

人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积及脑组织和血清 IL-1 β 的影响

刘俊伟^{1*} 任冶龙¹ 刘旭玲¹ 夏红莲¹ 张慧玲² 金深辉¹ 戴勤学¹ 王均炉¹

摘要 **目的** 研究人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)后脑梗死体积及脑组织和血清中炎症因子 IL-1 β 的影响。**方法** 采用线栓法建立大鼠 I/R 模型,将 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,人参皂苷 Rb1 低(20 mg/kg)、中(40 mg/kg)、高剂量(80 mg/kg)组,每组 12 只。假手术组大鼠仅做大脑中动脉栓塞手术,但不插入线栓。除假手术组外,另 4 组均接受线栓法制备大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,2 h 后恢复大脑中动脉再灌注;人参皂苷 Rb1 各剂量组于脑缺血即刻腹腔注射,模型组给予等量生理盐水。观察各组大鼠脑缺血 2 h 再灌注损伤后 24 h 大鼠神经缺损程度评分、脑梗死体积、脑组织及血清 IL-1 β 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组神经功能缺损程度评分提高($P < 0.01$),脑组织 IL-1 β 阳性细胞数增加,血清 IL-1 β 含量升高($P < 0.05$)。与模型组比较,人参皂苷 Rb1 中、高剂量组神经缺损程度评分降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),人参皂苷 Rb1 各剂量组梗死体积均缩小,脑组织 IL-1 β 阳性细胞数减少,血清 IL-1 β 含量降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与人参皂苷 Rb1 低剂量组比较,高剂量组神经功能缺损程度评分降低,梗死体积缩小,血清 IL-1 β 含量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rb1(20、40、80 mg/kg)可能通过下调 IL-1 β 的表达有效缓解大鼠局灶性脑 I/R。

关键词 脑缺血再灌注损伤;人参皂苷 Rb1;白介素-1 β

Effect of Ginsenoside Rb1 on Cerebral Infarction Volume and IL-1 β in the Brain Tissue and Sera of Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Model Rats LIU Jun-wei¹, REN Ye-long¹, LIU Xu-ling¹, XIA Hong-lian¹, ZHANG Hui-ling², JIN Shen-hui¹, DAI Qin-xue¹, and WANG Jun-lu¹ 1 Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China; 2 Department of Anesthesiology, Yangquan Coal Group General Hospital, Shanxi (045000), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of ginsenoside Rb1 on cerebral infarction volume as well as IL-1 β in the brain tissue and sera of focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury model rats. **Methods** The I/R rat model was established by using thread according to Zea-Longa. SD rats were randomly divided into five groups, i.e., the sham-operation group, the model group, the low dose ginsenoside Rb1 (20 mg/kg) group, the medium dose ginsenoside Rb1 group (40 mg/kg), and the high dose ginsenoside Rb1 group (80 mg/kg), 12 in each group. Rats in the sham-operation group only received middle cerebral artery occlusion (MCAO) but without thread insertion. The MCAO model was prepared in the rest 4 groups, followed by MCAO 2 h later. Ginsenoside Rb1 at each dose was peritoneally administrated to rats in corresponding groups immediately after cerebral ischemia. Equal volume of normal saline was administered to rats in the sham-operation group. Rats' cerebral infarction volume, integrals of neurologic defect degree, expression of IL-1 β content in the brain tissue and sera were observed 24 h after 2-h cerebral I/R. **Results** In the model group, integrals of neurologic defect degree were improved ($P < 0.01$), IL-1 β positive cells in the brain tissue increased and serum IL-1 β content elevated ($P < 0.05$),

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2101225);浙江省中医药管理局(No.2011ZB086)

作者单位:1.温州医学院附属第一医院麻醉科(浙江温州 325000);2.山西省阳泉市阳煤集团总医院麻醉科(山西阳泉 045000)

通讯作者:王均炉, Tel:0577-88069458, E-mail:wangjunlu@163.com

*现在山西省阳泉市阳煤集团总医院麻醉科(山西阳泉 045000)

DOI: 10.7661/CJIM.2013.12.1696

when compared with the sham-operation group. In comparison of the model group, integrals of neurologic defect degree were lowered in the medium dose and high dose ginsenoside Rb1 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The cerebral infarction volume was all shrunken in each ginsenoside Rb1 group, IL-1 β positive cells in the brain tissue decreased, and IL-1 β content in serum reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the low dose ginsenoside Rb1 group, integrals of neurologic defect degree decreased, the cerebral infarction volume shrunken, and IL-1 β content in serum reduced in the high dose ginsenoside Rb1 group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion Ginsenoside Rb1 (20, 40, 80 mg/kg) might effectively release local cerebral ischemia by down-regulating the IL-1 β expression.

