

益气活血通络方下调 TGF- β /ERK 信号通路对蛛网膜下腔出血大鼠的神经保护作用

陈 华¹, 申 遥², 张占军¹

1. 焦作市人民医院 麻醉手术中心, 河南 焦作 454002

2. 焦作市人民医院 消毒供应中心, 河南 焦作 454002

摘要: **目的** 探讨益气活血通络方对蛛网膜下腔出血大鼠 TGF- β /ERK 信号通路的影响及神经保护作用。**方法** SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 益气活血通络方 5、10、15 g/kg 组和尼莫地平组, 除假手术组外, 其余各组建立蛛网膜下腔出血模型大鼠, 分组处理后, 各组大鼠进行神经功能缺损评分; 以伊文思蓝染料外渗实验检测大鼠血脑屏障通透性; 以 TUNEL 染色检测大鼠脑皮质神经细胞凋亡情况; 以酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平; 以蛋白免疫印迹法检测大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白 TGF- β 1、p-ERK/ERK 表达情况。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠神经功能缺损评分、伊文思蓝渗出量、TUNEL 阳性细胞比例、血清 IL-6、TNF- α 水平、TGF- β 1 表达、p-ERK/ERK 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 益气活血通络方 5、10、15 g/kg 组和尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分、伊文思蓝渗出量、TUNEL 阳性细胞比例、血清 IL-6、TNF- α 水平、TGF- β 1 表达和 p-ERK/ERK 水平明显降低 ($P < 0.05$), 且益气活血通络方各组呈剂量相关性, 益气活血通络方 15 g/kg 组与尼莫地平组相比, 各指标比较差异无统计学意义。**结论** 益气活血通络方可下调 TGF- β /ERK 信号, 保护蛛网膜下腔出血大鼠神经功能。

关键词: 益气活血通络方; 蛛网膜下腔出血; TGF- β /ERK 信号; 神经保护

中图分类号: R966; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)05-0836-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.05.003

Neuroprotective effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on TGF- β /ERK signal pathway in rats with subarachnoid hemorrhage

CHEN Hua¹, SHEN Yao², ZHANG Zhan-jun¹

1. Anesthesia Operation Center, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454002, China

2. Sterilization Supply Center, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454002, China

Abstract: **Objective** To investigate the neuroprotective effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on TGF- β /ERK signal pathway in rats with subarachnoid hemorrhage. **Methods** SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Yiqi Huoxue Tongluo Prescription Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 5, 10, and 15 g/kg groups, and nimodipine group. In addition to the sham operation group, the other rats were established to establish subarachnoid hemorrhage model, after group treatment, the rats in each group were assessed for neurological deficit. Evans blue extravasation test was used to detect the permeability of BBB. TUNEL staining was used to detect the apoptosis of neurons. The levels of serum TNF- α and IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expressions of TGF- β 1 and p-ERK/ERK in the cortex of rats were detected by Western blotting. **Results** Compared with the sham group, the neurological deficit score, seepage amount of Evans blue, proportion of TUNEL positive cell, levels of serum IL-6 and TNF- α , expression of TGF- β 1, and p-ERK/ERK of rats in the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the neurological deficit score, seepage amount of Evans blue, proportion of TUNEL positive cell, levels of serum IL-6 and TNF- α , expression of TGF- β 1 and p-ERK/ERK of rats in the Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 5, 10, and 15 g/kg groups and nimodipine group were decreased ($P < 0.05$), and Yiqi Huoxue Tongluo Prescription groups were dose-dependent, in addition, there was no significant difference in the indexes between Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 15 g/kg group and nimodipine group. **Conclusion** Yiqi Huoxue Tongluo Prescription can down regulate TGF- β /ERK signal and protect

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 河南省科技研发专项项目 (162102310120)

作者简介: 陈 华, 研究方向为神经内外科、麻醉等。E-mail: cwhai0423@163.com

the nerve function of rats with subarachnoid hemorrhage.

