

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.009

天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠神经功能缺损评分及海马区 Nogo - A 和 LPA 蛋白表达的影响

陈红梅¹, 秦碧勇², 尤志珺^{1△}

(1. 湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北省武汉市江夏第一人民医院, 湖北 武汉 430200)

摘要:目的 探讨天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠神经功能缺损评分及海马区 Nogo - A 及溶血磷脂酸(LPA)蛋白表达的影响。方法 将 80 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、天丹通络胶囊低剂量组(40.0 mg/kg)、高剂量组(80.0 mg/kg), 每组 20 只, 雌雄各半。模型组、天丹通络胶囊各剂量组建立急性脑梗死模型。天丹通络胶囊各剂量组于造模成功第 1 天开始给予相应剂量药物灌胃, 持续给予 3 个月, 对照组和模型组给予等体积生理盐水。评价各组大鼠神经运动功能, 观察大鼠脑梗死区域病理改变, 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法及蛋白质印迹(Western Blot)法测定脑梗死海马组织 Nogo - A 及 LPA 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 治疗 7, 14 d 后, 模型组神经功能缺损评分、双侧贴肢去除时间、平衡木过杆时间、海马 Nogo - A 及 LPA 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组($P < 0.05$); 天丹通络胶囊低、高剂量组上述指标均明显低于模型组($P < 0.05$), 且随着天丹通络胶囊给药剂量的增加而逐渐降低($P < 0.05$); 对照组海马组织神经细胞正常; 模型组海马组织见大量坏死神经元, 呈缺血样病理改变, 空泡样变性坏死数量较多; 天丹通络胶囊高剂量组海马组织神经细胞坏死有明显改善; 天丹通络胶囊低剂量组神经元疏松紊乱, 但坏死神经元细胞减少。结论 天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠神经功能缺损有保护作用, 其作用机制可能与其通过抑制脑梗死海马区 Nogo - A 及 LPA 的 mRNA 和蛋白表达, 进而抑制神经元细胞的坏死与凋亡有关。

关键词:天丹通络胶囊; 急性脑梗死; 神经功能缺损; Nogo - A; 溶血磷脂酸

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0034-05

Effect of Tiandan Tongluo Capsules on Neurological Deficit Score and Nogo - A, LPA Protein Expression in Hippocampus of Rats with Acute Cerebral Infarction

CHEN Hongmei¹, QIN Biyong², YOU Zhijun¹

(1. Hubei People's Hospital Affiliated to Hubei Institute of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000; 2. Jiangxia District First People's Hospital, Wuhan, Hubei, China 430200)

Abstract: Objective To investigate the effect of Tiandan Tongluo Capsules on neurological deficit score and Nogo - A, lysobisphosphatidic acids(LPA) protein expression in hippocampus of rats with acute cerebral infarction. **Methods** Eighty SPF grade SD rats were randomly divided into four groups: control group, model group, Tiandan Tongluo Capsules low dose group(40.0 mg/kg), Tiandan Tongluo Capsules high dose group(80.0 mg/kg), 20 rats in each group, half male and half female. Acute cerebral infarction model was established in the model group and the two doses of Tiandan Tongluo Capsules groups. Each dose group of Tiandan Tongluo Capsules was given the corresponding dose of medicine by gavage on the first day after the successful model establishment, which lasted for 3 months. The rats in the control group and the model group were given the same volume of normal saline. At the end of the experiment, the neuromotor function, pathological changes of cerebral infarction area were examined, and the Nogo - A, LPA gene and protein levels in hippocampus were evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western Blot. **Results** The neurological deficit scores at 7, 14 d after treatment, the removal time of bilateral stickers, the passing time of the balance beam, the expression level of Nogo - A, LPA mRNA and protein in hippocampus in the model group were significantly higher than those in the control group($P < 0.05$). The low dose group and high dose group of Tiandan Tongluo Capsules were significantly lower than those in the model group($P < 0.05$). With the increase of the dosage of Tiandan Tongluo Capsules, the above indicators were gradually decreased($P < 0.05$). In the control group, the neurons were normal. In the model group, a large number of necrotic neurons were observed, which showed a lack of blood like pathological changes and a large number of vacuolated degeneration necrosis. In the high dose group of Tiandan Tongluo Capsules, the necrotic neurons were significantly improved. In the low dose group of Tiandan Tongluo Capsules, the neurons were loose and disordered, but the necrotic neurons were reduced. **Conclusion** Tiandan Tongluo Capsules has protective effect on the nerve function defect of rats with acute cerebral infarction, and its mechanism may be related to that Tiandan Tongluo Capsules can inhibit the neuron cell necrosis and apoptosis by inhibiting the Nogo - A, LPA mRNA and protein expression in the hippocampus of cerebral infarction.

