

【药效学评价】

黄芪多糖对蛛网膜下腔出血大鼠神经元凋亡因子及脑积水的影响

朱世杰¹, 张明阳³, 秦源¹, 刘兆昌², 李潺², 田维毅¹, 唐中生¹, 罗亚非^{1*}, 陆莹¹, 范瑞娟¹

1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 大连医科大学基础医学院, 辽宁 大连 116044

3. 辽宁师范大学, 辽宁 大连 116029

摘要: **目的** 通过研究黄芪多糖对蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠神经元凋亡因子及脑积水的影响,探讨黄芪多糖发挥作用可能存在的机制。**方法** 以雄性SD大鼠为研究对象,随机分为假手术组、模型组、黄芪多糖组。采用颅内血管刺破法建立SAH模型后,黄芪多糖组ip给予黄芪多糖40 mg/kg,1次/d,模型组给予和假手术组相同容量的生理盐水,24 h后进行神经功能评分,采用免疫组化和免疫蛋白印迹法检测各组大鼠海马部核因子(NF)- κ B、Bcl2、Caspase3、AQP4的阳性细胞数及灰度值,应用核磁共振技术分别扫描各组大鼠脑室,统计脑室大小指数变化情况。**结果** 免疫组化和免疫蛋白印迹结果显示,与假手术组相比,黄芪多糖组和模型组大鼠海马部凋亡相关因子Bcl2、Caspase3、NF- κ B均有明显的表达($P < 0.01$),但模型组上调Bcl2的表达和抑制Caspase3及NF- κ B表达的效果弱于黄芪多糖组($P < 0.01$)。与假手术组对比,黄芪多糖组和模型组海马部AQP4的表达和脑室指数均明显提高($P < 0.01$),黄芪多糖组与模型组相比海马部AQP4表达无统计学意义,而黄芪多糖组脑室指数小于模型组($P < 0.01$)。**结论** 黄芪多糖能通过调节NF- κ B、Bcl2、Caspase3的表达来抑制SAH大鼠海马部位神经元的凋亡,而减轻因SAH引起的脑积水,在早期可能不是主要通过调节AQP4表达而发挥作用的。

关键词: 黄芪多糖;蛛网膜下腔出血;凋亡;脑积水

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)08-1509-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.004

Effects of astragalus polysaccharide on neuronal apoptotic factor and hydrocephalus in SAH rats

ZHU Shijie¹, ZHANG Mingyang³, QIN Yuan¹, LIU Zhaochang², LI Chan², TIAN Weiyi¹, TANG Zhongsheng¹, LUO Yafei¹, LU ying¹, FAN Ruijuan¹

1. Basic Medical School of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. College of Basic Medical Science of Medical University of Dalian, Dalian 116044, China

3. Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

Abstract: Objective To study the effect of astragalus polysaccharide on neuronal apoptosis factor and hydrocephalus in rats with subarachnoid hemorrhage and explore the possible mechanism of astragalus polysaccharide. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and astragalus polysaccharide group. After the SAH model was established by intracranial vascular puncture, the astragalus polysaccharide group was intraperitoneally injected with astragalus polysaccharide (40 mg/kg, once a day). The model group was given the same volume of saline as the sham-operated group. After 24 hours, the neurological function was scored. The positive cells of NF- κ B, Bcl 2, Caspase 3 and AQP4 in the hippocampus of each group were detected by immunohistochemistry and Western blotting. The ventricles of rats in each group were scanned by magnetic resonance technology, and the changes of ventricular size index were counted. **Results** The results of immunohistochemistry and Western blot showed that the expression of Bcl 2, caspase 3 and NF- κ B in the hippocampus of ASP group and model group were significantly higher than those of sham operation group ($P < 0.01$), but the effect of up-regulating the expression of Bcl 2 and down-regulating the

收稿日期: 2019-01-23

基金项目: 贵州省国内一流建设学科项目(中药学 GNYL[2017]008号); 贵中医科学院内[2016]30号

第一作者: 朱世杰(1986—),男,河南西平人,主要从事中药对肠道菌群及脑血管疾病影响的研究。E-mail: zhu3514@163.com

*通信作者: 罗亚非(1965—),男,硕士生导师,主要从事中药对脑血管疾病的形态学研究。E-mail: 944943527@qq.com

expression of caspase 3 and NF- κ B in model group was weaker than that of ASP group ($P < 0.01$). Compared with the sham operation group, the expression of AQP4 in hippocampus and ventricular index in Astragalus polysaccharide group and model group were significantly increased ($P < 0.01$). The expression of AQP4 in hippocampus of astragalus polysaccharide group was not statistically significant, but the ventricular index in astragalus polysaccharide group was lower than that in model group ($P < 0.01$).

