

栝楼桂枝汤对脑缺血/再灌注大鼠脑组织葡萄糖代谢的作用及机制研究

韩 静, 张继州, 邹 俊, 蒋 畅

福建省中医药科学院, 福建 福州

收稿日期: 2021年12月13日; 录用日期: 2022年1月14日; 发布日期: 2022年1月25日

摘 要

目的: 动态观察栝楼桂枝汤对脑缺血再灌注损伤后脑组织葡萄糖代谢的作用及葡萄糖转运体相关的机制。方法: SD大鼠随机分为假手术组、模型组和栝楼桂枝汤组, 采用线栓法制作大鼠中动脉闭塞再灌注模型, 栝楼桂枝汤组于造模后连续14日灌胃栝楼桂枝汤予以干预, 每日1次。分别于造模后3天、7天和14天, 采用Micro-PET活体影像检测方法, 观察大鼠脑组织造影剂¹⁸F-FDG摄取情况变化。采用免疫组织化学方法检测脑缺血周边区葡萄糖转运体Glut-1的表达。结果: 随着用药时间增加, 栝楼桂枝汤可显著降低缺血损伤大鼠葡萄糖低摄取区域($p < 0.05$)。免疫组织化学结果显示栝楼桂枝汤组Glut-1阳性染色较模型组显著提高($p < 0.05$)。结论: 栝楼桂枝汤可促进脑缺血损伤大鼠脑组织的葡萄糖摄取, 该作用可能与其提高脑组织葡萄糖转运相关。

关键词

栝楼桂枝汤, 脑缺血, Micro-PET, 葡萄糖转运体-1

Effects of Gualou Guizhi Decoction on Glucose Metabolism in Rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion and Its Mechanisms

Jing Han, Jizhou Zhang, Jun Zou, Chang Jiang

Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou Fujian

Received: Dec. 13th, 2021; accepted: Jan. 14th, 2022; published: Jan. 25th, 2022

文章引用: 韩静, 张继州, 邹俊, 蒋畅. 栝楼桂枝汤对脑缺血/再灌注大鼠脑组织葡萄糖代谢的作用及机制研究[J]. 中医学, 2022, 11(1): 89-95. DOI: 10.12677/tcm.2022.111016

Abstract

The purpose of this article is to observe the effects of Gualou Guizhi Decoction on the glucose metabolism of brain tissue after cerebral ischemia-reperfusion injury and the underlying mechanism related to glucose transporter. SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and Gualou Guizhi Decoction group. The middle cerebral artery occlusion and reperfusion surgery were performed by plugging a thread into the artery. Following the surgery, the rats in the Gualou Guizhi Decoction group were given the compound once daily for 14 consecutive days. While rats in the sham group and model group were administrated vehicle. At 3, 7 and 14 days after modeling, *in vivo* Micro-PET imaging was performed to observe the uptake of ^{18}F -FDG in the brain tissue of rats. Then immunohistochemical method was used to detect the expression of glucose transporter (Glut-1) in the peripheral area of ischemia. Results showed that, with the increase of medication time, Gualou Guizhi Decoction significantly reduced the volume of low uptake area of glucose in rats with ischemic injury ($p < 0.05$). Immunohistochemistry staining showed that the Glut-1 positive staining in the Gualou Guizhi Decoction group was significantly higher than that in the model group ($p < 0.05$). The results indicate that Gualou Guizhi Decoction promotes brain glucose uptake in rats with cerebral ischemia injury. This effect may be related to the compound's ability to improve the Glut-1 of brain tissue.

