

·基础研究·

芒果苷通过抑制氧化应激及抗凋亡作用保护大鼠 颅脑损伤

谭支强

作者单位
浠水县人民医院神
经外科
湖北 浠水 438200
收稿日期
2016-09-01
通讯作者
谭支强
397933045@qq.
com

摘要 目的:探索芒果苷(MAN)对大鼠颅脑损伤的保护作用及其相关机制。**方法:**SD大鼠60只,随机分为假手术组、模型组、MAN低浓度(10 mg/kg)组、MAN中浓度(20 mg/kg)组、MAN高浓度(40 mg/kg)组各12只,制备脑损伤动物模型。术后第3、7天进行神经功能评分,7 d后干湿法测定脑组织含水量;Elisa法检测氧化应激因子丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT),Western blotting检测凋亡蛋白Bax、Bcl-2表达;免疫组织化学染色观察Caspase-3表达。**结果:**MAN能显著降低颅脑损伤大鼠神经功能评分以及脑组织水肿,并呈剂量依赖趋势($P<0.05$);Elisa结果显示MAN逆转氧化应激因子的表达,并呈剂量依赖趋势($P<0.05$);Western-blot结果显示MAN能显著抑制Bax表达,提高Bcl-2蛋白表达,并呈剂量依赖趋势($P<0.05$);免疫组织化学染色显示,MAN能显著抑制caspase-3表达,并呈剂量依赖趋势($P<0.05$)。**结论:**MAN可通过减轻水肿、抑制氧化应激以及抗细胞凋亡从而发挥神经保护作用。**关键词** 芒果苷;颅脑损伤;氧化应激;神经保护
中图分类号 R741;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.01.008

创伤性颅脑损伤(Traumatic Brain Injury, TBI)的发生率逐年增加,已成为神经外科常见的疾病之一^[1]。TBI后颅内继发性水肿、氧化应激反应和炎症反应等是患者死亡的主要原因^[2,3]。因此,抑制颅内水肿及氧化应激以及抗神经凋亡能加速TBI患者恢复。芒果苷(Mangiferin, MAN)是一类双苯吡酮类黄酮类化合物,具有抗糖尿病、抗肿瘤、抗炎、抗氧化等作用^[4,5]。本实验探讨MAN对大鼠TBI的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠60只,体质量200~250 g,由上海交通大学动物实验中心提供。
1.1.2 主要试剂及仪器 Freeny's自由落体架由上海交通大学动物实验中心提供,MAN(纯度 $\geq 98\%$,购于美国Sigma公司);大鼠丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)Elisa试剂盒、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)(购于上海博谷公司);大鼠Bax, Bcl-2一抗, DAB显色试剂盒(购于美国Santa Cruz公司);1%戊巴比妥钠(购于北京化学试剂公司);紫外分光光度计(购于美国Bausch Lomb公司);0.9%氯化钠注射液(购于北京双鹤药业);注射用青霉素钠(购于瑞阳制药公司);Image Pro Plus 6.0软件(美国Media Cybernetics公司)。

1.2 方法

1.2.1 TBI模型的制作 术前禁食8 h, 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠固定于Freeny's支架上,消毒,切开颅顶部皮肤后剥离骨膜,充分暴露颅骨,利用微型电钻切开直径约5 mm的圆形骨窗,将50 g打击器置于20 cm高度自由落下撞击骨窗,骨蜡封闭骨窗,缝合头皮。术后大鼠单笼饲养。神经

