

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.005

黄连素对实验性脑出血大鼠脑水肿与神经功能的影响

关庆凯, 赵树鹏, 刁玉领, 周祥, 黄立勇, 金保哲, 周文科

(新乡医学院第一附属医院神经外科, 河南 卫辉 453100)

[摘要] 目的: 研究不同剂量黄连素对实验性脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)大鼠脑水肿与神经功能的影响, 并初步探讨其作用机制。方法: 实验共分为假手术组(Sham组), 脑出血组(ICH组), 药物低(Ber-10组)、中(Ber-20组)、高剂量组(Ber-40组), 每组10只, 除假手术组采用注射胶原酶的方法建立实验性脑出血大鼠模型, 药物低、中、高剂量组分别给予黄连素10, 20或40 mg/kg灌胃, 每天1次, 共给药28 d; 对各组大鼠进行神经功能缺损评分, 干湿重法测定脑含水量, Tunel法检测血肿周围脑组织细胞凋亡数, Western印迹法检测Cleaved cas-3, Cleaved cas-9, 线粒体与胞浆中cyto-c的蛋白表达水平。结果: 与脑出血组大鼠相比, 采用黄连素给药后大鼠的神经功能缺损评分明显上升($P<0.05$), 脑含水量明显下降($P<0.05$); 血肿周围脑组织细胞凋亡数显著降低($P<0.05$), Cleaved cas-3和Cleaved cas-9的蛋白表达, 线粒体中cyto-c的蛋白表达明显上升($P<0.05$)而胞浆中cyto-c的蛋白表达明显下降($P<0.05$)。结论: 黄连素具有改善实验性脑出血大鼠神经功能缺损以及保护脑细胞的作用, 可能与黄连素抑制线粒体凋亡通路有关。

[关键词] 黄连素; 脑出血; 线粒体凋亡通路

Effect of berberine on cerebral edema and neurological function in intracerebral hemorrhage rats

GUAN Qingkai, ZHAO Shupeng, DIAO Yuling, ZHOU Xiang, HUANG Liyong, JIN Baozhe, ZHOU Wenke

(Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui Henan 453100, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of Berberine on cerebral edema and neurological function in experimental intracerebral hemorrhage (ICH) rats and to explore the underlying mechanisms. **Methods:** Rats were randomly divided into five groups: sham group, ICH group, ICH rats treated with low, medium or high dose of Berberine group. ICH model was induced by injection of collagenase, and ICH rats were received Berberine by gavage once a day at dose of 10, 20 or 40 mg/kg, respectively. After 28-day treatment, the grade of neurological function was scored, the water content of brain was measured, the apoptotic cells in pre-hematoma area were detected with TUNEL staining, and the protein expression of Cleaved cas-3, Cleaved cas-9 and the release of cytochrome c from mitochondria to cytoplasm were determined by Western blot. **Results:** Compared with the ICH group, neurological function improved significantly and the brain water content decreased, as accompanied with the reduced number of apoptotic cells in pre-hematoma area. Moreover, the protein expression of Cleaved

收稿日期 (Date of reception): 2017-04-12

通信作者 (Corresponding author): 金保哲, Email: jinbaozhe@126.com

cas-3, Cleaved cas-9 and the release of cytochrome c from mitochondria to cytoplasm were dramatically inhibited after berberine treatment. **Conclusion:** Berberine protects against ICH-induced the impairment of neurological function through inhibition mitochondria-dependent intrinsic apoptosis pathway.

Keywords berberine; intracerebral hemorrhage; mitochondria-dependent intrinsic apoptosis pathway

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是指非外伤脑实质内血管破裂所引起的出血,发病率在脑卒中约占10%~30%^[1]。多发于中老年人,最常见的病因主要是年龄大并伴随高血压、脑血管畸形、脑动脉粥样硬化和动脉瘤等,因此脑出血具有高发病率、高致残率和高致死率的特点^[2]。目前临床上,常用于脑出血的治疗手段为外科手术,并配合保守性的降压止血用药以及后期康复锻炼,然而治疗效果并不能完全恢复患者受损的神经功能。因此寻求新的有效药物用于预防与治疗脑出血是一项急需的解决问题。