Keywords

Gualou Guizhi Decoction, Cerebral Ischemia, Micro-PET, Glut-1

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脑卒中是多种原因导致脑血管受损的疾病，其中以缺血性脑卒中为主，发病率逐年增高，由于其具有较高的致残率和复发率，给社会和家庭带来沉重的负担[1]。脑卒中后肢体痉挛是脑卒中常见的并发症，严重影响脑卒中患者偏瘫肢体的活动能力，影响功能恢复。目前脑卒中后痉挛性瘫痪的治疗主要有药物、针灸、推拿、手术、康复治疗等[2]。中医药疗法在脑卒中后肢体痉挛的治疗中具有独特的优势，得到了广泛的应用。

栝楼桂枝汤是张仲景《金匱要略》中用于治疗外感热病引起的痉挛及内伤杂病中出现的抽搐、发痉、手足孺动等症的经典方：“太阳病，其证备，身体强，几几然，脉反沉迟，此为痉，栝楼桂枝汤主之”，方药由栝楼根，桂枝，白芍，甘草，生姜，大枣组成，具有调和阴阳气血，柔润筋脉，养营生津的功效[3]。目前已被批准为福建中医药大学附属第二人民医院院内制剂，用于治疗脑卒中后肢体痉挛。课题组前期研究发现该方可显著改善脑缺血大鼠肢体功能，促进缺血脑组织神经再生及突触生长[4]。本文采用 Micro-PET 活体成像方法，检测栝楼桂枝汤对脑缺血后脑组织葡萄糖代谢的作用及其与葡萄糖转运体-1 (glucose transporter 1, Glut-1) 相关的可能机制。

2. 材料与方法

2.1. 动物

SD 大鼠，雄性，280~300 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(许可证号 SCXK (沪) 2019-0002)，

光暗周期 12/12 h (光照时间 8:00~20:00) 下饲养, 自由饮食。

2.2. 药品及试剂

天花粉、桂枝、芍药、甘草、生姜、大枣颗粒剂购自北京康仁堂药业有限公司。兔抗 Glut-1 抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司(GB11215)。MaxVision 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂为福州迈新生物技术公司产品, 免疫染色稀释液为碧云天生物技术公司产品。MCAO 线栓购自广州佳灵生物技术公司。其余试剂为国产分析纯。

2.3. 方法

2.3.1. 大鼠大脑中动脉栓塞/再灌注模型

按照课题组前期研究方法制作大脑中动脉闭塞/再灌注模型, SD 大鼠在异氟烷麻醉下进行手术。大鼠取仰卧位, 行颈部正中切口, 分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。凝断 ECA 的分支动脉, 结扎远心端。暂时夹闭 CCA 和 ICA, 在 ECA 距离 CCA 分叉 3mm 处剪一个小口, 将 MCAO 线栓经 ECA 插入 ICA, 当进线遇轻微阻力时停止, 此时线栓头部距 CCA 分叉处约 18 mm, 栓线头部进入颅内的大脑中动脉(MCA)开口处, 制成 MCAO 模型。线栓缺血 2 小时后, 再次以异氟烷麻醉动物, 拔出线栓。假手术组除不在颈内动脉插入线栓外, 其余步骤相同。

模型制作后按 Longa 神经功能缺失 5 分制评分标准进行神经功能评分, 评 1~3 分者为模型成功纳入标准。评分标准: 0 分: 无明显神经缺损症状, 活动正常; 1 分: 提尾悬空时不能完全伸展左侧前爪; 2 分: 行走时身体向偏瘫的左侧转圈, 即追尾征; 3 分: 行走时向偏瘫的左侧倾倒; 4 分: 不能自发行走或清醒障碍。

2.3.2. 动物分组及给药

大鼠随机分为假手术组、模型组和栝楼桂枝汤组, 按前述方法造模, 除假手术组动物外, 所有进行过 MCAO 手术的动物依据其造模后的神经功能评分随机分为模型组和栝楼桂枝汤给药组, 给药组动物每日一次给予灌胃栝楼桂枝汤, 模型组和假手术组给予等体积生理盐水, 连续给药 14 天。

栝楼桂枝汤由天花粉 30 g, 桂枝 9 g, 白芍 9 g, 甘草 6 g, 生姜 9 g, 大枣 9 g 组成, 采用各药的标准颗粒剂在 100℃沸水浴中冲泡混合作用 30 分钟而成。每 1 剂标准颗粒剂溶解于 120 mL 沸水中, 大鼠的给药剂量为每 kg 体重 10 mL, 该剂量相当于生药量 6 g/kg, 为成人临床剂量的 5 倍。

