

- 2011,17(19):2961-2963.
- [9] 郭庆军,王桂敏,张秀秀.淫羊藿苷预处理对心肌缺血再灌注损伤炎症反应的影响[J].中国病理生理杂志,2013,29(11):2034-2038.
- [10] 许官学,石蓓,盛瑾,等.改良大鼠急性心肌梗死模型的制备方法[J].中国老年学杂志,2013,33(14):3367-3370.
- [11] 史婷婷,白建平,梁月琴,等.芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J].中国药理学通报,2011,27(5):666-671.
- [12] OGURA T,TANAKA Y,TAMAKI H, et al .Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptosis caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells[J].Int J Oncol,2016,48(6):2330-2338.
- [13] 张春玲,吴立军,左海军,等.冬凌草甲素通过改变 Bax/Bcl-xL 表达激活 caspase-3 诱导 A375-S2 细胞凋亡[J].中国药理学通报,2004,20(6):669-672.
- [14] SAEEDI BORUJENI M J,HAMI J,HAGHIR H, et al .Evaluation of Bax and Bcl-2 proteins expression in the rat hippocampus due to childhood febrile seizure[J].Iran J Child Neurol,2016,10(1):53-60.

(收稿日期:2018-02-24)

(本文编辑 薛妮)

苦参素对大鼠全脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究

余 婷¹,韩亚非²



摘要:目的 探讨苦参素对大鼠全脑缺血再灌注后脑组织的保护作用。方法 通过夹闭血管 20 min 复制大鼠全脑缺血再灌注模型并随机分为假手术组(0.9%氯化钠溶液)、模型组(0.9%氯化钠溶液)和苦参素低剂量组[25 mg/(kg·d)]、中剂量组[50 mg/(kg·d)]、高剂量组[100 mg/(kg·d)],各 20 只。术前 10 min 腹腔注射给药,再灌注 6 h 后检测相关指标,记录翻正反射及脑电恢复时间,计算脑组织含水量,通过苏木精-伊红(HE)染色、末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导 dUTP 切口末端标记(TUNEL)法分别观察海马 CA1 区神经元形态及凋亡状况;测定海马组织炎症细胞因子含量,生化分析脑组织抗氧化酶活性和丙二醛(MDA)含量。结果 与模型组比较,苦参素中剂量组、高剂量组翻正反射和脑电恢复时间均显著缩短($P < 0.01$),脑组织含水量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),海马 CA1 区神经元病理性形态结构变化和凋亡状况均明显改善,凋亡指数显著降低($P < 0.01$),炎症细胞因子[白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)]活性升高,MDA 含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 苦参素对全脑缺血再灌注损伤具有保护作用,可能与抑制氧化应激和炎症反应有关。

关键词:脑缺血再灌注损伤;大鼠;苦参素;氧化应激;细胞凋亡;炎症因子

中图分类号:R741 R285.5 文献标识码:A doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2019.12.011

Protective Effects of Oxymatrine on Global Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

