

- cellular carcinoma [J]. *Biomaterials*, 2008, 30(2): 226-232
- [5] 胡展红, 章良, 周奕, 等. 肝靶向去甲斑蝥素修饰物的合成及其纳米粒的制备 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9): 679-685
- [6] 张玮, 刘扬, 张学农, 等. 低分子量壳聚糖去甲基斑蝥素纳米粒的表征及体外释放研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1477-1482
- [7] Yoshie M, Kumi K, Kazuo Y, *et al.* Efficiency of liposomes surface modified with soybean derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells [J]. *J Controlled Release*, 2001, 75(3): 381-389
- [8] Teng B S, Lu Y H, Wang Z T, *et al.* *In vitro* antitumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells [J]. *Pharm Res*, 2006, 54(3): 186-194
- [9] 范锋, 孙晓飞. 去甲斑蝥素-半乳糖衍生物的合成与抗癌活性 [J]. 药学学报, 2008, 42(8): 157-161
- [10] James D B, Tania B, Lisa B P. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2008, 60(15): 1615-1626

虎杖苷对脑出血性损伤大鼠血清白细胞介素 1β 和脑组织 Bcl-2 蛋白表达的影响

刘 铭¹, 刘 华², 张国平², 张宇燕³, 万海同³, 杨洁红^{3*}

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016; 2 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 3. 浙江中医药大学心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 探讨虎杖苷对大鼠脑出血性损伤的治疗作用及作用机制。方法 采用 VII 型胶原酶诱导大鼠脑出血, 建立脑出血模型, 观察虎杖苷对大鼠神经功能症状、脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA) 水平, 脑组织 Bcl-2 蛋白表达, 及血清中白细胞介素 1β (IL- 1β) 水平的影响。结果 与脑出血模型组相比, 虎杖苷 (25、50、100 mg/kg) 可显著改善脑出血后神经功能缺损, 提高脑组织 SOD 活力、降低 MDA 水平, 增加 Bcl-2 蛋白表达, 降低血清中 IL- 1β 水平, 其作用与剂量呈正相关。结论 虎杖苷通过对抗自由基损伤, 抗凋亡及抗炎等作用, 发挥对大鼠脑出血性损伤的治疗作用。

关键词: 虎杖苷; 脑出血; VII 型胶原酶; Bcl-2 蛋白; 白细胞介素 1β

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2010-04

Effect of polydatin on IL- 1β in serum and protein expression of Bcl-2 in brain tissue of cerebral hemorrhage injured rats

LIU Ming¹, LIU Hua², ZHANG Guo-ping², YANG Jie-hong³, ZHANG Yu-yan³, WAN Hai-tong³
(1. Sir Run Run Shaw Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310053, China; 2. Second Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310053, China; 3. Institute of Cardiovascular Diseases, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Objective To explore the effects and mechanisms of polydatin on rats with brain hemorrhagic injury. **Methods** The cerebral hemorrhage model in rats was induced by local injection of type VII collagenase and they were randomly divided into six groups. The treated groups were treated with polydatin and Na₂Oxekang; The normal and control groups were only treated with water. The changes of neurological defect were observed. The activity of SOD, the content of MDA, the protein expressions of Bcl-2 in brain tissue, and the contents of IL- 1β in serum were measured. **Results** Compared with the cerebral hemorrhage model group, polydatin (25, 50, and 100 mg/kg) could significantly reduce the symptoms of neurological deficits of cerebral hemorrhage rats, raise the activity of SOD, reduce the content of MDA, increase the protein expressions of Bcl-2, and decrease the contents of IL- 1β in serum. Its effects were positively correlated with the dose-effect. **Conclusion** Polydatin has therapeutic effect on rats of cerebral hemorrhage, through against free radical damage and inhibiting neuronal apoptosis and inflammatory.

