

活血化瘀中药对脑出血大鼠脑组织含水量及 AQP4 表达的影响

李妍^{1,2}, 崔向宁^{3*}, 陈泽涛⁴, 李玉波⁵

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 泰安市中医医院, 山东 泰安 271000;

3. 卫生部中日友好医院心血管中心, 北京 100010; 4. 山东中医药大学附属医院保健科, 济南 250014;

5. 北京中医药大学, 北京 100010)

[摘要] **目的:** 观察活血化瘀药对脑出血大鼠脑组织含水量及 AQP4 表达的影响, 以期从分子水平探讨其治疗出血性脑水肿的机制。**方法:** 将 80 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 活血高、低剂量组 (10.4, 2.6 g·kg⁻¹), 采用自体不凝血注入尾状核法制作大鼠脑出血模型, 组织干重法计算脑含水量, 免疫组织化学法和 real-timePCR 法检测脑组织 AQP4 蛋白和基因的表达。**结果:** 模型组大鼠各时间点病灶侧脑含水量、血肿周围组织 AQP4 蛋白和基因的表达均明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 活血高、低剂量组大鼠病灶侧脑含水量及血肿周围组织 AQP4 的表达与同一时间点模型组相比均明显降低, 活血高、低剂量组间也有统计学意义。**结论:** 活血化瘀药能够减轻脑出血后脑水肿, 其机制可能与降低 AQP4 表达有关。

[关键词] 活血化瘀; 脑出血; 脑含水量; 水通道蛋白 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0153-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1705.007 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1705.007.html>

Effect of Blood-activating and Stasis-removing Herbs on Brain Water Content and Aquaporin4 Expression in Intracerebral Hemorrhage Rats

LI Yan^{1,2}, CUI Xiang-ning^{3*}, CHEN Ze-tao⁴, LI Yu-bo⁵

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China;

2. Taian Hospital of TCM, Taian 271000, China;

3. Department of National Integrative Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100010, China; 4. The Affiliated Hospital to Shandong University of TCM, Jinan 250014, China; 5. Beijing University of TCM, Beijing 100010, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of blood-activating method on brain water content and aquaporin4 (AQP4) expression in intracerebral hemorrhage (ICH) rats. **Method:** SD rats were randomly divided into the following groups: the sham operated group, model group, blood-activating high dose group and blood-activating low dose group. ICH rat model was established by injection autologous blood. The brain water content was determined by wet-dry weight, the expression of AQP4 protein and AQP4 mRNA in cerebral tissues were determined respectively by immunohistochemistry techniques and real-time PCR. **Result:** Compared with those in the sham group, the expression of AQP4 mRNA and AQP4 protein increased significantly in the model group ($P < 0.01$), and the

[收稿日期] 20110203(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873208)

[第一作者] 李妍, 医学博士在读, 主治医师, 从事中西医结合老年病学研究, Tel: 13853838800, E-mail: liyan_sd@163.com

[通讯作者] * 崔向宁, 博士, 主任医师, 主要从事中西医结合心脑血管病的防治研究, Tel: 010-84205041, E-mail: cuixiangning@126.com

brain water content showed the same trend. Compared with the model group, the expression of AQP4 mRNA and AQP4 protein and the brain water content decreased obviously in blood-activating groups ($P < 0.01$), in a dose dependent manner. **Conclusion:** Blood-activating and stasis-removing herbs could decrease the edema of ICH, and the probable mechanism might be downregulation of AQP4.

[**Key words**] blood-activating and stasis-removing; intracerebral hemorrhage; brain water content; aquaporin 4

脑出血是一种严重危害人类健康的疾病,脑水肿的发生是引起脑出血病情恶化和高死亡率的主要危险因素。近年来,运用活血化瘀中药治疗脑水肿在理论研究和动物实验方面取得了长足进展,临床也显示了良好疗效,但其具体作用机制尚无报道。AQP4(aquaporin4)是中枢神经系统最主要的水通道蛋白,介导脑组织水代谢,与多种原因导致的脑水肿关系密切^[1],调控 AQP4 表达有利于维持脑组织水代谢平衡,减轻脑水肿程度。本研究拟通过观察活血化瘀中药对脑出血大鼠脑组织含水量及 AQP4 表达的影响,以期从分子水平探讨其治疗出血性脑水肿的机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 80 只,体重 230 ~ 280 g,清洁级,购于北京维通利华实验动物中心,饲养于卫生部中日友好医院动物实验中心动物房,环境温度为 20 ~ 25 °C,12/12 h 昼夜规律喂养。

