阿魏酸钠对局灶性脑缺血大鼠神经功能及脑梗死面积的影响

林志坚　董姣璇　程　欣　王怡平　吴　军

摘　要　目的　探讨阿魏酸钠(sodium ferulate,SF)对局灶性脑缺血大鼠神经功能及梗死面积影响。**方法**　将 50 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、低剂量 SF 组、中剂量 SF 组及高剂量 SF 组,采用线栓法制作局灶性大脑中动脉闭塞(MCAO)脑缺血 Sprague - Dawley(SD)大鼠模型,治疗组予股静脉点滴不同剂量(低剂量 20mg/kg,中剂量 50 mg/kg,高剂量 100 mg/kg)的 SF 7 天,运用改良的神经功能缺损评分法(mNSS)观察 SD 大鼠神经行为学变化情况,并采用 2,3,5 - 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色显示 SD 大鼠脑梗死范围并计算梗死面积,与假手术组及模型组进行比较观察。**结果**　中剂量 SF 组及高剂量 SF 组 mNSS 明显低于模型组及低剂量 SF 组($P<0.05$);中剂量 SF 及高剂量 SF 组梗死面积小于模型组及低剂量 SF 组($P<0.05$);治疗后高剂量 SF 组 mNSS 评分及脑梗死面积与中剂量组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　中剂量 SF 及高剂量 SF 对局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复具有促进作用,并具有减小脑梗死面积的作用,可能存在一定的量效果关系。

关键词　脑梗死　阿魏酸钠　大脑中动脉闭塞

中图分类号　R741　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.04.018

Effect of Sodium Ferulate on Neurological Function and Infarction Size in Focal Cerebral Ischemia Rats.

Lin Zhijian, Dong Jiaoxuan, Cheng Xin, et al. Department of Neurology, Peking University Shenzhen Hospital, Guangdong 518036, China

Abstract　Objective　To explore the effect of sodium ferulate (SF) on neurological function and infarction size in focal cerebral ischemia rats. **Methods**　Fifty Sprague - Dawley(SD) rats were randomly divided into sham operation group, model group, low - dose SF group, middle - dose SF group and high - dose SF group. The middle cerebral artery occlusion(MCAO) rats were prepared with thread embolism method. In the treatment groups, rats were given different doses of SF(20mg/kg,50mg/kg,100mg/kg) iv drip for 7 days. The neurological behavior function were observed with modified neurological severity scores(mNSS). 2,3,5 - Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to show the cerebral infarction and the size was measured. **Results**　mNSS in both middle - dose SF group and high - dose SF group were lower than that in model group and low - dose SF group ($P<0.05$). The infarction size in both middle - dose SF group and high - dose SF group were smaller than that in model group and low - dose SF group ($P<0.05$). Compared with middle - dose SF group, both mNSS and infarction size in high - dose SF group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion**　Middle - dose SF and high - dose SF can improve the neurological function and decrease the infarction size in focal cerebral infarction rats. The effect of SF may have a dose - effect relatioship.

Key words　Cerebral infarction; Sodium ferulate; Middle cerebral artery occlusion

阿魏酸(ferulic acid, 化学名称为 3 - 甲氧基 - 4 - 羟基丙烯酸)普遍存在于当归、川芎、酸枣仁、蜂胶等中草药材中,具有抗血小板聚集,解除血管平滑肌痉挛,抗氧化和清除氧自由基,提高膜稳定性,以及抗炎、镇痛、调节免疫功能、利肝保湿等药理作用[1,2]。近年来,阿魏酸钠在脑梗死的治疗作用越来越引起人们的关注[3]。本研究旨在探讨阿魏酸钠(sodium ferulate,SF)对局灶性脑缺血大鼠神经功能及脑梗死面积的影响。

材料与方法

1. 实验动物与分组:健康雄性 Sprague - Dawley(SD)大鼠,清洁级,体重 250 ~ 300g,50 只,由北京大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2016 - 0010。随机方法分为 5 组,即假手术组、模型组、低剂量 SF 组、中剂量 SF 组及高剂量 SF 组,每组 10 只。

