

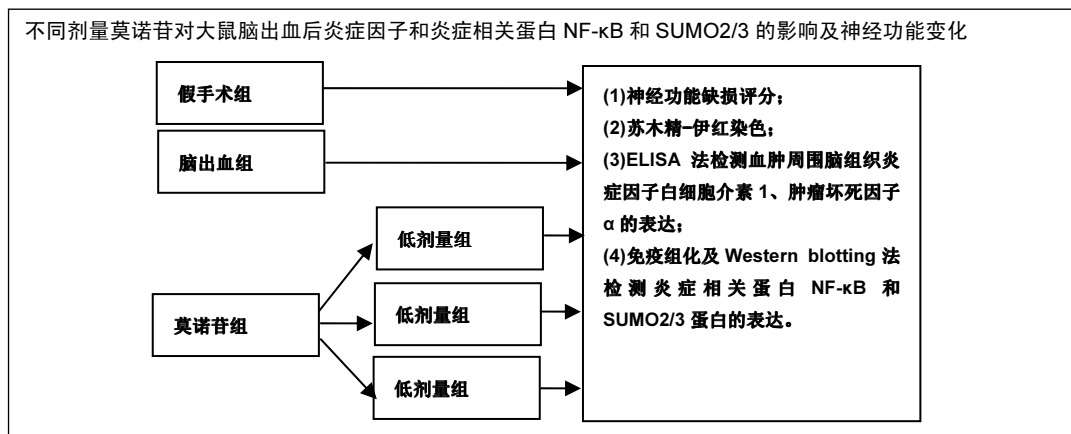
莫诺昔通过抑制炎症反应改善脑出血模型大鼠的神经功能

袁志俊, 何晓英, 袁 平, 郑晓梅, 李小刚(西南医科大学附属医院神经内科, 四川省泸州市 646000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0140

ORCID: 0000-0001-9255-7508(袁志俊)

文章快速阅读:



袁志俊, 女, 1988 年生, 四川省泸州市人, 2011 年泸州医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事神经病学方面的研究。

通讯作者: 李小刚, 主任医师, 硕士研究生导师, 西南医科大学附属医院神经内科, 四川省泸州市 646000

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2017-12-16



文题释义:

莫诺昔:是从中药山茱萸中分离提取的一种成分, 据国内外研究表明它在大鼠缺血性脑损伤模型中, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、促进血管和神经再生、抗血小板聚集和神经保护作用。因脑出血的病理生理过程与缺血性脑损伤有许多相似之处, 因此推测莫诺昔是否也可以抑制脑出血的炎症反应。

炎症反应:是临床常见的一个病理过程, 可以生于机体各部位的组织和各器官。致炎因子作用于机体后, 一方面引发组织细胞的损坏, 使局部组织细胞显现变性、坏死; 另一方面, 诱导机体抗病机能增加, 以益于清除致炎因子, 使受损组织得到修复, 从而使机体的内环境以及内环境和外环境之间达到新的均衡。

摘要

背景:研究表明莫诺昔在大鼠缺血性脑损伤模型中具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、促进血管和神经再生、抗血小板聚集和神经保护作用, 但莫诺昔是否可以抑制脑出血的炎症反应尚不清楚。

目的:观察不同剂量的莫诺昔对大鼠脑出血后炎症因子白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 和炎症相关蛋白 NF- κ B 和 SUMO2/3 的影响及神经功能变化。

方法:将健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、脑出血和莫诺昔低、中、高剂量组, 后 4 组大鼠采用自体尾动脉血注入法建立脑出血模型, 术后莫诺昔低、中、高剂量组分别给予莫诺昔 30, 90, 270 mg/kg 每天 3 次灌胃给药, 连续 7 d, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。给药 7 d 后应用 NSS 评分观察各组大鼠神经功能缺损症状; 评分后取大鼠血肿周围脑组织, 苏木精-伊红染色观察血肿周围神经细胞形态结构的变化; ELISA 法检测大鼠脑组织炎症因子白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 水平; 免疫组化法及 Western blotting 法检测通道蛋白 NF- κ B 和 SUMO2/3 蛋白的表达。

