

· 博士之窗 ·

脑溢安颗粒对脑出血大鼠脑内细胞间粘附分子-1 表达
和中性白细胞浸润及神经细胞损伤的影响^{*}何 纲[△] 金益强 黎杏群

摘要 目的 探讨脑溢安颗粒(简称脑溢安)对脑出血后脑内炎症损伤的影响。方法 采用胶原酶诱导的大鼠脑出血模型,分组处理,并用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、免疫组织化学和组织学方法检测术后不同时间各组出血侧脑内细胞间粘附分子-1(ICAM-1)mRNA 表达、脑微血管内皮细胞上 ICAM-1 蛋白表达、中性白细胞浸润和神经细胞损伤情况。结果 正常组和假手术组大鼠术侧脑内检测到低水平 ICAM-1 mRNA 表达及少量 ICAM-1 阳性微血管,未见中性白细胞浸润和受损神经细胞。模型组大鼠出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 表达在术后 4h 显著升高,24h 达到高峰,96h 仍保持较高水平,168h 恢复正常水平;ICAM-1 阳性微血管数在术后 4h 显著增多,48h 达到峰值,持续至 168h;中性白细胞浸润和神经细胞损伤在术后 4h 也明显增多,均于 48h 达到高峰,之后逐渐下降。脑溢安组大鼠出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 表达水平和 ICAM-1 阳性微血管数显著降低,中性白细胞浸润,神经细胞损伤明显减轻。结论 脑溢安具有抗脑出血后脑内炎症损伤作用,其作用机制可能与抑制 ICAM-1 介导的中性白细胞浸润有关。

关键词 脑溢安颗粒 脑出血 细胞间粘附分子-1 中性白细胞 神经细胞

Effect of Naoyi'an Granule on Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression, Neutrophil Infiltration and Neuronal Injury in Rats's Brain with Cerebral Hemorrhage HE Gang, JIN Yi-qiang, LI Xing-qun *Institute of Integrated TC and Western Medicine, Xiangya Hospital, Zhongnan University, Changsha (410008)*

Objective: To explore the mechanism of Naoyi'an Granule (NYAG) in alleviating inflammatory injury of brain after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods:** The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA expression, ICAM-1 protein expression in cerebral microvessel endothelium, neutrophil infiltration and neuronal injury in hemorrhagic hemisphere in collagenase induced ICH model rats were determined at various times after modeling by using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry and histological examination. **Results:** A low level of ICAM-1 mRNA expression and few ICAM-1 positive microvessels were detected in the hemisphere of rats in the sham operation group and the normal control group, no neutrophil infiltration and neuronal injury was found. In the model group, levels of ICAM-1 mRNA expression in brain significantly increased 4 hrs after modeling, it reached the peak at 24 hrs, remained in a high level at 96 hrs and recovered to normal at 168 hrs after operation; ICAM-1 positive microvessels increased remarkably at 4 hrs, reached the peak at 48 hrs and sustained to 168 hrs after modeling; the neutrophil infiltration and neuronal injury also showed obvious increase at 4 hrs, reached peak at 48 hrs after modeling, and declined thereafter. In the hemorrhagic hemisphere of NYAG treated group, the above-mentioned indexes were significantly lower than those in the model group. **Conclusion:** NYAG has protective effects against inflammatory injury in the brain after ICH, the mechanism of the effects may be associated with the inhibition of ICAM-1 mediated neutrophil infiltration.

Key words Naoyi'an Granule, intracerebral hemorrhage, intercellular adhesion molecule-1, neutrophil, neuron

^{*} 国家科技部新药研究基金资助项目(No. 96-901-05-225), 国家中医药管理局科研基金资助项目(No. 2000-J-B-03)

中南大学湘雅医院中西医结合研究所(长沙 410008)

[△]现在深圳市人民医院(深圳 518020)

