

# 地黄饮子对脑缺血再灌注损伤大鼠保护作用及其机制

王俊杰<sup>1</sup>, 楼琦<sup>2</sup>, 汤娟娟<sup>1</sup>, 白亚平<sup>1</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 张培璐<sup>1</sup>, 杜月光<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

**[摘要]** **目的:**探讨地黄饮子对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其初步机制。**方法:**建立大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠模型,随机分为6组,分别为假手术组,模型组,尼莫地平组(0.01 g·kg<sup>-1</sup>),地黄饮子高、中、低剂量组(38.80, 19.40, 9.70 g·kg<sup>-1</sup>),每组20只,连续给药28 d;术后第7,14,28天通过改良神经功能缺损评分(mNSS),第28天行2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色,苏木素-伊红(HE)染色观察地黄饮子的保护作用,应用免疫荧光技术观察侧脑室室管膜下区(SVZ)的5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)阳性细胞数(第28天)以分析神经干细胞(NSCs)增殖情况,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)观察 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 的表达情况。**结果:**术后第7,14,28天地黄饮子高、中剂量组,尼莫地平组的mNSS明显低于同时时间段的模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );术后第28天地黄饮子高、中剂量组和尼莫地平组的脑梗死体积占脑组织体积的百分比均低于模型组( $P < 0.01$ );HE染色显示地黄饮子高、中剂量组,尼莫地平组大鼠脑组织坏死和软化灶不明显,并可见神经元细胞和神经胶质细胞增生;术后第28天,上述3组SVZ的BrdU阳性细胞数显著高于模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),地黄饮子高剂量组BrdU阳性细胞数高于尼莫地平组( $P < 0.05$ );术后28天地黄饮子高、中剂量组,尼莫地平组SVZ的Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA表达水平明显高于模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );尼莫地平组Hes1 mRNA水平高于地黄饮子高、中、低剂量组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**地黄饮子能改善MCAO大鼠模型的神经功能缺损,减小脑梗死体积,减轻脑组织病理改变,从而对脑缺血再灌注损伤大鼠起到保护作用,可能与激活Notch信号通路,上调Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA的表达,从而促进NSCs增殖有关。

**[关键词]** 地黄饮子; 脑缺血再灌注损伤; 实验研究; 神经干细胞

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0042-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190406

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181106.1121.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-06 17:28

## Protective Effect of Dihuang Yinzi on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats and Its Mechanism

WANG Jun-jie<sup>1</sup>, LOU Qi<sup>2</sup>, TANG Juan-juan<sup>1</sup>, BAI Ya-ping<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, ZHANG Pei-lu<sup>1</sup>, DU Yue-guang<sup>1\*</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective effect and the preliminary mechanism of Dihuang Yinzi on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Method:** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established. Totally 90 SD rats were randomly divided into 6 groups: sham operation group, model group, nimodipine group (0.01 g·kg<sup>-1</sup>) and high, medium, low-dose Dihuang Yinzi groups (38.80, 19.40, 9.70 g·kg<sup>-1</sup>), with 20 rats in each group. The modified neurological severity score (mNSS) was assayed at the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> days after operation, and the volume of cerebral infarction, pathological changes of brain tissue, the BrdU positive cells and mRNA levels of Notch1, Jagged1 and Hes1 in subventricular zone (SVZ) were observed respectively by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) stain, htrylin eastin (HE) stain, immunofluorescence

**[收稿日期]** 20180813(017)

**[基金项目]** 浙江省自然科学基金项目(LY14H270005)

**[第一作者]** 王俊杰, 硕士, 教授, 从事中医药防治缺血性脑血管病及其机制研究, Tel:0571-86633390, E-mail:wjjie2000@163.com

**[通信作者]** \* 杜月光, 博士, 教授, 从事中医药防治缺血性脑血管病及其机制研究, Tel:0571-86633140, E-mail:1323944178@qq.com

technique and reverse transcriphase polymerase chain reaction (Real-time PCR) methods at the 28<sup>th</sup> day after the operation. **Result:** The mNSS on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> days of high, medium-dose Dihuang Yinzi groups and nimodipine group were significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). On the 28<sup>th</sup> day, the percentage of cerebral infarction volume in brain tissue volume of high, medium-dose Dihuang Yinzi groups and nimodipine group were smaller than that of model group ( $P < 0.01$ ). HE staining showed that the necrosis and softening lesions of brain tissue were not obvious in rats of high, medium-dose Dihuang Yinzi groups and nimodipine group, with neuronal cell and neuroglial cell proliferation. On the 28<sup>th</sup> day, the BrdU positive cells in SVZ of the above 3 groups were significantly higher than model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the high-dose Dihuang Yinzi group was significantly higher than nimodipine group ( $P < 0.05$ ). On the 28<sup>th</sup> day, the mRNA levels of Notch1, Jagged1 and Hes1 of high, medium-dose Dihuang Yinzi groups and nimodipine group were significantly higher than those of model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the mRNA level of Hes1 of nimodipine group was higher than that of high, medium, low-dose Dihuang Yinzi groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Dihuang Yinzi can improve the nerve function defect of MCAO rat model, and reduce the volume of cerebral infarction and the pathological changes of brain tissue, thus playing a protective role in cerebral ischemia-reperfusion injury rats. Its mechanism may be related to the activation of the Notch signaling pathway, and the up-regulation of expressions of Notch1, Jagged1 and Hes1 mRNA, thus promoting the proliferation of NSCs.

