

原花青素对小鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制*

张文艳^{1,2**}, 孙宝飞¹, 余资江^{1***}, 余彦¹, 肖朝伦¹, 罗时鹏¹, 令狐艳¹, 杨丹¹

(1. 贵阳医学院 解剖学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 呼吸内科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨原花青素对小鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制。方法: 120只昆明小鼠随机分成正常对照组、假手术组、14 d模型组、14 d治疗组、28 d模型组、28 d治疗组; 采用小鼠双侧颈总动脉结扎缺血15 min、再灌注15 min, 反复3次构建脑缺血再灌注损伤模型; 各治疗组在处死前7 d连续给予松树皮提取物灌胃治疗, 其余各组灌注等量生理盐水, 小鼠处死后取各组海马组织用ELISA法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白介素-6 (IL-6) 的表达, western blot法检测海马内核因子- κ B (NF- κ B) 的表达。结果: 各治疗组脑组织 TNF- α 、IL-6 及 NF- κ B 蛋白表达水平与同时点模型组比较均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 原花青素对脑缺血再灌注损伤小鼠神经保护机制可能是通过降低 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 表达而实现。

[关键词] 脑缺血; 再灌注损伤; 原花青素; 炎症; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-6; 核因子- κ B

[中图分类号] R743.3; R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)04-0352-04

The Protective Effect of Procyanidins on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Mice

ZHANG Wenyan^{1,2}, SUN Baofei¹, YU Zijiang¹, YU Yan¹, XIAO Chaolun¹,
LUO Shipeng¹, LINGHU Yan¹, YANG Dan¹

(1. Department of Anatomy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Respiratory, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the protective effect and possible mechanism of procyanidins on cerebral ischemia reperfusion injury in mice. **Methods:** One hundred and twenty healthy Kunming mice were randomly divided into 6 groups: the normal control group, sham operation group, 14-day model group, 28-day model group, 14-day treatment group and 28-day treatment group. The model of cerebral ischemia reperfusion injury was constructed by gripping bilateral carotid artery of mice for 15 minutes, and conducting reperfusion for another 15 minutes and repeating the above process 3 times. The treatment group was continuously given procyanidins by intragastric administration for 7 days before execution, and other groups were given the same amount of normal saline by intragastric administration. The hippocampal tissue of mice was taken. ELISA was adopted to determine the expression of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) and the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B), and western blotting was adopted to observe the expression of NF- κ B. **Results:** Compared with the model group, in each treatment group TNF- α and IL-6 protein expressions in mice brain tissue were decreased significantly ($P < 0.05$). NF-kappa B protein expressions of hippocampal tissues in treatment group were decreased significantly compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Procyanidins can protect hippocampal neurons and reduce the inflammation in cerebral ischemia reperfusion injury of mice, and the mechanism may be related to reduce the expression of NF- κ B, TNF- α and IL-6.

* [基金项目] 国家自然科学基金 (NO:81060108); 贵州省科技厅社会发展攻关项目 [黔科合 SY 字(2012)3144 号]

** 贵阳医学院 2012 级硕士研究生

*** 通讯作者 E-mail: yzj0112@126.com

网络出版时间: 2015-04-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150420.1907.017.html>

[**Key words**] brain ischemia; reperfusion injury; procyanidin; inflammation; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6; nuclear factor- κ B

松树皮提取物中含有大量原花青素(oligomeric proanthocyanidins, OPCs)的化合物, OPCs 具有抗炎、抗氧化及抗血小板聚集及改善学习记忆能力作用^[1-3]。海马内核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在脑缺血后可被诱导激活, NF- κ B 通过调控多种基因的表达参与了多种细胞因子和炎症介质的转录调节, 在缺血性脑损伤中具有重要作用。NF- κ B 作为脑缺血损伤的治疗靶点, 对有效防治脑缺血炎症具有重要的理论和临床意义^[4]。目前中药在治疗脑缺血炎症方面虽已有许多报道, 但中药作用于 NF- κ B 信号转导途径的研究还较少。本实验采用 OPCs 治疗缺血再灌注模型小鼠, 探讨 OPCs 对缺血再灌注损伤后小鼠脑海马神经元的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年昆明种小白鼠 120 只, 体重 20~22 g, 由贵阳医学院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(黔)2002-0001。按随机分组原则将 120 只小鼠分为正常对照组、假手术组、14 d 模型组、14 d 治疗组、28 d 模型组和 28 d 治疗组, 每组 20 只。饲养温度 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度 48%~60%。

