

• 药理与临床 •

冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷通过 Notch 信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤模型的神经保护作用

欧阳波, 刘晓丹, 杨筱倩, 丁 煌, 黄小平*, 邓常清*

湖南中医药大学分子病理实验室, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 从 Notch 信号通路探讨冰片配伍黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)和三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)对大鼠脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)模型的神经保护作用。方法 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、冰片(7.5 mg/kg)组、PNS(25 mg/kg)组、AST IV(10 mg/kg)组、AST IV(10 mg/kg)+PNS(25 mg/kg)组、冰片(7.5 mg/kg)+AST IV(10 mg/kg)+PNS(25 mg/kg)低剂量组、冰片(15 mg/kg)+AST IV(20 mg/kg)+PNS(50 mg/kg)高剂量组、依达拉奉(4 mg/kg)组。假手术组、模型组 ig 0.5% CMC-Na, 依达拉奉 ip 相应药物, 其余各组 ig 相应药物, 2 次/d, 间隔 12 h。末次给药后 2 h 采用线栓法阻断大鼠右侧大脑中动脉, 建立 CIRI 模型。缺血 2 h, 再灌注 22 h 后, 进行神经功能缺损评分; HE 染色法观察缺血皮质区病理变化; 免疫组化法检测神经元特异性核蛋白(neuron specific nuclear, NeuN)、内皮屏障抗原蛋白(endothelial barrier antigen, EBA)表达; Western blotting 法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、Notch1、Notch 胞内域(intracellular domain of Notch, NICD)蛋白表达。**结果** 模型组大鼠神经功能缺损评分和细胞损伤率显著增加($P<0.01$); 各给药组大鼠神经功能缺损评分和细胞损伤率显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 冰片+AST IV+PNS 组的效应强于各药物单用及 AST IV+PNS 组($P<0.05$ 、 0.01)。模型组大鼠缺血皮质区 NeuN、EBA 蛋白表达均显著降低($P<0.01$); 各给药组 NeuN、EBA 蛋白表达显著增加($P<0.05$ 、 0.01), 冰片+AST IV+PNS 组的效应强于各药物单用及 AST IV+PNS 组($P<0.05$ 、 0.01)。模型组大鼠缺血皮质区 VEGF 蛋白表达显著增加($P<0.05$), NICD、Notch1 蛋白表达无显著变化; 冰片+AST IV+PNS 组 VEGF、NICD、Notch1 蛋白表达显著上调($P<0.01$), 且 3 种药物配伍的效应强于各药物单用及 AST IV+PNS($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 冰片、AST IV、PNS 具有抗脑缺血再灌注后神经元和脑微血管损伤的作用, 3 种药物配伍的作用强于各药物单用及 AST IV+PNS, 其作用可能与激活 Notch 信号通路、上调 VEGF 表达, 从而发挥对缺血脑组织的保护作用有关。

关键词: 冰片; 黄芪甲苷; 三七总皂苷; 脑缺血再灌注损伤; 神经元; 微血管

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-5990-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.011

Neuroprotective effect of borneol combined with astragaloside IV and *Panax notoginseng* saponins in cerebral ischemia reperfusion injury rat model through Notch signaling pathway

OUYANG Bo, LIU Xiao-dan, YANG Xiao-qian, DING Huang, HUANG Xiao-ping, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Hunan Key Laboratory of Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-cerebral Diseases, Key Laborator of Cell Biology and Molecular Techniques of Hunan Universities, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To observe the neuroprotective effect of borneol combined with astragaloside IV (AST IV) and *Panax notoginseng*

收稿日期: 2020-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573875); 湖南省自然科学基金创新群体基金项目; 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划资助项目(2017SK4005); 湖南省科技厅重点专项资助(2017SK2111); 湖南省自然科学基金资助项目(2018JJ3382); 湖南省教育厅优秀青年项目(18B236); 湖南中医药大学“十三五”一级学科基础医学建设项目(06)

作者简介: 欧阳波, 博士研究生, 从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。Tel: (0731)88458258 E-mail: 1020192091@qq.com

***通信作者** 黄小平, 教授, 硕士生导师, 从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。Tel: (0731)88458258 E-mail: 569229858@qq.com

邓常清, 教授, 博士生导师, 从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。Tel: (0731)88458258 E-mail: dchangq@sohu.com