Conclusion Astragalus polysaccharide can inhibit neuronal apoptosis in the hippocampus of SAH rats by regulating the expression of NF- κ B, Bcl 2 and caspase 3, and alleviate hydrocephalus caused by SAH. It may not play a major role in the early stage by regulating the expression of AQP4.

Key words: APS; SAH; apoptosis; hydrocephalus

中药及其提取物因具有多靶点作用,所以常被临床医生用来治疗在诸多病因不明或病情复杂多变的疾病。黄芪是中医临床常用药物,具有益气固表、敛汗固脱、托疮生肌、利水消肿之功效,而黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是发挥药理作用的重要物质基础之一,现代药理学证明黄芪多糖具有抗氧化、调节免疫力、抑制脑损伤等作用^[1-3]。

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)主要继发症状及病理变化为脑积水、凋亡因子释放等^[4-5],其中脑积水发生发展因素诸多,但与水通道蛋白4(AQP4)的表达关系密切,而核因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达的变化可以影响凋亡相关因子如 Bcl 2、Caspase3 等表达的变化,最终调节神经元产生凋亡或死亡^[6-7]。前期研究证实黄芪多糖对蛛网膜下腔出血后神经元凋亡具有抑制作用,但是具体发挥作用机制及对脑积水改善情况不清楚,且已有报道称 NF- κ B 信号通路对神经元凋亡具有调节作用。基于此,拟探讨黄芪多糖对 SAH 大鼠海马部位中 NF- κ B、Bcl 2、caspase3、AQP4 表达的影响,以期丰富黄芪多糖发挥抑制神经元凋亡的作用机制,为黄芪多糖进一步的临床应用奠定实验基础。

1 材料

1.1 主要试剂

黄芪多糖购于西安文竹生物科技有限公司,批号 HK-20171421,分子式为 $C_{10}H_{17}N_2O_5S$,相对分子质量 254.69,质量分数 90%,用前用生理盐水配制 1% 溶液,用时稀释为 40 mg/kg 使用^[3]。兔抗大鼠 Bcl-2 抗体(Santa Cruz 公司,货号 SC493)、兔抗大鼠 NF- κ B 抗体(Abcam 公司,货号 ab-16502)、兔抗大鼠 Caspase3 抗体(Santa Cruz 公司,货号 sc-492)、兔抗大鼠 AQP4 抗体(Cell Signaling Technology 公司,货号 #9661S)、兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体(睿灏生物公司)、兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体、NF- κ B 多克隆抗体和 AQP4 多克隆抗体和小鼠抗大鼠 β -actin 多克隆抗体(北京普利莱基因技术有限公司);兔抗小鼠、兔抗山羊和山羊抗兔抗体(北京普利莱基因技

术有限公司);ECL 发光液(北京普利莱基因技术有限公司)。

1.2 实验动物

雄性 SD 大鼠,体质量 280~300 g,由重庆腾鑫比尔实验动物销售公司提供。合格证号 SCXK(军)2012-0011。

2 方法

2.1 制备大鼠 SAH 模型

本实验采用颈内动脉刺破的方法制作模型,具体步骤参照 Bederson 法^[8],经 ip 水合氯醛(浓度 10%,剂量 1 mL/kg)麻醉后,把 SD 大鼠仰卧固定,逐层钝性分离并夹闭颈内动脉和颈总动脉。在颈外动脉剪“V”型切口,一次性将 4 号尼龙线从切口导入到大脑中动脉与大脑前动脉分叉处至出现落空感后(深度 20~22 mm),停约 10 s 左右,抽出并结扎颈外动脉,逐层缝合消毒。