Key words: polydatin; cerebral hemorrhage; collagenase VII Bcl-2 protein; interleukin 1β

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873430, 30973933); 浙江省中医药管理局项目 (2007CA061)

作者简介: 刘 铭 (1968-), 男, 主任医师, 主要开展中医临床基础研究。E-mail: yannoo7376@126.com

* 通讯作者 杨洁红 E-mail: yannoo7376@sina.com

脑出血是指非外伤性脑实质内的出血,较脑缺血有更高的死亡率和致残率,是严重威胁中老年健康的疾病之一。脑出血后引起机体和脑组织局部发生系列病理性反应,除早期血肿本身的占位效应外,尚与多种机制有关,如氧自由基损害、炎症反应等,目前尚缺乏有效的治疗手段,手术的远期效果尚存争议。

虎杖苷(polydatin)是从蓼科蓼属虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎中提取的单体,也称白藜芦醇苷^[1],是白藜芦醇与葡萄糖结合的产物,属于芪类化合物,即羟基二苯乙烯类化合物,化学名称为3,4,5-三羟基芪-3-β-D-葡萄糖苷(3,4,5-trihydroxystilbene-3-β-D-glucoside)。虎杖苷具有较强的生物活性,具有抗血栓形成、抗动脉硬化、扩张血管、改善微循环、保护血管内皮、防治脑缺血等药理作用^[2]。本实验在建立脑出血模型的基础上,观察虎杖苷对大鼠脑出血损伤后神经功能症状、脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)水平,脑组织 Bcl-2 蛋白表达,及血清中白细胞介素-1β(IL-1β)水平的影响,探讨虎杖苷对大鼠脑出血损伤的治疗作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物:健康清洁级 SD 大鼠,雄性,体质量 360~400 g,实验室符合国家动物实验设施屏障系统标准,于温度 22~25 °C、相对湿度 40%~70% 环境条件下饲养,购自浙江中医药大学动物实验研究中心,动物实验条件合格证:SYXK(浙)2008-0115。

1.2 药品与试剂:虎杖苷由浙江中医药大学心脑血管病研究所制备,质量分数 ≥95%,批号 2008001。脑血康片由通化东宝永健制药厂生产,批号 080312。上述药品临用前以生理盐水配制溶液。VII 型胶原酶(Sigma 公司),IL-1β ELISA 试剂盒(上海晶美生物技术有限公司),SOD、MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),Bcl-2(为 Rabbit 来源的多克隆抗体)、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器:AG135 电子天平(灵敏度 0.0001 g,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),Universal 32 高速离心机(德国 Hettich 公司),NU-6382E 型-85 °C 超低温冰箱(美国 Nuair 公司),三维立体定位仪(第二军医大学,江湾 II 型 C),680 型酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司),TU-1900 双

光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),MIAS-2000 型图像分析仪(四川大学智胜软件股份有限公司)。

2 方法

2.1 脑出血动物模型制备^[3]:大鼠用 10% 水合氯醛麻醉后,固定于脑立体定向仪上,头顶剪毛,常规消毒,矢状切开头正中额顶部皮肤,暴露颅骨,以前囟为中心,向后 0.2 mm 向右旁开 2.9 mm,用牙科钻在颅骨表面钻孔,用固定在立体定向仪上的微量注射器(5 μL,针头直径 0.7 mm)沿钻孔进针垂直插入脑组织,深约 6 mm(此处为尾状核位置),缓慢注入含 1 U/μL VII 型胶原酶的生理盐水 1.2 μL,留针 8 min 缓慢出针,用牙科水泥封闭颅骨上的钻孔,缝合切口(假手术组仅钻开颅骨不注入胶原酶)。

2.2 分组与给药:60 只大鼠随机分为 6 组:假手术组、模型组、虎杖(25、50、100 mg/kg)组、脑血康(1.2 g/kg)组,每组 10 只。以上各组均于造模前 0.5 h ig 给药 1 次,造模后连续给水、给药 4 d,每天 2 次,每次 3 mL(假手术组、模型组给予等容积生理盐水),第 5 天进行神经症状评级后断头处死,取脑,取脑前 12 h 禁食,自由饮水。