2. 试剂:阿魏酸钠注射液(中国药品生物制品检定研究所);2% TTC 染色液(上海晶美生物科技有限

基金项目:深圳市卫生计生系统科研项目(201505008)
作者单位:518036　北京大学深圳医院神经内科
通讯作者:林志坚,电子信箱:linzjpush@139.com

公司)。

3. 动物模型的制备:采用传统改良的大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血(MCAO)大鼠模型,腹腔注射10%水合氯醛(3ml/kg)进行麻醉,仰卧固定于鼠板上,颈部正中皮肤予强力碘消毒,做一2.5~3.0cm的切口,钝性分离出右侧颈总动脉及颈内、颈外动脉,结扎颈总动脉和靠近气管的颈外动脉,然后在颈总动脉分叉下方约3mm处剪一小切口,插入头端烧成钝圆形0.25mm尼龙线,大约进入17~20mm,在大脑中动脉起始端堵塞大脑中动脉,然后结扎固定,缝合切口,在切口及周围涂布抗生素[4]。假手术组仅切开皮肤,分离右侧颈总动脉后即缝合。术后将动物放回清洁的饲养笼中,如果动物死亡则随机补充造模。

4. 给药方法:(1)假手术组:仅切开皮肤,分离右侧颈总动脉后即缝合;每日股静脉滴注等体积无菌生理盐水。(2)模型组:建立MCAO模型,每日股静脉滴注等体积无菌生理盐水。(3)低剂量SF组:建立MCAO模型,每日股静脉滴注20mg/kg SF共7天。(4)中剂量SF组:建立MCAO模型,每日股静脉滴注50mg/kg SF共7天。(5)高剂量SF组:建立MCAO模型,每日股静脉滴注100mg/kg SF共7天。低剂量、中剂量及高剂量SF的浓度参考文献[5,6]报道确定。

5. 神经功能评估:运用改良的神经功能缺损评分法(mNSS)观察SD大鼠神经行为学变化情况,最高分数18分,分数越高提示神经功能损伤越严重[7]。

6. 脑梗死面积计算:大鼠腹腔注射水合氯醛(4ml/kg)麻醉固定,从背面剪下头部取出大脑,用0.01mol/L PBS(大约100ml)冲洗后放入-34℃冰箱内快速冷冻30min,自脑前极与视交叉连线中点处和漏斗柄与后叶尾极之间,做冠状切片,每2mm切1片,一般切5~6片,置于2% TTC中,37℃避光水浴20~30min。使用Image J软件计算脑梗死面积。

7. 统计学方法:采用SPSS 18.0统计学软件对数据进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,组间均数比较采用$LSD-t$检验,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　　果

1. 各组治疗前后mNSS比较:治疗前模型组、低剂量SF组、中剂量SF组及高剂量SF组mNSS比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后模型组与低剂量SF组生理盐水治疗后mNSS比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。中剂量SF组及高剂量组SF治疗后mNSS与低剂量SF组治疗后比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后高剂量SF组与中剂量SF组mNSS比较,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表1。

表1　各组治疗前后mNSS比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后
假手术组	10	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	10	11.45±3.73	12.11±3.29
低剂量SF	10	11.88±3.55*	10.74±4.01
中剂量SF	10	11.76±2.98*	7.63±3.06*
高剂量SF	10	11.95±3.26*	6.89±2.34*#

与低剂量SF组比较,*$P<0.05$;与中剂量SF组比较,#$P<0.05$

2. 各组治疗前后脑梗死面积的比较:各组大脑TTC染色,假手术大脑正常组织呈红色,模型组梗死组织颜色苍白(图1)。治疗前模型组、低剂量SF组、中剂量SF组及高剂量SF组脑梗死面积,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后模型组与低剂量SF组生理盐水治疗后脑梗死面积比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。中剂量SF组及高剂量组SF治疗后脑梗死面积与低剂量SF组治疗后比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后高剂量SF组与中剂量SF组脑梗死面积比较,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表2。