**[Key words]** Dihuang Yinzi; cerebral ischemia-reperfusion injury; experimental study; neural stem cells

脑缺血再灌注损伤(CIRI)是指缺血脑组织在恢复血液灌注后损伤进一步加重的现象<sup>[1]</sup>,是绝大多数缺血性脑血管病的病理过程。研究认为与细胞内钙超载、兴奋性氨基酸释放、氧自由基过量生成、炎性细胞因子释放增加、凋亡基因激活等相关,引起脑细胞凋亡或坏死<sup>[2-4]</sup>,最终导致神经功能障碍,因此,较多的实验研究从以上几方面来探讨对 CIRI 的保护作用。

近年来国内外的研究表明,在成年脑侧脑室室管膜下区(SVZ)和海马齿状回的颗粒细胞下层(SGZ)存在着具有自身增殖、分化、迁移能力的神经干细胞(NSCs)<sup>[5-6]</sup>。NSCs能分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。在脑缺血时,NSCs被激活,继而发生增殖分化,分化的新生神经元能部分替代和修复受损的神经元,从而在一定程度上改善神经功能缺损<sup>[7]</sup>。Notch通路是脊椎、无脊椎动物发育过程中高度保守、极其重要的信号转导通路,相邻细胞通过Notch受体传递信号可以调节包括干细胞在内的多种细胞的增殖、分化和凋亡,在个体发育、肿瘤发生及Alzheimer's病等神经系统疾病的病理生理过程中起着重要作用<sup>[8]</sup>。有研究证实,NSCs的增殖、迁移和分化与Notch信号通路密切相关<sup>[9]</sup>。

地黄饮子出自《黄帝内经·素问·宣明论方》,是治疗缺血性脑卒中的有效方剂,用于治疗缺血性中风病的疗效已为临床和实验研究所证实。以往的研究认为地黄饮子可能通过调控凋亡相关蛋白B淋

巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)的表达<sup>[10]</sup>,抗氧化应激<sup>[11-12]</sup>,保护胆碱能系统<sup>[13]</sup>等,而对缺血后脑损伤具有显著的保护作用,并能改善大鼠的学习记忆能力。有少量实验研究涉及地黄饮子与NSCs的增殖,有学者发现,地黄饮子能上调MCAO大鼠大脑皮质NSCs标志物巢蛋白(Nestin)mRNA和干细胞因子(SCF)mRNA的表达<sup>[14]</sup>。鉴于Notch通路对于NSCs增殖分化的重要调控作用,笔者推测地黄饮子可能通过Notch信号通路促进NSCs的增殖分化,从而加速或参与脑缺血后的神经再生和修复,改善CIRI。因此,本研究拟以MCAO模型大鼠为研究对象,通过行为学、病理学、分子生物学等方法,研究地黄饮子对CIRI大鼠的保护作用,以及对SVZ的NSCs增殖,Notch信号通路中Notch1,Jagged1,Hes1 mRNA表达的影响,从而探讨其可能的作用靶点与相关机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级雄性SD大鼠,体质量250~270g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号SCXK(浙)2014-0001。实验前先饲养1周,温度20~24℃,昼夜各半节律,自由饮食。实验由浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

**1.2 药物与试剂** 地黄饮子由熟干地黄12g,山茱萸15g,巴戟天15g,肉苁蓉15g,石斛15g,麦门冬

15 g, 五味子 15 g, 肉桂 15 g, 附子 15 g, 石菖蒲 15 g, 远志 15 g, 茯苓 15 g, 生姜 3 g, 大枣 3 g, 薄荷 3 g 组成(购自浙江中医药大学滨江门诊部,均由中药房主任的鉴定为正品),由浙江中医药大学制药厂代加工,制备成每毫升含 3.88 g 生药的水煎剂,4 ℃ 冰箱保存。西药尼莫地平片(哈药集团三精制药四厂有限公司,国药准字 H23020496)用 0.9% 氯化钠溶液制备成尼莫地平混悬液(1 g·L<sup>-1</sup>)。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(天津百浩生物科技有限公司,批号 20160423);氯化三苯四氮唑(TTC,北京西浓科技有限公司,批号 409E033);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,美国 Sigma 公司,批号 HMBD8875V);小鼠抗 BrdU 抗体(杭州赫贝科技有限公司,批号 F1711);Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠二抗,trizol(美国 Invitrogen 公司,批号分别为 1802436, 12183-555)。