2.3 神经症状观察:参照 Bederson 等^[4]的标准制定。I 级,无明显障碍;II 级,提起鼠尾使鼠头下垂位,患侧前肢回收屈曲于胸前,正常侧的前肢伸展;III 级,追尾;IV 级,追尾且偏瘫侧腿长拖,眼分泌物多,脸模糊;V 级,站立不稳,倒向健侧不能立起。

2.4 血清 IL-1β、脑组织 SOD 活力、MDA 水平及 Bcl-2 蛋白表达测定:大鼠用 10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g) ip 麻醉,由腹主动脉抽取 4~6 mL 血液,静置 60 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,取血清,置 -85 °C 冰箱保存,用于血清中 IL-1β 的测定;心脏灌流后,断头取脑,低温下取出右侧脑组织,靠额极的 1/2 脑组织,称定质量后加生理盐水制成 10% 组织匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-85 °C 冰箱保存,用于脑组织匀浆 SOD、MDA 测定;靠枕叶的 1/2 脑组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片,免疫组化法测定 Bcl-2 蛋白表达。脑组织匀浆 SOD 活力、MDA 测定采用比色法;Bcl-2 蛋白表达采用 SABC 免疫组化染色法;血清中 IL-1β 用 ELISA 法测定,并分别按照各试剂盒说明书操作。

2.5 数据处理:计量资料比较用 *t* 检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;等级资料比较用 Ridit 分析,所有数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计。

3 结果

3.1 神经症状观察: 结果见表 1。脑出血模型组与假手术组比较, 神经症状评级显著升高 ($P < 0.01$), 结合 Ridit 值, 可见神经症状以模型组最严重, 虎杖苷低剂量组次之, 虎杖苷高、中剂量组程度较轻, 假手术组最轻。

表 1 虎杖苷对脑出血大鼠神经功能症状的影响

Table 1 Effect of polydatin on neurological symptoms of cerebral hemorrhage rats

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	神经缺损症状				
			I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级
假手术	-	10	10	0	0	0	0
模型	-	10	1	2	4	2	1
虎杖苷	25	10	2	2	3	3	0
	50	10	2	4	2	2	0
	100	10	3	4	3	0	0
脑血康	1 200	10	2	3	4	1	0

3.2 对脑出血大鼠脑组织 SOD 活力和 MDA 水平的影响: 结果见表 2。脑出血模型组脑组织匀浆中 SOD 活力与假手术组相比显著降低 ($P < 0.01$), 虎杖苷高、中剂量组与模型组相比均能显著提高 SOD 活力, 且量效关系呈正相关。提示虎杖苷可显著提高脑出血损伤大鼠脑组织中 SOD 活力 ($P < 0.01$ 、 0.05)。脑出血模型组脑组织匀浆中 MDA 水平与假手术组相比显著升高 ($P < 0.01$), 虎杖苷高、中剂量组、脑血康组与脑出血模型组相比均显著降低。提示虎杖苷能显著降低脑出血大鼠脑组织中 MDA

表 2 虎杖苷对脑出血大鼠脑匀浆 SOD 活力和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of polydatin on activity of SOD and level of MDA of cerebral hemorrhage rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	SOD/ (U · mg ⁻¹)	MDA/ (nmol · mg ⁻¹)
假手术	-	51.62 ± 2.97	8.01 ± 1.52
模型	-	30.70 ± 3.84**	16.48 ± 1.61**
虎杖苷	25	33.19 ± 3.30	14.58 ± 2.31
	50	34.67 ± 3.75	12.12 ± 1.79 [△]
	100	43.58 ± 3.38 ^{△△}	10.91 ± 1.29 ^{△△}
脑血康	1 200	40.58 ± 3.43 ^{△△}	11.51 ± 2.19 ^{△△}

