(左旋龙脑,主要成分为1,7-三甲基-二环庚-2-醇,含量86%,购自湖北俊辉有限公司,批号:20170815);AST IV(纯度 $\geq 98\%$ ,批号:MUST-17022804)、PNS(纯度 $\geq 98\%$ ,批号:MUST-17060601)均购自成都曼思特生物科技有限公司,用时以0.5%羧甲基纤维素钠配成混悬液。依达拉奉注射液(3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮)购自南京先声东元制药有限公司,批号:80-090104,规格10 mg/支(5 mL),用时以生理盐水配成0.4 mg·mL<sup>-1</sup>溶液备用。

### 1.3 主要试剂

甲苯胺蓝染液(谷歌生物,批号G1032);小鼠抗大鼠神经丝蛋白200(neurofilament-200, NF-200)单克隆抗体(美国CST公司,批号2836);小鼠抗大鼠 $\alpha$ II-血影蛋白( $\alpha$ II-Spectrin,  $\alpha$ II SP)单克隆抗体(美国Abcam公司,批号ab11755);兔抗大鼠 $\beta$ -actin多克隆抗体(美国ABclonal公司,批号A7248);HRP标记的山羊抗兔二抗(美国Proteintech公司,批号SA00001-2);HRP标记的山羊抗小鼠二抗(美国AB-

clonal公司,批号 AS003);Cy5 标记山羊抗小鼠 IgG (谷歌生物,批号 GB27301);DAPI 染色液(北京鼎国昌盛生物科技有限公司,批号 GD3410);RIPA 蛋白裂解液(康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2333);蛋白酶抑制剂混合物(批号 P1005)、磷酸酶抑制剂混合物 A(批号 P1082)(碧云天生物技术有限公司);ECL 化学发光液(北京鼎国昌盛生物科技有限公司,批号 GE2301);蛋白 Marker(美国 Thermo-fisher 公司,批号 515683);BCA 蛋白定量试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 K176810E)。

#### 1.4 主要仪器

BX51 光学显微镜(日本 Olympus 公司);Nikon Eclipse C1 正置荧光显微镜、Nikon DS-U3 成像系统(日本 Nikon 公司);EG1160 组织病理包埋仪(德国 leica 公司);Chemiluminescence+化学发光成像分析仪、041BR132283 电泳/转膜装置(美国 Bio-Rad 公司);ELX800 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组与给药

根据以往研究<sup>[8]</sup>,将动物随机分为假手术组、模型组、冰片组( $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、AST IV 组( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、PNS 组( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、AST IV +PNS 组(AST IV  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +PNS  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、低剂量组(冰片  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +AST IV  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +PNS  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、高剂量组(冰片  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +AST IV  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +PNS  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、依达拉奉组( $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。冰片、AST IV、PNS 及其配伍各组于造模前 3 d 灌胃给药,每日 2 次,同时腹腔注射等量生理盐水。依达拉奉组腹腔注射给药,同时灌胃等量 0.5%羧甲基纤维素钠,每日 2 次。假手术组和模型组以 0.5%羧甲基纤维素钠  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量灌胃给药,同时腹腔注射等量生理盐水,每日 2 次。末次给药后 2 h 造模。缺血 2 h 后进行再灌注,再灌注期间同前给药,再灌注后 22 h 进行检测。

### 2.2 右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制备大鼠 CIRI 模型

按以往方法<sup>[9]</sup>制作线栓法 MCAO 局灶性脑缺血模型,阻断 2 h 后,拔出线栓进行再灌注 22 h。假手术组不做插线处理,其他操作同模型组。各组纳入 Bederson 评分<sup>[9]</sup>为 1~3 分的大鼠,剔除评分为 0 分或 4 分的大鼠。

### 2.3 检测指标

2.3.1 神经功能缺损评分 采用 Zea Longa 评分法<sup>[10]</sup>测定神经功能评分。0 分:无明显神经功能缺失症

状;1 分:轻度局灶性神经功能障碍(不能完全伸展左侧前肢);2 分:中度局灶性神经功能障碍(行走时向左侧旋转);3 分:重度神经功能障碍(行走时向左侧倾倒);4 分:极重度神经功能障碍(不能自行行走或意识丧失)。