结果与结论:①与脑出血组比较, 莫诺昔低、中、高剂量组神经功能缺损改善, 其中高剂量组改善最明显 ($P < 0.05$); ②与假手术比较, 脑出血组和莫诺昔低、中、高剂量组神经功能受损, 炎症因子白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 和炎症相关蛋白 NF- κ B、SUMO2/3 表达增多 ($P < 0.05$); ③与脑出血组比较, 莫诺昔低、中、高剂量组炎症因子白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 表达减少, 炎症相关蛋白 NF- κ B 降低, SUMO2/3 表达增多 ($P < 0.05$), 以高剂量组作用最明显 ($P < 0.05$)。提示: 高剂量莫诺昔可通过炎症调节蛋白的变化, 下调炎症因子的表达, 抑制炎症反应改善脑出血大鼠的神经功能。

关键词:

莫诺昔; SUMO2/3 蛋白; 组织构建; 组织工程; 脑出血; NF- κ B 蛋白; 白细胞介素 1; 肿瘤坏死因子 α ; 炎症反应

主题词:

脑出血; 山茱萸科; 小泛素相关修饰蛋白质类; NF- κ B; 白细胞介素 1; 肿瘤坏死因子 α

基金资助:

四川省卫生厅科研项目(110368)

Yuan Zhi-jun, Master, Physician, Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author:

Li Xiao-gang, Chief physician, Master's supervisor, Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Morroniside improves the neurological function in intracerebral hemorrhage rats by inhibiting inflammatory response

Yuan Zhi-jun, He Xiao-ying, Yuan Ping, Zheng Xiao-mei, Li Xiao-gang (Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Morroniside has been shown to play roles of anti-inflammation, antioxidant, anti-apoptosis, promoting vascular and neural regeneration, anti-platelet aggregation and neuroprotection in the rat model of ischemic brain injury, but whether it can inhibit the inflammatory reaction of cerebral hemorrhage is unclear.

OBJECTIVE: To observe the changes of inflammatory factors (interleukin-1, tumor necrosis factor- α) and inflammatory-related proteins (nuclear factor- κ B and SUMO2/3) as well as neurologic function in a rat model of cerebral hemorrhage treated with morroniside at different doses.

METHODS: Healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation, cerebral hemorrhage and low-, medium- and high-dose morroniside groups. The model of cerebral hemorrhage was established in the latter four groups by injecting autologous blood from the tail artery, followed by intragastric injection of 30, 90, 270 mg/kg morroniside in the three morroniside groups, respectively, three times daily for consecutive 7 days; the rats in the sham operation and model groups were given same volume of normal saline. Then, the neurological function was evaluated by Neurological Severity Scores; the brain tissue around the hematoma were removed to observe the morphological changes of neurocytes around the hematoma by hematoxylin-eosin staining; the expression levels of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in the brain tissue were detected by ELISA; the expression levels of nuclear factor- κ B and SUMO2/3 were detected by immunohistochemistry and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the cerebral hemorrhage group, the low-, medium- and high-dose morroniside groups showed a significant neurological improvement, especially the high-dose group ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the cerebral hemorrhage and morroniside groups exhibited a significant increase in the nerve function damage and expression levels of interleukin-1, tumor necrosis factor α , nuclear factor- κ B and SUMO2/3 ($P < 0.05$). Compared with the cerebral hemorrhage group, in the low-, medium- and high-dose morroniside groups, the expression levels of interleukin-1 and tumor necrosis factor α were significantly reduced, and expression levels of nuclear factor- κ B and SUMO2/3 were significantly increased ($P < 0.05$). In summary, high-dose morroniside can improve the neurological function in rats with cerebral hemorrhage by down-regulating the levels of inflammatory cytokines.

Subject headings: Cerebral Hemorrhage; Cornaceae; Small Ubiquitin-Related Modifier Proteins; NF- κ B; Tumor Necrosis Factor- α

Funding: the Research Project of Sichuan Provincial Health Department, No. 110368

0 引言 Introduction

脑出血发病率和死亡率高, 非手术患者内科治疗无特异有效方法, 因此, 明确脑出血的发病机制及寻找新的治疗方法非常重要。目前大多数学者认为脑出血可能的机制有: 炎症反应、细胞凋亡、机械压迫、血脑屏障的破坏、凝血酶的级联反应、细胞自噬等。Li等^[1]研究显示, 脑缺血组织蛋白的SUMO化修饰能够提高大鼠脑缺血的耐受性, 从而可达到脑保护作用, 且主要效应蛋白为SUMO2/3。Hochrainer等^[2]研究表明, 炎症相关蛋白SUMO2/3修饰可调控通道蛋白核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的活化, SUMO2/3能竞争性结合I κ Ba蛋白, 而I κ Ba蛋白可抑制NF- κ B的活化。