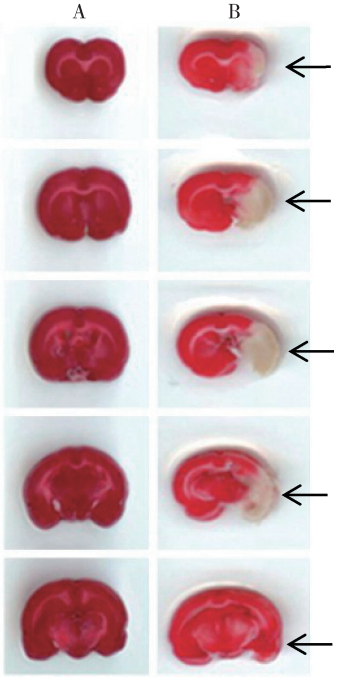

图1　TTC染色

A. 假手术组大脑组织呈红色;B. 模型组大脑梗死组织呈苍白色(箭头所示)

表 2 各组治疗前后脑梗死面积比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	治疗前	治疗后
假手术组	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	10	43.27 ± 7.71	41.33 ± 6.91
低剂量 SF	10	42.44 ± 7.54	39.75 ± 6.52
中剂量 SF	10	40.87 ± 2.98	21.55 ± 5.43 *
高剂量 SF	10	41.79 ± 3.26	18.23 ± 4.99 *#

与低剂量 SF 组比较，* $P < 0.05$；与中剂量 SF 组比较，# $P < 0.05$

讨 论

脑卒中是当今威胁人类健康的三大疾病之一，其发生率、病死率、致残率均高，在我国位居首位[8]。如何有效的救治脑卒中患者一直是研究的热点，在有限的时间窗内进行静脉溶栓或者机械取栓可改善患者预后，但是价格较为昂贵，且偏远地区条件尚未成熟[9]。阿魏酸是桂皮酸的衍生物之一，也是植物来源的一种酚酸，在细胞壁中与多糖和蛋白质结合成为细胞壁的骨架。阿魏酸是阿魏、川芎、当归、升麻、木贼、莱菔、酸枣仁等多种中草药的有效成分之一。

本研究发现，中剂量 SF 组及高剂量组 SF 治疗后 mNSS 与模型组治疗后比较有明显的下降，差异有统计学意义，提示中剂量 SF 及高剂量 SF 具有改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能。SF 改善 MCAO 大鼠神经功能具体机制尚未明确，可能从多种途径发挥作用。缺血性脑卒中是脑动脉闭塞或者栓塞导致脑组织缺血、缺氧的一种急性脑血管病，其病理生理过程十分复杂，包括一系列的炎性反应、细胞凋亡、神经细胞电活动消失、能量代谢障碍、血管再生等[10]。

研究表明，SF 可清除氧自由基产生，防止脂质过氧化，抑制多种炎性因子形成，从而起到神经保护作用。SF 也是一种非肽类内皮素受体拮抗剂，脑缺血、缺氧发生时，血管内皮细胞受损后，内皮素生成增多。SF 可降低血浆内皮素的浓度，还可拮抗内皮素引起的血管收缩、升压及血管平滑肌细胞增殖，促进一氧化氮的合成，松弛血管平滑肌，扩张血管，改变血液流变学特征，从而减轻脑缺血损伤程度[11]。脑缺血时神经细胞凋亡除了与氧自由基产生、钙超载、线粒体损伤等相关，凋亡过程受基因调控，已知相关基因有 bc1 - 2、p53、Fas 等基因家族，各种基因在细胞凋亡过程中作用各不相同，有研究发现 SF 能增加 bc1 - 2 表达，减少 Bar 表达，从而抑制细胞凋亡的发生，SF 尚能剂量依赖性地降低 Par - 4 及 caspase - 3 基因的 mRNA 的表达水平，而过氧化氢通过促进 caspase - 3 及Par - 4 蛋白的激活来诱发细胞凋亡，这可能是 SF 对抗过氧化氢引起的神经毒性的作用机制[12]。

