黄芩苷对脑出血大鼠脑组织凝血酶受体-1表达及细胞凋亡的影响

周庆博[1]　贾　青[2]　张　媛[1]　李鲁扬[3]

摘要　**目的**　研究黄芩苷对大鼠脑出血后神经组织的保护作用及其机制。**方法**　大鼠随机分为5组：假手术组、脑出血模型组、黄芩苷小、中、大剂量组，采用胶原酶Ⅶ诱导大鼠脑出血模型，术后2 h各治疗组给予不同剂量的黄芩苷腹腔注射，余组给予等容量生理盐水，每天1次，连续用药1、3、5、10天后取脑组织，Western blot法检测脑出血周围脑组织凝血酶受体1（protease-activated receptor-1，PAR-1）表达，TUNEL法检测细胞凋亡情况，干湿比重法测定脑组织水肿情况。**结果**　与脑出血模型组比较，黄芩苷各治疗组的大鼠脑组织PAR-1表达和TUNEL阳性细胞数明显减少、脑水肿减轻，差异均有统计学意义（P<0.01）。**结论**　脑出血后的脑组织PAR-1高表达可能介导了细胞凋亡和脑水肿，黄芩苷对脑出血大鼠有保护作用，可能参与抑制脑出血后脑组织PAR-1表达、减少细胞凋亡，从而减轻脑水肿症状。

关键词　黄芩苷；脑出血；蛋白酶激活受体；细胞凋亡；脑水肿

Effect of Baicalin on Protease-activated Receptor-1 Expression and Cell Apoptosis in Brain of Rat with Intracerebral Hemorrhage　ZHOU Qing-bo, JIA Qing, ZHANG Yuan, et al　*Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Shandong University, Jinan (250033)*

ABSTRACT　**Objective**　To investigate the protective effect and mechanism of baicalin on nerve tissue in rat with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods**　Rats were randomly divided into five groups: the sham-operated group, the ICH model group, and the three baicalin treated groups treated respectively with small, medium and large doses of baicalin. ICH rat model was established by injecting collagenase Ⅶ into caudate nucleus. Baicalin was given by peritoneal injection to the baicalin treated groups, and saline was given to the other two groups once a day started from 2 h after modeling. Animals were sacrificed in batches on the 1st, 3rd, 5th and 10th day of treatment to take their brains for detecting protease-activated receptor-1 (PAR-1) expression and cell apoptosis in brain tissue surrounding hematoma by Western blot and TUNEL method, respectively. And the water content of brain was estimated by dry-wet weight method. **Results**　Compared with the model group, the PAR-1 expression and TUNEL-positive cells were significantly reduced in the baicalin treated groups; and brain edema was also significantly reduced (P<0.01). **Conclusions**　The up-regulated PAR-1 expression after ICH in rats might play an important role in inducing cell apoptosis and brain edema. Baicalin shows significant protective effect on ICH rats, which may be related to its effects in inhibiting PAR-1 expression and decreasing apoptosis cells, so as to reduce brain edema.

KEYWORDS　baicalin; intracerebral hemorrhage; protease-activated receptor-1; cell apoptosis; brain edema

近年研究表明，血肿释放的凝血酶在脑出血后的脑组织损伤过程中起着关键作用，与神经细胞凋亡、脑组织水肿及血脑屏障破坏等密切相关[1]。凝血酶通过作用于脑组织内蛋白酶激活受体-1（PAR-1）而发挥细胞毒性作用，特异性凝血酶抑制剂可显著减轻脑出血后脑水肿及神经损伤，但其临床应用尚处于探索阶段。我们在临床实践中发现毒邪与中风病密切相关，热毒是中风病急性期的主导病机之一[2]。既往研究，我们观察到具有清热解毒功效的脑宁康颗粒（黄芩等药物），对脑出血大鼠具有神经保护作用[3]。黄芩苷（baicalin，分子式$C_{21}H_{18}O_{11}$）是从传统中药黄芩根部提取的主要活性成分，是中药复方制剂清开灵注射液、醒脑静注射液等的重要成分，两者在临床上广泛用于治疗急性脑血管病[4,5]。目前，黄芩苷对脑出血后的神经损伤是否有保护作用及相关机制报道较少，本研究旨在观察黄芩苷对脑出血后PAR-1表达及神经细胞凋亡的影响，探讨其作用机制。

