

Z-没药甾酮联合 11-羧基- β -乙酰乳香酸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的改善作用研究^Δ

汪继涛^{1*}, 刘天龙², 李玉文^{1,3#} (1. 苏州大学附属第一医院药学部, 江苏 苏州 215006; 2. 空军军医大学附属西京医院药学部, 西安 710032; 3. 四川大学华西医院临床药学部, 成都 610041)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)24-3354-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.24.07

摘要 目的: 研究 Z-没药甾酮(Z-GL)联合 11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA)对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的改善作用。方法: 将雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和 Z-GL+AKBA 低、高剂量组(二者低、高剂量均分别为 25、50 mg/kg), 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组均采用线栓法复制大脑中动脉闭塞/再灌注损伤模型。各给药组大鼠均于再灌注后灌胃相应药物, 假手术组和模型组大鼠灌胃等容二甲亚砷, 每 12 h 给药 1 次, 连续 7 d。采用改良 Longa 评分法评价各组大鼠的神经功能缺损情况, 采用苏木精-伊红染色法观察各组大鼠脑组织的病理学变化, 采用 TTC 法检测其脑梗死面积并计算脑梗死百分比, 采用 TUNEL 法检测其脑组织中在体细胞凋亡情况, 采用免疫荧光染色法、免疫印迹法分别检测其脑组织中 CD34、血管内皮生长因子(VEGF)、Delta 样配体 4(DLL4)的表达情况。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织皮层细胞数量减少且排列不规则, 可见明显梗死区, 并伴有新生血管明显减少; 其神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比均显著升高, TUNEL 阳性细胞数显著增多, CD34、VEGF、DLL4 的表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠上述症状均有明显改善, 其神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比均显著降低, TUNEL 阳性细胞数显著减少, CD34、VEGF、DLL4 的表达水平均显著升高, 且 Z-GL+AKBA 高剂量组神经功能缺损评分、脑梗死面积百分比、TUNEL 阳性细胞数均显著低于或少于低剂量组, CD34、DLL4 的表达水平均显著高于低剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: Z-GL 和 AKBA 联用可减轻脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经功能缺损, 改善其脑损伤; 这种作用可能与促进血管新生以及上调 VEGF、DLL4 蛋白的表达有关, 并具有一定的剂量依赖性。

关键词 脑缺血再灌注损伤; Z-没药甾酮; 11-羧基- β -乙酰乳香酸; 血管新生; 血管内皮生长因子; 神经功能缺损; 大鼠

提升药师能力及提高其待遇, 以稳定和推动药师队伍的建设。

参考文献

[1] 国务院办公厅. 国务院办公厅关于印发深化医药卫生体制改革 2012 年主要工作安排的通知[Z]. 2012.

[2] 重庆市人民政府办公厅. 重庆市人民政府办公厅关于印发重庆市全面推开公立医院综合改革实施方案的通知[Z]. 2017.

[3] 卫生部, 国家中医药管理局, 总后勤部. 医疗机构药事管理规定[S]. 2011.

[4] 罗宏丽, 张成斌, 肖顺林. 川南地区 35 家医院药事部门基本情况调查[J]. 中国药房, 2016, 27(12): 1593-1595.

[5] 曾露, 李娟. 医改背景下中国 15 省市医院药师现状调研[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1714-1717.

[6] 王瑜, 苏娜, 代国友, 等. 我国西南、西北地区医院药师地位与作用现状调查(一): 医院药师一般状况调查[J]. 中

国药房, 2015, 26(12): 1585-1588.

[7] 杜成凤, 钱妍, 邓丹. 医院临床药师药学服务能力及影响因素研究[J]. 中国药房, 2017, 28(17): 2436-2440.

[8] 教育部高等学校药学类专业教学指导委员会. 临床药学专业教学质量国家标准[EB/OL]. (2018-03) [2019-10-25]. <http://jzw.cpu.edu.cn/1046/list.htm>.

[9] 国家卫生部, 国家中医药管理局, 总后勤部卫生部. 关于印发医疗机构药事管理规定的通知[EB/OL]. (2011-03-30) [2019-10-25]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxwj/2013-04/0149da1f66bd483995xbboea51a354de1.shtml>.

[10] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴: 2018 年[R]. 2018.