YU Ting,HAN Yafei

Handan Hospital of Traditional Chinese Medicine,Handan 056001,Hebei,China

Abstract Objective To explore the protective effect of oxymatrine on global cerebral ischemia-reperfusion in rats.**Methods** The rat models of global cerebral ischemia-reperfusion were replicated by clamping the four vessels for 20 minutes and were randomly assigned to sham group (0.9% sodium chloride solution),model group (0.9% sodium chloride solution)and oxymatrine low dose group [oxymatrine 25 mg/(kg·d)],medium dose group [oxymatrine 50 mg/(kg·d)],and high dose group [oxymatrine 100 mg/(kg·d)], $n = 20$.The drugs were given by intraperitoneal injection 10 minutes before operation.Six hours after reperfusion,the time of righting reflex and EEG recovery were recorded.Content of water in brain was measured.The morphological changes of neurons in hippocampus CA1 region were observed by HE Staining.The cell apoptosis was observed after TUNEL staining.The levels of inflammatory factors, antioxidant enzymes,and malondialdehyde (MDA) in hippocampus tissue were measured.**Results** Compared with the model group, the time of righting reflex and EEG recovery,content of water in brain of medium dose groups and high dose groups were significantly reduced($P < 0.05$ or $P < 0.01$).Hippocampal CA1 neuronal pathological changes and apoptosis were significantly improved($P < 0.05$ or $P < 0.01$).The apoptosis index (AI)was significantly decreased($P < 0.01$).Inflammatory factors [interleukin(IL)-1 β ,IL-6,tumor necrosis factor- α (TNF- α)]were significantly reduced($P < 0.05$ or $P < 0.01$),antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD),and catalase (CAT)] activity were significantly improved and malondialdehyde (MDA) was decreased($P < 0.05$ or $P < 0.01$).**Conclusion** Oxymatrine has protective effects on global cerebral ischemia-reperfusion injury,which may be related to inhibition of oxidative stress and inflammatory response.

Keywords:ischemia-reperfusion injury;rats;oxymatrine;oxidative stress;apoptosis;inflammation factors

基金项目 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(No.1723208007ZC)

作者单位 1.邯郸市中医院(河北邯郸 056001),E-mail:ffyzhq@163.com;2.邯郸市中心医院

引用信息 余婷,韩亚非.苦参素对大鼠全脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(12):1807-1810.

外科手术、心脏骤停、窒息等导致低压、低氧常引发全脑缺血^[1],目前临床以药物或介入手术溶栓为主要治疗方案,但再灌注损伤极大地影响病人预后,其机制与炎症、氧化应激及细胞凋亡有关^[2-3]。现代药学研究发现,苦参素为喹诺西啉类生物碱,是一类具有抗炎、抗凋亡活性的中药提取物^[4-5],但苦参素对全脑缺血再灌注损伤影响的相关报道较少,本研究探讨苦参素对大鼠全脑缺血再灌注后脑组织的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠(雌雄不限)由河北医科大学实验动物中心提供[SCXK(冀)2013-1-003]。

1.2 实验药物与试剂 苦参素(南京泽朗医药科技有限公司,批号:20170114);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒和末端脱氧核苷酰基转移酶介导 dUTP 切口末端标记(TUNEL)试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司,批号:170129、170312、170116、170324;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批号:20170309、20170413、20170114。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、给药与模型制备 采用随机数字表法将 100 只 SD 大鼠随机分为假手术组(0.9%氯化钠溶液)、模型组(0.9%氯化钠溶液)和苦参素低剂量组[25 mg/(kg·d)]、中剂量组[50 mg/(kg·d)]、高剂量组[100 mg/(kg·d)],每组 20 只。术前 10 min 腹腔注射相应浓度药物,实施麻醉后通过夹闭四动脉(双侧椎动脉和双侧颈动脉)制备全脑缺血大鼠模型,造模成功标志:脑电图波幅下降正常 25% 以下、翻正反射消失、瞳孔颜色变灰白,夹闭四动脉 20 min;假手术组不夹闭四动脉,其余操作同模型组^[6]。

1.3.2 翻正反射和脑电恢复时间记录 应用 BL-420E 型生物机能实验系统记录大鼠翻正反射恢复时间;记录脑电振幅恢复到正常 75% 时间,即脑电恢复时间。

1.3.3 脑组织含水量 各组随机取 6 只大鼠,麻醉后取脑并去除小脑和脑干,称重为湿重;用锡纸包裹后置 110 °C 干燥箱烘烤至恒重,称重为干重,脑组织含水量=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.3.4 海马 CA1 区病理学检查及神经元凋亡观察 每组随机取 6 只大鼠,麻醉后取脑并去除小脑和脑干后置于浓度 4% 多聚甲醛溶液固定 72 h,之后进行石蜡包埋和切片,切片厚度约 2 μ m,经二甲苯透明、脱蜡水化处理,进行苏木精-伊红(HE)染色,梯度乙醇脱水后封片,最后通过光学显微镜观察海马 CA1 区组织细胞病理学改变。取石蜡切片并脱蜡水化处理,按照 TUNEL 试剂盒操作说明步骤进行,通过光学显微镜观察细胞凋亡状况,计算视野内细胞总数和凋亡细胞数,每张切片均取 5 个不重叠的视野并分别计数后取平均值,计算凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数/细胞总数)×100%。