2.3.2 尼氏染色法测定脑组织 CA1 区病理形态 再灌注 22 h 后,再次麻醉动物,经心脏灌流生理盐水,断头取脑,去除小脑和脑干,4%多聚甲醛固定 24~48 h。自视交叉后 2~4 mm 处,冠状切取 2 mm 厚脑组织(含有海马),常规脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,冠状位切片,片厚  $5 \mu\text{m}$ 。行尼氏染色:依次将切片放入二甲苯 I (20 min)、二甲苯 II (20 min)、无水乙醇 I (5 min)、无水乙醇 II (5 min)、75%酒精(5 min),自来水冲洗。蒸馏水稍洗后,置于 1%甲苯胺蓝染液中 50~60 °C 浸染 30 min。继续蒸馏水稍洗,于 95%酒精中迅速分化,使用无水酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。按照文献<sup>[11]</sup>方法,观察缺血侧海马 CA1 区,取长度 200  $\mu\text{m}$  海马 CA1 区,用 ImageJ 图像分析软件记录尼氏体数量,每张切片计数 3 个不重复视野的尼氏体数量,取均值进行分析。

2.3.3 免疫荧光法检测 NF-200 蛋白表达 按“2.3.2”项方法制成石蜡切片。将石蜡切片脱蜡至水后置于抗原修复缓冲液中行抗原修复;然后滴加 3% BSA 孵育 30 min;再滴加小鼠抗大鼠 NF-200 单克隆抗体一抗(1:500),4 °C 孵育过夜。滴加 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:1 000),于室温孵育 30 min。滴加 Cy5 标记山羊抗小鼠 IgG(1:500)试剂,避光、室温下孵育 10 min。滴加自发荧光淬灭剂 5 min;最后滴加 DAPI 染液,避光、室温下孵育 10 min 后,用抗荧光淬灭封片剂封片。置荧光显微镜下观察并采集右脑缺血侧海马 CA1 区图像,DAPI 激发为蓝光荧光,CY5 激发为粉色荧光。随机取 3 个不重叠高倍视野( $\times 400$ )拍照。Nikon DS-U3 图像采集分析系统测定海马 CA1 区 NF-200 免疫荧光强度,以荧光强度表示蛋白的表达。

2.3.4 Western blot 检测  $\alpha$ II-Spectrin 蛋白的表达 取患侧视交叉后 2~4 mm 脑组织 50 mg,提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白量。每个样本取 80  $\mu\text{g}$  蛋白,100 °C 水浴 10 min 使蛋白变性,SDS-PAGE 电泳 90 min,200 mA 转膜 2 h,5%脱脂牛奶封闭 1 h,分别加入小鼠抗大鼠  $\alpha$ II-Spectrin 单克隆抗体(1:1 000)、兔抗大鼠  $\beta$ -actin 多克隆抗体(1:1 000),于 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次。再分别加羊抗小鼠二抗(1:8 000)或羊抗兔二抗(1:5 000),于 37 °C 孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后加 ECL 化学发光剂显



影。用 Image Lab 图像分析软件测定目的条带的积分光密度值(integral optical density, IOD),以目的条带的IOD值与β-actin条带 IOD 值的比值作为该目的蛋白相对表达量。