基金项目：山东省自然科学基金资助项目（No. Q2008C26）；山东省中医药管理局资助项目（No. 2007-143）

作者单位：1. 山东大学第二医院（济南 250033）；2. 山东医学科学院；3. 山东大学齐鲁医院

通讯作者：周庆博，Tel：15153169197，E-mail：lianxiang1210@163.com

万方数据

材料与方法

1 动物 清洁级Wistar雄性大鼠120只，10~12月龄，体重300~350 g，由山东大学医学院动物实验中心提供，SPF级。

2 药品及试剂 黄芩苷（四川协力制药有限公司，国药准字：H20053191，纯度：98.1%）；Ⅶ型胶原酶：美国Sigma公司提供；10%水合氯醛：山东齐鲁制药厂生产；凝血酶受体抗体试剂盒（SC-13503）：美国Santa Cruz Biotechnology公司提供；细胞凋亡检测试剂盒：北京中山生物技术有限公司提供；SDS-PAGE凝胶配制试剂盒和Bradford蛋白浓度测定试剂盒：上海碧云天生物技术研究所提供。

3 方法

3.1 分组及给药方法 实验条件下大鼠适应性喂养1周后，随机分为5组，即假手术组，脑出血模型组，黄芩苷小剂量组（25 mg/kg），黄芩苷中剂量组（50 mg/kg），黄芩苷大剂量组（100 mg/kg），各组在模型复制成功后再随机分成1、3、5、10天，共4个时相点组，每组每个时相点6只大鼠。模型制备成功后2 h开始给药，黄芩苷各治疗组腹腔注射给予相应剂量的黄芩苷混悬液，假手术组和脑出血模型组均分别腹腔注射给予等容量生理盐水，连续用药，均每天1次。

3.2 脑出血大鼠模型制备 参考Rosenberg GA等[6]造模方法，将大鼠以10%水合氯醛溶液按360 mg/kg腹腔注射麻醉后，俯卧位固定在大鼠立体定向仪上，暴露颅骨，在前囟前0.2 mm，中线右旁开3 mm处，用7#注射针头钻透颅骨，成一直径约3 mm小孔，用微量注射器沿针孔垂直进针6 mm后（即尾状核部位），将1 μL的胶原酶Ⅶ（0.5 U/μL）缓慢匀速注入脑组织，留针10 min后，缓慢退出。缝合切口，消毒，肌肉注射0.3 mL庆大霉素注射液。假手术组操作同上，但不注入胶原酶，注入等量的1 μL生理盐水。术后根据Longa EZ法[7]进行 5分制神经功能评分：0分：无明显神经病学症状；1分：不能完全伸展右前肢；2分：向右侧旋转；3分：行走时向右侧倾倒；4分：不能自行行走。评分为1~3分者模型制备成功，余者剔除。不足预定数额者按照随机抽样原则补齐动物并重新造模。

3.3 组织标本制备 大鼠脑出血后，按实验分组规定的时间点，将大鼠麻醉，断头处死，冰盘上取出全脑，用冷生理盐水（4 ℃）冲洗3遍，除去积血，用滤纸吸去表面水分，去除嗅脑、小脑和低位脑干。于冰盘上迅速分离大脑半球，取左侧半球，进针孔则标志着尾状核的所在位置。以进针孔为界冠状切开脑组织，前半部分出血灶及血肿周围脑组织损伤区待测脑组织含水量；后半部分出血灶及血肿周围脑组织损伤区置于-70 ℃冰箱中冻存，用于匀浆检测生化指标。

