

玫瑰总黄酮对小鼠局灶性脑缺血模型的影响

项丽玲, 冯煜, 苗明三*, 白明, 方晓艳(河南中医药大学, 郑州 450046)

摘要: 目的 观察玫瑰总黄酮对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 采用线栓法阻塞左侧大脑中动脉, 建立小鼠局灶性脑缺血再灌注模型。手术前尼莫地平组、脑络通组、玫瑰总黄酮高中低剂量组分别给予相应的药物灌胃, 假手术组和模型组同时给予同体积 0.5%CMC 灌胃, 每天 1 次, 连续给药 7 d。末次给药 1 h 后造模, 手术清醒后, 对小鼠神经功能进行评分, 再灌注 22 h, 测血清中 S-100 β 蛋白含量, 取脑组织 TTC 染片, 计算脑梗死面积。结果 玫瑰总黄酮各剂量组均显著降低小鼠神经功能缺失评分, 减少小鼠脑梗死面积, 显著降低血清中 S-100 β 蛋白的含量, 显著改善脑组织中皮质区的病理损伤。结论 玫瑰总黄酮可较好抑制脑组织缺血再灌注损伤后血清中的 S-100 β 释放, 并降低神经功能缺失评分, 减少脑梗死面积, 改善大脑皮质区的病变情况, 对脑缺血再灌注损伤起到一定的保护作用。

关键词: 玫瑰总黄酮; 局灶性缺血再灌注; S-100 β 蛋白

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)01-0076-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.017

引用本文: 项丽玲, 冯煜, 苗明三, 等. 玫瑰总黄酮对小鼠局灶性脑缺血模型的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 76-79.

Effects of Rose Total Flavonoids on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Mice

XIANG Liling, FENG Yu, MIAO Mingsan*, BAI Ming, FANG Xiaoyan(1.Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effects of rose total flavonoids on cerebral ischemia reperfusion injury in mice. **METHODS** By using the suture block the left middle cerebral artery to establish the focal cerebral ischemia-reperfusion model in mice. Nimodipine group, Nao Luo Tong group, the high, medium and low dose of rose total flavonoids groups were given related drugs via intragastric administration before the operation. The sham operation group, and ischemia-reperfusion group were given the same volume of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose for seven days, once a day. One hour after the last administration model, after operation sober, evaluating neural function score of mice, reperime 22 h, measuring the concentration of S-100 β in serum, TTC stained of brain tissue slices, calculating the area of cerebral infarction. **RESULTS** Rose total flavonoids groups significantly decreased the nerve function score in mice, reduced the area of cerebral infarction in mice, significantly decreased the content of S-100 β protein in serum, significantly improved the pathological changes of cortical areas in brain tissue. **CONCLUSION** Rose total flavonoids could inhibit S-100 β in serum released after cerebral ischemia reperfusion injury, improve the nerve injury symptoms, reduce the infraction area of brain and improve the pathological changes of cerebral cortex, thereby rose total flavonoids play a protective role on cerebral ischemia reperfusion injury.

KEY WORDS: rose total flavonoids; focal ischemia-reperfusion; S-100 β protein

玫瑰又名刺玫花, 为蔷薇科蔷薇属植物, 味微苦、甘, 性温, 具有化湿和中, 理气解郁, 活血散瘀, 降脂疏肝等功效^[1]。玫瑰具有浓郁甜美的香气, 是一些食品、化妆品的主要添加剂, 具有很高的食疗价值^[2]。玫瑰中丰富的营养元素容易被机体快速吸收并利用, 玫瑰总黄酮(rose total flavonoids, RTF)是其主要有效成分, 但迄今未见其对脑缺血保护作用的报道。本研究主要观察 RTF 对小鼠局灶性脑缺血再灌注模型的干预作用, 为其防治缺血性脑血管疾病的临床应用及实验研究