通讯作者 黎杏群, Tel 0731-4327227, E-mail: tcmzhx@public.cs.hn.cn

Del Bigio 等^[1]证实,大鼠脑出血后,脑内嗜中性白细胞反应造成血肿周围神经细胞损伤。Gong 等^[2]发现脑出血大鼠血肿内及血肿周围出现炎症反应,其特征为中性白细胞和巨噬细胞浸润,小胶质细胞活化及细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达上调。脑溢安颗粒(以下简称脑溢安)是我所黎杏群教授研制的三类中药新药(已取得Ⅱ期临床试验批文),功能平肝熄风、凉血泻火、行血化痰,主治脑出血急性期肝阳暴亢、风火上扰、痰热腑实证。临床和实验研究均证明疗效显著^[3,4]。本研究观察脑溢安对实验性脑出血大鼠脑内 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达、中性白细胞浸润及神经细胞损伤的影响,以探讨该药对脑出血后脑内炎症损伤的影响及其作用机制。

材料与方法

1 药物与试剂 脑溢安浸膏干粉,由羚羊角、钩藤、三七、天竺黄、丹皮、地龙、牛膝、生地、大黄等 14 味中药组成(湘雅医院药剂科提供)。用蒸馏水配成 307.5g/L 溶液,4℃ 保存备用。胶原酶(Ⅶ型)、L-多聚赖氨酸、Triton X-100、焦碳酸二乙酯(DEPC 产品)、琼脂糖、石蜡油(Sigma 公司产品);TRIzol 试剂(GIBCO BRL 公司产品);逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶(Promega 公司产品);马血清、ABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(Vector Lab 公司产品);小鼠抗大鼠 ICAM-1 单抗(Pharmingen 公司产品);100bp DNA marker(MBI 公司产品);其余试剂均为国产分析纯。

2 主要仪器 STOELTING TL-2 鼠脑定位仪、Perkin Elmer 7700 型 PCR 热循环仪、Beckman J2-21 型低温离心机、Beckman DU-640 型紫外分光光度仪、Stratagene Eagle Eye II 型图像分析处理系统(美国产);Leica CM 1800 冷冻切片机、Leica RM 2135 石蜡切片机(德国产);Nicon OFX-II 型光学显微镜(日本产)。

3 脑出血模型制备 采用 Rosenberg 等^[5]的方法。用 10% 水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,在鼠脑定位仪引导下用微量进样器向右侧尾状核(前囟前 0.7mm,矢状缝右侧 3mm,深 5mm)注入 2 μ l 含 0.4U 胶原酶的生理盐水,假手术大鼠注入 2 μ l 生理盐水。

4 动物分组及给药方法 雄性 SD 大鼠 186 只,体重 280~320g,由中南大学实验动物中心提供。随机分为正常组(6 只)、假手术组(36 只)、模型组(72 只)、脑溢安组(72 只),后 3 组再随机等分为术后 4、12、24、48、96、168h 等 6 个时间点。从术前 2h 开始至处死之日,模型组及脑溢安组每日分 2 次灌胃 4ml 蒸

馏水或脑溢安药液(每天 4.92g/kg 体重,按体表面积系数折算,相当 70kg 成人临床剂量的 6 倍),正常组和假手术组不作任何治疗。

5 逆转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)

5.1 总 RNA 提取 在各规定时间点麻醉大鼠,断头,切取血肿周围全层脑组织约 50mg,采用 TRIzol 试剂一步抽提法提取总 RNA。电泳可见清晰的 28S 和 18S 条带,所有样本总 RNA 的 OD260/OD280 比值均 ≥ 1.8 ,置 -80℃ 保存。

5.2 逆转录反应 取总 RNA 10 μ l,与 Olig dT (500ng/ μ l)1 μ l 混匀,68℃ 变性 5min,快速置于冰上,加入 AMV 逆转录酶(20U/ μ l)1 μ l, Rnasin(10U/ μ l)1 μ l, 10 \times 逆转录缓冲液 5 μ l, dNTPs(10mmol/L)2.5 μ l,加无核酸酶水至总体积 50 μ l。瞬时离心混匀,42℃ 水浴箱中反应 60min。95℃,5min 后置冰浴中。逆转录产物置 -20℃ 保存。

5.3 聚合酶链式反应 根据大鼠 ICAM-1 和 rpL32 cDNA 序列,设计下列引物,由上海生物工程公司合成。

ICAM-1 上游:5'-AGGTGTGATATCCGGTAGA-3'(bases 1934—1953)