3.4 脑组织PAR-1表达的检测 采用Western blot法，取血肿周围的100 mg脑组织，冰上研磨组织至粉末状后加预冷的蛋白裂解液，超声波匀浆,冰上静置1 h，然后4 ℃ 14 000 r/min 离心30 min，留上清液，用Bradford法测定蛋白浓度，配置8.0%分离胶，蛋白样品中加入上样缓冲液煮沸变性，100 V垂直电泳，溴酚蓝到达分离胶底部后电泳结束，在200 mA条件下硝酸纤维素膜进行印迹转移40 min，封闭液室温下膜封闭后，加入羊抗小鼠PAR-1（一抗），4 ℃孵育膜过夜；次日TBST液室温下摇动清洗3次；HRP偶联兔抗羊二抗稀释液室温下摇动孵育1 h，TBST液室温下摇动清洗3次，DAB显色，应用扫描成像系统对膜进行扫描，Total LabTL120图像分析软件进行图像分析，获取每只动物条带的积分光密度值，目的蛋白与同一样本的β-actin积分光密度比值即为目的蛋白的相对表达水平。

3.5 脑组织细胞凋亡的检测 采用TUNEL染色法，细胞核或胞浆中见有棕色颗粒者为阳性细胞，即凋亡细胞。每只动物观察2张切片，在OlympusCH1型200倍显微镜下，随机观察每张切片的血肿周围6个不重叠视野，利用Leica QWin V3图像分析系统，计数TUNEL阳性细胞数，计算出其均值，为1只大鼠的结果。

3.6 脑组织含水量的检测 应用干湿比重法，取大脑前部组织立即测湿重，后将同一标本放入95 ℃烘箱中烘烤24 h至恒重，再称干重，干湿重均应用电子分析天平测定。脑组织含水量（%）=（湿重-干重）/湿重×100%。

3.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用SPSS 13.0统计软件，多组间比较采用方差分析。

结 果

1 各组急性脑出血大鼠脑组织PAR-1蛋白表达比较（表1，图1） 假手术组大鼠大脑的PAR-1蛋白的表达量维持在较低水平且恒定；在各时点，与假手术组比较，大鼠脑PAR-1蛋白表达差异均有统计学意义（$P<0.01$），与模型组比较，黄芩苷小、中、大剂量组PAR-1蛋白的表达量均降低，差异有统计学意义（$P<0.01$）；黄芩苷组随着剂量的加大，在3、5天各时点，PAR-1蛋白的表达量均逐渐减少，差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）；10天时，黄芩苷小、中、大剂量组PAR-1蛋白表达量的差异无统计学意义（$P>0.05$）。

万方数据

表1　各组急性脑出血大鼠脑组织PAR-1蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	PAR-1蛋白表达			
		1天	3天	5天	10天
假手术	6	0.217 ± 0.024	0.221 ± 0.016	0.218 ± 0.019	0.220 ± 0.020
模型	6	1.580 ± 0.041*	2.607 ± 0.042*	1.260 ± 0.032*	0.960 ± 0.033*
黄芩苷小剂量	6	1.000 ± 0.039$^{\triangle}$	1.347 ± 0.036$^{\triangle}$	0.880 ± 0.024$^{\triangle}$	0.347 ± 0.037$^{\triangle}$
中剂量	6	0.923 ± 0.023$^{\triangle}$	1.042 ± 0.053$^{\triangle}$	0.537 ± 0.034$^{\triangle}$	0.307 ± 0.019$^{\triangle}$
大剂量	6	0.880 ± 0.032$^{\triangle}$	0.987 ± 0.050$^{\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$	0.423 ± 0.031$^{\triangle\blacktriangle}$	0.313 ± 0.036$^{\triangle}$