KEYWORDS cerebral ischemia-reperfusion injury; ginsenoside Rb1; interleukin-1 β

脑缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)的机制十分复杂,是一个多因素参与的复杂的级联反应。如炎症反应、钙超载,氧自由基作用等。近来有研究发现炎症反应参与缺血性脑损伤,为其重要病理机制之一^[1,2]。因此研究抑制脑缺血后炎症反应,可能成为治疗脑缺血损伤的有效方法。人参皂苷 Rb1 是人参的有效成分之一,是人参二醇型的代表性成分。已有研究表明人参皂苷 Rb1 对中枢神经系统疾病有保护作用。其主要作用机制包括:抑制钙超载,抑制神经元细胞凋亡,抗氧化清除自由基等作用^[3,4]。本实验采用大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO) I/R 模型,进一步研究证实人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑 I/R 保护作用及对炎症反应相关因子 IL-1 β 的影响,为人参皂苷 Rb1 治疗脑血管疾病提供更充分的实验依据。

材料与方法

1 实验动物 健康成年雄性 SD 大鼠,3~5 个月龄,体重 260~300 g,上海斯莱克实验动物中心提供,许可证号:SCXK[沪]2007-0005。实验前适应环境 1 周,自由进食、饮水,室温(23 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,术前 1 天禁食,不禁饮。

2 试剂及仪器 人参皂苷 Rb1(上海同田生物技术公司,批号:10072432);IL-1 β 抗体(Abcam 公司,美国);血清 IL-1 β 定量双抗体夹心 ELISA 试剂盒(上海西唐生物有限公司);SP 免疫组化染色试剂盒和 DAB 显色剂(北京中杉金桥生物有限公司);TTC 试剂(Sigma 公司,美国);微量分光光度计(Thermo, NanoDrop1000, 美国);酶标仪型号(DENLEY DRAGON Wellscan MK3, Thermo, 芬兰);线栓(型号:2634,北京沙东生物有限公司)。

3 动物分组 60 只大鼠随机分为假手术组,模型组,人参皂苷 Rb1 低(20 mg/kg)、中(40 mg/kg)、高剂量(80 mg/kg)组,每组 12 只。

4 I/R 模型制备 除假手术组外,各组均参照改良 Zea Longa 法^[5]采用颈外动脉插入线栓法制作模型。所有大鼠称重后,用 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,3~5 min 后麻醉达成。将大鼠腹面朝上固定在手术操作台上,颈部备皮,75% 酒精消毒后,颈部正中切口长约 3~4 cm,依次钝性分离肌肉、组织,暴露右侧迷走神经、颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),分离迷走神经时注意避免损伤,以免引起呼吸骤停。将提前准备好的丝线分别在颈总动脉近心端,颈外动脉远端挂线。动脉夹夹住颈总动脉近心端与颈内动脉远心端。沿着颈外动脉动脉结扎两线间将其剪断,在颈外动脉距颈总动脉分叉处之间,距离短端 2 mm 左右剪一小口。将提前准备好线栓沿小切口插入约 5 mm 后,将预先放置在颈外动脉根部的丝线打结将其固定,打结的松紧以不易颈内动脉反流出血又可以顺利推进线栓为宜,然后松开颈内动脉远心端的动脉夹,将线栓缓慢地向颈内动脉入颅方向推进大约 18~19 mm 后再将固定丝线收紧再次打结,防止大鼠出血。在向颅内送线栓时如果遇到阻力时,应停止并调整进线栓方向,一般都可以成功地完成,缝合皮肤。此时即完成右侧 MCAO 模型,记录此刻时间,栓塞颈内动脉 120 min 后,拔出线栓,恢复脑血流,术中维持肛温 36~37 $^{\circ}\text{C}$ 。于动物清醒时参照 Longa EZ 等^[6]的神经缺陷 5 级 4 分法对大鼠行为学进行评分,0 分(正常):无功能障碍;1 分(轻度神经行为学缺陷):不能完全伸展左前肢;2 分(中度神经行为学缺陷):向左侧旋转;3 分(重度神经行为学缺陷):向左侧倾倒;4 分(极重度神经行为学缺陷):无自主活动伴意识抑制。评分 1 分及以上作为实验对象,0 分剔除。造模过程中死亡 3 只,神经缺陷评 0 分 1 只。造模成功率 92.3%,死亡率 5.8%。