莫诺昔是从中药山茱萸中分离提取的一种成分, 据国内外研究表明它在大鼠缺血性脑损伤模型中, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、促进血管和神经再生、抗血小板聚集和神经保护作用^[3-14]。在研究大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的中表明: 莫诺昔能提高皮质总抗氧化能力^[4]; 可降低皮质梗死周边区基质金属蛋白酶2、9的表达从而保护血脑屏障^[5-6]; 增加皮质Ngn2、Pax6的表达而促进神经发生^[7], 促进成年大鼠海马齿状回内源性神经干细胞的增殖及分化^[8]; 通过上调CD34、Ang-1及受体Tie-2、血管内皮生长因子和成纤维生长因子2的表达, 促进血管再生^[9-11]; 通过抑制大鼠脑组织caspase-3活性, 抗凋亡并发挥神经保护作用^[12]; 莫诺昔能明显降低纤维蛋白原含量, 延长凝血酶原

时间、活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间从而抗凝血功能的作用^[13]。除此之外, 王娜等^[12]研究表明: 山茱萸环烯醚萜苷可能通过抑制炎症细胞因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 的表达, 减轻炎症反应, 从而发挥对创伤性脑损伤后的脑保护作用。因脑出血的病理生理过程与缺血性脑损伤有许多相似之处, 作者推断莫诺昔是否也可以抑制脑出血的炎症反应。

因此实验选择炎症相关蛋白SUMO2/3和NF- κ B作为重要的炎症指标, 拟观察不同剂量的莫诺昔干预脑出血后大鼠血肿周围脑组织炎症因子和炎症相关蛋白的表达变化, 探讨莫诺昔是否可通过抑制炎症反应改善脑出血大鼠的神经功能。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验完成于2017年1月25日, 实验地点为西南医科大学附属医院中心实验室。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雄性SD大鼠50只, 鼠龄1至2个月, 体质量100-120 g, 由西南医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(川)2013-181, 饲养环境为室温, 湿度适宜, 由西南医科大学实验动物中心提供的SD大鼠标准饲料单笼喂养。

1.3.2 实验用主要试剂及仪器 白细胞介素1抗体、肿瘤

坏死因子 α 抗体、ELISA试剂盒及NF- κ B抗体、SUMO2/3抗体、Western试剂盒、SABC免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒,以上试剂盒均购自上海宝音生物科技有限公司;莫诺昔,购自上海纯优生物公司。

鼠脑立体定向仪、50 μ L微量注射仪等购自世界精密仪器商贸(上海)有限公司;其他仪器包括Olympus光学显微镜、光学显微镜照相系统、Image-J图像分析系统等。

1.4 方法

1.4.1 动物分组干预方法 将雄性SD大鼠50只随机分为5组:假手术组、脑出血组和莫诺昔低、中、高剂量组,每组10只。

脑出血模型制备:采用Chen等^[15]改良二次注入法建立脑出血模型。大鼠用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位固定在大鼠脑立体定位仪上,备皮、消毒铺巾,将50 μ L微量注射器针尖定位于前囟前面0.5 mm,线右侧旁边3 mm处,通过颅骨钻孔缓慢垂直进针6 mm,约为尾状核的位置,将50 μ L尾动脉血注入,最后退出注射器,局部用骨蜡封闭并消毒后缝合切口。术毕根据Longa等^[16]5级评定方法进行神经功能缺损评分,1-3分者为大鼠脑出血造模成功。

分组干预:假手术组按照脑出血模型制备的方法向尾状核注入等量的生理盐水,其他4组制备脑出血模型。莫诺昔低、中、高剂量组在脑出血造模成功后分别给予莫诺昔30, 90, 270 mg/kg(药物配置使用生理盐水,剂量选择通过查阅艾厚喜等^[4-5]实验方法选取),3次/d灌胃给药,连续7 d。假手术组和脑出血组给予等量生理盐水。给药7 d后取材。