Keywords: Yiqi Huoxue Tongluo Prescription; subarachnoid hemorrhage; TGF- β /ERK signal; neuroprotection

蛛网膜下腔出血是常见的脑血管急症,发病急,致死率、致残率较高,可造成颅内压升高、脑灌注量降低、血脑屏障破坏、脑水肿及神经细胞死亡等脑损伤,严重损害患者神经功能,使其生活质量大大下降,减轻脑损伤是蛛网膜下腔出血患者预后的关键^[1-2]。神经炎症反应是蛛网膜下腔出血后脑损伤的重要致病因素^[3],转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 可提高 ERK1/2 磷酸化水平,介导博莱霉素引发的炎症损伤,进而诱导肺纤维化^[4],下调 TGF- β 1 表达,抑制 ERK1/2 磷酸化,可减轻神经炎症反应,改善蛛网膜下腔出血后脑损伤,提示 TGF- β /ERK 信号与蛛网膜下腔出血病情发展密切相关^[5-6]。益气活血通络方中的黄芪作为君药,可通脉益气、促进血行,与延胡索、桃仁、红花等活血药物配合使用,可消除气滞血瘀,改善血循环,有效延缓神经细胞炎症反应发生发展,减轻出血性中风患者神经损伤,促进其肢体运动功能恢复^[7-9]。本文主要对益气活血通络方对蛛网膜下腔出血大鼠 TGF- β /ERK 信号通路及神经功能的影响进行探讨。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2015-003,雄性,体质量 220~240 g,在本院清洁级动物房中饲养,饲养条件:温度 25 °C,相对湿度 50%,定期更换垫料、清理、消毒鼠笼,添加饲料及饮用水,12 h/12 h 交替照明,自由饮食、饮水。

1.2 主要试剂和仪器

益气活血通络方(黄芪 35 g,当归尾 25 g,赤芍 10 g,川芎 15 g,僵蚕 10 g,延胡索 10 g,地龙 10 g,桃仁、红花各 10 g,桂枝 8 g,甘草 6 g 加水煎煮,滤过后得药液 300 mL,为 1 剂)购自北京同仁堂科技发展股份有限公司,经焦作市人民医院药剂科专家鉴定符合《中国药典》2015 年版一部的相关规定;尼莫地平注射液,规格 50 mL:10 mg,购自德国 Bayer Vital GmbH 公司,产品批号 20050050;Evans 蓝购自北京索莱宝科技有限公司,货号 E8010-1;TUNEL 检测试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒、兔源 TGF- β 1、ERK1/2、p-ERK1/2、GAPDH 一抗、

羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司,货号 ab206386、ab100785、ab100772、ab215715、ab17942、ab223500、ab181602、ab150077;RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、HE 染色试剂盒购自上海碧云天公司,货号 P0013K、P0011、C0105 等。酶标仪(型号 XELx800)购自美国 Perkin Elmer 公司;倒置显微镜(型号 1X70)购自日本 Olympus 公司;电子天平(型号 BSA224S-CW)购自德国 Sartorius 公司;荧光分光光度计(型号 F-7000)购自日立高新技术公司;轮转切片机(型号 RM2035)购自德国 Leica 公司;蛋白电泳仪及转膜仪(型号 Mini PROTEAN)购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统(型号 2500)购自上海天能公司等。

1.3 蛛网膜下腔出血大鼠模型的制备和分组给药

采用蛛网膜下腔直接注射自体动脉血的方法制作蛛网膜下腔出血大鼠模型^[10],以 45 mg/kg 的剂量 ip 2.5%戊巴比妥钠溶液麻醉 SD 大鼠,固定在鼠板上,头部备皮、消毒,剪开皮肤,暴露颅骨,于脑中线 Bregma 点前方 7.5 mm 处开颅窗,大小为 1 mm²,经股动脉取血 300 μ L,自颅窗进针,于深 11 mm 处缓慢注入大鼠蛛网膜下腔内,最后缝合伤口,消毒,即完成模型制备,共建模 60 只,随机分为模型组,益气活血通络方低、中、高剂量组和尼莫地平组,每组 12 只,另取 12 只大鼠注射 300 μ L 生理盐水,其余操作与建模大鼠相同,设为假手术组。