2.2 分组与给药

将 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 20 只。黄芪多糖组于术后 ip 给予注射黄芪多糖 40 mg/kg;SAH 模型组术后予同剂量的生理盐水;假手术组在线栓遇到阻力后立即拔出,并给予同剂量的生理盐水。因 SAH 模型而死亡、神经功能评分和 MRI 显示不合格的动物均予以补充。

2.3 观察指标

2.3.1 神经功能评分 各实验组大鼠模型制备 24 h 后,参照 Garcia^[9]评分原则,从自主运动、前肢伸展功能、身体触觉、触须反射、体态对称性、网屏实验 6 个方面进行神经功能评分,每项最低为 0 分,最高为 3 分,满分为 18 分。

2.3.2 免疫组织化学染色 取切片,0.3% Triton X-100,37℃温箱 30 min;0.3% H_2O_2 室温孵育 15 min,5% BSA 室温孵育 1 h;分别依次滴加兔抗大鼠 Bcl-2 抗体(1:200),兔抗大鼠 NF- κ B 抗体(1:100),兔抗大鼠 Caspase3 抗体(1:200),兔抗大鼠 AQP4 抗体(1:500),4℃过夜;次日滴加二抗工作液,37℃孵育 1 h;DAB 显色并苏木精复染,梯度酒精脱水,二

甲苯透明后中性树脂封片。上述每步骤间均用 0.01 mol/mL PBS 洗涤 5 min×3。

2.3.3 Western blotting 检测 取各组 SD 大鼠腹腔麻醉后,断头取脑的海马部放入装有放有射免疫沉淀裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的试管中,超声粉碎,用 BCA 法测定蛋白浓度。电泳上样每孔的蛋白量为 90 μ g, 12% SDS-PAGE 分离蛋白质,电转移至 PVDF 膜(100 V, 100 min), 5%BSA 室温封闭 1 h, 兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体(1:500), 等比例的兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体、NF- κ B 多克隆抗体和 AQP4 多克隆抗体和小鼠抗大鼠 β -actin 多克隆抗体(1:4 000)过夜。复温 1 h 后分别加相应二抗,HRP 标记兔抗小鼠、兔抗山羊和山羊抗兔抗体(1:2 000), 室温孵育 2 h。洗涤后,在 PVDF 膜上滴加 ECL 发光液,暗室曝光后将蛋白印迹条带扫描,经 Image J 5.1 图像软件分析读取灰度值并比较。

2.3.4 磁共振成像结果 在造模后 24 h, 采用 Siemens Trio 3.0 TMR 扫描仪, 8 通道腕关节线圈, 采用 T1W 三维磁化准备快速采集梯度回波序列, TR 1 500 ms, TE 3.7 ms, 翻转角 12°, 翻转时间 900 ms, 厚度 0.5 mm, 视野 267 mm, 像素 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm, 采集时间 300 s。以冠状位利用 RadiAnt DICOM Viewer 软件观察分析各组脑室指数比值(r/R)^[10-11]。

2.4 统计学处理

采用 Sigma Plot 10.0 统计学软件进行实验数据的统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用单因素方差分析(ANOVA)对神经功能评分、免疫组化阳性细胞和 Western blotting 蛋白条带灰度值进行组间

比较。

3 结果

3.1 神经功能评分

24 h 后,对各组大鼠进行神经功能评分,结果见表 1。假手术组的神经功能评分的平均分均高于其他两组,差异具有显著性($P < 0.01$);与模型组相比,模型大鼠给予黄芪多糖后,大鼠的神经功能评分值显著升高($P < 0.05$),说明给予黄芪多糖后 24 h,蛛网膜下腔出血大鼠的神经功能有所恢复。

表 1 APS 对大鼠神经功能评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 1 Effect of APS on neurological function score in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分
假手术	—	16.5±1.05
模型	—	9.83±1.47**
黄芪多糖	40	11.67±1.21***