saponins (PNS) on cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) rat model through Notch signaling pathway. **Methods** SD rats were randomly divided into sham group, model group, borneol (7.5 mg/kg) group, AST IV (25 mg/kg) group, PNS (10 mg/kg) group, AST IV (10 mg/kg) + PNS (25 mg/kg) group, borneol (7.5 mg/kg) + AST IV (25 mg/kg) + PNS (10 mg/kg) low dose group, borneol (15 mg/kg) + AST IV (20 mg/kg) + PNS (50 mg/kg) high dose group and edaravone (4 mg/kg) group. Rats in sham group and model group were ig 0.5% CMC-Na, edaravone group was ip drug, and the other groups were ig corresponding drugs, twice a day with an interval of 12 h. The right middle cerebral artery of rat was blocked by a suture method 2 h after last administration to establish a CIRI model. After 2 h of ischemia and 22 h of reperfusion, the neurological function scores were scored and pathological changes of ischemic cortex in brain tissues of rats were observed by HE staining. The expressions of neuron specific nuclear (NeuN) and endothelial barrier antigen (EBA) in ischemic cortex of brain tissue were detected by immunohistochemistry. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), Notch1, and intracellular domain of Notch (NICD) in ischemic cortex of brain tissue were detected by Western blotting. **Results** The score of neural dysfunction and cell damage rate in model group were significantly increased ($P < 0.01$); The score of nerve function defect and rate of cell damage in each administration group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), the effect of borneol + AST IV + PNS group was better than that of single drug and AST IV + PNS group ($P < 0.05, 0.01$). NeuN and EBA protein expressions were significantly decreased in the ischemic cortex of model group ($P < 0.01$), while NeuN and EBA protein expressions were significantly enhanced in each administration group ($P < 0.05, 0.01$), and the effect of borneol + AST IV + PNS group was better than that of single drug and AST IV + PNS group ($P < 0.05, 0.01$). In model group, VEGF protein expression was increased significantly ($P < 0.05$), while NICD and Notch1 protein expression had no significant change. The expression of VEGF, NICD and Notch1 protein were significantly up-regulated in borneol + AST IV + PNS group ($P < 0.01$), and the effect of combination of three drugs was better than that of single drug and AST IV + PNS ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Borneol, AST IV, and PNS have the effects of preventing neuronal and cerebral microvascular damage after CIRI, and the effect of combination of three drugs was better than that of single drug and AST IV + PNS, which may be related to the activation of the Notch signaling pathway and up-regulation of VEGF expression, thereby, exerting protective effects on ischemic brain tissue.

Key words: borneol; astragaloside IV; *Panax notoginseng* saponins; cerebral ischemia reperfusion injury; neurons; microvascular

缺血性脑卒中是一种脑血管病变引起血流中断或减少, 导致脑组织缺血缺氧和变性坏死的疾病, 严重威胁人类健康。中医认为气虚血瘀是缺血性脑卒中的主要病机, 可用益气活血法治疗。黄芪和三七为益气活血配伍的常用药物, 黄芪甲苷 (astragaloside IV, AST IV) 和三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 分别为黄芪和三七的有效组分。AST IV 与 PNS 配伍符合缺血性脑血管病益气活血的治疗原则^[1]。课题组前期研究发现, AST IV 配伍 PNS 具有抑制脑缺血后神经细胞凋亡、抗缺血性脑损伤等作用^[2]。AST IV 和 PNS 相对分子质量较大且脂溶性低, 较难透过血脑屏障进入病变脑组织充分发挥作用, 而冰片具有“引药上行”的作用, 可促进药物成分透过血脑屏障。课题组最近研究表明, 冰片配伍后可促进 AST IV 和 PNS 的药物成分进入脑组织, 使药物向缺血再灌注侧大脑皮层富集^[3]。因此, 推测冰片、AST IV、PNS 3 种药物配伍能促进药物成分进入脑组织, 增强抗缺血性脑损伤的作用。本研究从 Notch 信号通路探讨冰片配伍 AST IV 和 PNS 对大鼠脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia/reperfusion injury, CIRI) 模型的神经保护作用及可能机制, 为其合理应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

冰片 (左旋龙脑, 质量分数为 86%, 批号 20170815) 购自湖北俊辉有限公司; AST IV (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 MUST-17022804)、PNS (批号 MUST-17060601) 购自成都曼思特生物科技有限公司。以上药物临用时分别以 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配制成冰片 (0.75、1.5 mg/mL)、AST IV (1.0、2.0 mg/mL)、PNS (2.5、5.0 mg/mL) 混悬液。依达拉奉注射液 (规格 10 mg/支, 批号 80-090104) 购自南京先声东元制药有限公司, 用时以生理盐水配制成质量浓度为 0.4 mg/mL 的溶液。

兔抗大鼠神经元特异性核蛋白 (neuron specific nuclear, NeuN) 多克隆抗体 (批号 A0951)、兔抗大鼠 activated Notch1 多克隆抗体 (批号 A2349)、兔抗大鼠内皮屏障抗原蛋白 (endothelial barrier antigen, EBA) 多克隆抗体 (批号 A1935)、兔抗大鼠 β -actin 多克隆抗体 (批号 AC026) 购自美国 Abclonal 公司; 兔抗大鼠血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体 (批号 ab32152) 购自美国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 SA00001-2) 购自美国

proteintech 公司; RIPA 裂解液 (批号 cw2333s) 购自康为世纪生物科技有限公司; ECL 化学发光液 (批号 GE2301) 购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司; 蛋白 Marker (批号 515683) 购自美国 Thermo Fisher 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 K176810E)、通用型二步法免疫组化检测试剂盒 (批号 PV-9000) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物合格证号 43004700037715, 于湖南中医药大学动物实验中心饲养, 许可证号 SKY (湘) 2013-0005。实验前适应性喂养 5~7 d, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

