

·论著·

毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

彭志柱¹, 肖晶¹, 李启明¹, 夏学巍², 王文波²

作者单位
1. 桂林医学院研究生学院
广西 桂林 541010
2. 桂林医学院附属医院神经外科
广西 桂林 541001
基金项目
广西自然科学基金
(No. 2018GXNSFAA050054;
2018GXNSFAA294138);
2017年度广西脑与
认知神经外科学重
点实验室开放课题
(No. GKLBCN-201
70105-04)
收稿日期
2019-03-31
通讯作者
王文波
wwbgxgl@163.com

摘要 目的:探究毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用机制。方法:将80只SD大鼠随机分为假手术组(sham)、缺血再灌注组(I/R)、低剂量组、中剂量组、高剂量组。在造模前14 d,低剂量组、中剂量组、高剂量组分别腹腔注射5 mg/(kg·d)、10 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d)毛蕊异黄酮,sham组和I/R组等量注射二甲基亚砜,随后建立脑缺血再灌注模型,24 h后评估大鼠神经功能评分,计算脑梗死体积及脑含水量,测定脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量及NF-κB表达量。**结果:**低剂量组、中剂量组、高剂量组的神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量随着毛蕊异黄酮浓度升高而降低,以高剂量组下降最为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$),均低于I/R组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。低剂量组、中剂量组、高剂量组的脑组织中SOD活性显著高于I/R组($P<0.01$),MDA水平显著低于I/R组($P<0.01$);低剂量组、中剂量组、高剂量组的SOD活性随着毛蕊异黄酮浓度的增加而升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),低剂量组、中剂量组、高剂量组的MDA水平随着毛蕊异黄酮浓度升高而降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与I/R组相比,低剂量组、中剂量组、高剂量组的NF-κB的表达显著下调($P<0.01$);低剂量组、中剂量组、高剂量组的NF-κB的表达随着毛蕊异黄酮浓度升高而下调,以高剂量组下调最为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

关键词 毛蕊异黄酮;缺血再灌注;炎症反应;氧化应激

中图分类号 R741;R741.02; R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20190409

本文引用格式:彭志柱,肖晶,李启明,等.毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].神经损伤与功能重建,2020,15(5):252-255.

Protective Effect of Calycosin on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats PENG Zhi-zhu¹, XIAO Jing¹, LI Qi-ming¹, XIA Xue-wei², WANG Wen-bo². 1. Graduate College, Guilin Medical University, Guangxi 541010, China; 2. Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guangxi 541001, China

Abstract Objective: To explore the protective mechanism of calycosin on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** Eighty SD rats were randomly divided into the groups sham operation, ischemia/reperfusion (I/R), low-dose, medium-dose and high-dose. Fourteen days before model establishment, the rats of low-dose, middle-dose, and high-dose groups were intraperitoneally injected with 5 mg/(kg·d), 10 mg/(kg·d), and 20 mg/(kg·d) calycosin, respectively; the sham and I/R group rats were injected with an equal amount of dimethyl sulfoxide. Next the cerebral ischemia and reperfusion models were constructed. Twenty-four hours later, the neurological function score of rats was evaluated, the cerebral infarction volume and brain water content were calculated, and the superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) content and NF-κB expression in the brain tissue were determined. **Results:** The neurological function score, cerebral infarction volume, and brain water content of the low-dose, medium-dose, and high-dose groups decreased with the increase of calycosin concentration, with the high-dose group showing the most significant decrease ($P<0.05$ or $P<0.01$), and all showed lower values than the I/R group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The SOD activity in the brain tissue of the low-dose, medium-dose, and high-dose groups was significantly higher than that of the I/R group ($P<0.01$), and the MDA level was significantly lower than that of the I/R group ($P<0.01$); the SOD activity of the low-dose, medium-dose, and high-dose groups increased with the increase of calycosin concentration ($P<0.05$ or $P<0.01$); the MDA level of the low-dose, medium-dose, and high-dose groups decreased with the increase of calycosin concentration ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the I/R group, the expression of NF-κB in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups was significantly down-regulated ($P<0.01$); the expression of NF-κB in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups was down-regulated with the increase of calycosin concentration, with the high-dose group showing the most significant down-regulation ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Calycosin has protective effects in cerebral ischemia reperfusion rats.