[11] 国家卫生健康委员会. 关于政协十三届全国委员会第一次会议第 4055 号(医疗体育类 405 号提案答复的函)[EB/OL]. (2018-12-10) [2019-10-25]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/tia/201812/31ed1cbb95f244daaf52dbdaf57d7d65.shtml>.

[12] 王淑洁, 王育琴, 甄健存, 等. 北京地区医院药师规范化培训体系设计与实践[J]. 中国药房, 2011, 22(9): 788-790.

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81673631); 山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2016HQ37)

* 主管药师。研究方向: 中药药理学。电话: 0512-67780474。E-mail: wjt997018@163.com

通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 中药药理学。电话: 028-85422664。E-mail: liyuwenz@163.com

(收稿日期: 2019-03-04 修回日期: 2019-10-27)

(编辑: 陈宏)

Study on Improvement Effects of Z-guggulsterone Combined with Acetyl-11-keto- β -boswellic Acid on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

WANG Jitao¹, LIU Tianlong², LI Yuwen^{1,3} (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215006, China; 2. Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Dept. of Clinical Pharmacy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of Z-guggulsterone (Z-GL) combined with acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) on cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. METHODS: Male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Z-GL+AKBA low-dose and high-dose groups (25, 50 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for sham operation group, middle cerebral artery occlusion/reperfusion injury model was induced by suture method in other groups. Administration groups were given relevant medicine intragastrically after reperfusion; sham operation group and model groups were given constant volume of DMSO intragastrically, every 12 h, for consecutive 7 d. The neurological deficits were evaluated with modified Longa score; HE staining was performed to observe the pathological changes of cerebral tissue in rats; the area of cerebral infarction was measured by TTC, and the percentage of cerebral infarction area; TUNEL staining was performed to detect apoptotic neurons. The expression of CD34, VEGF and DLL4 were detected by immunofluorescence and immunoblotting assay, respectively. RESULTS: Compared with sham operation group, the number of cortical cells in the model group decreased and arranged irregularly, with obvious infarct area and obvious decrease of neovascularization; the neurological deficit score, the percentage of cerebral infarction area and TUNEL positive cells increased significantly, while the expression of CD34, VEGF and DLL4 decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the above symptoms of the rats in each administration group were significantly improved, the neurological deficit score, the percentage of cerebral infarction area and the number of TUNEL positive cells were significantly reduced; the expression levels of CD34, VEGF and DLL4 were significantly increased; the neurological deficit score, the percentage of cerebral infarction area and the number of TUNEL positive cells in Z-GL + AKBA high-dose group were significantly lower or less than low dose group; the expression of CD34 and DLL4 in high-dose group was significantly higher than low-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Z-GL combined with AKBA can relieve neurological deficit and cerebral injury of cerebral ischemia-reperfusion injury model rats, which may be related to promoting angiogenesis and up-regulating the expression of VEGF and DLL4 protein, with a certain dose-dependent effect.

KEYWORDS Cerebral ischemia-reperfusion injury; Z-guggulsterone; Acetyl-11-keto- β -boswellic acid; Angiogenesis; VEGF; Neurological deficit; Rats

缺血性脑卒中是严重危害人类健康的难治性疾病, 发病率、致残率和致死率均较高。脑卒中急性期西医溶栓治疗局限性大、风险性高, 大多数患者因超过治疗时间窗或其他禁忌证(如严重肝肾功能不全、近3个月有手术病史)而无法获得满意的治疗结局, 严重影响了患者的生活质量^[1]。中医药治疗脑卒中是中医学历代积累的宝贵财富。由于目前可用以改善患者脑循环的化学药有限, 而中医诸多活血化瘀药均具有改善脑循环的作用, 且中医治疗恢复期脑卒中患者具有一定的优势, 可调节患者整体机能、促进其神经功能恢复, 故中西医结合治疗已成为脑卒中治疗的有效途径之一^[2]。有研究指出, 促进缺血区结构及功能重建以及血管新生和神经再生对慢性恢复期患者的预后至关重要, 其中血管新生是其他脑细胞再生的“基石”, 但如何有效促进血管新生已成为脑缺血损伤治疗中亟待解决的重大医学难题之一^[1]。张锡纯在《医学衷中参西录》中有云, “乳香、没药, 为宣通脏腑、流通经络之要药”; 又曰“二药合用, 气血并治, 共奏宣通经络、活血祛瘀、消肿止痛、敛疮生肌之