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

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

3.2 免疫组化结果

与假手术组相比,黄芪多糖组和模型组 NF- κ B、AQP4、Caspase3、Bcl2 阳性细胞均增高($P < 0.01$);与模型组相比,黄芪多糖组大鼠海马部抗凋亡蛋白 Bcl 2 表达增强($P < 0.01$),而 Caspase3、NF- κ B 表达的阳性细胞数明显弱于模型组($P < 0.01$),说明黄芪多糖能够提高抑制凋亡蛋白 Bcl2 的表达,降低促凋亡因子 Caspase3、NF- κ B 表达进而抑制神经神经元的凋亡;与模型组相比,黄芪多糖组大鼠海马部 AQP4 的阳性细胞数没有统计学差异,说明在 SAH 早期,黄芪多糖不是主要通过调节 AQP4 表达而影响脑积水发展的。见表 2 与图 1。

表 2 免疫组织化学染色结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 2 Immunohistochemical staining results ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NF- κ B	Bcl-2	Caspase3	AQP4
假手术	—	2.4±1.12	9.4±1.14	6.4±1.15	7.6±1.14
模型	—	17.6±1.52**	20.2±1.92**	17.4±1.52**	52.8±3.42**
黄芪多糖	40	13.6±1.52***	27±2.74***	11±1.58***	50.8±3.56**

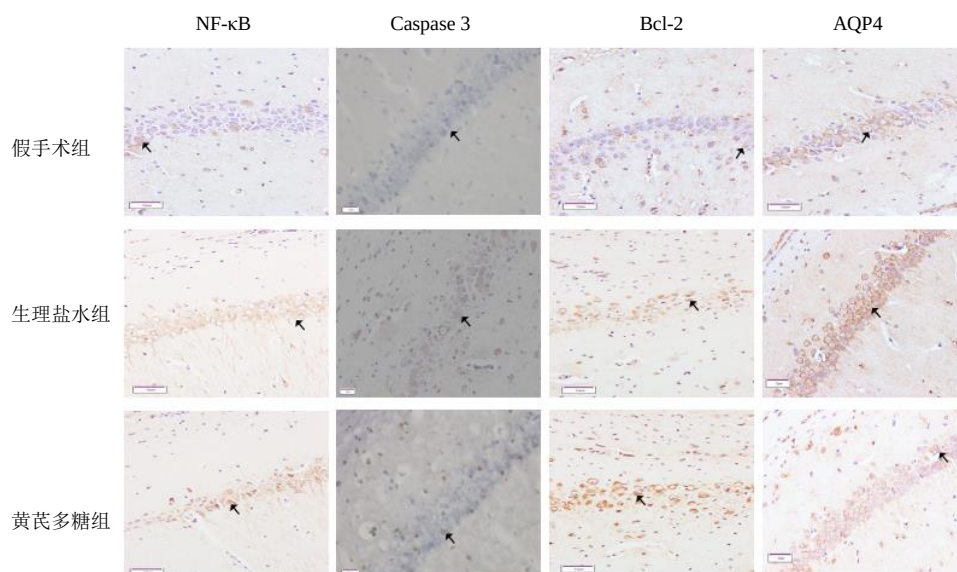
与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.01$

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

3.3 Western blotting

与假手术组相比,模型组和黄芪多糖组大鼠海马的凋亡相关因子 NF- κ B、Caspase3、Bcl2 的灰度值均明显上调($P < 0.01$),与模型组相比,黄芪多糖组大鼠海马部的 NF- κ B、Caspase3 的灰度值显著降低($P < 0.01$),而 Bcl2

的表达明显增强($P < 0.01$)。与假手术组相比,模型组和黄芪多糖组大鼠海马部水通道蛋白 AQP4 的灰度值均明显上调($P < 0.01$),模型组与黄芪多糖组比较无统计学差异,表明黄芪多糖可以通过调节 AQP4 的表达来影响脑积水的发展变化,但可能不是主要因素。结果见图 2。

