

## 海风藤醇提物对慢性硬膜下血肿大鼠的治疗作用及机制

夏士涛, 王培宇, 张开创, 魏静

(黑龙江中医药大学附属第一医院外三科, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:**【目的】探讨海风藤醇提物对慢性硬膜下血肿大鼠的治疗作用及机制。【方法】采用自体血反复多次颅内灌注法建立慢性硬膜下血肿大鼠模型。成功造模后, 将大鼠随机分为模型组、阳性对照组, 海风藤醇提物低、高剂量组, 每组10只, 另取10只作为假手术组。次日, 阳性对照组灌胃126 mg/kg阿托伐他汀钙溶液, 海风藤醇提物低、高剂量组分别灌胃15.44、30.88 mg/kg海风藤醇提物溶液, 模型组、假手术组灌胃等体积羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液, 1次/d, 连续给药14 d。给药结束后, 观察脑血肿体积, 酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测血清白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)水平, 凝固法检测血浆凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)含量, 免疫组织化学染色法检测血肿包膜新生血管数目, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测脑组织缺氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、紧密连接蛋白Claudin-5表达水平。【结果】与假手术组比较, 模型组大鼠可见脑血肿, 血清IL-6、IL-8水平升高( $P < 0.05$ ), 血浆PT、FIB含量降低, TT含量升高( $P < 0.05$ ), 血肿包膜微血管密度(MVD)增多( $P < 0.05$ ), 脑组织HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平升高、Claudin-5蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 海风藤醇提物低、高剂量组脑血肿体积减小( $P < 0.05$ ), 血清IL-6、IL-8水平降低( $P < 0.05$ ), 血浆PT、FIB含量升高, TT含量降低( $P < 0.05$ ), 血肿包膜MVD数目减少( $P < 0.05$ ), 脑组织HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平降低、Claudin-5蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。【结论】海风藤醇提物可缩小大鼠慢性硬膜下血肿体积, 改善凝血功能, 其机制可能与调节HIF-1 $\alpha$ 信号通路有关。

**关键词:** 海风藤醇提物; 慢性硬膜下血肿; 抗凝血; 抗炎; 缺氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )信号通路; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)12-2723-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.029

## Therapeutic Effects and Mechanism of Ethanol Extracts from Caulis Piperis Kadsurae for Chronic Subdural Hematoma in Rats

XIA Shi-Tao, WANG Pei-Yu, ZHANG Kai-Chuang, WEI Jing

(Third Dept. of Surgery, the First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China)

**Abstract: Objective** To explore the therapeutic effect and mechanism of ethanol extracts from Caulis Piperis Kadsurae for chronic subdural hematoma in rats. **Methods** The rat model of chronic subdural hematoma was established by repeated intracranial perfusion of autogenous blood. After successful modeling, the rats were randomly divided into model group, positive control group, low-dose and high-dose ethanol extracts from Caulis Piperis Kadsurae groups, with 10 rats in each group, and another 10 rats were set up as the sham-operation group. On the next day, the positive control group was given 126 mg/kg of atorvastatin calcium solution, and the low-dose and high-dose ethanol extracts from Caulis Piperis Kadsurae groups were given 15.44 and 30.88 mg/kg of ethanol extracts from Caulis Piperis Kadsurae, respectively. The model group and sham-operation group were given equal volume of sodium carboxyl methyl cellulose (CMC-Na). Once a day, the treatment lasted for 14 consecutive days. After treatment, the volume of brain haematoma was observed, serum interleukin 6(IL-6) and interleukin 8(IL-8) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), plasma prothrombin time (PT), prothrombin time (TT) and fibrinogen (FIB) levels were measured by rapid solidification method,