**1.3 仪器** 2636 型 MCAO 线栓(北京西浓科技有限公司);RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);CFX384 型多重实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司);FV10-PSU 型激光共聚焦显微镜,OlympusBX60 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 大脑中动脉栓塞(MCAO)模型复制** 参照文献[15]采用线栓复制一侧 MCAO 模型,大鼠以 10% 水合氯醛溶液(350 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉,仰卧固定于实验台上,颈部常规备皮消毒,逐层分离左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉;结扎左侧颈总动脉远心端和颈外动脉,在颈总动脉分叉处近心端约 4 mm 剪一小口,将线栓从切口处朝颈内动脉入颅方向插入约 18 mm,感到有轻微阻力即停止;扎紧并固定线栓,逐层缝合,放入保暖箱;90 min 后向外退出线栓,行再灌注。假手术组仅分离动脉,不结扎,不插线栓,余同手术组。术后 90 min 参照 Longa 评分法[16]进行行为学评分,1~3 分的大鼠纳入研究。具体标准如下,0 分,无神经缺损症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,行走时向对侧转圈;3 分,行走时向对侧跌倒;4 分,不能自发行走或意识丧失。

**2.2 分组与给药** 造模成功后,将评分为 1~3 分的大鼠随机分为假手术组,模型组,尼莫地平组,地黄饮子高、中、低剂量组,共 6 组,每组 20 只。根据大鼠与人体每 1 kg 体质量剂量折算系数 6.25,术后第 1 天起,地黄饮子高、中、低剂量组分别灌胃地黄饮子水煎剂(生药 38.80,19.40,9.70 g·kg<sup>-1</sup>),尼莫

地平组给予尼莫地平混悬液 10 mg·kg<sup>-1</sup>[17];假手术组、模型组灌胃等容积 0.9% 氯化钠溶液,每天 1 次,连续给药 28 d。

**2.3 BrdU 标记方法**[18] BrdU 溶解于 0.9% 氯化钠溶液中,临注射前配制(质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup>),每次腹腔注射 50 mg·kg<sup>-1</sup>,每天 2 次,每次间隔 8 h,共 6 次,在末次注射后 24 h,即术后第 28 天处死取材,进行指标检测。

**2.4 大鼠神经功能缺损评分** 术后第 7,14,28 天参照改良神经功能缺损评分(mNSS)[19-22],从运动、感觉、平衡木和反射 4 个方面评估大鼠的神经损伤和治疗状况。神经功能记分在 0~18 分之间,0 分为正常,1~6 分为轻度神经功能缺损,7~12 分为中度缺损,13~18 分为重度缺损。

**2.5 TTC 染色观察脑梗死体积**[23] 在术后第 28 天行神经功能缺损评分后,用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠,0.9% 氯化钠溶液经心灌注后断头取脑,于 -20 ℃ 冰箱中速冻 10 min,切除嗅球、脑干和小脑,将大脑自前向后切成 6 个约 2 mm 厚度的冠状切片。将脑片置于 0.5% TTC 溶液中,放于切片盒,37 ℃ 恒温箱避光振荡水浴 20 min。其间用镊子翻动脑组织切片,使染色均匀。吸去 TTC 溶液,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,按顺序均匀排列于载玻片上,正常组织呈红色,梗死组织呈白色,拍照保存。应用 Image Pro Plus 6.0 软件对所拍图像进行分析,脑梗死面积 = 非缺血侧半球面积 - 缺血侧半球未梗死面积,各面积乘以厚度(2 mm)为体积,根据公式[24]计算:梗死体积占脑组织体积的百分比 = [(非缺血侧半球体积 - 缺血侧半球未梗死体积) / 非缺血侧半球体积] × 100%。

**2.6 HE 染色观察大鼠脑组织病理变化** 术后第 28 天各组大鼠用 4% 多聚甲醛溶液经心灌注后取脑,4% 多聚甲醛固定 48 h,常规石蜡包埋、切片,然后脱蜡至水化,染色,脱水、透明、封固,显微镜下观察大鼠脑组织病理变化。

**2.7 BrdU 免疫荧光染色检测神经干细胞增殖情况** 术后第 28 天各组大鼠用 4% 多聚甲醛溶液经心灌注后取脑,10% 甲醛固定 48 h,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,常规包埋。轮转式石蜡切片机切片,厚度为 4 μm,展片于载玻片上,于 62 ℃ 烤箱中烤片 4 h;常规二甲苯脱蜡,水化,进行抗原修复;滴加小鼠抗 BrdU(1:100),置湿盒中,4 ℃ 冰箱内孵育过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)洗后,滴加相应的荧光二抗,二抗为 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠(BrdU