注：与假手术组比较，$^{*}P$<0.01；与模型组比较，$^{\triangle}P$<0.05；与黄芩苷小剂量组比较，$^{\blacktriangle}P$<0.05，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P$<0.01

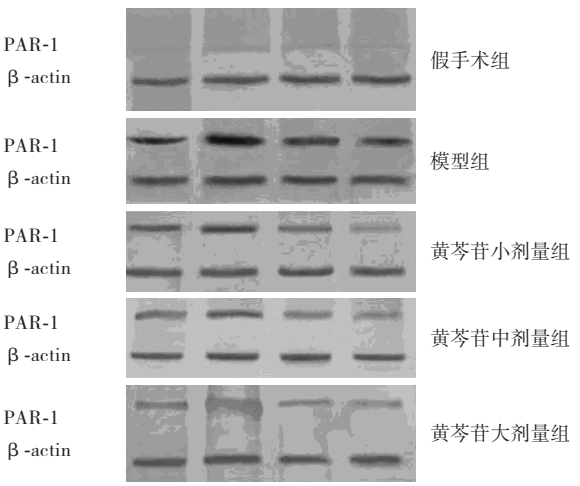

图1　Western blot检测不同时间点各组大鼠脑PAR-1蛋白的表达

2　各组急性脑出血大鼠脑组织TUNEL阳性细胞数比较（表2）　假手术组偶见阳性细胞。脑出血模型组TUNEL阳性细胞数量明显增多，与假手术组比较，差异有统计学意义（P<0.01）。黄芩苷小、中、大剂量组的TUNEL阳性细胞数均较模型组明显减少（P<0.01）；脑出血1、3、5天，黄芩苷中、大剂量组与小剂量组之间比较，差异有统计学意义（P<0.01），大剂量组TUNEL阳性细胞数最少，中剂量组次之，小剂量组最多。脑出血10天，黄芩苷小、中、大剂量组间的TUNEL阳性细胞数差异无统计学意义。

3　各组急性脑出血大鼠脑组织含水量比较（表3）　与假手术组比较，脑出血模型组的脑组织含水量明显升高（P<0.01）。脑出血1、3、5天，黄芩苷小、中、大剂量组的脑组织含水量均较模型组明显减少，差异有统计学意义（P<0.05），脑出血3天，黄芩苷中、大剂量组与黄芩苷小剂量组比较，差异有统计学意义（P<0.01）。

讨　论

脑出血是临床常见病，临床上除应用甘露醇等传统脱水药外，缺乏有效的内科治疗手段。脑出血发病后30天内的病死率接近50%，存活者中仅有20%在发病后6个月时获得了有功能意义的恢复，很多患者遗留有持久的神经功能障碍和脑萎缩[8]。

脑出血的神经损伤机制除了血肿的机械压迫和占位效应，还存在血肿的继发性损伤。脑出血后血液在凝固过程中产生的大量凝血酶具有细胞毒性作用，是出血后一系列病理生理变化而致继发性脑损伤的关键物质[1、9]。凝血酶受体是一种蛋白酶激活受体（PAR），目前，已有4种PARcDNA被克隆，其中PAR-1、PAR-3、PAR-4主

表2　各组急性脑出血大鼠脑组织TUNEL阳性细胞数比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	TUNEL阳性细胞数（个）			
		1天	3天	5天	10天
假手术	6	3.000 ± 0.739	2.750 ± 0.622	2.500 ± 0.674	2.417 ± 0.515
模型	6	38.583 ± 2.610*	45.167 ± 1.899*	29.500 ± 2.541*	16.917 ± 1.311*
黄芩苷小剂量	6	34.000 ± 2.132$^{\triangle}$	37.500 ± 1.784$^{\triangle}$	25.333 ± 2.498$^{\triangle}$	10.500 ± 1.446$^{\triangle}$
中剂量	6	31.917 ± 1.564$^{\triangle\blacktriangle}$	33.417 ± 1.240$^{\triangle\blacktriangle}$	24.250 ± 2.179$^{\triangle}$	9.833 ± 1.528$^{\triangle}$
大剂量	6	31.167 ± 1.267$^{\triangle\blacktriangle}$	32.250 ± 1.357$^{\triangle\blacktriangle}$	23.500 ± 2.316$^{\triangle\blacktriangle}$	9.667 ± 1.497$^{\triangle}$

