

齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的保护作用

韩雨薇, 刘秀娟, 高 阳, 李晓明*

沈阳军区总医院 神经外科, 辽宁 沈阳 10016

摘要: **目的** 探讨齐墩果酸对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用, 阐释其作用机制。**方法** 72 只大鼠随机分为假手术组、模型组和齐墩果酸 10、20 mg/kg 组, 每组 18 只。采用颈内动脉穿刺法建立大鼠蛛网膜下腔出血模型, 并在造模 1 h 后给药, 24 h 后进行神经功能损伤评分; 检测脑水含量、脑伊文思蓝浸出; 并利用 Western blotting 法检测脑组织 VE-cadherin、p120-catenin 蛋白的表达量。**结果** 齐墩果酸 (20 mg/kg) 可有效改善神经功能损伤 ($P < 0.01$); 降低脑水肿和脑血管通透性 ($P < 0.01$); 增加 VE-cadherin、p120-catenin 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。**结论** 齐墩果酸对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤具有显著的保护作用, 改善脑水肿, 其作用机制可能与增加脑血管内皮粘附连接蛋白的表达有关。

关键词: 齐墩果酸; 蛛网膜下腔出血; 神经功能损伤评分; 脑水肿; VE-cadherin 蛋白; 粘附连接

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)05-0762-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.05.002

Protection of oleanolic acid on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rat

HAN Yu-wei, LIU Xiu-juan, GAO Yang, LI Xiao-ming

Department of Neurology, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 10016, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of oleanolic acid on early brain injury after subarachnoid hemorrhage and explain its mechanism. **Methods** SD rats (72) were divided into 4 groups: Sham, model, and oleanolic acid groups (10 and 20 mg/kg), and each group had 18 rats. The endovascular puncture model was used to induce subarachnoid hemorrhage. Rats were administered with the according drugs after 1 h of model established. Neurological score, brain water content and blood-brain barrier were evaluated after 24 h. The protein expression of VE-cadherin and p120-catenin were determined by Western blotting. **Results** Oleanolic acid (20 mg/kg) could significantly improve neurological scores ($P < 0.01$), reduced brain water content and blood-brain barrier permeability ($P < 0.01$), and increased the levels of VE-cadherin and p120-catenin ($P < 0.01$). **Conclusion** Oleanolic acid could protect against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats and improve brain edema. The mechanism may be related to the increase of expression of endothelial adhesion protein.

Key words: oleanolic acid; subarachnoid hemorrhage; neurological score; brain edema; VE-cadherin protein; adherent junctions

蛛网膜下腔出血是一种常见的高致死率出血性脑血管病^[1]。蛛网膜下腔出血的死亡率高达 50%, 近年来发病率呈上升趋势, 严重威胁人类健康和生命^[2-3]。蛛网膜下腔出血患者中, 早期脑损伤是最常见的致残、致死原因, 其中血脑屏障破坏是脑损伤的重要环节^[4-6]。在生理状态下, 粘附连接在血管内皮细胞-细胞间连接中起主导作用。粘附连接是由相邻两细胞上 VE-cadherin 相互连接而成, 同时其

近膜区与 p120-catenin 相连。VE-cadherin 与 p120-catenin 在血管内皮中特异性表达, 并且稳定结合是维持粘附连接的关键^[7-10]。齐墩果酸是一个广泛存在于食品和药用植物中的五环三萜类化合物, 具有潜在的抗炎和神经保护作用^[11-13]。本研究采用动脉刺破方法建立大鼠蛛网膜下腔出血模型, 考察齐墩果酸对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的治疗效果以及是否通过稳定血脑屏障减轻早期脑损伤, 改

收稿日期: 2016-11-04

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目 (2015225022)

作者简介: 韩雨薇 (1990—), 女, 辽宁抚顺人, 药师, 硕士, 研究方向为药理学。Tel: (024)28851284 E-mail: hanmendi@163.com

*通信作者: 李晓明 (1970—), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 副主任医师。Tel: (024)28851284 E-mail: lxm5668sw@yahoo.com

