

【药效学评价】

苦碟子注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤炎症及 TLR-4/NF- κ B 信号的影响

张鑫, 耿诗涵, 王萍, 庄朋伟*, 张艳军*

天津中医药大学 中药学院 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 考察苦碟子注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用, 并从炎症角度探讨其保护机制。方法 改良线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型, 激光多普勒血流仪(LDF)监测大鼠脑血流变化。雄性SD大鼠随机分为假手术、模型组及苦碟子注射液高、低剂量组。缺血2h再灌注24h后进行神经功能缺损评分; 断头取脑, 称脑湿质量, 计算脑指数; TTC染色法检测脑梗死面积; HE染色观察脑组织病理形态; 并取血、脑组织, Elisa试剂盒检测炎症因子表达, Western Blotting技术检测TLR-4、NF- κ B蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组神经功能缺损较严重($P < 0.01$), 脑指数和脑梗死面积也显著升高; 给予苦碟子注射液后能改善神经功能缺损症状($P < 0.01$), 显著降低模型组的脑指数和脑梗死面积, 减少神经元坏死, 同时苦碟子注射液还可显著降低脑匀浆和血清TNF- α 水平($P < 0.05$), 增加局部脑组织IL-10水平($P < 0.05$)。Western Blotting结果显示, 苦碟子注射液可降低TLR-4、NF- κ B蛋白的表达($P < 0.05$)。结论 苦碟子注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤有明确的保护作用, 具有降低脑缺血再灌注后TNF- α , 并升高IL-10水平的作用, 其作用机制可能与其下调TLR-4/NF- κ B信号通路有关。

关键词: 苦碟子注射液; 脑缺血再灌注; 炎症; TLR-4/NF- κ B信号通路

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)07-0892-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.002

Effect of Kudiezi Injection on inflammation and TLR-4/NF- κ B signal in cerebral ischemia reperfusion rats

ZHANG Xin, GENG Shi-han, WANG Ping, ZHUANG Peng-wei, ZHANG Yan-jun

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Kudiezi (KDZ) Injection on cerebral ischemia reperfusion injury in rats and to explore its protective mechanism. **Methods** The rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by modified suture method, and cerebral blood flow was monitored using laser Doppler flowmetry (LDF). Male SD rats were randomly divided into control group, model group, Kudiezi Injection high and low dose groups. After ischemia-reperfusion for 24 h, the neurological scores were evaluated. After anesthesia, the blood samples and brain tissues were collected, and the expression of inflammatory was detected by Elisa. Western blotting was used to detect the expression of TLR-4 and NF- κ B protein. **Results** Behavioral scores showed that neural function defect was serious in model group compared with control group ($P < 0.01$). In model group, cerebral index and cerebral infarction area were significantly higher than those of the control group; After KDZ intervention, the symptoms of neurological deficit was alleviated ($P < 0.01$), the cerebral index and cerebral infarction area of mode were decreased, and the neuronal necrosis was reduced. Kudiezi Injection could significantly reduce the cerebral homogenate and serum levels of TNF- α ($P < 0.05$) and increase IL-10 level ($P < 0.05$). Western blotting showed that Kudiezi Injection could reduce the expression of TLR-4 and NF- κ B protein ($P < 0.05$). **Conclusion** Kudiezi Injection has protective effect on cerebral ischemia reperfusion rats. After ischemia-reperfusion, Kudiezi Injection could reduce the levels of TNF- α and raise IL-10. Its mechanism may be associated to the down-regulation of TLR-4/NF- κ B signaling pathway.