注：与假手术组比较，$^{*}P$<0.01；与模型组比较，$^{\triangle}P$<0.01；与黄芩苷小剂量组比较，$^{\blacktriangle}P$<0.01

表3　各组急性脑出血大鼠脑组织含水量比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	脑含水量（%）			
		1天	3天	5天	10天
假手术	6	70.122 ± 0.511	69.983 ± 0.556	70.105 ± 0.356	69.788 ± 0.405
模型	6	78.867 ± 0.565*	78.683 ± 0.343*	74.428 ± 0.947*	71.343 ± 0.795*
黄芩苷小剂量	6	76.633 ± 0.804$^{\triangle}$	75.617 ± 0.621$^{\triangle}$	74.070 ± 0.813	70.888 ± 0.563
中剂量	6	76.073 ± 0.774$^{\triangle}$	74.572 ± 0.503$^{\triangle\blacktriangle}$	72.958 ± 0.777$^{\triangle}$	70.988 ± 0.614
大剂量	6	76.052 ± 0.186$^{\triangle}$	74.533 ± 0.475$^{\triangle\blacktriangle}$	72.658 ± 0.514$^{\triangle}$	70.793 ± 0.511

注：与假手术组比较，$^{*}P$<0.01；与模型组比较，$^{\triangle}P$<0.05；与黄芩苷小剂量组比较，$^{\blacktriangle}P$<0.01

万方数据

要由凝血酶激活，PAR-2主要由胰蛋白酶、凝血因子Ⅶa和Ⅹa激活，以PAR-1介导的作用最为主要，其在脑内分布最广泛[10]。凝血酶诱导神经细胞凋亡的机制尚不完全清楚，Gong C等[11]向脑内注入5 U（100 μL）凝血酶后，在注入区可检测到TUNEL阳性细胞；大量研究表明，脑出血后PAR-1高表达介导了脑组织水肿和神经细胞凋亡[1, 11, 12]。本研究显示：正常脑组织内几乎无PAR-1表达，但在胶原酶诱导的脑出血周围脑组织PAR-1表达非常明显，同时TUNEL阳性细胞明显增多、脑组织含水量明显增加，脑出血后脑水肿、PAR-1表达和TUNEL阳性细胞增多均在出血后3天达到高峰，5天已减轻，10天趋于正常，表明脑出血后10天内脑组织PAR-1的表达、细胞凋亡和脑水肿可能均存在升后渐降的病理演变过程，相互间有着密切的关系。该结果与既往研究相符[12]。

PAR-1介导的神经细胞凋亡的确切信号转导通路尚未明了，Nakamura T等[13]认为是通过蛋白酶信号系统和NMDA受体起作用，凝血酶通过激活PAR-1，增强NMDA受体的敏感性，加重了谷氨酸介导的神经元凋亡和死亡。凝血酶引起的细胞凋亡还与细胞内Ca^{2+}超载相关[14]，可能存在着酪氨酸激酶（PTK）、蛋白激酶C（PKC）和RhoA等信号物质的参与[15]。

本研究显示，黄芩苷可显著抑制脑出血后脑组织PAR-1表达、减少神经细胞凋亡的发生、减轻脑水肿而保护神经细胞，大、中剂量组效果优于小剂量组（$P<0.01$）。已有报道亦显示，黄芩苷在脑脊液中浓度较高，对感染导致的脑水肿有较好疗效；并可抑制大鼠脑缺血再灌注后的神经细胞凋亡，减轻脑损伤[16]。

参 考 文 献

[1] Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage[J]. Lancet Neurol, 2006, 5 (1) : 53–63.