1.2 动物模型建立

各组小鼠常规饮食, 术前 12 h 禁食, 4 h 禁水。小鼠以 3.5% 水合氯醛(10 mL/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 常规消毒, 自下颌骨到胸骨柄间作 5~8 mm 长的颈部正中切口, 游离双侧颈总动脉及伴行神经, 夹闭双侧颈总动脉, 缺血 15 min, 然后松开微动脉夹, 恢复血液灌注 15 min, 反复 3 次造成小鼠脑缺血再灌注损伤, 苏醒前小鼠保温。术后连续 3 d 给予青霉素 2 000 000 U 肌注抗炎, 分笼饲养。假手术组除不夹闭颈总动脉外, 其余操作同模型组。治疗组在处死前 7 d 给予 OPCs(100 mg/kg)灌胃治疗, 1 次/d, 正常对照组、假手术组、模型组灌注等量生理盐水。

1.3 海马组织炎症因子测定

每组取 10 只小鼠海马组织匀浆离心后取上清液, 采用 ELISA 法测定肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及白介素-6(interleukin-6,

IL-6)水平, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 海马 CA3 区 NF- κ B 蛋白表达

Western blot 法检测, 每组各取 10 只小鼠断颈处死取出全脑分离出海马, 切取双侧海马 CA3 区组织, 称重, 以 1:10 加入 4 $^\circ\text{C}$ 预冷的匀浆缓冲液后抽提核蛋白, 恒温冷冻离心机 4 $^\circ\text{C}$, 14 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, Bradford 法测定蛋白含量, 加等体积的 2 \times 电泳样品缓冲液混合, 以 1 g/L 蛋白量上样, 10% SDS-PAGE 电泳分离后电转膜至硝酸纤维素膜, 膜片以 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗(NF- κ Bp65 单克隆抗体) 4 $^\circ\text{C}$ 过夜, 洗涤后与二抗-辣根过氧化物酶(HRP)交联物反应, 强化学发光试剂(ECL)显色剂显色, 以柯达医学专用胶片曝光, 手工显影、定影、洗片, 显现特定的蛋白信号条带。BIO-RAD 生物图像处理系统(PDQUEST 6.1.1)进行灰度测定。按目的蛋白灰度值与相应 β -actin 灰度值计算每例标本相应指标的相对值。

1.5 统计学处理

数据用 SPSS 11.5 软件处理, 数据结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

造模后观察到模型组小鼠出现惊厥、呼吸深慢、心跳加快等脑缺血模型特异性表现。表明造模成功。

2.2 海马组织中 NF- α 、IL-6 蛋白表达

ELISA 结果显示, 假手术组与正常对照组结果无差异($P > 0.05$), 各模型组小鼠 TNF- α 、IL-6 蛋白表达水平明显高于假手术组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 模型组中, 14 d 组升高更明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 各治疗组 TNF- α 、IL-6 水平低于同期模型组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 海马组织 CA3 区 NF- κ B 蛋白表达

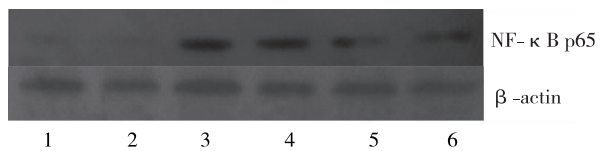
假手术组海马 CA3 区 NF- κ B 蛋白水平与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 各模

型组 NF-κB 蛋白水平显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$);各治疗组低于同期模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

表 1 各组小鼠海马组织中 TNF-α、IL-6 及 NF-κB 蛋白表达
Tab. 1 The protein expressions of TNF-α, IL-6 and NF-κB in hippocampal tissues of mice in each group

组别	n	炎症因子(ng/L)		NF-κB
		TNF-α	IL-6	
正常对照组	10	128.94 ± 7.31	145.56 ± 8.45	0.06 ± 0.01
假手术组	10	127.35 ± 3.50	154.77 ± 6.47	0.07 ± 0.01
14 d 模型组	10	191.92 ± 7.26 ⁽¹⁾	250.31 ± 11.24 ⁽¹⁾	0.31 ± 0.04 ⁽¹⁾
14 d 治疗组	10	162.68 ± 2.27 ⁽¹⁾⁽²⁾	231.54 ± 8.69 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.25 ± 0.06 ⁽¹⁾⁽²⁾
28 d 模型组	10	175.05 ± 5.24 ⁽¹⁾	221.06 ± 10.35 ⁽¹⁾	0.24 ± 0.02 ⁽¹⁾
28 d 治疗组	10	146.64 ± 5.14 ⁽¹⁾⁽²⁾	194.27 ± 7.83 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.19 ± 0.03 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与假手术组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与同期模型组比较, $P < 0.05$



