

• 论著 •

甘草酸二铵通过 Wnt/ β -连接蛋白信号通路促进重型颅脑损伤大鼠中枢神经再生修复刘鑫杰¹ 潘宇政¹ 黄宗轩¹ 彭玲玲¹ 韦春珠¹ 韦进新²¹ 广西医科大学第一附属医院中医科, 南宁 530021; ² 广西国际壮医院中西医结合内科, 南宁 530201

通信作者: 潘宇政, Email: pyz79298@sina.com

【摘要】 目的 从 Wnt/ β -连接蛋白信号通路探讨甘草酸二铵(DG)对重型颅脑损伤(STBI)大鼠中枢神经再生修复的影响。**方法** 按随机数字表法将 72 只雄性 SD 大鼠均分为正常组、STBI 模型组、神经节苷脂(GA)治疗组和 DG 治疗组。采用改良的 Feeney 自由落体方法建立 STBI 大鼠模型; 正常组不致伤。制模后 6 h, GA 治疗组和 DG 治疗组分别经尾静脉注射单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液或 DG 注射液各 0.78 mL, 每日注射 1 次, 连续注射 7 d; 正常组和 STBI 模型组则给予等量生理盐水。各组分别于给药后 1、3、7 d 取 6 只大鼠进行神经功能缺损评分(NSS); 然后取腹主动脉血和脑组织, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)含量; 取海马齿状回颗粒下区(SGZ)组织, 行苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察病理学改变; 用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)及 Axin 的 mRNA 表达。**结果** ① 正常组大鼠无神经功能缺损表现, NSS 评分为 0 分。STBI 制模后 1 d 大鼠 NSS 评分即明显升高, 之后随时间延长逐渐下降。加用 GA 或 DG 治疗后 1 d 大鼠 NSS 评分即显著低于模型大鼠(分: 7.33 ± 2.07 、 6.17 ± 2.23 比 9.33 ± 1.63 , 均 $P < 0.01$), 且随时间延长呈逐渐下降趋势, 至 7 d 时差异仍有统计学意义(分: 2.67 ± 0.82 、 1.00 ± 0.00 比 6.17 ± 2.23 , 均 $P < 0.01$), 而且 DG 治疗组的 NSS 评分较 GA 治疗组降低更为显著。② 正常组大鼠海马 SGZ 细胞层次、结构清晰, 排列较为紧密整齐。STBI 模型组大鼠 SGZ 神经细胞和组织于各个时间点均有不同程度的损伤与破坏。加用 GA 或 DG 治疗后大鼠神经组织损伤得以改善, 并随时间延长逐渐好转, 而 DG 的作用更为明显。③ 正常组海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 几乎不表达, GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达较高, 血清中 BDNF 和 NGF 含量很少。STBI 制模后 1 d, 大鼠海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达量及血清 BDNF、NGF 含量均明显升高, GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达量明显下降。加用 GA 或 DG 后 1 d 海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达量及血清 BDNF、NGF 含量均较模型组明显升高, GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达量显著降低, 且 DG 的作用较 GA 更为显著[Wnt3a mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.51 ± 0.14 比 2.93 ± 0.05 , β -连接蛋白 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.90 ± 0.08 比 1.75 ± 0.04 , BDNF(ng/L): 4.06 ± 0.55 比 3.16 ± 0.64 , NGF(ng/L): 9.53 ± 1.08 比 7.26 ± 0.43 , GSK-3 β mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.75 ± 0.01 比 0.79 ± 0.01 , Axin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.74 ± 0.02 比 0.76 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$], 并随时间延长呈逐渐升高或下降趋势, 至 7 d 时差异仍有统计学意义。**结论** DG 能够促进 STBI 大鼠中枢神经再生修复, 其机制可能与 Wnt/ β -连接蛋白信号通路介导的神经细胞增殖分化及海马 SGZ 神经组织重建有关。

【关键词】 甘草酸二铵; 颅脑损伤, 重型; 神经再生修复; Wnt/ β -连接蛋白信号通路**基金项目:** 国家中医药管理局“十一五”重点专科建设项目(2008-3); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZLC14-29)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.12.004