2.3.3. Micro-PET 活体影像检测方法

SD 大鼠放在麻醉盒中, 在 3 L/min 的氧气流速下利用 3% 异氟烷进行预麻醉, 然后尾静脉注射 0.2 mL (37 Mbq) ^{18}F -FDG 标记探针, 吸收 40 min 之后, 放入 Siemens Inveon Micro PET/CT 设备扫描床进行扫描显影, PET/CT 设备分辨率为 1.5 mm, 单个床位孔径 5.7 cm, 轴向 8.5 cm 视野(Field of view, FOV)。大鼠俯卧位固定于扫描床位 FOV 的中心位置, 并处于 2 L/min 的 1.5% 异氟烷持续麻醉中。CT (视野: 8.5 cm × 5.7 cm) 扫描 5 min 后再进行 10 min 的 PET 数据采集, CT 数据用于衰减校正和图像的解剖学描绘。

应用 Inveon Research Workplace 软件进行图像分析。基于 PET/CT 融合图像, 在 CT 图像的指导下手动画出感兴趣区域(regions of interest, ROI), 对脑部的示踪剂吸收值进行定量, 并计算出平均标准摄取值(standard uptake value, SUV), 缺血后造影剂摄取量降低, 通过阈值设置软件自动勾画吸收值低的区域从而统计出低摄取区域体积大小。

2.3.4. 免疫组织化学染色及图像分析

各组取 5 只大鼠, 缺血再灌注 7 天后, 以 10% 水合氯醛(3 mL/kg, i.p.) 麻醉大鼠, 经心脏灌注生理盐

水快速冲洗全身血液,然后缓慢灌入含4%多聚甲醛的0.1 M 磷酸钠缓冲液(PB)至大鼠身体僵硬。然后剥离鼠脑,依次置于含20%蔗糖的多聚甲醛固定液和含30%蔗糖的0.1 M 磷酸钠缓冲液至标本沉底。在冰冻切片机上制备30 μm 厚冰冻冠状切片,参照大鼠脑立体定位图谱,选取冠状面位于前凶前1.7~1.0 mm (纹状体)的冠状脑切片,收集于含30%蔗糖、30%乙二醇的0.05 M 磷酸钠缓冲盐溶液(PBS),置 -20°C 保存至测定。免疫组织化学采用即用型快捷免疫组化 MaxVisionTM 检测试剂盒进行,切片经0.01 M PBS液充分漂洗3次,在含3% H_2O_2 的0.01 M PBS液中室温孵育10 min以去除内源性过氧化物酶,在兔抗 Glut-1 抗体(1:100)中 4°C 孵育过夜,然后在酶标聚合物中室温孵育15 min。每一步孵育后均以0.01 M PBS液充分漂洗3次。最后切片用DAB显色试剂盒显色5~10 min。显色后切片漂洗,裱于载玻片上,常规脱水、透明、中性树胶封片。光镜下观察并拍照。免疫组化对照实验是在省略一抗其余步骤同上情况下进行,结果为阴性。