收稿日期: 2021-04-27

作者简介: 夏士涛(1967-), 男, 副主任医师; E-mail: 17137276814@163.com

通讯作者: 魏静(1974-), 女, 主管护师; E-mail: 17157084635@163.com

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(编号: LH2019H110)

number of new vessels in hematoma capsule was measured by immunohistochemical staining, and the expression levels of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and tight junction-associated protein Claudin-5 in brain tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the sham-operation group, visible brain hematomas were seen in the model group, serum IL-6 and IL-8 levels were increased ( $P < 0.05$ ), plasma PT and FIB levels were decreased and TT level was increased ( $P < 0.05$ ), microvessel density (MVD) in hematoma capsule was increased ( $P < 0.05$ ), HIF-1 $\alpha$  protein expression level was increased and Claudin-5 protein expression level was decreased in brain tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the hematoma volume was decreased in the low- and high-dose ethanol extracts from *Caulis Piperis Kadsurae* groups ( $P < 0.05$ ), serum IL-6 and IL-8 levels were decreased ( $P < 0.05$ ), plasma PT and FIB levels were increased and TT level was decreased ( $P < 0.05$ ), the MVD in the hematoma capsular was decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression level of HIF-1 $\alpha$  in brain tissue was decreased ( $P < 0.05$ ), expression level of Claudin-5 protein was increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ethanol extracts from *Caulis Piperis Kadsurae* can reduce volume of chronic subdural hematoma and improve coagulation function in rats, and the mechanism may be related to the regulation of HIF-1 $\alpha$  signaling pathway.

**Keywords:** ethanol extracts from *Caulis Piperis Kadsurae*; chronic subdural hematoma; anti-coagulation; anti-inflammation; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) signaling pathway; rats

慢性硬膜下血肿 (chronic subdural hematoma, CSDH) 是最常见的一种继发性颅脑损伤。有报道, 颅脑创伤为 CSDH 发生的主要因素, 但肝肾功能不全、老年痴呆、代谢性疾病、抗凝药物应用等均亦可引起 CSDH<sup>[1]</sup>。目前, 以钻孔引流为主的手术凭借其快捷、安全、方便等优点成为 CSDH 的首选疗法, 但术后死亡率、致残率和复发率居高不下, 且患者术后容易并发感染、脑水肿、器官功能不全等, 死亡率高。因此, 有必要开发安全、有效的 CSDH 治疗新策略, 以改善 CSDH 患者的预后。海风藤是胡椒科胡椒属植物海风藤 *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi 的干燥藤茎, 味辛、苦, 性微温, 入肝经, 有祛风、止痛、通络等功效, 现代药理研究表明, 其具有抗炎、镇痛等作用<sup>[2]</sup>。前期实验发现, 海风藤醇提物对 CSDH 有明显的疗效。故本研究以海风藤醇提物为研究药物, 以阿托伐他汀钙为阳性对照药<sup>[3-4]</sup>, 通过动物实验分析其对 CSDH 的治疗作用及其可能机制, 以期为临床应用提供借鉴, 现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 7 周龄, 体质量 260 ~ 270 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010。实验前适应性饲养 1 周, 室温 22 ~ 24  $^{\circ}\text{C}$ ,

相对湿度 40% ~ 60%, 自然光照, 自由摄食饮水。本实验方案满足一般动物实验伦理学原则, 已通过本院伦理委员会批准, 审批号: 20190511。

1.2 药物及制备 海风藤, 由湖北省青山中药材公司生产提供, 批号: 20191204, 已经华中科技大学同济医学院陈家春教授鉴定。制备方法: 取海风藤 7 kg, 以体积分数 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 混合提取液, 获得乙醇提取物。回收乙醇, 浸膏加水混悬, 依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取, 蒸干得到正丁醇 377.37 g, 以 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液配制成 7.72、15.44、30.88 mg/kg 海风藤醇提物溶液。阿托伐他汀钙片, 辉瑞制药有限公司生产, 规格: 20 mg, 批号: 国药准字 H20051408。

1.3 试剂与仪器 CMC-Na (济宁市贝诺克生物科技有限公司生产); 白细胞介素 6 (IL-6)、IL-8 酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒 (上海臻科生物科技有限公司); 凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、纤维蛋白原 (FIB) 检测试剂盒 (上海将来实业股份有限公司); 小鼠抗大鼠 CD31 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 兔抗大鼠缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、紧密连接相关蛋白 Claudin-5、GAPDH 等抗体 (海雅吉生物科技有限公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的免疫球蛋白 (IgG) 抗体 (北京博尔西科技有限公司)。CA-7000 全自动血凝分析仪

(日本 Sysmex 公司); M 型小动物核磁共振成像系统 (ASPECT Imaging 公司); 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); BH2 显微镜 (日本 Olympus 公司)。