功”^[3]。本课题前期已证实, 在短暂性大脑中动脉缺血模型大鼠中, 没药的主要成分Z-没药甙酮(Z-GL)和乳香有效成分11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA)均具有显著的抗脑缺血再灌注(CI/R)损伤作用, 且Z-GL可有效改善急性血瘀证模型大鼠的凝血和血管内皮功能^[4-6]。

目前, Notch信号通路因在血管生成中的重要作用及其与血管内皮生长因子(VEGF)的紧密关联逐渐成为CI/R相关研究的热点。其中, VEGF信号活化可促进Notch4通路的激活和Delta样配体4(DLL4)的表达, 而DLL4/Notch4信号的传递则有利于调控新生血管中特定类型细胞的密度和位置, 最终确保正常血管的形成^[7]。本课题组虽已证实了Z-GL和AKBA的脑保护作用, 但考虑到没药、乳香为传统中药药对, 二药常相兼而用, 且其主要成分联用对脑缺血损伤后血管新生的影响如何尚未见相关报道。为此, 本研究拟将没药和乳香的主要成分Z-GL、AKBA作为一个整体, 研究二者联用对CI/R后血管新生的影响, 并探讨可能的作用机制, 旨在为抗脑卒中药物的深入研究和开发提供理论支持。

1 材料

1.1 仪器

BX50/BX-FLA/DP70 型光学/荧光显微镜(日本 Olympus 公司);RM2235 型石蜡组织切片机(德国 Leica 公司);552BR 型垂直电泳槽、041BR74879 型电泳仪电源、GelDoc XR 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);5810R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);D7100 型数码相机(日本 Nikon 公司)。

1.2 药品与试剂

Z-GL 对照品(上海甄准生物科技有限公司,批号:12100905,纯度: $>98\%$);AKBA 对照品(美国 Sigma 公司,批号:21030320,纯度: $>95\%$);TUNEL 法检测试剂盒(批号:C1089)、辣根过氧化物(HRP)标记山羊抗兔 IgG 二抗(批号:A0208)、山羊血清(批号:C0265)均购自碧云天生物科技研究所;兔抗小鼠 CD34 抗体(批号:10CM130)、兔抗小鼠 VEGF 抗体(批号:10CM199)均购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗小鼠 DLL4 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:E1407);兔抗小鼠 β -actin 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:AE071755);Alexa Fluor[®] 594 标记驴抗兔 IgG 二抗(批号:A21207)、封片液(批号:P36980)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;不含脱氧核糖核酸酶(DNase)的蛋白酶 K 试剂(批号:39450)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色试剂(批号:T8170)均购自北京索莱宝科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂(上海沪峰化工有限公司,批号:G1120);ECL 检测试剂盒(美国 Merck Millipore 公司,批号:S0100);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 220~280 g,购自空军军医大学实验动物中心[动物使用合格证号:SYXK(陕)2014-001]。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

将大鼠随机分为 4 组,即假手术组、模型组、Z-GL+AKBA 低、高剂量组[二者剂量分别均为 25、50 mg/kg,以二甲亚砜(DMSO)为溶剂。剂量设置参考已有文献^[4-6,8-9];50 mg/kg Z-GL 可有效发挥抗异丙肾上腺素致心肌损伤的作用,故以其作为高剂量;将 25 mg/kg 作为低剂量。此外,没药、乳香为传统中药药对,两者配伍比例为 1:1,且根据前期急性毒性试验结果判定此剂量均无毒,每组 10 只。采用线栓法于室温环境下复制大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)损伤模型:所有大鼠腹腔注射 10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)进行麻醉后,以仰卧位固定,钝性分离颈总动脉、颈内动脉,并于颈总动脉分叉处开小口,将尼龙线沿颈总动脉插入颈内动脉直至有轻微阻力为止(深度约 18 mm),造成大脑中动脉闭塞;缺血 2 h 后,轻轻拔出尼龙线,恢复血流循环实现再灌注。假手术组大鼠除不插入线栓外,其余手术过程相