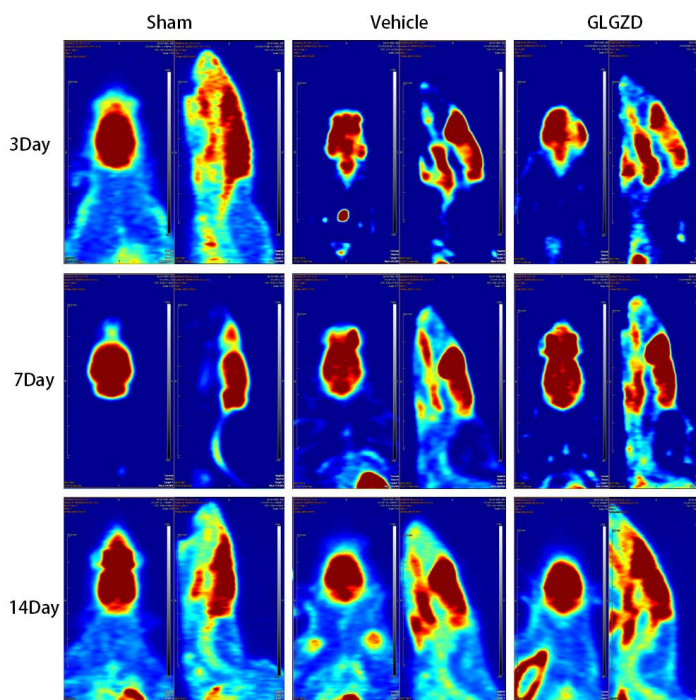
2.3.5. 统计分析

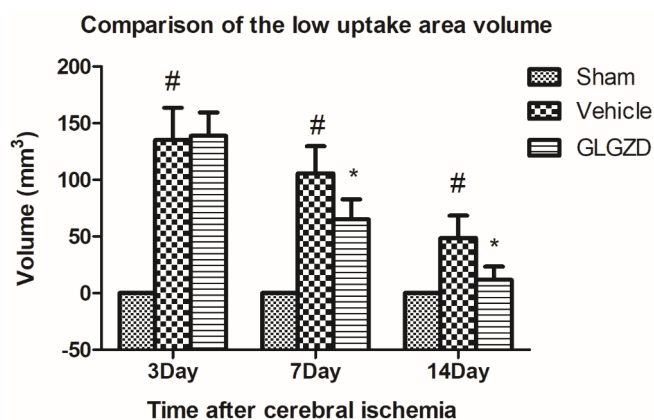
采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式给出。组间比较采用单因素方差分析及LSD-t进行两两比较,以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 栝楼桂枝汤改善大鼠脑缺血区域葡萄糖代谢水平

大鼠MCAO手术造成脑缺血再灌注损伤后,采用栝楼桂枝汤灌胃干预,各组随机选取3只大鼠,进行纹状体及周边区域葡萄糖代谢水平比较。经检测,发现假手术组大鼠脑组织结构完整,未发现 ^{18}F -FDG标记物摄取降低的区域。MCAO手术造模后,纹状体及周边区域 ^{18}F -FDG标记物摄取值显著降低,随着缺血时间推移,至缺血后7天、14天,脑组织造影剂低摄取区域体积有所降低。大鼠脑缺血手术后给予栝楼桂枝汤治疗,脑组织造影剂 ^{18}F -FDG低摄取区域在缺血后7天、14天较模型组显著降低(见图1),表明栝楼桂枝汤对脑缺血损伤后脑细胞的葡萄糖摄取有显著的提升作用。





注: 与假手术组比较, [#]: $p < 0.01$; 与模型组比较, ^{*}: $p < 0.05$;
Sham: 假手术组; Vehicle: 模型组; GLGZD: 栝楼桂枝汤颗粒给药组; 各组 $n = 3$ 。

Figure 1. Effect of GLGZD on uptake of ¹⁸F-FDG in MCAO rats
图 1. 栝楼桂枝汤对 MCAO 大鼠 ¹⁸F-FDG 摄取的作用

3.2. 栝楼桂枝汤对脑缺血区域 Glut-1 表达的作用

免疫组织化学染色结果显示, 假手术组纹状体缺血周边区域仅有少量 Glut-1 阳性染色表达, 模型组 Glut-1 阳性染色显著高于假手术组, 阳性细胞数量增多(见表 1, $p < 0.05$), 栝楼桂枝汤治疗组 Glut-1 阳性染色较模型组显著升高(见表 1, $p < 0.05$)。

Table 1. Effect of GLGZD on Glut-1 expression in striatum of MCAO rats

表 1. 栝楼桂枝汤对 MCAO 大鼠纹状体 Glut-1 表达的作用

组别	例数	平均积分光密度
假手术组	5	1.92 ± 0.68
模型组	5	$3.09 \pm 1.02^{\#}$
栝楼桂枝汤组	5	$4.55 \pm 0.78^*$