参照文献^[11],将益气活血通络方药液 1 剂(药液符合本院药剂科质量标准)平分为 30 份,每份 10 mL,益气活血通络方低、中、高剂量组分别以 10、20、30 mL/kg 的剂量 ig,换算为生药剂量为 5、10、15 g/kg,尼莫地平以 0.2 mg/kg 的剂量 ip,注射剂量 10 mL/kg^[12];假手术组与模型组大鼠以 10 mL/kg 的剂量 ig 生理盐水,同时 ip 尼莫地平组等剂量的生理盐水,1 次/d,持续 28 d。

1.4 益气活血通络方对大鼠神经功能缺损评分的影响

给药结束后 24 h,根据大鼠活动情况,参照 Longa 分级法^[13]对各组大鼠进行神经功能缺损进行评分。无神经功能缺损计为 0 分,对侧前爪不能完全伸展计为 1 分,行走时向对侧转圈计为 2 分,行走时向对侧倾倒计为 3 分,意识丧失或不能自行行走计为 4 分,死亡计为 5 分。

1.5 益气活血通络方对大鼠血脑屏障通透性的影响

分别取各组大鼠尾静脉血 2 mL, 静置后于 4 °C 下以 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清液获得血清, 储存在-80 °C 备用。各组大鼠分别随机选取 6 只, 经股 iv 2%伊文思蓝染料, 剂量为 5 mL/kg, 1 h 后麻醉、处死大鼠, 解剖取出大脑, 于 60 °C 下置于甲酰胺中浸泡 24 h, 然后收集大脑浸出液, 以分光光度计检测其中伊文思蓝含量, 作为反映血脑屏障损伤情况的指标。各组剩余的 6 只大鼠麻醉、处死, 断头后分离脑皮质组织, 剪取约 0.5 g 置于蛋白裂解液中, 以匀浆机匀浆后得到匀浆液, 4 °C 下以 1 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液置于 Episode 管中, 分组做好标记, 即获得蛋白样品液, 储存在-80 °C 备用; 剩余脑皮质组织置于生理盐水中漂洗干净, 经 4%多聚甲醛溶液固定 24 h、低浓度到高浓度梯度酒精依次脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后, 采用切片机做常规病理切片备用。

1.6 益气活血通络方对大鼠神经细胞凋亡的影响

选取 1.5 项下病理切片中完好、厚薄均匀的, 以二甲苯脱蜡、高浓度到低浓度梯度酒精浸泡后, 采用 TUNEL 检测试剂盒染色, 具体操作参照说明书进行, 然后经再次脱水、透明后封片, 使用光学显微镜观察脑皮层神经细胞凋亡情况, 任选 5 个视野拍照, 统计每个视野 TUNEL 阳性细胞数目和细胞总数。

TUNEL 阳性细胞比例=TUNEL 阳性细胞数目/细胞总数

1.7 益气活血通络方对大鼠血清 IL-6、TNF- α 水平的影响

1.5 项下血清置于冰水浴中解冻, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测其中 IL-6、TNF- α 水平, 参照大鼠试剂盒说明书的步骤。

1.8 益气活血通络方对大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白表达的影响

1.5 项下各组脑皮质组织蛋白样品液置于冰水浴中解冻, 参照 BCA 试剂盒说明书的步骤, 测得各自总蛋白浓度, 根据结果将各组蛋白浓度调至相同, 然后取同体积的样品液上样, 进行电泳, 分离蛋白, 转移至 PVDF 膜, 以 5%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h 后, 根据目的蛋白相对分子质量剪开 PVDF 膜, 获得目的蛋白条带, 置于孵育中, 做好标记, 加入兔源 TGF- β 1、ERK1/2、p-ERK1/2、GAPDH 一抗, 于 4 °C 冰箱中孵育过夜, TBST 溶液漂洗 3 次, 加入羊抗兔二抗, 于室温中孵育 2 h, TBST 溶液漂洗 3 次, 经化学发光法显色后采用凝胶成像系