黄连素是毛茛科植物黄连干燥根茎的主要有效成分,又称盐酸小檗碱,是一种天然的异喹啉类生物碱^[3]。已有研究^[4]表明黄连素能够提高缺血再灌注早期海马CA1区神经元内线粒体、粗面内质网和高尔基体的缺血耐受性,同时减轻缺血再灌注晚期海马区迟发性神经元的损伤程度。本实验通过研究黄连素对动物实验性脑出血的保护作用,并探讨初步机制,为临床上黄连素辅助用于脑出血治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

健康Wistar大鼠50只,清洁级,雌雄各半,体重180~220 g, 8~12周龄,购自北京维通利华生物科技股份有限公司。将Wistar大鼠随机分为假手术组(Sham),脑出血组(ICH),药物低(Ber-10)、中(Ber-20)、高剂量组(Ber-40),每组10只。实验前先进行适应性饲养1周。

1.2 实验试剂

黄连素购于哈尔滨三精制药厂,批号20150214;线粒体分离试剂盒(#89874)购于美国Thermo Fisher Scientific公司,胶原酶(#1148089)购于美国Sigma公司;Tunel(TUN11684817)试剂盒购自瑞士Roche公司;cleaved cas-3 (ab13847), cleaved cas-9 (ab32539)和cyto cyto-c (ab13575)抗体购自英国Abcam公司;其他试剂为国产试剂。

1.3 大鼠脑出血模型的建立

参照Rosenberg等^[5]方法建立大鼠脑出血模型,用10%水合氯醛(35 mg/100 g)腹腔注射麻醉,腹卧固定于脑立体定位仪,以前囟为中点,左旁开3.0 mm处,用动物骨钻钻孔,用微量进样器垂直插入钻孔中,进针深度5.0 mm,注入2 μ L 0.30 U/ μ L的IV型胶原酶,注射完后留针10 min,退针后缝合皮肤。假手术组操作与模型制作相同,注入等量人工脑脊液。及时补充各组死亡大鼠,造模完成后,分笼饲养。

1.4 方法

1.4.1 各组大鼠给药方法

药物低、中和高剂量组在造模完成后分别给予黄连素10, 20或40 mg/kg灌胃,每天1次,共给药28 d;假手术组和脑出血组在造模完成后给予等量生理盐水,每天1次,共28 d。

1.4.2 神经功能缺损评分

采用Garcia法^[6]对各组大鼠进行神经功能行为学评分,分数越低代表神经功能障碍情况越严重,共进行6项测试,自主运动0~3分、活动对称性0~3分、触摸触须反应1~3分、金属丝网鼠笼攀援1~3分、前肢对称性0~3分、触摸双侧躯干反应1~3分,各项得分相加即为神经功能评分。

1.4.3 脑含水量的测定

末次给药后,10%水合氯醛麻醉处死3只大鼠,迅速低温取脑,去除嗅球、小脑、脑干和软脑膜后,称量湿重,置于85 $^{\circ}$ C烤箱烘烤至恒重,称量干重,计算脑含水量,计算脑组织脑含水量 $BWC=(湿重-干重)/湿重 \times 100\%$ 。

1.4.4 Tunel 荧光染色

末次给药后,处死3只大鼠,将血肿周围脑组织制作成石蜡切片,浸入二甲苯I, II各30 min,依次浸入梯度乙醇(100%, 95%, 90%, 80%和70%)各5 min,3%过氧化氢室温孵育30 min, PBS洗涤,蛋白酶K湿盒37 $^{\circ}$ C孵育60 min, PBS洗涤,加入酶标记抗荧光素抗体37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS洗涤3次,抗荧光淬灭封片剂封片。置于显微镜下观察,计数凋亡细胞(激发光波长480 nm,检测波长540 nm)。

1.4.5 线粒体提取

末次给药后, 处死4只大鼠, 使用线粒体分离试剂盒提取血肿周围脑组织细胞中的线粒体, 收集约 2×10^7 个细胞, 用预冷的PBS重悬细胞沉淀, 取少量细胞进行计数, 1 000 r/min, 4 °C离心5 min, 弃上清。加入试剂A, 离心10 s, 冰上孵育1 min, 加入试剂B, 离心30 s, 冰上孵育4 min, 其中每隔1 min涡旋震荡1次, 加入试剂C, 4 000 r/min, 4 °C离心5 min, 沉淀部分为线粒体。将上清以12 000 r/min, 4 °C离心5 min, 此部分为胞浆。