Keywords: Kudiezi Injection; cerebral ischemia reperfusion; inflammation; TLR-4/NF- κ B signaling pathway

收到日期: 2017-03-30

作者简介: 张鑫(1990—), 女, 硕士在读, 主要研究方向为中药药理。E-mail: wangxiaohuiX@163.com

*通信作者 庄朋伟(1982—), 男, 副教授, 硕士生导师。Tel: 13212082363 E-mail: zhuangpengwei@163.com

张艳军(1967—), 男, 教授, 博士生导师。Tel: (022)59596138 E-mail: zyjsunye@163.com

急性脑缺血病是神经科的常见病、多发病,具有死亡率高、致残率高、复发率高等特点^[1]。研究发现急性脑缺血病约80%~90%为脑动脉堵塞造成局部组织细胞缺血缺氧,发生缺血性损伤。临床上的治疗原则是尽早恢复血流,使可逆性区域获得功能上的恢复。然而,研究发现恢复血流一方面可以缓解缺血性损伤造成的神经功能缺损,而另一方面却可导致进一步的组织损伤和功能障碍,即缺血再灌注损伤^[2]。急性脑缺血是一个极其复杂的病理生理过程,既包括缺血期的原发性损伤又涵盖再灌注期的继发性损伤,多种机制间相互影响,共同作用,加重了脑梗死病变。免疫炎症损伤是其重要的机制之一,在治疗时间窗内积极的进行脑保护和抗炎成为目前研究的重点课题。

苦碟子为菊科苦苣菜属植物,味辛、苦,性寒,具有清热解毒,活血化瘀和排脓止痛的作用,苦碟子注射液是以苦碟子为原材料进行提取制成的静脉注射液,其主要成分为黄酮类、有机酸类、腺苷类等化学物质^[3-4]。文献报导,苦碟子注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[5-6]。基于以上内容,本研究考察苦碟子注射液对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制,为临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

健康清洁级SD雄性大鼠,体质量250~280g,购自北京华埠康实验有限公司,许可证号SCXK(京)2014-0004。

1.2 药物及主要试剂

苦碟子注射液(通化华夏药业有限责任公司,批号160308,规格20mL,主要成分见参考文献^[3]); β -actin一抗(批号sc-47778, SANTA);NF- κ B、TLR-4一抗,均购自上海优宁维生物科技有限公司;羊抗兔IgG、羊抗小鼠IgG,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

双通道激光多普勒血流仪(LDF,瑞典Perimed公司,PF5001);凝胶成像分析仪(Cuene Genins);OLYMPUSU-CMAD3型光学显微镜(日本OLYMPUS公司)。

2 方法

2.1 实验分组

取SD大鼠100只,随机分为4组:假手术组(只分离血管不插栓)、模型组、苦碟子高、低剂量

组(7.2、3.6 mL/kg, 3.6 mL/kg为临床等效剂量),每组25只,ip给药,每天1次,假手术组及模型组注射等量生理盐水,给药3天后造模,造模结束即刻再给药1次。

2.2 模型制备

用10%水合氯醛ip麻醉大鼠,沿头皮正中线纵向开口,剥离筋膜以暴露出颅骨前囟及右侧半颅骨,以前囟为起点向右5mm,向后2mm用牙科钻打孔,至穿透颅骨但未打破硬脑膜为宜,固定光纤并与LDF探头连接,监测实验动物血流^[7]。

模型组大鼠栓塞右侧大脑中动脉(MCA),假手术组只分离血管其余步骤与模型组相同。大鼠仰卧固定,颈部正中开口,分离右侧颈总动脉,颈外动脉(ECA),将线栓从ECA插入至颈内动脉(ICA),当LDF显示脑血流量下降至基础值20%时停止插栓^[8],保持缺血2h后拔出线栓行再灌注,血流恢复至基线为模型成功。

2.3 神经功能缺损评分

大鼠脑缺血再灌注24h后,按Bederson的4级评分法进行分级评价。0级:未观察到异常神经症状;1级:提尾悬空时,动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲,肩内旋,肘外展,紧贴胸壁;2级:将动物置于光滑平面上,推手术侧肩向对侧移动时,阻力降低;3级:动物自由行走时向手术对侧环转或转圈。