为红色, 1:200) 混合液, 室温中放置 30 min; 滴加 DAPI 染核, 室温中放置 5 min; PBS 洗后, 抗荧光衰减封片剂封片, 在激光共聚焦显微镜 400 倍下, 选取侧脑室室管膜下区(SVZ)的 5 个视野, 计数 BrdU 阳性细胞, 以 BrdU 阳性代表神经干细胞(NSCs)增殖。

**2.8 Real-time PCR 检测大鼠 SVZ 的 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达** 术后第 28 天取各组大鼠脑组织快速放入液氮保存。实验时分离侧脑室室管膜下区组织 0.1 g, 按照 trizol 试剂盒提取总 RNA, 紫外分光光度计和电泳测定其含量、纯度及质量。将 mRNA 逆转录为 cDNA, 反应条件为 25 °C 10 min, 50 °C 30 min, 85 °C 5 min。采用 Primer Premier 6.0 和 Beacon designer 7.8 软件进行定量 PCR 引物设计(表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司负责合成。95 °C 预变性 1 min, 放入荧光定量 PCR 仪扩增, 共进行 40 个循环(95 °C 15 s, 63 °C 25 s)。反应完成后作熔点曲线分析, 以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[25]</sup> 计算 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers for PCR

名称	引物序列(5'-3')	扩增长度 /bp
Notch1	上游 CGCTGATGTCAATGCTGTGGAT	115
	下游 CATGTCCTTTGTGGCTCCGTCT	
Jagged1	上游 CGGTGGTACCTGCTATGATGAA	103
	下游 CGGCAGGCAGCTACTGTTTCTA	
Hes1	上游 GTCAACACGACACCGGACAAAC	158
	下游 GAATGCCGGAGCTATCTTCTT	
$\beta$ -actin	上游 GTGTGACGTTGACATCCGTAAAGA	247
	下游 GCCGGACTCATCGTACTCT	

**2.9 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。单因素方差分析采用 One-way ANOVA, 方差齐时, 各组间两两比较采用 LSD 检验; 方差不齐时选用 Kruskal-Wallis H 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 MCAO 大鼠 mNSS 的影响** 假手术组的 mNSS 为 0, 说明神经功能正常, 与假手术组比较, 模型组 mNSS 均显著升高( $P < 0.01$ ); 7, 14, 28 d 地黄饮子高、中剂量组, 尼莫地平组的 mNSS 明显低于同时时间段的模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 各地黄饮子组的 mNSS 与尼莫地平组没有统计学意义。见表 2。

**3.2 对各组大鼠脑梗死体积的影响** TTC 染色结

表 2 地黄饮子对 MCAO 大鼠 mNSS 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 2 Effect of Dihuang Yinzi on mNSS of MCAO rats( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	7 d	14 d	28 d
假手术	-	0	0	0
模型	-	8.38 ± 1.92 <sup>2)</sup>	7.88 ± 2.03 <sup>2)</sup>	6.63 ± 1.92 <sup>2)</sup>
尼莫地平	0.01	6.30 ± 1.64 <sup>3)</sup>	5.50 ± 1.65 <sup>4)</sup>	4.60 ± 1.29 <sup>4)</sup>
地黄饮子	9.70	7.44 ± 1.68	6.89 ± 2.15	5.78 ± 2.05
	19.40	6.60 ± 1.65 <sup>3)</sup>	5.80 ± 1.93 <sup>3)</sup>	4.90 ± 1.20 <sup>3)</sup>
	38.80	6.20 ± 1.79 <sup>3)</sup>	5.21 ± 1.30 <sup>4)</sup>	4.20 ± 1.30 <sup>4)</sup>

注: 与同时时间段假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与同时时间段模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

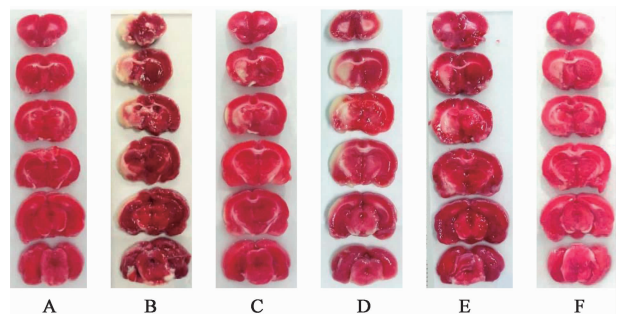
果显示, 假手术组脑组织染色全部为红色, 其余 5 组脑组织冠状切片可见不同程度的白色梗死灶。缺血再灌注第 28 天, 地黄饮子高、中剂量组和尼莫地平组的脑梗死体积占脑组织体积的百分比均低于模型组( $P < 0.01$ ); 地黄饮子高、中剂量组与尼莫地平组无统计学意义。见表 3, 图 1。