1.3 仪器

BX51 光学显微镜、凝胶成像分析仪、电泳/转膜装置 (美国 Bio-Rad 公司); Kopf 脑立体定位仪 (美国 David Kopf Instruments 公司); 激光多普勒血流仪 (瑞典 Perimed AB 公司); 石蜡切片机 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 CIRI 大鼠模型的制备

参照 Longa 等^[4]线栓法制备右侧大脑中动脉阻塞脑缺血模型。大鼠术前 12 h 禁食, ip 2%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉后仰卧位固定。于大鼠颈正中切开皮肤, 分离右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA)。将 ECA 结扎, 用动脉夹夹闭 CCA 和 ICA, 并在 ECA 上剪一小口, 插入生理盐水浸泡的鱼线线栓, 松开夹住 ICA 的动脉夹, 将线栓缓缓向颅内插入, 插入长度 18~20 mm。采用激光多普勒血流仪检测脑血流, 栓塞后脑血流量迅速下降, 降幅约为基础值的 70%, 则大脑中动脉阻塞局灶性脑缺血模型制备成功^[5]。缺血 2 h 后, 再次麻醉大鼠, 拔出线栓, 造成大鼠脑缺血 2 h、再灌注 22 h 的 CIRI 模型。假手术组仅分离 CCA、ECA、ICA, 不插入线栓。各组纳入 Bederson 评分^[6]1~3 分的大鼠, 剔除评分为 0 分或 4 分的大鼠。

2.2 动物分组与给药

根据课题组前期结果^[7], 将动物随机分为假手术组、模型组、冰片 (7.5 mg/kg) 组、PNS (25 mg/kg) 组、AST IV (10 mg/kg) 组、AST IV (10 mg/kg) + PNS (25 mg/kg) 组、冰片 (7.5 mg/kg) + AST IV

(10 mg/kg) + PNS (25 mg/kg) 低剂量组、冰片 (15 mg/kg) + AST IV (20 mg/kg) + PNS (50 mg/kg) 高剂量组、依达拉奉 (4 mg/kg) 组, 每组 15 只。术前 3 d, 假手术组、模型组 ig 0.5% CMC-Na (10 mL/kg), 依达拉奉组大鼠 ip 2.5 mL 药物, 其余各组 ig 2.5 mL 相应药物, 2 次/d, 间隔 12 h。末次给药后 2 h 造模, 缺血 2 h 后行再灌注, 再灌注期间同前给药, 再灌注 22 h 后检测。

2.3 神经功能评分

采用 Longa 评分法^[4]测定神经功能评分。0 分: 无明显神经功能缺失症状; 1 分: 轻度局灶性神经功能障碍 (不能完全伸展左侧前肢); 2 分: 中度局灶性功能障碍 (行走时向左侧旋转); 3 分: 重度神经功能障碍 (行走时向左侧倾倒); 4 分: 极重度神经功能障碍 (不能自发行走或意识丧失)。

2.4 脑组织病理检测

再灌注 22 h 后再次麻醉动物, 经心脏灌流生理盐水, 取脑, 去除小脑和脑干, 于 4%多聚甲醛固定 24~48 h。经视交叉平面处冠状切取 2 mm 厚脑组织, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 行常规 HE 染色。将切片于显微镜 (×400) 下, 随机取缺血皮质区的 5 个不重叠视野区观察损伤细胞, 损伤细胞表现为核固缩、核溶解、嗜酸性样变性、空泡样变性等改变。计数每个视野的细胞总数及损伤细胞数, 并计算细胞损伤率。

细胞损伤率 = 损伤细胞数/细胞总数

2.5 免疫组化法检测缺血脑组织 NeuN、EBA 蛋白表达

脑组织石蜡包埋, 制成 5 μm 切片, 常规脱蜡、脱水, 于枸橼酸钠缓冲液中微波修复抗原, PBS 漂洗, 3% BSA 封闭 30 min。分别滴加兔抗大鼠 NeuN 多克隆抗体 (1:500)、兔抗大鼠 EBA 多克隆抗体 (1:500), 4 °C 孵育过夜; PBS 漂洗, 滴加二抗, 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗, DAB 溶液显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封片。

于显微镜 (×400) 下观察, NeuN 阳性染色可见棕黄或棕褐色产物沉积于细胞胞质、突起, EBA 阳性着色可见棕黄或棕褐色产物沉积于微血管内皮细胞。随机选取 5 个视野, 用 Image J 图像分析系统分别计数 NeuN、EBA 阳性表达的平均吸光度值。

2.6 Western blotting 法检测缺血脑组织 VEGF、NICD、Notch1 蛋白表达

取患侧视交叉后 2~5 mm 脑组织 50 mg, 加入

1 mL RIPA 裂解液, 于冰上匀浆 30~50 次, 充分混匀静置 30 min 后, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定总蛋白量。取 80 µg 蛋白样品, 100 °C 水浴变性后, 于 110 V 恒压电泳 90 min, 200 mA 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 分别加入兔抗大鼠 VEGF 单克隆抗体 (1:1 000)、兔抗大鼠 Activated NOTCH1 多克隆抗体 (1:1 000)、兔抗大鼠 β-actin 多克隆抗体 (1:8 000) 孵育, TBST 洗涤 3 次后, 加入山羊抗兔二抗 (1:5 000), 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤, 加入 ECL 化学发光剂显影。用 Image Lab 图像分析软件测定蛋白相对表达量。