本研究还发现中剂量 SF 及高剂量组 SF 治疗后脑梗死面积与模型组治疗后比较亦有明显下降。SF 具有减小 MCAO 大鼠脑梗死面积的作用。急性脑梗死病灶中心区以神经元坏死为主，周围则是缺血半暗带（ischemia penumbra），后者有大量存活的神经元，故尽快恢复缺血半暗带供血是缺血性脑卒中治疗的关键[13]。SF 可能通过减少缺血半暗带神经细胞凋亡，挽救一定数量的神经细胞，从而减小脑梗死面积。血小板的黏附和聚集以及血栓的形成是缺血性脑卒中形成中重要的病理生理过程，花生四烯酸是血小板活化的重要因素。有研究表明，SF 和阿司匹林合用可显著降低脑梗死患者血浆中血栓素 A_2（TXA_2）与前列环素（PGI_2）的比值，TXA_2 促进血小板聚集，而 PGI_2 抑制血小板聚集，TXA_2与 PGI_2 的比值降低可抑制血小板的活化聚集，对脑梗死的防治具有一定的作用。SF 抗血小板聚集、抗血栓形成及缩小梗死面积等作用可能与调节 TXA_2和 PGI_2 平衡有密切关系。

本研究发现，治疗后高剂量 SF 组与中剂量 SF 组 mNSS 及脑梗死面积比较，差异有统计学意义，提示高剂量 SF 对局灶性脑缺血大鼠的神经保护作用及减少脑梗死面积优于中剂量组，可能存在一定的量效关系。本研究的局限性在于仅观察 SF 对 MCAO 大鼠神经功能及脑梗死面积的影响，而未进一步从分子角度探讨其机制，这也是本课题组今后研究的方向之一。

综上所述，本研究发现中剂量 SF 及高剂量 SF 对局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复具有一定的促进作用，同时也减小脑梗死面积，提示 SF 在缺血性脑卒中的治疗具有一定的治疗作用。

参考文献

1 吴建良，沈敏敏，杨水新，等. 阿魏酸对小胶质细胞炎性反应的抑制作用[J]. 中国药理学通报，2015，31（1）：97 - 102

2 颜斯亮. 阿魏酸钠注射液的药理作用与临床应用研究进展[J]. 甘肃科技，2016，32，（7）：100 - 101

3 Zhao Y, Guan Y, Xu Y, *et al*. Sodium Ferulate combined with bone marrow stromal cell treatment ameliorating rat brain ischemic injury after stroke[J]. Brain Res，2012，1450：157 - 165

4 Bleilevens C, Roehl AB, Goetzenich A, *et al*. Effect of anesthesia and cerebral blood flow on neuronal injury in a rat middle cerebral artery occlusion（MCAO）model[J]. Exp Brain Res，2013，224（2）：155 - 164

5 Zhang Q, Zhao Y, Xu Y, *et al*. Sodium ferulate and n - butylidenephthalate combined with bone marrow stromal cells（BMSCs）improve the therapeutic effects of angiogenesis and neurogenesis after rat focal cerebral Ischemia[J]. J Transl Med, 2016，14（1）：223

（下转第 82 页）

和 LDL 是脂代谢变化的指标，APOA 是 HDL 的主要载脂蛋白，APOB 是 LDL 的主要载脂蛋白。妊娠期相对较低的 HDL 与 GDM 和巨大儿发生显著相关；而相对较高的 HDL 是两者的保护因素[10]。研究发现 GDM 组中 LDL 明显高于对照组，HDL 明显低于对照组，研究还发现 LDL 亚型表型 B 与 GDM 风险增加 4 倍相关。Leiva 等[11]研究发现孕妇血浆中 LDL 浓度随孕周增加而升高，可能导致胎儿胎盘血管内皮功能的改变。本实验中 GDM 组血浆中 LDL、APOB 的浓度水平与正常组比较明显升高（$P<0.05$），HDL、APOA 浓度水平与正常组比较明显降低（$P<0.05$），且 GDM 组血浆中 TNF－α、VCAM－1 分别与 LDL、APOB 浓度呈正相关（$P<0.05$），与 HDL、APOA 浓度呈负相关（$P<0.05$），而正常组血浆中 TNF－α、VCAM－1 分别与 HDL、LDL、APOA 和 APOB 没有相关性（$P>0.05$）。