注:1、2、3、4、5 及 6 分别为正常对照组、假手术组、14 d 模型组、28 d 模型组、14 d 治疗组及 28 d 治疗组
图 1 各组小鼠海马组织 CA3 区 NF-κB 蛋白表达(Western blot)

Fig. 1 Expressions of NF-κB in CA3 region in hippocampal tissues of mice in each group

3 讨论

脑缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury)引起缺血组织一系列复杂的病理生理变化,涉及自由基产生、氧化应激、钙超载、兴奋性氨基酸毒性、炎性细胞因子损害和细胞凋亡等多个方面。NF-κB 是一类具有多向调节作用的核蛋白因子,当中枢神经系统缺血时,可被特异性激活,从而调控多种基因的表达,参与免疫、炎症、氧化应激、细胞凋亡等多种病理生理过程,与缺血再灌注损伤关系密切^[5]。NF-κB 存在于脑血管内皮细胞、神经元和神经胶质细胞中,是由 p50 和 p65 两个亚单位组成的异二聚体。NF-κB 未激活时与抑制蛋白 IκB 结合后位于胞质,在某些刺激因素作用下 IκB 降解,并与 NF-κB 解离后被激活,进入胞核与特定基因启动子结合,调控基因的转录^[6]。多种炎症递质

基因的启动子和增强子中包含 κB 位点,如 TNF-α、IL-1β、IL-2、IL-6 和 IL-12、血管细胞黏附分子-1、干扰素-γ 等,这些因子促进炎症反应,最终促使神经细胞从早期缺血到细胞死亡的不可逆损害演变,加重脑损伤,炎性细胞因子在缺血再灌注后所引发的继发性损伤起关键作用^[6]。

脑缺血早期 TNF-α 分泌的增加是缺血再灌注损伤形成的主要原因^[7],TNF-α 又可诱导 IL-6 的合成。本研究证实脑缺血后 NF-κB 蛋白表达水平明显升高,14 d 模型组高于 28 d 模型组,可能与机体自身修复有关,提示 NF-κB 是脑缺血再灌注损伤炎症机制中的一个关键性因子,在脑缺血中发挥重要作用。在脑缺血再灌注损伤后 TNF-α、IL-6 蛋白表达水平明显升高,提示脑缺血再灌注后损伤机制可能与此有关。

从松树皮中提取的 OPCs 是一种多酚类复合物,含量一般为 80% 左右,OPCs 通过抗氧化、抗凋亡等途径发挥改善脑缺血再灌注损伤的作用^[8-11]。李建玲等^[12]研究发现,OPCs 可以通过下调凋亡相关蛋白 caspase-3 对脑缺血产生保护作用。杨东斌^[13]发现 OPCs 能够明显改善脑缺血再灌注损伤,IL-6 和内皮素-1 可能与其减轻炎症反应有关。本研究采用 OPCs 治疗脑缺血再灌注损伤小鼠后,蛋白印迹结果显示海马 CA3 区 NF-κB 蛋白水平与同期模型组比较均降低,炎性因子 TNF-α 和 IL-6 水平均较同期模型组小鼠低,说明 OPCs 治疗对核因子 NF-κB 的表达具有明显的抑制作用,对小鼠缺血再灌注产生了一定的保护作用。提示如能通过某些方法、途径或药物来抑制 NF-κB 的激活,可有效地预防和治疗脑缺血再灌注损伤。抗 NF-κB 产生可能为预防和治疗脑缺血再灌注损伤提供一个新的思路和途径。

4 参考文献

[1] Ren C, Gao M, Dornbos D, et al. Remote ischemic post-conditioning reduced brain damage in experimental ischemia-reperfusion injury[J]. Neurol Res, 2011(5):514-519.
[2] Terra X, Valls J, Vitrac X, et al. Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264. 7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2007(11):4357-4360.
[3] 钟书辉,张艳,李乐雯. 原花青素对心肌缺血再灌注大鼠血清 T-AOC、CRP 及 NO 的影响[J]. 中国生化药物