Key words calycosin; ischemia reperfusion; inflammation; oxidative stress

缺血性脑卒中的治疗主流思想是恢复血流再通,但血流再通后会导致再灌注损伤^[1]。有研究表明,缺血再灌注损伤导致多种疾病的发病率和死亡率增高,与缺血再灌

注组织氧化应激、炎症密切相关^[2,3],因此抑制炎症反应在缺血再灌注损伤的治疗中至关重要。毛蕊异黄酮是一种天然植物雌激素,Wang等^[4]报道毛蕊异黄酮在缺血再灌注损伤中具有神经保护作用,但是目前毛蕊异黄酮对脑缺血再灌注的作用机制仍不清楚。因此,本研究探讨毛蕊异黄酮对脑缺血再灌注大鼠的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2月龄体质量225~285 g的雄性SD大鼠(Ⅱ级,No.140211)80只,购于桂林医学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 毛蕊异黄酮(分子量=284.27,纯度N 98%,通过高效液相色谱验证;购于中国Phytomarker公司)溶解在二甲基亚砜(购于天津马克生物技术公司)中制备成200 mmol/L溶液,4℃储存备用。丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。蛋白质印迹法(Western Blot, WB)相关试剂包括兔源磷酸化NF-κB单抗、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记兔抗鼠IgG和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购于美国Santa Cruz公司。4%多聚甲醛、辣根过氧化物酶DAB显色试剂盒、蛋白上样缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、氯化三苯四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 局灶性脑缺血再灌注模型制备 所有实验程序均根据美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南进行,该方案经桂林医学院动物伦理委员会批准。将80只大鼠随机分为sham组、I/R组、高剂量组、中剂量组和低剂量组各16只。造模前14 d开始腹腔注射给药毛蕊异黄酮,高剂量组给予毛蕊异黄酮20 mg/(kg·d),中剂量组给予毛蕊异黄酮10 mg/(kg·d),低剂量组给予毛蕊异黄酮5 mg/(kg·d),sham组、I/R组则给予等量DMSO,连续给药14 d,末次给药后1 h后,使用10%水合氯醛麻醉大鼠,然后采用线栓法建立大脑中动脉脑缺血再灌注模型:将具有圆形尖端的4-0尼龙单丝线插入右侧颈总动脉,并进入颈内动脉直至其阻塞大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)的起源。在闭塞动脉2 h后,小心取出细丝恢复血流灌注实现组织血液再灌注24 h。sham组暴露颈动脉但不插入细丝。在整个

操作过程中,监测直肠温度并用加热垫保持在37℃~38℃,室温25℃~27℃。

1.2.2 动物神经行为学评分 将苏醒后的大鼠放回笼内,使其自由饮食。再灌注24 h后评估并记录每组大鼠神经功能缺损评分^[5]:0级为无功能障碍,1级为不能伸展左侧前肢,2级为向左侧旋转,3级为向左侧倾倒,4级为无自主活动伴意识障碍,5级为死亡(死亡的需剔除)。级别越高,表示动物神经功能损伤越大。

1.2.3 脑梗死体积测量 TTC染色法用于测量脑梗死体积的大小^[6]。神经行为学评分后处死大鼠,将大鼠整脑从颅中取出并在-20℃下保持10 min。将冷冻脑切成连续的2 mm冠状切片,并在2%TTC溶液中于37℃浸泡30 min,梗死脑组织染色阴性形成对比,使用具有高分辨率的数码相机拍摄梗死区域,应用图像分析软件(NIH Image, National Institutes of Health, Bethesda, Version 1.63)测量脑梗死灶体积大小。

