

芹菜素对脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复的影响及其作用机制分析

涂丰霞 陈翔 刘婵 林晓燕

【摘要】 目的 观察芹菜素对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能的影响,并探讨其相关作用机制。方法 将90只大鼠随机分为假手术组、模型组及芹菜素组。采用线栓法将模型组和芹菜素组大鼠制成左侧大脑中动脉缺血再灌注(1.5 h)模型,假手术组大鼠在制模过程中不阻断大脑中动脉血流。芹菜素组大鼠于再灌注同时及其后每24 h腹腔注射芹菜素液,假手术组及模型组大鼠则在相同时间点注射等体积生理盐水。于再灌注第24, 48, 72小时及第7天时参照 Zea longa 法评定大鼠神经功能缺损程度,同时采用光镜、电镜观察各组大鼠脑组织病理形态学改变,选用 ELISA 法测定脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 含量。结果 模型组大鼠神经功能缺损症状于脑缺血再灌注第7天时明显改善,芹菜素组大鼠神经功能缺损症状于脑缺血再灌注第72小时时即有显著提高。与假手术组比较,模型组、芹菜素组 TNF- α 和 IL-1 β 含量均显著增高 ($P < 0.01$),芹菜素组 TNF- α 、IL-1 β 含量在脑缺血再灌注第48和72小时均较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。进一步分析后发现,大鼠神经功能缺损评分均与 IL-1 β 含量、TNF- α 含量呈正相关。模型组大鼠脑皮质和海马细胞肿胀、细胞间质水肿,有空泡形成,神经细胞均有核固缩、碎裂、溶解表现。芹菜素组大鼠脑组织神经细胞轻度肿胀,细胞间质、毛细血管壁轻微水肿,神经细胞有明显核固缩、碎裂、溶解表现。结论 芹菜素能促进局部脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复,其作用机制可能与下调 TNF- α 和 IL-1 β 水平有关。

【关键词】 缺血再灌注; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 芹菜素

The effects of apigenin on the recovery of neurological function following focal cerebral ischemia and reperfusion

TU Feng-xia, CHEN Xiang, LIU Chan, LIN Xiao-yan. Brain and Rehabilitation Center, The 2nd Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325007, China

Corresponding author: CHEN Xiang, Email: Chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the effect of apigenin on the recovery of neurological function following cerebral ischemia-reperfusion and investigate its mechanism. **Methods** Ninety male Sprague-Dawley rats were randomized into a sham-operated group, a model group and an apigenin-treated group. A transient (1.5 h) focal cerebral ischemia-reperfusion model was established in the rats of the model and apigenin-treated groups. In the sham-operated rats the middle cerebral artery was not occluded. The rats in the apigenin-treated group received an intra-abdominal injection of apigenin, and the rats in the other two groups received injections of normal saline solution. Neurological behavior scores were assessed in accordance with the Zea Longa method at the 24th, 48th and 72nd hour and the 7th day after reperfusion. Cellular and sub-cellular morphology were observed with an optical microscope and an electron microscope, and the levels of TNF- α and IL-1 β were measured using ELISA. **Results** Neurological function improved by the 7th day after reperfusion in the model group, but improved significantly by the 72nd hour after reperfusion in the apigenin-treated group. Average TNF- α and IL-1 β levels in the model group and the apigenin-treated group were significantly higher than in the sham-operated group. Average TNF- α and IL-1 β levels in the apigenin-treated group were significantly lower than in the model group at the 48th and 72nd hour after reperfusion. Neurological behavior scores had a positive correlation with the IL-1 β and TNF- α levels. In the model group, obvious intracellular and intercellular edema and vacuolization were observed in the ischemic cortices and hippocampuses, with remarkable karyopycnosis and organelle broadening and dissolution and vacuolization in glial cells and neurons. In the apigenin-treated group, similar but significantly milder morphological changes were observed. **Conclusion** Apigenin can promote the recovery of neurological function in rats by downregulating the expression of TNF- α and IL-1 β following focal cerebral ischemia-reperfusion.