同。造模后,假手术组和模型组大鼠均灌胃等容 DMSO,各给药组灌胃相应药物,每 12 h 给药 1 次,连续 7 d。

2.2 神经功能缺损评分

末次给药后,根据改良 Longa 评分法评价各组大鼠的神经功能缺损情况。评分标准——0 分:四肢活动正常,无神经功能缺损;1 分:尾部垂直提起大鼠时可见左前爪呈屈曲状态,不能伸直;2 分:平地行走时大鼠向左侧倾斜,身体可向左侧旋转转圈;3 分:行走不稳,整个身体向左侧倾倒;4 分:有意识障碍或不能自主行走^[10]。根据首次神经功能缺损评分结果,将评分 0 分或 4 分、死亡、呼吸困难、生命体征不平稳或处死后发现有颅内出血的造模动物弃之不用,最终每组取 6 只大鼠进行后续研究。

2.3 组织病理学观察

采用 HE 染色法。所有大鼠麻醉后处死,取脑组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。经脱水、透明、浸蜡、包埋成蜡块,行冠状切片(厚度约 5 μ m)。切片经二甲苯脱蜡、不同浓度乙醇脱水后,依次用苏木精、伊红试剂染色,置于显微镜下观察各组大鼠脑组织的病理学变化。

2.4 脑梗死面积检测

采用 TTC 法。取大鼠脑组织,由心尖至心基底部将心室切成厚约 2 mm 的心肌切片,置于 3% TTC 试剂中,于 37 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,再于 4 $^{\circ}$ C 预冷的 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h。使用数码相机拍照后以 Image-Pro Plus 6.0 软件处理,并计算脑梗死面积百分比(脑梗死区为白色,正常脑组织为红色),脑梗死面积百分比=(总对侧半球面积-同侧半球总染色面积)/对侧半球总面积 $\times 100\%$ 。

2.5 在体细胞凋亡情况检测

采用 TUNEL 法。取大鼠脑组织,按“2.2”项下方法石蜡包埋后,切片(厚度约 5 μ m),经脱蜡、脱水后,加入 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K 试剂,于 20~37 $^{\circ}$ C 下反应 15~30 min;用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,加入 TUNEL 检测试剂 50 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h;用 PBS 清洗 3 次,以封片液封片后置于显微镜下观察,记录视野中 TUNEL 染色阳性细胞(即染成棕色的凋亡细胞)的数量。

2.6 脑组织中 CD34 表达情况检测

采用免疫荧光染色法。取大鼠脑组织,按“2.2”项下方法石蜡包埋后,切片(厚度约 5 μ m),并于 65 $^{\circ}$ C 烤片 2 h 后,常规脱蜡;柠檬酸盐修复 20 min,置于 3% 过氧化氢溶液中浸泡 10 min 以灭活内源性过氧化物酶;用 PBS 清洗 5 min $\times 3$ 次;滴加山羊血清封闭 15 min,弃去上清;加入 CD34 抗体(稀释度为 1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBST 溶液清洗 5 min $\times 3$ 次;加入 Alexa Fluor[®] 594 标记驴抗兔 IgG 二抗(稀释度为 1:500),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBST 溶液清洗 5 min $\times 3$ 次,中性树胶封片后置于荧光显微镜下观察,

使用 Image Pro Plus 6.0 软件处理,以 CD34 阳性表达细胞(即染色后呈红色的细胞)的荧光强度表示 CD34 的表达水平。上述试验重复 3 次。

2.7 脑组织中 DLL4、VEGF 蛋白表达情况检测

采用免疫印迹法。取大鼠脑组织,采用研磨法提取蛋白适量,于 95 °C 变性后,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳结束后转移至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂牛奶封闭 30 min。加入相应一抗(DLL4、VEGF、 β -actin)的稀释度分别为 1:1 000、1:1 000、1:2 000),4 °C 孵育过夜;用 TBST 溶液清洗 3 次,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(稀释度为 1:2 000),37 °C 孵育 1 h;TBST 溶液清洗 3 次,以 ECL 检测试剂盒显色后,置于凝胶成像系统上成像并使用 Quantity One v.2.0 软件处理,以相应蛋白与内参 β -actin 的灰度值比值表示该蛋白的表达水平。上述试验重复 3 次。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)或 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠神经功能缺损评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠神经功能缺损评分均显著降低,且高剂量组显著低于低剂量组($P < 0.01$),详见表 1。