1.2.4 脑水肿测量 将两个大脑半球分别称重(湿重),然后将其置于100℃下24 h后测定干重。计算脑水肿程度:水含量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.5 脑组织中MDA、SOD活力测定 取出术侧MCA供血的皮质和尾状壳核,储存在-80℃,分别采用TBA法、比色法测定脑组织中过氧化产物MDA含量及SOD活性,均严格按试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 脑缺血半暗带区NF-κB含量的测定 将各组的脑组织置于裂解液中裂解30 min,12 000 r/min,4℃离心15 min,取上清液,BCA法测定蛋白浓度后行SDS-PAGE电泳分离等量的蛋白质样品,转至PVDF膜,使用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜1 h,加入单克隆抗体,4℃孵育过夜,加入二抗,室温孵育1 h,洗膜,加入ECL发光液,显色,UV凝胶成像系统成像记录,利用Image J进行图像灰度值处理。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0统计学软件分析数据,符合正态分布的计量资料以(Mean±SD)表示,完全随机秩和检验、方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛蕊异黄酮对神经功能缺损、脑梗死率和水肿的影响

I/R组大鼠的神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量明显高于sham组($P<0.001$),低剂量组、中剂量组、高剂量组的神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量均高于sham组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与I/R组相比,低剂量

组、中剂量组、高剂量组的神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量下降,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);低剂量组、中剂量组、高剂量组的神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量随着毛蕊异黄酮浓度升高而降低,以高剂量组下降最为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图1。

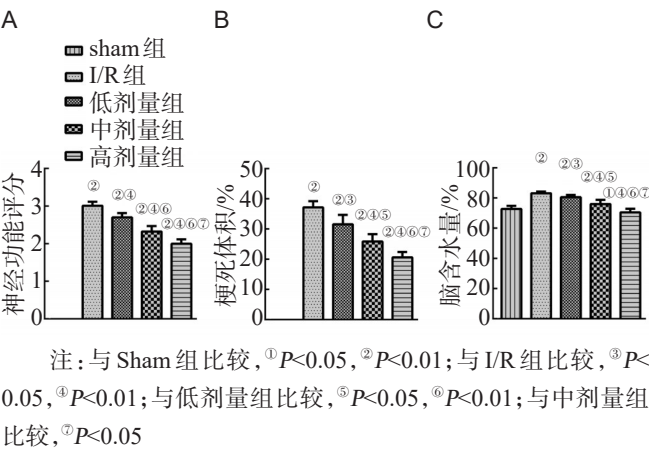


图1 各组神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量比较

2.2 毛蕊异黄酮对大鼠脑组织中MDA含量及SOD活力的影响

与sham组比较,I/R组的SOD活性显著降低,有显著性差异($P<0.01$);低剂量组、中剂量组的SOD活性较sham组下降,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),高剂量组的SOD活性与sham组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与I/R组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组的脑组织中SOD活性显著增加,有显著性差异($P<0.01$);低剂量组、中剂量组、高剂量组的SOD活性随着毛蕊异黄酮浓度的增加而升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图2A。I/R组的MDA水平显著高于sham组,有显著性差异($P<0.01$);与I/R组相比,低剂量组、中剂量组、高剂量组的MDA水平显著降低,有显著性差异($P<0.01$);与sham组相比,低剂量组、中剂量组、高剂量组的MDA水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);低剂量组、中剂量组、高剂量组的MDA水平随着毛蕊异黄酮浓度升高而降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图2B。

2.3 毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注NF-κB表达水平的影响

与sham组相比,I/R组的NF-κB的表达上调,有显著性差异($P<0.01$);与sham组相比,低剂量组、中剂量组、高剂量组的NF-κB的表达上调,有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与I/R组相比,低剂量组、中剂量组、高剂量组的NF-κB的表达显著下调,有显著性差异($P<0.01$);低剂量组、中剂量组、高剂量组的NF-κB的表达