【Key words】 Ischemia and reperfusion; Tumor necrosis factor alpha; Interleukin-1 beta; Apigenin

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.05.009

基金项目:浙江省教育厅项目(20020448);温州市科技局项目(LHZ02022)

作者单位:325007 温州,温州医学院附属第二医院暨育英儿童医院康复中心

通信作者:陈翔,Email: Chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

近年来研究表明,脑缺血再灌注后脑组织局部过度炎症反应是造成脑缺血再灌注损伤的主要原因之一^[1];有实验发现,一些细胞因子均参与该炎症过程,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)等,它们均具有免疫调节和趋化功能,并且可促进白细胞黏附于内皮细胞表面,使白细胞自血管内向缺血脑组织迁移,加重了缺血性脑损伤^[1]。芹菜素是一种来源广泛的植物黄酮,相关研究发现它具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、神经保护、免疫调节等作用^[2]。本研究通过观察芹菜素对大鼠脑缺血再灌注后神经功能恢复的影响及其与 TNF- α 、IL-1 β 间的关系,以进一步揭示芹菜素的脑保护作用机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 主要实验试剂及仪器:芹菜素(粉剂)购自陕西慧科植物开发有限公司,纯度 98%,分子量为 270.25;使用时先用二甲基亚砷配成母液,再用生理盐水配成浓度为 11.6×10^{-3} mol/L (3.13 mg/ml) 溶液。IL-1 β 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉博士德生物有限公司;TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。主要实验仪器包括:FA2104 型电子天平(上海产)、CX21FS1 型普通光学显微镜(日本 Olympus 公司出品)、LKB-V2088 型超薄切片机(美国产)、H-7500 型透射电镜(日本产)以及 2 号尼龙渔线(日本产)。

2. 实验动物及分组:共选取健康雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠 90 只,3~4 月龄,体重(250 ± 20)g,由温州医学院动物中心提供。将上述大鼠随机分为假手术组(10 只)、模型组(40 只)及芹菜素组(40 只)。

二、实验操作方法

1. 动物模型制备:参照 Belayev 等^[1]报道的线栓法并加以改良,将模型组和芹菜素组大鼠制成左侧大脑中动脉缺血再灌注损伤模型,实验大鼠均以左侧为脑动脉栓塞侧,取 10% 水合氯醛按 3.5 ml/kg 体重进行腹腔注射麻醉,随后将大鼠仰卧位固定于手术台上;颈部正中切开皮肤及浅筋膜,钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌,暴露左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉及其分支;结扎颈外动脉及其分支,用眼科剪在颈外动脉近分叉处作一细小切口(恰好能让线栓头通过),剪断已结扎的颈外动脉及其分支,牵拉颈外动脉使其走行与颈内动脉成一直线,将渔线从颈外动脉插入,绕过颈总动脉分叉处进入颈内动脉,向颅内方向推进约 (18.0 ± 0.5) mm,微遇阻力时停止,使线栓阻断大脑中动脉起始处血流 1.5 h。当进行再灌注操作时,于大

鼠麻醉状态下缓慢轻拉线栓使其头端回缩至颈外动脉内,即可实现大脑中动脉再灌注。造模结束后将大鼠放回鼠笼内,期间自由摄食、饮水。假手术组大鼠手术操作步骤同上,但线栓只插到颈外动脉与颈内动脉分叉处,不阻断大脑中动脉血流。

2. 动物模型纳入标准及神经功能缺损评分:各组大鼠于麻醉清醒时及其后每 24 h 进行神经功能缺损评分。参照 Zea Longa 5 分制评分标准^[2]:0 分代表无神经缺损症状;1 分代表不能完全伸展对侧前肢;2 分代表行走时向偏瘫侧转圈;3 分代表行走时向偏瘫侧倾倒;4 分代表不能自发行走、意识障碍;5 分代表死亡。累积 1 分及以上即为制模成功;但凡达到 5 分、解剖时发现蛛网膜下腔出血或无神经功能缺损症状(0 分)均视为制模失败,从本研究中剔除,用来自同一批次的大鼠制成相应模型后补足数目。

3. 干预措施:芹菜素组于脑动脉再灌注同时及其后每 24 h 腹腔注射芹菜素液(按 8 ml/kg 体重),假手术组及模型组则在相同时间点注射等体积生理盐水。

三、检测指标及方法

每组大鼠于再灌注 24 h, 48 h, 72 h 及 7 d 时,取其左侧大脑半球(位于视交叉和脚间窝两个冠状切面间)约 100 mg 脑组织加入生理盐水中,并在冰浴条件下制成 10% 组织匀浆,冷冻离心 15 min (4°C , 3 000 r/min),取上清液。采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 含量,整个操作过程严格按照试剂盒说明书进行。每组于术后 24 h, 48 h, 72 h 及 7 d 时各取 2 只大鼠制成标本,分别进行光镜、电镜观察。电镜标本取材部位为大鼠左侧海马和中部大脑皮质间(即视交叉和脚间窝两个冠状切面间的脑皮质)约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 区域,经常规方法处理后进行电镜观察。光镜标本取材部位为冠状切取前凶前 1.0 mm 至前凶后 2.0 mm 范围内脑组织,经常规方法制成石蜡切片,片厚约 5 μm ,经苏木精-伊红(HE)染色后进行光镜观察。