表 1 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积百分比和 TUNEL 阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 Effects of Z-GL+AKBA on neurological score, the percentage of cerebral infarction area and the number of positive TUNEL cells in MCAO/R injury model rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	神经功能缺损评分,分	脑梗死面积百分比,%	TUNEL 阳性细胞数,个
假手术组	0	0	3 ± 2
模型组	12.50 ± 1.26*	43.00 ± 4.69**	53 ± 7**
Z-GL+AKBA 低剂量组	9.17 ± 1.07 [#]	31.00 ± 4.65 [#]	34 ± 3 [#]
Z-GL+AKBA 高剂量组	7.33 ± 1.25 ^{#Δ}	19.60 ± 3.44 ^{#Δ}	23 ± 3 ^{#Δ}

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与 Z-GL+AKBA 低剂量组比较, ^{Δ} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; vs. Z-GL+AKBA low-dose group, ^{Δ} $P < 0.01$

3.2 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠脑组织病理学的影响

假手术大鼠皮层细胞排列有序,且细胞结构清晰、致密,核仁清晰可见;模型组大鼠大脑皮层缺血灶周围细胞数量明显减少,且排列不规则,大多数核皱缩;各给药组大鼠上述症状均较模型组有所好转,详见图 1。

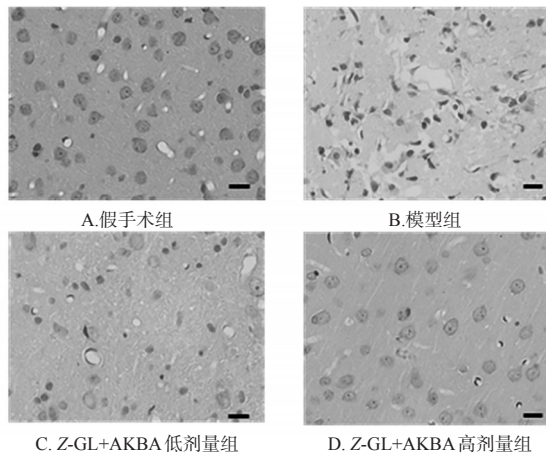


图 1 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠脑组织病理学的影响($\times 400$)

Fig 1 Effects of Z-GL+AKBA on cerebral pathology of MCAO/R injury model rats($\times 400$)

3.3 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠脑梗死区的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织可见明显的灰白色梗死区,其脑梗死面积百分比显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠的脑梗死区均有所缩小,脑梗死面积百分比均显著降低,且高剂量组显著低于低剂量组($P < 0.01$),详见图 2、表 1。

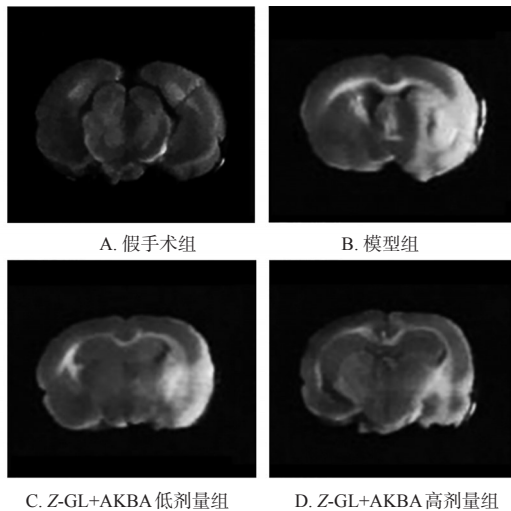


图 2 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠脑梗死区的影响

Fig 2 Effects of Z-GL + AKBA on infarct area of MCAO/R injury model rats

3.4 Z-GL+AKBA 对 MCAO/R 损伤模型大鼠 TUNEL 阳性细胞数的影响

假手术组大鼠脑组织中未见或可见少量 TUNEL 阳性细胞;模型组大鼠脑组织中可见大量 TUNEL 阳性细胞,其数量较假手术组显著增加($P < 0.01$);各给药组大鼠脑组织中 TUNEL 阳性细胞明显减少,其数量均较模型组显著减少,且高剂量组显著少于低剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图 3(图中,箭头表示 TUNEL 阳性细

