熊果酸对大鼠蛛网膜下腔出血早期脑损伤和基质金属蛋白酶-9 的影响

张婷婷，梁国标，苏静缘，郭冰玉，李晓明*(沈阳军区总医院，沈阳 110016)

摘要：目的 观察熊果酸对大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage，SAH)后早期脑损伤和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9，MMP-9)的影响。**方法** 采用颈内动脉穿刺法制备大鼠 SAH 模型，腹腔注射给药，于 SAH 后 24 h 进行神经功能缺损评分；48 h 后处死大鼠，测定脑含水量、伊文斯兰含量，明胶酶谱法检测 MMP-9 的活性，Real-time PCR 检测 MMP-9 mRNA 表达水平，Western blot 法检测其蛋白表达水平，尼氏染色检测脑中存活的神经元。**结果** 与模型组相比，熊果酸给药可明显降低 MMP-9 活性、mRNA 及蛋白表达水平；缓解神经功能缺损症状，降低脑含水量和伊文斯兰含量；改善 SAH 后脑内神经元减少的状况。与阳性对照(强力霉素)组比较，2 组之间对 MMP-9 的影响无显著性差异。**结论** 熊果酸可缓解 SAH 后的早期脑损伤，其作用可能与抑制脑中 MMP-9 的表达有关。

关键词：熊果酸；蛛网膜下腔出血；早期脑损伤；基质金属蛋白酶-9

中图分类号：R965 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2015)08-0911-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.002

Effect of Ursolic Acid on Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage and Matrix Metalloproteinase-9 in Rats

ZHANG Tingting, LIANG Guobiao, SU Jingyuan, GUO Bingyu, LI Xiaoming* (*The General Hospital of Shenyang Military, Shenyang 110016, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of ursolic acid(UA) on early brain injury(EBI) after subarachnoid hemorrhage(SAH) and matrix metalloproteinase(MMP)-9. **METHODS** The SAH model was induced by endovascular puncture. The scores of neurologic impairment were measured after SAH for 24 h. The rats in each group were executed after SAH for 48 h and the contents of water and Evans blue in brain were measured. Gelatin zymography assay was used to measure the activity of MMP-9. Real-time PCR was used to measure the expression of MMP-9 mRNA. Western blot was used to measure the expression of MMP-9 protein. Nissl staining was used to detect the survived neurons in brain. **RESULTS** Compared with the model control group, the activity and the expression of MMP-9 mRNA and protein signifincantly decreased in ursolic acid groups. UA also relieved the symptoms of nervous function impairment, decreased the contents of water and Evans blue in brain and improved the reduction of neurons in brain after SAH. Compared with the positive control(doxycycline) group, there was no significant difference between doxycycline and UA of the effects on MMP-9. **CONCLUSION** UA could promote EBI after SAH and its mechanism may be related with inhibition of the expression of MMP-9.

KEY WORDS: ursolic acid; subarachnoid hemorrhage; early brain injury; matrix metalloproteinase-9

近年来研究表明，蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage，SAH)后的早期脑损伤(early brain injury，EBI)与其病理发展及预后密切相关[1]，但 EBI 的病理机制还未明确。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase，MMPs)是一组具有蛋白水解活性的半胱氨酸蛋白酶。MMP-9 是 MMPs 家族中明胶酶的一种，参与多种神经系统疾病的发生发展[2]，与 SAH 后 EBI 的脑水肿和继发性出血关系密切[3]。熊果酸(ursolic acid，UA)又名乌索酸，是广泛存在于天然植物和草药中的五环三萜类化合物，具有降糖、降脂、护肝、抗炎、抗肿瘤、抗氧化和抗病毒等多种生物学活性[4]，多种体内、体外实验也证实 UA 具有神经保护作用[5-6]，但 UA 对 SAH 是否具有治疗作用尚未研究，此实验旨在探讨 UA 对 SAH 后 EBI 是否具有保护作用及其作用机制是否与 MMP-9 相关。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SD 大鼠，♂，体质量 250~300 g，由沈阳军区总医院实验动物中心提供，实验动物合格

基金项目：“十二五”国家科技支撑项目(2011BAI08B06)