统拍照, 并以 Quantity One 软件分析图像, 获得各组蛋白相对表达量。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料, 多组间比较行单因素方差分析, 两组间进一步比较行 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 益气活血通络方对大鼠神经功能缺损评分的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 益气活血通络方低、中、高剂量组和尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P < 0.05$), 且益气活血通络方各组呈剂量相关性, 益气活血通络方高剂量组与尼莫地平组相比, 神经功能缺损评分差异无统计学意义, 见表 1。

表 1 益气活血通络方对大鼠神经功能缺损评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on neurological deficit score in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经功能缺损评分
假手术	—	0
模型	—	3.78 ± 0.63*
益气活血通络方	5	2.56 ± 0.52 [#]
	10	1.47 ± 0.46 ^{#△}
	15	0.35 ± 0.21 ^{#△△}
尼莫地平	2 × 10 ⁻⁴	0.32 ± 0.19 ^{#△△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 5 g·kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 10 g·kg⁻¹ 组比较: ^{△△} $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription low dose group; ^{△△} $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription middle dose group

2.2 益气活血通络方对大鼠血脑屏障通透性的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠伊文思蓝渗出量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 益气活血通络方低、中、高剂量组和尼莫地平组大鼠伊文思蓝渗出量显著降低 ($P < 0.05$), 且益气活血通络方各组呈剂量相关性, 益气活血通络方高剂量组与尼莫地平组相比, 伊文思蓝渗出量差异无统计学意义, 见表 2。

2.3 益气活血通络方对大鼠神经细胞凋亡的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑皮质组织中 TUNEL 阳性细胞比例明显升高 ($P < 0.05$)。与模型

表2 益气活血通络方对大鼠血脑屏障通透性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 2 Effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on blood-brain barrier permeability in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	伊文思蓝渗出量/(ng·mg ⁻¹)
假手术	—	5.38 ± 0.76
模型	—	22.93 ± 3.98*
益气活血通络方	5	17.02 ± 2.41 [#]
	10	11.82 ± 2.32 ^{#▲}
	15	5.97 ± 0.92 ^{#▲△}
尼莫地平	2 × 10 ⁻⁴	5.92 ± 0.96 ^{#▲△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 5 g·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 10 g·kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 5 g·kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 10 g·kg⁻¹ group

组相比, 益气活血通络方低、中、高剂量组和尼莫地平组大鼠脑皮质组织中 TUNEL 阳性细胞比例显著降低 ($P < 0.05$), 且益气活血通络方各组呈剂量

相关性, 益气活血通络方高剂量组与尼莫地平组相比, 脑皮质组织中 TUNEL 阳性细胞比例无明显变化, 见表 3、图 1。

表3 益气活血通络方对大鼠神经细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on nerve cell apoptosis in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TUNEL 阳性细胞比例/%
假手术	—	0
模型	—	86.72 ± 19.65*
益气活血通络方	5	62.05 ± 10.76 [#]
	10	31.42 ± 5.42 ^{#▲}
	15	2.02 ± 0.28 ^{#▲△}
尼莫地平	2 × 10 ⁻⁴	1.94 ± 0.26 ^{#▲△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 5 g·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 10 g·kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 5 g·kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 10 g·kg⁻¹ group

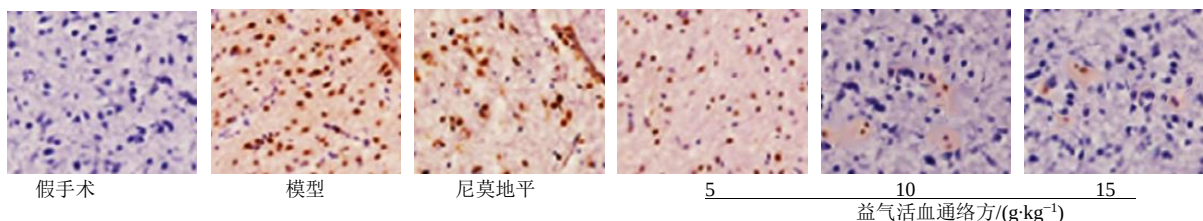


图1 大鼠脑皮质组织中 TUNEL 染色结果 (×200)