1.4.2 神经功能缺损评分(neurological severity scores, NSS)测评 各组大鼠分别于处死取脑组织前行NSS评分测定,采用Garcia等^[17]评分标准:包括运动、感觉、平衡测试、反射消失或不正常运动、行走,NSS评分18分为神经功能正常,13-18分为轻度损害,7-12分为中度损害,1-6分为重度损害。

1.4.3 苏木精-伊红染色观察各组大鼠脑组织形态结构改变 各组大鼠测NSS评分后腹腔注射1%戊巴比妥钠进行深麻醉,迅速断头取脑,并以注射部位为中点平分为4份,一份放于40 g/L多聚甲醛固定液中固定30-50 min,以作石蜡包埋、切片,用于苏木精-伊红染色、免疫组化染色;一份用于ELISA检测;一份用于Western blotting检测;最后一份备用。

苏木精-伊红染色通过脱蜡、染色、脱水I与复染、脱水II与透明、封固。在光学显微镜下观察脑出血及莫诺昔干预后大鼠脑组织形态结构的改变,正常细胞核呈浅蓝色,细胞浆呈粉红色。

1.4.4 ELISA检测白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 含量 采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测脑组织匀浆中炎症因子白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 含量。

1.4.5 免疫组化检测NF- κ B、SUMO2/3的表达 采用SABC法,步骤简述如下:①切片常规脱蜡至水,体积分数3% H_2O_2 室温孵育5-10 min,用以消除内源性的过氧化物酶的活性;②蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min;③用山羊血清封闭液封闭,室温孵育10 min,倒去血清,0.02%PBS漂洗5 min $\times$ 3次;④滴加一抗,于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,0.02%PBS漂洗5 min $\times$ 3次。此外,用PBS取代一抗用作空白对照;⑤加入二抗,室温孵育20 min,0.02%PBS漂洗5 min $\times$ 3次;⑥滴加试剂SABC(1:100),室温孵育2 h,0.02%PBS漂洗5 min $\times$ 3次;⑦DAB染色;⑧自来水冲洗,苏木素轻度复染,然后进行脱水、透明、封固。

选择5个不重叠的肿区域采集图像,然后用Image-Pro-Plus5.0软件分析蛋白阳性表达的累积吸光度值,并计算平均值。

1.4.6 Western blot检测脑组织通道蛋白NF- κ B、SUMO2/3蛋白的表达 分别提取3组血肿周围脑组织的总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。100 g/L SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶中电泳、转膜,50 g/L脱脂奶粉封闭,加入一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入HRP标记的二抗室温孵育1 h,滴加增强型发光试剂(ECL)后,暗室曝光,观察蛋白表达情况,Image J软件分析各个条带的灰度值。

1.5 主要观察指标 各组大鼠神经功能缺损评分、大鼠血肿周围脑组织炎症因子白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 及通道蛋白NF- κ B p65、SUMO2/3的表达。

1.6 统计学分析 结果以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 19统计软件进行统计学分析,组内不同时间均数比较采用重复测量数据的方差分析,两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 在造模过程中大鼠麻醉意外死亡2只,造模时在注入自体血过程中死亡3只,造模成功后置笼喂养过程中死亡2只。死亡大鼠需再次造模补充实验。死亡后进行尸体解剖分析死亡可能原因:①麻醉药注入大鼠动脉血管,导致麻醉药过量中毒死亡;②麻醉后,大鼠呼吸道分泌物过多,导致呼吸道阻塞,窒息死亡;③造模时定位不准确或者是进针不垂直,导致大量血液进入脑干死亡;④注入自体血过程中大鼠因麻醉过浅剧烈活动导致死亡;⑤喂养过程中,术后感染死亡;⑥大鼠脑出血水肿高峰期所致大面积脑出血死亡。

2.2 各组大鼠的NSS评分比较 与假手术组比较,脑出血组和莫诺昔低、中、高剂量组NSS评分降低,神经功能受损加重($P < 0.05$);与脑出血组比较,莫诺昔低、中、高剂量组NSS评分增高,神经功能缺损改善,其中高剂量组改善最明显($P < 0.05$),见图1。