综上所述，通过监测妊娠期糖尿病患者血浆和胎盘组织中 TNF－α、VCAM－1 的表达，结合 FBG、HbA1c、HDL、LDL、APOA 及 APOB 的水平，评估妊娠期糖尿病病情的严重程度和胎儿宫内环境，为胎儿胎盘血管内皮功能障碍提供治疗方案，改善不良妊娠结局及降低孕产妇和围生儿代谢疾病发生的风险。

参考文献

1 Vitoratos N, Vrachnis N, Valsamakis G, *et al*. Perinatal mortality in diabetic pregnancy[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1205: 94－98

2 López－Tinoco C, Roca M, Fernández－Deudero A, *et al*. Cytokine profile, metabolic syndrome and cardiovascular disease risk in women with late－onset gestational diabetes mellitus[J]. Cytokine, 2012, 58(1): 14－19

3 Tu'uhevaha J, Kaitu'u－Lino, Fiona C, *et al*. Combining metformin and esomeprazole is additive in reducing sFlt－1 secretion and decreasing endothelial dysfunction－implications for treating preeclampsia[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0188845

4 Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction[J]. Clin Sci (Lond), 2005, 109: 143－159

5 Li H, Peng W, Jian W, *et al*. ROCK inhibitor fasudil attenuated high glucose－induced MCP－1 and VCAM－1 expression and monocyte－endothelial cell adhesion[J]. Cardiovasc Diabetol, 2012, 11(1): 65

6 Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, *et al*. Summary and recommendations of the fifth international workshop－conference on gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2007, 30(Suppl2): S251－S260

7 Lawrence NJ, Kousta E, Penny A, *et al*. Elevation of soluble E－selectin level following gestational diabetes is restricted to women with persistent abnormalities of glucose regulation[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2002, 56: 335－340

8 Telejko B, Zonenberg A, Kuzmicki M, *et al*. Criculating asymmetric dimethylarginine, endothelin－1 and cell adhesion molecules in women with gestational diabetes[J]. Acta Diabetol, 2009, 46(4): 303－309

9 Di Fulvio P, Pandolfi A, Formoso G, *et al*. Features of endothelial dysfunction in umbilical cord vessels of women with gestational diabetes[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014, 24(12): 1337－1345

10 Jin WY, Lin SL, Hou RL, *et al*. Associations between maternal lipid profile and pregnancy complications and perinatal outcomes: a population－based study from China[J]. BMC Preg Childbirth, 2016, 16: 60

11 Leiva A, Salsoso R, Sáez T, *et al*. Cross－sectional and longitudinal lipid determination studies in pregnant women reveal an association between increased maternal LDL cholesterol concentrations and reduced human umbilical vein relaxation[J]. Placenta, 2015, 36(8): 895－902

（收稿日期：2018－07－05）
（修回日期：2018－07－17）

（上接第 77 页）

6 靖会，姚凌云，李教社，等. 国内阿魏酸钠的药理研究进展[J]. 西北药学杂志，2002，17(5): 236－238

7 Wang C, Fei Y, Xu C, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate neurological deficits and blood－brain barrier dysfunction after intracerebral hemorrhage in spontaneously hypertensive rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 4715－24

8 张薇，范宇威，高静，等. 脑卒中流行病学调查相关文献复习[J]. 中国临床神经科学，2014，22(6): 699－703

9 中华医学会神经病学分会. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. 中华神经科杂志，2015，48(4): 246－257

10 Jin R, Liu L, Zhang S, *et al*. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2013, 6(5): 834－851

11 Zhao J, Suyama A, Chung H, *et al*. Ferulic acid enhances nitric oxide production through up－regulation of argininosuccinate synthase in inflammatory human endothelial cells[J]. Life Sci, 2016, 145: 224－232

12 Cheng CY, Tang NY, Kao ST, *et al*. Ferulic acid administered at various time points protects against cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl－2 anti－apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia－reperfusion injury in rats[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155748

13 Manning NW, Campbell BC, Oxley TJ, *et al*. Acute ischemic stroke: time, penumbra, and reperfusion[J]. Stroke, 2014, 45(2): 640－644

（收稿日期：2018－07－10）
（修回日期：2018－07－29）