5 干预方法 假手术组仅做大脑中动脉栓塞手术,但不插入线栓;各给药组于脑缺血即刻给予腹腔注

射;模型组给予等量生理盐水注射。

6 检测指标及方法 各组大鼠于 IR 后 24 h, 评估神经功能后,深麻醉下,各组下腔静脉取血后,随机 6 只,大鼠直接断头,取脑,置于 - 20 ℃ 冰箱中 20 min,用于 TTC 染色测脑梗死体积,余下各组大鼠经开胸灌注后,取脑组织,石蜡包埋、切片(厚度 4 μm),用于免疫组化染色。

6.1 神经功能缺损程度评分 大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,采用单盲法进行评分,参照 Longa EZ 等^[6] 5 级 4 分法进行神经功能缺损程度评分。

6.2 脑梗死体积测量 脑组织从冰箱中取出后,间隔 2 mm 连续切成 5 个冠状切片,用 2% TTC 缓冲液避光染色 30 min,梗死部分被染成白色。数码相机拍照后应用 IPP6.1 图像分析软件,计算脑梗死区域的面积再乘以 2 mm 后相加即为梗死体积。

6.3 脑组织及血清 IL-1β 表达检测 石蜡标本切片后经 3% H₂O₂ 室温处理 10 min 灭活内源性过氧化物酶、柠檬酸缓冲液(PBS)3 min × 2 次、将切片放入柠檬酸缓冲液中(0.01 mol/L, pH 6.0)、微波 98 ℃、3 min 修复、自然冷却后,PBS 3 min × 2 次,加入 10% 的胎牛血清(FBS)封闭 30 min,单克隆抗鼠 IL-1β 抗体覆盖切片组织 4 ℃ 过夜,复温 30 min,加鼠抗兔二抗,PBS 3 min × 2 次,DAB 显色,苏木素复染,水洗,脱水,透明,封片,光学显微镜下观察,阴性照片用 PBS 液代替。阳性细胞在显微镜下为棕黄色,记录并比较各组脑组织 IL-1β 阳性细胞数。血清 IL-1β 检测:动脉取血 8 mL,加入含肝素抗凝的试管中,混匀,在 4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 10 min,取血清备用。采用双抗体夹心 ELISA 法检测,操作严格按试剂盒说明书步骤进行。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计分析,全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验进行两两比较,若方差不齐则采用 Tamhane 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组神经功能缺损程度评分及脑梗死体积比较(表 1) 假手术组无神经功能障碍,其余各组大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 均有不同程度的神经功能障碍。与假手术组比较,模型组神经功能缺损程度评分提高($P < 0.01$)。与模型组比较,人参皂苷 Rb1 中、高剂量组神经功能缺损程度评分降低($P < 0.05, P < 0.01$),人参皂苷 Rb1 各剂量组梗死体积均缩小($P <$

0.01);与人参皂苷 Rb1 低剂量组比较,高剂量组神经功能缺损程度评分降低,梗死体积缩小($P < 0.01$)。

表 1 大鼠神经缺损程度评分和脑梗死体积 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	评分 (分)	脑梗死体积 (mm ³)
假手术	—	12	0.0 ± 0.0 **	0.0 ± 0.0 **
模型	—	12	2.6 ± 1.1	253.9 ± 68.8
人参皂苷 Rb1 低剂量	20	12	2.2 ± 0.7	181.3 ± 27.0 **
中剂量	40	12	1.7 ± 0.9 *	116.7 ± 32.4 **
高剂量	80	12	1.2 ± 0.8 **△	95.5 ± 15.7 **△

