

IL-6 诱导肝细胞产生大量 CRP, 这些炎症因子介导了 AS 一系列炎症反应过程^[8]。有报道^[6]称, 乌灵菌粉具有抗炎作用。本研究中 AS 兔饲乌灵菌粉后, 兔血浆 CRP 含量明显下降, 但 NO、IL-6、TNF- α 没有影响。可能原因是, 一方面乌灵菌粉具有降脂、抗氧化、提高机体抗氧化酶活力, 从而解除或缓解了高脂血症作为炎症反应过程的始动影响; 另一方面在炎症反应过程中, 乌灵菌粉对多种炎症因子没有影响, 乌灵菌粉仅能抑制炎症介质 CRP 的生成, 可减少该炎症介质引起的炎症反应。综上所述, 本研究证实乌灵菌粉具有降低动脉粥样硬化兔血浆甘油三酯的作用, 同时能增加抗氧化酶活力, 影响部分炎症因子的产生, 从而起到保护心血管系统的作用。

REFERENCES

- [1] YIN D D H, ZHAG J, LIU C L. Advance in clinical application of Wuling capsule [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2011, 20(16): 1530-1562.
- [2] ANG N, LIU Y Y, HAO W Y, et al. Anti-depressant mechanisms of Wuling Jun powder by gene microarray analysis [J]. Chin J Rehabil Theory Pract(中国康复理论与实践), 2010, 16(4): 328-331.
- [3] YANG N, HAO W Y, LIU Y Y, et al. Behavioral studies on anxiolytic effects of *Xylaria nigripes* [J]. Chin J Ethomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2010, 5: 27-30
- [4] CHEN G F, REN G L, ZHANG L S, et al. Effects of Wuling mycelia on pentylentetrazole-induced epilepsy in rats [J]. J Zhejiang Univ(Med Sci)(浙江大学学报: 医学版), 2012, 41(6): 647-652.
- [5] LIU L. Antidepressant reearch with hypericum perforatum and Wuling mycelia extracts [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2012, 24(6): 77-100.
- [6] REN G L, CHEN G F, ZHANG L S, et al. Mechanisms of Wuling mycelia powder on memory retrieval impairment in rats with chronic epilepsy [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(14): 2156-2159.
- [7] LI Z, ZHAO Z X. Advance in base and clinical application of Wuling capsule [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(1): 120-121.
- [8] LI J J, FANG C. C-reactive protein is not only aninflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular disease [J]. Med Hypotheses, 2004, 62(9): 499-506.

收稿日期: 2013-10-09

藤茶总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

罗淑萍, 郭炎荣, 杨青(广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

摘要: 目的 探讨藤茶总黄酮对大鼠脑缺血后再灌注损伤的保护作用以及可能的作用机制。方法 阻断大鼠大脑中动脉血流制备大鼠脑缺血模型。96 只 Wistar 大鼠, 随机分为假手术组、模型对照组、阳性药组、藤茶总黄酮高、中、低剂量组。阳性药组以尼莫地平注射液 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射, 藤茶总黄酮高、中、低剂量组分别以 80, 40, 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药, 模型组和假手术组给予相同体积的生理盐水, 每天 1 次, 术前 5 d 开始给药。给药动物脑缺血 2 h 后再灌注 24 h, 处死动物。观察脑缺血大鼠神经行为学; TTC 染色计算大鼠脑梗死面积; 测定脑组织中 SOD 活性、MDA 含量。**结果** 与模型组相比, 藤茶总黄酮高、中剂量组均能减少梗死面积($P < 0.05$), 且大脑 SOD 活力显著升高($P < 0.05$), MDA 含量显著降低($P < 0.05$)。**结论** 藤茶总黄酮对大鼠局灶性脑缺血损伤具有保护作用, 其机制可能与抗氧自由基损伤有关。**关键词:** 藤茶总黄酮; 缺血再灌注; 梗死面积; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)06-0674-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.008

Protective Effects of Tengcha Flavonoids on the Global Cerebral Ischemia Reperfusion Injury of Rats

LUO Shuping, GUO Yanrong, YANG Qing(Guangxi Zhuang Autonomous Region People's Hospital, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effects and mechanism of Tengcha flavonoids(TCF) on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **METHODS** Ninety-six Wistar rats were randomly divided into sham group, model group, nimodipine group($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, TCF low dose, middle dose, high dose group(20, 40 and 80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Control group and

model group were given the same volume of physiological saline, once a day, for gavage 5 days. Cerebral ischemia model was established in rats through occluding the middle cerebral artery (MCAO). After ischemia for 2 h, all animals were reperused for 24 h and were killed. Behavior and infarct size were evaluated, and malondialdehyde(MDA) content and superoxide dismutase(SOD) activity of brain were observed. **RESULTS** Compared with the model group, the infarction area in the TCF 40 and 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹ groups were significantly lower($P<0.05$), MDA content of brain tissue of all TCF groups decreased($P<0.05$) and SOD activity increased significantly($P<0.05$). **CONCLUSION** TCF have protective effects on focal brain ischemia reperfusion injury in rats by improving state of oxidative stress and increasing activity of antioxidant enzymes.