Diammonium glycyrrhizinate promotes the regeneration and repair of central nervous system in rats with severe traumatic brain injury by Wnt/ β -catenin signaling pathwayLiu Xinjie¹, Pan Yuzheng¹, Huang Zongxuan¹, Peng Lingling¹, Wei Chunzhu¹, Wei Jinxin²¹Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530201, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Corresponding author: Pan Yuzheng, Email: pyz79298@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of diammonium glycyrrhizinate (DG) on nerve regeneration repair in rats with severe traumatic brain injury (STBI) from the perspective of Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Seventy-two Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into normal group, STBI model group, ganglioside (GA) treatment group and DG treatment group. The STBI animal model was reproduced referring to modified Feeney free fall impact model. No injury was made in normal group. Six hours after modeling, monosialotetrahexosylganglioside sodium injection and DG injection were injected via tail vein of rats in GA treatment group and DG treatment group respectively, once a day for 7 days. Normal group and STBI model group were given the

same amount of normal saline. Six rats in each group were sacrificed on the 1st, 3rd and 7th day after the challenge for neurological severity score (NSS), and then the blood of abdominal aorta was drawn and brain tissue was harvested. The contents of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of sub-granular zone (SGZ) were observed under light microscope after hematoxylin eosin (HE) staining. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expressions of Wnt3a, β -catenin, glycogen synthetase kinase-3 β (GSK-3 β) and Axin. **Results** ① There was no neurological deficit in the normal group and NSS was 0. NSS score of rats increased significantly on the first day after modeling, and then decreased gradually over time. NSS of the rats treated with GA and DG were significantly lower than that of the STBI model rats (score: 7.33 ± 2.07 , 6.17 ± 2.23 vs. 9.33 ± 1.63 , both $P < 0.01$). Though NSS gradually decreased over time, the differences were still statistically significant on the 7th day (score: 2.67 ± 0.82 , 1.00 ± 0.00 vs. 6.17 ± 2.23 , both $P < 0.01$), and NSS of DG treatment group was significantly lower than that of GA treatment group. ② In SGZ of rats, cells were arranged in a compact and orderly way in the normal group, but neurons and tissues were damaged and destroyed at different time points in the STBI model group. After either GA or DG treatment, the damage of nerve tissue was improved gradually over time, and the effect of DG was more obvious. ③ In the normal group, the mRNA expressions of Wnt3a and β -catenin were almost not expressed, the mRNA expressions of GSK-3 β and Axin were higher, and the contents of BDNF and NGF in serum were less. On the 1st day after STBI, the mRNA expressions of Wnt3a and β -catenin in hippocampus, the contents of BDNF and NGF in serum were significantly increased, and the mRNA expressions of GSK-3 β and Axin were significantly decreased. The mRNA expressions of Wnt3a and β -catenin in the hippocampus and the contents of BDNF and NGF in serum were significantly higher than those in the model group 1 day after GA or DG was added, the mRNA expressions of GSK-3 β and Axin were significantly decreased, and the effect of DG was more significant than that of GA [Wnt3a mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.51 ± 0.14 vs. 2.93 ± 0.05 , β -catenin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.90 ± 0.08 vs. 1.75 ± 0.04 , BDNF (ng/L): 4.06 ± 0.55 vs. 3.16 ± 0.64 , NGF (ng/L): 9.53 ± 1.08 vs. 7.26 ± 0.43 , GSK-3 β mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.75 ± 0.01 vs. 0.79 ± 0.01 , Axin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.74 ± 0.02 vs. 0.76 ± 0.02 , all $P < 0.05$]. It was gradually increasing or decreasing over time and the difference was still statistically significant up to the 7th day. **Conclusion** DG can promote the recovery of nerve function in rats with STBI, and its mechanism may be related to the regeneration of nerve cells proliferation and differentiation by Wnt/ β -catenin signaling pathway and the reconstruction of nerve tissue in SGZ of hippocampus.

【Key words】 Diammonium glycyrrhizinate; Severe traumatic brain injury; Nerve regeneration and repair; Wnt/ β -catenin signaling pathway

Fund program: Key Specialty Construction Project of the 11th Five Year Plan of the State Administration of Traditional Chinese Medicine of China (2008-3); Specialized Science and Technology of Traditional Chinese Medicine in the Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region of China (GZLC14-29)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.12.004

甘草酸二铵(DG)系中药甘草中提取和纯化的有效成分之一,是甘草酸单铵盐的更新换代产品,为中药甘草有效成分的第3代提取物。DG具有一定的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用,临床上主要用于肝炎转氨酶升高等疾病。目前已有不少DG脑保护作用的研究,但主要集中在脑缺血/再灌注损伤、脑梗死等方面,关于DG对重型颅脑损伤(STBI)后神经保护作用的研究较少,而观察其对STBI后中枢神经再生修复影响的动态研究更是鲜见报道。中医理论认为,甘草属于补益类中药,除具有补益脾气、清热解毒、祛痰止咳、调诸药等作用外,还具有缓急止痛的作用^[1]。STBI是急诊科常见的急危重症,符合中医对于“急”的认识。本课题组前期研究提示甘草及甘草酸通过减轻继发性炎症反应、抑制细胞凋亡等对STBI大鼠起到神经保护作用^[2]。基于以上认识,我们推测DG除对STBI大鼠具有抗炎、抗水肿作用外,可能对其中枢神经的再生修复也具有潜在药理作用。本研究从神经功能缺