四、统计学分析

本研究计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.5 版软件进行比较,多组间比较采用单因素方差(ANOVA)分析,组间比较采用 *t* 检验,相关性分析采用 Spearman 秩相关, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠神经功能缺损评分比较

本研究纳入分析的实验大鼠神经功能缺损评分均在 1 分或以上,各组大鼠神经功能缺损评分结果详见表 1,表中数据显示,模型组大鼠神经功能缺损评分在脑缺血再灌注 7 d 时显著下降,与之前各观察时间点评分比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);芹菜素组

神经功能缺损评分在脑缺血再灌注 72 h 时即有显著下降,与再灌注 24 h 和 48 h 时评分比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且该组大鼠再灌注 7 d 时的神经功能缺损评分仍较上一观察时间点水平继续显著降低($P < 0.05$)。组间比较后发现,在脑缺血再灌注 72 h 时,芹菜素组大鼠神经功能缺损评分较模型组显著降低,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 芹菜素对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	神经功能缺损评分
模型组		
再灌注 24 h	40	1.69 ± 0.53
再灌注 48 h	40	1.50 ± 0.58
再灌注 72 h	40	1.44 ± 0.46
再灌注 7 d	40	0.90 ± 0.57 ^{bed}
芹菜素组		
再灌注 24 h	40	1.42 ± 0.58
再灌注 48 h	40	1.25 ± 0.65
再灌注 72 h	40	0.81 ± 0.70 ^{abc}
再灌注 7 d	40	0.50 ± 0.60 ^{bed}

注:与模型组再灌注 72 h 比较,^a $P < 0.05$;与再灌注 24 h 组内比较,^b $P < 0.05$;与再灌注 48 h 组内比较,^c $P < 0.05$;与再灌注 72 h 组内比较,^d $P < 0.05$

二、大鼠脑缺血再灌注后 TNF- α 和 IL-1 β 含量分析与假手术组比较,模型组和芹菜素组 TNF- α 含量均显著升高,其中以模型组升高幅度尤为明显($P < 0.01$)。芹菜素组大鼠 TNF- α 含量于再灌注 48 h 及 72 h 时均较模型组相应水平显著降低($P < 0.05$ 或 0.01),其中以再灌注 72 h 时的降低幅度尤为显著($P < 0.01$)。模型组和芹菜素组 IL-1 β 含量均较假手术组水平明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但芹菜素组再灌注 7 d 时 IL-1 β 含量与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组大鼠再灌注 48 h 时 IL-1 β 水平较再灌注 24 h 时显著升高($P < 0.05$);芹菜素组 IL-1 β 含量于再灌注 48 h 及 72 h 时均较模型组相应水平显著降低($P < 0.05$),具体数据详见表 2。

三、大鼠神经功能缺损评分与 TNF- α 、IL-1 β 含量的相关性分析

经相关性分析后发现,大鼠神经功能缺损评分与 IL-1 β 含量呈正相关($r = 0.290, P = 0.020$);大鼠脑缺血再灌注后 48 h 和 7 d 时,其神经功能缺损评分与 TNF- α 含量呈正相关(均 $P < 0.05$)。

四、大鼠脑缺血再灌注后细胞形态学变化

模型组大鼠脑缺血再灌注后,发现各观察时间点脑皮质及海马细胞肿胀、细胞间质水肿,有空泡形成,尤以脑缺血再灌注 48 h 最为明显;其神经细胞均有核固缩、碎裂、溶解等异常表现,以脑缺血再灌注 24 h 较为显著。芹菜素组大鼠再灌注后脑组织神经细胞轻度肿胀,

细胞间质、毛细血管壁轻微水肿;神经细胞有明显核固缩、碎裂、溶解等异常表现,具体情况详见图 1~9。

表 2 芹菜素对脑缺血再灌注大鼠 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α (ng/g)	IL-1 β (ng/g)
假手术组			
	10	2.08 ± 0.60	2.90 ± 0.50
模型组			
再灌注 24 h	8	3.91 ± 0.74 ^b	4.31 ± 0.75 ^b
再灌注 48 h	8	4.14 ± 0.94 ^b	5.24 ± 0.89 ^{bd}
再灌注 72 h	8	4.72 ± 1.05 ^b	5.14 ± 1.15 ^b
再灌注 7 d	8	4.30 ± 1.22 ^b	4.39 ± 1.13 ^b
芹菜素组			
再灌注 24 h	8	3.11 ± 0.88 ^a	3.58 ± 0.51 ^a
再灌注 48 h	8	3.03 ± 0.69 ^{ac}	3.80 ± 0.73 ^{ac}
再灌注 72 h	8	3.00 ± 0.82 ^{ac}	3.84 ± 0.61 ^{bc}
再灌注 7 d	8	3.15 ± 1.13 ^a	3.25 ± 0.50