功能缺损评分 >2 分表明造模成功。假手术组只制作骨窗,不打击颅脑。
1.2.2 实验分组及给药 60只SD大鼠适应性喂养1周后随机分为5组:假手术组、模型组、MAN低浓度组(10 mg/kg)、MAN中浓度组(20 mg/kg)和MAN高浓度组(40 mg/kg),每组12只。MAN低、中、高组每日通过腹腔注射MAN 1次,连续注射7 d。假手术组和模型组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。
1.2.3 神经功能评估 采用改良神经功能缺损评分(modified Neurological Severity Score, mNSS)^[6]评估术后各组大鼠3 d和7 d的神经功能缺损情况,包括:肢体运动测试6分,感觉测试2分,平衡木测试6分,反射反应及异常活动4分。
1.2.4 颅内水肿的测定 造模7 d后,各组取4只大鼠,取出脑组织后称重,随后放入80 ℃烘箱中放置72 h,待完全风干后再次称重。
1.2.5 Elisa法检测损伤脑组织氧化应激因子含量及活性 造模7 d后,各组取4只大鼠脑组织,保留损伤灶及边缘2 mm区域,每个脑组织切分为2份,分别用于氧化应激因子和Bax/Bcl-2蛋白的检测。充分剪碎后研磨,利用标准稀释液进行稀释,加终止液后混匀,测定450 nm吸光度,根据吸光度计算MDA、CAT、SOD、GSH含量。
1.2.6 Western-blot法检测Bax和Bcl-2蛋白表达 造模7 d后,取出损伤区域脑组织,充分剪碎后研成匀浆,3 mL/g蛋白裂解液充分裂解后,以10 000 g离心30 min,取出上清液。BCA法测定总蛋白浓度。经过加样、SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、一抗(1:1 500)孵育过夜,二抗(中衫金桥)1:5 000孵育3 h,脱脂奶粉充分洗净后加入显色剂显色,利用凝胶成像系统成像,Image Pro Plus 6.0软件计算各组条带灰度值。

1.2.7 免疫组织化学染色观测 造模7 d后,各组取4只大鼠脑组织,保留损伤灶及边缘2 mm区域,10%多聚甲醛固定48 h,石蜡包埋,从损伤部位的脑组织连续切片,片厚5 μm。切片后行Caspase-3免疫组织化学染色,荧光倒置显微镜下观察,Caspase-3阳性镜下可呈黄色或棕黄色,形态不规则。200倍镜视野下,每张切片随机取3个视野,观察Caspase-3染色及利用Image Pro Plus 6.0软件检测Caspase-3蛋白表达平均光密度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,配对组间单因素方差分析或t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能比较

造模后3 d和7 d,mNSS评分明显升高($P<0.05$),经过芒果苷治疗后,MAN 3个浓度组mNSS评分低于假手术组($P<0.05$);MAN中浓度组低于低浓度组,高浓度组低于低、中浓度组,呈剂量依赖趋势($P<0.05$),见表1。

表1 各组造模后mNSS评分比较($\bar{x}\pm s$,n=12)				
组别	只数	3 d	7 d	
假手术组	12	0	0	
模型组	12	12.1±1.3 ^①	8.7±0.8 ^①	
MAN低浓度组	12	9.5±0.9 ^②	7.2±0.9 ^②	
MAN中浓度组	12	8.6±0.7 ^{②③}	6.4±0.7 ^{②③}	
MAN高浓度组	12	7.3±0.8 ^{②③④}	5.5±0.6 ^{②③④}	
F值		14.862	19.343	
P值		0.018	0.007	

注:与假手术组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与MAN低浓度组比较,^③ $P<0.05$;与MAN中浓度组比较,^④ $P<0.05$

2.2 芒果苷对TBI大鼠脑水肿情况的影响

假手术组、模型组、MAN低浓度组、MAN中浓度组、MAN高浓度组的脑组织含水量分别为(68.3±4.4)%、(82.1±4.9)%、(79.2±4.7)%、(74.8±4.4)%、(70.4±4.8)%,模型组的脑组织含水量较假手术组明显升高($P<0.05$)。MAN低浓度组和中浓度组的脑组织含水量较模型组降低($P<0.05$),而高浓度组脑含水量明显低于低、中浓度组脑组织含水量($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠MDA、CAT、SOD及GSH活性比较