1.3.5 海马组织炎症细胞因子含量、抗氧化酶活性和 MDA 含量 取各组剩余 8 只大鼠,麻醉后取脑组织并剥取海马组织,于冰上剪碎后加入适量冷裂解液后行研磨匀浆,4 °C 条件下,12 000 r/min 离心,取上清液,之后按照各试剂盒操作方法测定炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量和抗氧化酶 SOD、CAT 活性和 MDA 含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验,检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠翻正反射和脑电恢复时间、脑含水量比较 与模型组比较,苦参素中剂量组、高剂量组翻正反射和脑电恢复时间均显著缩短($P < 0.01$)。模型组脑组织翻正反射恢复时间、脑电恢复时间和脑含水量较假手术组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,苦参素中、高剂量组脑含水量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 1。

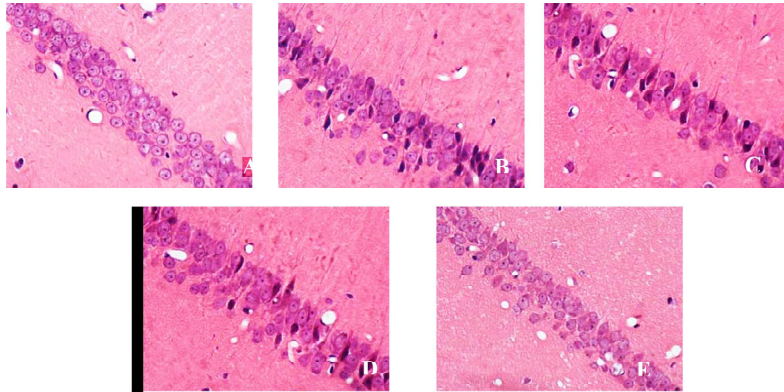
表 1 各组大鼠翻正反射和脑电恢复时间、脑含水量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	翻正反射恢复时间(min)	脑电恢复时间(min)	脑含水量(%)
假手术组	0.0±0.0	0.0±0.0	77.2±0.6
模型组	26.9±7.4 ¹⁾	25.0±7.1 ¹⁾	80.1±0.7 ¹⁾
苦参素低剂量组	25.0±8.1	22.6±7.8	79.3±1.0
苦参素中剂量组	22.1±7.2 ³⁾	17.9±6.7 ³⁾	78.7±0.9 ²⁾
苦参素高剂量组	18.5±6.0 ³⁾	15.5±5.2 ³⁾	77.9±0.6 ³⁾

与假手术组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$

2.2 海马 CA1 区神经元形态结构 假手术组未见异常;模型组海马 CA1 区神经元数量减少、排列稀疏、层次紊乱,胞体肿胀或空泡变性,核固缩或溶解、核膜不

清等病理性改变;苦参素干预能改善全脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区神经元病变,以高剂量组最显著。详见图 1。