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与人参皂苷 Rb1 低剂量组比较,△ $P < 0.01$

2 各组脑组织及血清 IL-1β 表达比较(图 1,表 2) 假手术组表达少量 IL-1β,与假手术组比较,模型组脑组织 IL-1β 阳性细胞数增加,血清 IL-1β 含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,人参皂苷 Rb1 各剂量组 IL-1β 的阳性细胞数减少,血清 IL-1β 含量降低($P < 0.05$);与人参皂苷 Rb1 低剂量组比较,高剂量组血清 IL-1β 含量降低($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠脑组织 IL-1β 免疫组化和血清 IL-1β 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

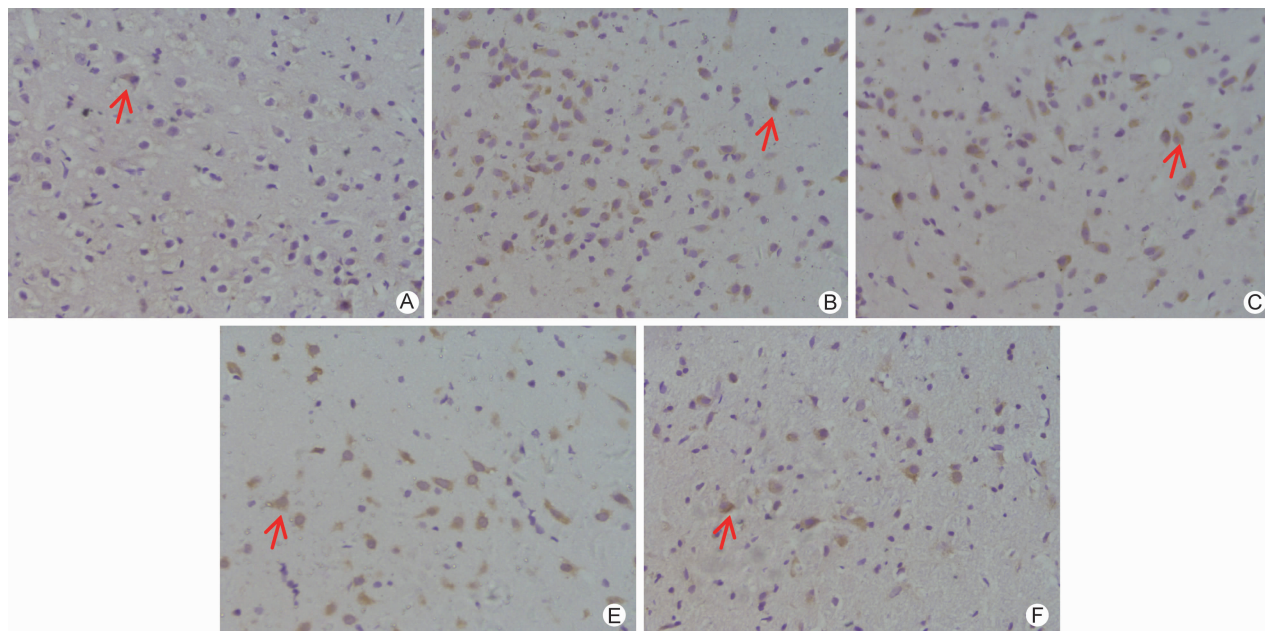
组别	剂量 (mg/kg)	n	IL-1β 阳性细胞数(个)	血清 IL-1β 含量(pg/mL)
假手术	—	6	4.8 ± 1.7 **	19.3 ± 2.8 **
模型	—	6	44.7 ± 6.3	205.1 ± 35.4
人参皂苷 Rb1 低剂量	20	6	33.0 ± 3.7 *	89.6 ± 27.1 **
中剂量	40	6	22.2 ± 2.5 **	50.0 ± 19.1 **
高剂量	80	6	22.0 ± 2.3 **	35.5 ± 24.0 **△