作者简介：张婷婷，女，硕士，初级药师 Tel: (024)28851284 E-mail: tingyu3160@163.com *通信作者：李晓明，女，博士，副主任医师 Tel: (024)28851284 E-mail: lxm5668sw@yahoo.com

证号：0003583。

1.2 药物与试剂

UA(天津士兰科技有限公司，批号：77-52-1，纯度>98%)；强力霉素(批号：135344914607029)、伊文斯兰(批号：E2129)、明胶(批号：G9382)均购于 Sigma 公司；MMP-9 单克隆抗体(批号：SC-393859)和β-actin 单克隆抗体(批号：SC-47778)均购于 Santa cruz 公司；Trizol(Invitrogen 公司，批号：15596026)；RT-PCR 试剂盒(普洛麦格公司，批号：K1005S)；水合氯醛(批号：B01012)由中国人民解放军沈阳军区总医院提供。

1.3 方法

1.3.1 模型建立 颈内动脉穿刺法建立 SAH 模型，术前 10%水合氯醛(4.0 mL·kg^{-1})腹腔注射麻醉，颈部腹侧正中纵行切口，分离颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉，结扎颈外动脉远端，并以动脉夹临时阻断颈总动脉和颈内动脉，颈外动脉残端以显微剪刀剪小口，鱼线(直径 0.261 mm)送入颈外动脉，解除颈内动脉临时血管夹，将尼龙线沿颈内动脉送入 2 cm，有阻力后继续送入，待有突破感再送入 2 mm，解除颈总动脉阻断夹后回撤鱼线，结扎颈外动脉，如实验动物死亡需继续制作模型补足数量。以穿刺颈外动脉鱼线送入颈内动脉未刺破血管者作为假手术组。

1.3.2 分组与给药 设立假手术组、模型组、UA 低、高剂量组(25，50 mg·kg^{-1})、阳性对照(强力霉素)组，每组 32 只。分别在制成模型后 0.5，24，47 h 给药，47 h 给药后 1 h 取材。每组 8 只用于脑水肿检测，8 只用于脑内伊文斯兰含量检测，8 只固定用于尼氏染色，8 只冻存用于生化检测。

1.3.3 神经功能缺损评分 于造模后 24 h 对各组大鼠进行神经功能缺损评分，评分参照 Sugawara 等[7]的方法，从大鼠自发性活动、四肢自发性移动、拽尾时前肢伸展、爬行金属笼壁、双侧躯干对碰触的反应和触须反应 6 个方面对大鼠神经行为进行评分。分值为 3~18 分，分值越低表明神经功能缺损越严重。

1.3.4 脑组织含水量测定 模型 48 h 后，迅速取脑。拭去表面血迹，用电子分析天平(1/1 000)精确称出湿重，放入 110 ℃电烤箱内烘 72 h 至恒重，精确称出干重。按照 Elliott 公式计算脑含水率：脑含水率(%)=[(湿重−干重)/湿重]×100%。

1.3.5 大鼠脑血管通透性研究 大鼠于末次给药后股动脉给予 2%伊文斯兰溶液(5 mL·kg^{-1})，全身循环 1 h，10%水合氯醛麻醉后开胸，先剪开右心耳，并结扎降主动脉，推注生理盐水 100 mL，排出全身血液直至右心耳流出液体清亮，灌注完毕后迅速开颅完整取脑，称重，按 10 mL·g^{-1} 的体积浸入到甲酰胺溶液中，60 ℃水浴 48 h，待染料浸出后，取浸出液于紫外分光光度仪 620 nm 处测 OD 值。

1.3.6 脑组织中 MMP-9 mRNA 的表达 每组各取 8 只大鼠，于造模 48 h 后处死，立刻取出完整大脑，取受损侧皮质区置于−80 ℃保存。用 Trizol 试剂提取大鼠脑组织总 RNA，用 Real-time PCR 检测皮质中 MMP-9 mRNA。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成，MMP-9 和β-actin 的引物序列分别为：5′-GTAACCCTGGTCACCGGACTT-3′，5′-CAGATACGTTCCCGGCTGAT-3′和 5′-CTGTGT GGATTGGTGGCTCTATC-3′，5′-TGT TATGATGG TGCCACTTGA-3′。溶解曲线单峰作为产物特异性的标志。