Key words: Tiandan Tongluo Capsules; acute cerebral infarction; nerve function defect; Nogo - A; lysobisphosphatidic acids

第一作者: 陈红梅, 女, 在读硕士研究生, 住院医师, 研究方向为缺血性脑血管病, (电子信箱)1932350459@qq.com。

[△]通信作者: 尤志珺, 女, 博士研究生, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向为缺血性脑血管病, (电子信箱)zhijunyou@126.com。

急性脑梗死为常见脑血管疾病,有很高的发病率和死亡率,正在成为公共卫生的主要挑战^[1]。目前,重组组织纤溶酶原是治疗急性脑梗死临床最有效的药物,但有时时间窗限制,不良反应较多^[2]。氧自由基、神经元凋亡、兴奋性氨基酸的毒性及脑组织代谢异常引起的损伤与急性脑梗死的发生和发展有关,氧化应激是缺血-再灌注损伤的主要发病机制,且是导致脑梗死的重要原因^[3]。溶血磷脂酸(LPA)是一种新发现的细胞间磷脂类信号分子,常作为体内凝血或血栓形成启动的分子标志物,其可诱导血小板形态改变,促进血小板聚集和活化,而活化的血小板可释放LPA^[4]。勿动蛋白-A(Nogo-A)由中枢神经系统(CNS)少突胶质细胞及一些神经元产生,存在于髓鞘的内外环和少突胶质细胞的表面,与神经元的存活和发育密切相关,Nogo-A及LPA的产生与氧化应激密切相关^[5]。天丹通络胶囊主要功效为活血通络、熄风化痰,用于中风中经络、风痰瘀血痹阻脉络症,见半身不遂、偏身麻木、口舌歪斜、语言蹇塞,脑梗死急性期、恢复早期见上述证候^[6];具有抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡和神经保护作用,其抗氧化效力是 α -生育酚的500倍;毒性低和不良反应少,是心血管和神经系统疾病的有效治疗药物^[7]。本研究中探讨了天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠神经功能缺损评分及海马区Nogo-A及LPA蛋白表达的影响,为急性脑梗死的治疗提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:PRO-200型组织均质器(德国默克公司),VR-98型紫外分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司),ABI PRISM® 7300型RT-qPCR系统(美国Applied Biosystems公司);EC3型成像系统(美国Upland公司)。

试剂:天丹通络胶囊(山东凤凰制药股份有限公司,国药准字Z20010029,批号为C14001035399,规格为每粒0.4g);TRIzol®(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific公司,批号为65412);PrimeScript RT试剂盒(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific公司,批号为63541);放射免疫沉淀测定裂解缓冲液(Pierce Rockford IL,批号为52489);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific, Inc,批号为20154);10%聚丙烯酰胺凝胶电泳膜(polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, Sigma,批号为12547);聚偏二氟乙烯膜(美国赛默飞世公司,批号为AZ5486);TBS-T(含有0.05% Tween-20,碧云天科技公司;批号为1247);Nogo-A, LPA抗体(Cell Signaling Technology, Inc,目录号为2225S和65841,稀释度为1:1000); β -肌动蛋白抗体(武汉博斯特生物技术有限公司,目录号为BM0627,稀释度为1:300);

辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗(武汉博斯特生物技术有限公司,目录号为GA1014,稀释度为1:5000);ECL溶液(EMD Millipore, Billerica, MA,批号为2015633)。

动物:SPF级SD大鼠80只,7~8周,体质量250~280g,由苏州大学医学部实验动物中心提供[许可证号为SCXK(苏)2019-0012,合格证号为SCXK(苏)2018-0013]。该研究经医院动物伦理委员会批准。

1.2 动物分组、造模与给药

所有大鼠根据体质量随机分为对照组(A组)、模型组(B组)、天丹通络胶囊低剂量组(C₁组,40.0mg/kg)、天丹通络胶囊高剂量组(C₂组,80.0mg/kg),每组20只,雌雄各半。各组大鼠用水合氯醛(400mg/kg)麻醉并置仰卧位,直肠温度维持在(37.0±0.5)℃,手术暴露右颈总动脉,颈内动脉和颈外动脉,然后将颈外动脉分离并结扎。B组、C₁组、C₂组将4-0尼龙缝合线通过颈外动脉残端插入颈内动脉,并轻轻推进以闭塞大脑中动脉。闭塞90min后,小心地移除缝合线以恢复血流,闭合颈部切口,将大鼠放回温暖的笼子中。C₁组及C₂组于造模成功第1天开始给予相应剂量药物灌胃(天丹通络胶囊内容物,灌胃体积为每100g体质量1.0mL),持续给药3个月,A组和B组大鼠给予等体积生理盐水。

1.3 大鼠神经运动功能评价

神经系统检查:治疗7d及14d后,以盲法进行神经系统检查。使用0~5分制的神经功能缺损评分进行评估。0分,无神经功能障碍症状;1分,前爪无法完全伸展;2分,走路时向内旋转;3分,走路时向内倾斜;4分,无法自发行走和失去知觉;5分,完全无法行走。

双侧贴纸去除试验:动物术后14d,用2片边长10mm的正方形黏性纸将大鼠2个前肢掌面粘住(黏性程度以正常大鼠10s内将黏性纸咬掉为佳),将大鼠置测试圆筒中,大鼠会本能地将纸片咬掉。观察并记录大鼠去除两侧纸片的总时间,若120s内未去除纸片,记为120s^[8]。

平衡木行走试验:动物术后14d进行。平衡木为105cm×4cm×3cm木条,两端固定使木条离地80cm。起始点为陡峭平台,终点为一平台。记录大鼠四肢均通过整个平衡木的时间;超过120s未通过整个平衡杆记为120s,大鼠从平衡杆跌落记为超过120s未通过。测试前大鼠每天训练1次,共训练2d^[9]。

1.4 大鼠脑梗死结构观察

大体标本观察:造模后1h直接取脑,观察创伤区病理改变。鼠脑经-80℃冰箱速冻后,切取厚2mm创伤区冠状脑片,观察冠状剖面脑组织病理变化。

HE染色观察:造模后1d灌注取脑,常规制作厚6μm石蜡切片,按照产品说明书行HE染色,10倍及

200倍显微镜下观察创伤区病理变化。

1.5 大鼠海马组织 Nogo-A 及 LPA 基因水平检测

从海马标本中总共获得 100 g 组织,添加 1 mL TRIzol® 并与组织均质器混合搅拌,根据制造商的规程提取总 RNA。使用 VR-98 型紫外分光光度计检测总 RNA 浓度和纯度,并使用 PrimeScript RT 试剂盒进行反转录合成 cDNA。转录合成的 cDNA 产物储存在 -20℃ 下供以后使用。Nogo-A, LPA, GAPDH 引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司提供。GAPDH 被用作参考基因,各引物序列如下。Nogo-A:正向 5'-CCCGTGTGACGATGTAGCGCTAGA-3',反向 5'-TCGTAGCTATGC-GATACGTACACAAC-3';LPA:正向 5'-CTAGTAGC-TAGAAAGTCGCCTAAACGTG-3,反向 5'-CTAGT-CAATGCTAGCTTCGTTGTGACCCGTAGTAGCTGA-3;GADPH:正向 5'-CTAGAGGGGAAATCCTATCGATGA-CATAGTCAG-3,反向 5'-CTGACGTAGCTTGAAC-TATGCTAGCTTCGTTGTCTGATGCTGAT-3。使用 RT-qPCR 系统检测 Nogo-A 和 LPA mRNA 的表达。RT-qPCR 扩增反应的总体积为 25 μL,热循环仪条件如下:50℃ 2 min,95℃ Taq 酶活化 10 min,95℃ 15 s,然后 60℃ 1 min,共 40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 方法用于证明 Nogo-A 和 LPA 的相对表达。