胞)、表1。

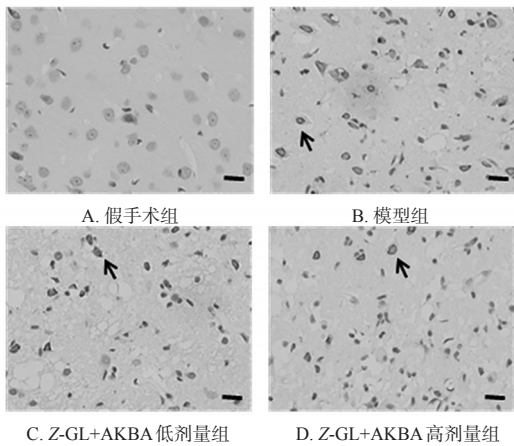


图3 Z-GL+AKBA对MCAO/R损伤模型大鼠TUNEL阳性细胞数的影响($\times 400$)

Fig 3 Effects of Z-GL + AKBA on the number of TUNEL positive cells of MCAO/R injury model rats ($\times 400$)

3.5 Z-GL+AKBA对MCAO/R损伤模型大鼠脑血管新生的影响

假手术组大鼠脑组织中血管丰富,形态清晰;模型组大鼠脑组织中新生血管明显减少,CD34的表达水平较假手术组显著降低($P < 0.01$);各给药组大鼠脑组织中新生血管明显增多,CD34的表达水平均较模型组显著升高,且高剂量组显著高于低剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图4、表2。

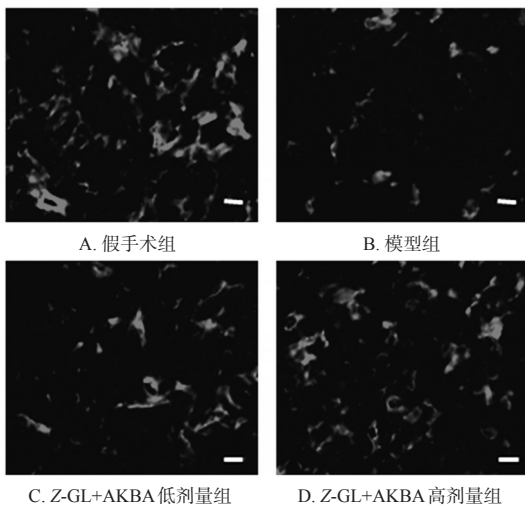


图4 Z-GL+AKBA对MCAO/R损伤模型大鼠脑组织中血管新生的影响($\times 400$)

Fig 4 Effects of Z-GL-AKBA on angiogenesis in brain tissue of MCAO/R injury model rats ($\times 400$)

3.6 Z-GL+AKBA对MCAO/R损伤模型大鼠脑组织中VEGF、DLL4表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中VEGF、DLL4的表达水平均显著降低($P < 0.01$);与模型组比

较,各给药组大鼠脑组织中VEGF、DLL4的表达水平均显著升高,且高剂量组DLL4的表达水平显著高于低剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图5、表2。

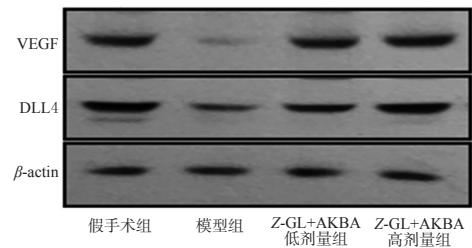


图5 Z-GL-AKBA对MCAO/R损伤模型大鼠脑组织中VEGF和DLL4表达的影响

Fig 5 Effects of Z-GL-AKBA on the expression of VEGF and DLL4 in brain tissue of MCAO/R injury model rats