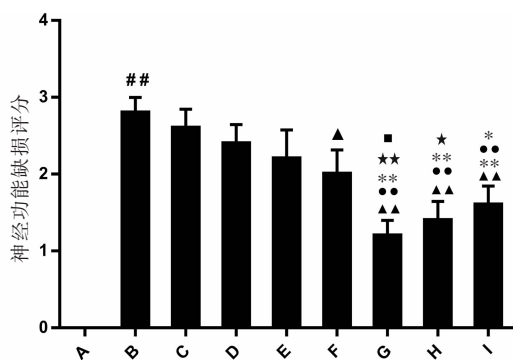
### 2.4 统计分析

数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,以 SPSS 26.0 软件进行分析。先将各组数据进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者用 LSD 检验,方差不齐时先将数据进行对数转换,使之方差齐,再同上进行分析。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对神经功能缺损评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠出现神经功能障碍体征,神经功能缺损评分显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,AST IV+PNS 组、低剂量组、高剂量组、依达拉奉组神经功能缺损评分显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),冰片组、AST IV 组、PNS 组神经功能缺损评分差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与 AST IV 组、PNS 组比较,AST IV+PNS 组神经功能缺损评分差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与冰片组、AST IV 组、PNS 组、AST IV+PNS 组比较,低剂量组神经功能缺损评分显著降低( $P<0.05$  和  $P<0.01$ );与冰片组、AST IV 组、PNS 组比较,高剂量组神经功能缺损评分显著降低( $P<0.05$  和  $P<0.01$ ),但与 AST IV+PNS 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。低剂量组和高剂量组比较,神经功能缺损评分差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.冰片组;D.AST IV;E.PNS;F.AST IV+PNS;G.低剂量组;H.高剂量组;I.依达拉奉组。与假手术组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ;与冰片组比较,<sup>●●</sup> $P<0.01$ ;与 AST IV 比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 PNS 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 AST IV+PNS 组比较,<sup>■</sup> $P<0.05$

图 1 各组神经功能缺损评分比较( $\bar{x}\pm s$ , $n=5$ )

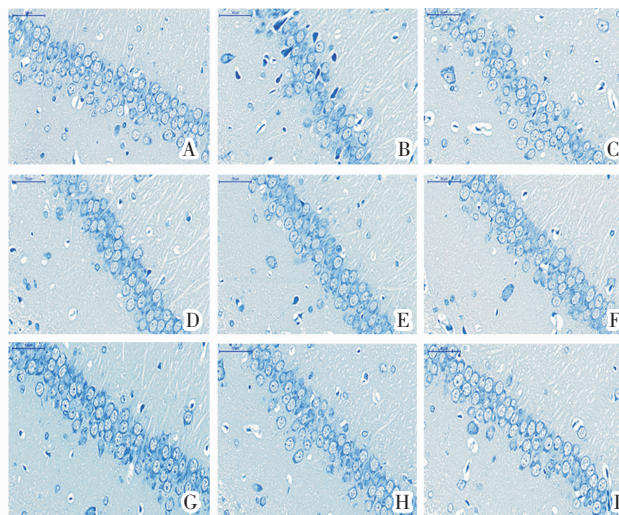
### 3.2 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对海马 CA1 区尼氏体数量的影响

假手术组海马 CA1 区神经元胞质内可见深蓝色斑块状尼氏体。与假手术组比较,模型组尼氏体数量显著减少( $P<0.01$ )。与模型组比较,冰片组、AST IV 组、PNS 组、AST IV+PNS 组、低剂量组、高剂量组、依达拉奉组尼氏体数量显著增加( $P<0.01$ )。与 AST IV 组、PNS 组比较,AST IV+PNS 组尼氏体数量显著增加( $P<0.05$  和  $P<0.01$ )。与冰片组、AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较,低剂量组尼氏体数显著增加( $P<0.01$ )。与冰片组、AST IV 组、PNS 组比较,高剂量组尼氏体数显著增加( $P<0.01$ ),但与 AST IV+PNS 组比较,高剂量组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。低剂量组和高剂量组比较,尼氏体数量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1 和图 2。

表 1 各组海马 CA1 区尼氏体数量比较( $\bar{x}\pm s$ , $n=5$ )

组别	尼氏体数/200 $\mu\text{m}$
假手术组	48.2±3.1
模型组	29.6±2.1 <sup>#</sup>
冰片组	34.6±1.5 <sup>▲▲</sup>
AST IV 组	35.6±1.8 <sup>▲▲</sup>
PNS 组	37.6±2.2 <sup>▲▲</sup>
AST IV+PNS 组	39.2±1.6 <sup>▲▲***</sup>
低剂量组	43.4±1.5 <sup>▲▲●●***■</sup>
高剂量组	42.0±1.6 <sup>▲▲●●***</sup>
依达拉奉组	40.4±2.6 <sup>▲▲</sup>

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ;与冰片组比较,<sup>●●</sup> $P<0.01$ ;与 AST IV 比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与 PNS 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与 AST IV+PNS 组比较,<sup>■</sup> $P<0.01$