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组各相应时间点比较,^c $P < 0.05$;与再灌注 24 h 组内比较,^d $P < 0.01$

讨 论

在脑缺血和再灌注早期阶段,由受损神经元释放的细胞因子和黏附分子构成了缺血性损伤向炎性损伤转变的物质基础。在炎性反应出现之前,有介导炎性反应的细胞因子(如前炎性细胞因子)表达,随后趋化白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)释放,这些细胞因子与其它炎性代谢产物共同促使白细胞释放大量蛋白水解酶、氧自由基和其它效应分子,这是造成脑缺血再灌注损伤的重要病理机制之一^[3,4]。在这些前炎性细胞因子中,以 TNF- α 和 IL-1 β 对炎性反应的影响尤为显著^[5]。

TNF- α 具有双重、多样及网络性生物效应,在脑缺血不同阶段产生不同甚至相反的综合作用^[6]。基础量的 TNF- α 对机体正常生长发育具有重要作用,例如维持神经元和胶质细胞存活及功能等;但当机体发生脑缺血后 TNF- α 水平急剧升高,能诱发并促进炎症、细胞毒性、凝血等一系列反应,加剧脑损伤^[7]。本研究结果显示,模型组和芹菜素组受损脑区域内均有过量 TNF- α 表达,提示 TNF- α 参与了大鼠脑缺血再灌注损伤病理过程,诱发并促进炎性反应,从而产生神经毒性作用。采用芹菜素干预后,发现脑缺血大鼠 TNF- α 表达水平于再灌注 48 h 及 72 h 时明显降低,其中以再灌注 72 h 时的降低幅度尤为显著($P < 0.01$),表明芹菜素能下调脑缺血再灌注大鼠 TNF- α 表达,从而抑制炎性反应并减轻脑水肿程度。已有体外研究证实,芹菜素确实能抑制 TNF- α 表达^[8],本研究结果表明芹菜素在体内也具有抑制 TNF- α 表达的作用。

