

实验研究

黄连解毒汤有效部位调控 VEGF 表达对中动脉栓塞大鼠海马神经元的保护

龙建飞¹ 张秋霞¹ 邹海艳¹ 赵 晖¹ 王 蕾¹ 边宝林² 赵海誉²

(1 首都医科大学中医药学院中医络病研究北京市重点实验室,北京,100069; 2 中国中医科学院中药研究所,北京,100700)

摘要 目的:观察黄连解毒汤有效部位(总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜)对中动脉栓塞大鼠海马神经元的保护作用。并通过检测缺血中心区(尾壳核)和远隔脑区(海马)血管内皮生长因子 VEGF 的表达,探讨其作用机制。方法:建立中动脉栓塞大鼠模型,免疫荧光染色技术观察神经元核蛋白 NeuN 及血管内皮生长因子 VEGF 的表达。结果:脑缺血 7 d 大鼠海马神经元核蛋白 NeuN 表达下调,尾壳核、海马 VEGF 免疫染色强度降低,差异较假手术组有统计学意义($P < 0.05$)。黄连解毒汤水提取物和总黄酮可提高海马神经元 NeuN 表达($P < 0.05$);总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜组大鼠海马 CA1 区 VEGF 表达较模型组增强($P < 0.05$);总黄酮还可明显上调尾壳核 VEGF 表达($P < 0.01$)。结论:黄连解毒汤总黄酮对缺血中心区、远隔脑区 VEGF 均有调节作用,可减轻脑梗死远隔部位海马 CA1 区神经元继发性损害。

关键词 黄连解毒汤;中动脉栓塞;神经核抗原;VEGF

Active Fractions of Huanglian Jiedu Decoction Regulating the Expression of VEGF and Protecting the Hippocampal Neurons of Rats with Middle Cerebral Artery Occlusion

Long Jianfei¹, Zhang Qiuxia¹, Zou Haiyan¹, Zhao Hui¹, Wang Lei¹, Bian Baolin², Zhao Haiyu²

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Key Laboratory for Collateral-Disease Theory of TCM, Beijing 100069, China; 2 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100070, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Huanglian Jiedu Decoction (HLJDDAF) which consists of total alkaloids, total flavonoids and total iridoids on the expression of VEGF in caudate putamen and hippocampal CA1 region of rats after middle cerebral artery occlusion and to explore the mechanism of the effects. **Methods:** Cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion (MACO). The expressions of NeuN and VEGF were observed by immunofluorescence staining. **Results:** The expression of NeuN in distant brain regions of rats in model group were significantly reduced, and the expression of VEGF in caudate putamen and hippocampal region were reduced compared with those of the sham group ($P < 0.01 - 0.05$). Aqueous extract, total flavonoids were capable of increasing the expression of the NeuN compared with those of the model group ($P < 0.01 - 0.05$); total alkaloids, total flavonoids and total iridoids were capable of increasing the expression of the VEGF in hippocampal CA1 region compared with those of the model group ($P < 0.01 - 0.05$). Especially the total flavonoids also increased the expression of VEGF in caudate putamen ($P < 0.01$). **Conclusion:** Total flavonoids of HLJDD is inherently capable of regulating the expression of VEGF in caudate putamen and distant brain regions, and reducing hematogenously secondary damage of hippocampal CA1 region after cerebral infarction.

Key Words HLJDDAF; Middle cerebral artery occlusion; NeuN; VEGF

中图分类号:R289.9;R-332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.10.023

临床和实验研究表明,大脑中动脉缺血后,脑梗死损害并不仅仅限于梗死灶局部,远隔缺血脑区海马 CA1 区也会出现神经元变性^[1]。采取有效手段减轻脑梗死远隔部位继发性损害,对卒中康复具有重要意义。

黄连解毒汤源于唐·王焘《外台秘要》,可用于急性脑卒中及脑血管后遗症的临床治疗^[2-4],本研究重点观察黄连解毒汤水提取物 3 个主要有效部位(总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜)对中动脉栓塞大鼠海马神经元标记