Fig. 1 TUNEL staining in cortical tissue of rats (×200)

2.4 益气活血通络方对大鼠 IL-6、TNF-α 水平的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠血清 IL-6、TNF-α 水平明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 益气活血通络方低、中、高剂量组和尼莫地平组大鼠血清

IL-6、TNF-α 水平显著降低 ($P < 0.05$), 且益气活血通络方各组呈剂量相关性, 益气活血通络方高剂量组与尼莫地平组相比, 血清 IL-6、TNF-α 水平差异无统计学意义, 见表 4。

表4 益气活血通络方对大鼠血清 IL-6、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 4 Effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on IL-6 and TNF-α levels in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	29.76 ± 2.08	33.47 ± 2.56
模型	—	76.85 ± 5.75*	83.75 ± 6.83*
益气活血通络方	5	61.02 ± 4.38 [#]	66.92 ± 5.04 [#]
	10	45.57 ± 3.23 ^{#▲}	51.23 ± 3.97 ^{#▲}
	15	30.46 ± 2.13 ^{#▲△}	34.02 ± 2.72 ^{#▲△}
尼莫地平	2 × 10 ⁻⁴	30.38 ± 2.17 ^{#▲△}	33.96 ± 2.63 ^{#▲△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 5 g·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$; 与益气活血通络方 10 g·kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 5 g·kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription 10 g·kg⁻¹ group

2.5 益气活血通络方对大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白 TGF- β 1、p-ERK/ERK 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 益气活血通络方低、中、高剂量组和尼莫地平组大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白 TGF- β 1、p-ERK/ERK 显著降低 ($P < 0.05$), 且益气活血通络方各组呈剂量相关性, 益气活血通络方高剂量组与尼莫地平组相比, 大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白 TGF- β 1、p-ERK/ERK 差异无统计学意义, 见图2、表5。

3 讨论

蛛网膜下腔出血后脑损伤的病理机制复杂, 其中蛛网膜下腔进入的大量血液, 经过降解生成高铁

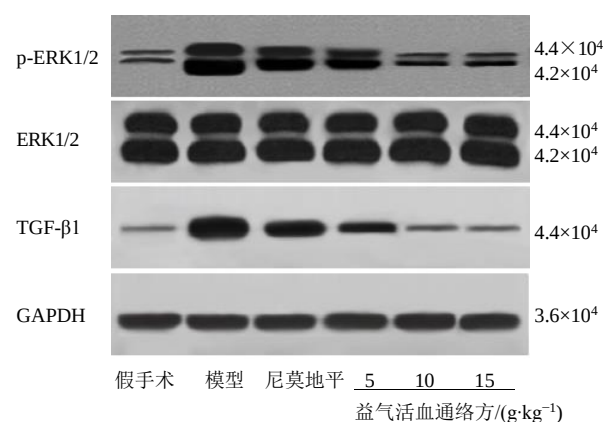


图2 益气活血通络方对大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 2 Effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on TGF- β /ERK pathway related protein expression in cortical tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

表5 益气活血通络方对大鼠脑皮质组织 TGF- β /ERK 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 5 Effect of Yiqi Huoxue Tongluo Prescription on TGF- β /ERK pathway related protein expression in cortical tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF- β 1/GAPDH	p-ERK/ERK
假手术	—	0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.02
模型	—	1.74 ± 0.29*	0.99 ± 0.17*
益气活血通络方	5	1.08 ± 0.19 [#]	0.67 ± 0.13 [#]
	10	0.67 ± 0.12 ^{#▲}	0.46 ± 0.10 ^{#▲}
	15	0.28 ± 0.05 ^{#▲△}	0.09 ± 0.02 ^{#▲△}
尼莫地平	2 × 10 ⁻⁴	0.26 ± 0.06 ^{#▲△}	0.10 ± 0.03 ^{#▲△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与益气活血通络方低剂量组比较: [▲] $P < 0.05$; 与益气活血通络方中剂量组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription low dose group; [△] $P < 0.05$ vs Yiqi Huoxue Tongluo Prescription middle dose group