KEY WORDS: Tengcha flavonoids; ischemia reperfusion injury; infarction area; antioxidant

缺血性中风是成人死亡和致残最常见的原因之一^[1]。脑缺血复灌损伤是缺血脑组织恢复血供后的病理生理性改变,可引起细胞的损伤加重、即对神经元的三次损伤,严重者可引起细胞坏死或凋亡^[2]。因此,寻找切实有效的神经保护药物一直是缺血性中风研究领域的重要方向。

藤茶又名甜婆婆茶、甜茶藤,系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W.T. Wang 的茎叶,主要分布于广西、广东、云南、贵州等省区^[3]。藤茶的化学成分以黄酮为主,总黄酮含量高达 45%左右^[4],药理研究表明,藤茶总黄酮(Tengcha flavonoids, TCF)及其衍生物具有很强的抗氧化作用,它们不但可以清除氧自由基,还可抑制氧自由基的生成^[5]。本实验建立大鼠大脑中动脉闭塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO),通过计算各组模型大鼠的脑梗死面积,测定脑组织中 SOD、MDA 含量,探讨 TCF 发挥对大鼠脑缺血后再灌注损伤保护的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠 96 只,♂, 体重 200~250 g, 由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号: SCXK(桂)2009-0002。动物在手术前一周领回,安静环境饲养,自由进食及饮水,光照周期采用自然节律。实验过程中对动物的饲养、给药、手术及取材,均遵循实验动物管理规定。

1.2 试剂及仪器

尼莫地平注射液(江苏济川制药有限公司,批号: 111022,规格: 100 mL·瓶⁻¹); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,美国 Sigma 公司); TCF(广西自治区人民医院药剂科提供,含量: 含生药 3 g·g⁻¹); SOD、MDA 试剂盒(由南京建成生物工程研究所提供,批号: 20120620); 722 分光光度计(重庆川仪九厂); BP121S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备及给药

手术后经行为学判断造模成功的存活大鼠随机分为假手术组,TCF 高剂量组(80 mg·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃给药)、TCF 中剂量组(40 mg·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃给药)、TCF 低剂量组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃给药)、模型组、阳性药组(尼莫地平,10 mg·kg⁻¹,注射给药),每组各 16 只动物。模型组和假手术组给予相同体积的生理盐水。术前 5 d 开始给药。末次给药后,按文献方法^[6]制备大鼠脑缺血模型,除假手术组外,所有大鼠行阻断大鼠脑中动脉血流的 MCAO 术,动物脑缺血 2 h 后再灌注 24 h 处死动物。

2.2 神经行为学评分

分别于术后 4, 8, 24 h 对缺血小鼠进行神经功能评分,根据 Zea Longa 的 5 分制评分标准,满分为 5 分,分数越高,动物行为障碍越严重。神经功能评分标准为: 0 分: 无神经损害症状; 1.0 分: 表现为不能伸展对侧前爪,运动障碍; 2.0 分: 表现为行动不协调,屈曲姿势,旋转运动; 3.0 分: 表现为向对侧倾倒; 4.0 分: 表现为痉挛,昏睡,意识丧失。

2.3 梗死面积测定

将各组 8 只动物断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,冠状均切 5 片,5 片脑组织放置 0.25%TTC 溶液中,37 °C 避光孵育 30 min 染色,10%福尔马林固定 4 h,拍照,经染色后正常组织呈红色,梗死部位呈白色,利用 Image J 图像分析软件进行分析,以梗死灶面积占总面积的百分率进行统计分析。

2.4 大鼠脑组织中 SOD 活性,MDA 含量测定

各组剩余 8 只大鼠缺血再灌注 24 h 后断头,快速取脑,取预冷的生理盐水按重量体积比 1:9,用玻璃匀浆器研磨,制成 10%脑组织匀浆,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清,-80 °C 保存。SOD 活力检测采用黄嘌呤氧化法;脑组织 MDA 含量用硫代巴比妥酸显色法测定;组织蛋白含量

测定用考马斯亮蓝法。具体步骤按试剂盒操作程序进行测定。

2.5 统计学分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为有统计学差异标准, $P<0.01$ 为有显著统计学差异标准。