2.7 统计分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。先将各组数据进行方差齐性检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐者用 LSD 检验。方差不齐时先将数据进行对数转换后使之方差齐, 再同上分析。

3 结果

3.1 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对神经功能评分的影响

如表 1 所示, 假手术组大鼠无神经功能缺损症状。与假手术组比较, 模型组大鼠出现行动迟缓、提尾悬空时左前肢蜷缩、行走时向左侧转圈或倾倒等神经功能障碍体征, 神经缺失评分显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, AST IV+PNS 组、依达拉奉组和冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组大鼠神经功能缺失评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 高剂量组大鼠神经功能学评分显著降低 ($P < 0.05$)。与冰片组、AST IV 组、PNS 组比较, 冰片+

表 1 各组大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Neurological function scores of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分
假手术	—	0
模型	—	2.80 ± 0.45 ^{##}
冰片	7.5	2.60 ± 0.55 ^{●●■}
AST IV	10	2.40 ± 0.55 ^{●●■}
PNS	25	2.20 ± 0.45 ^{●■}
AST IV+PNS	10+25	2.00 ± 0.71 [▲]
冰片+AST IV+PNS	7.5+10+25	1.40 ± 0.55 ^{▲▲}
	15+20+50	1.20 ± 0.45 ^{▲▲*}
依达拉奉	4	1.60 ± 0.55 ^{▲▲}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$;
与 AST IV+PNS 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与冰片+AST IV+
PNS 低剂量组比较: [●] $P < 0.05$ ^{●●} $P < 0.01$; 与冰片+AST IV+PNS
高剂量组比较: [■] $P < 0.05$ ^{■■} $P < 0.01$, 下表同
^{##} $P < 0.01$ vs sham group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs AST IV + PNS group; [●] $P < 0.05$ ^{●●} $P < 0.01$ vs borneol + AST IV + PNS low dose group; [■] $P < 0.05$ ^{■■} $P < 0.01$ vs borneol + AST IV + PNS high dose group, same as below table

AST IV+PNS 低、高剂量组大鼠神经功能学评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组间无显著差异。

3.2 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对脑缺血皮质区形态的影响

如图 1、表 2 所示, 光镜下可见假手术组大鼠大脑皮质细胞结构完整, 形态规则, 核仁清晰可见, 细胞与细胞紧密排列, 间质无炎性细胞浸润, 偶尔可见细胞损伤改变。与假手术组比较, 模型组大鼠缺血皮质区细胞排列紊乱, 胞核不规整, 细胞核深染固缩或出现嗜酸性样变性, 细胞间隙增大, 间质水肿明显, 毛细血管管腔塌陷, 细胞

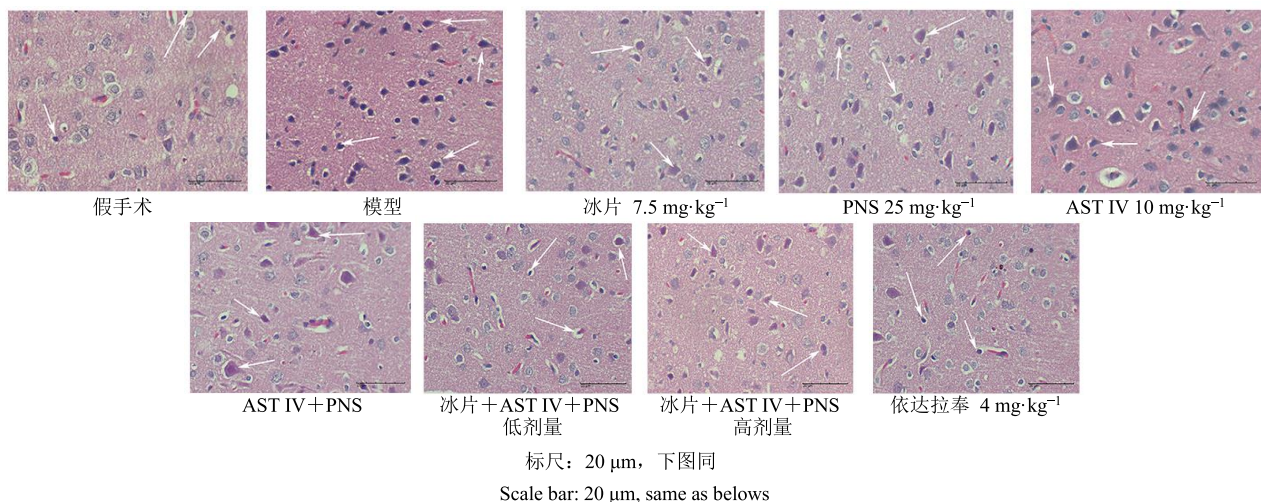


图 1 各组大鼠缺血皮质病理图 (HE, ×400)

Fig. 1 Pathomorphology pattern in ischemic cortex of different groups (HE, ×400)