损评分(NSS)、Wnt/ β -连接蛋白信号通路、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)和海马齿状回颗粒下区(SGZ)细胞组织形态等角度,旨在探讨DG对STBI大鼠神经再生修复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 72只SPF级雄性SD大鼠,体重250~300g,购自广西医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK(桂)2014-0002。大鼠在12h光/暗循环的室温下普通饲料喂养。

1.2 主要药物及试剂: DG注射液购自南京正大天晴药业集团股份有限公司;单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液购自山东齐鲁制药有限公司。RNA提取试剂盒、反转录试剂盒均购自大连Takara生物工程有限公司;Wnt3a、 β -连接蛋白、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、Axin和3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列由上海生工生物工程技术有限公司设计;大鼠BDNF和NGF酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司。

1.3 实验动物分组及处理:按照随机数字表法将 72 只大鼠分为正常组、STBI 模型组、神经节苷脂 (GA) 治疗组、DG 治疗组, 每组 18 只。采用改良的 Feeney 自由落体方法制备大鼠 STBI 模型; 正常组不致伤。制模后 6 h, GA 治疗组、DG 治疗组分别经尾静脉缓慢注射单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液 (用生理盐水稀释为 3.31 g/L 的溶液) 和 DG 注射液 (5 g/L) 各 0.78 mL, 该剂量根据临床使用剂量, 参照 Nair 和 Jacob^[3] 推导的动物与人给药剂量折算关系计算得出, 均每日注射 1 次, 连续注射 7 d; 正常组和 STBI 模型组则注射等量生理盐水。

1.4 STBI 动物模型制备^[4]:大鼠术前禁食 12 h, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 俯卧位固定于脑立体定位仪上, 剔除头部毛发并消毒, 沿头顶正中切开头皮, 剥离骨膜, 暴露矢状缝、冠状缝及左侧顶骨, 在确保硬脑膜完整的情况下, 用牙科专用迷你小电钻在距离矢状缝左侧 2.5 mm、冠状缝后 1.5 mm 处钻一直径为 5 mm 的骨窗, 用致伤力度为 50 g 砝码沿高度为 25 cm 的自制套管上滑落, 撞击在大鼠骨窗上厚度约 3.5 mm、直径 4 mm 的圆形钢板垫上, 造成左侧大脑重型损伤, 然后用骨蜡填闭骨窗, 逐层缝合头皮后, 消毒伤口。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 并经广西医科大学实验动物伦理委员会审批 (审批号: 201809031)。

1.5 检测指标及方法:各组于给药后 1、3、7 d 分别取 6 只大鼠, 如大鼠死亡则随即用替补动物补上。每组大鼠在进行 NSS 评分后用 10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉, 取腹主动脉血, 4 ℃ 离心 15 min, 置于 -80 ℃ 超低温冰箱冻存待测。腹主动脉采血结束后迅速断头取脑, 分离海马, 右侧海马快速液氮冷冻, -80 ℃ 超低温冰箱中冻存, 以备实时定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测; 左侧脑组织置于多聚甲醛中固定 24 h 备用。

1.5.1 NSS 评分:采取盲法, 参照文献^[5]方法进行 NSS 评分, 总分 10 分, 评分 >2 分表明 STBI 模型制备成功; <2 分则表明制模失败, 从本实验中剔除。

1.5.2 海马 SGZ 病理检测:取多聚甲醛固定的脑组织, 经梯度脱水、石蜡包埋后, 切成 3 μm 厚冠状切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色及脱水透明后, 用中性树胶封片, 光镜下观察海马 SGZ 病理学改变。

1.5.3 RT-qPCR 检测海马 Wnt3a、β-连接蛋白、Axin、GSK-3β 的 mRNA 表达:提取海马总 RNA 并

反转录得到 cDNA。加入 2 μg cDNA, 荧光扩增, 所有标本的溶解曲线均为特异性对照。用比较阈值法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 计算目的基因与内参基因 GAPDH 的相对表达量。

1.5.4 血清 BDNF、NGF 蛋白含量检测:按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测血清 BDNF、NGF 含量, 用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值, 用 Curve Exert 1.4 软件制作标准曲线, 计算样本实际浓度值。