2.3 苏木精-伊红染色观察各组大鼠脑组织形态结构的变化 假手术组大鼠脑组织结构清晰完整,细胞排列有序,

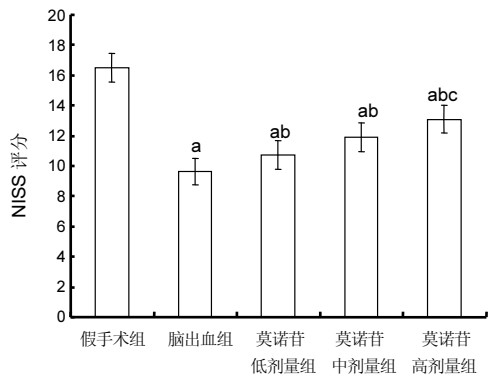


图 1 各组大鼠的神经功能缺损(NSS)评分比较
Figure 1 Comparison of the Neurological Severity Scores of rats among groups
图注: 与假手术组比较, ^a*P* < 0.05; 与脑出血组比较, ^b*P* < 0.05; 与莫诺昔低、中剂量组比较, ^c*P* < 0.05。

表 1 各组大鼠血肿周围脑组织炎症因子白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 水平
($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Expression levels of interleukin-1 and tumor necrosis factor-α in the rat brain tissue around hematoma

组别	<i>n</i>	白细胞介素 1	肿瘤坏死因子 α
假手术组	10	102.56±10.46	134.36±13.84
脑出血组	10	219.38±10.76 ^a	286.21±15.13 ^a
莫诺昔低剂量	10	197.34±10.21 ^{ab}	247.86±14.28 ^{ab}
莫诺昔中剂量	10	170.52±10.12 ^{ab}	200.87±14.42 ^{ab}
莫诺昔高剂量	10	135.64±9.64 ^{abc}	165.28±14.64 ^{abc}

表注: 与假手术组比较, ^a*P* < 0.05; 与脑出血组比较, ^b*P* < 0.05; 与莫诺昔低、中剂量组比较, ^c*P* < 0.05。

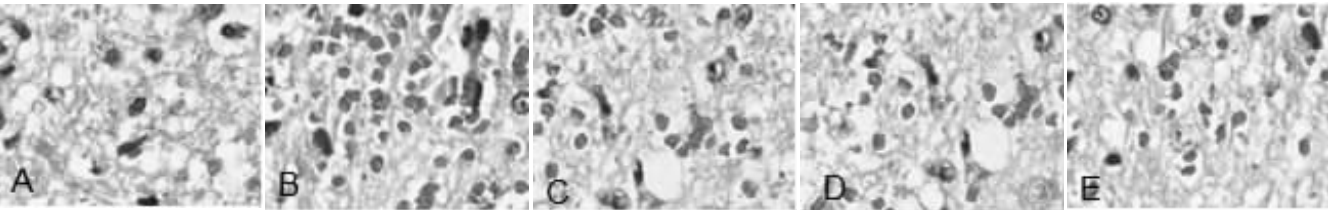


图 2 各组大鼠脑组织形态结构的变化(苏木精-伊红染色, ×400)
Figure 2 Morphological changes of the rat brain tissue (hematoxylin-eosin staining, ×400)
图注: 图中 A 为假手术组; B 为脑出血组; C-E 为莫诺昔低、中、高剂量组。

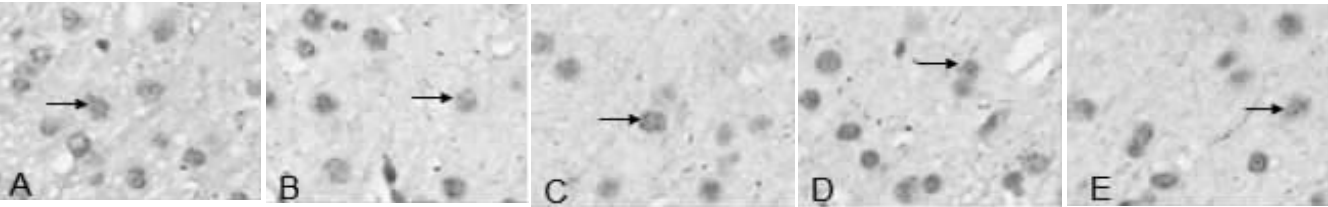


图 3 各组大鼠血肿周围 NF-κB p65 阳性细胞表达(免疫组化染色, ×400)
Figure 3 The cells positive for nuclear factor-κB p65 around hematoma in rats (immunohistochemical staining, ×400)
图注: 图中 A 为假手术组; B 为脑出血组; C-E 为莫诺昔低、中、高剂量组。箭头所示为 NF-κB 阳性细胞。