1.6 大鼠脑梗死海马组织 Nogo-A 和 LPA 蛋白检测

使用放射免疫沉淀测定裂解缓冲液提取海马组织总蛋白样品,并使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白质(每泳道 100 ng 蛋白质)通过 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳膜分离,使用湿化学法转移到聚偏二氟乙烯膜上,并在室温下与 5% 脱脂奶粉一起搅拌并封闭 2 h;将膜用 TBS-T 洗涤 3 次,然后与 Nogo-A 及 LPA 抗体或 β -肌动蛋白抗体在 4℃ 下过夜。用 TBS-T 洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗一起在室温下孵育 1 h;此后,使用 ECL 溶液进行化学发光,并使用 EC3 成像系统对蛋白质条带进行可视化,并通过灰度定量使用 Image J 软件(美国国立卫生研究院)进行分析。重复操作 3 遍。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间的比较使用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠神经运动功能评分

治疗 7,14 d 后,B 组神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间明显高于 A 组($P < 0.05$);C₁ 组及 C₂ 组上述指标均明显低于 B 组($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加,7d 和 14 d 神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均逐渐降低($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠神经运动功能的比较($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 (mg/kg)	神经功能缺损评分(分)		双侧贴纸 去除时间(s)	平衡木过杆 时间(s)
		7 d	14 d		
A 组		0	0	26.59 ± 6.63	1.89 ± 0.39
B 组		10.96 ± 0.96*	8.46 ± 0.62*	103.48 ± 25.84*	16.48 ± 6.63*
C ₁ 组	40	8.49 ± 0.59**	5.69 ± 0.53**	80.85 ± 8.23**	12.59 ± 0.74**
C ₂ 组	80	6.69 ± 0.49** ^Δ	4.26 ± 0.45** ^Δ	51.42 ± 9.25** ^Δ	8.76 ± 0.63** ^Δ

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,** $P < 0.05$;与 C₁ 组比较,^Δ $P < 0.05$ 。下表同。

2.2 大鼠脑梗死海马结构

结果见图 1。可见,A 组海马组织神经细胞正常,B 组海马组织见大量坏死神经元,呈缺血样病理改变,空泡样变性坏死数量较多;C₂ 组海马组织神经细胞坏死有明显改善;C₁ 组神经元疏松紊乱,但坏死神经元细胞减少。

2.3 大鼠海马 Nogo-A 及 LPA 的 mRNA 和蛋白表达

B 组海马 Nogo-A 和 LPA 的 mRNA 表达水平明显高于 A 组($P < 0.05$);C₁ 组及 C₂ 组海马 Nogo-A 和 LPA mRNA 表达水平明显均低于 A 组($P < 0.05$),且随着天丹通络胶囊给药剂量的增加而逐渐降低($P < 0.05$)。B 组海马 Nogo-A 和 LPA 蛋白表达水平明显高于 A 组($P < 0.05$);C₁ 组及 C₂ 组海马 Nogo-A 和 LPA 蛋白表达水平明显低于模型组($P < 0.05$),且随着给药剂量的