表2 Z-GL-AKBA对MCAO/R损伤模型大鼠脑组织中CD34、VEGF、DLL4表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab 2 Effects of Z-GL-AKBA on the expression levels of CD34, VEGF and DLL4 in brain tissue of MCAO/R injury model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	CD34	VEGF	DLL4
假手术组	2.52 ± 0.41	5.16 ± 0.47	6.11 ± 0.81
模型组	1.17 ± 0.19**	1.15 ± 0.22**	1.18 ± 0.17**
Z-GL+AKBA低剂量组	1.59 ± 0.18 [#]	3.80 ± 0.60 ^{##}	3.00 ± 0.15 ^{##}
Z-GL+AKBA高剂量组	2.34 ± 0.38 ^{##Δ}	3.67 ± 0.53 ^{##}	4.73 ± 0.46 ^{##Δ}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; vs. low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

4 讨论

乳香、没药作为经典的活血化瘀药对,多见于名家典籍^[11]。《本草纲目》言,“乳香活血、没药散血,皆能止痛、消肿、生肌”;《海药本草》记载,二者“主折伤马坠,推陈出新,能生好血,研烂,以热酒调服”;《本草述》曰,“久服舒筋膜,通血脉,固齿牙,长须发”,故二药每每相兼而用。同时,没药、乳香也作为药对常见于中成药或方剂(如活络效灵丹、脑心痛胶囊)中。没药、乳香的有效成分Z-GL、AKBA均具有明显的抗CI/R损伤作用,但尚未见两种成分联用效果评价的相关文献。为此,本文在前期研究的基础上,对两药有效成分对MCAO/R损伤模型大鼠的改善作用及其对大鼠新生血管的影响进行了初步探讨。

血管新生属于中医学“生脉”范畴。益气活血生脉也包含有“祛瘀生新”的含义,瘀血去,则新血及新脉生,生新脉又反过来促进瘀血祛除^[12]。许多中药单体、单味药及中药复方都具有很好的促进血管新生的作用:余小平等^[13]发现,复方丹参片可通过增加急性脑缺血模型大鼠脑内VEGF和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达,从而促进缺血组织侧支循环的建立、改善神经功能;

田兆华等^[14]发现,补阳还五汤可调节局灶性脑缺血模型大鼠脑缺血区 VEGF 等的表达,增强血管内皮细胞的趋化作用,并促进其增殖、移行和分化以确保新生血管网络的建立。本研究采用 MCAO/R 损伤大鼠模型,考察了 Z-GL+AKBA 的脑保护作用。结果显示,假手术组大鼠未见神经功能异常,皮层细胞排列有序,无明显脑梗死区,未见或可见少量 TUNEL 阳性细胞。造模后,模型组大鼠大脑皮层缺血灶周围细胞数量明显减少,且排列不规则,可见明显的脑梗死区和大量的 TUNEL 阳性细胞,其神经功能缺损评分、脑梗死面积百分比、TUNEL 阳性细胞数均显著升高。经 Z-GL+AKBA 处理后,各给药组大鼠上述症状均有所好转,其神经功能缺损评分、脑梗死面积百分比、TUNEL 阳性细胞数均显著降低,且 Z-GL+AKBA 高剂量组上述指标均显著低于低剂量组。这提示二者联用可减轻模型大鼠的神经功能损伤,减少在体细胞凋亡,缩小其脑梗死面积,并具有一定的剂量依赖性。

脑缺血后血管新生是由多种细胞因子和信号通路共同参与的动态的、复杂的生理过程。其中,Notch 信号网络在调节血管出芽和分支形成,调控动静脉形成、内皮祖细胞分化和血管平滑肌细胞的成熟稳定的过程中发挥着重要的作用^[7]。在血管新生的调节通路中,配体 Jagged1 和 DLL4 通过与 Notch4 竞争性结合,共同调控血管新生相关信号的转导^[15]。Gridley T 等^[16]发现,内皮细胞 DLL4 表达上调,可激活邻近细胞 Notch4 受体,启动细胞内信号转导,诱导靶基因 *Hes3*、*Shh* 表达,促使血管形成。更深入的研究表明,减少 VEGF 的表达可使 DLL4 的表达受到抑制,最终导致内皮细胞增殖、迁移和血管网络形成受阻。这提示 VEGF-DLL4 信号通路对调节 Notch 级联信号转导通路、保证正常血管生成具有重要意义^[17]。本研究结果显示,模型组大鼠脑组织中的新生血管明显减少,CD34、VEGF、DLL4 的表达水平均显著降低。经 Z-GL+AKBA 处理后,大鼠脑组织中的新生血管有所增多,CD34、VEGF、DLL4 的表达水平均显著升高,且 Z-GL+AKBA 高剂量组 CD34、DLL4 的表述水平均显著高于低剂量组。这提示二者联用可促进血管内皮标志物(CD34)的表达,促进血管新生,并上调 VEGF、DLL4 的表达,且具有一定的剂量依赖性。