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与人参皂苷 Rb1 低剂量组比较,△ $P < 0.05$

讨 论

缺血性脑血管疾病的发病机制是由于血流量突然中断或减少,早期溶栓治疗,缺血区恢复血供后却出现了更加严重的脑损伤,即称之为脑 I/R。国内外的研究发现其发病机制是一个多因素、多环节的级联反应。近来有研究发现炎症反应中多种炎症因子如 IL-1β、TNF-α 等参与缺血性脑损伤的“瀑布效应”,为其重要病理机制之一^[2,7]。Yamasaki Y 等^[8]报道脑室内注射重组 IL-1β 增加大鼠脑 I/R 后脑梗死体积表明 IL-1β 蛋白是大鼠脑 I/R 的重要病理机制之一。Hara H 等^[9]研究表明选择性抑制 IL-1β 可以减轻脑 I/R,提示 IL-1β 含量对衡量脑 I/R 有重要的意义。

另一方面,人参是中国传统中药,其应用于中医临床有 2 000 多年的悠久历史。人参皂苷 Rb1 是从人参



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为人参皂苷 Rb1 低剂量组;D 为人参皂苷 Rb1 中剂量组;E 为人参皂苷 Rb1 高剂量组;红色箭头所指棕黄色细胞为 IL-1 β 阳性表达细胞

图 1 各组脑组织中 IL-1 β 阳性细胞表达 (DAB 染色, $\times 400$)

中提取的有效成分,是人参二醇皂苷的有效成分之一。人参皂苷 Rb1 具有抗脂质过氧化,清除自由基、抑制兴奋性氨基酸释放及抗凋亡、抑制炎症反应等多种作用。有研究表明,对中枢神经系统疾病,人参皂苷 Rb1 可以通过多种机制来达到脑保护的作用。Lim JH 和黄诒森等^[10,11] 研究也表明人参皂苷 Rb1 及人参三醇皂苷的脑保护作用与清除自由基,抑制脂质过氧化反应有关。江山等^[12] 在研究人参皂苷 Rb1 对大鼠海马脑片缺血损伤的保护作用时观察到人参皂苷 Rb1 可以促进海马脑片缺血条件下顺向群峰电位的恢复程度,表明人参皂苷 Rb1 有对抗 GLu 兴奋毒性的作用。吴新民等^[13] 研究发现人参皂苷 Rb1 可以减少人脐静脉内皮细胞中 TNF- α 、VCAM-1 的高表达,提示人参皂苷 Rb1 对心血管疾病有临床应用价值。那么人参皂苷 Rb1 的脑保护效应与脑 I/R 的进程中起到重要作用的炎症因子 IL-1 β 是否相关,其结论一直不明确。

本研究结果证实了人参皂苷 Rb1 对脑 I/R 的保护作用,并进一步探索 Rb1、IL-1、脑 I/R 之间的关系。在本实验中发现,大鼠脑缺血 2 h 再灌注后 24 h,缺血即刻给予腹腔注射不同剂量(20、40、80 mg/kg)人参皂苷 Rb1,都可以不同程度降低大鼠神经缺损程度评分和脑梗死体积,抑制脑组织 IL-1 β 蛋白的表达,降低血液中 IL-1 β 含量。表明人参皂苷 Rb1 对大鼠 I/R 有保护作用且与其抑制炎症因子 IL-1 β 蛋白表达有关。

这可能是人参皂苷 Rb1 对缓解脑缺血再灌注损伤的重要机制之一。

另外,实验结果还发现,人参皂苷 Rb1 不同剂量组都有一定的保护作用,与低剂量组比,高剂量组大鼠神经缺损程度评分、脑梗死体积、脑组织和血清中 IL-1 β 含量差异均有统计学意义,但中剂量组与低剂量组比较,除脑组织中 IL-1 β 阳性细胞数的差异有统计学意义,其余三项检查指标差异均无统计学意义,提示人参皂苷 Rb1 高剂量组(80 mg/kg)的脑保护效应要优于低剂量和中剂量组。