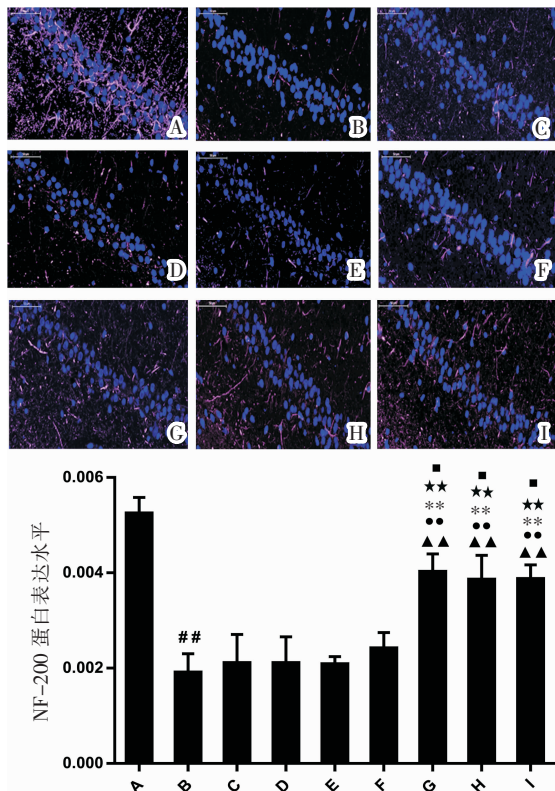


注:A.假手术组;B.模型组;C.冰片组;D.AST IV;E.PNS;F.AST IV+PNS;G.低剂量组;H.高剂量组;I.依达拉奉组

图 2 各组海马 CA1 区尼氏体计数图( $\times 400$ )

### 3.3 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对海马 CA1 区 NF-200 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组海马 CA1 区 NF-200 蛋白表达显著减少( $P<0.01$ )。与模型组比较,冰片组、AST IV 组、PNS 组、AST IV+PNS 组海马 CA1 区 NF-200 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),低剂量组、高剂量组、依达拉奉组海马 CA1 区 NF-200 表达显著增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与 AST IV 组、PNS 组比较,AST IV+PNS 组海马 CA1 区 NF-200 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与冰片组、AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较,低剂量组和高剂量组海马 CA1 区 NF-200 表达均显著增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。低剂量组和高剂量组比较,海马 CA1 区 NF-200 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 3。



注:A.假手术组;B.模型组;C.冰片组;D.AST IV;E.PNS;F.AST IV+PNS;G.低剂量组;H.高剂量组;I.依达拉奉组。DAPI:蓝色;NF-200:粉红色。与假手术组比较,## $P<0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与冰片组比较,●● $P<0.01$ ;与 AST IV 比较,\*\* $P<0.01$ ;与 PNS 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 AST IV+PNS 组比较,■ $P<0.05$

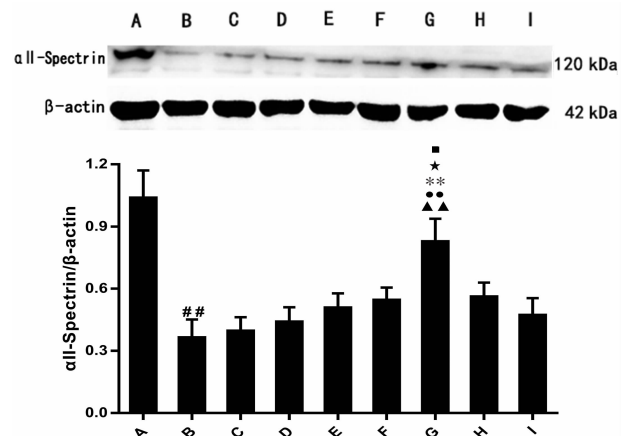
图 3 各组海马 CA1 区 NF-200 蛋白表达的比较

( $\bar{x}\pm s, n=5, \times 400$ )

### 3.4 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对 $\alpha$ II-Spectrin 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组  $\alpha$  II-Spectrin 表达显