善神经功能。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

齐墩果酸购自天津士兰科技有限公司, 质量分数为 98%, 批号为 20150311; VE-Cadherin 抗体购自 Santa Cruz 公司, 货号 sc-6458; p120-catenin 抗体购自 Bioworld, 货号 BS6572; HRP 标记的兔抗购自 Santa Cruz 公司, 货号 sc-2004; HRP 标记的羊抗购自 Santa Cruz 公司, 货号 sc-2020; BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天公司, 货号 P0010; RIPA 裂解液购自碧云天公司, 货号 P0013B; 5×loading buffer 购自碧云天公司, 货号 P0015。

1.2 实验动物和分组

雄性清洁级 SD 大鼠, 体质量 280~350 g, 购自沈阳药科大学, 实验动物生产许可证号 SCXK(辽) 2014-0002。动物饲养于 18~22 °C 恒温室中, 12 h/12 h 光暗周期, 实验前自由进食进水。动物实验严格按照“National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”标准进行, 尽可能减轻动物痛苦并减少动物使用数量。

72 只大鼠随机分为假手术组、模型组和齐墩果酸 10、20 mg/kg 组, 每组 18 只。术前禁食, 自由饮水, 在模型制作完成后 1 h 后 ig 给药, 24 h 后进行取材。

1.3 模型建立

手术前, 10%水合氯醛腹腔麻醉, 于颈部正中纵向切口后, 分离出颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉, 结扎颈外动脉远端, 并以手术线临时阻断颈总动脉和颈内动脉, 在颈外动脉端用手术剪刀剪一小口, 将鱼线(直径 0.261 mm)从小口送入颈外动脉, 推进至大鼠大脑前动脉和中动脉分叉处, 并穿破动脉建立蛛网膜下腔出血模型。假手术组中进行类似的操作, 但不穿破动脉^[14]。

1.4 体质量百分率测定

在术前和术后 24 h 分别称量大鼠体质量, 并计算其术后体质量百分率。

体质量百分率=术后体质量/术前体质量

1.5 神经功能缺失的评价

记录死亡率, 并根据 Sugawara 等^[15]评分标准对蛛网膜下腔出血 24 h 后的各组大鼠进行神经功能缺陷评分, 即对大鼠自发性活动、四肢运动对称、前肢伸展、攀登、双侧躯干的触碰反应以及触须反应 6 个项目进行测试, 并给予从 0~3 分的评价。各项

之和作为总评分, 得分越低, 表明神经功能损伤越严重。

1.6 脑组织含水率测定

每组动物各取 6 只, 造模 24 h 后, 取出大鼠脑组织, 将其切分为左右半脑和小脑 3 个部分, 擦去表面血迹, 分别称量其湿质量后, 放入 110 °C 烘箱内烘干 72 h。称量其干质量, 计算其脑含水率。

脑含水率=(湿质量-干质量)/湿质量

1.7 脑血管通透性测定

每组动物各取 6 只, 于取材前 1 h 尾 iv 给予 2% 伊文思蓝溶液 5 mL/kg, 全身循环 1 h 后, 进行生理盐水灌注, 迅速取出脑组织, 将其切分为左右半脑和小脑, 立即称定质量。按 10 mL/g 的体积将组织浸润到甲酰胺溶液中, 60 °C 恒温孵育 24 h, 待伊文思蓝浸出, 收集浸出液, 于液酶标仪 620 nm 处测定其吸光度(A)值。

1.8 Western Blotting 检测 VE-cadherin、p120-catenin 的表达

大鼠过量麻醉致死, 取大鼠患侧大脑皮层, 称定质量后加入 1 mL 裂解液(含 PMSF), 匀浆裂解 30 min 后, 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清即为蛋白溶液; BCA 法测定蛋白浓度, 按照蛋白溶液体积的 1/4 加入 5×loading buffer 混合, 100 °C 煮沸 5 min 冷却后-70 °C 保存; 用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 向加样孔中加入 40 μg 总蛋白样品, 恒流转至 PVDF 膜; 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h; 一抗 VE-cadherin 的稀释比例为 1:200, β-actin 一抗的稀释比例为 1:1 000, 4 °C 过夜; 将 HRP 标记的二抗用 TBST 稀释, 与膜室温孵育 1 h; TBST 洗后经 Pro-light HRP 化学发光检测试剂盒发光, 用 X-ray 显影。

