

·基础研究·

脑-肠轴参与 β -细辛醚和丹皮酚治疗脑梗死的过程肖敏¹,张琦²,田博¹,范清雨³

作者单位

1. 西安大兴医院神
经内科

西安 710000

2. 西安市长安区医
院内科

西安 710100

3. 西安交通大学第
二附属医院神经内
科

西安 710004

收稿日期

2019-05-16

通讯作者

田博

87898176@qq.com

摘要 目的:探讨 β -细辛醚和丹皮酚联合干预对脑梗死的治疗作用及脑-肠轴在其中的调节作用。方法:雄性SD大鼠15只随机分为假手术组、模型组和治疗组各5只,制备大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,假手术组不造成缺血,治疗组在造模前给予 β -细辛醚灌胃及丹皮酚腹腔注射7 d。对各组大鼠的神经功能进行评分,TTC染色分析各组大鼠的脑梗死体积,实时定量PCR检测大鼠肠黏膜及脑梗死区中胆囊收缩素(CCK)mRNA的表达,并分析其与血清促肾上腺皮质激素(ACTH)含量的相关性。结果:模型组和治疗组大鼠神经功能评分和梗死体积均高于假手术组,治疗组低于模型组($P<0.05$)。模型组和治疗组大鼠梗死区和肠黏膜中CCK mRNA的表达及血清ACTH含量均高于假手术组,治疗组低于模型组($P<0.05$)。模型组血清ACTH含量与梗死区及肠黏膜中CCK mRNA表达均呈显著正相关($P<0.05$)。结论:CCK介导脑-肠轴参与 β -细辛醚和丹皮酚联合治疗脑梗死的过程。

关键词 脑-肠轴; β -细辛醚;丹皮酚;脑梗死

中图分类号 R741;R743.3 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20190617

本文引用格式:肖敏,张琦,田博,等.脑-肠轴参与 β -细辛醚和丹皮酚治疗脑梗死的过程[J].神经损伤与功能重建,2020,15(5):278-280.

脑梗死是由于动脉阻塞或狭窄引起血流中断,进而发生脑组织坏死^[1]。脑-肠轴是将胃肠道与中枢神经系统联系起来的神经内分泌网络,已证明其为多种脑血管病的潜在调节机制^[2],但脑-肠轴在脑梗死病理过程中的作用及机制还甚少报道。胆囊收缩素(cholecystokinin,CCK)是从空肠中提取的胆囊收缩因子,为经典肠道激素肽之一^[3]。研究表明,除在胃肠道外,CCK还分布于内分泌细胞、神经元和上皮细胞,因此CCK已被确定为脑-肠轴的主要成分,参与脑梗死的病理过程^[4]。 β -细辛醚是石菖蒲的主要成分,其可减轻缺血再灌注诱导的脑自噬^[5]。丹皮酚是牡丹皮的主要成分之一,可通过抑制 β 分泌酶活性和细胞凋亡来保护记忆并减轻脑缺血性损伤^[6]。本研究通过建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型,来探讨 β -细辛醚和丹皮酚对缺血再灌注后脑-肠轴的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 雄性SD大鼠15只,购自西安交通大学,许可证号为SYXK(陕)2015-002,体质量(250 \pm 30)g,自由饮食饮水。将所有动物随机分为3组:假手术组、模型组和治疗组,每组各5只。

1.1.2 主要试剂及材料 β -细辛醚和丹皮酚(购于美国Sigma-Aldrich公司,纯度99%),Primer Script RT Master Mix kit(购于大连Takara公司),SYBR Select Master Mix kit(购于上海碧云天公司),促肾上腺皮质激素(adreno-cortico-tropic-hormone,ACTH)ELISA试剂盒(购于上海Novus Biologicals公司)。

1.2 方法

1.2.1 MCAO模型的建立 采用Zea Longa^[7]线栓法对模型组和治疗组大鼠建立MCAO模型。待缺血2 h后缓慢退出尼龙线,使血流再灌注24 h。假手术组不造成缺血,其余同模型组。

1.2.2 β -细辛醚和丹皮酚的治疗 在建模前7 d,治疗组大鼠每天给予34 mg/kg β -细辛醚灌胃^[8]及30 mg/kg丹皮酚腹腔注射^[9],每天各1次,连续7 d。末次给药后2 h进行MCAO手术造模。假手术组和模型组在相同时间点依照各自的给药方式给予生理盐水。模型组大鼠在建模时1只死亡。采用神经功能评分及TTC染色评价是否造模成功。

