

齐墩果酸通过抑制 NF- κ B/ICAM-1 信号通路减轻大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的研究

刘秀娟, 韩雨薇, 李晓明^{*}(中国人民解放军沈阳军区总医院神经外科, 沈阳 110000)

摘要: 目的 研究齐墩果酸(oleanolic acid, OA)对蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑损伤的影响,并探讨其潜在的作用机制。方法 39 只大鼠随机分为假手术组、模型组、OA 治疗组(OA 组, 20 mg·kg⁻¹), 每组 13 只。分别对各组进行体质量测量, 神经功能评分, 伊文思蓝法检测血脑屏障的通透性, 并用 Western blot 法检测大鼠脑皮质中 NF- κ B/ICAM-1 信号通路蛋白的表达情况。结果 与模型组比较, OA 组能显著增加大鼠体质量和神经功能评分, 显著降低脑部伊文思蓝通透率和 NF- κ B/ICAM-1 信号通路蛋白的表达水平, 差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 齐墩果酸能够明显减轻大鼠 SAH 后早期脑损伤, 有可能是通过减少 Akt/NF- κ B/ICAM-1 信号通路的炎症因子发挥作用。

关键词: 蛛网膜下腔出血; 齐墩果酸; 早期脑损伤; NF- κ B/ICAM-1 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)09-1225-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.002

引用本文: 刘秀娟, 韩雨薇, 李晓明. 齐墩果酸通过抑制 NF- κ B/ICAM-1 信号通路减轻大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1225-1228.

Effects of Oleanolic Acid on Early Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats by Inhibiting NF- κ B / ICAM-1 Signaling Pathway

LIU Xiujuan, HAN Yuwei, LI Xiaoming^{*} (Department of Neurosurgery, General Hospital of Shenyang Military Region of Chinese PLA, Shenyang 110000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of oleanolic acid (OA) on brain damage after subarachnoid hemorrhage (SAH) and to explore its potential mechanism. **METHODS** Thirty-nine rats were randomly divided into sham group, model group and oleanolic acid treatment group (OA group, 20 mg·kg⁻¹), each group of 13. Weight measurement, neurological function score, and Evans blue method to detect the permeability of blood-brain barrier were used for each group, separately. Then the protein expression of NF- κ B, p65 and ICAM-1 in the cerebral cortex of rats were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the body weight and neurological score were improved, the Evans blue rate and the level of NF- κ B/ICAM-1 signaling pathway were reduced in the OA group, significantly($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSION** OA could attenuate early brain injury in SAH rats by decreasing the inflammatory cytokines of Akt/NF- κ B / ICAM-1 signaling pathway.

KEY WORDS: subarachnoid hemorrhage; oleanolic acid; early brain injury; NF- κ B/ICAM-1 signaling pathway

动脉瘤蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是一种具有高死亡率和较高发病率的严重的神经系统疾病^[1], 30 d 内死亡率达到 40%, 生存者的致残率达 50%, 是一种预后很差的疾病。SAH 的早期脑损伤是指从 SAH 开始至 72 h 之内的多种脑损伤。早期脑损伤对 SAH 患者的预后非常重要。而炎症反应在 SAH 后的早期脑损伤中又发挥重要作用^[2]。已有研究表明, 由于血脑屏障遭到破坏, 血液裂解抗原的刺激可引起炎症细胞的激活及炎症介质的释放, 其中 NF- κ B/ICAM-1 信号通路在早期脑损伤的炎症反应中发挥重要的作用, 可介

导淋巴细胞、血小板黏附到内皮细胞从而加重脑损伤^[3]。因此, 寻找新的能够减轻早期脑损伤的药物对于治疗 SAH 具有十分重要的意义。

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)主要从木犀科植物齐墩果的叶中提取, 是一种五环三萜类化合物。OA 具有多种药理活性, 如保肝、双向免疫调节、抑制血小板凝集、降糖降脂、抗病毒、消炎及抗肿瘤等^[4-5], 其神经保护作用在帕金森^[6]等相关疾病中得到验证。但有关 OA 在 SAH 治疗中的应用目前尚未有任何报道。本研究通过建立 SAH 模型, 检测 OA 对 SAH 的治疗效果, 并研究其作用的机制。