基金项目:国家科技支撑计划课题“中药有效成分群功效关联性评价技术研究”(编号:2008BAI51B02);北京市自然科学基金(编号:7102014,编号:7122018);北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划-长城学者项目资助(编号:CIT&TCD20140329);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(编号:PXM2011014226)

作者简介:龙建飞,女,2012 级在读硕士研究生,E-mail:ljbefijing2012@163.com

通信作者:赵晖,女,博士研究生,副教授,E-mail:zhaohui8957@sina.com;王蕾,女,博士研究生,教授,E-mail:tmwangl@ccmu.edu.cn

蛋白 NeuN 表达的影响,并通过检测缺血中心区(尾壳核)和远隔脑区(海马)血管内皮生长因子 VEGF 的表达,探讨黄连解毒汤对脑梗死后远隔脑区继发性损害的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 320 ~ 350 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。饲养在首都医科大学实验动物中心。实验条件下自然饮食,适应环境 3 d 后进行实验。

1.2 受试药物 黄连解毒汤水提物及 3 个有效部位(总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜),由中国中医科学院中药研究所提供。水提取物粉末得率为 20%;总生物碱主要成分有黄连碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀,质量分数为 48.50%;总黄酮主要成分是黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素,质量分数为 32.22%;总环烯醚萜主要成分是栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷,质量分数为 43.08%。

1.3 试剂 鼠抗 NeuN (Millpore, Cat. #MAB377, Lot# 1991263);兔抗 VEGF (Abcam, 批号: ab46154);二抗: Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG、Dylight 594 - 山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥有限公司)。

1.4 仪器 全自动脱水机 (BLEICA ASP300 型,德国);轮转式石蜡切片机 (LEICA RM2235 型,德国);摊片机 (LEICA HI1210 型,德国);包埋机 (LEICA EG1150H 型,德国);Nikon 生物显微镜、NIS - Elements Basic Research 图像采集分析系统(日本)。

2 方法

2.1 中动脉栓塞大鼠模型制备 参照文献^[5]制作。大鼠麻醉后,分离右颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),同侧颈总动脉永久结扎,于 ECA 与 ICA 分叉处作一切口,将制备好的线栓沿 CCA 顺行插入,插入深度为距动脉分叉 17 ~ 18 mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。动物入选的标准:大鼠麻醉清醒后出现明显左侧偏瘫体征(不能完全伸展左前肢、行走时向左侧倾倒或转圈者)纳入,无此体征者被弃去。

2.2 分组、给药 黄连解毒汤 3 个有效部位的给药剂量由药理实验动物与人体临床等效剂量换算而成。实验大鼠随机分为 5 组:假手术组、模型组、总生物碱组 44 mg/kg、总黄酮组 50 mg/kg、总环烯醚萜组 80 mg/kg。造模后 2 h 给药组大鼠灌胃给药 1 次,造模 24 h 再次灌胃给药,连续给药 7 d, 1 次/d, 给药体积为 0.5 mL/100 g。假手术组、模型组灌胃等容量生理盐水。

2.3 取材与标本处理 缺血 7 d 后,每组随机取 4 只大鼠,麻醉后,进行 4% 多聚甲醛心内灌注固定,恒定灌注时间 45 min,待固定充分后,开颅取脑,切取视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 组织块,投入相同固定液于 4 ℃ 固定 1 周后,常规石蜡包埋,切片。

2.4 免疫荧光组织化学染色 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (PH6.0) 20 min 修复抗原,10% 羊血清封闭,每片滴加一抗 70 μL (NeuN 抗体稀释 1:100、VEGF 抗体稀释 1:200),于湿盒中 4 ℃ 孵育 40 h。每片滴加二抗试剂 70 μL,室温孵育 2 h 后,0.01M PBS 洗涤,DAPI 封片。

2.5 图像处理 NIS - Elements Basic Research 图像采集分析系统采集每张切片右侧(缺血侧)远隔脑区海马 CA1 区以及缺血脑区尾壳核相互不重叠的 5 个视野,分析每个视野的阳性表达,以荧光强度反映阳性表达的免疫强度。