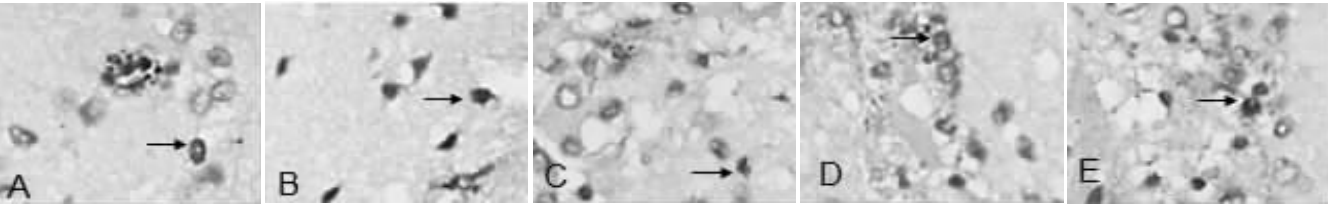


图 4 各组大鼠血肿周围 SUMO2/3 阳性细胞表达(免疫组化染色, ×400)
Figure 4 The cells positive for SUMO2/3 surrounding hematoma in rats (immunohistochemical staining, ×400)
图注: 图中 A 为假手术组; B 为脑出血组; C-E 为莫诺昔低、中、高剂量组。箭头所示为 SUMO2/3 阳性细胞。

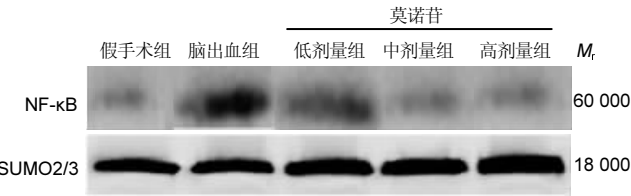


图 5 各组大鼠血肿周围 NF-κB、SUMO2/3 蛋白表达(Western blotting)
Figure 5 Expression of nuclear factor-κB and SUMO2/3 in the rat brain tissue surrounding hematoma detected by western blot assay

表2 免疫组化测定各组血肿周围脑组织通道蛋白 NF- κ B p65、SUMO2/3 的表达 ($\bar{x} \pm s$, A 值)

Table 2 Expression levels of nuclear factor- κ B and SUMO2/3 in the rat brain tissue surrounding hematoma detected by immunohistochemistry

组别	n	NF- κ B p65	SUMO2/3
假手术组	10	0.36 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01
脑出血组	10	0.83 $\pm$ 0.04 ^a	0.33 $\pm$ 0.05 ^a
莫诺昔低剂量	10	0.62 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.56 $\pm$ 0.04 ^{ab}
莫诺昔中剂量	10	0.53 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.67 $\pm$ 0.06 ^{ab}
莫诺昔高剂量	10	0.41 $\pm$ 0.03 ^{abc}	0.91 $\pm$ 0.05 ^{abc}

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与脑出血组比较,^b $P < 0.05$;与莫诺昔低、中剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

胞核、胞浆染色均匀;脑出血组血肿区组织结构消失呈空泡样变性,神经细胞和细胞间隙水肿明显,可见大量炎症细胞及少量胶质细胞增生;莫诺昔组可见血肿周边细胞肿胀较脑出血组有所减轻,以高剂量组减轻最明显,见图2。

2.4 ELISA检测各组大鼠血肿周围脑组织炎症因子水平与假手术比较,脑出血组和莫诺昔低、中、高剂量组白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 含量增高($P < 0.05$);与脑出血组比较,莫诺昔低、中、高剂量组白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 水平降低($P < 0.05$),以高剂量组降低最明显($P < 0.05$),见表1。

2.5 各组血肿周围脑组织通道蛋白NF- κ B、SUMO2/3的表达与假手术比较,脑出血组和莫诺昔低、中、高剂量组NF- κ B、SUMO2/3蛋白的表达增高($P < 0.05$);与脑出血组比较,莫诺昔低、中、高剂量组NF- κ B的表达降低,SUMO2/3蛋白的表达增高($P < 0.05$),以高剂量组最明显($P < 0.05$)。