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

水平 ($P < 0.01, 0.05$)。

3.3 对脑出血大鼠脑组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响: 采用 SABC 法进行 Bcl-2 免疫组化染色, 显微镜下观察, 脑组织神经元细胞胞质中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 结果见图 1。每张免疫组化切片中采集 10 个具有代表性的 400 × 互不重叠视野, 计数 Bcl-2 蛋白染色阳性细胞个数, 取其平均值作为该标本的阳性细胞数, 结果见表 3。模型组 Bcl-2 蛋白染色阳性细胞数明显增多, 虎杖苷高、中剂量组与模型组相比, Bcl-2 蛋白染色阳性细胞数明显增多 ($P < 0.01, 0.05$)。提示虎杖苷具有抗神经元凋亡的作用。

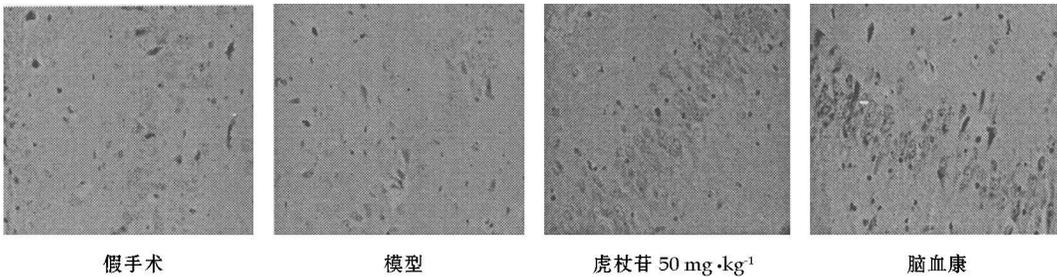


图 1 免疫组化检测 Bcl-2 蛋白表达

Fig. 1 Protein expression of Bcl-2 detected by immunohistochemistry

3.4 对脑出血大鼠血清中 IL-1 β 的影响: 由表 3 可知, 脑出血模型组血清中 IL-1 β 水平明显升高 ($P < 0.01$), 虎杖苷高、中剂量可明显降低 IL-1 β 水平, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.01, 0.05$), 表明虎杖苷能显著抗脑出血引起的炎症反应, 减少炎症因子的释放。

4 讨论

脑出血是发病率较高的脑血管疾病, 而且三分之一的患者在发病后一段时间内出现继发性神经功

能损伤。而氧自由基在脑出血继发性脑损害中也起重要作用, 脑出血时由于血肿压迫周围脑组织和微血管, 病灶周围存在大范围低灌注区, 产生大量超氧阴离子自由基^[5]; 同时损伤区发生明显炎症反应^[6], 激活的多形核白细胞也产生大量氧自由基。所产生的自由基除了可使蛋白质及其他有机分子变性外, 还可与细胞脂质的疏水部分反应生成脂质自由基, 通过氧化反应, 破坏细胞膜, 损害细胞完整性, 最终造成细胞广泛损伤, 产生脑水肿。自由基还可导

表 3 虎杖苷对脑出血大鼠脑组织中 Bcl-2 蛋白阳性细胞数和血清中 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of polydatin on positive cell number of Bcl-2 and IL-1 β in serum of cerebral hemorrhage rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Bcl-2 阳性 细胞/个	IL-1 β / (ng·mL ⁻¹)
假手术	-	6.16 ± 3.30	0.499 ± 0.053
模型	-	26.22 ± 4.03 [*]	0.921 ± 0.080 [*]
虎杖苷	25	36.98 ± 5.06	0.755 ± 0.083 Δ
	50	40.34 ± 6.11 Δ	0.738 ± 0.061 Δ
	100	49.06 ± 3.98 $\Delta\Delta$	0.641 ± 0.069 $\Delta\Delta$
脑血康组	1200	39.20 ± 6.20 Δ	0.767 ± 0.074 Δ

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.01$

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

^{*} $P < 0.01$ vs Sham group

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

致脑组织微血管内皮细胞坏死,引起脑血管通透性增加,进一步加重脑水肿。本实验结果显示,脑出血后大鼠出现神经功能缺损明显,脑组织 SOD 活力显著下降,过氧化产物 MDA 显著增高,证实脑出血时脂质过氧化反应增强,抗自由基酶活力下降,显示自由基与脑出血后脑组织的损伤密切相关。