1.9 免疫荧光染色

取大鼠脑组织, 放入 4%多聚甲醛中室温固定 24 h, 包埋蜡块, 切片厚度为 4 μm。石蜡切片脱蜡至水, 柠檬酸热修复 15 min, 3%过氧化氢孵育, 5% BSA 封闭, 滴加一抗 VE-cadherin (1:50), CD31 (1:50), 4 °C 孵育过夜, 滴加荧光标记的二抗, 室温孵育 1 h, DAPI 复染细胞核, 于荧光显微镜下观察。

1.10 统计学处理

采用 GraphPad Prism 4.0 软件进行统计学处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据均采用单因素方差分析进行比较; 组间比较采用 one-way

ANOVA 分析。

2 结果

2.1 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠体质量的影响

蛛网膜下腔出血成模后, 大鼠体质量显著降低 ($P<0.01$), 而齐墩果酸 20 mg/kg 能够抑制蛛网膜下腔出血大鼠体质量降低 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血 24 h 后大鼠体质量的影响
Table 1 Effect of oleanolic acid on body weight loss of subarachnoid hemorrhage in rat

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量百分率/%
假手术	—	99.34
模型	—	91.75 ^{###}
齐墩果酸	10	94.21
	20	97.78 [*]

与假手术组比较: ^{###} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$

^{###} $P<0.01$ vs sham group; ^{*} $P<0.05$ vs model group

2.2 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠神经功能损伤的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠均出现了严重的神经损伤症状 ($P<0.001$), 而齐墩果酸 20 mg/kg 能够显著改善大鼠的神经功能 ($P<0.01$), 见表 2。

表 2 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血 24 h 后大鼠神经功能损伤的影响
Table 2 Effects of oleanolic acid on injury of neural function after 24 h of subarachnoid hemorrhage in rat

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分/分
假手术	—	18.00
模型	—	7.25 ^{###}
齐墩果酸	10	8.67
	20	12.00 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.001$ vs sham group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

2.3 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑水肿的影响

与假手术比较, 模型组左半球、右半球、小脑含水率分别增加了 8.0%、9.7%、6.6%, 而齐墩果酸 20 mg/kg 能够显著降低脑含水率 ($P<0.01$), 见表 3。

2.4 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑血管通透性的影响

蛛网膜下腔出血模型建模后, 伊文思蓝浸出明显增加, 说明脑血管通透性增强, 齐墩果酸 20 mg/kg 降低脑内伊文思蓝含量 ($P<0.01$), 对脑血管通透性具有显著的改善作用, 见表 4。

表 3 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑组织含水率的影响

Table 3 Effects of oleanolic acid on brain water content in rats after subarachnoid hemorrhage

组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	含水率/%		
		左脑	右脑	小脑
假手术	—	73.49	75.72	73.58
模型	—	81.47 ^{###}	85.41 ^{###}	80.21 ^{###}
齐墩果酸	10	78.10	80.85	77.44
	20	75.62 ^{**}	78.50 ^{**}	76.02 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.001$ vs sham group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

表 4 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑血管通透性的影响

Table 4 Effects of oleanolic acid on brain EB content in rats after subarachnoid hemorrhage

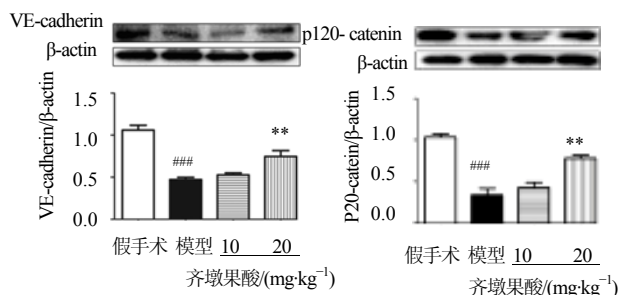
组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	伊文思蓝/(μg·kg ⁻¹)		
		左脑	右脑	小脑
假手术	—	0.72	0.78	0.62
模型	—	1.85 ^{###}	1.95 ^{###}	1.76 ^{###}
齐墩果酸	10	1.57	1.69	1.47
	20	1.29 ^{**}	1.32 ^{**}	1.19 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.001$ vs sham group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