表 3 地黄饮子对 MCAO 大鼠脑梗死体积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Dihuang Yinzi on volume of cerebral infarction of MCAO rats( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	脑梗死体积比/%
假手术	-	0
模型	-	28.78 ± 3.38 <sup>2)</sup>
尼莫地平	0.01	8.83 ± 3.92 <sup>4)</sup>
地黄饮子	9.70	26.13 ± 2.64 <sup>6)</sup>
	38.80	6.13 ± 2.17 <sup>4)</sup>

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; 与尼莫地平组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ (表 4, 5 同)。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼莫地平组; D. 地黄饮子低剂量组; E. 地黄饮子中剂量组; F. 地黄饮子高剂量组(图 2, 3 同)

图 1 地黄饮子对 MCAO 大鼠脑梗死体积的影响(TTC)

Fig. 1 Effect of Dihuang Yinzi on volume of cerebral infarction of MCAO rats(TTC)

**3.3 对 MCAO 大鼠脑组织病理改变的影响** 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织可见坏死灶明显, 局

部脑细胞溶解液化,呈筛网状。各治疗组大鼠脑组织可见部分脑细胞核固缩、碎裂、溶解,胞浆红染,但软化灶不明显,可见胶质细胞及胶质明显增生,坏死区尚可见神经元细胞增生,其中地黄饮子高剂量组尤为明显。见图 2。

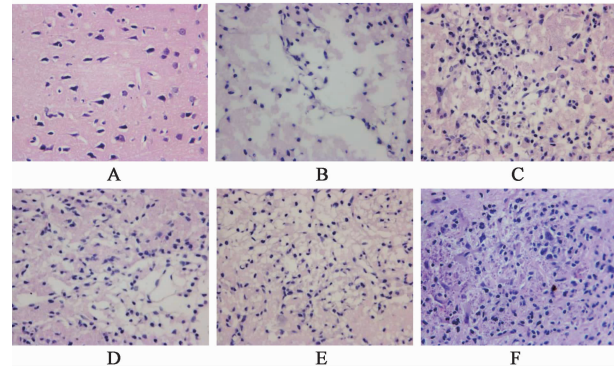


图 2 地黄饮子对 MCAO 大鼠脑组织病理改变的影响(HE, ×400)  
Fig.2 Effect of Dihuang Yinzi on pathological changes of brain tissue of MCAO rats(HE, ×400)

**3.4 对 MCAO 大鼠 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数的影响** 正常成年大鼠 SVZ 存在着少量神经干细胞,缺血再灌注第 28 天,模型组、尼莫地平组、地黄饮子各组较假手术组 BrdU 阳性细胞数增多,其中尼莫地平组,地黄饮子高、中剂量组大鼠 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数明显高于模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),地黄饮子高剂量组 BrdU 阳性细胞数明显高于尼莫地平组 ( $P < 0.05$ )。见图 3,表 4。

表 4 地黄饮子对 MCAO 大鼠 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of Dihuang Yinzi on number of BrdU positive cells in SVZ of MCAO rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BrdU 阳性细胞数/个
假手术	-	12.75 ± 2.49
模型	-	13.88 ± 2.75
尼莫地平	0.01	20.38 ± 3.25 <sup>4)</sup>
地黄饮子	9.70	15.63 ± 3.58 <sup>6)</sup>
	19.40	17.75 ± 2.60 <sup>3)</sup>
	38.80	23.50 ± 3.12 <sup>4,5)</sup>

**3.5 对 MCAO 大鼠术后第 28 天 SVZ 的 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达的影响** 术后 28 d 尼莫地平组,地黄饮子高、中剂量组大鼠 SVZ 的 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达水平明显高于模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),地黄饮子低剂量组的三者表达量升高不明显,模型组、尼莫地平组、地黄饮子各组有上调 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达水平的趋势;尼莫地平组的 Hes1 mRNA 明显高于地黄饮子