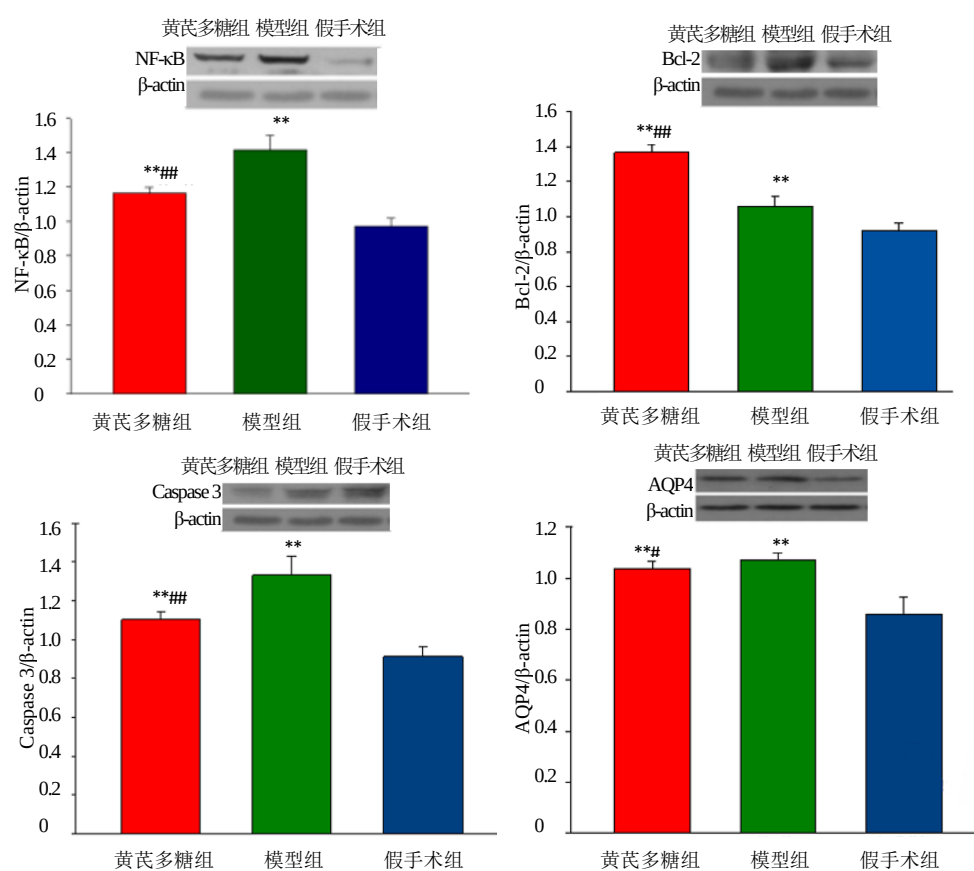


标尺示 10 μm ; $\uparrow$, 阳性细胞

Bar=10 μm ; $\uparrow$, Positive cells

图1 免疫组织化学染色结果(400 $\times$)

Fig.1 Immunohistochemical staining results(400 $\times$)



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

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

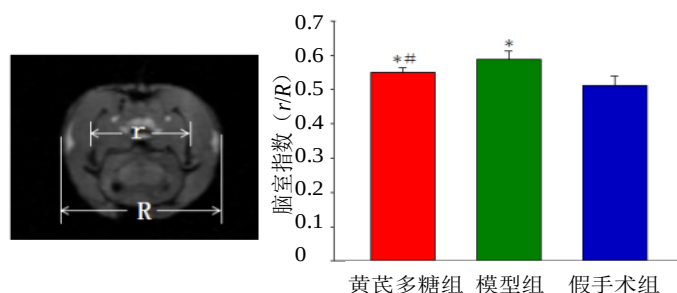
图2 APS对大鼠神经元凋亡和脑积水的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig.2 Effects of APS on nerve apoptosis and hydrocephalus in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.4 磁共振成像结果

各组大鼠 T1W 结果见图 3 和 4。假手术组 MRI 显示无明显变化,模型组和黄芪多糖组显示出异常亮信号;脑室大小指数显示,与假手术相比,黄芪多

糖组与模型组大鼠脑室指数均高于假手术组($P < 0.05$),而黄芪多糖组脑室指数小于模型组($P < 0.05$),表明黄芪多糖能够降低 SAH 大鼠脑积水的产生。