1.3.7 脑组织蛋白提取及 MMP-9 含量检测 标本收集完后，取出血侧大脑半球组织称重，置于事先预冷的组织匀浆器中，按 1∶4 的体积加入组织裂解液(含 cocktail)充分研磨，于冰上静置 30 min，4 ℃低温离心机中，12 000 r·min^{-1} 离心 20 min。采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度，收集上清液−80 ℃冰箱保存备用。采用 Western blot 检测 MMP-9 含量：测定蛋白浓度后，按每泳道加总蛋白 40 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.3.8 脑组织中 MMP-9 活性检测 采用明胶酶谱法检测 MMP-9 活性：将组织上清液与 5×上样缓冲液按 4∶1 混匀，于含 1%明胶蛋白的 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳槽中电泳。以凝胶图像处理系统扫描后使用图像分析软件计算每条带的密度值[密度值=条带面积×(灰度−背景灰度)]，表示酶活性相对大小。

1.3.9 标本处理和尼氏染色 造模 48 h 后，每组取 8 只快速断头处死，立刻取出完整大脑，置于 10%甲醛中固定，包埋。受损侧皮质区石蜡切片行尼氏染色，观察尼氏小体及尼氏染色阳性神经元并计数。

1.3.10 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采

用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。所有数据比较均采用单因素方差分析；组间比较采用 LSD 法，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UA 对 SAH 大鼠神经行为学、脑组织含水量及脑血管通透性的影响

大鼠经颈内动脉穿刺损伤后，神经功能明显缺损，脑组织含水量、脑血管通透性均显著增加($P<0.01$)，给药组均可明显改善大鼠的神经功能、降低脑含水量和脑血管通透性，UA 组与阳性对照组相比无显著性差异。结果见表 1。

表 1 UA 对 SAH 大鼠神经行为学、脑组织含水量及脑血管通透性的影响

Tab. 1 Effects of UA on neurologic score, brain water content and blood-brain barrier in SAH rats

组 别	剂量/ $mg\cdot kg^{-1}$	神经行为学评分	脑含水量/%	伊文斯兰含量/$\mu g\cdot g^{-1}$
假手术组	–	17.33±0.52	75.90±0.02	0.16±0.00
模型组	–	8.00±1.41[1)]	80.62±0.02[1)]	0.23±0.01[1)]
UA 低剂量组	25	14.67±1.63[3)]	78.09±0.01[2)]	0.19±0.02[3)]
UA 高剂量组	50	15.33±2.42[3)]	77.44±0.01[2)]	0.18±0.01[3)]
阳性对照组	20	15.83±2.13[3)]	76.92±0.02[2)]	0.18±0.02[3)]

注：与假手术组比较，[1)]$P<0.01$；与模型组比较，[2)]$P<0.05$，[3)]$P<0.01$。

Note: compared with the sham operation group, [1)]$P<0.01$; compared with the model group, [2)]$P<0.05$, [3)]$P<0.01$.

2.2 UA 对 SAH 大鼠脑组织 MMP-9 mRNA 表达的影响

造模 48 h 后，模型组大鼠皮质区 MMP-9 mRNA 表达(1.32±0.16)明显高于假手术组(0.34±0.09)($P<0.01$)；与模型组相比，UA 低、高剂量组(0.58±0.13，0.56±0.11)均可明显抑制 MMP-9 mRNA 的表达($P<0.01$)；与阳性对照组(0.57±0.07)相比无显著性差异。

2.3 UA 对 SAH 大鼠脑组织 MMP-9 蛋白含量的影响

造模 48 h 后，模型组大鼠皮质的 MMP-9 蛋白含量较假手术组明显增加($P<0.01$)；UA 组与模型组相比可明显抑制 MMP-9 的蛋白表达($P<0.01$)，与阳性对照组相比无显著性差异。结果见图 1。

2.4 UA 对 SAH 大鼠脑组织 MMP-9 活性的影响

造模 48 h 后，模型组大鼠皮质的 MMP-9 活性较假手术组明显增强($P<0.01$)；UA 组与模型组相比可明显抑制 MMP-9 的活性($P<0.01$)；给药组与阳性对照组相比无显著性差异。结果见图 2。