IL-1 β 是 IL-1 家族在体内的主要分泌形式,它作为机体早期产生的促炎性细胞因子,直接参与了血脑

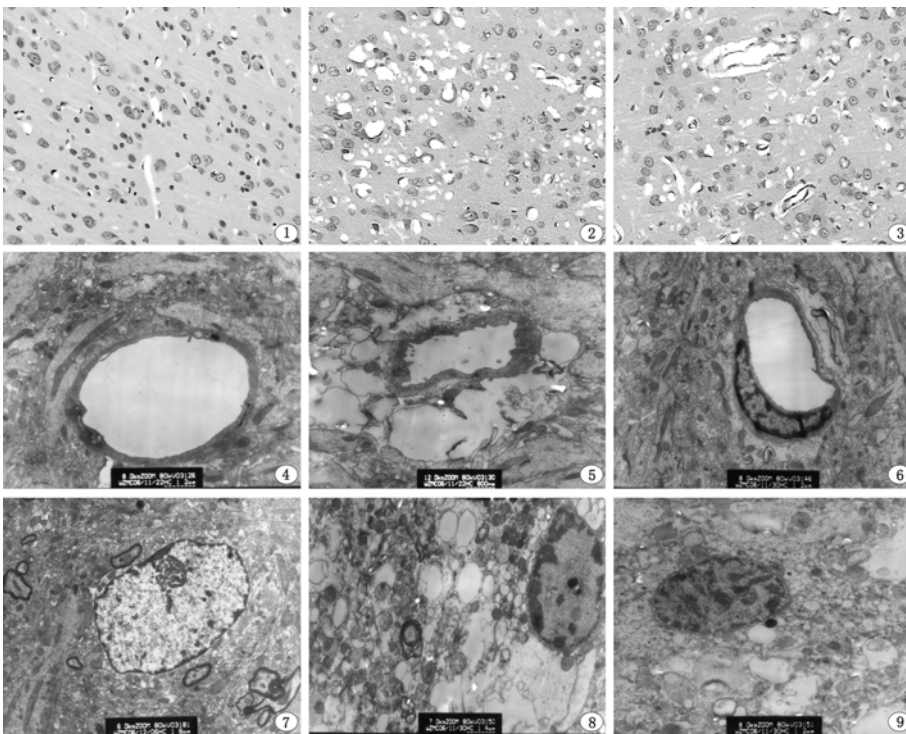


图 1 假手术组左侧大脑皮质神经细胞正常(HE 染色, ×200); 图 2 模型组再灌注 48 h 缺血侧脑皮质水肿明显, 有空泡形成(HE 染色, ×200); 图 3 芹菜素组再灌注 48 h 缺血侧脑皮质轻度水肿(HE 染色, ×200); 图 4 假手术组左侧脑皮质毛细血管正常(柠檬酸铅-醋酸铀双重染色, ×8 000); 图 5 模型组再灌注 48 h 缺血侧脑皮质毛细血管壁水肿明显(柠檬酸铅-醋酸铀双重染色, ×12 000); 图 6 芹菜素组再灌注 48 h 缺血侧脑皮质毛细血管周围轻度水肿(柠檬酸铅-醋酸铀双重染色, ×8 000); 图 7 假手术组左侧脑皮质神经胶质细胞正常(柠檬酸铅-醋酸铀双重染色, ×6 000); 图 8 模型组再灌注 24 h 缺血侧脑皮质神经胶质细胞核固缩, 胞浆水肿明显, 有空泡形成(柠檬酸铅-醋酸铀双重染色, ×7 000); 图 9 芹菜素组再灌注 24 h 缺血侧脑皮质神经胶质细胞核固缩, 胞浆水肿(柠檬酸铅-醋酸铀双重染色, ×8 000)

屏障破坏、脑水肿形成以及诱导其它炎性介质大量表达等病理过程, 导致炎症反应及细胞因子表达失控^[9], 最终造成脑缺血后继发性损伤。

本研究观察了 IL-1β 在脑缺血再灌注不同时间后的动态变化过程, 发现假手术组大鼠脑组织中 IL-1β 含量较低, 模型组缺血侧脑组织中 IL-1β 含量明显增加, 推测脑缺血后机体合成、分泌 IL-1β 能力迅速增强, 促进了其它炎性细胞因子(如 TNF-α 等)分泌, 后者又反馈性加强了机体合成分泌 IL-1β, 由此造成局部脑组织 IL-1β 含量持续升高, 从而诱导血管内皮细胞黏附分子表达, 促进中性粒细胞浸润, 最终引发一系列脑缺血性损伤, 因此推测阻断或抑制 IL-1β 表达及合成可能对减轻脑缺血损伤具有重要意义。本研究发现脑缺血大鼠经芹菜素干预后, 其 IL-1β 含量在脑缺血再灌注 48 h 及 72 h 时均较同观察时间点模型组显著降低($P < 0.05$), 表明芹菜素能下调脑缺血组织中 IL-1β 表达, 从而减轻脑缺血性损伤。目前有体外研究已证实芹菜素能抑制 IL-1β 表达^[10], 本研究通过体内实验也发现芹菜素具有抑制 IL-1β 表达的作用。

综上所述, 本研究结果表明大鼠神经功能缺损评分与机体 IL-1β 含量呈正相关; 大鼠脑缺血再灌注 48 h 和 7 d 时神经功能缺损评分与 TNF-α 含量呈正相关, 提示大鼠脑缺血再灌注后炎性细胞因子表达增强, 诱发缺血后炎症反应, 加重神经缺损症状; 经芹菜素治疗后, 实验大鼠神经缺损症状均有明显改善, 以脑缺血再灌注 72 h 时改善幅度最为显著, 提示芹菜素可能通过减少炎性细胞因子产生, 抑制脑缺血再灌注后炎症反

应, 但其确切机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Belayev L, Alonso OA, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture; neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*, 1996, 27: 1616-1623.
- [2] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [3] Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*, 2001, 14: 89-94.
- [4] 高鹏, 夏成青, 王佩燕, 等. 葛根素对全脑缺血再灌注后脑组织诱导型一氧化氮合酶影响的实验研究. *中华急诊医学*, 2001, 10: 85-86.
- [5] Wang X, Barone FC, Aiyar NV, et al. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. *Stroke*, 1997, 28: 155-161.
- [6] Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med*, 2002, 8: 1363-1368.
- [7] Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, et al. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kappaB transactivation; the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 142-152.
- [8] Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-alpha production. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 119-125.
- [9] Gibson RM, Rothwell NJ, Le RA, et al. CNS injury; the role of the cytokine IL-1. *Vet J*, 2004, 168: 230-237.
- [10] Kowalski J, Samoedny A, Paul M, et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774. 2 macrophages. *Pharmacol Rep*, 2005, 57: 390-394.

(收稿日期: 2008-08-29)

(本文编辑: 易 浩)