造模后,模型组MDA含量明显升高,CAT、SOD、GSH含量明显降低($P<0.05$),经MAN治疗后,各组氧化应激因子明显逆转

表2 各组氧化应激因子表达($\bar{x}\pm s$)					
组别	只数	MDA/(nmol/mg)	CAT/(U/mg)	SOD/(U/mg)	GSH/(U/mg)
假手术组	4	16.7±1.8	183.9±11.4	18.9±1.5	42.8±1.9
模型组	4	43.8±2.1 ^①	37.8±10.1 ^①	4.1±1.3 ^①	8.9±1.7 ^①
MAN低浓度组	4	31.4±2.2 ^②	79.8±9.7 ^②	6.4±1.4 ^②	14.8±1.9 ^②
MAN中浓度组	4	22.3±1.8 ^{②③}	99.1±11.2 ^{②③}	7.5±1.6 ^{②③}	21.6±1.9 ^{②③}
MAN高浓度组	4	19.7±1.9 ^{②③④}	141±12.6 ^{②③④}	9.9±1.5 ^{②③④}	31.4±2.1 ^{②③④}
F值		10.967	17.455	9.174	13.021
P值		0.029	0.003	0.014	0.008

注:与假手术组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与MAN低浓度组比较,^③ $P<0.05$;与MAN中浓度组比较,^④ $P<0.05$

($P<0.05$),中浓度组高于低浓度组,高浓度组高于低、中浓度组,呈剂量依赖趋势($F=10.967,17.455,9.174,13.021,P<0.05$),见表2。

2.4 Western blot法检测Bax/Bcl-2蛋白表达

各组大鼠脑组织Bax蛋白表达分别为(1.1±0.2)、(11.8±0.9)、(9.1±0.8)、(7.3±0.8)、(5.6±0.7),模型组中凋亡蛋白Bax表达提高($P<0.05$),而经过MAN治疗后,损伤脑组织中Bax表达得到明显抑制,与模型组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),各浓度组之间,中浓度组低于低浓度组,而高浓度组低于低、中浓度组($F=16.927,P<0.05$);各组大鼠脑组织Bcl-2蛋白表达分别为(9.3±0.9)、(1.0±0.2)、(3.2±0.3)、(3.9±0.4)、(5.7±0.6),模型组中Bcl-2表达明显下调($P<0.05$),而经过MAN治疗后,损伤脑组织中Bcl-2表达得到明显提升($P<0.05$),各浓度组之间,中浓度组高于低浓度组,而高浓度组高于低、中浓度组($F=12.852,P<0.05$),见图1。



图1 各组大鼠Bax及Bcl-2蛋白表达

2.5 免疫组织化学染色观察

各组Caspase-3蛋白均表达于脑皮质,假手术组可见少量Caspase-3表达,模型组可见大量Caspase-3蛋白,MAN组Caspase-3蛋白依次减少,见图2。假手术组、模型组、MAN低浓度组、MAN中浓度组和MAN高浓度组的Caspase-3表达平均光密度分别为(13.9±2.8)、(94.7±9.6)、(82.1±8.8)、(67.9±7.1)、(55.4±6.3),模型组的Caspase-3表达高于假手术组($P<0.05$)。MAN组Caspase-3表达均低于模型组($P<0.05$)。MAN各组之间,中浓度组低于低浓度组,高浓度组低于低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