下游:5'-CCTTCTAAGTGGTTGGAACA-3'(base 2505—2524),扩增片段长度为 590bp

rpL32 上游:5'-GTGAAGCCCAAGATCGTC-3'(bases 28—45)

下游:5'-GAACACAAAACAGGCACAC-3'(bases 422—440),扩增片段长度为 412bp

反应体系:无 RNase 水 30 μ l, 10 \times 逆转录缓冲液 5 μ l, dNTPs(2mmol/L)5 μ l,上、下游引物(10pmol/ μ l)各 1 μ l, Taq 酶(2U/ μ l)1 μ l,逆转录产物 5 μ l,石蜡油 30 μ l。

反应条件:95℃ 变性 30s,50℃ 退火 30s,72℃ 延伸 60s,35 个循环,末次循环后 72℃ 再延伸 10min。阴性对照直接用每个样本总 RNA 做 PCR。其反应产物置 -20℃ 保存。

5.4 电泳 取 PCR 产物 10 μ l,用 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察,照相保留结果。

5.5 PCR 产物半定量分析 利用图像分析系统测定各泳道目的基因(ICAM-1)和内对照基因(rpL32)条带的光密度值,ICAM-1 mRNA 的相对表达水平用两者的比率(%)计算。

6 免疫组织化学和组织学检查 在规定时间点将各组另一批大鼠深度麻醉,经升主动脉快速灌注 4℃ 生理盐水 100ml 冲洗血液,随后灌注磷酸盐缓冲液

(PBS 0.01mol/L, pH 7.4)配制的 4% 多聚甲醛溶液 200ml。取全脑,以注射点为中心切取两块 2mm 厚冠状脑片,一块置于 PBS 配制的 30% 蔗糖溶液中 4℃ 过夜。脑块沉底后取出,用冷冻切片机作 30 μ m 厚连续冠状切片,裱于 L-多聚赖氨酸处理过的玻片上;另一块制成 5 μ m 厚石蜡切片。ICAM-1 免疫组化染色:脑片入 PBS 漂洗 \rightarrow 10% H₂O₂ 甲醇,室温 30min \rightarrow 1% Triton X-PBS,室温 30min \rightarrow 10% 马血清,37℃ 3h \rightarrow 小鼠抗大鼠 ICAM-1 单抗(1:200),4℃ 湿盒内 72h \rightarrow 生物素标记马抗鼠二抗(1:200),37℃ 湿盒内 4h \rightarrow 辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素,37℃ 湿盒内 4h。以上各步骤间均用 PBS 漂洗,5min,3 次,DAB 显色,5min \rightarrow 上行梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。阴性对照用小鼠 IgG 代替一抗。每只取 3 张切片,每张切片随机选择 5 个互相不重叠视野,400 倍光镜下计数出血侧半球染成棕黄色的阳性微血管数,手工计数 ICAM-1 阳性微血管以排除偶尔表达 ICAM-1 的浸润细胞,取 3 张切片的平均数为每只结果。组织学检查:石蜡切片作 HE 染色后光镜下观察。镜下见体积较小、呈圆形、胞核呈杆状或分叶、胞浆丰富等特征的细胞,为中性白细胞;根据核固缩、胞浆浓缩、细胞边缘不规则等特征,确认为受损神经细胞。

7 统计学方法 两组间比较采用 t 检验。

结 果

1 各组大鼠 ICAM-1 mRNA 表达的改变 见图 1。假手术组术侧脑内有极低水平 ICAM-1 mRNA 表达;与正常组比较,各时间点差异均无显著性;与假手术组比较,模型组出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 表达在术后 4h 明显升高($P < 0.01$)24h 达到高峰,96h 仍保持较高水平,168h 恢复正常;与模型组同期比较,脑溢安组术后 12、24、48 和 96h 出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.01$)。