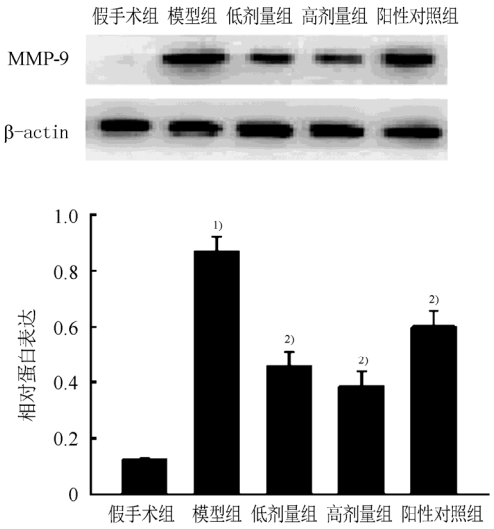


图 1 UA 对 SAH 大鼠皮质 MMP-9 蛋白含量的影响

与假手术组比较，[1)]$P<0.01$；与模型组比较，[2)]$P<0.01$。

Fig. 1 Effect of UA on the protein expression of MMP-9 in the cortex in SAH rats

Compared with the sham operation group, [1)]$P<0.01$; compared with the model group, [2)]$P<0.01$.

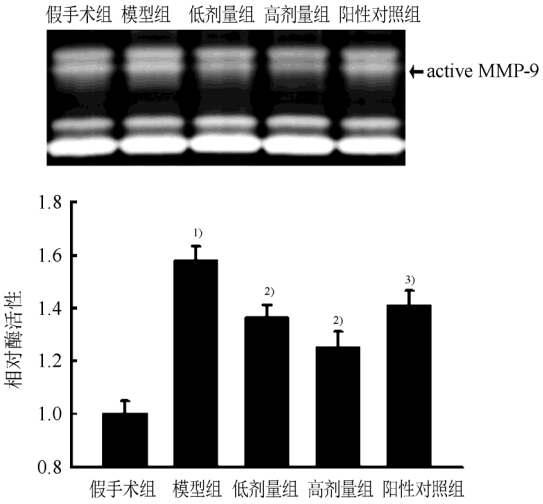


图 2 UA 对 SAH 大鼠皮质 MMP-9 活性的影响

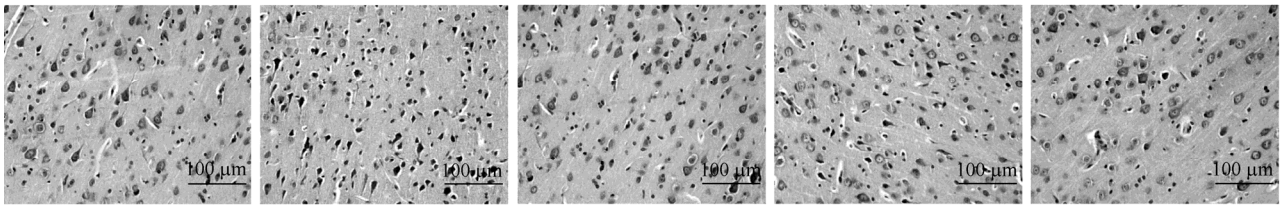
与假手术组比较，与假手术组比较，[1)]$P<0.01$；与模型组比较，[2)]$P<0.01$，[3)]$P<0.05$。

Fig. 2 Effect of UA on the activity of MMP-9 in the cortex in SAH rats

Compared with the sham operation group, [1)]$P<0.01$; compared with the model group, [2)]$P<0.01$, [3)]$P<0.05$.

2.5 UA 对 SAH 大鼠脑组织存活神经元的影响

显微镜下观察：假手术组，神经元结构清晰，含丰富的细胞质和尼氏小体，细胞周围没有水肿；模型组神经元减少，排列不规则，发生明显的核固缩，细胞呈椭圆形或三角形；给药组较模型组均可明显抑制神经元凋亡，改善细胞形态；给药组和阳性对照组相比无显著性差异。结果见图 3。



假手术组　　模型组　　低剂量给药组　　高剂量给药组　　阳性对照组

图 3　UA 对 SAH 大鼠脑组织中细胞凋亡的影响(200×)

Fig. 3　Effect of UA on cell survival in the cerebral cortex in SAH rats(200×)