基金项目: 辽宁省科技计划项目(2015225022)

作者简介: 刘秀娟, 女, 初级技师 Tel: (024)28851284
Tel: (024)28851284 E-mail: lxm5668sw@sina.com

E-mail: 15382094195@163.com ^{*}通信作者: 李晓明, 女, 博士, 副主任医师

1 材料与方法

1.1 试剂

OA(天津士兰科技有限公司,批号:20150311,含量:98%);BCA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:P0010);预染蛋白 Marker(赛默飞世尔科技公司);其他试剂均购于国药集团。

1.2 动物来源与饲养

SPF 级 SD 大鼠,♂,体质量为 300~320 g,由辽宁省实验动物资源中心提供,实验动物合格证号:0005095,动物饲养于 18~22 °C 恒温室中,自由进食进水,昼夜节律饲养。动物实验严格按照“National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”标准进行,尽可能减轻动物痛苦并减少动物使用数量。

1.3 大鼠 SAH 模型的制备

采用改良血管内穿刺法建立 SAH 模型。10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,将大鼠仰卧固定于手术台上,在颈部正中位纵向切口,暴露右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,分离右侧颈总动脉,结扎并剪断颈外动脉远心端,分离颈动脉分叉部,同时夹闭颈总动脉和颈内动脉,在颈外动脉处剪一个小口,将单丝尼龙线自颈外动脉剪口处插入颈内动脉,靠近颈内动脉端大约 19 mm 稍感阻力时继续向内刺入 2 mm 左右刺破血管壁造成 SAH,迅速将尼龙线拔出,整个过程不超过 30 s,拔出尼龙线,结扎残端并消毒缝合皮肤切口。假手术组除了尼龙线不刺破血管壁以外,其他同模型组一样。建模成功的标准是以模型组有明确的凝血块而无实质性脑损害为标准。

1.4 动物分组和给药方案

SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和 OA 治疗组(OA 组),每组 13 只。OA 用生理盐水稀释,浓度为 20 mg·kg⁻¹,于造模后 1 h 腹腔注射,假手术组给予等量生理盐水注射。

1.5 神经功能缺损评分

运用神经行为学评分检测大鼠神经功能损伤情况,参照神经功能评分标准^[7]于造模后 24 h 对各组大鼠进行神经功能评分,评分为 0~18 分,正常鼠为 3 分,神经功能完全丧失为 0 分,评价的内容主要包括大鼠自发活动(在笼中观察 5 min)、四肢的运动、前肢运动(由尾部保持伸展)、可以攀爬的高度、触碰四肢的反应和触摸两侧胡须的反应。由 2 位熟悉该评分标准且未参与本实验的人

员进行评分,评分结果取两者均值。

1.6 血脑屏障通透性的检测

每组 5 只,将大鼠于造模后 24 h 用 10%水合氯醛麻醉,于尾静脉注射 5 mL·kg⁻¹伊文思蓝,注射完成后 1 h 处死,取脑,将整脑分为左、右、小脑 3 部分,放入 10 mL·g⁻¹甲酰胺中,放置于 65 °C 温箱,24 h 后在波长 620 nm 处测定吸光值。

1.7 NF-κB/ICAM-1 信号通路表达的检测

用 Western blotting 检测各组大鼠大脑皮质中 NF-κBp65、ICAM-1、Akt、P-Akt 和 P-IκBα、IκBα 表达的改变。

1.7.1 蛋白样品的制备 假手术组、模型组和 OA 组每组 8 只,将标本在完成 SAH 模型后 24 h 用过量的水合氯醛深度麻醉致死,取脑并分离脑皮质,将皮质放入研磨器小心研磨,并加入适量 RIPA 细胞裂解液(含 PMSF)处理,冰上匀浆 2~3 min 至组织匀浆均匀,转移至 EP 管中,在 4 °C 冰箱中放置 30 min 以使组织充分裂解。于 4 °C 以 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,快速取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量检测。剩余蛋白加入 5×loading buffer 并混匀,100 °C 煮沸 5 min。室温平衡后,保存于-70 °C 超低温冰箱中。