注: 与假手术组比较, [#]: $p < 0.05$; 与模型组比较, ^{*}: $p < 0.05$ 。

4. 讨论

正电子发射型计算机断层扫描(position emission tomography, PET)成像是将发射正电子的放射性核素(如 ¹⁸F、¹¹C、¹³N、¹⁵O 等)标记在具有生物学效应的配体分子上, 用于对体内新陈代谢和生理功能的成像。由于它是一种功能成像, 能够用于研究引起疾病的根本生理过程和分子异常表达情况。葡萄糖是人体三大能源物质之一, 将可以被 PET 探测并形成影像的正电子核素 ¹⁸F 标记在葡萄糖上, 即 ¹⁸F-脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG), 可准确反映体内器官/组织的葡萄糖代谢水平, 是目前 PET-CT 显像的主要显像剂[5]。通过对大鼠脑组织 ¹⁸F-FDG 糖代谢功能进行测定, 可以在活体上显示脑缺血后脑组织葡萄糖代谢的动态变化。

糖酵解是脑缺血后脑组织利用能量的主要形式, 脑缺血后神经元存活的关键因素在于是否能有效利用葡萄糖提供能量[6]。脑组织葡萄糖由细胞膜上的葡萄糖转运体(glucose transporter 1, Glut-1)进行转运, 其表达量反映组织对葡萄糖的代谢。本文采用 PET-CT 分子成像技术观测栝楼桂枝汤治疗缺血性脑卒中的疗效, 结果表明, 大鼠脑缺血损伤后, 脑内出现明显的葡萄糖低摄取区域, 表明缺血造成神经细胞活

性降低, 葡萄糖摄取下降, 栝楼桂枝汤可显著降低脑组织造影剂 ^{18}F -FDG 低摄取区域, 表明该方可增加脑缺血后神经细胞对葡萄糖的摄取利用。进一步研究发现, 脑缺血后脑组织 Glut-1 表达有所升高, 这可能是脑组织对缺血的适应性反应, 增加组织的葡萄糖转运以供给更多的能量。栝楼桂枝汤治疗可显著升高 Glut-1 的表达, 表明该方可能是通过增加葡萄糖转运体改善脑组织葡萄糖摄取。

栝楼桂枝汤是中医用以缓解太阳病“痉症”的经典方, 目前临床用于治疗脑卒中后肢体痉挛已有许多报道[7] [8]。前期研究关于栝楼桂枝汤治疗脑卒中的药理机制研究发现, 该方在氧化应激及谷氨酸损伤的细胞模型和脑缺血再灌注大鼠模型上都可表现出明确的神经保护作用[9] [10] [11] [12], 其机制可能涉及调控脑组织兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸的平衡[13] [14] [15], 抗炎[16]、抗凋亡[17]、抗氧化[18]等途径。本研究结果表明, 栝楼桂枝汤对脑缺血后葡萄糖代谢具有促进作用, 为该方用于脑卒中后遗症的临床应用提供了更多的实验依据。

基金项目

本研究得到国家自然科学基金项目(81803870); 福建省自然科学基金项目(2018J01855); 福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2019R1003-2)的资助。