1.6 统计学方法:使用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制统计图, 用 SPSS 23.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 NSS 评分 (表 1):正常组大鼠无神经功能缺损症状, NSS 评分为 0 分。STBI 模型组给药后各时间点 NSS 评分均明显高于正常组 (均 P < 0.01), 但随时间延长 NSS 评分逐渐降低。与 STBI 模型组比较, GA 治疗组 3 d、7 d 时 NSS 评分明显降低 (均 P < 0.05), 而 DG 治疗组 NSS 评分在各时间点均明显降低 (均 P < 0.01)。DG 治疗组在 3 d、7 d 时 NSS 评分均显著低于 GA 治疗组 (均 P < 0.01), 且 7 d 时与正常组 NSS 评分无差异。

表 1 各组大鼠给药后不同时间点神经功能缺损评分 (NSS) 变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	NSS 评分 (分)		
		1 d	3 d	7 d
正常组	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
STBI 模型组	6	9.33 ± 1.63 ^a	8.67 ± 2.07 ^a	6.17 ± 2.23 ^{af}
GA 治疗组	6	7.33 ± 2.07 ^a	6.17 ± 2.23 ^{ac}	2.67 ± 0.82 ^{abg}
DG 治疗组	6	6.17 ± 2.23 ^{ab}	3.50 ± 1.23 ^{abde}	1.00 ± 0.00 ^{abdf}

注: STBI 为重型颅脑损伤, GA 为神经节苷脂, DG 为甘草酸二铵; 与正常组比较, ^aP < 0.01; 与 STBI 模型组比较, ^bP < 0.01, ^cP < 0.05; 与 GA 治疗组比较, ^dP < 0.01; 与本组 1 d 比较, ^eP < 0.01; 与本组 3 d 比较, ^fP < 0.05, ^gP < 0.01

2.2 各组大鼠海马 SGZ 病理学改变 (图 1):正常组海马 SGZ 神经元呈层状有序分布, 细胞大小、形态正常, 细胞核圆且大。STBI 模型组给药后 1 d 可见海马区结构异常, 存在变性坏死的神经元, 部分神经细胞发生空泡样变, 散在存留正常神经细胞, 细胞排列结构杂乱, 形态异常, 细胞核发生偏移、碎裂和固缩, 核仁不可见; 给药后 3 d 神经细胞大量脱失, 残存的神经细胞发生固缩, 核仁不可见, 出现噬神经细胞现象; 7 d 时上述情况得以改善。GA 治疗组和

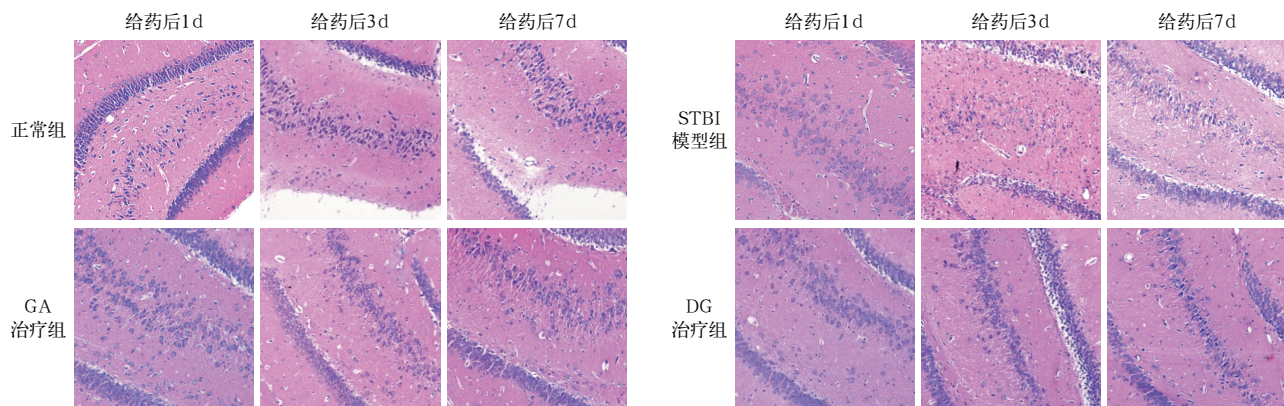


图1 光镜下观察各组大鼠给药后不同时间点海马齿状回颗粒下区(SGZ)组织病理学改变 正常组各时间点 SGZ 细胞大小、形态正常,细胞核圆且大,细胞层次清晰,排列较为紧密整齐。重型颅脑损伤(STBI)模型组给药后 1 d 海马区结构异常,部分神经细胞发生空泡样变,散在存留正常神经细胞,细胞排列结构紊乱,形态异常,细胞核发生偏移和固缩,核仁不可见;给药后 3 d 神经细胞大量脱落,存在变性坏死神经元的残存神经细胞发生固缩,核仁不可见,出现噬神经细胞现象;给药后 7 d 细胞排列较整齐,形态异常,可见散在正常神经细胞。神经节苷脂(GA)治疗组给药后 1 d 神经细胞排列结构紊乱,形态异常,细胞核发生偏移和固缩,核仁不可见;给药后 3 d 细胞排列紊乱,形态异常,部分细胞核发生偏移和固缩;给药后 7 d 细胞排列相对整齐,但较松散,细胞形态尚可,可见较多正常神经细胞。甘草酸二铵(DG)治疗组给药后 1 d 神经细胞排列结构紊乱,形态异常,细胞核发生偏移和固缩,核仁不可见;给药后 3 d 细胞排列相对整齐,部分细胞形态异常,细胞核发生偏移和固缩;给药后 7 d 神经细胞排列大致正常,大部分为正常神经细胞,散在形态异常的神经细胞 HE 染色中倍放大