1.7.2 电泳、转移 蛋白样品通过 8% SDS-PAGE 凝胶,恒压 80 V 电泳、湿转转到 PVDF 膜、5%脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,之后加入辣根过氧化物酶标记的二抗在摇床上室温孵育 1 h,通过 X 射线胶片曝光检测蛋白质条带密度,β-actin 作为内参计算蛋白表达水平。并使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,2 组间采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 对 SAH 大鼠体质量的影响

模型组大鼠体质量变化较假手术组具有显著性差异(*P*<0.05);OA 组大鼠体质量较模型组显著升高(*P*<0.05),说明 OA 对于改善 SAH 后的大鼠食欲,从而增加其体质量有一定作用。结果见图 1。

2.2 OA 治疗对大鼠神经功能评分的影响

神经功能评分结果显示,模型组神经功能评分显著低于假手术组(*P*<0.01);而 OA 治疗则能显

著提高神经功能评分, 与模型组相比差异显著 ($P<0.01$); OA 组和假手术组比较无统计学差异。结果见图 2。

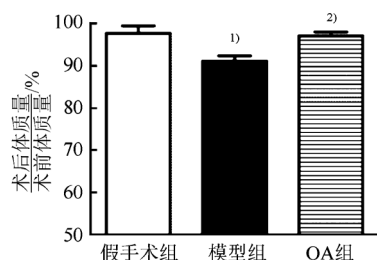


图 1 OA 治疗对 SAH 大鼠体质量的影响
与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。
Fig. 1 Effect of oleanolic acid treatment on body weight of SAH rats
Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

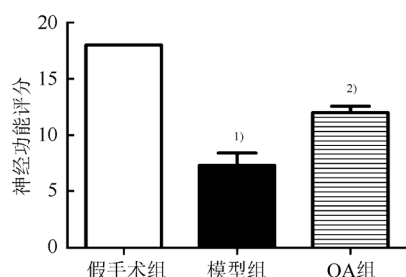


图 2 OA 治疗对大鼠神经功能评分的影响
与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 2 Effect of oleanolic acid on neurological function in rats
Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

2.3 OA 治疗对血脑屏障破坏的影响

在左、右和小脑 3 部分中, 模型组伊文思蓝通过量和假手术组相比显著增加 ($P<0.01$), 说明大鼠 SAH 后血脑屏障遭到破坏。OA 组与模型组相比, 伊文思蓝通过量明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。结果见图 3。

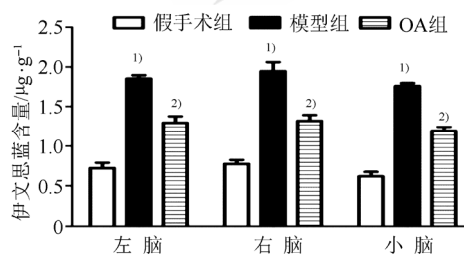


图 3 OA 治疗对血脑屏障破坏的影响
与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 3 Effect of oleanolic acid treatment on blood-brain barrier disruption
Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

2.4 OA 治疗对 NF- κ B/ICAM-1 信号通路蛋白表达水平的影响

与假手术组相比, 模型组 NF- κ B p65、ICAM-1、p-Akt 和 p-I κ B α 蛋白表达水平显著增强 ($P<0.01$); OA 组中 NF- κ B p65、ICAM-1、p-Akt 和 p-I κ B α 蛋白表达水平显著低于模型组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 3 组之间 Akt 和 I κ B α 两个蛋白表达水平无统计学差异。结果见图 4。