综上所述,Z-GL 和 AKBA 联用可减轻 MCAO/R 损伤模型大鼠的神经功能缺损,改善其脑损伤;这种作用可能与促进血管新生以及上调 VEGF、DLL4 蛋白的表达有关。本研究为没药-乳香药对治疗卒中提供了实验基础,但具体机制尚有待后续研究进一步完善;此外,乳香、没药配伍后,其有效成分(尤其是 Z-GL、AKBA)是否会发生变化,也有待于后续研究深入探讨。

参考文献

[1] ZURASKY JA, AIYAGARI V, ZAZULIA AR, et al. Early mortality following spontaneous intracerebral hemor-

rhage[J]. *Neurology*, 2005. DOI: 10.1212/01.WNL.00001-52045.56837.58.

[2] 中国中西医结合学会神经科专业委员会.中国脑梗死中西医结合诊治指南:2017[J].中国中西医结合杂志, 2018,38(2):136-144.

[3] 文雯,张朋.乳香、没药现代药理学研究与临床应用[J].河南中医,2009,29(2):204-206.

[4] LIU TL, LIU MN, ZHANG TJ, et al. Z-guggulsterone attenuates astrocytes-mediated neuroinflammation after ischemia by inhibiting toll-like receptor 4 pathway[J]. *J Neurochem*, 2018,147(6):803-815.

[5] DING Y, CHEN MC, WANG M, et al. Neuroprotection by acetyl-11-keto-b-boswellic acid, in ischemic brain injury involves the Nrf2/HO-1 defense pathway[J]. *Sci Rep*, 2014. DOI:10.1038/srep07002.

[6] 李宏力,李玉文,刘天龙,等. Z-没药甾酮对急性血瘀模型大鼠凝血和血管内皮功能的改善作用及其机制研究[J].中国药房,2016,27(19):2615-2617.

[7] JIN Y, KALUZA D, JAKOBSSON L. VEGF, Notch and TGF β /BMPs in regulation of sprouting angiogenesis and vascular patterning[J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(6):1576-1583.

[8] CHANDER R, RIZVI F, KHANNA AK, et al. Cardioprotective activity of synthetic guggulsterone (E and Z-isomers) in isoproterenol induced myocardial ischemia in rats: a comparative study[J]. *Indian J Clinical Biochem*, 2003,18(2):71-79.

[9] 陈婷,宿树兰,段金殿,等.乳香-没药配伍前后化学成分溶出变化及其对 LPS-诱导的巨噬细胞产生 NO 的影响[J].中国中药杂志,2013,38(2):179-185.

[10] 程发峰,宋文婷,郭少英,等.神经功能损伤评分在大鼠脑缺血实验中的应用[J].中国比较医学杂志,2011,21(3):43-48.

[11] 朱小芳,管咏梅,刘莉,等.乳香、没药药对的研究进展[J].江西中医药,2016,47(12):72-75.

[12] 谭峰,莫新民.缺血性脑血管病血管新生的研究概况[J].湖南中医药大学学报,2007,27(4):76-77,80.

[13] 余小平,张超群,覃仁安,等.复方丹参片对急性脑缺血大鼠血管新生因子影响的研究[J].中华中医药学刊,2011,29(5):1145-1147.

[14] 田兆华,刘柏炎.补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响[J].中国动脉硬化杂志,2010,18(3):193-198.

[15] BENEDITO R, ROCA C, SORENSEN I, et al. The Notch ligands DLL4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis[J]. *Cell*, 2009,137(6):1124-1135.

[16] GRIDLEY T. Notch signaling in vascular development and physiology[J]. *Development*, 2007, 134(15):2709-2718.

[17] GRIDLEY T. Vascular biology: vessel guidance[J]. *Nature*, 2007, 445(7129):722-723.

(收稿日期:2019-07-12 修回日期:2019-11-25)
(编辑:张元媛)