1.2.3 神经功能评分 造模成功后6 h,采用Zea Longa^[7]法对各组大鼠的神经功能进行评估。无神经功能缺陷为0分,左前爪不能完全伸展为1分,向左旋转为2分,在行走期间向左倾倒入为3分,昏迷为4分,死亡为5分。评分1~4分表示造模成功。神经功能评估后,大鼠经麻醉处理,收集血液样本,提取血清,并立即分离脑组织和肠黏膜,用于后续试验。

1.2.4 TTC染色 脑组织进行轻度冰冻,然后沿冠状面用刀片切成5块,每块厚约2 mm,将切片置于含2%TTC的0.2 mol/L的PBS溶液中,37℃避光孵育30 min,PBS洗3次,最后在4%的多聚甲醛中浸泡过夜。拍照观察梗死灶的情况,梗死体积采用Image J软件统计分析。

1.2.5 实时定量PCR 采用TriZol试剂从各组大鼠的肠黏膜及脑梗死区中提取总RNA,用Primer Script RT Master Mix kit合成cDNA第一链,之后采用SYBR Select Master Mix kit进行实时定量PCR分析,所有操作严格按照说明书进行。GAPDH为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。引

物序列:CCK:上游:5'-GCACTGCTAGCCCGATAACAT-3',下游:5'-CCGAAATCCATCCAGCCCAT-3';GAPDH:上游:5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3',下游:5'-GATGGTGATGGTTTCCCGT-3'。

1.2.6 ELISA 按照说明书采用ACTH ELISA试剂盒检测各组大鼠血清中ACTH的含量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件行统计学分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析及LSD多重比较进行组间差异分析,Pearson相关性分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经功能评分和梗死体积的对比

模型组和治疗组大鼠的神经功能评分和梗死体积均高于假手术组,治疗组低于模型组,差异有统计学意义(P<0.05),见图1、表1。

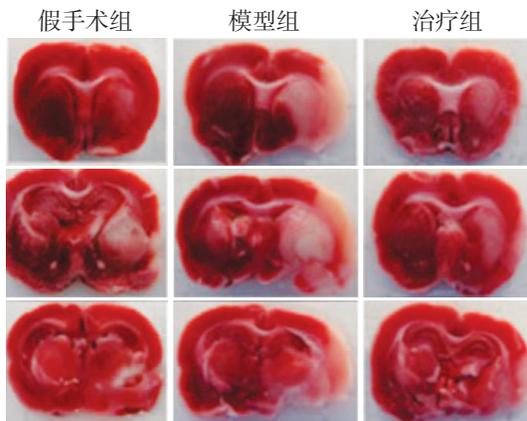


图1 各组脑切片TTC染色结果观察

表1 各组大鼠神经功能评分及梗死体积的对比($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	神经功能评分/分	梗死体积/mm ³
假手术组	5	0.38±0.11	53.46±8.71
模型组	4	4.42±0.19 ^①	237.29±15.34 ^①
治疗组	5	2.15±0.20 ^{①②}	96.50±10.18 ^{①②}

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与模型组比较,^②P<0.05

2.2 各组梗死区和肠黏膜中CCK mRNA表达的对比

模型组和治疗组大鼠梗死区和肠黏膜中CCK mRNA的表达均高于假手术组,治疗组低于模型组,差异有统计学意义(P<0.05),见表2。

表2 各组大鼠CCK mRNA表达的对比($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	梗死区	肠黏膜
假手术组	5	0.22±0.10	0.64±0.21
模型组	4	0.69±0.18 ^①	1.37±0.29 ^①
治疗组	5	0.52±0.14 ^{①②}	1.08±0.25 ^{①②}

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与模型组比较,^②P<0.05

2.3 各组血清中ACTH含量的对比

假手术组、模型组和治疗组大鼠血清ACTH含量分别为

(3.52±0.74)ng/mL、(6.22±1.10)ng/mL、(4.69±0.88)ng/mL,模型组和治疗组大鼠血清ACTH含量均高于假手术组,治疗组低于模型组,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.4 ACTH与CCK mRNA表达的相关性分析

模型组中,血清ACTH含量与梗死区及肠黏膜中CCK mRNA表达均呈显著正相关($r=0.916, P=0.012; r=0.885, P=0.030$)。

3 讨论

脑梗死的病理机制较复杂,啮齿类动物的MCAO模型由于操作简单,重复性和稳定性良好,已被广泛应用于脑梗死致病过程的研究^[10]。本研究结果显示,MCAO术后大鼠的神经功能评分及梗死体积显著增加,提示大鼠出现神经功能障碍,经β-细辛醚和丹皮酚干预后,大鼠的神经功能评分及梗死面积显著降低,提示β-细辛醚和丹皮酚干预可修复受损的神经功能,但其修复机制还有待进一步探讨。