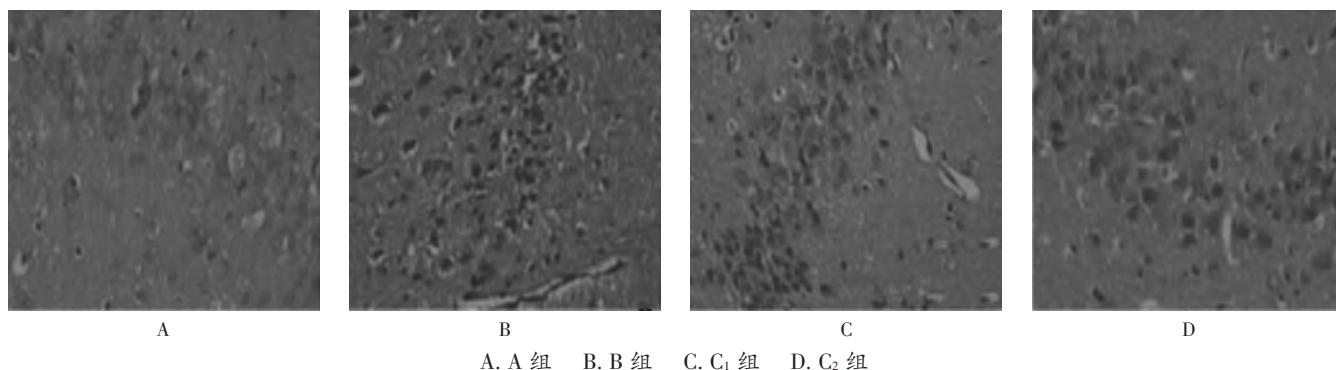


图 1 天丹通络胶囊对大鼠海马结构的影响(HE, ×200)

增加而逐渐降低 ($P < 0.05$)。详见表 2 及图 2。

表 2 天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠海马 Nogo-A 及 LPA 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响 ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 (mg/kg)	Nogo-A mRNA	LPA mRNA	Nogo-A 蛋白	LPA 蛋白
A 组		1.52 ± 0.41	1.69 ± 0.48	0.89 ± 0.36	1.29 ± 0.47
B 组		6.96 ± 0.39*	5.99 ± 0.59*	6.62 ± 0.39*	6.48 ± 0.59*
C ₁ 组	40	5.41 ± 0.54**	4.12 ± 0.59**	5.96 ± 0.48**	4.99 ± 0.42**
C ₂ 组	80	2.26 ± 0.49** [△]	2.15 ± 0.51** [△]	2.14 ± 0.53** [△]	2.26 ± 0.69** [△]

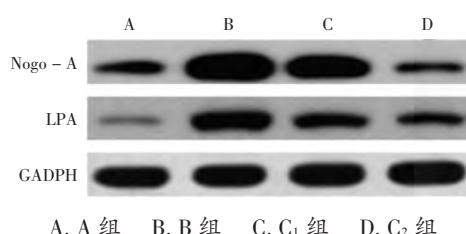


图 2 天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠海马 Nogo-A 和 LPA 蛋白表达水平的影响

3 讨论

急性脑梗死的病理基础为脑组织发生急性缺血,局灶性脑微血管内皮细胞受损,血脑屏障功能丧失,脑细胞发生细胞凋亡和坏死。天丹通络胶囊有抑制脑水肿、抗氧化应激损伤和调节神经营养因子如脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)表达的作用^[10]。本研究结果显示,B组7d和14d神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间明显高于A组,表明大鼠急性脑梗死模型建立成功,而天丹通络胶囊可明显降低7d和14d神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间,表明天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠神经功能缺损有保护作用。

药理学研究显示,天丹通络胶囊可抑制大鼠血小板聚集,促进已聚集的血小板解聚;可延长凝血酶原、凝血酶和白陶土部分凝血活酶时间,使大鼠凝血时间延长;缩短大鼠优球蛋白溶解时间;改善肌肉注射地塞米松磷酸钠引起的激素性血瘀大鼠全血黏度;可延长电流刺激所致大鼠动脉血栓形成的时间;降低结扎颈总动脉所致的急性脑缺血大鼠脑血管的通透性和脑组织的含水量;减轻电热阻断大鼠大脑中动脉所致脑缺血病变的程度^[11]。本研究结果显示,B组脑梗死组织见大量坏死神经元,呈缺血样病理改变,空泡样变性坏死数量较多;C₂组脑组织神经细胞坏死有明显改善;C₁组神经元疏松紊乱,但坏死神经元细胞减少,表明天丹通络胶囊能明显减少神经元细胞坏死。