表 2 各组大鼠缺血皮质区细胞损伤率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Cell damage rate in ischemic cortex of different groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	细胞损伤率/%
假手术	—	18.8±2.8
模型	—	61.0±5.4 ^{##}
冰片	7.5	40.3±5.5 ^{▲▲}
AST IV	10	49.3±6.4 ^{▲▲●●■}
PNS	25	47.2±4.4 ^{▲▲●●■}
AST IV+PNS	10+25	43.7±4.7 ^{▲▲■}
冰片+AST IV+PNS	7.5+10+25	36.9±6.5 ^{▲▲}
	15+20+50	36.2±8.8 ^{▲▲*}
依达拉奉	4	28.3±6.2 ^{▲▲**}

损伤率显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠缺血皮质区细胞轻度肿胀, 核固缩及嗜酸性样变性减少, 细胞间隙增大减轻, 细胞损伤率显著减少 ($P<0.01$)。与 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 高剂量组大鼠缺血皮质区细胞损伤率显著减少 ($P<0.05$)。与 AST IV 组、PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 低剂量组大鼠缺血皮质区细胞损伤率显著减少 ($P<0.01$); 与 AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS

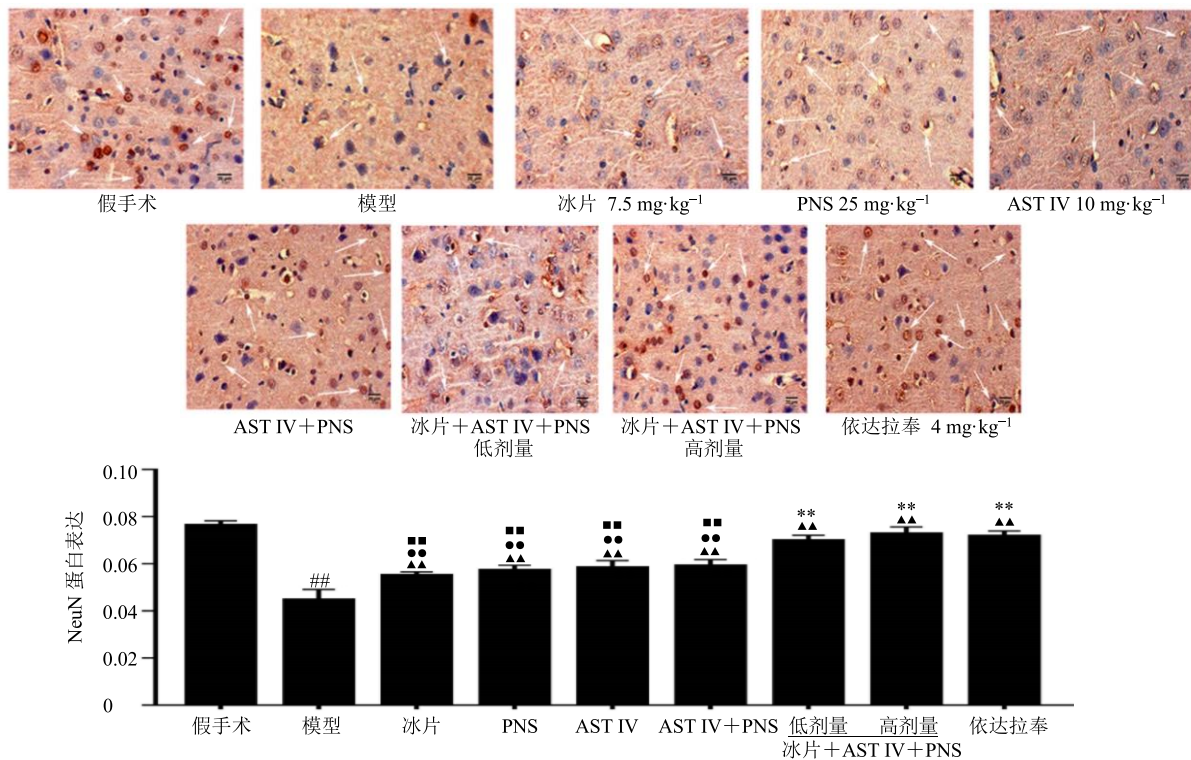
高剂量组大鼠缺血皮质区细胞损伤率显著减少 ($P<0.05, 0.01$)。冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组间无显著差异。

3.3 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对脑缺血皮质区 NeuN、EBA 蛋白表达的影响

如图 2、3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 NeuN、EBA 表达显著减少 ($P<0.01$)。与模型组比较, 冰片组、AST IV 组、PNS 组、AST IV+PNS 组、依达拉奉组和冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组大鼠 NeuN、EBA 表达显著增加 ($P<0.01$)。与 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组和依达拉奉组大鼠 NeuN、EBA 表达显著增加 ($P<0.01$)。与冰片组、AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 低、高剂量大鼠 NeuN、EBA 表达显著增加 ($P<0.01$)。冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组间 NeuN、EBA 表达无显著差异。