1.2 药品与试剂

1.2.1 药品 中药复方由水蛭、大黄、三七(3 者比例为 1:10:15)组成,购自中日友好医院药房,经中日友好医院李耿主管药师根据《中国药典》2010 版一部鉴定,均为正品。分别取大黄 200 g,三七 300 g,打碎为黄豆粒样小块,用 5 倍 95% 乙醇浸泡 24 h 后,再用 5 倍 95% 乙醇回流提取 1 h 3 次,合并提取液,浓缩制成流浸膏;取水蛭 20 g,打成细粉,过 40 目筛,与大黄、三七提取物一起用 0.5% CMC-Na 制成 1 000 mL 混悬液,每 1 mL 含生药量分别为:水蛭 0.02 g,大黄 0.2 g,三七 0.3 g。

1.2.2 试剂 大鼠单克隆抗体 AQP4 系 Santa Cruz 公司产品,二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒系购自基因科技(上海)有限公司。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及 PCR 扩增试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

2 方法

2.1 动物模型建立 根据文献[2]制作大鼠脑出

血模型。10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹) ip,麻醉后头部及股部备皮,碘伏消毒;首先在操作台上切开右股部皮肤,切口长 15 mm,分离肌肉、神经,暴露股动脉后固定在立体定位仪上。调节定位仪使大鼠前后囟在同一水平面上,头部正中切开皮肤,长约 15 mm,3% 双氧水剥蚀骨膜,暴露前后囟。于前囟前 0.2 mm,中线右侧旁开 3.5 mm 处牙钻钻一直径约 1 mm 的小孔,不伤及硬脑膜。微量注射器抽取 50 μL 未凝血并局部压迫止血,将微量注射器固定于立体定位仪上,自钻孔处垂直进针,深度 5.8 mm,以 2 μL·min⁻¹ 匀速向大鼠尾状核内缓慢推注,完毕后留针 20 min,退针后,骨蜡封闭钻孔,缝合切口并消毒皮肤。术后观察神经症状和体征,模型成功的评分判断参照 Zealanga^[3] 等的 5 分制标准。假手术组只注入等量生理盐水。实验前后各组动物自由进食和饮水。各组在相应时间点处死动物。

2.2 动物分组 随机分为假手术组($n = 30$)、模型组($n = 30$)、活血高剂量组($n = 10$)和活血低剂量组($n = 10$),假手术组和模型组又分为 1,3,5 d 3 个时间点组,每个时间点 10 只大鼠,每组中 4 只大鼠用于脑含水量和 AQP4mRNA 检测,6 只用于 AQP4 蛋白表达的检测。

2.3 用药方法 活血高、低剂量组于术前 2 h 开始 ig,术后每 12 h ig 1 次。活血高剂量组为 20 mL·kg⁻¹,10.4 g·kg⁻¹;活血低剂量组为 5 mL·kg⁻¹,2.6 g·kg⁻¹;假手术组和模型组在相同时间给予 10 mL·kg⁻¹ 生理盐水 ig。

2.4 标本的取材和制备 假手术组、活血高剂量组和活血低剂量组于术后 3 d,模型组分别于术后 1,3,5 d 随机取 4 只大鼠麻醉后断头处死,在冰上迅速开颅取脑,在注血点作冠状切开,取前半部分约 100 mg 左右脑组织,去除皮质表面的软脑膜,吸除表面水分及血渍,用于脑组织含水量以及 AQP₄ mRNA 的检测;另外 6 只大鼠用生理盐水及 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液经心脏灌注后取脑,置于 10% 中性福尔马