3　讨论

SAH 是具有高死亡率和致残率的疾病，主要由颅内动脉瘤破裂引起[8]。以往认为脑血管痉挛是 SAH 患者不良预后的首要原因，但长期的临床治疗 SAH 后脑血管痉挛对神经功能行为未见良好疗效，提示对于患者的治疗可能存在误区。近年来，越来越多的研究重点已从脑血管痉挛转向 EBI，认为 EBI 可能是 SAH 患者死亡的重要原因[9]。

MMP-9 的表达对 SAH 的影响已有研究[10]，认为 MMP-9 与 SAH 后血脑屏障破坏，脑水肿密切相关。Castillo 等[11]研究发现 MMP-9 具有较强的蛋白水解功能，特别是对小动脉基底膜，MMP-9 降解基底膜成分可以引起脑水肿和继发性出血。Sehba 等[12]应用大鼠颈内动脉穿刺致 SAH 模型对 SAH 后微血管基底膜急性期改变进行研究，发现 SAH 后 3 h 微血管段 MMP-9 水平升高，Ⅳ型胶原表达降低或消失，表明 SAH 后 MMP-9 可能导致脑微血管Ⅳ型胶原急性丢失，引起血脑屏障的破坏，加重脑损伤。研究表明[13]，MMP-9 可能是通过降解细胞外基质 laminin，在体内多种病理生理条件下引起脑内神经元失巢，从而参与 SAH 后 EBI 的病理过程。

本研究表明，模型组在 SAH 48 h 后出现明显的神经功能缺损，脑含水量和脑血管的通透性明显增加，可以观察到脑内神经元凋亡，同时脑内 MMP-9 活性以及 mRNA、蛋白质表达水平明显升高，UA 给药可明显改善大鼠神经功能缺损症状，降低脑水肿，抑制脑血管通透性和脑内神经元的凋亡。与模型组相比，明显抑制脑组织 MMP-9 活性、MMP-9 mRNA 和蛋白质的表达，提示 UA 可能是潜在有效的 MMP-9 抑制剂，通过抑制 MMP-9 表达以改善神经行为缺损症状，降低脑血管通透性，减轻脑水肿，从而达到脑保护的目的。

EBI 机制十分复杂，涉及到一系列因子之间的相互作用，其他因子与 MMP-9 之间是否存在信号通路或作用机制，以及 UA 在通路中是否有作用尚未进行研究。因此，SAH 后 MMP-9 在 EBI 中的作用机制及 UA 如何具体发挥 MMP-9 抑制作用有待近一步的深入研究。

REFERENCES

[1] SEHBA F A, HOU J, PLUTA R M, et al. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2012, 97(1): 14-37.

[2] KUSAKA G, ISHIKAWA M, NANDA A, et al. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(8): 916-925.

[3] CAHILL J, CALVERT J W, ZHANG J H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(11): 1341-1353.

[4] LI L, ZHANG X, CUI L, et al. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice [J]. Brain Res, 2013(1497): 32-39. Doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.032.

[5] YIN M C, CHAN K C. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(17): 7177-7181.

[6] TSAI S J, YIN M C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells [J]. J Food Sci, 2008, 73(7): H174-178.

[7] SUGAWARA T, AYER R, JADHAV V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. J Neurosci Methods. 2008, 167(2): 327-334.

[8] ZHANG J, LIU G, ARIMA H, et al. Incidence and risks of subarachnoid hemorrhage in China [J]. Stroke, 2013, 44(10): 2891-2893.

[9] CLAASSEN J, CARHUAPOMA R, KREITER K T, et al. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome [J]. Stroke, 2002, 33(5): 1225-1232.

[10] SUZUKI H, AYER R, SUGAWARA T, et al. Protective effects of recombinant osteopontin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Crit Care Med, 2010, 38(2): 612-618.

[11] CASTILLO J, LEIRA R, BLANCO M. Metalloproteinases and neurovascular injury [J]. Neurologia, 2004, 19(6): 312-320.

[12] SEHBA F A, MOSTAFA G, KNOPMAN J, et al. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2004, 101(4): 633-640.

[13] GUO Z D, SUN X C, HE Z H, et al. Association between hippocampal MMP-9 expression and neuronal apoptosis in early brain injury in rats after subarachnoid hemorrhage [J]. Acta Acad Med Mil Tert(第三军医大学学报), 2009: 31(1): 71-74.

收稿日期：2015-03-13