**1.4 造模与分组** 抽取 50 只大鼠采用自体血反复多次颅内灌注法建立慢性硬膜下血肿模型<sup>[5]</sup>: 麻醉大鼠, 以俯卧位固定在立体定向架上, 在额顶叶中心取切口, 暴露颅骨, 磨出直径为 1 mm 的骨窗, 在硬脑膜上剪开直径为 1 mm 的十字切口。用无菌 BD 注射器取大鼠尾静脉血 700  $\mu\text{L}$ , 注入于硬膜下腔, 先以 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  速度注血 10 min, 再以 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  速度注血 10 min。首次注血 72 h 后, 再次取 500  $\mu\text{L}$  自体血, 划开愈合的硬脑膜切口, 再次注血, 先以 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  速度注血 10 min, 再以 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  注血 10 min。造模大鼠首次注血后第 24 天用 MRI 扫描大鼠头部, 血肿形成表示造模成功。共 40 只大鼠造模成功, 将其随机分为模型组, 阳性对照组, 海风藤醇提取物低、高剂量组, 每组各 10 只。剩余 10 只作为假手术组, 其造模方法同上, 但不注射自体血。

**1.5 干预方法** 阳性对照组造模成功后次日灌胃 126 mg/kg 阿托伐他汀钙 (以生理盐水配制成溶液), 海风藤醇提取物低、高剂量组同一时间分别灌胃 15.44、30.88 mg/kg 海风藤醇提取物溶液<sup>[6]</sup>, 模型组、假手术组亦同一时间灌胃等体积 CMC-Na 溶液。1 次/d, 连续给药 14 d。

#### 1.6 观察指标与方法

**1.6.1 大鼠脑血肿体积测定** 末次给药后 1 h, 麻醉大鼠, 将其置于 MRI 扫描专用线圈内, 进行 T2WI 序列冠状位扫描, 层厚 1 mm。选择体积最大血肿的最大断层截面, 用核磁工作站软件 Volume Viewer 4.3 测量血肿的横、纵径, 计算血肿体积 ( $\text{mm}^3$ )。

**1.6.2 ELISA 法检测大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-8 含量** MRI 扫描后, 腹主动脉采血, 低温离心取血清。参考 IL-6、IL-8 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL-6、IL-8 水平, 操作如下: 在酶标包被板上设置空白孔、样品孔、标准品孔, 加样后稀释, 温育, 洗涤, 加入酶标试剂, 显色, 终止, 在 450 nm 波长下测定各孔光密度值, 计算各样本浓度值。

**1.6.3 凝固法检测血浆凝血功能指标** 取血浆用全自动血凝分析仪检测, 严格参考 PT、TT、FIB 试剂盒说明书, 采用凝固法检测血浆 PT、TT、FIB

含量, 即将血浆样本试管编号, 根据仪器操作流程检验, 将结果自动传输到计算机上, 统计检验结果。

**1.6.4 CD31 免疫组织化学染色法检测大鼠血肿包膜新生血管** 麻醉后处死大鼠, 快速分离颅骨, 获得脑组织, 取注血侧的脑组织液氮冷冻, 另一部分脑组织用冰冻组织切片包埋剂包埋脑组织, 制作冠状位连续切片 (厚 8  $\mu\text{m}$ ), 进行 CD31 血管免疫组织化学染色: 将冰冻切片用甲醇固定, 用小牛血清封闭, 滴加小鼠抗大鼠 CD31 一抗 (稀释 1:100), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 取出滴加 HRP 标记的 IgG 二抗 (稀释 1:1 200), 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱孵育 20 min。DAB 显色, 镜下观察显色情况, 蒸馏水终止反应, 苏木素复染, 盐水酒精分化, 1% 氨水返蓝, 脱水封片。以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照, 其余操作同上。随机选取 5 个血管密集区, 显微镜 (400 倍) 下计数单个条索状 CD31 阳性血管内皮细胞与彼此分离的血管簇数目, 计算平均值, 转化为包膜血管密度 (MVD)。