2.4 脑指数的检测

神经缺损功能评估后,立即断头取脑,去除小脑、脑干等,称脑湿质量。按公式“脑指数=脑湿质量/体质量”计算脑指数。

2.5 脑梗死面积的测定

取出脑组织后去除嗅脑、小脑和脑干,置于一20℃冰箱冷冻15min,将冻好的大脑取出,沿冠状面连续均匀切取6张脑片,厚度约为2mm,置于配制好的2% TTC溶液中,于37℃水浴锅中孵育20min,严格避光。缺血脑组织呈苍白色,正常脑组织呈鲜红色。拍照扫描入电脑后,用Image J软件测量脑梗死面积,脑梗死面积比= Σ 梗死面积/ Σ 全脑片面积。

2.6 HE染色

大鼠脑缺血再灌注24h后迅速取脑去除嗅脑、小脑和低位脑干,置于4%多聚甲醛固定液中24h,冠状切开脑组织,取视交叉前后约0.5mm处的组织,常规石蜡包埋,连续冠状切片,HE染色,中性树脂胶封固,光学显微镜下观察组织病理学变化。

2.7 细胞因子检测

各实验组大鼠脑缺血再灌注24 h后腹主动脉取血, 3 000 r/min 低温离心 15 min, 取其上清, 用 ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-10。取脑, 将缺血侧半脑称质量, 按 1:10 的比例加入生理盐水, 进行冰浴匀浆, 将匀浆液 3 000 r/min 低温离心 15 min, 取其上清, ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-10。

2.8 Western Blotting 法检测大鼠脑组织炎症相关蛋白的表达

取出缺血侧脑组织皮层, 每 100 mg 组织加入 1 mL 裂解液, 提取蛋白并用 BCA 蛋白试剂盒进行蛋白定量。按 4:1 比例加入 Loading Buffer, 沸水煮沸 5 min 进行蛋白变性。将制备好的蛋白样品用 8% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳并转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗涤后, 加入 NF- κ B、TLR-4 等一抗过夜, TBST 洗涤后加入相应的二抗孵育 1 h, TBST 洗涤后加入显影液进行曝光扫描。

2.9 统计分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据用 SPSS 17.0 统

计软件作单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 神经功能缺损评分

神经功能缺损评分结果显示: 假手术组大鼠无神经功能缺损症状, 与假手术组比较, 模型组神经功能缺损明显 ($P < 0.01$); 苦碟子低、高剂量组神经功能也有明显缺损, 但与模型组比较, 缺损显著改善 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

3.2 脑指数的变化

脑指数计算结果显示, 与假手术组比较, 模型组脑指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 苦碟子高、低剂量组脑指数显著下降 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

3.3 脑梗死面积比

假手术组脑组织 TTC 染色呈均匀的玫红色, 模型组脑组织具有大面积的白色梗死灶, 缺血半暗带区较小, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.01$); 苦碟子注射液高、低剂量组梗死面积与模型组比较明显缩小 ($P < 0.05$), 半暗带面积增加, 结果见图 1、表 1。

表 1 神经功能缺损评分、脑指数指标和梗死面积比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Neural function defect score, cerebral index and cerebral infarction area ratio ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	神经功能缺损评分/分	脑指数/%	梗死面积比/%
假手术	—	0	0.561±0.017	0
模型	—	2.8±0.4**	0.667±0.023**	19.2±3.9**
苦碟子注射液	3.6	1.8±0.75###	0.597±0.03#	10.2±4.9#
	7.2	1.8±0.76###	0.592±0.029#	10.9±3.2#