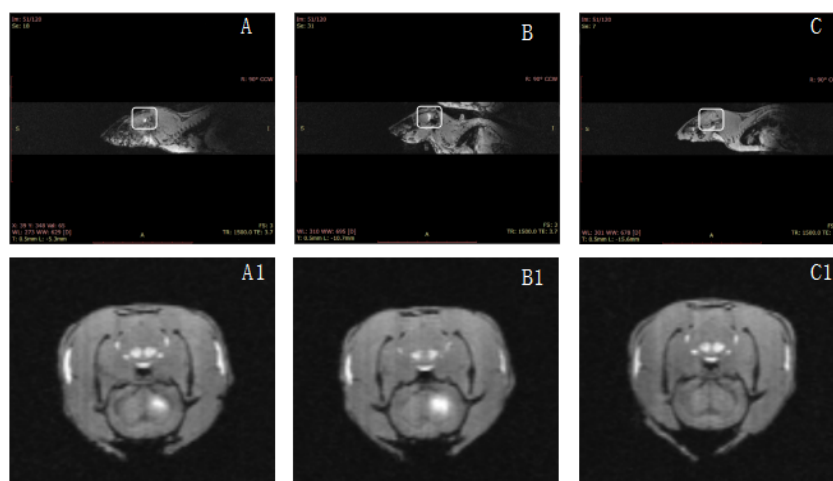


与假手术组比: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

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

图3 APS对大鼠脑积水的影响

Fig.3 Effect of APS on hydrocephalus in rats



A、A1-黄芪多糖组;B、B1-模型组;C、C1-假手术组

A, A1- APS group; B, B1- model group; C, C1- sham group

图4 大鼠脑部MRI检查

Fig.4 Brain MRI examination in rats

3 讨论

蛛网膜下腔出血是临床上脑卒中较常见的一种疾病形式,发病急,发病迅速且死亡率高,极大影响着病人康复及生活质量,因此也是目前临床治疗和基础研究都注重的热点之一。

它发生后的病理变化和继发症状诸多,如脑积水、脑血管痉挛、凋亡因子及炎症因子释放等,引起的分子机制也复杂多变,这些最终会激活凋亡信号通路和水通道蛋白的表达异常,引起神经凋亡的及脑积水的产生。凋亡的发生是受凋亡相关基因控制的自主有序的过程,NF- κ B是细胞内信号传递的重要桥梁,静息状态以三聚体形式存在胞浆中,脑

出血后NF- κ B活化入核内进而激活该信号通路,参与介导炎症、凋亡的发生发展^[12-13]。其中Bcl2和Caspase3在细胞凋亡发生中的作用早已被证实,Bcl2蛋白主要通过抑制凋亡基因、稳定细胞器Ca²⁺、调控细胞周期蛋白等发挥阻止凋亡信号的转导^[14]。而Caspase3是诸多凋亡通路中共同的下游作用蛋白,它存在于胞浆中,只有在损伤因子作用下活化,通过线粒体释放细胞色素C和肿瘤坏死因子受体两条途径诱发细胞凋亡的发生。脑出血后脑部水平衡被打破,造成颅内脑脊液增加而形成脑积水,影响脑积水的发生发展的因素非常复杂,如炎症因子、补体等^[15-17],而水通道蛋白AQP4的分布在毛血

管处,具有水分子跨膜转运功能,参与液体的转运,证实与脑积水的发生发展有关联^[18]。

前期研究证实黄芪多糖对SAH大鼠神经元凋亡起到抑制作用^[3],具体作用机制尚不清楚,而NF- κ B信号通路参与调节神经元凋亡的发生及AQP4的表达,但黄芪多糖是否通过该信号通路发挥抑制神经凋亡作用及脑积水的产生研究未有报道。本实验通过免疫组化和免疫蛋白印迹等方法检测大鼠海马部位神经凋亡蛋白NF- κ B、Bcl2、Caspase3的表达,其结果表明黄芪多糖可以影响NF- κ B信号通路上的蛋白如上调凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达,减少NF- κ B和Caspase-3表达而起到减少神经元凋亡的作用。MRI结果显示,黄芪多糖可以降低脑积水的发生,但免疫组化和免疫蛋白印迹显示黄芪多糖虽然能调节水通道蛋白AQP4的表达,但没有统计学意义,说明在蛛网膜下腔出血引起脑积水的早期,黄芪多糖不是主要通过调节AQP4蛋白的表达来降低SAH大鼠脑积水产生的。关于黄芪多糖是直接通过NF- κ B信号通路来发挥抑制SAH大鼠神经元凋亡的,还是通过其他途径间接影响NF- κ B信号通路来调节相关凋亡因子表达及黄芪多糖降低SAH大鼠脑积水的具体机制有待进一步深入探究。