[2] 周庆博, 邵念方, 毕建忠. 清热解毒法在中风病急性期治疗中的探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24 (3) : 263–265.
Zhou QB, Shao NF, Bi JZ. Exploration on the application of heat-clearing and detoxicating in treating stroke in acute stage[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2004, 24 (3) : 263–265.

[3] 周庆博, 李鲁杨, 贾青, 等. 脑宁康颗粒对脑出血大鼠的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27 (9) : 814–818.
Zhou QB, Li LY, Jia Q, et al. Protective effect of Naoningkang Granule on brain in intracerebral hemorrhagic rats[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2007, 27 (9) : 814–818.

[4] 朱磊, 张彦红. 清开灵注射液治疗脑出血急性期随机对照试验系统评价[J]. 国际医药卫生导报, 2009, 15 (3) : 42–46.
Zhu L, Zhang YH. Qingkailing Injection for acute cerebral hemorrhage: a systematic review[J]. Intern Med Health Guid News, 2009, 15 (3) : 42–46.

[5] 王珏, 程安龙, 吕善庆, 等. 醒脑静治疗急性脑血管病的临床观察[J]. 脑与神经疾病杂志, 2000, 8 (2) : 115–117.
Wang J, Cheng AL, Lu SQ, et al. Clinical observation on effect of Xingnaojing Injection in treating acute cerebrovascular disease[J]. J Brain Nerv Dis, 2000, 8 (2) : 115–117.

[6] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21 (5) : 801–807.

[7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20 (1) : 84–91.

[8] Naval NS, Nyquist PA, Carhuapoma JR. Management of spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. Neurol Clin, 2008, 26 (2) : 373–384.

[9] Lee KR, Kawai N, Kim S, et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model[J]. Neurosurg, 1997, 86 (2) : 272–278.

[10] Avala YM, Cantwell AM, Rose T, et al. Molecular mapping of the thrombin-receptor interaction[J]. Protein, 2001, 45 (2) : 107–116.

[11] Gong C, Boulis N, Qian T, et al. Intracerebral hemorrhage induced neuronal death[J]. Neurosurgery, 2001, 48 (4) : 875–882.

[12] 姜亚军, 常诚, 张琳, 等. 脑出血后脑组织凝血酶受体-1 (PAR-1) 的表达及其病理意义[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21 (2) : 100–103.
Jiang YJ, Chang C, Zhang L, et al. Role of thrombin receptor-1 in the pathogenesis of cerebral hemorrhage in rats [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2004, 21 (2) : 100–103.

[13] Nakamura T, Keep RF, Hua Y, et al. Intracerebral hemorrhage induces edma and oxidative stress and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunits expression[J]. Acta Neurochir Suppl, 2005, 95 (9) : 421–424.

[14] Gingrich MB, Junge CE, Lyuhoslavsky P, et al. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin[J]. Neurosci, 2000, 20 (12) : 4582–4595.

[15] 周中和, 曲方, 张朝东. 脑出血凝血酶的神经毒性机制及其防治策略[J]. 中国临床神经科学, 2008, 16 (1) : 318–323.
Zhou ZH, Qu F, Zhang CD. Neurotoxicity mechanism of thrombin in intracerebral hemorrhage and its prevention and cure strategies[J]. Chin J Clin Neurosci, 2008, 16 (1) : 318–323.

[16] 刘萍, 王菊英, 王姿颖, 等. 黄芩苷对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19 (6) : 412–418.
Liu P, Wang JY, Wang ZY, et al. Effects of baicalin on hippocampus neuronal apoptosis in focal cerebral ischemia-reperfusion injury rats[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2005, 19 (6) : 412–418.

（收稿：2010–04–21 修回：2010–09–07）

万方数据