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种细胞死亡形式,其过程受多种相关基因及其蛋白调控,有研究表明,细胞凋亡机制参与了脑出血继发性神经细胞损伤。其中 Bcl-2 家族在凋亡调控基因中位于重要地位^[7], Bcl-2 蛋白是一种膜合蛋白,为中枢神经系统主要的神经保护性蛋白,它存在于细胞的线粒体、核膜等处。Bcl-2 家族既能阻抑坏死又能阻抑凋亡^[8],一般认为, Bcl-2 基因家族是一种重要的内源性抗凋亡因子,过度表达后可抑制 Ca²⁺ 超载、阻止凋亡基因信号的传递或基因产物的诱导、抑制由于氧自由基、兴奋性氨基酸等诱发的神经细胞凋亡^[9-10]。本实验结果发现,假手术组大鼠脑组织中 Bcl-2 蛋白有较低水平的表达,与假手术组相比,脑出血模型组 Bcl-2 蛋白表达显著增加。

研究表明,脑出血后存在明显的炎症反应,炎症反应参与了脑出血后继发性脑水肿和脑损害的病理生理过程,是具有血管系统的活体组织对损伤发生的反应。动物试验证明,脑出血后发生的炎症反应,较非出血性脑损伤更为明显^[11]。Del Bigio 等^[12]发现血凝块及受损的脑组织能释放化学趋化因子,包括凝血酶,促进中性粒细胞向血肿及周围脑组织转

移,成为活化的白细胞。活化的白细胞能够释放各种细胞因子,如: IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (INF- γ) 和氧自由基等,加重脑损伤。本实验结果显示,脑出血后大鼠血清中 IL-1 β 水平明显升高,证实脑出血后伴有明显炎症反应。

本实验结果表明,虎杖苷可改善脑出血损伤后大鼠神经功能缺损症状,使脑组织 SOD 活力增强,MDA 降低;同时使脑组织 Bcl-2 蛋白表达增加,血清中 IL-1 β 降低,且虎杖苷各剂量组量效呈正相关。提示虎杖苷具有提高细胞抗氧化和抑制其脂质过氧化作用,减轻自由基对脑组织损伤的作用,并具有明显抗凋亡作用,同时通过减轻炎症反应,发挥虎杖苷对脑出血损伤的治疗作用。

参考文献:

- [1] 李世学, 刘建利, 张楠, 等. 处理方法对虎杖不同部位白藜芦醇和虎杖苷量的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 469-471.
- [2] 黄斌, 王兴勇, 匡凤梧, 等. 白藜芦醇苷对大鼠局灶性脑缺血的保护作用 [J]. 中国急救医学, 2005, 25(3): 192.
- [3] 任泽光, 吴建中. 大鼠脑出血模型 [J]. 中华神经外科杂志, 1993, 9(4): 205.
- [4] Bederson J B, Pitts L H, Tsujim M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472.
- [5] Hall C, Packard A, Hall L, et al. Protein oxidation and enzyme susceptibility in white and gray matter with *in vitro* oxidative stress: relevance to brain injury from intracerebral hemorrhage [J]. Cell Mol Bio, 2000, 46: 673.
- [6] 吴家霖, 刘春梅, 李君. 脑出血后周边组织继发性脑损伤炎症机制的研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2004, 17: 278.
- [7] Graham S H, Chen J, Clark R S. Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 831.
- [8] Wei M C, Zong W X, Cheng E H Y, et al. Proapoptotic BAX and BAK: requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death [J]. Science, 2001, 292(5517): 727.
- [9] Kluck R M, Bossy Wetzel E, Green D R, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. Science, 1997, 275(5303): 1132.
- [10] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y, et al. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC [J]. Nature, 1999, 399(6375): 483-487.
- [11] 刘庆新, 苏长海, 张苏明. 脑出血血肿周围半暗带的病理生理研究进展 [J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2002, 10(6): 425.
- [12] Del Bigio M R, Yan H J, Buist R, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in rats: Magnetic resonance imaging and histopathological correlates [J]. Stroke, 1996, 27(9): 2312.