表2 各组大鼠给药后不同时间点海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白、GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达及血清 BDNF、NGF 含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Wnt3a mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			β -连接蛋白 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正常组	6	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.15	1.10 ± 0.04	1.11 ± 0.23	1.32 ± 0.15	1.24 ± 0.04
STBI 模型组	6	1.55 ± 0.08 ^a	3.54 ± 0.24 ^{af}	5.60 ± 0.21 ^{ag}	1.26 ± 0.05 ^a	1.64 ± 0.13 ^{af}	2.37 ± 0.35 ^{ag}
GA 治疗组	6	2.93 ± 0.05 ^{ab}	4.46 ± 0.15 ^{abf}	6.55 ± 0.21 ^{abg}	1.75 ± 0.04 ^{ab}	2.11 ± 0.10 ^{abf}	3.07 ± 0.34 ^{abg}
DG 治疗组	6	3.51 ± 0.14 ^{abd}	5.41 ± 0.20 ^{abdf}	7.57 ± 0.14 ^{abdg}	1.90 ± 0.08 ^{abd}	2.58 ± 0.28 ^{abdf}	3.51 ± 0.20 ^{abdg}

组别	动物数 (只)	GSK-3 β mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			Axin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正常组	6	1.02 ± 0.02	1.13 ± 0.01	1.10 ± 0.04	1.05 ± 0.03	1.05 ± 0.03	1.04 ± 0.02
STBI 模型组	6	0.95 ± 0.01 ^a	0.79 ± 0.06 ^{af}	0.65 ± 0.05 ^{ag}	0.95 ± 0.02 ^a	0.95 ± 0.02 ^{af}	0.74 ± 0.04 ^{ag}
GA 治疗组	6	0.79 ± 0.01 ^{ab}	0.64 ± 0.04 ^{af}	6.55 ± 0.21 ^{abg}	0.76 ± 0.02 ^{ab}	0.54 ± 0.05 ^{abf}	3.07 ± 0.34 ^{abg}
DG 治疗组	6	0.75 ± 0.01 ^{abd}	0.49 ± 0.06 ^{abdf}	0.34 ± 0.03 ^{abdg}	0.74 ± 0.02 ^{abe}	0.31 ± 0.02 ^{abdf}	0.22 ± 0.03 ^{abdg}

组别	动物数 (只)	BDNF (ng/L)			NGF (ng/L)		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正常组	6	0.53 ± 0.19	0.80 ± 0.21	0.79 ± 0.15	2.97 ± 0.57	4.02 ± 0.31	3.97 ± 0.89
STBI 模型组	6	2.16 ± 0.61 ^a	4.29 ± 0.89 ^{af}	6.09 ± 0.34 ^{ag}	6.02 ± 0.48 ^a	7.93 ± 0.45 ^{af}	9.57 ± 0.60 ^{ag}
GA 治疗组	6	3.16 ± 0.64 ^{ac}	6.04 ± 1.03 ^{acf}	8.02 ± 0.56 ^{abg}	7.26 ± 0.43 ^{ac}	12.20 ± 1.11 ^{abf}	15.47 ± 0.79 ^{abg}
DG 治疗组	6	4.06 ± 0.55 ^{abe}	10.08 ± 1.14 ^{abdf}	12.92 ± 1.08 ^{abdg}	9.53 ± 1.08 ^{abd}	20.53 ± 1.46 ^{abdf}	26.09 ± 2.06 ^{abdg}

注: STBI 为重型颅脑损伤, GA 为神经节苷脂, DG 为甘草酸二铵, GSK-3 β 为糖原合成酶激酶-3 β , BDNF 为脑源性神经营养因子, NGF 为神经生长因子;与正常组比较,^a $P < 0.01$;与 STBI 模型组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$;与 GA 治疗组比较,^d $P < 0.01$,^e $P < 0.05$;与本组 1 d 比较,^f $P < 0.01$;与本组 3 d 比较,^g $P < 0.01$