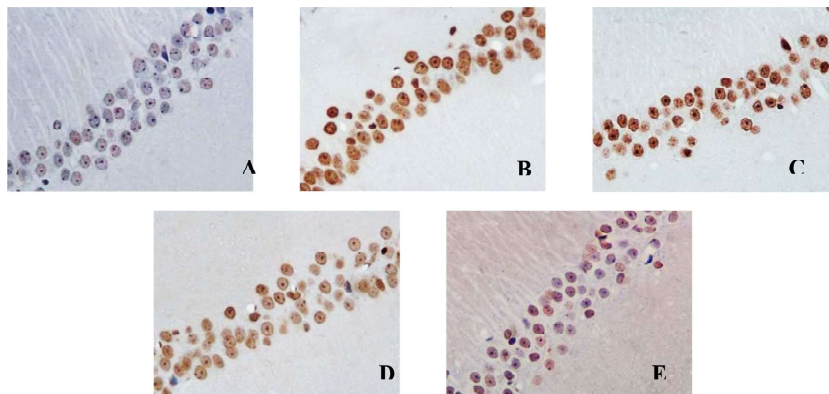


A 为假手术组;B 为模型组;C 为苦参素低剂量组;D 为苦参素中剂量组;E 为苦参素高剂量组

图 1 各组大鼠大脑海马 CA1 区神经元形态结构(HE, ×400)

2.3 海马 CA1 区神经元凋亡状况 假手术组仅见少量凋亡神经元;模型组凋亡神经元数量明显多于假手术组;与模型组比较,苦参素能减少神经元凋亡,以高剂量组最显著。详见图 2。模型组 AI 高于假手术组

[(64.8±8.3)%与(2.3±0.9)%, $P < 0.01$];与模型组比较,苦参素中、高剂量组 AI 明显降低[(41.2±7.0)%、(15.8±3.6)%与(64.8±8.3)%, $P < 0.01$]。



A 为假手术组;B 为模型组;C 为苦参素低剂量组;D 为苦参素中剂量组;E 为苦参素高剂量组

图 2 各组大鼠大脑海马 CA1 区神经元凋亡状况(TUNEL, ×400)

2.4 各组大鼠海马组织炎症细胞因子含量比较 模型组炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量较假手术组均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,苦参素中剂量组、高剂量组炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 2。

2.5 各组大鼠海马组织抗氧化酶活性和 MDA 含量比较 模型组抗氧化酶(SOD、CAT)活性较假手术组降低($P < 0.01$),MDA 含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,苦参素中剂量组、高剂量组 SOD、CAT 活性增高且 MDA 含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 3。

表 2 各组大鼠海马组织炎症细胞因子含量比较($\bar{x} \pm s$)

nmol/L

组别	只数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	8	512.4±36.1	101.3±14.5	24.8±4.7
模型组	8	931.1±90.9 ¹⁾	213.4±25.0 ¹⁾	55.9±7.1 ¹⁾
苦参素低剂量组	8	870.2±88.5	188.6±28.7	49.4±6.0
苦参素中剂量组	8	714.9±67.3 ²⁾	167.5±21.9 ²⁾	44.1±6.4 ²⁾
苦参素高剂量组	8	684.6±71.2 ³⁾	132.8±17.9 ³⁾	37.1±5.7 ³⁾

与假手术组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$

表 3 各组大鼠海马组织抗氧化酶活性和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SOD(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	MDA(μ mol/g prot)
假手术组	8	175.2±9.0	5.1±1.2	16.7±2.9
模型组	8	139.8±8.4 ¹⁾	2.9±0.8 ¹⁾	29.4±5.2 ¹⁾
苦参素低剂量组	8	144.1±8.2	3.2±1.1	26.0±4.3
苦参素中剂量组	8	148.7±8.8 ²⁾	4.0±1.5 ²⁾	19.8±3.5 ²⁾
苦参素高剂量组	8	159.6±9.7 ³⁾	4.3±1.6 ³⁾	17.1±3.5 ³⁾

与假手术组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$

3 讨论

氧化应激、炎症及神经元凋亡在再灌注损伤发生发展中发挥重要作用^[2-3,7],其作为靶点已成为防治缺血再灌注损伤新型药物研发热点。苦参素是中药苦参的主要有效成分之一,王雪芬等^[8]研究发现苦参素具有扩张血管、改善微循环的药理学作用,苦参素通过抑制氧化应激、细胞凋亡表现出对心肌缺血再灌注损伤的保护作用^[8-9];贾昌盛等^[10]研究发现苦参素通过调控机体抗氧化系统对肾脏缺血-再灌注损伤起到一定保护作用;高鹏^[11]研究发现苦参素通过抑制细胞凋亡而保护肝脏缺血再灌注。既往关于苦参素对全脑缺血再灌注损伤影响文献的报道尚不多见。