**1.6.5 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 法检测大鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$ 、Claudin-5 蛋白表达水平** 取液氮冷冻脑组织, 放射免疫沉淀分析 (RIPA) 细胞裂解液进行裂解, 离心取上清。二喹啉甲酸 (BCA) 法定量蛋白质, 沸水浴变性, 上样, 用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白, 转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉封闭。分别加入一抗稀释液 HIF-1 $\alpha$  (1:800)、Claudin-5 (1:600)、VEGF (1:800)、GAPDH (1:600) 孵育过夜, 次日加入 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:2 000) 室温孵育 0.5 h。加入电化学发光 (ECL) 试剂显色, 用 Image J 软件分析目的蛋白与内参灰度值的比值。

**1.7 统计方法** 采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

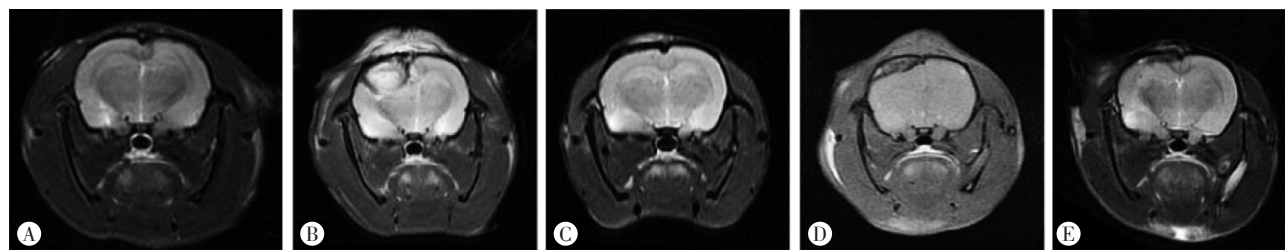
## 2 结果

**2.1 大鼠脑血肿体积** 以 MRI 观测结果计算血肿体积, 假手术组大鼠无颅内血肿不做统计。与模型组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组及阳性对照组大鼠血肿体积缩小 ( $P < 0.05$ ); 与阳性对照组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组血肿体积



增大( $P < 0.05$ ); 与海风藤醇提取物低剂量组比较, 高剂量组大鼠血肿体积较小( $P < 0.05$ )。结果见表1、图1。

**2.2 大鼠血清炎症因子** 与假手术组比较, 模型组大鼠血清IL-6、IL-8水平升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 阳性对照组, 海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠血清IL-6、IL-8水平降低( $P < 0.05$ ); 与阳性对照组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠血清IL-6、IL-8水平均升高( $P < 0.05$ ); 与海风藤醇提取物低剂量组比较, 高剂量组大鼠血清IL-6、IL-8水平均降低( $P < 0.05$ )。结果见表2。



A: 假手术组, 无血肿; B: 模型组, 血肿呈椭圆形, 压迫脑组织向下及对侧移位; C: 阳性对照组, 血肿大部分吸收, 脑组织回弹到正常位置, 仅硬脑膜与脑表面腔隙剩余小部分血肿; D: 海风藤醇提取物低剂量组, 血肿缩小, 呈透视镜形, 边沿上下径被吸收, 脑组织回弹; E: 海风藤醇提取物高剂量组, 血肿明显吸收, 呈月牙状, 头皮水肿减轻

图1 各组大鼠脑血肿体积MRI结果比较

Figure 1 Comparison of MRI results of brain hematoma volume in various groups

表2 各组大鼠血清IL-6、IL-8水平比较

Table 2 Comparison of serum IL-6 and IL-8 levels of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

组别	鼠数(只)	IL-6	IL-8
假手术组	10	51.66 ± 3.14	49.87 ± 3.41
模型组	10	249.44 ± 15.69 <sup>①</sup>	255.15 ± 14.46 <sup>①</sup>
阳性对照组	10	97.42 ± 5.91 <sup>②</sup>	92.16 ± 4.66 <sup>②</sup>
海风藤醇提取物低剂量组	10	198.63 ± 10.36 <sup>①②③</sup>	211.42 ± 10.58 <sup>①②③</sup>
海风藤醇提取物高剂量组	10	147.84 ± 7.59 <sup>①②③④</sup>	143.15 ± 8.42 <sup>①②③④</sup>

① $P < 0.05$ , 与假手术组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较; ④ $P < 0.05$ , 与海风藤醇提取物低剂量组比较