DG 治疗组各时间点神经组织受损情况相对较轻,以 DG 治疗组最为明显;DG 治疗组 7 d 时神经细胞排列大致正常,细胞层数略少,形态尚可。

2.3 各组大鼠海马 Wnt3a、 β -连接蛋白、GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达(表 2):正常组各时间点 Wnt3a、 β -连接蛋白、GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达均无明显变化。与正常组比较,STBI 模型组、GA 治疗组和 DG 治疗组各时间点海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达均明显上调,GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达均明显下调(均 $P < 0.01$)。STBI 模型组、GA

治疗组和 DG 治疗组海马组织 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达水平随着时间的延长而逐渐升高,而 GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达水平随时间延长逐渐下降(均 $P < 0.01$)。与 STBI 模型组比较,GA 治疗组和 DG 治疗组各时间点 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达显著升高,GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达显著下降(均 $P < 0.01$)。与 GA 治疗组比较,DG 治疗组各时间点 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达进一步升高,GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达进一步下降(均 $P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠血清 BDNF、NGF 含量(表 2):STBI 模型组、GA 治疗组和 DG 治疗组各时间点血清 BDNF、NGF 含量明显高于正常组(均 $P < 0.01$),且随时间延长逐渐升高。与 STBI 模型组比较,GA 治疗组和 DG 治疗组各时间点 BDNF、NGF 含量明显升高(均 $P < 0.05$);且 DG 治疗组各时间点 BDNF、NGF 含量较 GA 治疗组进一步升高(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

STBI 会导致中枢神经系统(CNS)的严重损伤与破坏^[6]。神经元本身修复能力弱,且恶劣的微环境导致 CNS 损伤后难以再生修复^[7]。促进神经再生修复已成为 STBI 研究的重点和难点。研究显示,中医药对 STBI 后神经组织的再生修复可能存在潜在的药理作用^[8]。DG 为甘草中含量最高的三萜皂苷类成分甘草酸的铵盐^[9]。Okuma 等^[10]研究发现,与 DG 相似化学结构的甘草甜素(GL)可以通过下调受损大鼠脑中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)/HMGB1 受体/核转录因子- κ B(NF- κ B)介导的炎症反应,减轻继发性脑损伤,从而对液体冲击诱导的脑损伤有神经保护作用。DG 与 GL 具有相似的药理作用,但与 GL 相比,DG 性质稳定、易水溶性,作用更强,不良反应较少,更适合于实验和临床应用^[11]。韩乐等^[12]研究发现,DG 可能通过激活 Wnt/ β -连接蛋白信号通路实现毛囊生长期的延长及毛发生长。据此我们推测,DG 可能在 STBI 大鼠神经再生修复的过程中发挥重要作用。

NSS 评分越高,神经缺损程度越重^[13]。海马 SGZ 是神经再生的特定区域之一^[14],该区域的神经干细胞(NSC)在一定条件下会表现出增殖、迁移和多方向分化的能力。Wnt/ β -连接蛋白信号通路是 CNS 中 NSC 细胞增殖分化的关键调控环节,与脑损伤后的修复有关^[15]。正常情况下 Wnt/ β -连接蛋白通路几乎不表达,在损伤刺激下被激活。Wnt3a 是 Wnt/ β -连接蛋白信号通路的起始蛋白,其表达增加可激活 Wnt 信号通路。 β -连接蛋白作为 Wnt/ β -连接蛋白信号通路最为关键的信号转导因子,在正常细胞质中以磷酸化的降解复合物形式存在,含量较低^[16]。GSK-3 β 具有促进 β -连接蛋白磷酸化的作用。Axin 在 Wnt/ β -连接蛋白信号通路中扮演着重要的角色,能将 GSK-3 β 、 β -连接蛋白等结合在一起,使 β -连接蛋白形成复合降解物,共同调节细胞 mRNA 的转录^[17]。Wnt/ β -连接蛋白信号通路被激活时,上游分子 Wnt3a 含量增加,同时

降低 GSK-3 β 和 Axin 的含量,抑制 β -连接蛋白的磷酸化,使 β -连接蛋白在细胞质中聚集并被运转至细胞核中,促进核内靶基因的转录^[18]。BDNF 和 NGF 是神经再生修复过程中起促进作用的两个重要活性物质,这些神经因子与 Wnt/ β -连接蛋白信号通路的表达有关。故 BDNF 和 NGF 可作为判断 STBI 患者脑损伤修复程度的指标。