TBI包括原发性脑损伤(Primary Brain Injury,PBI)和继发性脑损

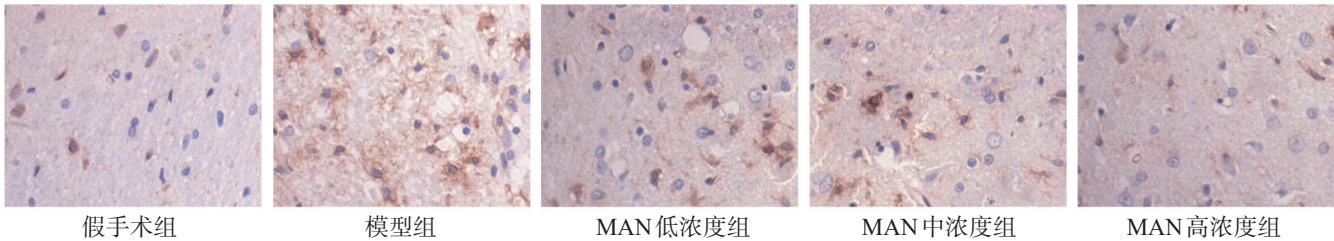


图2 各组大鼠Caspase-3表达(免疫组织化学染色×200)

伤(Secondary Brain Injury, SBI)^[7],PBI后颅内发生一系列病理生理改变,如脑组织水肿、氧化应激及炎性因子代谢异常或神经细胞凋亡和坏死等^[8]。大量研究证明,脑水肿、氧化应激反应、炎性反应以及神经凋亡是TBI后继发性脑损伤的主要原因^[9]。

颅内水肿在TBI病情发展中占据重要作用^[10],TBI后血脑屏障发生变化,脑微循环障碍,引起损伤区及周围组织含水量增加,且TBI后可发生脑自由基、前列腺素及神经肽类变化,均可引起脑水肿。本研究通过Feeney氏自由落体法制作的TBI模型,通过干湿法可测量脑水肿情况发现,TBI后脑水肿明显加剧,而经过MAN治疗后,水肿指数明显下调,mNSS评分显示大鼠神经功能明显提高,提示MAN可通过抑制损伤脑组织水肿从而发挥神经保护作用。

氧化应激是TBI后形成继发性损伤的重要因素之一^[11],TBI后颅内氧自由基大量增加,自由基破坏生物膜结构的完整性和通透性,使细胞钙通道开发,大量钙离子进入细胞内,导致细胞变性、凋亡和坏死。MDA是膜脂过氧化终产物,可直接反映体内膜脂过氧化程度,其含量可间接反映呼吸链酶对细胞的攻击程度^[12]。SOD催化过氧阴离子的歧化反应,是细胞内主要的自由基清除剂,广泛存在于哺乳动物细胞内,SOD含量可反映机体细胞内源性氧自由基清除能力^[13]。CAT科催化分解过氧化氢,避免过氧化氢与氧在铁螯合物作用下生产有害的氢氧根离子,CAT主要存在于红细胞和机体某些组织内,是过氧化物酶体的标志酶。GSH是一种重要的过氧化物分解酶,可将过氧化物还原成无毒性的羟基化合物,其含量高低可间接反映机体清除过氧化物的能力^[14]。本研究发现,TBI后脑组织氧化应激因子MDA明显上调,而CAT、SOD、GSH含量得到抑制,经MAN治疗后,MDA含量明显下调,CAT、SOD、GSH含量明显提高,提示MAN可通过抑制MDA,上调CAT、SOD、GSH含量抑制氧化应激反应,从而发挥神经保护作用。

凋亡是细胞的自毁机制,在TBI后病理生理机制中发挥重要作用,TBI后神经细胞受到氧化应激及炎性因子刺激,启动一系列控制程序,其中Bcl家族与凋亡的关系最为密切。Bcl-2是一种重要的抗凋亡蛋白,能掌控细胞存活的分子调控点,能通过线粒体膜抑制一些凋亡诱导因子,如Caspase和细胞色素C的释放,促使细胞存活^[15]。Bax是细胞内主要的促凋亡因子之一,Bax过表达可拮抗Bcl-2,从而促进细胞凋亡^[16],病理条件下,Bax可促进细胞色素C释放,激活Caspase,加速细胞凋亡。因此,Bax大量表达可能是导致颅脑损伤后神经细胞凋亡的主要原因。目前研究认为,Bcl-2和Bax对细胞凋亡调控作用相互拮