随着毛蕊异黄酮浓度升高而下调,以高剂量组下调最为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图3。

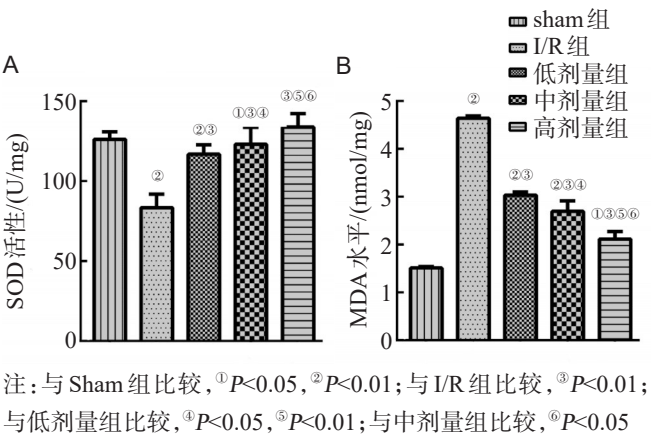


图2 各组脑组织SOD、MDA比较

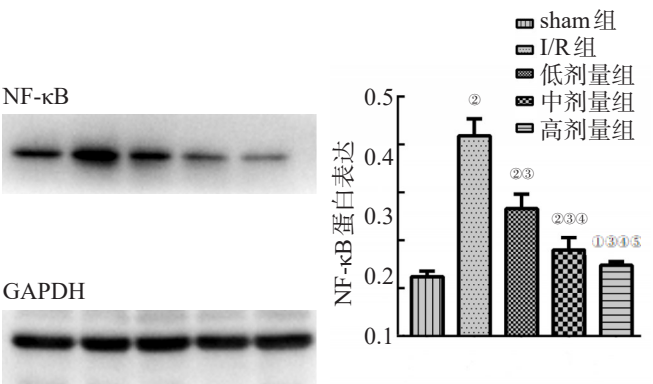


图3 各组脑缺血半暗带NF-κB蛋白表达比较

3 讨论

脑缺血再灌注可引起神经血管损伤,导致脑水肿、脑出血和神经元死亡。脑缺血再灌注损伤涉及各种机制,例如能量衰竭、细胞内 Ca^{2+} 水平升高、兴奋性神经递质释放、氧自由基产生、炎症和细胞凋亡等^[7]。有些学者认为炎症反应是缺血性脑卒中后最主要的继发性损伤机制之一^[8-10]。脑缺血再灌注时,缺血、缺氧后的神经细胞会重新获得血供,同时会产生在脑损伤中起主要作用的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS可由多种活化细胞产生,包括内皮细胞、血小板、白细胞和成纤维细胞,由于脑组织中抗氧化酶的活性较低,因此缺血再灌注损伤产生的ROS非常容易导致脑组织受到氧化损伤,从而导致脑水肿及加重梗死。

目前,在临床中预防和治疗脑缺血再灌注损伤的药物非常有限。令人欣慰的是,雌二醇和植物雌激素

的神经保护作用在脑局灶性和全脑性缺血中引起了极大的关注^[11,12]。有研究证明^[8],毛蕊异黄酮具有显著的抗氧化活性,因此本研究选择毛蕊异黄酮作为阳性对照药物。本研究中,通过大鼠体征异常变化判断神经功能缺损的程度、运用干湿重法计算大鼠脑含水量,并且TTC染色能够直观地显示模型大鼠脑梗死的区域。结果提示,毛蕊异黄酮能显著降低大鼠的神经病学评分、减轻脑细胞的水肿和脑组织梗死体积,提示其对脑缺血再灌注有保护作用。

因为ROS可攻击神经细胞的不饱和脂肪酸,引发的脂质过氧化作用会产生大量的MDA,所以脑组织中的MDA含量高低可间接反映神经细胞脂质过氧化反应的程度^[9,10]。同时脑组织中的SOD是ROS的特殊底物诱导酶,能将脑缺血再灌注时产生的ROS歧化为H₂O₂和O₂,所以脑组织中SOD活性的高低也可在一定程度上反映出机体氧自由基的清除能力^[11]。本研究中,SOD的含量在缺氧缺血后明显降低;而经毛蕊异黄酮给药后,脑组织中SOD含量明显增加,MDA水平显著下降,并且随着治疗剂量的增加神经细胞的缺血再灌注损伤逐渐减少。这提示毛蕊异黄酮是一种有效的自由基清除剂和抗氧化剂,其作用机制可能是通过增加脑细胞中超氧化物歧化酶的含量,有效清除羟自由基和超氧阴离子。