参考文献

- [1] 王红芹,孙明杰,武乾,等.黄芪多糖对缺血再灌注损伤脐静脉内皮细胞抗氧化应激机制探讨[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(5):600-603.
- [2] Ren L N, Wang X F, Li S, et al. Effect of gamma irradiation on structure, physicochemical and immunomodulatory properties of *Astragalus polysaccharides* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120: 641-649.
- [3] 朱世杰,张艳,唐中生,等.黄芪多糖对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的治疗作用[J].解剖学报,2017,48(5):526-531.
- [4] Lemcke J, der Brelie C, Meier U, et al. The dilemma of complicated shunt valves: How to identify patients with posthemorrhagic hydrocephalus after aneurysmatic subarachnoid hemorrhage who will benefit from a simple valve? [J]. J Neurosci Rural Pract, 2016, 7(1): 48.
- [5] Ostrowski R P, Colohan A R, Zhang J H. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Neurol Res, 2006, 28(4): 399-414.
- [6] Bloch O, Auguste K I, Manley G T, et al. Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(12): 1527-1537.
- [7] Sticozzi C, Belmonte G, Meini A, et al. IL-1 β induces GFAP expression *in vitro* and *in vivo* and protects neurons from traumatic injury-associated apoptosis in rat brain striatum via NF κ B/Ca²⁺ - calmodulin/ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. Neuroscience, 2013, 252: 367-383.
- [8] 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): 1086-1092.
- [9] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-635.
- [10] Laubner S, Ondreka N, Failing K, et al. Magnetic resonance imaging signs of high intraventricular pressure - comparison of findings in dogs with clinically relevant internal hydrocephalus and asymptomatic dogs with ventriculomegaly [J]. BMC Vet Res, 2015, 11: 181.
- [11] 李学义,王伟,韩鸿宾,等.采用磁共振示踪法探讨大鼠脑细胞间隙内物质转运清除规律[J].中国医学影像技术,2018,34(1):1-4.
- [12] Scotece M, Conde J, Abella V, et al. Oleocanthol inhibits catabolic and inflammatory mediators in LPS-activated human primary osteoarthritis (OA) chondrocytes through MAPKs/NF- κ B pathways [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(6): 2414-2426.
- [13] Aslan A, Gok O, Erman O, et al. Ellagic acid impedes carbontetrachloride-induced liver damage in rats through suppression of NF- κ B, Bcl-2 and regulating Nrf-2 and caspase pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 662-669.
- [14] Li H L, Tang Z Y, Chu P, et al. Neuroprotective effect of phosphocreatine on oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced apoptosis *in vitro* and *in vivo* : Involvement of dual PI₃K/Akt and Nrf2/HO-1 pathways [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 120: 228-238.
- [15] Garton T, Hua Y, Xiang J M, et al. Challenges for intraventricular hemorrhage research and emerging therapeutic targets [J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(12): 1111-1122.
- [16] Chen Q W, Feng Z, Tan Q, et al. Post-hemorrhagic hydrocephalus: Recent advances and new therapeutic insights [J]. J Neurol Sci, 2017, 375: 220-230.
- [17] Picketts D J. Neuropeptide signaling and hydrocephalus: SCO with the flow [J]. J Clin Invest, 2006, 116(7): 1828-1832.
- [18] Castañeyra-Ruiz L, González-Marrero I, González-Toledo J M, et al. Aquaporin-4 expression in the cerebrospinal fluid in congenital human hydrocephalus [J]. Fluids Barriers CNS, 2013, 10(1): 18.