著减少( $P<0.01$ )。与模型组比较,冰片组、AST IV 组、PNS 组、AST IV+PNS 组、高剂量组、依达拉奉组  $\alpha$  II-Spectrin 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),低剂量组  $\alpha$  II-Spectrin 表达显著增加( $P<0.01$ )。与 AST IV 组、PNS 组比较,AST IV+PNS 组  $\alpha$  II-Spectrin 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与冰片组、AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较,低剂量组  $\alpha$  II-Spectrin 表达显著增加( $P<0.05$  和  $P<0.01$ ),但高剂量组  $\alpha$  II-Spectrin 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与高剂量组比较,低剂量组  $\alpha$  II-Spectrin 的表达组显著增加( $P<0.05$ )。见图 4。



注:A.假手术组;B.模型组;C.冰片组;D.AST IV;E.PNS;F.AST IV+PNS;G.低剂量组;H.高剂量组;I.依达拉奉组。注:与假手术组比较,## $P<0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与冰片组比较,●● $P<0.01$ ;与 AST IV 比较,\*\* $P<0.01$ ;与 PNS 组比较,\* $P<0.05$ ;与 AST IV+PNS 组比较,■ $P<0.05$

图 4 各组  $\alpha$  II-Spectrin 蛋白表达的比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

## 4 讨论

CIRI 的病理是一个复杂的损伤级联反应。当脑缺血缺氧后,脑组织能量代谢障碍、兴奋性氨基酸毒性、氧化/硝化应激损伤、 $\text{Ca}^{2+}$ 超载、炎症反应等一系列病理因素相互作用,形成恶性循环,损伤神经细胞和血脑屏障,加重脑水肿,导致脑组织不可逆性损伤<sup>[12-13]</sup>。神经元是中枢神经系统的主要成分之一,CIRI 后可导致神经元损伤,引起神经功能障碍。因而,脑缺血后在尽快恢复脑血流的同时,减轻再灌注后神经元损伤、恢复神经功能对于缺血性脑损伤的治疗具有重要意义。

尼氏体是分布在神经元除轴突和轴丘以外胞浆中的一种物质,是神经元胞体细胞质的特征结构<sup>[14]</sup>。当神经元变性死亡时,尼氏体可出现数量及位置的

变化,甚至溶解,故尼氏体数量可作为神经元胞体损伤的指标<sup>[15]</sup>。NF-200 是成熟神经元特有的细胞骨架蛋白,是神经轴突的重要组成部分<sup>[16-17]</sup>。YU 等<sup>[18]</sup>研究表明,大鼠缺血区脑组织中 NF-200 的表达在脑卒中急性期显著降低。故 NF-200 可作为神经元轴突损伤的标志。 $\alpha$ II-Spectrin 是神经元的一种重要的蛋白质成分,大量分布在轴突和突触前终端<sup>[19]</sup>。在短暂性脑缺血、外伤性脑损伤时,Calpain-1 和 Caspase-3 被激活,选择性水解神经元的结构蛋白  $\alpha$ II-Spectrin,使神经元的结构蛋白降解,细胞结构完整性受损,引起轴突运输障碍,从而造成神经元损伤甚至死亡<sup>[20]</sup>。故  $\alpha$ II-Spectrin 表达可以反映神经元的轴突和突触损伤程度。研究表明,CIRI 后,大鼠出现明显的神经功能障碍,AST IV+PNS、低剂量和高剂量组均能降低 CIRI 后神经功能缺损评分;冰片、AST IV、PNS、AST IV+PNS、低剂量和高剂量组均可增加尼氏体数量;冰片+AST IV+PNS 组可上调 NF-200 蛋白表达,上调  $\alpha$ II-Spectrin 表达。提示冰片配伍 AST IV 和 PNS 能减轻神经元胞体、树突及轴突损伤,3 种药物合用组的效应显著强于各药物单用组和 AST IV+PNS 组,表明冰片与 AST IV、PNS 配伍能减轻神经元损伤,改善 CIRI 后的神经功能障碍。这可能与冰片能促进 AST IV、PNS 透过 BBB 入脑,增强药物抗 CIRI 的效应有关。

综上所述,冰片、AST IV、PNS 具有抗 CIRI 后神经元损伤的作用,且冰片配伍 AST IV+PNS 后,对脑缺血后具有比 AST IV 配伍 PNS 更好的神经元保护作用,3 种药物配伍的作用增强。目前冰片配伍 AST IV 和 PNS 针对神经元细胞的保护作用探究只是一个初步的认识,而冰片配伍 AST IV 和 PNS 增强抗缺血性脑损伤作用的确切机制及药物的量效关系尚有待进一步阐明。

## 参考文献

[1] HUANG X P, TAN H, CHEN B Y, et al. Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(4): 449-454.