**2.3 大鼠血浆凝血功能** 与假手术组比较, 模型组大鼠血浆PT、FIB含量降低, TT含量升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 阳性对照组, 海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠血浆PT、FIB含量降低, TT含量升高( $P < 0.05$ ); 与阳性对照组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠血浆PT、FIB含量降低,

表1 各组大鼠脑血肿体积比较

Table 1 Comparison of brain hematoma volume of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{mm}^3$ )

组别	鼠数(只)	血肿体积
模型组	10	604.33 ± 23.78
阳性对照组	10	166.69 ± 18.42 <sup>①</sup>
海风藤醇提取物低剂量组	10	415.59 ± 20.25 <sup>①②</sup>
海风藤醇提取物高剂量组	10	241.79 ± 19.47 <sup>①②③</sup>

① $P < 0.05$ , 与模型组比较; ② $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较; ③ $P < 0.05$ , 与海风藤醇提取物低剂量组比较

TT含量升高( $P < 0.05$ ); 与海风藤醇提取物低剂量组比较, 高剂量组大鼠血浆PT、FIB含量升高, TT含量降低( $P < 0.05$ )。结果见表3。

**2.4 大鼠血肿包膜MVD** CD31为血管内皮标记, 可作为血肿包膜MVD观察指标。与模型组比较, 阳性对照组, 海风藤醇提取物低、高剂量组血肿包膜MVD增大( $P < 0.05$ ); 与阳性对照组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组血肿包膜MVD数减小( $P < 0.05$ ); 与海风藤醇提取物低剂量组比较, 高剂量组血肿包膜MVD较高( $P < 0.05$ )。结果见表4、图2。

**2.5 大鼠脑组织HIF-1 $\alpha$ 信号通路相关蛋白表达** 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平升高、Claudin-5蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平降低、Claudin-5蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ ); 与海风藤醇提取物低剂量组比较, 高剂量组HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平降低、Claudin-5蛋白表达水平较高( $P < 0.05$ )。结果见表5、图3。

表 3 各组大鼠血浆 PT、TT、FIB 含量比较

Table 3 Comparison of plasma PT, TT, FIB levels of rats in various groups

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	PT( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	TT( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	FIB( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
假手术组	10	99.15 ± 5.42	62.66 ± 7.61	1.34 ± 0.17
模型组	10	60.31 ± 2.34 <sup>①</sup>	87.41 ± 6.28 <sup>①</sup>	0.71 ± 0.11 <sup>①</sup>
阳性对照组	10	87.66 ± 2.48 <sup>①②</sup>	68.41 ± 2.54 <sup>①②</sup>	1.20 ± 0.12 <sup>①②</sup>
海风藤醇提取物低剂量组	10	71.32 ± 1.45 <sup>①②③</sup>	80.69 ± 4.12 <sup>①②③</sup>	0.98 ± 0.12 <sup>①②③</sup>
海风藤醇提取物高剂量组	10	80.63 ± 2.16 <sup>①②③④</sup>	74.36 ± 3.69 <sup>①②③④</sup>	1.07 ± 0.13 <sup>①②③④</sup>

① $P < 0.05$ , 与假手术组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较; ④ $P < 0.05$ , 与海风藤醇提取物低剂量组比较

表 4 各组大鼠脑血肿包膜 MVD 比较

Table 4 Comparison of the MVD in the brain hematoma capsule of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ , 条)

组别	鼠数(只)	MVD
模型组	10	9.31 ± 0.78
阳性对照组	10	69.61 ± 5.14 <sup>①</sup>
海风藤醇提取物低剂量组	10	15.69 ± 1.91 <sup>①②</sup>
海风藤醇提取物高剂量组	10	50.85 ± 2.75 <sup>①②③</sup>

① $P < 0.05$ , 与模型组比较; ② $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较; ③ $P < 0.05$ , 与海风藤醇提取物低剂量组比较