本研究采用与人类病理特点接近的四动脉夹闭法制备全脑缺血再灌注大鼠模型^[12]展开研究,海马是对脑缺血最敏感的区域之一,尤其是 CA1 区的锥体细胞层^[13],因此本研究以大脑海马 CA1 区为组织损伤及改善观察区域。本研究结果显示,中、高剂量苦参素预处理能有效缩短翻正反射和脑电恢复时间、降低脑组织含水量、抑制海马 CA1 区病变并抑制该区域神经元凋亡,提示苦参素对全脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

氧自由基代谢失衡是导致细胞膜不饱和脂肪酸氧化破坏等氧化应激损伤的根源,其代谢失衡,在体内蓄积与抗氧化酶(SOD、CAT)过度消耗有关^[14];MDA 为不饱和脂肪酸氧化应激损伤终产物之一,其含量间接反映氧化应激损伤程度^[15]。炎症细胞因子是临床监测炎症反应的常用指标。本研究结果显示,中、高剂量苦参素预处理能有效提高海马组织 SOD、CAT 活性并降低 MDA 含量,降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量,提示苦参素对全脑缺血再灌注损伤后氧化应激损伤及炎症反应具有一定的抑制作用。

综上所述,苦参素对全脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抑制氧化应激和炎症反应有关。

参考文献:

- [1] HARUKUNI I, BHARDWAJ A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia[J]. *Neurol Clin*, 2006, 24(1): 1-21.
- [2] 张予阳, 刘岩, 付守廷. 脑缺血与炎症反应[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(1): 5-9.
- [3] 刘超, 刘敬霞, 任非非, 等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤的实验研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(2): 481-484.
- [4] 黄秀梅, 李波. 氧化苦参碱对 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的影响[J]. *中成药*, 2003, 25(11): 903-906.
- [5] 孔秀岩, 苏志刚. 氧化苦参碱对细胞凋亡影响的研究现状[J]. *河北医药*, 2007, 29(12): 1371-1373.
- [6] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.
- [7] ZHENG Z, YENARI M A. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. *Neurol Res*, 2004, 26(8): 884-892.
- [8] 王雪芬, 王磊, 陈树杰. 苦参素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(6): 988-992.
- [9] 陈树杰. 苦参素对心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(5): 476-485.
- [10] 贾昌盛, 孙建军, 李美德, 等. 苦参素降低大鼠肾脏缺血-再灌注损伤[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(8): 943-947.
- [11] 高鹏. 苦参素抗大鼠肝脏缺血再灌注损伤作用的研究[J]. *当代医学*, 2010, 16(14): 15-17.
- [12] 赵勇, 崔淑芳, 汤球. 血管性痴呆动物模型研究进展[J]. *上海实验动物科技学报*, 2005, 25(1): 54-58.
- [13] 赵晴, 杜建时, 韩雪梅, 等. 大鼠急性全脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡及红花保护作用研究[J]. *中国实验诊断学*, 2004, 8(1): 21-23.
- [14] LARTIGUE A, BURLAT B, COUTARD B, et al. The megavirus chilensis Cu, Zn-superoxide dismutase: the first viral structure of a typical cellular copper chaperone-independent hyperstable dimeric enzyme[J]. *J Virol*, 2015, 89(1): 824-832.
- [15] KWIECIEN S, MAGIEROWSKA K, MAGIEROWSKI M, et al. Role of sensory afferent nerves, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the carbon monoxide-induced gastroprotection against stress ulcerogenesis[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2016, 67(5): 717-729.

(收稿日期: 2018-02-09)

(本文编辑 薛妮)