林中固定 24 h 后,将标本脱水,石蜡包埋并切片备用,片厚 5 mm。

2.5 脑组织含水量的测定 采用干湿重法。将各时间点的脑组织分别用电子分析天平称重(湿质量),然后置入 95 °C 恒温箱中,24 h 后取出再称重(干质量)。

脑含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 × 100%。

2.6 AQP4 免疫组化染色 EnVision 法检测 AQP4 表达:将备用切片预热后脱蜡、梯度乙醇脱水,3% H₂O₂ 室温氧化 15 min,微波修复(修复液为 Dako antibody Diluent Tris EDTA Buffer Prl 9.0)后 0.01% PBS 漂洗 5 min × 3 次,滴加 AQP4 一抗(稀释度 1:100),置湿盒中 4 °C 孵育过夜,滴加生物素标记的二抗置于湿盒中室温孵育 2 h, DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后封片。阴性对照用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同前。采用 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件进行分析,每只大鼠选 1 张脑切片,在 400 倍光镜下随机选取血肿周围 5 个不重叠视野。分析指标为平均吸光度(A)。

2.7 real-time PCR 检测脑组织 AQP4 mRNA 的表达

从 NCBI 中检索出完整的大鼠 AQP4 核苷酸序列,以 Primer Premier 5.0 软件设计引物,然后进行 blast 分析验证其特异性。引物由上海生物工程公司合成(表 1)。按提取试剂盒操作说明书提取脑组织 RNA,由紫外分光光度法测定其纯度和浓度,计算总 RNA 浓度;按反转录试剂盒说明书将 mRNA 反转录成 cDNA,实时定量 PCR 反应在 ABI PRISM 7300 荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件为:预变性 95 °C 30 s,变性 95 °C 5 s,退火/延伸 60 °C 31 s,40 个循环,绘制出溶解曲线反应。每个样本重复 3 次,取平均值为 C_t 值,采用相对定量 2^{-ΔΔC_t} 法比较各组基因表达的异常。

2.8 统计方法 使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理,用单因素方差分析进行组间差异比较,数

表 1 聚合酶链式反应引物序列

引物名称	引物序列	片段长度 /bp
GAPDH	上游 5'-CCCTCCACCCAAGGAAACT-3'	269
	下游 5'-GCCCTACGCTGAATGCTGA-3'	
AQP4	上游 5'-CTTGACTGCCCCATCTCACTTC-3'	192
	下游 5'-CGCATGATATATTAGCAATGGCA-3'	

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠脑组织含水量的变化 结果见表 2。脑出血后 1,3,5 d 脑组织含水量与假手术组比较均有显著意义。脑出血后 1 d 脑含水量明显增加($P < 0.01$),3 d 达高峰,5 d 仍处于较高水平。脑出血后 3 d 活血高、低剂量组与同时间点模型组相比,脑含水量明显降低,且活血高、低剂量组间亦有统计学意义。

表 2 各组大鼠脑组织含水量的比较($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	脑组织含水量/%		
		1 d	3 d	5 d
假手术	-	71.27 ± 1.41	70.44 ± 0.84	69.31 ± 1.27
模型	-	76.87 ± 1.79	82.31 ± 1.51	80.34 ± 1.68
活血化瘀	10.4	-	73.27 ± 0.50 ²⁾	-
	2.6	-	75.67 ± 1.34 ^{2,4)}	-

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与活血高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 4 同)。

3.2 各组大鼠脑组织 AQP4 表达的变化 结果见表 3 ~ 4。模型组血肿周围水肿区 AQP4 蛋白和基因的表达 1 d 明显增强,3 d 最为显著,5 d 仍处于较高水平。假手术组仅有少量表达,脑出血后 3 d 活血高、低剂量组与同时间点模型组相比,脑组织 AQP4 蛋白和基因的表达明显降低,且活血高、低剂量组间亦有统计学意义。