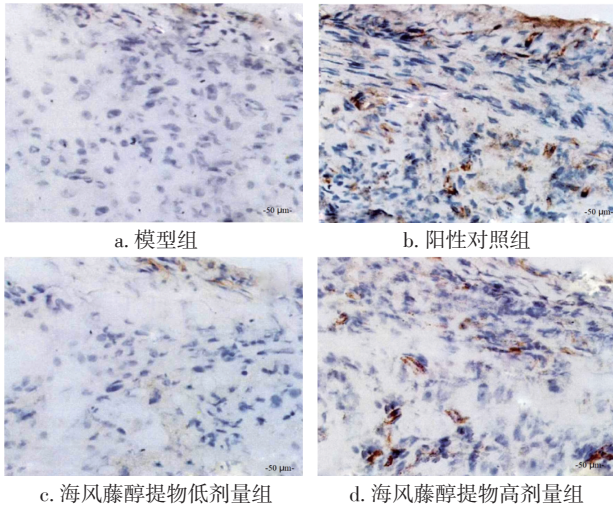


图 2 各组大鼠脑组织 CD31 阳性细胞分布比较 (免疫组化染色法, ×400)

Figure 2 Comparison of distribution of CD31 positive cells in brain tissue of rats in various groups (by immunohistochemical staining, ×400)

### 3 讨论

慢性硬膜下血肿(CSDH)作为一种慢性出血性神经系统疾病, 往往因创伤性颅脑损伤, 致硬脑膜与硬膜下腔处桥静脉被撕裂, 出血聚集在硬膜

表 5 各组大鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$  信号通路相关蛋白表达比较

Table 5 Comparison of HIF-1 $\alpha$  signaling pathway related proteins in brain tissue of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	HIF-1 $\alpha$	Claudin-5
假手术组	10	0.52 ± 0.11	0.99 ± 0.09
模型组	10	1.25 ± 0.18 <sup>①</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>①</sup>
海风藤醇提取物低剂量组	10	0.84 ± 0.13 <sup>①②</sup>	0.39 ± 0.08 <sup>①②</sup>
海风藤醇提取物高剂量组	10	0.65 ± 0.12 <sup>①②③</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>①②③</sup>

① $P < 0.05$ , 与假手术组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与海风藤醇提取物低剂量组比较

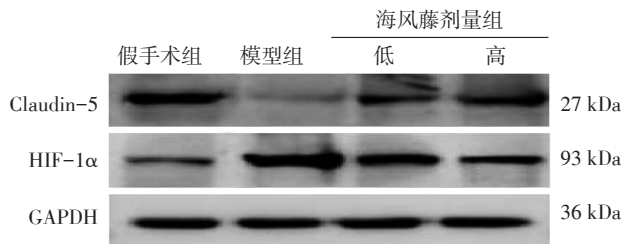


图 3 各组大鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$  信号通路相关蛋白表达电泳图  
Figure 3 Electrophoretic diagram of HIF-1 $\alpha$  signaling pathway related proteins in rat brain tissue of various groups

下腔, 形成血肿。当前, CSDH 发病机制的研究尚在起始阶段。Fan 等<sup>[7]</sup>研究表明, 炎症、血管生成在 CSDH 发病中发挥了关键作用。故探索与 CSDH 发作相关的炎症反应、血管生成病理生理机制, 开发可改善 CSDH 预后的新药有一定的临床意义。既往张柯媛等<sup>[8]</sup>研究表明, 海风藤醇提取物有抗炎作用, 王伟等<sup>[9]</sup>报道其具有抗血小板聚集的作用。因此, 本研究拟观察海风藤醇提取物治疗慢性硬膜下血肿的效果及其作用机制。本研究通过脑 MRI 观察发现: 与模型组比较, 海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠脑血肿体积减小, 提示海风藤醇提取物可

促进脑血肿吸收,效果仅次于经典西药阿托伐他汀。PT是凝血机制中心环节,活化后可形成TT,TT为蛋白水解酶,可水解多种凝血因子,并直接作用于血液中FIB,诱发凝血、血肿生成。一般情况下,PT、TT、FIB处于动态平衡中,CSDH发生后血浆PT活化生成TT,TT释放大量毒性物质、细胞因子,损伤血脑屏障,降低其通透性,导致凝血因子进入血液循环,表现为TT升高、PT下降。本研究结果显示:与模型组比较,海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠血浆PT、FIB含量升高,TT含量降低。结合免疫组化染色结果显示:与模型组比较,海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠血肿包膜MVD增大。提示海风藤醇提取物可调节凝血指标,促使血管形成,这可能是其促进血肿吸收的原因之一。