NF-κB蛋白是机体细胞中广泛存在的一种转录因子,不仅在正常生理状态下发挥着重要的生理作用,同时也参与炎症反应等病理生理过程。一些抗炎药物作用机理就是通过抑制NF-κB蛋白的活化达到减轻炎症反应作用^[17,18]。本研究结果显示,缺血再灌注组NF-κB表达水平显著增加,提示NF-κB参与调节炎症反应,炎症反应加重脑缺血再灌注的损伤,导致神经细胞的死亡^[12],同时高表达的NF-κB还可以通过启动细胞凋亡途径导致神经细胞的凋亡,这是脑缺血再灌注损伤的另一重要途径^[13]。毛蕊异黄酮组NF-κB表达显著下调,说明毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的脑组织NF-κB的表达有抑制作用,毛蕊异黄酮可能通过抑制大鼠脑组织NF-κB表达,下调脑组织的炎症反应,进而在神经保护中发挥作用。

综上所述,毛蕊异黄酮具有神经保护作用,可能

与抑制缺血再灌注脑组织的炎症反应有关,为以后研究毛蕊异黄酮在脑缺血再灌注损伤作用机制提供研究方向。

参考文献

- [1] Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS. Ischemia-reperfusion injury in stroke[J]. Interv Neuroradiol, 2013, 1: 185-199.
- [2] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17: 1391-1401.
- [3] Lakhani SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches[J]. J Transl Med, 2009, 7: 97.
- [4] Wang Y, Dong X, Li Z, et al. Downregulated RASD1 and upregulated miR-375 are involved in protective effects of calyculin on cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. J Neurol Sci, 2014, 339: 144-148.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [6] Rupadevi M, Parasuraman S, Raveendran R. Protocol for middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method[J]. J Pharmacol Pharmacother, 2011, 2: 36-39.
- [7] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2007, 87: 179-197.
- [8] Del ZG, Ginis I, Hallenbeck JM, et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and inos in brain response to ischemia[J]. Brain Pathol, 2000, 10: 95-112.
- [9] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke[J]. J Neuroimmunol, 2007, 184: 53-68.
- [10] Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia[J]. Surg Neurol, 2006, 66: 232-245.
- [11] Merchantlender I, Delovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1007: 89-100.
- [12] Schreihöfer DA, Redmond L. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury in vitro[J]. Neuroscience, 2009, 158: 602-609.
- [13] Chen HQ, Jin ZY, Li GH. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage through inhibition of microglia activation and proinflammatory factors generation[J]. Neurosci Lett, 2007, 417: 112-117.
- [14] 张片红, 何芳, 陈莹莹, 等. 茶色素对脑缺血再灌注损伤大鼠一氧化氮合酶表达的影响[J]. 浙江预防医学, 2011, 23: 14-16, 34.
- [15] Soane L, Li Dai W, Fiskum G, et al. Sulforaphane protects immature hippocampal neurons against death caused by exposure to hemin or to oxygen and glucose deprivation[J]. J Neurosci Res, 2010, 88: 1355-1363.
- [16] Xu H, Cai M, Zhang X. Effect of the blockade of the IL- 23- Th17- IL- 17A pathway on streptozotocin- induced diabetic retinopathy in rats[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2015, 253: 1485-1492.
- [17] Flood PM, Qian L, Peterson LJ, et al. Transcriptional Factor NF-kappaB as a Target for Therapy in Parkinson's Disease[J]. Parkinsons Dis, 2011: 216298.
- [18] 李凡, 常彦青, 丁军. 下丘脑核转录因子NF-kB的临床研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28: 113-116.
- [19] Herz J, Hagen SI, Bergmüller E, et al. Exacerbation of ischemic brain injury in hypercholesterolemic mice is associated with pronounced changes in peripheral and cerebral immune responses[J]. Neurobiol Dis, 2014, 62: 456-468.
- [20] 王光胜, 耿德勤. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 医学综述, 2011, 24: 3753-3756.

(本文编辑:王晶)