3.4 冰片配伍 AST IV 和 PNS 对脑缺血皮质区 VEGF、NICD、Notch1 蛋白表达的影响

如图 4-A 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠



与假手术组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{▲▲} $P<0.01$; 与 AST IV+PNS 组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与冰片+AST IV+PNS 低剂量组比较: ^{●●} $P<0.01$; 与冰片+AST IV+PNS 高剂量组比较: [■] $P<0.05$ [■] $P<0.01$, 下图同

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs sham group; ^{▲▲} $P<0.01$ vs model group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs AST IV+PNS group; ^{●●} $P<0.01$ vs borneol+AST IV+PNS low dose group; [■] $P<0.05$ [■] $P<0.01$ vs borneol+AST IV+PNS high dose group, same as belows

图 2 各组缺血皮层区 NeuN 表达 ($\times 400, \bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 2 Expression of NeuN in ischemic cortex of different groups ($\times 400, \bar{x} \pm s, n=5$)

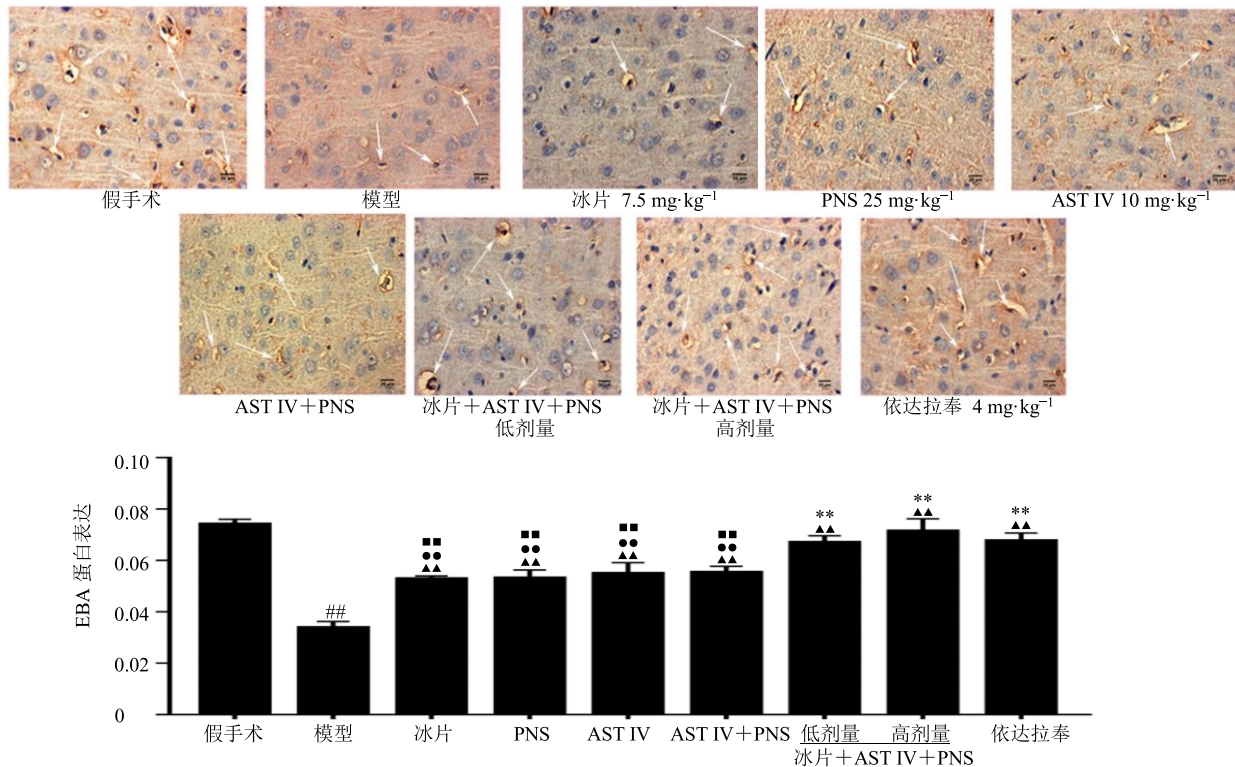


图 3 各组缺血皮层区 EBA 表达($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 3 Expression of EBA in ischemic cortex of different groups ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

脑缺血皮质区 VEGF 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组和依达拉奉组 VEGF 表达显著增加($P < 0.01$)。与 AST IV+PNS 组比较,冰片+AST IV+PNS 低剂量组 VEGF 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。与冰片组、AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组 VEGF 蛋白表达显著增加($P < 0.05$ 、 0.01)。冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组间无显著差异。

如图 4-B 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血皮质区 NICD 蛋白表达无显著差异。与模型组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组和依达拉奉组 NICD 表达显著增加($P < 0.01$)。与 AST IV+PNS 组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组 NICD 表达明显增加($P < 0.05$)。与冰片组和 AST IV+PNS 组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组 NICD 表达明显增加($P < 0.05$ 、 0.01)。冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组间无显著差异。

如图 4-C 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血皮质区 Notch1 表达无显著差异。与模型组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组 Notch1 表达显著增加($P < 0.01$)。与 AST IV+PNS 组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组 Notch1 表达显