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

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

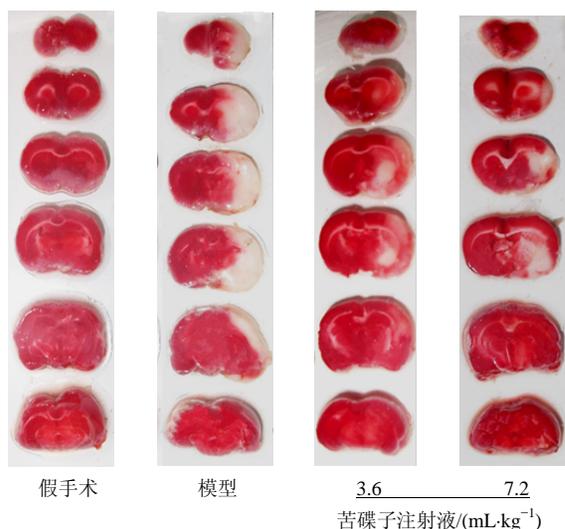


图 1 苦碟子注射液对脑梗死面积的影响

Fig. 1 Effect of Kudiezi Injection on cerebral infarction area

3.4 对大鼠脑组织病理形态学的影响

HE 染色可见假手术组脑组织实质各层结构清晰, 神经元数量丰富, 排列有序, 胞体呈圆形, 结构完整, 核膜清晰, 核仁大, 未见细胞水肿、空泡变性、脱髓鞘改变、未见核固缩。模型组坏死区神经元明显水肿, 胞浆呈空泡变性, 着色明显变浅, 镜下呈一片苍白色, 变性坏死的神经元主要分布在大脑皮层, 可见神经元大面积坏死, 细胞稀疏, 大量残存神经元胞体为三角型, 细胞排列紊乱、结构不清, 细胞核固缩深染, 间质疏松呈筛状。对侧皮层神经细胞结构基本正常, 无明显神经元缺失及血管内皮细胞的肿胀。苦碟子注射液高、低剂量组与模型组比较, 缺血皮质区坏死的神经元减少, 且周围细胞水肿减轻, 明显改善了病理形态学改变。见图 2。

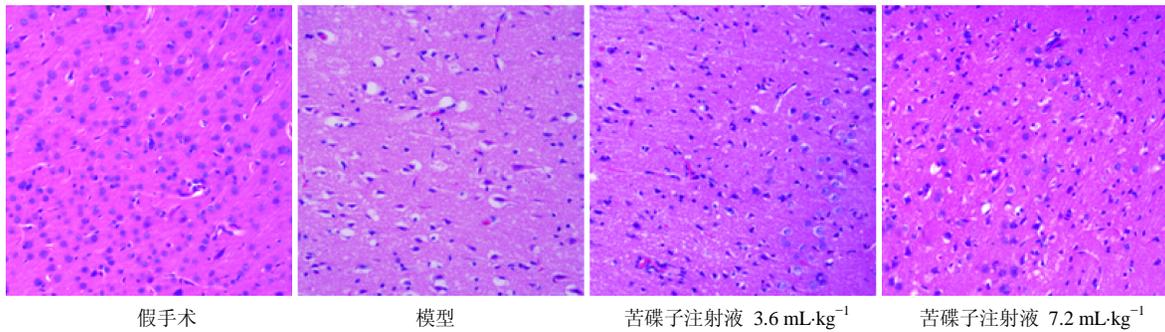


图2 苦碟子注射液对缺血再灌注脑组织病理形态学影响

Fig. 2 Effect of Kudiezi Injection on pathomorphology of cerebral ischemia reperfusion

3.5 细胞因子的表达

TNF- α 对脑缺血再灌注损伤有损害作用, IL-10 对脑缺血再灌注损伤发挥保护作用, 两者在脑缺血再灌注损伤后均会相应升高。结果显示, 与假手术组比较, 脑缺血损伤明显升高血清、脑组织中 TNF- α 和 IL-10 的水平 ($P < 0.05$)。苦碟子注射液能够显著降低血清 TNF- α 和 IL-10 水平 ($P < 0.05$); 显著降低脑