本研究显示,正常大鼠无神经功能缺损症状,NSS 评分为 0 分;STBI 大鼠 NSS 评分较正常大鼠明显升高,符合 STBI 征象。陈亦华等^[19]动态观察发现,STBI 大鼠伤后神经缺损程度较为严重,随时间延长逐渐改善,与本实验中 STBI 大鼠 NSS 评分在伤后明显升高且随时间推移逐渐降低相一致。提示 STBI 大鼠伤后具有一定的自我修复能力。GA 是目前治疗颅脑损伤患者脑功能障碍的常用药物。本研究显示,给予 GA 干预后 STBI 大鼠 NSS 评分明显降低;而与 GA 相比,给予 DG 干预后 STBI 大鼠 NSS 评分降低更为显著。提示从症状学角度 DG 对 STBI 大鼠具有促进神经再生修复的作用。

HE 染色显示,正常大鼠海马 SGZ 组织结构完整、神经元形态正常,未见神经元损伤;而 STBI 大鼠在给药后 1 d 即显示脑组织结构、神经细胞有较严重的损伤,3 d 时损伤最为严重,7 d 得以改善。说明 STBI 后机体有一定的自我修复能力。给予 GA 或 DG 干预后,STBI 大鼠各时间点神经元变性坏死、神经细胞空泡样变等病理改变明显减轻,且随时间的推移逐渐改善,7 d 时可见细胞排列基本有序,部分神经细胞形态趋于正常。且与 GA 相比,DG 的干预效果更为显著。表明从细胞层面 DG 具有促进 STBI 大鼠神经再生修复的作用。

本实验显示,STBI 大鼠给药后各时间点 Wnt3a 和 β -连接蛋白的 mRNA 表达显著高于正常大鼠,GSK-3 β 和 Axin 的 mRNA 表达显著低于正常大鼠。张利美等^[20]证实,正常大鼠 Wnt 信号通路处于抑制状态,脑损伤后会激活 Wnt/ β -连接蛋白信号通路,促进神经再生,与本实验结果基本一致。应用 GA 或 DG 干预后 1 d 即能显著促进 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达,抑制 GSK-3 β 和 Axin 的 mRNA 表达。且与 GA 相比,给予 DG 干预后各时间点 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA 表达更高,GSK-3 β 和 Axin 的 mRNA 表达更低。提示 DG 具有促进 STBI 大鼠神经再生修复的作用。这一作用是通过促进 Wnt/ β -连接蛋白信号通路中 Wnt3a、 β -连接蛋白的 mRNA

表达和抑制 GSK-3 β 、Axin 的 mRNA 表达两条途径实现的。海马组织中 Wnt 信号通路上这些指标的变化从分子水平阐述了 DG 对 STBI 大鼠具有促进神经再生修复的作用。

本实验显示,正常大鼠血清中 BDNF 和 NGF 含量很少;STBI 大鼠血清 BDNF 和 NGF 含量明显升高,且随时间的推移逐渐升高,7 d 达到高峰,提示损伤刺激可促进大鼠海马神经因子的表达。药物干预后,STBI 大鼠血清 BDNF 和 NGF 含量呈现时间和药物依赖性;与 GA 相比,给予 DG 干预后各时间点 BDNF 和 NGF 含量均显著升高。另外,BDNF 和 NGF 的变化趋势与 Wnt/ β -连接蛋白信号通路上各指标的表达式一致,说明 Wnt/ β -连接蛋白信号通路的激活可以促进 BDNF 和 NGF 的表达。