1.4.6 Western 印迹法检测相关蛋白表达

末次给药后, 处死大鼠, 剪取大鼠血肿周围脑组织, 加入裂解液于冰上裂解30 min, 12 000 r/min, 4 °C离心5 min, 收集细胞, 提取细胞总蛋白并定量, 调整蛋白量。取等量裂解产物, 上样, 进行12%SDS-PAGE电泳。转膜, 5%脱脂奶粉室温放置1 h, 将膜于一抗中4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次, 每次5 min; 再加入相对应二抗37 °C孵育2 h, TBST洗膜3次, 每次5 min, ECL化学发光法显色, 运用Image J图像分析系统对每个条带进行灰度分析。

1.5 统计学处理

所有实验数据均采用SPSS15.0统计软件进行分析, 计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组内数据采用单因素方差分析, 两组间数据采用Benferroni校正的t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠神经功能评分

在本实验中, 并未出现大鼠死亡。实验结果显示: 假手术组未出现神经功能缺损症状, 脑出血组与药物低、中、高剂量组大鼠造模后出现明显的神经功能缺损症状, 如向瘫痪侧转圈等, 并

在24 h时出现高峰, 然后随时间推移神经功能逐渐得到一定程度的恢复, 但在24 h之后, 采用黄连素给药的大鼠在24h后的神经功能评分均显著低于脑出血组($P < 0.05$, 表1)。

2.2 各组大鼠脑含水量变化

与假手术组相比, 脑出血组大鼠的脑含水量显著增加($P < 0.05$), 采用黄连素给药后, 大鼠的脑含水量明显低于脑出血组大鼠($P < 0.05$), 并随黄连素剂量增大而脑含水量逐渐下降(表2)。

2.3 血肿周围脑组织细胞凋亡情况

与假手术组相比, 脑出血组大鼠的血肿周围脑组织细胞凋亡数显著增加($P < 0.05$); 采用黄连素给药后, 大鼠血肿周围脑组织细胞的凋亡数明显少于脑出血组, 并随黄连素剂量增加而细胞凋亡数逐渐减少(图1)。

2.4 Cleaved cas-9 与 Cleaved cas-3 的蛋白表达水平变化

与假手术组相比, 脑出血组大鼠血肿周围脑组织的Cleaved cas-9与Cleaved cas-3的蛋白表达显著上升($P < 0.05$), 而采用黄连素给药后, 大鼠血肿周围脑组织的Cleaved cas-9与Cleaved cas-3明显低于脑出血组(图2)。

2.5 线粒体与胞浆中 cyto-c 的蛋白表达水平变化

与假手术组相比, 脑出血组大鼠血肿周围脑组织细胞的线粒体中cyto-c的蛋白表达水平显著下降, 胞浆中cyto-c的蛋白表达水平显著上升; 采用黄连素给药后, 线粒体中cyto-c的蛋白表达水平明显高于脑出血组, 胞浆中cyto-c的蛋白表达水平明显低于脑出血组(图3)。

表1 各组大鼠神经功能评分($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Neurological function score of each group ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	神经功能评分				
	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
Sham组	16.70 \pm 0.67	16.80 \pm 0.83	17.20 \pm 0.92	17.10 \pm 0.86	17.20 \pm 0.93
ICH组	7.60 \pm 0.83*	8.10 \pm 0.67*	9.80 \pm 0.87*	10.70 \pm 0.79*	10.60 \pm 0.89*
Ber-10组	7.80 \pm 0.67*	8.50 \pm 0.78*	10.90 \pm 0.76*	12.40 \pm 0.67**	12.70 \pm 0.79**
Ber-20组	7.90 \pm 0.59*	9.20 \pm 0.67**	11.30 \pm 0.84**	12.90 \pm 0.72**	13.60 \pm 0.86**
Ber-40组	8.00 \pm 0.62*	10.10 \pm 0.67**	12.60 \pm 0.91**	13.40 \pm 0.58**	13.80 \pm 0.64**
F	6.357	6.574	7.652	6.684	6.917
P	0.002	0.004	0.003	0.004	0.005

与Sham组相比, * $P < 0.05$; 与ICH组相比, ** $P < 0.05$ 。

Compared with the Sham group, * $P < 0.05$; compared with the ICH group, ** $P < 0.05$.

表2 各组大鼠脑含水量变化($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Change of the content of brain water ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	脑含水量/%
Sham组	77.24 ± 0.57
ICH组	80.54 ± 0.61*
Ber-10组	79.28 ± 0.53*#
Ber-20组	78.43 ± 0.48*#
Ber-40组	78.25 ± 0.41*#
F	7.214
P	0.004

与Sham组相比, * $P<0.05$; 与ICH组相比, # $P<0.05$ 。

Compared with the Sham group, * $P<0.05$; compared with the ICH group, # $P<0.05$.