组织 TNF- α 水平, 升高 IL-10 水平。见表 2。

3.6 对 TLR-4/NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

结果显示, 与假手术组比较, 模型组炎症相关蛋白 TLR-4、NF- κ B 表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 苦碟子低、高剂量组 TLR-4、NF- κ B 蛋白表达均呈下降趋势, 且差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。见图 3、表 4。

表 2 血清、脑组织细胞因子指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Cytokines in serum and brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	血清		脑组织	
		TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	235.66 ± 5.49	28.93 ± 1.30	187.05 ± 3.71	42.3 ± 2.51
模型	—	278.73 ± 8.64*	36.02 ± 1.91*	211.89 ± 2.65*	60.1 ± 3.35*
苦碟子注射液	3.6	245.89 ± 8.86 [#]	28.11 ± 1.74 [#]	195.34 ± 1.02 [#]	71.01 ± 1.19 [#]
	7.2	260.13 ± 7.95 [#]	31.91 ± 0.47 [#]	192.61 ± 1.58 [#]	60.27 ± 3.62

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

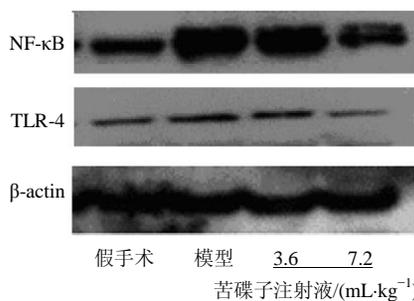


图3 苦碟子注射液对脑组织炎症通路相关蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of Kudiezi Injection on expression of inflammatory pathway related proteins in brain tissue

表 4 苦碟子注射液对炎症通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Kudiezi Injection on expression of inflammatory pathway related proteins in brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	TLR-4/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
假手术	—	0.32 ± 0.13	1.18 ± 0.23
模型	—	0.75 ± 0.15**	3.27 ± 0.43**
苦碟子注射液	3.6	0.65 ± 0.13 [#]	2.90 ± 0.27 [#]
	7.2	0.39 ± 0.04 ^{##}	1.82 ± 0.18 ^{##}

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

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

4 讨论

近年来苦碟子注射液的临床应用逐渐增多, 主要集中在心血管疾病和脑血管疾病两方面, 很多临床研究报道^[9-11]苦碟子注射液在治疗缺血性心肌病

方面已有确切疗效, 在缺血性脑血管病的应用也越来越广泛^[12-13]。

采用 Meta 系统分析发现^[14]苦碟子注射液治疗急性脑梗死疗效优于目前常用的其他药物, 其机制

主要与抗凝和提高缺氧耐受性有关,抗凝、抗血小板、增加脑血流量等作用已经研究得较为全面^[15],而有关于神经细胞凋亡、细胞因子、炎症信号转导通路等方面的研究还较少。本研究主要从炎症方面探讨了苦碟子注射液的脑保护机制,为以后的实验研究和临床用药提供依据。

脑水肿、脑梗死及神经元变性坏死是脑缺血再灌注损伤后的主要病理改变。脑指数的升高反应了脑水肿的严重程度,脑水肿包括细胞毒性水肿和血管源性水肿两种机制。在脑缺血再灌注早期,有效的控制脑水肿是降低颅高压、预防脑病的关键。HE染色能直观的体现脑组织神经细胞的变化,反应药物治疗效果。HE染色结果可见,假手术组脑组织实质各层结构清晰,神经元数量丰富,排列有序,胞体呈圆形,结构完整,核膜清晰,核仁大;模型组坏死区脑组织水肿,疏松,着色明显变浅,变性坏死的神经元主要分布在大脑皮层,可见神经元大面积坏死,细胞稀疏,大量残存神经元胞体为三角型,细胞排列紊乱、结构不清,胞浆空泡变性,细胞核固缩深染,间质疏松呈筛状,对侧皮层神经细胞结构基本正常,无明显神经元缺失及血管内皮细胞的肿胀。苦碟子注射液高、低剂量组与模型组比较,缺血皮质区坏死的神经元减少,且周围细胞水肿减轻。