综上所述,本研究从神经功能表现、组织细胞病理学改变、Wnt 信号通路及神经营养因子分子水平等不同角度,提示 DG 对 STBI 大鼠神经再生修复具有促进作用,这种作用似乎比目前临床上已经使用的 GA 更加明显。我们推测:一方面,DG 可能通过减轻脑损伤后继发的炎症反应和脑水肿等为神经再生修复提供了一个有利的内环境,从而间接促进 STBI 后神经的再生修复;另一方面,可能是通过抑制细胞凋亡、激活神经再生通路等途径对 STBI 大鼠神经再生修复起到促进作用。但二者是否存在潜在的内在联系尚不清楚,有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 86-87.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia (one part) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 86-87.
- [2] 张慧, 潘宇政, 王学敏, 等. 甘草对重型颅脑损伤大鼠血清炎症细胞因子及 BCL-2、BAX、NGF 表达的影响[J]. 山西中医, 2017, 33 (12): 51-54. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7156.2017.12.027.
Zhang H, Pan YZ, Wang XM, et al. Effect of radix glycyrrhizae on serum inflammatory cytokines and expressions of BCL-2, BAX and NGF in rats with severe craniocerebral injury [J]. Shanxi J Tradit Chin Med, 2017, 33 (12): 51-54. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7156.2017.12.027.
- [3] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7 (2): 27-31. DOI: 10.4103/0976-0105.177703.
- [4] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. Brain Res, 1981, 211 (1): 67-77. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90067-6.
- [5] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1241.
Zhang JT. Modern pharmacological experimental methods [M]. Beijing: Beijing Medical University/China Union Medical University Press, 1998: 1241.
- [6] 谭翱. 重型颅脑损伤的治疗进展[J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18 (5): 317-319. DOI: 10.3760/j.issn.1003-0603.2006.05.025.
Tan A. Advances in treatment of severe craniocerebral injury [J]. Chin Crit Care Med, 2006, 18 (5): 317-319. DOI: 10.3760/j.issn.1003-0603.2006.05.025.
- [7] 张辉, 张海飞, 李艳花, 等. ROCK 抑制剂在中枢神经再生和修复中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29 (11): 1227-1229, 封 4. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2013.11.024.
Zhang H, Zhang HF, Li YH, et al. Role of rock inhibitors in central nervous system regeneration and repair [J]. Chin J Immunol, 2013, 29 (11): 1227-1229, back cover. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2013.11.024.
- [8] 姜红振. 云南白药对重型颅脑损伤患者治疗作用的研究[D]. 北京: 军医进修学院, 2012.
Jiang HZ. The therapeutic effects of Yunnan Baiyao on moderate or severe traumatic brain injury in patients [D]. Beijing: Military Medical Training College, 2012.
- [9] 田武生. 甘草的化学成分和临床研究概况[J]. 中医临床研究, 2012, 4 (16): 31-32. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2012.16.013.
Tian WS. Clinical research on chemical composition of licorice [J]. Clin J Chin Med, 2012, 4 (16): 31-32. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2012.16.013.
- [10] Okuma Y, Liu K, Wake H, et al. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction [J]. Neuropharmacology, 2014, 85: 18-26. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.007.
- [11] Zhao H, Wang SL, Qian L, et al. Diammonium glycyrrhizinate attenuates $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced neuroinflammation and regulates MAPK and NF- κB pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19 (2): 117-124. DOI: 10.1111/ens.12043.
- [12] 韩乐, 刘本, 陈贤燕, 等. 甘草酸二铵对人毛囊生长作用及对 Wnt/ β 连环蛋白信号通路的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51 (2): 138-142. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2018.02.012.
Han L, Liu B, Chen XY, et al. *In vitro* effect of diammonium glycyrrhizinate on the growth of human hair follicles and Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chin J Dermatol, 2018, 51 (2): 138-142. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2018.02.012.
- [13] Yang C, Zhou L, Gao X, et al. Neuroprotective effects of bone marrow stem cells overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor on rats with intracerebral hemorrhage and neurons exposed to hypoxia/reoxygenation [J]. Neurosurgery, 2011, 68 (3): 691-704. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3182098a8a.
- [14] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [J]. Annu Rev Neurosci, 2005, 28: 223-250. DOI: 10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459.
- [15] Cho C, Smallwood PM, Nathans J. Reck and Gpr124 are essential receptor cofactors for Wnt7a/Wnt7b-specific signaling in mammalian CNS angiogenesis and blood-brain barrier regulation [J]. Neuron, 2017, 95 (5): 1056-1073. e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.031.
- [16] Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin [J]. EMBO J, 2012, 31 (12): 2714-2736. DOI: 10.1038/emboj.2012.150.
- [17] Che X, Qian Y, Li D. Suppression of disheveled-axin domain containing 1 (DIXDC1) by microRNA-186 inhibits the proliferation and invasion of retinoblastoma cells [J]. J Mol Neurosci, 2018, 64 (2): 252-261. DOI: 10.1007/s12031-017-1017-9.
- [18] Bao XL, Song H, Chen Z, et al. Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells [J]. Mol Vis, 2012, 18: 1983-1990.
- [19] 陈亦华, 程振宇, 邵林华, 等. 醒脑静注射液对颅脑损伤大鼠神经功能的影响及机制研究[J/CD]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2018, 11 (1): 29-34. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2018.01.005.
Chen YH, Cheng ZY, Shao LH, et al. Protective effect of Xingnaojing injection on neurological functions of rats with craniocerebral injury and its related mechanisms [J/CD]. Chin J Crit Care Med (Electronic Edition), 2018, 11 (1): 29-34. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2018.01.005.
- [20] 张利美, 周小青, 刘旺华, 等. 丹龙醒脑方促进脑缺血再灌注损伤大鼠神经干细胞增殖与 β -catenin、Wnt-3a 表达及其机制的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35 (1): 7-10. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2015.01.002.007.04.
Zhang LM, Zhou XQ, Liu WH, et al. Study of Danlongxingnao recipe on proliferation of neural stem cells and expressions of β -catenin, Wnt-3a in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats and its mechanism [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2015, 35 (1): 7-10. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2015.01.002.007.04.

(收稿日期: 2019-08-26)