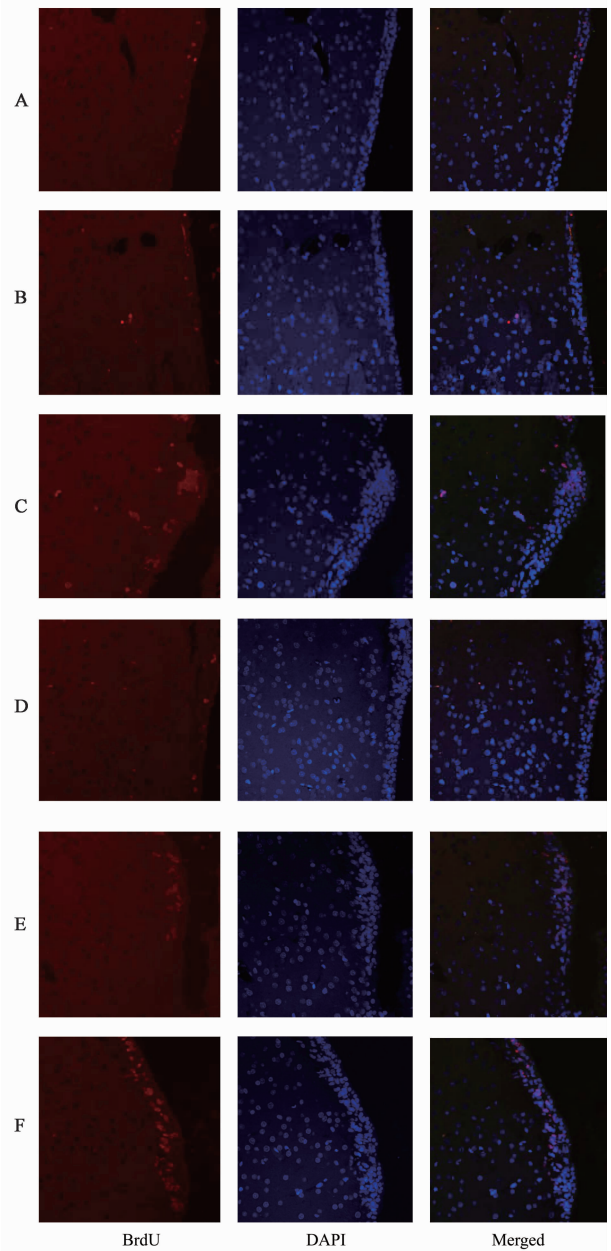


图 3 地黄饮子对 MCAO 大鼠 SVZ 的 BrdU 蛋白表达的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig.3 Effect of Dihuang Yinzi on BrdU protein expression in SVZ of MCAO rats(IF, ×400)

高、中、低剂量组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5。

#### 4 讨论

缺血性脑血管病具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点,严重危害人类健康<sup>[26]</sup>。脑缺血后再灌注引起的氧自由基过量产生、氨基酸过度兴奋、钙离子超载等级联反应,进一步加重了神经细胞的损伤<sup>[27]</sup>。此病中医属中风、中经络、偏枯、偏风等范畴。肾元虚衰,髓海空虚,脉络不畅,脑络瘀阻,脑络失养而发为中风,故肾虚血瘀是本病的病理基础,治疗当以补肾活血为基本法则,据兼证不同,佐以

表 5 地黄饮子对 MCAO 大鼠 SVZ 的 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Effect of Dihuang Yinzi on expressions of Notch1 and Jagged1 and Hes1 mRNA in SVZ of MCAO rats( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Notch1	Jagged1	Hes1
假手术	-	1.02 ± 0.09	0.98 ± 0.06	1.06 ± 0.06
模型	-	1.03 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.08 ± 0.10
尼莫地平	0.01	1.33 ± 0.05 <sup>4)</sup>	1.50 ± 0.09 <sup>4)</sup>	1.68 ± 0.07 <sup>4)</sup>
地黄饮子	9.70	1.05 ± 0.09 <sup>6)</sup>	1.08 ± 0.09 <sup>6)</sup>	1.14 ± 0.13 <sup>6)</sup>
	19.40	1.18 ± 0.06 <sup>3,6)</sup>	1.17 ± 0.07 <sup>3,6)</sup>	1.25 ± 0.03 <sup>3,6)</sup>
	38.80	1.55 ± 0.04 <sup>4,6)</sup>	1.52 ± 0.12 <sup>4)</sup>	1.54 ± 0.04 <sup>4,6)</sup>

化痰、通络等<sup>[28]</sup>。地黄饮子为补肾良方,出自《黄帝内经·素问·宣明论方》,功能“滋肾阴,补肾阳,开窍化痰”<sup>[29]</sup>,主治“肾虚暗瘵,语声不出,足废不用”,是治疗缺血性脑卒中的有效方剂。方中熟地黄、山茱萸滋补肾阴,填补肾精,共为君药;肉苁蓉、巴戟天、炮附子、肉桂、石斛、麦冬、五味子均为臣药,七药合用,助君药益精助阳,以治肾虚之本;石菖蒲、远志、茯苓三药开窍化痰,共为佐药;薄荷、生姜、大枣为使药,和胃补中,调和药性<sup>[30]</sup>。全方标本兼顾,上下并治,共成滋肾阴、补肾阳、化痰开窍之功。中医学认为“肾主骨生髓而通于脑”,而“脑为髓之海”,因而补肾法对于改善中枢神经系统的功能具有明显优势。在 NSCs 层面上,肾主藏精主要表现为促进 NSCs 的增殖和分化<sup>[31]</sup>。