- 杂志, 2011(3): 228-229.
- [4] Chen B, Liao WQ, Xu N, et al. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action [J]. *Brain Res*, 2009(4):129-137.
- [5] Crack PJ, Taylor JM, Ali U, et al. Potential contribution of NF-kappaB in neuronal cell death in the glutathione peroxidase-1 knockout mouse in response to ischemia-reperfusion injury [J]. *Stroke*, 2006(6):1533-1538.
- [6] Ridder DA, Schwaninger M. NF-κB signaling in cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2009(3):995-1006.
- [7] Clark IA, Alleva LM, Vissel B, et al. The roles of TNF in brain dysfunction and disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2010(3):519-548.
- [8] 段国平, 刘晓利, 赵丕文. 葡萄籽原花青素的药理学研究进展 [J]. *环球中医药*, 2014(4):313-316.
- [9] 顾冰. 原花青素在 D-半乳糖致衰老大鼠大脑、心脏组织中的抗氧化作用 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2011(22):1-3.
- [10] 吴岚, 刘开祥, 俸军林, 等. 原花青素对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性和自由基含量的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009(7):801-803
- [11] Annapurna A, Ansari MA, Manjunath PM, Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013(4):491-500
- [12] 李建玲, 何斌, 李琳琳. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2011(6):463-466.
- [13] 杨东斌, 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织中 TL-6 和 ET-1 的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2013(9):44-45.
- (2015-01-12 收稿, 2015-03-09 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

(上接第 348 页)

综上所述,应用阻断小鼠肠系膜上动脉 40 ~ 50 mm 再灌注 6 h,既能保证动物生存率,满足实验要求,又能形成肠道及远隔器官损伤及功能障碍,为进一步研究肠缺血再灌注诱发 MODS 发病机制的提供依据。

4 参考文献

- [1] Harward TR, Brooks DL, Flynn TC, et al. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization [J]. *J Vasc Surg*, 1993(18):459-469.
- [2] 朱枝祥, 陈丁丁. 肠系膜动脉缺血再灌注诱发多器官功能障碍综合征模型研究 [J]. *抗感染药学*, 2010(2):93-96.
- [3] 宋富波, 杨牟, 车海杰. 兔急性肠道缺血再灌注损伤模型的建立 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2010(2):166-170.
- [4] 郑德义, 王建明, 贾一韬, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在小鼠肠缺血再灌注肺损伤中的作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2010(3):254-257.
- [5] Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, et al. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion [J]. *J Appl Physiol*, 2001(4):1800-1807
- [6] Yao Y, Yu Y, Wu Y, et al. The role of gut as a cytokine-generating organ in remote organ dysfunction after intestinal ischemia and reperfusion [J]. *Chin med J*, 1998(6):514-518.
- [7] 王敏, 俞诗源, 刘佳昕, 等. X 射线辐射对小鼠肾组织中乳酸脱氢酶、Na⁺ - K⁺ ATP 酶活性及 caspase-3 蛋白、Bax 蛋白表达的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2014(2):41-47.
- (2015-01-23 收稿, 2015-03-11 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

(上接第 351 页)

- [8] 翁霞, 辛光, 李云霞. 蒽酮比色法测定马铃薯淀粉总糖的条件研究 [J]. *食品研究与开发*, 2013(17):86-88.
- [9] 郭雷, 吕明生, 王淑军等. 苯酚-硫酸法测定樱桃酒中总糖 [J]. *食品研究与开发*, 2010(6):130-132.
- [10] 陈焕娜, 刘洋, 赵晓霞, 等. 分光光度法测定丹参总酚含量方法的研究 [J]. *亚太传统医药*, 2010(8):19-22.
- [11] 陈农, 丁宁, 彭国平, 等. 两种方法测定丹参滴注射液糖类含量 [J]. *医药导报*, 2013(5):672-674.
- [12] 阮鸣. 冠心宁注射液中大类成分的含量测定 [J]. *南京晓庄学院学报*, 2013(3):71-75.
- [13] 李萌, 刘新国, 吴金虎, 等. 前愈合方中多糖成分的提取工艺优选 [J]. *中国医院药学杂志*, 2011(24):2018-2021.
- [14] 孙淑玲, 刘坤, 杨新涛. 关于食品中总糖测定中几个问题的探讨 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013(13):2852-2853.
- (2014-09-25 收稿, 2015-02-15 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