2.6 统计学处理 所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用美国 Chicago SAS 公司的 SPSS 11.5 版软件进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 黄连解毒汤有效部位对中动脉栓塞大鼠海马神经元 NeuN 表达的影响 NeuN 为神经细胞特异性抗体,可反映神经元损伤程度。图像分析结果显示,脑缺血 7 d 大鼠海马 CA1 区神经元 NeuN 表达较假手术组明显下调 ($P < 0.05$)。水提取物和总黄酮可明显提高海马 CA1 区神经元 NeuN 荧光强度,与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。(见表 1)

表 1 黄连解毒汤有效部位对海马 CA1 区神经元 NeuN 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, 例数 = 4)

组别	剂量 (mg · kg ⁻¹)	荧光强度
假手术	-	1410.59 ± 673.60*
模型	-	892.55 ± 481.11
水提取物	800	1447.45 ± 988.36**
总生物碱	44	764.48 ± 617.70
总黄酮	50	1382.20 ± 799.60*
总环烯醚萜	80	1204.70 ± 631.36

注:与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.2 黄连解毒汤有效部位对中动脉栓塞大鼠 VEGF 表达的影响 VEGF 是血管新生的正性调节因子,同时又是一个多效性的神经保护因子。图像分析结果显示:脑缺血 7 d 大鼠海马 CA1 区、尾壳核 VEGF 表达较假手术组明显下调 ($P < 0.05$);黄连解毒汤水提取物及 3 个有效部位总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜均可明显上调海马 CA1 区 VEGF 表达 ($P < 0.05$),总黄酮还可增强缺血中心区尾壳核 VEGF 的荧光强度,较模型组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。(见表 2)

表2 黄连解毒汤有效部位对脑缺血大鼠 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, 例数 = 4)

组别	剂量 (mg/kg)	尾壳核 海马 CA1 区 荧光强度	
		尾壳核	海马 CA1 区
假手术	-	69.80 ± 45.83 *	91.09 ± 34.73
模型	-	159.66 ± 104.19	49.13 ± 25.68
水提取物	800	172.98 ± 93.99	115.40 ± 96.91 **
总生物碱	44	146.63 ± 76.30	92.17 ± 81.87 *
总黄酮	50	310.38 ± 247.86 **	112.97 ± 92.42 **
总环烯醚萜	80	200.13 ± 158.57	103.43 ± 78.77 *

注:与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

附图:

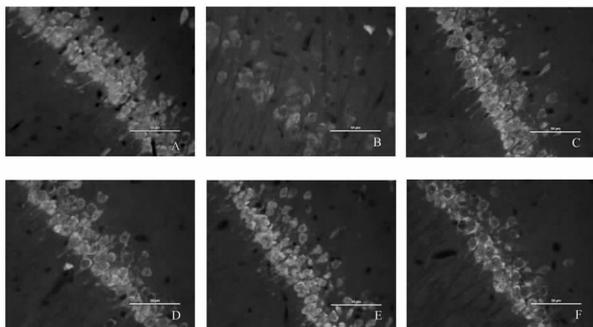


图1 黄连解毒汤有效部位对大鼠脑缺血7d海马CA1区神经元 NeuN 表达的影响(免疫荧光染色, ×400)

A 假手术组; B 模型组; C 水提取物组; D 总生物碱组;
E 总黄酮组; F 总环烯醚萜组。

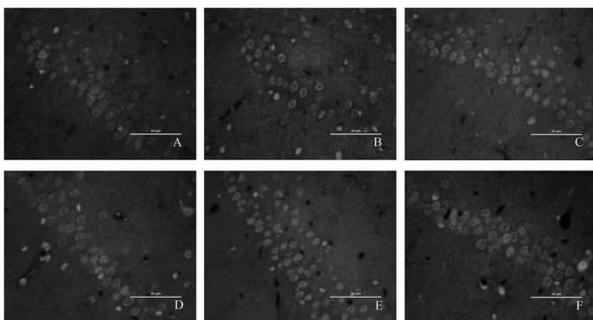


图2 黄连解毒汤有效部位对大鼠脑缺血7d后海马CA1区 VEGF 表达的影响(免疫荧光染色, ×400)