经典的 Notch 信号通路分子包括 Notch 受体, Notch 配体和 CSL-DNA 结合蛋白 3 部分。迄今为止发现了 4 种 Notch 受体,即 Notch 1, Notch 2, Notch 3 和 Notch 4<sup>[32]</sup>; 5 种 Notch 配体,分别为 Jagged1, Jagged2, Delta-like-1, Delta-like-3 和 Delta-like-4<sup>[33]</sup>。目前大多数研究者认为 Notch1/Jagged1 信号通路与 NSCs 的增殖分化密切相关。Notch 受体与其临近的配体结合后, Notch 受体蛋白被  $\gamma$ -分泌酶 ( $\gamma$ -secretase) 裂解,释放出水溶性的 Notch 受体胞内段 (NICD), 与细胞核内的 DNA 结合蛋白 CSL/RBPJ $\kappa$  结合形成复合体,刺激靶因子 Hes1, Hes5 等的转录,最终调节干细胞的增殖分化。Notch1 参与缺血脑损伤后的神经元及血管新生过程, Notch1 受体和 Jagged1 配体已被证实可以在成脑的侧脑室 SVZ, 海马齿状回表达,影响神经发育和神经可塑性<sup>[34]</sup>。多项动物实验研究发现,在大鼠脑缺血后, Notch 通路的活化中间产物 NICD 及其下游靶基因 Hes1 在 SVZ 表达增加, Notch1 信号通路的活化引起 SVZ 神经干细胞的增殖,但这种作用随着时间的推移而降低,使用

$\gamma$ -分泌酶抑制剂 DAPT 阻断 Notch1 信号通路则抑制神经干细胞增殖<sup>[35]</sup>; 进入分化阶段后,神经前体细胞的 Notch1 和 Hes1 表达下调<sup>[36]</sup>, 因此研究者指出 Notch 信号通路对调控脑缺血后神经干细胞的增殖分化起到关键作用,其途径主要是通过影响 Notch1/Jagged1 通路的重点环节 Notch1, Jagged1, NICD, Hes1 的表达来完成<sup>[37]</sup>。

本研究表明,地黄饮子可改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损评分,减小脑梗死体积,促进神经细胞增殖,且以高剂量组效果显著,提示地黄饮子对 CIRI 具有保护作用。此外,本实验显示术后 28 d 地黄饮子高、中剂量组,尼莫地平组大鼠 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数显著高于模型组,其中地黄饮子高剂量组优于尼莫地平组;上述 3 组大鼠 SVZ 的 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达水平也显著高于模型组,提示地黄饮子可能通过激活 Notch 信号通路,促进 NSCs 的增殖,从而加速或参与脑缺血后的神经再生和修复,改善神经功能缺损,同时地黄饮子也可能具有延长神经干细胞增殖分化时间的作用。本研究揭示了 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 的表达变化,但未进行相应蛋白表达水平的检测,因此尚不足以完全说明地黄饮子对 CIRI 的保护机制,还需进一步深入研究而明确。同时,作为中药复方,地黄饮子具有多成分、多靶点、多途径的特点,笔者推测它也可能通过多条信号通路针对缺血再灌注损伤发生的多个环节发挥调控作用,从而对 NSCs 的增殖产生影响。当然,这需要在后续的研究中进一步证实。

[参考文献]

[1] 孙晓杰,郭宝锋,王冰. 重组人源 Kunitz 型蛋白酶抑制剂治疗大鼠脑皮质缺血/再灌注损伤[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 378-385.

[2] Dewar D, Yam P, McCulloch J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter [J]. Eur J Pharmacol, 1999, 375(1/3): 41-50.

[3] Flanders K C, REN R F, Lippa C F. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease [J]. Prog Neurobiol, 1998, 54(1): 71-85.

[4] 张玉琴,李莺,李煌,等. 栝楼桂枝颗粒激活 Nrf2 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激损伤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 112-116.

[5] MING G L, SONG H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [J]. Annu Rev Neurosci, 2005, 28: 223-250.

[6] 覃清霞,仲米存,吴宣,等. 神经干细胞迁移研究平台的建立及补阳还五汤的干预影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 131-136.