CCK为肠道激素之一,其除作为消化系统的重要调节因子外,还作为生长因子、神经递质、精子活力因子、抗炎因子和心脏标志物等参与多种器官的各种生理和病理过程。CCK可诱导神经元和上皮细胞等合成及释放神经递质CCK-8和CCK-5,已有研究检测到CCK-8在脑出血和脑梗死患者中表达^[11]。由此可见,CCK不仅在人体多种器官中均有分布,而且还通过多种途径参与脑梗死的生理病理过程。本研究显示,MCAO术后大鼠脑梗死区及肠黏膜中CCK的表达显著降低,且经β-细辛醚和丹皮酚干预后,梗死区及肠黏膜中CCK的表达显著增加。由于中枢神经系统对胃肠道的调节主要是内、外刺激经中枢整合后由神经或神经内分泌系统下穿至肠道神经丛或直接作用于胃肠细胞^[12],因此笔者推测脑-肠轴中CCK表达的降低可能与脑梗死发病有密切关系。

脑-肠轴通过分泌一些神经递质(如CCK),在中枢神经系统和肠神经系统以及胃肠道效应细胞之间进行传递,调节内脏感觉、分泌及运动,这类神经递质称为脑肠肽。脑肠肽不仅参与胃肠道的调节,还参与下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal,HPA)轴、交感和副交感神经的激活过程,进而广泛参与神经内分泌调节。脑梗死作为一种应激因素作用于下丘脑,使HPA轴功能亢进,进一步导致脑病理变化,加重病情^[13]。ACTH是由丘脑下部室旁核的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone,CRH)刺激分泌的,在HPA轴参与脑梗死的调控中发挥重要作用。当大面积脑梗死时,颅内形成占位性病变效应导致垂体前叶受压、坏死,引发垂体分泌激素,ACTH等大量流入血液^[14]。本研究显示,模型组中血清ACTH的含量与脑肠轴CCK的表达呈正相关,这些结果提示脑梗死损伤导致梗死区及肠黏膜中CCK的表达增加,进而导致HPA轴功能亢进,进一步加重病情。垂体分泌的ACTH大量流入血液即为HPA轴功能亢进的标志。而β-细辛醚和丹皮酚干预可降低脑-肠轴CCK的表达,降低血清ACTH的含量,提示β-细辛醚和丹皮酚可通过抑制脑-肠轴中CCK表达,抑制HPA功

能亢进,进而改善脑梗死。但 β -细辛醚和丹皮酚对脑-肠轴中CCK表达的调控机制还不清楚,对下丘脑和肠黏膜中相关蛋白的作用机制也还不清楚,这将是本课题下一步要开展的项目。

参考文献

- [1] Mccullough LD, Graf J, Maas K, et al. Ischemic stroke induces gut permeability and enhances bacterial translocation leading to sepsis in aged mice[J]. *Aging*, 2016, 8: 1049-1060.
- [2] Quigley EMM. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2017, 17: 94.
- [3] Rehfeld JF. Cholecystokinin—From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger[J]. *Front Endocrinol*, 2017, 8: 47.
- [4] Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, et al. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2002, 52: 583-602.
- [5] Yang YX, Chen YT, Zhou XJ, et al. Beta-asarone, a major component of *Acorus tatarinowii* Schott, attenuates focal cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 236.
- [6] Zhao Y, Fu B, Zhang X, et al. Paeonol pretreatment attenuates cerebral

ischemic injury via upregulating expression of pAkt, Nrf2, HO-1 and ameliorating BBB permeability in mice[J]. *Brain Res Bull*, 2014, 109: 61-67.

- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [8] 何玉萍, 吴宏斌, 方永奇, 等. β -细辛醚对脑缺血大鼠血小板活化影响的动态研究[J]. *中华中医药学刊*, 2005, 23: 468-469.
- [9] 杨青. 丹皮酚对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[D]. 山东大学, 2010.
- [10] Liu F, Mccullough LD. Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 464701.
- [11] 王恒, 邵恩得, 张金荣, 等. 胆囊收缩素-8对高血压大鼠脑出血后核因子- κ B活性的影响[J]. *河北医药*, 2014, 36: 812-815.
- [12] 郭椿, 贺平. 脑肠轴及其研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘(电子版)*, 2017.
- [13] 唐洪梅, 房财富, 廖小红. 肠激安胶囊对IBS-D模型大鼠脑肠轴中NPY mRNA表达和ACTH含量的影响[C]. *中华中医药学会2013年药房管理分会学术年会论文汇编*, 2013: 161-165.
- [14] 任明. 脑梗塞与下丘脑-垂体-肾上腺轴功能间的相互影响[D]. 中国人民解放军军医进修学院解放军总医院, 解放军医学院, 军医进修学院, 1996.