2.5 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑血管内皮粘附连接蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组中 VE-cadherin、p120-catenin 蛋白表达显著降低 ($P<0.001$)。与模型组比较, 齐墩果酸 20 mg/kg 能够显著恢复这种变化, 增加 VE-cadherin、p120-catenin 的表达 ($P<0.01$), 见图 1。



与假手术组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.001$ vs sham group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

图 1 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑组织 VE-cadherin 和 p120-catenin 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of oleanolic acid on protein expression of VE-cadherin and p120-catenin in the cerebral cortex after subarachnoid hemorrhage

2.6 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑血管内皮 VE-cadherin 分布的影响

假手术组 VE-cadherin 呈连续丝线状排列, 模型组 VE-cadherin 蛋白轮廓不清, 丝线状断裂, 而齐墩果酸 20 mg/kg 能够减轻其断裂情况的发生, 与模型组比较改善显著, 见图 2。

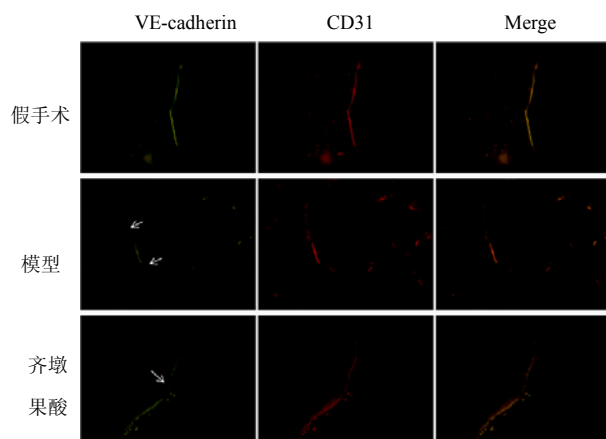


图 2 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑血管内皮 VE-cadherin 分布破坏的影响

Fig. 2 Effect of oleanolic acid on VE-cadherin distribution of subarachnoid hemorrhage in rat

3 讨论

蛛网膜下腔出血是一种常见的出血性脑血管疾病, 多见于动脉瘤的破裂。蛛网膜下腔出血发生后可引起一系列的并发症, 如脑水肿、脑血管基底动脉痉挛、肺水肿等。其中脑水肿是蛛网膜下腔出血后较严重的并发症, 也是蛛网膜下腔出血病人致死致残、预后差的主要原因之一^[16]。齐墩果酸具有多种生物活性, 有潜在的抗炎和神经保护作用^[11-13]。本研究结果显示, 齐墩果酸 20 mg/kg 对于蛛网膜下腔出血大鼠的神经功能损伤具有显著的改善作用。大鼠蛛网膜下腔出血后 24 h 脑含水率和伊文思蓝渗出明显增加, 而齐墩果酸给药后大鼠脑含水率和伊文思蓝渗透率明显降低, 这说明齐墩果酸能有效地减轻蛛网膜下腔出血引起的脑水肿和脑血管通透性的破坏。

脑血管内皮屏障主要与脑血管内皮细胞间通透性相关。其中主要依靠粘附连接维持脑血管屏障功能稳定。在生理状态下, 黏附连接在内皮细胞-细胞间连接中起主导作用, 保持肺内皮细胞的完整性。黏附连接是由相邻两细胞膜上 VE-cadherin 相互连接形成, VE-cadherin 的 C 末端与 β -catenins 和 α -catenins 相连, 同时其近膜区与 p120-catenin 相连。