脑组织内多种细胞因子介导炎症级联反应,其中炎性细胞因子包括白细胞介素类和肿瘤坏死因子类^[16],主要为IL-1、IL-6、IL-10和TNF- α 。研究发现IL-10可通过抗炎、抗自由基、抗凋亡等来发挥脑保护作用,相反在脑缺血再灌注损伤中TNF- α 的过度表达可导致多种病理改变^[17]。

通过对脑匀浆和血清中IL-10、TNF- α 水平检测发现,苦碟子注射液可降低脑组织局部和血清中TNF- α 水平,升高脑组织局部IL-10水平。提示苦碟子注射液可调节血清和脑组织中的炎症介质的合成和释放,减轻炎症损伤反应,起到脑保护作用。随后通过Western blotting对TLR-4/NF- κ B通路进行了验证,结果证明苦碟子注射液组降低了炎症通路蛋白的表达,从而抑制了脑缺血再灌注的炎症损伤,发挥了保护作用。

苦碟子注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤发挥保护作用,降低脑缺血再灌注后脑组织局部和血清中TNF- α ,并升高脑组织IL-10水平,其作用机制可能与下调TLR-4/NF- κ B信号通路有关。

参考文献

- [1] Feigin V L. Stroke epidemiology in the developing world [J]. Lancet. 2005, 365: 2160-2161.
- [2] 刘秀平,许栋明. 炎症反应影响脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践. 2009, 15(11): 1041-1043.
- [3] 刘思焱,张秀平,尚展鹏,等. UHPLC-LTQ-Orbitrap鉴定苦碟子注射液化学成分及其在大鼠血浆中的移行成分 [J]. 中国中药杂志. 2016, 41(12): 2235-2244.
- [4] 刘睿,马思萌,孙璐,等. HPLC-DAD法同时测定苦碟子注射液中10种核苷类成分[J]. 中草药, 2013, 44(18): 2542-2546.
- [5] 谭安雄,钱凤,朱耀斌,等. 苦碟子注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国医院药学杂志. 2009, 14: 1178-1181.
- [6] 陈春光,贾洪丽,吕首旭,等. 苦碟子注射液对大鼠急性脑缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志. 2012, 3: 196-199.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 赵琦,叶伟兵. 苦碟子注射液治疗冠心病45例临床观察 [J]. 亚太传统医药. 2011, 7(2): 123-124.
- [10] 刘克俭,夏豪,李彬. 苦碟子注射液联合常规西医疗法治疗冠心病心绞痛的临床观察 [J]. 湖北中医药大学学报. 2015, 17(5): 16-18.
- [11] 王智慧,张晶,邢明. 苦碟子对经皮冠状动脉介入治疗术后基质金属蛋白酶水平和支架内血栓形成的影响 [J]. 吉林大学学报:医学版. 2010, 36(2): 377-380.
- [12] 周芸,刘德军. 苦碟子注射液对急性脑梗死患者血清炎症因子、疗效及生活质量的影响 [J]. 中华中医药学刊. 2016, 34(4): 900-903.
- [13] 宋惠娟. 苦碟子注射液治疗63例脑梗死临床疗效观察 [J]. 中国继续医学教育, 2016, 8(9): 172-173.
- [14] 蒋亚斌,陈克家. 碟脉灵注射液治疗急性脑梗死的系统评价 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(27): 100-101.
- [15] 李增攀,周挺,蒋黎. 苦碟子注射液用于急性脑梗死的临床评价及对患者血清VEGF、S-100 β 、MMP-9水平的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2017, 3(37): 141-143.
- [16] Adukauskienė D, Bivainytė A, Radavičiūtė E. Cerebral edema and its treatment [J]. Medicina. 2007, 43(2): 170-176.
- [17] 张莉峰,滕军放,袁学谦,等. 白藜芦醇通过抑制TNF- α 表达保护大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(1): 32-36.