3 结果

3.1 对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响

MCAO 阻塞 4 h 后,与假手术组相比,各组均出现明显的神经功能损害症状,例如痉挛、对侧倾倒、旋转运动等,各组严重程度相似;8, 24 h 后,与模型组相比,阳性药组及 TCF 高剂量组大鼠的神经功能损害症状有所减轻,其中以阳性药组最为明显($P<0.01$)。实验结果见表 1。

表 1 TCF 对 MCAO 大鼠在不同时间点神经功能损伤的影响($n=8$)

Tab 1 Effects of TCF on neurological examination score of rat after awaking from MCAO($n=8$)

组 别	神经功能损伤评分/分		
	4 h	8 h	24 h
假手术组	0	0	0
模型组	3.61±0.68 ¹⁾	3.14±0.92 ¹⁾	3.87±0.71 ¹⁾
阳性药组	2.04±0.63 ²⁾	2.17±0.33 ²⁾	1.65±0.87 ³⁾
TCF 高剂量组	3.34±0.93	3.06±0.54	2.60±0.46 ²⁾
TCF 中剂量组	3.48±0.79	3.22±0.47	3.51±1.21
TCF 低剂量组	3.54±0.85	3.36±0.86	3.05±1.14

注:与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$
Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

3.2 藤茶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死面积的影响

与模型组比较,阳性药组能显著降低缺血再灌注大鼠脑梗死面积($P<0.01$),TCF 高、中剂量组均能减少梗死面积($P<0.05$),而 TCF 低剂量组与模型组比较,两者在减少梗死面积上没有统计学差异($P>0.05$)。实验结果见表 2 和图 1。

3.3 藤茶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠脑匀浆 SOD、MDA 活力的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑匀浆 SOD 活力显著降低($P<0.01$),而 MDA 含量则显著升高($P<0.01$),表明缺血再灌注造模后脑组织抗氧化能力下降。药物干预后,与模型组相比,TCF 高、中剂量组脑匀浆 SOD 活力显著升高($P<0.01$ 或

表 2 藤茶总黄酮对 MCAO 大鼠梗死面积的影响($n=8$)
Tab 2 Effects of TCF on cerebral infarct area in MCAO rats($n=8$)

组 别	梗死面积/%
假手术组	0
模型组	49.69±8.86
阳性药组	30.62±5.98 ¹⁾
TCF 高剂量组	37.17±3.41 ²⁾
TCF 中剂量组	38.23±3.30 ²⁾
TCF 低剂量组	47.81±6.93

注:与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ¹⁾ $P<0.01$
Note: Compared with model group: ²⁾ $P<0.05$, ¹⁾ $P<0.01$

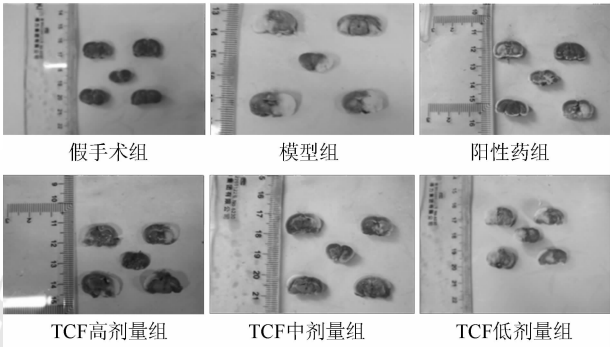


图 1 TTC 染色下各组大鼠脑组织标本
Fig 1 Representative TTC-stained brain sections of focal cerebral ischemia reperfusion rats

$P<0.05$),且 TCF 高、中剂量组脑组织匀浆中 MDA 含量降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);阳性药组和 TCF 低剂量组与模型组比较则没有统计学意义($P>0.05$),表明 TCF 对脑缺血再灌注后脑组织 SOD 活力有一定恢复作用,且能显著抑制缺血再灌注后脑组织过氧化脂质的生成。结果见表 3。

表 3 TCF 对脑缺血大鼠脑匀浆 SOD、MDA 活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 3 Effects of TCF on the activity of SOD and MDA in rats injured by focal cerebral ischemia reperfusion($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	SOD/U·mgprot ⁻¹	MDA/nmol·mgprot ⁻¹
假手术组	77.41±8.01	14.47±3.28
模型组	17.77±3.69 ¹⁾	83.33±22.94 ¹⁾
阳性药组	23.91±5.31	68.45±12.66
TCF 高剂量组	38.37±11.04 ²⁾	35.55±12.24 ²⁾
TCF 中剂量组	31.90±8.94 ³⁾	44.84±16.46 ³⁾
TCF 低剂量组	17.69±2.87	77.60±16.47