A 假手术组; B 模型组; C 水提取物组; D 总生物碱组;
E 总黄酮组; F 总环烯醚萜组。

4 讨论

NeuN 是神经元的标志蛋白,在缺血、缺氧、神经损伤等多种病理条件下,NeuN 免疫活性的降低可诱导神经元的死亡^[6]。在本次实验中我们观察到中动脉栓塞7d大鼠海马CA1区神经元 NeuN 表达明显减弱,结果进一步证实大脑中动脉栓塞后并不直接影响海马的供血,却引起了海马神经元变性^[1]。同时我们注意到,伴随神经元 NeuN 免疫活性降低,缺血中心区尾壳核及远隔脑区海马血管内皮生长因子 VEGF 表达明显下调。结果提示,中动脉栓塞后远隔缺血区海马神经元

变性,与血管内皮生长因子的表达变化存在必然的联系。

黄连解毒汤源于唐·王焘《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成,为清热解毒代表方。基础研究与临床报道表明黄连解毒汤可用于治疗缺血性脑血管病^[2,7-11]。本次实验重点对黄连解毒汤3个主要有效部位总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜防治脑梗死后远隔部位继发性损害的作用进行了研究。结果显示,黄连解毒汤水提取物及有效部位总黄酮可明显增强中动脉栓塞大鼠海马CA1区 NeuN 阳性表达,提示总黄酮是黄连解毒汤减轻海马CA1区神经元损伤的主要有效部位。VEGF 是高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂因子^[12],不仅可诱导内皮细胞增殖及毛细血管瓣生成,促进微血管形成,有利于侧支循环的建立^[13-14],还能直接作用于皮质、海马、小脑神经细胞,发挥神经营养效应和神经再生作用^[12-15]。已有报道表明,黄连解毒汤可促进 VEGF 表达^[16],对多种因素诱导的神经细胞损伤具有保护作用^[17-18]。在此基础上,我们进一步分析了黄连解毒汤总生物碱、总黄酮、总环烯醚萜对中动脉栓塞大鼠缺血中心区尾壳核及缺血远隔脑区海马 VEGF 表达的影响,结果发现总黄酮、总生物碱、总环烯醚萜均可增加远隔脑区海马 VEGF 表达,而总黄酮还可明显上调缺血中心区 VEGF 表达。综合本次实验结果,我们认为黄连解毒汤总黄酮可通过调节缺血中心区、远隔脑区血管内皮生长因子,发挥神经营养效应,对减轻脑梗死后远隔部位继发性损害具有重要意义。

参考文献

- [1] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia[J]. Brain research, 1982, 239(1): 57-69.
- [2] 李锐明. 黄连解毒汤治疗脑梗死急性期火热证 32 例临床观察[J]. 福建中医药, 2010, 41(5): 16-17.
- [3] 陈隐漪. 黄连解毒汤对急性脑梗死患者的血清 IL-6、TNF-α 的影响[J]. 首都医药, 2007(8): 35-36.
- [4] 陈国华, 单萍, 邱昕. 黄连解毒汤治疗老年性痴呆(心肝火旺型)临床研究[J]. 中国中医急症杂志, 2007, 16(4): 386-387, 434.
- [5] 田金洲. 血管性痴呆[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 598-607.
- [6] Kirino T. Delayed neuronal death[J]. Neuropathology, 2000, 20(7): S95-S97.
- [7] 青发基. 加味黄连解毒汤治疗急性脑梗死 48 例临床观察[J]. 安徽中医临床杂志, 2001, 13(5): 329-330.
- [8] 张建平. 黄连解毒汤为主治疗急性脑血管病 50 例[J]. 实用中医药杂志, 1998, 14(9): 10.