抗,存在动态平衡,当Bax过表达,细胞出现凋亡^[17-19]。本研究发现,TBI后,脑组织Bax表达水平提高,Bcl-2表达明显下调,而经MAN治疗后Bax蛋白表达受到明显抑制,Bcl-2水平提高,并且,MAN可明显抑制TBI大鼠脑组织Capase-3表达,提示MAN可通过抑制Bax/Bcl-2和Caspase-3途径发挥神经保护作用。

参考文献

[1] Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury [J]. JAMA Neurol, 2015, 72: 355-362.
[2] 骆良钦, 陈祥荣, 李亚松, 等. JNK 信号通路在大鼠创伤性脑损伤后炎症反应中的作用[J]. 中华神经医学杂志, 2014, 12: 1233- 1238.
[3] 白立曦, 宋锦宁. 创伤性脑损伤后氧化应激损伤机制研究进展[J]. 中华脑科疾病与康复杂志, 2013, 5: 325-328.
[4] Vyas A, Syeda K,Ahmad A, et al. Perspectives on medicinal properties of mangiferin [J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12: 412-425.
[5] Garrido-Suárez BB, Garrido G, Delgado R, et al. A Mangifera indica L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin [J]. Molecules, 2010, 15: 9035-9045.
[6] Charidimou A, Pasi M, Fiorelli M, et al. Leukoaraiosis, Cerebral Hemorrhage, and Outcome After Intravenous Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke: A Meta-Analysis (v1) [J]. Stroke, 2016, 47: 2364-2372.
[7] McDonald SJ, Sun M, Agoston DV, et al. The effect of concomitant peripheral injury on traumatic brain injury pathobiology and outcome [J]. J Neuroinflammation, 2016, 13: 90.
[8] Kinoshita K. Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care[J]. J Intensive Care, 2016, 4: 29.
[9] Nguyen T, Mao Y, Sutherland T. Neural progenitor cells but not astrocytes respond distally to thoracic spinal cord injury in rat models [J]. Neural Regen Res, 2017, 12:1885-1894.
[10] Liu W, Yuan J, Zhu H, et al. Curcumin reduces brain-infiltrating T lymphocytes after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Neurosci Lett, 2016, 620: 74-82.
[11] Lopez MS, Dempsey RJ, Vemuganti R. Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury [J]. Neurochem Int, 2015, 89: 75-82.
[12] Kontos Ding H, Wang H, Zhu L. Ursolic Acid Ameliorates Early Brain Injury After Experimental Traumatic Brain Injury in Mice by Activating the Nrf2 Pathway [J]. Neurochem Res, 2017, 42: 337-346.
[13] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases [J]. Joint Bone Spine, 2007, 74: 324-329.
[14] Wang XF, Huang YF, Wang L, et al. Photo-protective activity of p-gostone against UV-induced skin premature aging in mice [J]. Exp Gerontol, 2016, 77: 76-86.
[15] Li K, Ding D, Zhang M. Neuroprotection of Osthole against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury through an Anti-apoptotic Pathway in Rats [J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39: 336-342.
[16] Scarfò L, Ghia P. Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies [J]. Immunol Lett, 2013, 155: 36-39.
[17] 刘伟国, 杨小峰, 李谷. 盐酸纳络酮对严重颅脑损伤后神经细胞凋亡及相关基因的 Bcl-2,Bax 的表达影响的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2004, 20: 170-172.
[18] 崔梅, 杨琦, 董强. Mdivi-1 对糖氧剥夺后神经元凋亡蛋白 Bax 活化、嵌入及细胞色素 C 释放的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9: 173-176.
[19] 孙涛, 杨天明, 王天路. Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达与颞叶癫痫发病的相关性研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2009, 4: 170-172.

(本文编辑:王晶)