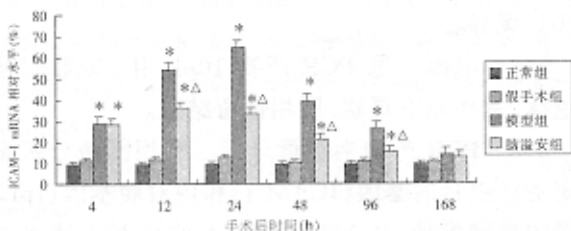


图 1 脑溢安对大鼠出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 表达水平的影响

注:与假手术组同期比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$ 万方数据

2 各组大鼠 ICAM-1 免疫反应阳性血管数的改变 见图 2。假手术组大鼠术侧脑内见少量 ICAM-1 免疫反应阳性血管,且各时间点与正常组比较差异均无显著性;与假手术组比较,模型组大鼠出血侧脑内 ICAM-1 免疫反应阳性血管数在术后 4h 明显增加($P < 0.01$)48h 达到峰值,以后逐渐减少,至 168h 仍较多。术后 12~168h,脑溢安组大鼠出血侧脑内 ICAM-1 免疫反应阳性血管数均较模型组同期显著减少($P < 0.01$)。

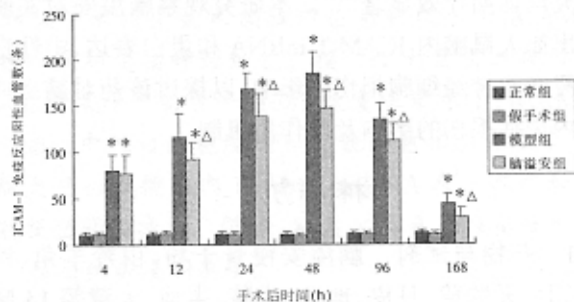


图 2 脑溢安对大鼠出血侧内 ICAM-1 免疫反应阳性血管数的影响

注:与假手术组同期比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠中性白细胞浸润和神经细胞损伤的改变 正常组和假手术组大鼠脑内未见中性白细胞浸润和神经细胞损伤;术后 4h,模型组大鼠出血侧脑微血管内可见中性白细胞粘附,血肿内及血肿周围脑内开始出现中性白细胞浸润,大脑皮质可见少量受损神经细胞,表现为胞浆浓缩、核固缩、细胞边缘不规则,细胞周围出现大量空隙;术后 12h,中性白细胞浸润和受损神经细胞继续明显增加;术后 48h,中性白细胞浸润和受损神经细胞数均多;术后 96 及 168h,中性白细胞浸润逐渐减少,巨噬细胞及胶质细胞明显增多,而受损神经细胞未再继续增加;脑溢安组大鼠从术后 12h 开始,出血侧脑内中性白细胞浸润和受损神经细胞数均较模型组明显减少。

讨 论

ICAM-1 是一种相对分子质量为 76~110kDa 的单链糖蛋白,属于免疫球蛋白超基因家族,与其配体即淋巴细胞功能相关抗原(LFA-1)在内皮细胞上结合,参与炎症发生过程,促进白细胞浸润,加重局部组织损伤。正常情况下,脑内 ICAM-1 表达水平很低;脑缺血-再灌注时,脑微血管内皮细胞上 ICAM-1 等粘附分子表达上调,介导白细胞-内皮细胞粘附,促进循环白细胞迁移进入脑实质,导致炎症性脑损伤;多种抗粘