提供实验依据及研究思路。

1 材料

1.1 药物及试剂

RTF(河南中医药大学, 含量为 63.2%, 批号: ZL2016-8); 尼莫地平片(山东新华制药股份有限公司, 批号: 1601023); 脑络通胶囊(哈药集团三精制药四厂有限公司, 批号: 201609002); 羧甲基纤维素钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 批号: 20160728); 水合氯醛(上海山浦化工有限公司, 批号: 20160406); 甲醛溶液(天津市科密欧化学试剂

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2009ZX09103-324); 河南省中原学者项目(162101510003)

作者简介: 项丽玲, 女, 硕士生 Tel: 13383718912 E-mail: xiangliling168@163.com *通信作者: 苗明三, 男, 教授, 博士 Tel: (0371)65962546 E-mail: miaomingsan@126.com

有限公司,批号:20150401);氯化三苯基四氮唑(TTC)(上海山浦化工公司,批号:20160401);S-100 β 蛋白ELISA检测试剂盒(江苏卡尔文生物科技有限公司,批号:20161101A)。

1.2 动物

KM小鼠,SPF级,♂,武汉生物制品研究所有限责任公司,小鼠合格证号:4200499815。

1.3 仪器

TGL-16G台式离心机(上海安亭科学仪器厂);JA1103N电子分析天平[奥豪斯(上海)公司];可调式移液器(上海雷勃分析仪器有限公司);MCAO栓线(沙东生物技术有限公司,批号:2838-100);680 Microplate Reader酶标仪(Bio-Rad Laboratories);专业图像分析系统(NIS-Elements AR 4.10.01)。

2 方法

2.1 造模与给药^[3]

选取体质量为26~29 g的KM小鼠112只,♂,随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组(30 mg·kg⁻¹,临床用量15倍)、脑络通组(750 mg·kg⁻¹,临床用量15倍)以及RTF高中低(300,150,75 mg·kg⁻¹)剂量组7组,每组16只。上述药物均在临用前用0.5%CMC配成相应的浓度,给药体积均为0.01 mL·g⁻¹;假手术组、模型组灌服同体积的0.5%CMC,每天给药1次,连续给药7 d。

于第6天20:00禁食不禁水,第7天8:00称重给药1 h后,用10%水合氯醛(0.003 mL·g⁻¹)腹腔注射麻醉,麻醉后颈部正中偏左切口,逐层分离暴露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),颈外动脉、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),结扎CCA及颈外动脉,用显微血管夹暂时夹闭ICA,于CCA距离分叉1 mm处剪0.2 mm小口,将线栓插入,经CCA分叉部进入ICA,松开血管夹,向上深入至分叉以上8~10 mm,直至有阻力,即阻断大脑中动脉分叉处,结扎ICA,2 h后轻轻抽出栓线。空白组只暴露左侧血管不做插线处理,造模小鼠只栓塞左侧大脑中动脉,建立大脑中动脉阻塞-再灌注动物模型。

2.2 指标检测

2.2.1 神经行为学评分 2 h后采用Longa标准进行神经行为学评分^[4]。评分标准:0分,无神经功能缺失症状;1分,提尾时右前肢内收,不能完全伸直;2分,行走时向右侧旋转;3分,向右侧倾倒;4分,

不能自发行走或意识丧失;剔除0分的动物。

2.2.2 S-100 β 及脑梗死面积测定 摘眼球取血,30 min后,离心分离血清测S-100 β 蛋白。小鼠断头后,迅速剥取脑组织,每组随机选取5只鼠脑,置于-20℃冰箱冷冻10 min,去掉小脑、嗅球和低位脑干后的剩余部分,冠状面切4刀,切成5片。然后迅速将脑片置于以pH 7.2磷酸缓冲液配置的1% TTC染液中,在37℃水浴、避光条件下孵育10 min。取出后置10%福尔马林液中避光保存24 h。经染色后非缺血区为玫瑰红色,梗死区为白色。单反数码相机拍照,用图像分析软件分别计算5个脑片共10个平面的总面积和梗死区域的面积,求出梗死区域面积占总面积的百分比。