- [ 7 ] LIU J, Solway K, Messing R O, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils [ J ]. *J Neurosci*, 1998, 18 ( 19 ): 7768-7778.
- [ 8 ] Lasky J L, WU H. Notch signaling, brain development, and human disease [ J ]. *Pediatr Res*, 2005, 57 ( 5 Pt 2 ): 104-109.
- [ 9 ] ZHANG X, HUANG G, LIU H, et al. Folic acid enhances Notch signaling, hippocampal neurogenesis, and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia [ J ]. *Nutr Neurosci*, 2012, 15 ( 2 ): 55-61.
- [ 10 ] 宫健伟, 叶蕾, 樊巧玲. 地黄饮子对脑缺血再灌注模型大鼠 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 ( 5 ): 248-251.
- [ 11 ] 李子军, 刘春娜. 地黄饮子对海马神经元缺氧损伤的保护机制 [ J ]. *中成药*, 2012, 34 ( 8 ): 1421-1424.
- [ 12 ] 闫妍, 韩冉, 高俊峰, 等. 地黄饮子改善 AD 大鼠脑组织线粒体生物合成与氧化损伤的机制 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 ( 21 ): 105-110.
- [ 13 ] 白黎明, 张晓双, 武苗, 等. 地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠学习记忆及海马 AChE, ChAT 的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 ( 7 ): 207-209.
- [ 14 ] 李胜志, 李庆云, 马睿杰, 等. 地黄饮子对缺血性脑损伤 Nestin mRNA, SCF mRNA 影响的实验研究 [ J ]. *中医药信息*, 2008, 25 ( 1 ): 77-79.
- [ 15 ] 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.
- [ 17 ] 冯珂, 纪立金. 健脾益智胶囊对 MCAO 大鼠海马  $\beta$ -catenin 表达的影响 [ J ]. *山东中医药大学学报*, 2015, 39 ( 2 ): 160-162.
- [ 18 ] 程建华, 刘双, 韩钊, 等. 姜黄素通过调控 Notch 通路促进大鼠脑缺血后神经干细胞增殖和迁移 [ J ]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29 ( 5 ): 878-882.
- [ 19 ] CHEN J, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [ J ]. *Stroke*, 2001, 32 ( 4 ): 1005-1011.
- [ 20 ] CHEN Y, Constantini S, Trembovler V, et al. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits [ J ]. *J Neurotrauma*, 1996, 13 ( 10 ): 557-568.
- [ 21 ] Schallert T, Kozłowski D A, Humm J L, et al. Use-dependent structural events in recovery of function [ J ]. *Adv Neurol*, 1997, 73 : 229-238.
- [ 22 ] LI Y, Chopp M, CHEN J, et al. Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20 ( 9 ): 1311-1319.
- [ 23 ] Hatfield R H, Mendelow A D, Perry R H, et al. Triphenyltetrazolium chloride ( TTC ) as a marker for ischaemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion [ J ]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1991, 17 ( 1 ): 61-67.
- [ 24 ] Swanson R A, Morton M T, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10 ( 2 ): 290-293.
- [ 25 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $-\Delta\Delta C_T$ ) Method [ J ]. *Methods*, 2001, 25 ( 4 ): 402-408.
- [ 26 ] 王桂倩, 谢雁鸣, 刘岷, 等. 真实世界的参芎葡萄糖注射液治疗缺血性脑血管病临床联合用药特征分析 [ J ]. *中国中药杂志*, 2017, 42 ( 14 ): 2808-2813.
- [ 27 ] 汪红, 钟晓明, 陈梦静, 等. 丹酚酸 B 对急性脑缺血小鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [ J ]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30 ( 2 ): 57-61.
- [ 28 ] 支艳, 杨明会. 从补肾活血论治老年病 [ J ]. *中华中医药杂志*, 2010, 25 ( 1 ): 72-74.
- [ 29 ] 邓中甲. 方剂学 [ M ]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 182.
- [ 30 ] 温彬宇, 张志辰, 高俊峰, 等. 地黄饮子抑制能量障碍诱导的 APP/PS1 小鼠内质网应激及神经元凋亡的作用机制 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 ( 21 ): 111-117.
- [ 31 ] 陈攀, 徐志伟, 敖海清, 等. 基于海马神经干细胞的增殖与分化机制探讨肝肾“藏泄互用”关系的内涵 [ J ]. *中华中医药杂志*, 2013, 28 ( 5 ): 1202-1206.
- [ 32 ] LAI E C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate [ J ]. *Development*, 2004, 131 ( 5 ): 965-973.
- [ 33 ] Aster J C, Robertson E S, Hasslerjian R P, et al. Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-J $\kappa$  or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-J $\kappa$  and activate transcription [ J ]. *J Biol Chem*, 1997, 272 ( 17 ): 11336-11343.
- [ 34 ] Oswald F, Winkler M, CAO Y, et al. RBP-J $\kappa$ /SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 ( 23 ): 10379-10390.
- [ 35 ] WANG X, MAO X, XIE L, et al. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain *in vivo* [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29 ( 10 ): 1644-1654.
- [ 36 ] WANG L, Chopp M, ZHANG R L, et al. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke [ J ]. *Neuroscience*, 2009, 158 ( 4 ): 1356-1363.
- [ 37 ] 冯珂, 纪立金. 健脾益智胶囊对大鼠中动脉栓塞大鼠海马神经干细胞增殖及 Notch1, Jagged1 表达的影响 [ J ]. *中华中医药杂志*, 2013, 28 ( 4 ): 921-924.

[ 责任编辑 周冰冰 ]