[2] LI H, DENG C Q, CHEN B Y, et al. Total saponins of *Panax notoginseng* modulate the expression of caspases and attenuate apoptosis in rats following focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 121(3): 412-418.

[3] 李静娴,杨筱倩,唐 标,等.黄芪甲苷和三七总皂苷配伍抗大鼠脑缺血再灌注损伤及其药动学的研究[J].*中国中药杂志*,2017,42(19): 3786-3794.

[4] HUANG X P, TAN H, CHEN B Y, et al. Combination of total *Astragalus* extract and total *Panax notoginseng* saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral is-

chemia-reperfusion in mice[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2017, 23(6): 445-452.

[5] 吴俊杰,汪宏锦,杨 帅,等.冰片对梓醇及葛根素透过局灶性脑缺血模型大鼠血脑屏障作用的研究[J].*中国中药杂志*,2016,41(21): 3988-3995.

[6] 刘晓丹,杨筱倩,唐 三,等.冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响[J].*中草药*, 2019,50(7):1649-1656.

[7] 唐 三,丁 煌,杨筱倩,等.冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障转运蛋白的影响[J].*中草药*,2019,50(18): 4389-4397.

[8] 丁 煌,唐 三,杨筱倩,等.冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷对脑缺血/再灌注后血脑屏障通透性的影响[J].*中国药理学通报*,2019,35(11):1516-1523.

[9] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.

[10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[11] 朱 杏,唐 振,向希盈,等.Toll 样受体 4 抑制剂对新生大鼠脑缺血后海马神经元及树突棘的影响[J].*第三军医大学学报*, 2020,42(8):815-821.

[12] 孔令提,宋春丽,石庆平.人参皂苷对脑缺血再灌注损伤的保护机制研究现状[J].*中国药房*,2019,30(17):2445-2448.

[13] 杨鹏飞,宋修云,陈乃宏.三七总皂苷抗脑缺血再灌注损伤的药理研究进展[J].*药学报*,2016,51(7):1039-1046.

[14] 刘同慎,李 冰,罗慧琼,等.尼氏体的甲苯胺蓝组织块染色法[J].*解剖学杂志*,2018,41(4):474-476.

[15] ZHAO B B, LONG Q H, WANG C Y, et al. Protective effects of Liu Wei Di Huang Wan on the liver, orbitofrontal cortex nissl bodies, and neurites in MSG+PH-induced liver regeneration rat model[J]. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2018, 2018: 9090128.

[16] YUAN A, RAO M V, VEERANNA, et al. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2017, 9(4).

[17] MAGES B, ALEITHE S, ALTMANN S, et al. Impaired neurofilament integrity and neuronal morphology in different models of focal cerebral ischemia and human stroke tissue[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12: 161.

[18] YU X, WU H, ZHAO Y, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells alleviate brain white matter injury via the enhanced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in focal cerebral ischemic rats[J]. *Brain Research*, 2018, 1680: 127-136.

[19] REEVES T M, GREER J E, VANDERVEER A S, et al. Proteolysis of submembrane cytoskeletal proteins ankyrin-G and  $\alpha$ I-spectrin following diffuse brain injury: a role in white matter vulnerability at Nodes of Ranvier[J]. *Brain Pathology*, 2010, 20(6):1055-1068.

[20] DEDOMICIS K E, HWANG H, CARTAGENA C M, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers are associated with glial fibrillary acidic protein and  $\alpha$ II-spectrin breakdown products in brain tissues following penetrating ballistic-like brain injury in rats[J]. *Frontiers in Neurology*, 2018, 9: 490.