参考文献

- [1] Wang, W., Jiang, B., Sun, H., Ru, X., Sun, D., Wang, L., *et al.* (2017) Prevalence, Incidence, and Mortality of Stroke in China: Results from a Nationwide Population-Based Survey of 480,687 Adults. *Circulation*, **135**, 759-771. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025250>
- [2] 刘冬, 郭建生, 刘顶鼎, 曹思佳, 向怡, 谢乐, 等. 脑卒中后痉挛性瘫痪药物治疗进展[J]. 贵州中医药大学学报, 2020, 42(2): 91-95+102.
- [3] 陈瑛玲, 陈立典, 陶静. 栝楼桂枝汤治疗中风后肢体痉挛的临床研究[J]. 中医临床研究, 2013, 5(4): 7-9.
- [4] Han, J., Zhang, J.Z., Zhong, Z.F., Li, Z.F., Pang, W.S., Hu, J., *et al.* (2018) Gualou Guizhi Decoction Promotes Neurological Functional Recovery and Neurogenesis Following Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion. *Neural Regeneration Research*, **13**, 1408-1416. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235296>
- [5] 彭一檬, 张春银, 余录, 谭华, 尤强. ^{18}F -FDG microPET/CT 在脑缺血再灌注模型筛选中的应用[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(11): 726-730.
- [6] 黄伟, 姜功道, 李佳, 吴松. 超早期针刺百会、水沟对急性脑缺血大鼠 GLUT1、GLUT3 的影响[J]. 中国中医急症, 2014, 23(1): 51-53.
- [7] 吕凤立. 栝楼桂枝汤联合康复训练治疗脑卒中偏瘫效果[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(7): 137-139.
- [8] 申金星, 潘佳佳. 栝楼桂枝汤辅治脑卒中后下肢痉挛对痉挛程度及步态稳定性的影响[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(9): 1556-1558.
- [9] 胡海霞, 李钻芳, 林如辉, 朱晓勤, 陈立典. 瓜蒌桂枝汤对 PC12 细胞的保护作用[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(3): 24-26.
- [10] 毛敬洁, 李钻芳, 黄佳, 林如辉, 朱晓勤, 陈立典. 栝楼桂枝汤醇提物对氧化应激 PC12 细胞内 NrF2 和 HO-1 mRNA 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(6): 563-566.
- [11] 朱晓勤, 李钻芳, 毛敬洁, 胡海霞, 林如辉, 陈立典. 栝楼桂枝汤对谷氨酸所致的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 福建中医药, 2015, 46(2): 35-36.
- [12] 庞文生, 胡娟. 瓜蒌桂枝汤对 MCAO 大鼠脑组织自由基代谢药效学研究[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(3): 19+23.
- [13] Chen, X., Li, H., Huang, M., Huang, M., Xu, W., Chu, K., *et al.* (2014) Effect of Gua Lou Gui Zhi Decoction on Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury through Regulating the Expression of Excitatory Amino Acids and Their Receptors. *Molecular Medicine Reports*, **10**, 248-254. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2189>
- [14] Huang, J., Tao, J., Xue, X., Yang, S., Han, P., Lin, Z., *et al.* (2013) Gua Lou Gui Zhi Decoction Exerts Neuroprotective Effects on Post-Stroke Spasticity via the Modulation of Glutamate Levels and AMPA Receptor Expression. *International Journal of Molecular Medicine*, **31**, 841-848. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1262>

-
- [15] Zhu, X., Hu, H., Li, Z., Lin, R., Mao, J., Chen, L., *et al.* (2015) Gua Lou Gui Zhi Decoction Attenuates Poststroke Spasticity via the Modulation of GABAB Receptors. *Molecular Medicine Reports*, **12**, 5957-5962. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4207>
- [16] Hu, H., Zhu, X., Lin, R., Li, Z. and Chen, L. (2016) Suppressive Effects of Gua Lou Gui Zhi Decoction on MCAO-Induced NO and PGE2 Production Are Dependent on the MAPK and NF- κ B Signaling Pathways. *Molecular Medicine Reports*, **14**, 5141-5147. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5876>
- [17] Hu, H., Li, Z., Zhu, X., Lin, R., Lin, J., Peng, J., *et al.* (2013) Gua Lou Gui Zhi Decoction Suppresses LPS-Induced Activation of the TLR4/NF- κ B Pathway in BV-2 Murine Microglial Cells. *International Journal of Molecular Medicine*, **31**, 1327-1332. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1331>
- [18] Mao, J., Li, Z., Lin, R., Zhu, X., Lin, J., Peng, J., *et al.* (2015) Preconditioning with Gua Lou Gui Zhi Decoction Enhances HO-Induced Nrf2/HO-1 Activation in PC12 Cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **10**, 877-884. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2610>