脑梗死急性期,缺血区域中央带的神经元在几分钟内会发生不可逆坏死,出现相应的神经功能缺损症状,导致神经元凋亡和生物学功能丧失。故细胞凋亡在急性脑梗死的发生和发展中起重要作用。研究表明,Nogo-A可与凋亡途径中的某些保守成分,即半胱天冬酶

(Caspase)反应^[12],可直接促进Caspase活化。Caspase也是细胞凋亡途径的中心环节。Nogo-A还可促进哺乳动物中Caspase-1,Caspase-3,Caspase-6,Caspase-7,Caspase-8,Caspase-10的活化。Nogo-A在神经细胞表面相互作用,并参与受体和线粒体的凋亡途径。基于此,抑制Nogo-A的激活可能是脑梗死的重要治疗靶点。LPA在毛细血管附近的星形胶质细胞足突和室管膜细胞中组成性表达,通过充当血脑屏障(BBB)和血脑脊液屏障的关键成分来调节脑脊液稳态^[13]。在缺氧和局部缺血中,血脑屏障的破坏和血管通透性的增加与大脑中LPA的上调有关。LPA在脑缺血中上调,并与血脑屏障破坏、水肿形成和出血性转化密切相关。在急性脑缺血中,血脑屏障破坏与LPA的表达上调相关,可能加剧神经元损伤和治疗后的出血性转化。活化的LPA可直接破坏神经血管基质,如紧密连接蛋白(ZO-1, claudin-5, occludin)和基底膜(胶原蛋白IV,层黏连蛋白和纤连蛋白),并导致血脑屏障分解最终出血和水肿。动物实验表明,降低了活性LPA的上调,血脑屏障出血减少,进而减少脑梗死的发生^[14]。本研究结果显示,天丹通络胶囊明显降低了脑梗死海马区Nogo-A及LPA的mRNA和蛋白表达水平。表明天丹通络胶囊可能通过抑制脑梗死海马区Nogo-A及LPA的mRNA和蛋白表达水平,进而抑制神经元细胞的坏死与凋亡。

综上所述,天丹通络胶囊对急性脑梗死大鼠神经功能缺损有保护作用;其作用机制可能与天丹通络胶囊通过抑制脑梗死海马区Nogo-A及LPA的mRNA和蛋白表达水平,进而抑制了神经元细胞的坏死与凋亡有关。

参考文献:

- [1] WAN JL, MA ZW. The Value of Mean Platelet Volume for Prognosis of Patients with Acute Cerebral Infarction[J]. Clin Lab, 2017, 63(11):1801-1807.
- [2] NAI Y, LIU H, BI X, et al. Protective effect of astaxanthin on acute cerebral infarction in rats[J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(9): 929-936.
- [3] ZHANG YN, GUO ZN, ZHOU HW, et al. Fabry disease with acute cerebral infarction onset in a young patient[J]. Chin Med J(Engl), 2019, 132(4):477-479.
- [4] BAE GH, LEE SK, KIM HS, et al. Lysophosphatidic acid protects against acetaminophen-induced acute liver injury[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(12):e407.
- [5] LIU F, LIAO F, LI W, et al. Progesterone alters Nogo-A, GFAP and GAP-43 expression in a rat model of traumatic brain injury[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4):1225-1231.
- [6] 李成栋, 陈治林, 谭荣平, 等. 天丹通络胶囊治疗脑梗死患者颈动脉斑块48例[J]. 中医研究, 2013, 26(1):17-18.
- [7] 李言磊. 天丹通络胶囊联合长春西汀治疗急性缺血性脑卒中疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2016, 19(2):53-55.
- [8] 徐悦, 郑永强, 付蓓蓓. 复方脑肽节苷脂对脑缺血再灌注损伤