表 3 各组大鼠脑组织 AQP4 蛋白表达(A)的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP4 表达		
		1 d	3 d	5 d
假手术	-	0.401 5 ± 0.028 4	0.395 7 ± 0.057 4	0.395 6 ± 0.013 5
模型	-	0.663 4 ± 0.064 6	1.310 8 ± 0.106 8	0.961 4 ± 0.083 3
活血化瘀	10.4	-	0.706 3 ± 0.045 7 ²⁾	-
	2.6	-	0.847 9 ± 0.040 0 ^{2,4)}	-

表 4 各组大鼠脑组织 AQP4mPCR 表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP4mPCR 表达 $2^{-\Delta\Delta Ct}$		
		1 d	3 d	5 d
假手术	-	1.205 7 ± 0.076 4	1.217 3 ± 0.040 9	1.076 2 ± 0.015 7
模型	-	1.619 8 ± 0.035 5	1.713 1 ± 0.072 5	1.617 2 ± 0.038 2
活血化瘀	10.4	-	1.402 2 ± 0.025 5 ²⁾	-
	2.6	-	1.595 4 ± 0.064 6 ^{2,4)}	-

4 讨论

AQP4 是中枢神经系统最主要的水通道蛋白,其主要生理功能是介导水分子的跨生物膜转运,维持体液及渗透压平衡,调节脑脊液的形成;AQP4 表达异常被认为是脑水肿形成过程中许多因素相互作用的最后关键一环,直接影响到水肿的形成和吸收。本实验表明,脑出血后 1 d 血肿周围组织 AQP4 蛋白和基因表达均增高,3 d 时达高峰,5 d 仍高于正常水平,且 AQP4 表达与脑含水量的变化趋势相一致,提示 AQP4 参与了脑出血后脑水肿的形成。有研究表明,调控 AQP4 表达有利于减轻脑水肿程度,AQP4 可能成为脑水肿治疗的新靶点^[4]。

脑出血后脑水肿属于水饮痰湿范畴,其病机为脑络破损,血液溢出脉外,瘀阻脑窍,形成血肿,“血不利则为水”,瘀积为痰为水而致脑水肿。因此,脑出血后脑水肿的病理特点是以血瘀为本,水饮邪实为标,治疗当从本截源,活血化瘀为其关键。正如《血证论》云:“须知痰水之壅,由瘀血使然,但去瘀血则痰水自消”。

“血不利”是导致水肿的重要原因,结合现代医学,AQP4 可能是“血不利”则为“水”的关键环节。前期研究中我们发现活血利水中药(三七、大黄、水蛭、茯苓、泽泻、石菖蒲)能够减轻脑外伤后脑水肿,调控 AQP4 表达,促进神经功能恢复^[5]。为进一步研究活血化瘀中药在脑水肿治疗中的作用机制,本实验我们将其中的活血成分三七、大黄、水蛭,按比例制成复方,观察不同剂量对大鼠脑出血后血肿周围脑组织含水量及 AQP4 表达的影响。本实验表

明,脑出血后 3 d 脑含水量与 AQP4 表达最明显,因此我们选取该时间点作为药物干预的观察点。结果表明,不同剂量活血化瘀中药对脑水肿、AQP4 表达均有影响,推测活血化瘀中药可能是通过调控 AQP4 表达,减轻“血不利”因素,影响水肿的形成和吸收从而达到利水目的。进一步分析表明,活血高剂量组脑组织水肿的改善程度好于低剂量组,AQP4 的表达也明显减低,由此推测可能是随着活血力度的加大,“血不利”的改善程度增大,则水的吸收增多,反向验证了“血不利”的程度与“水”息息相关。

[参考文献]

[1] Ecklund J M, Agoston D V, Ling G S, et al. Dexamethasone treatment modulates aquaporin-4 expression after intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 413 (2): 126.

[2] 张新江,殷小平,易黎,等. 大鼠缓慢注射自体血脑出血模型[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2002, 19 (5): 299.

[3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84.

[4] Bloch O, Manley G T. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema [J]. *Neurosurg Focus*, 2007, 22 (5): E3.

[5] 崔向宁,尹岭,王玉来,等. 脑疏宁对脑外伤大鼠脑水肿及脑组织 AQP4 表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31 (7): 474.

[责任编辑 聂淑琴]