3 讨论

SAH 后的早期脑损伤是患者预后不良的主要因素之一, 是导致患者死亡和致残的重要原因^[8]。有研究表明, SAH 早期会导致大量的炎症因子和趋化因子的产生, 大多数炎症因子(如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ICAM-1 等)均受 NF- κ B 的调控^[9], 因此 NF- κ B 信号通路是神经炎症调控的关键环节。有文献报道^[10], 在 NF- κ B 信号通路中, I κ B α 可以与 P65 结合, 防止其入核及与 DNA 结合, 使 I κ B α 与 NF- κ B 二聚体的复合物在细胞质和细胞核之间穿梭运动。当细胞收到各种胞内外刺激后, I κ B 激酶被激活, 从而导致 I κ B 蛋白磷酸化, 然后 I κ B 蛋白被降解, NF- κ B 二聚体得到释放, 并转移到细胞核中。又根据 Madrid 等的研究可知^[11], Akt 是激活 NF- κ B 的信号通路的关键介质。Li 等^[12]研究发现, 通过抑制 NF- κ B 信号通路可以明显减少微血管内皮细胞凋亡, 从而减轻炎症反应。SAH 后 NF- κ B 信号通路被激活, 所以笔者根据以上研究基础, 采用 Western blot 试验考察相关蛋白的表达变化, 结果表明, OA 能够降低 I κ B α 和 Akt 蛋白磷酸化, 阻止 P65 进入细胞核, 从而减轻一系列的炎症反应达到减轻早期脑损伤的目的。所以, OA 的抗炎效果会通过抑制该信号通路来减少炎症因子的产生, 进而改善 SAH。

OA 具有消炎、增强免疫、抑制血小板降集、降糖等多方面的临床药理作用及抗肿瘤等生物活性, 且毒性低、不良反应少^[13]。研究发现, OA 能够阻断 NF- κ B 信号转导通路, 下调炎症细胞因子和诱生型炎症介质合成酶的表达, 从而抑制炎症介质的生成^[14]。通过本研究结果可以发现, 在 SAH 中, 应用 OA 可以明显减少 Akt/NF- κ B/ICAM-1 信号通路蛋白的表达, 提示 OA 在 SAH 后可以通过抑制 Akt/NF- κ B/ICAM-1 信号通路中炎症相关因子的产生从而减轻早期脑损伤。