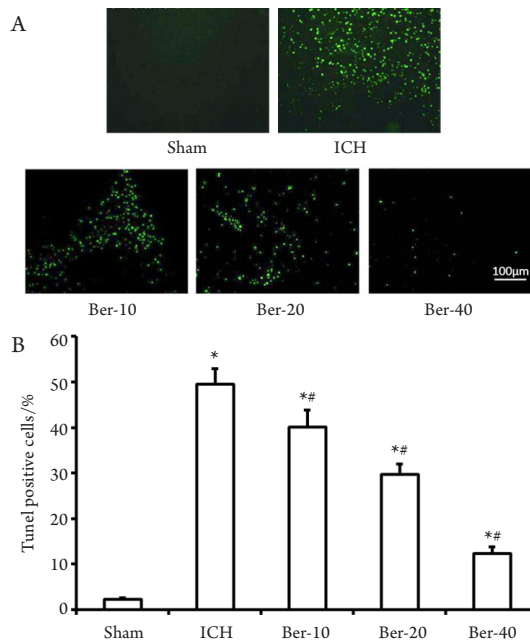


图1 水肿周围脑细胞凋亡情况

Figure 1 Apoptosis of brain cells around hematoma

(A)Tunel荧光染色图($\times 200$); (B)Tunel 阳性细胞的统计柱状图。与Sham组相比, * $P<0.05$; 与ICH组相比, # $P<0.05$ 。

(A)Tunel fluorescent staining ($\times 200$); (B) Statistical histogram of Tunel positive cells. Compared with the Sham group, * $P<0.05$; compared with the ICH group, # $P<0.05$.

3 讨论

脑出血后, 出血部位的血肿形成压迫, 在出血灶周围会出现缺血、缺氧、炎症与毒性等连锁反应, 进一步对脑组织产生继发性的损害, 神经

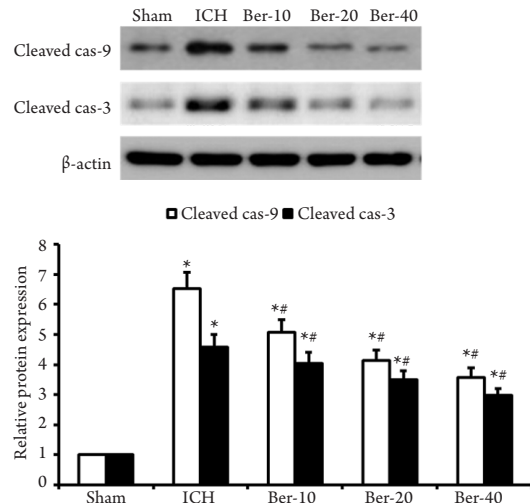


图2 Cleaved cas-3与Cleaved cas-9的蛋白表达水平变化

Figure 2 Protein expression of Cleaved cas-3 and Cleaved cas-9

与Sham组相比, * $P<0.05$; 与ICH组相比, # $P<0.05$ 。

Compared with the Sham group, * $P<0.05$; compared with the ICH group, # $P<0.05$.

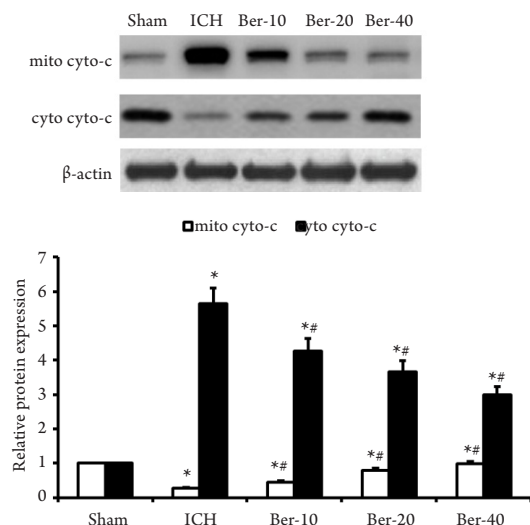


图3 线粒体(mito)与胞浆(cyto)中cyto-c的蛋白表达水平变化

Figure 3 Protein expression of cyto-c in the mito and the cyto

与Sham组相比, * $P<0.05$; 与ICH组相比, # $P<0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n=3$ 。

Compared with the Sham group, * $P<0.05$; compared with the ICH group, # $P<0.05$. $\bar{x} \pm s, n=3$.