2.2.3 脑组织病理形态观察 迅速取脑,冠状取视交叉后脑组织,放入10%福尔马林液中,固定1周,石蜡包埋,作HE染色,光镜下观察脑组织皮质区病理形态学变化。

2.3 统计学处理方法

数据分析用SPSS 17.0 for windows医用统计包进行数据资料的统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,方差检验齐者用最小显著差数(LSD)法,方差不齐者用Games-Howell法检验。

3 结果

3.1 对小鼠局灶性脑缺血模型神经功能缺失评分、死亡率的影响

假手术组小鼠没有神经功能缺损表现,造模各组小鼠缺血2 h后均出现不同程度的神经功能障碍,说明造模成功;尼莫地平组、脑络通组、RTF高、中剂量组显著降低小鼠神经功能缺失的评分($P < 0.01$),改善小鼠的神经功能损伤。模型组的死亡率最高,给药各组的死亡率均有所降低,说明给药各组均能不同程度的降低死亡率,减少脑组织损伤,保护脑组织。结果见表1。

3.2 对小鼠局灶性脑缺血再灌注模型血清S-100 β 蛋白

与假手术组比,模型组小鼠血清中S-100 β 蛋白含量显著升高($P < 0.01$),说明局灶性脑缺血再灌注模型成功。与模型组比,尼莫地平组、脑络通组、RTF各剂量组均能显著降低S-100 β 蛋白含量($P < 0.01$)。表明RTF对小鼠局灶性脑缺血模型血清中S-100 β 蛋白含量的变化有显著的改善作用,对脑组织具有保护作用。结果见表2。

表 1 对小鼠局灶性脑缺血模型神经功能评分、死亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of neurological function score and mortality in mice with focal cerebral ischemia($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	神经功能评分/分	死亡率/%
假手术组	16	-	0.0±0.0 ¹⁾	0
模型组	9	-	3.4±0.8	43.7
尼莫地平组	10	30	2.1±0.5 ³⁾	31.2
脑络通组	11	750	2.4±0.7 ³⁾	31.2
RTF 高剂量组	12	300	1.7±0.7 ³⁾	25.0
RTF 中剂量组	11	150	1.8±0.7 ³⁾	31.2
RTF 低剂量组	11	75	2.6±0.8 ²⁾	37.5

注: 与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 2 对小鼠局灶性脑缺血再灌注模型血清 S-100 β 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of serum S-100 β and beta protein on focal cerebral ischemia-reperfusion model in mice($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	S-100 β / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
假手术组	16	-	9.60±0.47 ¹⁾
模型组	9	-	24.89±0.56
尼莫地平组	10	30	15.31±0.71 ²⁾
脑络通组	11	750	14.31±0.48 ²⁾
RTF 高剂量组	12	300	12.85±0.38 ²⁾
RTF 中剂量组	11	150	12.30±0.60 ²⁾
RTF 低剂量组	11	75	15.62±0.48 ²⁾

注: 与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 对小鼠局灶性脑缺血再灌注模型脑面积梗死率的影响

与假手术组比, 模型组小鼠血清中, 脑梗死面积显著增加($P<0.01$), 说明局灶性脑缺血再灌注模型成功。与模型组比, 尼莫地平组、脑络通组、RTF 各剂量组均能显著降低小鼠脑组织梗死面积率($P<0.01$)。表明 RTF 显著降低梗死面积, 对脑组织具有保护作用。结果见表 3。

3.4 小鼠局灶性脑缺血再灌注模型脑组织皮质区病理形态学的影响

假手术组脑皮质神经细胞和神经胶质细胞基本正常; 模型组脑皮质神经细胞水肿伴变性, 神经胶质细胞大部分固缩; 尼莫地平组大脑皮质神经细胞变性, 神经胶质细胞大部分固缩; 脑络通组脑皮质神经细胞少数变性伴水肿, 神经胶质细胞固缩; RTF 高剂量组脑皮质神经细胞变性伴水

肿, 神经胶质细胞少数固缩; RTF 中剂量组脑皮质神经细胞少数变性, 神经胶质细胞基本正常; RTF 低剂量组脑皮质神经细胞个别变性, 神经胶质细胞基本正常。结果见表 4。