著增加($P < 0.01$)。与冰片组、AST IV 组、PNS 组和 AST IV+PNS 组比较,冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组 Notch1 表达显著增加($P < 0.05$ 、 0.01)。冰片+AST IV+PNS 低、高剂量组间无显著差异。

4 讨论

课题组前期研究表明,AST IV 和 PNS 配伍具有增强抗脑缺血性损伤的作用^[8]。本研究表明,AST IV 和 PNS 配伍能显著降低大鼠 CIRC 模型神经功能缺失评分和细胞损伤率,冰片配伍 AST IV 和 PNS 后作用强于各药物单用及 AST IV、PNS 配伍,提示冰片与 AST IV、PNS 配伍可增强其抗脑缺血再灌注损伤的作用。

NeuN 是成熟神经元细胞核的特异性标记物^[9],反映神经元细胞的存活,可作为神经元损伤的标志。研究表明,脑缺血后自由基损伤、炎症反应等导致神经细胞损伤、凋亡和坏死^[10]。EBA 是一种表达于血管内皮的标记性蛋白^[11],Omura 等^[12]通过对脑损伤后血脑屏障恢复过程中的 EBA 定量检测,发现 EBA 是血管内皮细胞紧密连接的成分。因此,EBA 可以反映微血管的完整性。本研究表明,模型组大鼠缺血皮质区 NeuN、EBA 蛋白表达均显著减少,提示模型组大鼠缺血皮质区神经元和微血管损伤。冰片、AST IV、PNS、AST IV+PNS 与冰片+AST IV+

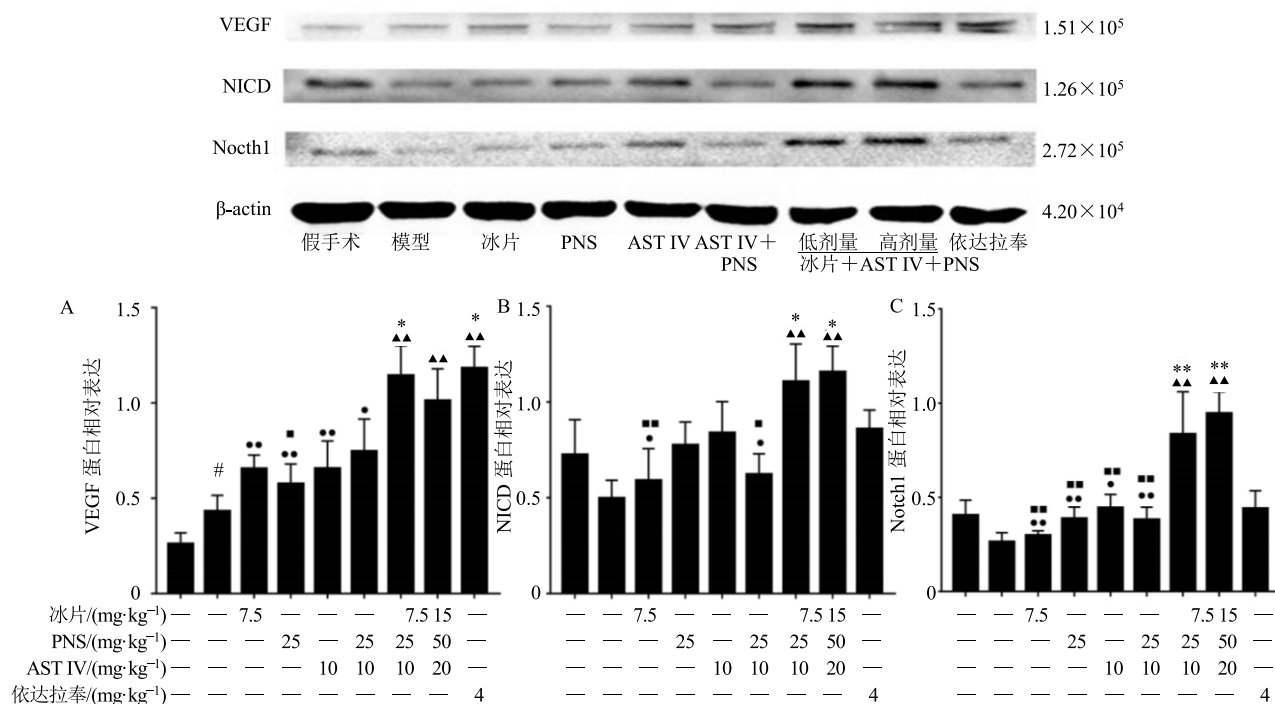


图 4 各组大鼠缺血皮质区 VEGF (A)、NICD (B)、Notch1 (C) 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 4 Protein expression of VEGF (A), NICD (B) and Notch1 (C) in ischemia cortex of different groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

PNS 能显著增强 NeuN、EBA 蛋白表达, 且冰片 + AST IV + PNS 的作用强于各药物单用及 AST IV + PNS。冰片、AST IV 和 PNS 能促进 CIRI 大鼠缺血皮质区 NeuN、EBA 蛋白表达, 且冰片配伍 AST IV 与 PNS 后, 可增强 NeuN、EBA 蛋白表达, 提示 3 种药物可减轻大鼠缺血皮质区的神经元和微血管的损伤, 3 种药物配伍后可增强其抗神经元及微血管损伤的作用。