VE-cadherin 与 p120-catenin 的稳定结合是维持黏附连接的关键。一旦 p120-catenin 与 VE-cadherin 解聚, 暴露出结合位点, VE-cadherin 将与 AP-2 结合, 从胞膜转位进入胞浆, 被网格蛋白内吞, 导致细胞-细胞间黏附连接破坏^[17]。并且, Xu 等^[10]研究发现, 在大鼠蛛网膜下腔出血模型中, VE-cadherin 表达显著减低, 粘附连接破坏, 通透性显著增加, 加重脑水肿的发生。本研究针对齐墩果酸对蛛网膜下腔出血后大鼠脑组织中 VE-cadherin、p120-catenin 的表达变化进行了考察, 发现假手术组 VE-cadherin、p120-catenin 蛋白表达明显, 在蛛网膜下腔出血组大鼠脑组织中两者表达显著减少, 而 20 mg/kg 齐墩果酸可以改善蛛网膜下腔出血后大鼠脑组织中 VE-cadherin、p120-catenin 表达降低的情况, 增加其蛋白的表达, 进而改善脑水肿, 对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤有保护作用。

综上所述, 齐墩果酸能够减轻蛛网膜下腔出血后早期脑水肿, 并改善神经功能损伤, 在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤治疗中有良好的应用前景。本研究为阐述齐墩果酸改善蛛网膜下腔出血早期脑损伤中脑水肿的可能作用机制提供了参考依据。

参考文献

- [1] Muñoz-Sánchez M A, Egea-Guerrero J J, Revuelto-Rey J, et al. A new percutaneous model of subarachnoid haemorrhage in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 211(1): 88-93.
- [2] Sehba F A, Pluta R M, Zhang J H. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 43(1): 27-40.
- [3] Dority J S, Oldham J S. Subarachnoid hemorrhage: an update [J]. *Anesthesiol Clin*, 1932; 34(3): 577-600.
- [4] Chen S, Feng H, Sherchan P, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115(2): 64-91.
- [5] Li Z, Liang G, Ma T, et al. Blood-brain barrier permeability change and regulation mechanism after subarachnoid hemorrhage [J]. *Metab Brain Dis*, 2015; 30(2): 597-603.
- [6] Yan J, Li L, Khatibi NH, et al. Blood-brain barrier disruption following subarachnoid hemorrhage may be facilitated through PUMA induction of endothelial cell apoptosis from the endoplasmic reticulum [J]. *Exp Neurol*, 2011, 230(2): 240-247.
- [7] Kazuki Y, Akita M, Kobayashi K, et al. Thalidomide-induced limb abnormalities in a humanized CYP3A mouse model [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21419.

- [8] El-Aarag B Y, Kasai T, Zahran M A, *et al.* In vitro anti-proliferative and anti-angiogenic activities of thalidomide dithiocarbamate analogs [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2): 283-292.
- [9] Gal J, Cintas P. Early history of the recognition of molecular biochirality [J]. *Top Curr Chem*, 2013, 333: 1-40.
- [10] Xu T, Zhang WG, Sun J, *et al.* Protective effects of thrombomodulin on microvascular permeability after subarachnoid hemorrhage in mouse model [J]. *Neuroscience*, 2015, 299: 18-27.
- [11] Pollier J, Goossens A. Oleanolic acid [J]. *Phytochemistry*, 2012, 77(5): 10-15.
- [12] Córdova C, Gutiérrez B, Martínez-García C, *et al.* Oleanolic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis [J]. *Plos One*, 2014, 9(4): e91282.
- [13] Wang X, Li Y L, Wu H, *et al.* Antidiabetic effect of oleanolic acid: a promising use of a traditional pharmacological agent [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(7): 1031-1040.
- [14] Bederson J B, Germano I M, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat [J]. *Stroke*, 1995, 26(6): 1086-1091.
- [15] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, *et al.* A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 167(2): 327-334.
- [16] Zhang C, Lee J Y, Keep R F, *et al.* Brain edema formation and complement activation in a rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2013, 118: 157-161.
- [17] Alcaide P, Newton G, Auerbach S, *et al.* p120-Catenin regulates leukocyte transmigration through an effect on VE-cadherin phosphorylation [J]. *Blood*, 2008, 112(7): 2770-2779.