表 3 对小鼠局灶性脑缺血再灌注模型脑面积梗死率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of focal cerebral ischemia-reperfusion model on infarct size in mice($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	脑面积梗死率/%
假手术组	16	-	0.00±0.00 ¹⁾
模型组	9	-	38.57±5.09
尼莫地平组	10	30	18.71±3.67 ²⁾
脑络通组	11	750	17.34±2.91 ²⁾
RTF 高剂量组	12	300	17.42±1.38 ²⁾
RTF 中剂量组	11	150	17.12±2.52 ²⁾
RTF 低剂量组	11	75	18.21±3.38 ²⁾

注: 与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

表 4 对小鼠脑缺血再灌注模型脑组织皮质区病理改变的影响

Tab. 4 Effects of cerebral ischemia reperfusion model on the pathological changes of cortical areas in mice

组别	动物数/只	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	-				+				++				+++				
			-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
假手术组	15	-	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
模型组	11	-	0	0	2	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
尼莫地平组	12	30	0	0	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脑络通组	13	750	2	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RTF 高剂量组	12	300	2	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RTF 中剂量组	13	150	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RTF 低剂量组	12	75	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: “-”神经细胞基本正常, 神经胶质细胞基本正常; “+”少数神经细胞变性, 神经胶质细胞基本正常; “++”神经细胞大部分变性, 神经胶质细胞基本正常或部分固缩; “+++”全部神经细胞变性, 神经胶质细胞完全固缩或消失。

Note: “-”The nerve cells were basically normal, and the glial cells were basically normal; “+”A few nerve cells were denatured, and glial cells were basically normal; “++”Most of the nerve cells were denatured, and the glial cells were basically normal or partially retraction; “+++”All the nerve cells were denatured, and the glial cells were completely retraction or disappearing.

经 Ridit 检验, 与假手术组相比, 模型组有显著的统计学意义($P<0.01$), 说明造模成功。与模型组相比, 脑络通组有明显的统计学意义($P<0.05$), 提示其明显改善脑组织的损伤; RTF 各剂量组有显著的统计学意义($P<0.01$); 提示 RTF 显著改善缺血再灌注模型脑组织皮质区的神经细胞、神经胶质细胞的损伤程度, 保护脑组织。

4 讨论

缺血性脑血管病(又称缺血性脑卒中)是由各种病因使供应脑部血液的血管发生病变所致的一种神经系统疾病,具有高致残率和死亡率特点^[5],同时此病也是导致癫痫、阿尔茨海默病等其他疾病的主要致病因素,已成为仅次于缺血性心脏病危害人类健康的“第二大杀手”^[6],严重威胁人类生命健康。

中医认为气虚血瘀是中风发病的基本病机。瘀血是导致脑卒中的直接原因,也是多种病因作用的病理产物,瘀阻不通为其发病根源,从而导致脑脉闭塞,引起了脑组织的炎症损伤与缺血,从而成为缺血性脑卒中的主要病机^[7]。因此活血化瘀法在治疗缺血性脑卒中有着广泛的应用价值,研发出疗效确切、起效快、剂量小的新的活性部位是中药治疗脑血管疾病的关键,中药以其多靶点效应在治疗缺血性脑血管疾病中应用历史悠久、疗效确切、不良伐木小、成本低,具有更广阔的前景。

玫瑰具有很好的理气解郁,活血散瘀的功效,有研究显示,玫瑰的药理作用广泛,能有效清除自由基,改善微循环,增强机体免疫力,抗衰老,降血脂,以及解毒排毒等^[8-10]。其对心脑血管系统也有着很好的保护作用,具有营养心肌、增加心肌血流量、降低血黏度和血小板聚集率等作用^[11]。另玫瑰花能开窍理气,提神健脑,能够刺激人的呼吸中枢,调节人的神经系统。