综上,本实验应用经典的大鼠脑 I/R 模型,给予不同浓度人参皂苷 Rb1 处理,观察大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后神经缺损程度评分、脑梗死体积及血清 IL-1 β 发现,给予人参皂苷 Rb1 各组大鼠脑组织和血清的 IL-1 β 含量的变化表明人参皂苷 Rb1 可以通过调节 IL-1 β 含量抑制炎症反应,减轻脑 I/R,从而架起了 Rb1—IL-1—脑 I/R 的桥梁,为今后的进一步研究提供了思路和支持。另外,对于其他的炎症因子,如 NF- κ B、TNF- α 等,本实验未做检测,所以人参皂苷 Rb1 是否还能通过炎症反应的其他通路起到脑保护的作用,还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 刘启锋,刘明,刘玉河,等. 脑缺血再灌注损伤机制研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5(6):

- 566-568.
- [2] Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, et al. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen[J]. *Stroke*, 2003, 34(6): 1526-1532.
 - [3] Gao XQ, Yang CX, Chen GJ, et al. Ginsenoside Rb1 regulates the expressions of brain-derived neurotrophic factor and Caspase-3 and induces neurogenesis in rats with experimental cerebral ischemia [J]. *Ethnopharmacology*, 2010, 132(2): 393-399.
 - [4] Wang J, Qiao L, Li Y, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia-reperfusion-induced liver injury by inhibiting NF- κ B activation[J]. *Exp Mol Med*, 2008, 40(6): 686-698.
 - [5] 汪亮, 刘潘潘, 胡勤乐. 线栓法致大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的制作及思考[J]. *医学综述*, 2011, 17(21): 3359-3361.
 - [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
 - [7] 高晶, 郭玉璞. 缺血后脑组织中的炎细胞作用[J]. *中华神经科杂志*, 1999, 32(5): 303-305.
 - [8] Yamasaki Y, Metsuura N, Shouzuohara H, et al. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 676-680.
 - [9] Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, et al. Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(5): 2007-2012.
 - [10] Lim JH, Wen TC, Matsuda S, et al. Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1 a main ingredient of ginseng root [J]. *Neur Res*, 1977, 28(3): 191-200.
 - [11] 黄诒森, 刘云, 张均田, 等. 人参皂甙 Rb1、Rg1 对大鼠肝、脑微粒体脂质过氧化的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 1989, 11(6): 460-462.
 - [12] 江山, 姜正林. 人参皂苷 Rb1 对大鼠海马脑片缺血损伤的保护作用 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2003, 5(20): 415-416.
 - [13] 吴新民, 姜正林, 陈益仁, 等. 人参皂甙抗缺血缺氧性脑损伤作用与抑制谷氨酸的释放有关 [J]. *南通医学院学报*, 2000, 20(4): 346-348.

(收稿:2012-03-27 修回:2013-09-16)

· 消 息 ·

《Chinese Journal of Integrative Medicine》

(中国结合医学杂志,英文版)SCI 影响因子提升至 1.059

美国汤森路透公司公布 2012 年 SCI 影响因子。《Chinese Journal of Integrative Medicine》(中国结合医学杂志,英文版)SCI 影响因子提升至 1.059,为我国中医药类杂志影响因子之首,在国际替代医学类期刊中的学科排名由 2012 年的 16 名提升至 12 名。

国际替代医学类期刊目前共 20 本,总体影响因子偏低,最高为 4.857。因此,《Chinese Journal of Integrative Medicine》此次影响因子达到 1.059 显得更为不易。同时,它对中医药发展以及国内学者科研水平的提高也具有重要意义。

近年来,针对国内外同类期刊现状,本杂志定位由中医、中西医结合拓展到整个替代医学、结合医学领域,调整了栏目设置,增加了国际约稿比例,利用国际一流的 ScholarOne 在线投稿系统,优化了审稿流程,提高了在线优先发表比例。网站也进行了全新改版,加大了宣传力度,使国际影响力不断提升。来稿方面,海外稿件比例达 29.7%,期刊的国际关注度明显增加。同时,2012 年对编委进行了改选和增补,其中国外编委比例达 46.39%,编委队伍的国际化为进一步提升杂志的国际影响力奠定了基础。