注:与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$
Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

4 讨论

大脑中动脉是人类脑卒中的多发部位, 大脑中动脉主干分布区梗死是中国人缺血性脑中风发生的常见原因。因此, 阻断大脑动脉所造成的局灶性脑缺血模型被认为是一种理想的动物模型。本实验采用血管内栓线阻断法制作 MCAO, 具有无需开颅, 对颅内环境的影响小, 术中不引起血压、体温、血气的异常变化, 对全身影响小, 可以再灌注, 能较好的模拟临床实际情况等优点^[7]。本实验中, 模型组梗死面积百分比为(49.69 ± 8.86)%, 证明利用血管内栓线阻断法制得的 MCAO 模型稳定性较好, 从而保证了以此为基础进行的药效学研究的可靠性。

大鼠脑缺血再灌注后进行脑梗死体积测定是评价脑缺血损伤程度的经典指标。实验结果显示, 与模型组相比, 藤茶总黄酮高、中剂量组以及阳性药组均可显著减少局灶性脑缺血小鼠的脑梗死面积, 具有显著性差异; 而藤茶总黄酮低剂量组与模型组比较, 在梗死面积百分比数值上有下降的趋势, 但没有统计学差异, 提示藤茶总黄酮具有对抗脑缺血的作用。

急性脑梗死时, 自由基损伤是脑缺血再灌注损伤的重要机制之一^[8-9]。机体通过酶系统和非酶系统产生氧自由基, 后者能进攻含有丰富多聚不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的脑血管内皮细胞和脑组织细胞, 使其发生脂质过氧化, 造成脑损伤^[10], 并形成脂质过氧化物, 如醛基(丙二醛, MDA)、酮基、羟基、羰基、氢过氧基或内过氧基, 以及新的氧自由基等。自由基不但可引起脂质氧化及膜降解, 还可直接破坏 DNA、蛋白质, 促进多糖分子聚合和降解, 加重脑损伤, 同时自由基会损伤血脑屏障, 促进脑水肿的形成^[11]。因而测定 MDA 含量可反应机体内脂质过氧化的程度, 间接反应脑细胞损伤的程度。同时, 缺血区脑组织内 SOD 受缺血及自由基氧化影响, 催化活性减弱; 而在清除自由基的过程中, SOD 酶大量消耗, 使酶活力显著降低^[12]。因此, 测定 SOD

含量可间接反应机体清除氧自由基的能力。本实验结果显示, 藤茶总黄酮高、中剂量组能够降低脑缺血大鼠血清中 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 提示藤茶总黄酮的脑缺血保护作用可能与减少过量自由基生成, 提高脑组织 SOD 活性, 或者对抗氧自由基损伤有关。

REFERENCES

- [1] LIU X S, CUI S K. Progress of cerebral ischemia by Chinese medicine [J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医), 2012, 32(1): 129-131.
- [2] HAN J Q, WU J X. Research progress of cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Intern Med China(内科), 2011, 6(6): 523-526
- [3] CHEN X M, NI F. Development on pharmacological functions of Tengcha [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2010, 22(1): 16-17
- [4] QIN J P, LIANG S D, HE C W. Determination of flavonoids in tender stem and leaf of *Ampelopsis grossedentata* by differential spectrophotometry [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(7): 607-609.
- [5] TAN Y. Anti-oxidative effect of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* (AGTF) *in vitro* [J]. China Pharm(中国药师), 2006, 26(12): 1449.
- [6] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] YAN H, DONG X L. Research progress of cerebral ischemia animal models [J]. Lab Anim Sci(实验动物科学), 2007, 24(1): 38-40
- [8] ZHAO Y P, QIN J, SUN S L. Effects of memantine on expression of Caspase-3 and MDA in rats after ischemia-reperfusion [J]. J Zhengzhou Univ(Med Sci)(郑州大学学报: 医学版), 2011, 46(5): 748-751.
- [9] HAN G, LI X D, TANG J J, et al. Protective effects and related mechanisms of pre-treated coenzyme Q10 on rats suffered from focal cerebral ischemic-reperfusion injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 715-718.
- [10] IMAI H, GRAHAM D I, MASAYASU H, et al. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia [J]. Free Radic Biol Med, 2003, 34(1): 56-63
- [11] CUZZOCREA S, RILEY D P, CAPUTI A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia reperfusion injury [J]. Pharmacol Rev, 2001, 53(1): 135-159.
- [12] WANG C J, XUE L B. Research progress of relationship between the SOD, NO and cerebral ischemic stroke [J]. J Brain Nerv Dis(脑与神经疾病杂志), 2007, 15 (5): 391-394.

收稿日期: 2013-07-16