本实验采用线栓法建立小鼠局灶性脑缺血再灌注模型,观察缺血 2 h 再灌 22 h 后的神经功能评分、死亡率、脑面积梗死率、脑组织皮质区病理形态学变化、血清中 S-100 β 蛋白含量的变化。S100 β 蛋白主要分布在外周神经系统的 Schwann 细胞内和中枢神经系统的神经胶质细胞内,作用于神经元和周围的环境,是星型胶质细胞激活的标志之一,可作为缺血性脑梗死早期的外周标志物^[12],脑缺血后, S100 β 蛋白会释放到脑脊液中,并可经受损的血脑屏障进入血液,其含量变化直接反映神经元、胶质细胞损伤的严重程度,为中枢神经系统受损状况提供了定量信息,对早期诊断及判断预后有一定指导意义^[13-14]。研究发现亚低温处理可以通过多途径对抗脑缺血再灌注损伤从而起到脑保护作用,降低血清中 S-100 β 蛋白的浓度,明显减轻脑水肿,降低脑损伤程度^[15]。

本实验结果显示 RTF 可以降低神经功能缺失评分、动物死亡率、血清中 S-100 β 蛋白的含量、减少梗死脑面积,对脑组织具有很好的保护作用。实验结论不仅与“气虚血瘀”病机相一致,也与其活血散瘀功效相符,从而为临床应用玫瑰花治疗缺血性脑血管疾病提供了实验依据,也为以后开发玫瑰花总黄酮奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] 孟爱君. 玫瑰花的药理作用[J]. 社区医学杂志, 2009, 7(2): 71-72.
- [2] ZHENG S Y, WANG W, DONG J J, et al. Research progress on nutrition health function and product development of edible rose [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2016, 37(23): 206-211.
- [3] 李刚,宋江华,张攀攀,等. 小鼠线栓法局灶性脑缺血模型研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11(6): 533-535.
- [4] 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.
- [5] MENG W T, LI D X, TONG L. Progress in research of the treatment of ischemic stroke [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(10): 1114-1120.
- [6] QIN F, HUANG X. Guanxin II for the management of coronary heartdisease [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(6): 472-476.
- [7] WANG H T, BIE X D, YAO Z, et al. Treating ischemic stroke patients of deficiency of Qi and Yin syndrome and atatic blood obstructing collaterals syndrome by Yangyin Yiqi Huoxue Recipe: a clinic study of therapeutic effect [J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2015, 35(3): 281-286.
- [8] 张璐,季巧遇,吕红. 玫瑰花概述及研究进展[J]. 江西中医药, 2012, 43(1): 64-66.
- [9] WANG B. Extraction and antioxidant activity of flavonoids from rose [J]. J Hubei Univ Arts Sci(湖北文理学院学报), 2017, 38(5): 29-32.
- [10] ZHANG X C, TANG D, DOU J, et al. Hypoglycemic activity of Xinjiang rose extracts *in vitro*[J]. Her Med(医药导报), 2016, 35(7): 693-698.
- [11] JIA J J, MIAO M S. Analysis of chemistry, pharmacology and clinical application for rose [J]. China J Chin Med(中医学报), 2014, 29(9): 1337-1338.
- [12] SUN Y G, QU X N, ZHANG L R, et al. Effects of small doses of hydrochloric penehyclidine on cerebral ischemia reperfusion serum levels of S100B and NSE in rats [J]. Acta Acad Med Weifang(潍坊医学院学报), 2015, 37(5): 388-389.
- [13] 景增秀. 缺血性脑卒中患者血清中 S100B、半乳糖凝集素-3 和神经元特异性烯醇化酶的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 623-625.
- [14] LIU C X, ZHENG C L, CHEN Y F, et al. Serum S100 β changes of patients with acute ischemic stroke [J]. Mod Hosp(现代医院), 2014, 14(10): 31-32.
- [15] MA S M, PU L J, WU W H, et al. Effect of local mild hypothermia on serum S100B against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Hebei Med J(河北医药), 2010, 32(17): 2330-2332.

收稿日期: 2017-06-13

(本文责编: 蔡珊珊)