血红蛋白、血红素等产物可引发活性氧大量产生, 诱导 TNF- α 、IL-6 等炎症因子过量表达, 促使神经炎症反应发生发展, 是脑损伤的主要致病机制^[14-16]。本文通过向蛛网膜下腔注射自体动脉血的方法制作蛛网膜下腔出血大鼠模型, 结果显示模型组大鼠神经功能缺损评分、Evans 蓝渗出量、TUNEL 阳性细胞比例、血清 IL-6 和 TNF- α 水平明显升高, 表明蛛网膜下腔出血后可引发炎症反应, 促使神经细胞凋亡, 破坏血脑屏障, 损害大鼠神经功能, 揭示模型制备成功。

尼莫地平是临床治疗蛛网膜下腔出血最为常用的西药之一, 但经常出现头痛、抑郁、出血、低钠血症等副作用, 因而寻找更为安全的中药治疗蛛网膜下腔出血具有重要的临床意义^[17]。中医理论认为

蛛网膜下腔出血属“头痛”“中风”范畴。由气血逆乱、络破血溢、脑脉络瘀阻所致, 治疗以益气、活血、化瘀为主, 由黄芪、当归尾、赤芍、川芎、僵蚕、延胡索等组成的益气活血通络方具有通脉益气、促进血行等作用, 能显著改善出血性卒中中偏瘫患者脑部血流, 促进运动功能康复, 改善神经功能^[8-9, 18]。本文以益气活血通络方处理蛛网膜下腔出血大鼠, 结果显示, 益气活血通络方可降低蛛网膜下腔出血大鼠神经功能缺损评分、Evans 蓝渗出量、TUNEL 阳性细胞比例、血清 IL-6 和 TNF- α 水平, 且呈剂量相关性, 表明益气活血通络方可抑制蛛网膜下腔出血引发的炎症发生及进展, 修复血脑屏障, 减轻神经细胞凋亡, 促使神经功能恢复, 且随剂量升高而作用增强。

TGF- β /ERK 信号可介导细胞凋亡及迁移、免疫炎症、组织纤维化等生理病理过程, TGF- β 1 水平在 SAH 引发的神经炎症反应过程中迅速升高, 并激活 ERK 信号参与 SAH 后脑损伤过程; 通过抑制 TGF- β /ERK 信号激活, 可阻止脑内炎症反应发生, 减轻脑损伤, 由此推测, TGF- β /ERK 信号是改善 SAH 大鼠神经功能的作用靶点之一^[6, 19-20]。本文结果显示, 蛛网膜下腔出血大鼠 TGF- β /ERK 通路相关蛋白 TGF- β 1、p-ERK/ERK 水平明显升高, 提示 TGF- β /ERK 信号可能参与蛛网膜下腔出血所致神经功能损伤过程。经益气活血通络方处理后, 大鼠脑皮质组织中 TGF- β 1 蛋白表达水平、p-ERK/ERK 水平降低, 炎症因子表达降低, 血脑屏障损伤减轻, 神经功能得到改善, 表明益气活血通络方可能通过下调 TGF- β /ERK 信号表达, 抑制蛛网膜下腔出血所致脑部炎症反应, 改善神经功能损伤。