细胞功能受损, 影响蛋白质合成, 进而启动细胞凋亡程序, 导致脑血管损伤, 神经元凋亡等, 使脑出血患者的神经功能缺损[7]。本研究发现: 采用黄连素给药后, 明显减缓脑出血大鼠的神经功能缺损情况, 脑出血大鼠的脑含水量也明显下降,

推测黄连素可能具有保护脑出血大鼠脑组织细胞的作用。而黄连素降低脑出血大鼠脑含水量具体的作用机制我们将进一步实验进行研究。

细胞凋亡是一种多基因调控的程序性细胞死亡过程^[8]。细胞凋亡与蛋白的激活、表达及调控等一系列的过程相关,如p53蛋白, Caspase蛋白家族, Survivin蛋白等在细胞凋亡中起重要作用^[9-10]。内源性线粒体途径是重要的细胞凋亡途径, 凋亡因子细胞色素C(Cyto C)是细胞凋亡的关键步骤。促凋亡因子能诱导Cyto C与Caspase 9结合成多聚体, 进一步激活下游的Caspase 3, Caspase 3的切割底物PARP被切割激活, 形成DNA碎片, 从而诱导细胞凋亡^[11]。有研究^[12]发现: 在大鼠脑出血发生后, Caspase 3在血肿内部与周边组织均出现强表达。本研究发现: 采用黄连素给药后, 能抑制脑出血大鼠血肿周围脑组织细胞中Cyto C从线粒体释放至胞浆中, 从而抑制Caspase 9与Caspase 3的蛋白表达, 并与黄连素的浓度呈正相关, 由此推测黄连素可能是通过调控Caspase途径抑制血肿周围脑细胞的凋亡, 从而发挥对脑出血大鼠的脑组织与神经功能的保护作用。

通过注射胶原酶法建立大鼠脑出血模型, 口服黄连素能够对大鼠的脑组织与神经功能具有保护作用, 下一步将对黄连素进行深入的药理毒理研究, 为临床上作为脑出血的辅助治疗提供实验数据。

参考文献

- Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(8): 720-731.
- van Asch CJ, Luitse MJ, Rinkel GJ, et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(2): 167-176.
- 左茹, 曹雪滨, 张文生. 黄连素药理作用研究进展[J]. *环球中医药*, 2014, 7(7): 568-572.
ZUO Ru, CAO Xuebin, ZHANG Wensheng. The progress of berberine's pharmacological effects[J]. *Global Chinese Medicine*, 2014, 7(7): 568-572.
- 潘力雄, 姚志彬, 陈以慈. 黄连素对缺血性脑细胞的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 1997, 14(4): 254.
PAN Lixiong, YAO Zhibin, CHEN Yici. The protective effects of berberine on ischemic brain cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 1997, 14(4): 254.
- Rosenverg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 801-807.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634.
- Gulati D, Dua D, Torbey MT. Hemostasis in intracranial hemorrhage[J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 80.
- Lee HH, Kim H, Lee MH, et al. Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 352(1): 33-36.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- Russo A, Terrasi M, Aqnese V, et al. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy[J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(7): vii115-vii123.
- Furukawa H, Oshima K, Tung T, et al. Overexpressed exogenous IL-4 And IL-10 paradoxically regulate allogenic T-cell and cardiac myocytes apoptosis through FAS/FASL pathway[J]. *Transplantation*, 2008, 85(3): 437-446.
- 吴家晔, 李珺. Caspase-3在脑出血后神经细胞凋亡中的作用[J]. *放射学杂志*, 2005, 18(2): 135-137.
WU Jiami, LI Jun. Role of Caspase -3 in neuronal apoptosis after experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Journal of Radioimmunology*, 2005, 18(2): 135-137.

本文引用: 关庆凯, 赵树鹏, 刁玉领, 周祥, 黄立勇, 金保哲, 周文科. 黄连素对实验性脑出血大鼠脑水肿与神经功能的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(7): 1356-1360. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.005

Cite this article as: GUAN Qingkai, ZHAO Shupeng, DIAO Yuling, ZHOU Xiang, HUANG Liyong, JIN Baozhe, ZHOU Wenke. Effect of berberine on cerebral edema and neurological function in intracerebral hemorrhage rats[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(7): 1356-1360. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.005