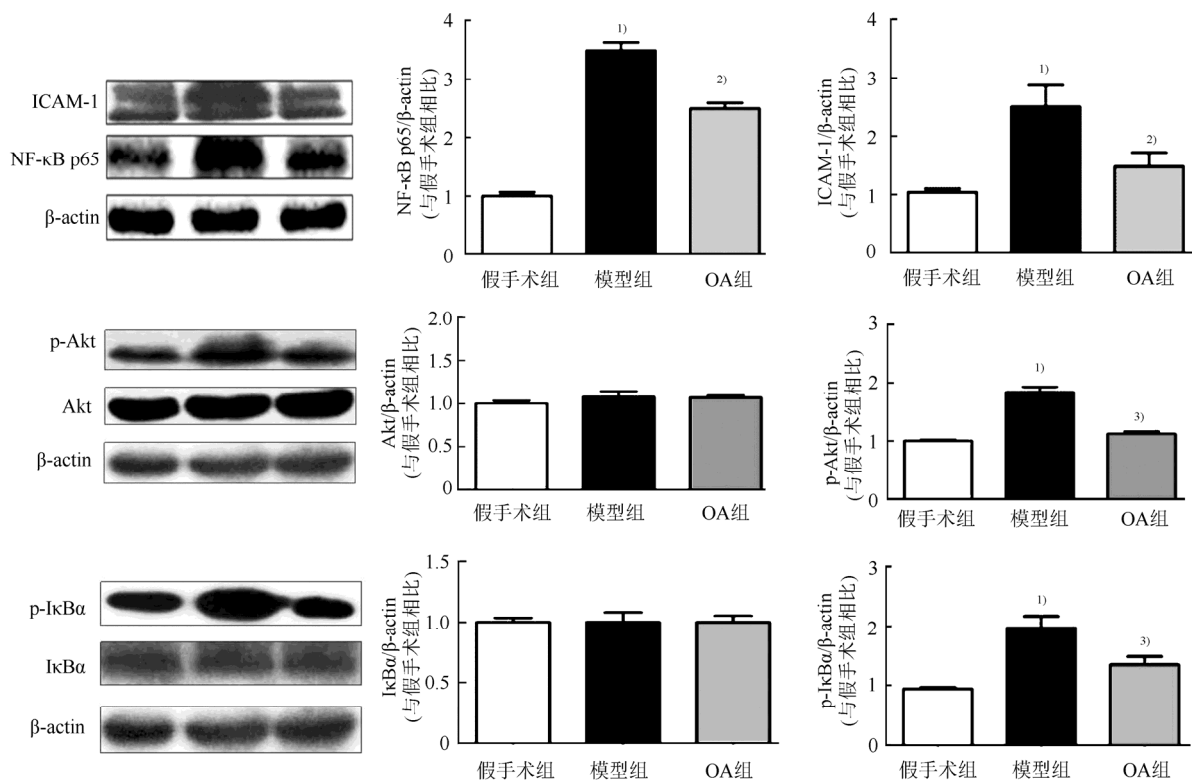


图4 OA治疗对Akt/NF-κB/ICAM-1信号通路蛋白水平表达的影响
与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Effect of oleanolic acid treatment on Akt/NF-κB/ ICAM-1 signaling pathway protein expression
Compared with the sham group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$.

综上所述, OA具有减轻大鼠SAH后早期脑损伤的作用, 其重要机制可能与抑制Akt/NF-κB/ICAM-1炎症信号通路相关。

REFERENCES

- [1] MACDONALD R L. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage [J]. Nat Rev Neurol, 2014, 10(2): 44-58.
- [2] SONG J N, AN J X. Advances in research on early brain injury and therapeutic options for neuroprotection following subarachnoid hemorrhage [J]. J Xi'an Jiaotong Univ: Med Sci(西安交通大学学报: 医学版), 2013, 34(6): 695-703.
- [3] MA T T, MA L, DU N S. Survey of pharmacology of aleanolic acid [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2002, 27(12): 884-886.
- [4] MABANDLA M V, NYOKA M, DANIELS W M. Early use of oleanolic acid provides protection against 6-hydroxydopamine induced dopamine neurodegeneration [J]. Brain Res, 2015, 10(5): 64-71.
- [5] HU Y, HE S, WANG Y. Progress in researches of the antibacterial effect of oleanolic acid [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(3): 304-308.
- [6] ZUO S, LI W, LI Q. Protective effects of Ephedra sinica extract on blood-brain barrier integrity and neurological function correlate with complement C3 reduction after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Neurosci Lett, 2015(609): 216-222.
- [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] 黎涛, 尹浩. 蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中血-脑屏障破坏的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(8): 755-757.
- [9] ZHUANG Z, SUN X J, ZHANG X, et al. Nuclear factor-κB /Bcl-XL pathway is involved in the protective effect of hydrogen-rich saline on the brain following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. Stroke, 2013, 44(5): 1410-1417.
- [10] ZHAO J, HE S P, MINASSIAN A, et al. Recent advances on viral manipulation of NF-κB signaling pathway [J]. Curr Opin Virol, 2015, 15(10): 103-111.
- [11] MADRID, L V, WANG C Y, GUTTRIDGE D C, et al. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-κB. Mo [J]. Cell. Biol, 2000, 20(5): 1626-1638.
- [12] LI Y, CAO Y, ZENG Z, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Masaxis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK /NF-κB pathways [J]. Sci Rep, 2015(5): 8209. Doi: 10.1038/srep08209.
- [13] 周志勇, 袁丁. 齐墩果酸药理作用研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23): 2031-2033.
- [14] BHANDARI P, PATEL N K, GANGWAL R P. Oleanolic acid analogs as NO, TNF-α and IL-1β inhibitors, synthesis, biological evaluation and docking studies [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(17): 4114-4119.

收稿日期: 2017-01-24
(本文责编: 蔡珊珊)