综上所述, 益气活血通络方可下调 TGF- β 1 表达, 抑制 ERK 磷酸化, 降低炎症因子表达, 减轻脑皮质细胞凋亡, 修复血脑屏障功能, 改善神经功能损伤, 为蛛网膜下腔出血的临床治疗提供了新的参考, 抑制 TGF- β /ERK 信号激活可能是其药理机制, 但本文未通过激活或抑制 TGF- β /ERK 通路进行对照验证, 存在一定不足, 后续将进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wang W Q, Han P, Xie R X, *et al.* TAT-mGluR1 attenuates neuronal apoptosis through preventing mGluR1 α truncation after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(1): 746-756.
- [2] Bevers M B, Wolcott Z, Bache S, *et al.* Soluble ST2 links inflammation to outcome after subarachnoid hemorrhage [J]. *Ann Neurol*, 2019, 86(3): 384-394.
- [3] Liu L, Fujimoto M, Nakano F, *et al.* Deficiency of Tenascin-C alleviates neuronal apoptosis and neuroinflammation after experimental subarachnoid hemorrhage in mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(11): 8346-8354.
- [4] Huang X Y, He Y C, Chen Y F, *et al.* Baicalin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via adenosine A2a receptor related TGF- β 1-induced ERK1/2 signaling pathway [J]. *BMC Pulm Med*, 2016, 16(1): 132-142.
- [5] Liu Y, Wang T, Liu X, *et al.* Overexpression of zinc- α 2-glycoprotein suppressed seizures and seizure-related neuroinflammation in pentylene-tetrazol-kindled rats [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 92-101.
- [6] Feng D Y, Wang B, Ma Y L, *et al.* The Ras/Raf/Erk pathway mediates the subarachnoid hemorrhage-induced apoptosis of hippocampal neurons through phosphorylation of p53 [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 53(8): 5737-5748.
- [7] 赵剑锋, 郜旭娜, 崔春风, 等. 益气活血通络方治疗中风后瘫侧肢体肿胀 25 例 [J]. *中医研究*, 2019, 32(4): 18-21.
- [8] 彭伟献, 陈远园. 从脑出血的病理变化过程探讨活血化瘀法在出血性中风中的应用 [J]. *中华全科医学*, 2015, 13(5): 151-153, 164.
- [9] 秦 锐, 费 夕, 熊晓雯, 等. 益气活血通络汤对气虚血瘀型脑出血患者运动功能的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(2): 113-115.
- [10] 侯鹏飞, 刘展会, 张 睿, 等. 辛伐他汀对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的治疗效果研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(5): 815-819.
- [11] 张 琴, 周 亮, 欧阳林旗, 等. 益气活血通络汤联合神经节苷脂对外伤性颅脑出血患者血清 SOD、D-D、CRP 及预后影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(2): 124-126.
- [12] 王 琳, 王 涛, 梁迎春, 等. 尼莫地平对蛛网膜下腔出血模型大鼠谷氨酸转运体表达的影响 [J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(4): 226-229.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S R, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] Venkatesulu K B, Nandhakumar A, Cherian M, *et al.* Scalp block for management of subarachnoid hemorrhage (SAH)-induced headache [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2019, 31(3): 356-357.
- [15] Savarraj J, Parsha K, Hergenroeder G. Early brain injury associated with systemic inflammation after subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurocrit Care*, 2018, 28(2): 203-211.
- [16] Wu W, Guan Y, Zhao G, *et al.* Elevated IL-6 and TNF- α levels in cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients [J]. *Mol neurobiol*, 2016, 53(5): 3277-3285.
- [17] Adami D, Berkefeld J, Platz J, *et al.* Complication rate of intraarterial treatment of severe cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage with nimodipine and percutaneous transluminal balloon angioplasty: worth the risk? [J]. *J Neuroradiology*, 2018, 46(1): 15-24.
- [18] 贾丽霞, 朱明兴, 刘东坡. 益气活血通络汤联合体针疗法治疗出血性脑卒中偏瘫及对患者血流动力和运动功能的影响 [J]. *陕西中医*, 2019, 40(5): 125-128.
- [19] Parsa R, Lund H, Tosevski I, *et al.* TGF β regulates persistent neuroinflammation by controlling Th1 polarization and ROS production via monocyte-derived dendritic cells [J]. *Glia*, 2016, 64(11): 1925-1937.
- [20] Gu X, Zheng C Z, Zheng Q Y, *et al.* Salvianolic acid A attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats by regulating ERK/P38/Nrf2 signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5643-5652.