(本文编辑:王晶)

(上接第258页)

THRIVE量表的高,可见简易量表不仅对不良预后预测良好,同时对死亡结局预测效能亦很好,考虑简易量表不仅对入院卒中的严重程度(NIHSS评分)进行评估,同时涉及既往糖尿病史、卒中史或TIA等动脉粥样硬化危险因素,还包括房颤史,对全身内科危险因素亦有涉及。

应用THRIVE、mSOAR和简易量表判断患者的预测结局,与随访结局比较,mSOAR和简易量表的Kappa值均大于0.4,说明mSOAR和简易量表判断的一致性一般,对于判断AIS的1年不良预后具有一定的应用价值。mSOAR对入院时卒中类别、严重程度、受累血管及入院前生活能力均进行评估,而长期预后往往与此息息相关,和简易量表应用实验室指标评估发病时血糖水平,既往卒中或TIA病史提示已有发病前兆和病变基础,较之THRIVE预测效能及一致性均较高。但mSOAR和简易量表的一致性并不很高,还有待于进一步改进。

综上所述,THRIVE、mSOAR和简易量表预测AIS患者1年不良预后较好的预测效能;且简易量表的预测能力更优。

参考文献

- [1] Feigin VL, Barker-Collo S, Parag V, et al. Auckland Stroke Outcomes Study. Part 1: Gender, stroke types, ethnicity, and functional outcomes 5 years poststroke[J]. *Neurology*, 2010, 75: 1597-1607.
- [2] Lawrence ES, Coshall C, Dundas R, et al. Estimates of the prevalence of acute stroke impairments and disability in a multiethnic population[J]. *Stroke*, 2001, 32: 1279-1284.
- [3] Cabral NL, Nagel V, Conforto AB, et al. Five-year survival, disability,

and recurrence after first-ever stroke in a middle-income country: A population-based study in Joinville, Brazil[J]. *Int J Stroke*, 2018, 13: 725-733.

- [4] 2014中国脑卒中大会[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2014, 6: 114.
- [5] Abdul-Rahim AH, Quinn TJ, Alder S, et al. Derivation and Validation of a Novel Prognostic Scale (Modified-Stroke Subtype, Oxfordshire Community Stroke Project Classification, Age, and Prestroke Modified Rankin) to Predict Early Mortality in Acute Stroke[J]. *Stroke*, 2016, 47: 74-79.
- [6] 顾美娟. 急性脑梗死1个月预后简易评估量表的构建及评价[D]. 华北理工大学, 2015.
- [7] The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators[J]. *J Clin Epidemiol*, 1988, 41: 105-114.
- [8] Bamford J, Sandercock P, Dennis M, et al. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction[J]. *Lancet*, 1991, 337: 1521-1526.
- [9] Flint AC, Cullen SP, Faigeles BS, et al. Predicting long-term outcome after endovascular stroke treatment: the totaled health risks in vascular events score[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2010, 31: 1192-1196.
- [10] Flint AC, Xiang B, Gupta R, et al. THRIVE score predicts outcomes with a third-generation endovascular stroke treatment device in the TREVO-2 trial[J]. *Stroke*, 2013, 44: 3370-3375.
- [11] Chen W, Liu G, Fang J, et al. External Validation of the Totaled Health Risks in Vascular Events Score to Predict Functional Outcome and Mortality in Patients Entered into the China National Stroke Registry[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25: 2331-2337.
- [12] Thaller M, Mitchell N. mSOAR: an effective bedside stroke prognosis tool[J]. *Clin Med (Lond)*, 2017, 17: 204-208.
- [13] Wang H, Pan Y, Meng X, et al. Validation of the mSOAR and SOAR scores to predict early mortality in Chinese acute stroke patients[J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0180444.
- [14] 计海峰, 杨雪莲, 姚峪岚, 等. mSOAR评分对急性缺血性卒中患者不良预后风险预测价值的探讨[J]. *诊断学理论与实践*, 2018, 17: 423-427.
- [15] 李娟, 秦铭, 彭延波. 急性脑梗死预后简易评估量表3个月预后价值分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19: 172-173, 175.

(本文编辑:唐颖馨)