附策略对脑缺血-再灌注损伤均具有保护作用^[6]。近年来,对脑内炎症反应及其干预措施的研究逐渐成为脑出血病理生理机理和防治研究中的新领域。

本实验结果表明,大鼠出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 表达在术后 4h 显著上升,24h 达到高峰,96h 仍保持较高水平,168h 恢复正常;ICAM-1 免疫反应阳性血管数于术后 4h 显著增加,48h 达到峰值,以后开始减少,持续至 168h;中性白细胞浸润和受损神经细胞数也均于术后 48h 时最多。表明 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达水平随时间改变趋势与中性白细胞浸润、神经细胞损伤程度的变化趋势基本平行,提示 ICAM-1 介导的中性白细胞浸润在脑出血后神经细胞损伤中可能起重要作用。有研究表明,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎性细胞因子诱导培养人脑微血管内皮细胞上 ICAM-1 mRNA 高度表达^[7]。Mayne 等^[8]发现,胶原酶诱导大鼠脑出血后 24h,脑内 TNF- α mRNA 及蛋白水平明显增高;使用反义寡核苷酸减少 TNF- α 表达对大鼠具有神经保护作用。结合本实验结果,我们推测:脑出血大鼠脑内 TNF- α 等炎性细胞因子大量生成,诱导脑微血管内皮细胞上 ICAM-1 等粘附分子表达增加,促进循环白细胞向脑内募集,通过以下机理造成脑损伤^[1,2,8-11]:阻塞微血管,导致继发性低灌注;释放氧自由基、一氧化氮(NO)和蛋白水解酶等损伤神经细胞和其他脑细胞;增加血管通透性,引发脑水肿。

本实验结果显示,用脑溢安治疗 12h 后,大鼠出血侧脑内 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达明显下调,相应区域的中性白细胞浸润及神经细胞损伤也显著减轻。提示减轻脑出血后脑内炎症反应,可能是该药实现神经保护作用的重要机理之一。我室曾报道该药可抑制脑出血大鼠脑内一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性,减少 NO 生成^[9,10];最近还发现该药可抑制脑出血大鼠脑内 TNF 蛋白表达,促进大鼠神经机能恢复^[11]。这些工作均提示,脑溢安具有抗脑出血后脑内炎症损伤作用。包仕尧等^[12]发现川芎嗪和丹皮酚可减少脑缺血-再灌注沙土鼠脑内白细胞和小胶质细胞数;刘军等^[13]证明丹参抗大鼠脑缺血-再灌注损伤作用机理与降低脑内 ICAM-1 蛋白表达、抑制中性白细胞浸润有关。由于脑溢安组方中同样含有丹皮、生地、三七等凉血泻火、活血化瘀类中药,因此认为这些工作也为本实验结果提供了支持证据。

参 考 文 献

- 1 Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in rats: magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke* 1996;27(12):2312-2320.
- 2 Gong C, Hoff JT, Keep RF. Acute inflammatory reaction following experimental hemorrhage in rat. *Brain Res* 2000;871(1-2):57-65.
- 3 梁清华,黎杏群.脑溢安颗粒剂与汤剂治疗急性脑出血临床疗效比较. *湖南医科大学学报* 1995;20(3):215-218.
- 4 胡随瑜,金益强,王勇华,等.脑溢安颗粒剂主要药效学研究. *中药新药与临床药理* 1997;8(3):150-152.
- 5 Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 1990;21(5):801-807.
- 6 Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1998;18(4):503-513.
- 7 Stanimirovic D, Shapiro A, Wong J, et al. The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemic-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J Neuroimmunol* 1997;76(1-2):193-205.
- 8 Mayne M, Ni W, Yan HJ, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001;32(3):240-248.
- 9 Peng ZC, Li XQ, Liang QH, et al. Induction of NADPH-diaphorase activity in the forebrain in a model of intracerebral hemorrhage and its inhibition by the traditional Chinese medicine complex Nao Yi An. *Brain Res Bull* 1997;42(2):119-128.
- 10 何 纲,黎杏群,张花先,等.脑溢安颗粒对脑出血大鼠脑组织病理改变及一氧化氮生成的影响. *现代康复* 2000;4(12):1832-1833.
- 11 张化彪,黎杏群,张铭湘.脑溢安对脑出血大鼠脑内碱性成纤维生长因子 mRNA 和肿瘤坏死因子蛋白表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2002;22(7):518-521.
- 12 包仕尧,傅 琦,张志琳,等.白细胞在实验性脑缺血中作用及中药川芎嗪和丹皮酚对其影响的研究. *中国神经精神疾病杂志* 1997;23(1):7-10.
- 13 刘 军,匡培根,吴卫平,等.大鼠脑缺血再灌注区 ICAM-1 表达与白细胞浸润的观察及丹参的影响. *中国神经精神疾病杂志* 1999;25(4):198-200.

(收稿 2002-09-25 修回 2003-03-10)