VEGF 是目前发现的最强有力的血管生成因子^[13], 具有调节血管内皮细胞增殖和分化、血管新生等作用^[14]。PNS 能上调 CIRI 模型大鼠 VEGF mRNA 和蛋白表达, 促进缺血区血管新生^[15]。冰片与黄芪联用可促进黄芪透过血脑屏障, 增加 VEGF 表达, 促进脑血管再生^[16]。Notch 信号通路是一条高度保守的信号通路, 对调节微血管形成具有重要作用^[17]。NICD 蛋白是 Notch 信号通路被激活的标志^[18]。在小鼠脑缺血模型中过表达 Notch1, 发现缺血区过表达组的微血管数量和血液灌流量明显高于单纯损伤组^[19]。研究发现, 脑泰方通过上调 VEGF-Notch1 信号通路的表达, 从而促进血管生成, 发挥抗脑缺血损伤的作用^[20]。因此, 调控 Notch 信号通路, 上调 VEGF 的表达, 可促进脑缺血区微血管新生, 从而发挥抗脑缺血的作用。本研究表明, 模型组大鼠 VEGF 蛋白表达显著增加,

而 NICD、Notch1 蛋白表达水平无显著变化, 表明脑缺血可促使 VEGF 表达; 冰片 + AST IV + PNS 能显著上调 VEGF、NICD、Notch1 蛋白表达, 且 3 种药物配伍效应强于各药物单用及 AST IV + PNS, 表明冰片配伍 AST IV 与 PNS 可能通过激活 Notch 信号通路和上调 VEGF 表达, 促进微血管内皮细胞增生, 减轻脑微血管损伤, 从而促进神经功能恢复, 增强抗缺血性脑损伤作用。

综上所述, 相较于 AST IV 配伍 PNS, 冰片配伍 AST IV、PNS 对 CIRI 大鼠有更好的神经保护作用, 可能与药物配伍后能增强神经元保护作用 and 促进脑微血管增生有关。

参考文献

- [1] 谭 华, 黄小平, 邓常清. 黄芪总苷和三七总皂苷配伍对小鼠缺血再灌注脑组织氧化应激的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(5): 448-452.
- [2] 黄小平, 王 蓓, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 220-226.
- [3] 刘晓丹, 杨筱倩, 唐 三, 等. 冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1649-1656.
- [4] 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.

- [5] 刘宇, 孟然, 闫峰, 等. 激光多普勒血流仪评价活体大鼠脑中动脉栓塞模型成功的可行性分析 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3): 620-624.
- [6] 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.
- [7] 杨筱倩, 陈仙蕾, 杨仁义, 等. 冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷抗脑缺血再灌注损伤有效剂量的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(4): 441-447.
- [8] Huang X P, Tan H, Chen B Y, *et al.* Combination of total Astragalus extract and total *Panax notoginseng* saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(6): 445-452.
- [9] Kirino T. Delayed neuronal death [J]. *Neuropathology*, 2000, 20(S1): S95-S97.
- [10] 张业昊, 姚明江, 丛伟红, 等. 西红花提取物对局灶型脑缺血/再灌注大鼠线粒体分裂融合的影响 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(6): 770-775.
- [11] Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Cisternino S, *et al.* Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(1): 81-92.
- [12] Omura K, Ohbayashi M, Sano M, *et al.* The recovery of blood-nerve barrier in crush nerve injury--a quantitative analysis utilizing immunohistochemistry [J]. *Brain Res*, 2004, 1001(1/2): 13-21.
- [13] Li N, Wang P, Ma X L, *et al.* Effect of bone marrow stromal cell transplantation on neurologic function and expression of VEGF in rats with focal cerebral ischemia [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2299-305.
- [14] 潘之光, 毛颖, 孙凤艳. 血管内皮生长因子促损伤脑内神经血管单元的重构 [J]. 生理学报, 2017, 69(1): 96-108.
- [15] 蒋会慧, 王园园, 胡东华, 等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注 VEGF 表达的影响 [J]. 长江大学学报: 自科版, 2015, 12(12): 1-5.
- [16] 张青, 李茂利, 赵阳, 等. 黄芪加冰片对大鼠脑缺血再灌注损伤后 VEGF 表达的影响 [J]. 山东医药, 2010, 50(7): 88-89.
- [17] Hayase M, Kitada M, Wakao S, *et al.* Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(8): 1409-1420.
- [18] 曾洪艳, 彭宇婕, 王莹. Notch-1/NICD 信号在普罗布考保护大鼠急性脑缺血后再灌注损伤中的作用 [J]. 解剖学杂志, 2016, 39(6): 656-659.
- [19] 刘琦, 魏璐珊, 王颖, 等. Notch 信号通路在大鼠骨髓间充质干细胞移植后促进脑缺血区血管新生过程中的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(17): 4185-4187.
- [20] 宋祯彦, 周瑜, 王珊珊, 等. 中药脑泰方对大鼠脑缺血后 VEGF 和 Angiopoietins 表达的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(1): 19-22.