Zhao等<sup>[10]</sup>报道,炎症与CSDH密切相关。IL-6是一种生物学功能较多的内源性促炎因子,可增加血管通透性,促进血液渗出,是CSDH形成过程中关键的炎症反应因子。IL-8不仅是炎症反应因子,还可作为趋化因子,促进黏附因子吸引中性粒细胞并将其激活,强化血管内皮细胞等迁移功能,与血管生成密切相关。CSDH持续扩大的炎症反应是IL-6、IL-8等共同作用的结果。本研究结果显示:与模型组比较,海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠IL-6、IL-8水平持续降低,提示海风藤醇提取物具有抗炎的功效。

CSDH发生后,凝聚在硬膜下腔的血块压迫皮质,形成局部缺血缺氧环境,导致HIF-1 $\alpha$ 不断累积。HIF-1 $\alpha$ 是多种信号通路的上游调控因子,也是哺乳动物机体缺氧状态下的重要转录调节因子,被认为在炎症反应中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。Lin等<sup>[12]</sup>研究表明,HIF-1 $\alpha$ 被激活后,可促进炎症因子的产生,并激活下游许多经典靶基因如血管内皮生长因子(VEGF)转录,上调VEGF表达。Horecka等<sup>[13]</sup>报道VEGF与基质金属蛋白酶9(MMP-9)正相关。HIF-1 $\alpha$ 活化后上调VEGF,导致MMP-9表达升高,降解内皮细胞间的紧密连接蛋白Claudin-5,从而破坏血脑屏障。Berndt等<sup>[14]</sup>报道Claudin-5是形成血脑屏障紧密连接的主要分子元件,是脑微血管内皮细胞紧密连接中特异性蛋白,其表达下调可影响血脑屏障结构完整性。本研究结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠脑组织HIF-1 $\alpha$

表达上调,Claudin-5表达下调;与模型组比较,海风藤醇提取物低、高剂量组大鼠脑组织HIF-1 $\alpha$ 表达下调,Claudin-5表达上调,提示海风藤醇提取物可能通过降低血肿周围组织缺氧生成的HIF-1 $\alpha$ 表达,降低下游产物MMP-9,从而上调Claudin-5表达,保持CSDH血脑屏障的完整性。

综上所述,海风藤醇提取物可促进CSDH吸收,调节凝血功能,其机制可能是通过下调HIF-1 $\alpha$ 信号通路实现的。

#### 参考文献:

- [1] KIM D H, PARK E S, KIM M S, et al. Correlation between head trauma and outcome of chronic subdural hematoma [J]. *Korean J Neurotrauma*, 2016, 12(2): 94-100.
- [2] 李中, 吴兵兵, 周颖灿, 等. 周德生教授脑病专科药对举隅[J]. *环球中医药*, 2015, 8(12): 1498-1501.
- [3] 刘强, 庞绍铮. 慢性硬膜下血肿术后应用阿托伐他汀降低复发的效果分析[J]. *江苏医药*, 2019, 45(5): 534-535.
- [4] JIANG R, ZHAO S, WANG R, et al. Safety and efficacy of atorvastatin for chronic subdural hematoma in Chinese patients: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Neurol*, 2018, 75(11): 1338-1346.
- [5] GAO C, GONG Z, WANG D, et al. Hematoma-derived exosomes of chronic subdural hematoma promote abnormal angiogenesis and inhibit hematoma absorption through miR-144-5p [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 12147-12164.
- [6] 秦晴, 阙金花, 张玉琴, 等. 海风藤正丁醇提取物抗类风湿作用药效学研究[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(4): 13-15.
- [7] FAN Y S, WANG B, WANG D, et al. Atorvastatin combined with low-dose dexamethasone for vascular endothelial cell dysfunction induced by chronic subdural hematoma [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(3): 523-530.
- [8] 张柯媛, 熊灏, 曹斌, 等. 海风藤提取物灌胃对高尿酸血症小鼠血清尿酸水平影响及对痛风大鼠足趾肿胀的防治作用[J]. *山东医药*, 2017, 57(27): 37-39.
- [9] 王伟, 刘洋, 周清明. 海风藤醇提取物对血小板活化因子诱导血小板聚集作用的初步研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2000, 7(4): 193.
- [10] ZHAO C, WEI Y, LIU J, et al. Spontaneous acute epidural hematoma associated with chronic subdural hematoma due to dural metastasis of gastric carcinoma: a case report and literature review [J]. *Int J Neurosci*, 2021, 131(4): 405-410.
- [11] LI Z L, LV L L, TANG T T, et al. HIF-1 $\alpha$  inducing exosomal microRNA-23a expression mediates the cross-talk between tubular epithelial cells and macrophages in tubulointerstitial inflammation [J]. *Kidney Int*, 2019, 95(2): 388-404.
- [12] LIN C J, LAN Y M, OU M Q, et al. Expression of miR-217 and HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer



- and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats [J]. J Endocrinol Invest, 2019, 42(11): 1307-1317.
- [13] HORECKA A, HORDYJEWSKA A, BIERNACKA J, et al. Intense remodeling of extracellular matrix within the varicose vein: the role of gelatinases and vascular endothelial growth factor[J]. Ir J Med Sci, 2021, 190(1): 255-259.
- [14] BERNDT P, WINKLER L, CORDING J, et al. Tight junction proteins at the blood-brain barrier: far more than claudin-5[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(10): 1987-2002.

【责任编辑：侯丽颖】

## 大车前苷对糖尿病大鼠肾纤维化的干预作用

梁霄<sup>1</sup>, 王盼<sup>2</sup>, 李涛<sup>3</sup>, 牛昭<sup>1</sup>, 陈婧<sup>4</sup>

(1. 保定市第二医院肾内科风湿免疫科, 河北保定 071000; 2. 河北大学附属医院病理科, 河北保定 071030;  
3. 保定市第二医院检验科, 河北保定 071000; 4. 保定市第二中心医院肿瘤科, 河北保定 071000)

**摘要:**【目的】探讨大车前苷对糖尿病大鼠肾纤维化的干预作用。【方法】将新生大鼠随机分为正常组, 模型组, 大车前苷低、中、高剂量组, 二甲双胍组, 每组6只。除正常组外, 其他各组大鼠出生第2天给予单次腹腔内注射链脲佐菌素(STZ)构建糖尿病模型。第12~16周, 大车前苷低、中、高剂量组大鼠分别对应灌胃大车前苷10、20、40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 二甲双胍组灌胃二甲双胍25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。给药结束后, 进行血液和尿液生化检测, 进行肾组织氧化应激指标检测, 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察肾脏病理变化, 采用免疫组织化学法检测肾组织中转化生长因子(TGF)-β水平, 采用蛋白免疫印迹法检测肾组织α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、E钙黏蛋白(E-cadherin)、TGF-β、Smad2、Smad3和Smad7蛋白表达水平。【结果】与正常组比较, 模型组大鼠血糖含量及总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)水平显著升高, 胰岛素、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平均显著降低, 尿液中尿蛋白(PRO)、潜血(BLO)和胆红素(BIL)含量均显著增加(均 $P < 0.01$ ), 肾组织可见明显纤维化改变, 肾组织丙二醛(MDA)水平显著升高, 还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽转移酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)水平均显著降低, 肾组织TGF-β的PI值显著升高, E-cadherin和Smad7表达水平显著下调, α-SMA、TGF-β、Smad2和Smad3表达水平均显著上调(均 $P < 0.01$ )。与模型组比较, 大车前苷中、高剂量组和二甲双胍组上述指标均得到明显改善( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 大车前苷低剂量组则改善不明显( $P > 0.05$ )。【结论】大车前苷可能通过调节氧化应激及TGF-β/Smad信号通路抑制糖尿病大鼠肾纤维化。

**关键词:** 大车前苷; 糖尿病; 肾纤维化; 氧化应激; TGF-β/Smad信号通路; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)12-2729-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.030

收稿日期: 2020-10-20

作者简介: 梁霄(1986-)男, 主治医师; E-mail: lx15830918585@163.com

基金项目: 保定市科学技术研究与发展指导计划项目(编号: 18ZF109)