免疫组化检测结果见表2,图3,4。

Western blot法检测结果见表3,图5。

3 讨论 Discussion

脑出血动物模型揭示了炎症在出血后引起神经元死亡和神经功能缺损中的作用,脑出血后的炎症反应包括4个不同的阶段:初始组织损伤和局部炎症因子的激活;炎症驱动的血脑屏障的破坏;循环血中炎症细胞和免疫细胞所致的二次继发性损伤;机体自身的组织修复反应,促进组织修复和神经功能恢复^[18-19]。NF- κ B是一种广泛存在于真核细胞内,能将信息从胞浆传至胞核引起相应基因表达的重要转录因子,在机体免疫和炎症反应、细胞凋亡等有关基因转录过程中具有重要的调控作用^[20-22]。脑出血诱导了NF- κ B的激活,活化的NF- κ B参与炎症反应、诱导细胞凋亡、介导自由基损伤等机制加重了脑出血后继发性脑损伤^[23-25]。莫诺昔是从中药山茱萸中分离提取的一种成分,据国内外研究表明它在大鼠缺血性脑损伤模型中,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、促进血管和神经再生、抗血小板聚

表3 Western 法测定各组血肿周围脑组织通道蛋白 NF- κ B、SUMO2/3 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression levels of nuclear factor- κ B and SUMO2/3 in the rat brain tissue surrounding hematoma detected by western blot assay

组别	n	NF- κ B	SUMO2/3
假手术组	10	0.15 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.03
脑出血组	10	0.56 $\pm$ 0.08 ^a	1.13 $\pm$ 0.04 ^a
莫诺昔低剂量	10	0.47 $\pm$ 0.07 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.03 ^{ab}
莫诺昔中剂量	10	0.39 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.22 $\pm$ 0.05 ^{ab}
莫诺昔高剂量	10	0.28 $\pm$ 0.05 ^{abc}	1.29 $\pm$ 0.02 ^{abc}

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与脑出血组比较,^b $P < 0.05$;与莫诺昔低、中剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

集和神经保护作用^[1-12]。国内外研究均未提出莫诺昔对脑出血是否也有类似的抗炎作用。

基于以上理论,本实验通过观察大鼠脑出血血肿周围脑组织炎症因子白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 和炎症相关蛋白NF- κ B、SUMO2/3的表达变化,结果显示:脑出血组血肿周围脑组织炎症因子白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 和炎症相关蛋白NF- κ B、SUMO2/3的表达均增多,神经功能缺损严重,说明脑出血后血肿周围有明显的炎症反应,神经功能受损。不同剂量的莫诺昔干预后,神经功能缺损有所恢复,炎症因子白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 的表达减少,炎症相关蛋白NF- κ B的表达减少,SUMO2/3的表达增多,以高剂量组作用最明显;说明莫诺昔干预脑出血大鼠可能通过炎症调节蛋白NF- κ B的减少和SUMO2/3蛋白的增多,从而下调炎症因子白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 的表达,最终达到神经功能的保护作用,其中以高剂量的莫诺昔组的作用最明显。

不足之处:本研究仅观察了莫诺昔对脑出血血肿周围的炎症相关因子和炎症蛋白的表达变化,具体的作用机制还没有研究。且实验只研究了莫诺昔对脑出血血肿周围炎症的影响,未进一步探讨莫诺昔抗氧化损伤、抗凋亡、对血管及神经再生等影响,这些都还需要进一步的研究。

综上所述,本研究首次将莫诺昔应用于干预脑出血大鼠,结果显示莫诺昔可以通过炎症调节蛋白的变化,下调炎症因子的表达,从而显著改善脑出血大鼠的神经功能,其中以高剂量组的改善最明显,有望为脑出血的治疗带来了新的治疗靶点。

作者贡献:实验设计为袁志俊,实验实施为袁志俊,实验评估为何晓英、袁平、郑晓梅,资料收集为袁志俊,李小刚审核,袁志俊、李小刚对文章负责。

经费支持:文章接受了“四川省卫生厅科研项目(110368)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章及内容不涉及相关利益冲突。文章中的干预手段应用了莫诺昔药物,应用了立体定位仪等医疗器械,应用了白细胞介素1抗体、肿瘤坏死因子 α 抗体、ELISA试剂盒及NF- κ B抗体、

SUMO2/3 抗体等试剂,但是所有作者声明没有接受相关的经费支持,不存在利益冲突。同时声明在稿件准备过程中所受的资助研究设计和实施,数据收集、分析和阐释、药物或仪器、软件等的使用,语言润色,写作等均不影响作者观点和对数据结果的报道。