(下接第 1337 页)

紊乱具有一定的改善作用。

我国传统中药很多具有保肝作用,如五味子,始载于《神农本草经》,有收敛固涩,益气生津,补肾宁心之功效^[13],是常用中药之一。本研究保肝实验所用阳性对照药联苯双酯是合成五味子中木质素类成分五味子丙素的中间体,是我国研究五味子时创制的一种治疗肝炎的降酶药物^[14]。

巴西莓是南美洲地区常用草药^[1],其引入极大丰富了我国药食同源原料资源。加强对这些品种的活性成分,药理作用等方面的基础研究,可以促进传统植物资源的有效利用,同时也促进国外天然资源与我国特有中药资源相融合,进行更加合理的应用。本研究表明巴西莓具有一定的解酒及保肝作用,其机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 许利嘉,肖伟,马培,等. 具开发前景的南美洲常用草药简介[J]. 现代药物与临床,2011,26(2):84-90.
- [2] 申海鹏. 卫生部关于批准茶树花等 7 种新资源食品的公告[J]. 食品安全导刊,2013(1):19-19.
- [3] 曾涛,王倩,于丽华,等. 大蒜油对急性乙醇处理小鼠某些生化指标的影响[J]. 毒理学杂志,2008,22(1):48-49.
- [4] 王聪,许玉芳,孙华毅,等. 二氧化硫对高脂饲养大鼠肝组织胆固醇水平的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2010,12(6):548-551.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 保健

食品检验与评价技术规范,2003:135-139.

- [6] 肖培根,刘勇,肖伟. 玛卡-全球瞩目的保健食品[J]. 中国食品卫生杂志,2006(4):396.
- [7] 芦志雁,李丽. 解醒四逆散治疗酒精性肝病的疗效观察[J]. 中国药物与临床,2008,8(2):155-156.
- [8] Dey A, Cederbaum A I. Alcohol and oxidative liver injury[J]. Hepato, 2006,43(S1):S63-S74.
- [9] Schauss A G, Wu X, Prior R L, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006,54(22):8598-8603.
- [10] Kang J, Xie C, Li Z, et al. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. Food Chem, 2011,128(1):152-157.
- [11] Kang J, Li Z, Wu T, et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) [J]. Food Chem, 2010,122(3):610-617.
- [12] Feio C A, Izar M C, Ihara S S, et al. *Euterpe oleracea* (acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis[J]. J athero thro, 2011,19(3):237-245.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:61.
- [14] 刘耕陶. 从五味子的研究到联苯双酯的发现[J]. 药学学报,1983,18(9):714-720.

(2014-06-25 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 1333 页)

- [9] 温跃才. 加味黄连解毒汤治疗脑梗塞 100 例[J]. 吉林中医药,1998,18(1):27.
- [10] 史一峰,陈维泽. 黄连解毒汤治疗中风后遗症 34 例[J]. 中国疗养医学,1996,5(3):50-52.
- [11] 唐晓玲,唐敏. 黄连解毒汤临床研究进展[J]. 实用中西医结合临床,2010,10(5):90-92.
- [12] Margaritescu O, Pirici D, Margaritescu C. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke [J]. Rom J Morphol Embryol, 2011,52(4):1283-1292.
- [13] Dzielko M, Derugin N, Wendland M F, et al. Delayed VEGF Treatment Enhances Angiogenesis and Recovery After Neonatal Focal Rodent Stroke [J]. Transl Stroke Res, 2013,4(2):189-200.
- [14] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. Journal of Clinical

Investigation, 2003,111(12):1843-1851.

- [15] Namiecinska M, Marciniak K, Nowak J Z. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2005,59:573-583.
- [16] Ye Y, Huang C, Jiang L, et al. Huanglian-Jie-Du-Tang extract protects against chronic brain injury after focal cerebral ischemia via hypoxia-inducible-factor-1alpha-regulated vascular endothelial growth factor signaling in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2012,35(3):355-361.
- [17] 王志潭, 窦锦明, 王修彬, 等. 黄连解毒汤药效部位对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(5):354-356.
- [18] 吴彦, 孙建宁, 张爱林, 等. 黄连解毒汤有效部位对实验性脑缺血的保护作用[J]. 中药材, 2004, 27(5):357-360.

(2014-04-03 收稿 责任编辑:曹柏)