伦理问题:本研究通过西南医科大学附属医院伦理委员会审查批准(审批号: 050198)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重:文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审:文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明:袁志俊、李小刚对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Li B, Zhu Y, Liu A, et al. Selective antegrade cerebral perfusion reduces brain injury following deep hypothermic circulatory arrest in the piglets' model by decreasing the levels of protein SUMO2/3-ylation. *J Clin Exp Med*. 2014; 7(11): 4562-4571.
- [2] Hochrainer K, Jackman K, Benakis C, et al. SUMO2/3 is associated with ubiquitinated protein aggregates in the mouse neocortex after middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35(1): 1-5.
- [3] Xie XY, Wang R, Shi YP. Chemical constituents from the fruits of *Cornus officinalis*. *Biochem Syst Ecol*. 2012; 45(7): 120-123.
- [4] Wang W, Xu JD, Li L, et al. Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull*. 2010; 83(5): 196-201.
- [5] 熊山, 李敬来, 王晓英, 等. 莫诺昔大鼠脑靶向分布研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 10(21): 87-90.
- [6] 侯虹丽, 孙芳玲, 艾厚喜, 等. 莫诺昔对脑缺血再灌注大鼠皮层梗死周边区基质金属蛋白酶表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(1): 5-8.
- [7] 艾厚喜, 孙芳玲, 侯虹丽, 等. 莫诺昔对大鼠脑缺血再灌注皮层Wnt信号通路转录因子表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(1): 1-4.
- [8] 张丽, 赵丽红, 张兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷促进成体大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中国新药杂志, 2015, 5(24): 550-553.
- [9] 王志敏, 孙芳玲, 刘婷婷, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层 CD34 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(1): 27-31.
- [10] 刘婷婷, 孙芳玲, 程华, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠血管生成素1及其受体Tie-2的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(1): 9-11.
- [11] 郭德玉, 孙芳玲, 魏仁平, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠血管内皮生长因子和成纤维生长因子-2 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(11): 1241-1244.
- [12] 汪莹, 高东明, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Caspase-3 活化程度的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(9): 801-802.
- [13] 袁廷伟, 孙芳玲, 王晓峰, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠凝血四项的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(2): 104-106.
- [14] 王娜, 李林. 山茱萸环烯醚萜苷对创伤性脑损伤模型大鼠脑内炎症反应的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(3): 255-259.
- [15] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001; 32(4): 1005-1011.
- [16] Long EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20(1): 84-91.
- [17] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rat statistical validation. *Stroke*. 1995; 26(4): 627-635.
- [18] Askenase MH, Sansing LH. Stages of the Inflammatory Response in Pathology and Tissue Repair after Intracerebral Hemorrhage. *Semin Neurol*. 2016; 36(3): 288-297.
- [19] Xie WJ, Yu HQ, Zhang Y, et al. CD163 promotes hematoma absorption and improves neurological functions in patients with intracerebral hemorrhage. *Neural Regen Res*. 2016; 11(7): 1122-1127.
- [20] Zhao XR, Gonzales N, Aronowski J. Pleiotropic role of PPARγ in Intracerebral Hemorrhage: An Intricate System involving Nrf2, RXR and NF-κB. *CNS Neurosci*. 2015; 21(4): 357-366.
- [21] Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-κB by TNF Family Cytokines. *Semin Immunol*. 2014; 26(3): 253-266.
- [22] Bortolotto V, Grilli M. Not only a bad guy: potential proneurogenic role of the RAGE/NF-κB axis in Alzheimer's disease brain. *Neural Regen Res*. 2016; 11(12): 1924-1925.
- [23] Banoth B, Chatterjee B, Vijayaragavan B, et al. Stimulus-selective crosstalk via the NF-κB signaling system reinforces innate immune response to alleviate gut infection. *Elife*. 2015; 4(5): 56-58.
- [24] Zhang Y, Moreno-Villanueva M, Krieger S, et al. Transcriptomics, NF-κB Pathway, and Their Potential Spaceflight-Related Health Consequences. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(6): pii: E1166.
- [25] Zhang ZL, Liu YG, Huang QB, et al. Nuclear factor-κB activation in perihematomal brain tissue correlates with outcome in patients with intracerebral hemorrhage. *Neuroinflammation*. 2015; 12: 53.