

7-羟乙基白杨素对低压低氧致脑组织损伤的保护作用

景临林, 杨颖, 邵瑾, 赵彤, 马慧萍*, 贾正平(中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科, 全军高原医学实验室, 兰州 730050)

摘要: 目的 研究 7-羟乙基白杨素(7-HEC)对低压低氧诱导大鼠脑组织损伤的保护作用。方法 将 52 只健康♂ Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、乙酰唑胺组、7-HEC 组, 每组 13 只。连续灌胃给药 5 d, 末次给药后, 除正常组, 将其余 3 组置于低压低氧动物实验舱, 升至 8 000 m 海拔缺氧处理 24 h。HE 染色观察脑组织病理改变, 酶标法检测脑组织中过氧化氢(H₂O₂)和丙二醛(MDA)水平, 以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和 ATP 酶的活力; Western blotting 检测蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白抗体(Bax)及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3(caspase-3)的表达。结果 与正常组相比, 低压低氧导致大鼠脑组织出现明显损伤, H₂O₂ 和 MDA 水平显著升高, 抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 以及 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 的活力显著降低。7-HEC 预处理能够逆转这些变化。此外, 低压低氧能够显著升高脑组织中促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase-3 表达, 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 而 7-HEC 能够下调 Bax 和 cleaved caspase-3 表达, 上调 Bcl-2 的表达。结论 7-HEC 对低压低氧致脑组织损伤具有明显的保护作用, 其作用机制可能与其缓解氧化应激, 抑制细胞凋亡, 改善能量代谢有关。

关键词: 7-羟乙基白杨素; 低压低氧; 脑损伤; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)09-1025-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.001

引用本文: 景临林, 杨颖, 邵瑾, 等. 7-羟乙基白杨素对低压低氧致脑组织损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1025-1029.

Protective Effect of 7-HEC on Brain Tissue Damage Induced by Hypobaric Hypoxia

JING Linlin, YANG Ying, SHAO Jin, ZHAO Tong, MA Huiping*, JIA Zhengping(Department of Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of CPLA, the Lab of PLA for High Altitude Medicine, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of 7-HEC against hypobaric hypoxia(HH) induced brain injury in rats. **METHODS** Fifty two ♂ Wistar rats were divided in to normal group, model group, acetazolamide group and 7-HEC group, 13 rats per group. The drugs were intragastrically administrated for 5 consecutive days, except normal group, the rats in other three groups were transferred to 8 000 m in a HH chamber for 24 h after the final administrated. The brain histomorphology of rats were detected by HE staining. Hydrogen peroxide(H₂O₂), malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSH-Px) and ATPase were evaluated using related Kits. The expression of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 were assessed with Western blotting. **RESULTS** Compared to normal group, HH induced brain damage as evidenced by the increased level of H₂O₂ and MDA and the decreased of the activity of antioxidant enzyme including SOD, CAT and GSH-Px as well as Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase. Pretreatment with 7-HEC could reverse these changes. Moreover, 7-HEC could inhibit the apoptosis induced by HH via up-regulating the expression of Bax and caspase-3 and down-regulating the expression of Bcl-2. **CONCLUSION** 7-HEC can suppress the HH-induced brain damage in rats by alleviating oxidative stress, inhibiting apoptosis and improving energy metabolism.

KEYWORDS: 7-HEC; hypobaric hypoxia; brain damage; oxidant stress; apoptosis

白杨素(Chrysin, 5,7-dihydroxyflavone)是一种在紫葳科植物木蝴蝶的种子、茎皮和蜂胶中含量丰富的黄酮化合物, 具有广泛的生理活性^[1]。但是

其溶解性较差、生物利用度低, 限制了其在临床上的应用^[2]。为了改善其溶解性, 课题组借鉴将芦丁制备成曲克芦丁后能够改善其溶解性的成功经验

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872796, 81202458, 81571847); 甘肃省自然科学基金(18JR3RA408, 1308RJYA061, 145RJZA089); 中国博士后科学基金(2012M521926); 军队后勤科研计划(CWH17J010)

作者简介: 景临林, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0931)8994671
任药师 Tel: (0931)8994671 E-mail: huipingmacyk@163.com

E-mail: lfjinglinlin@163.com *通信作者: 马慧萍, 女, 博士, 主

验,通过对白杨素的七位羟基进行羟乙基化反应,制备了 7-羟乙基白杨素^[3][5-羟基-7-羟乙氧基黄酮, 5-hydroxy-7-(2-hydroxyethoxy)flavone, 7-HEC],化学结构见图 1。课题组前期研究发现 7-HEC 对脑缺血再灌注大鼠具有明显的保护作用^[4],但是其对高原缺氧脑组织损伤是否具有保护作用,尚不得知。本研究将探讨 7-HEC 对低压低氧诱导脑组织损伤的保护作用及机制,为 7-HEC 的开发利用提供一定的实验数据。

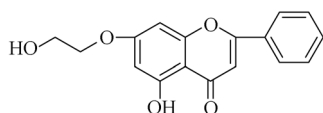


图 1 7-羟乙基白杨素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of 5-hydroxy-7-(2-hydroxyethoxy) flavone

1 仪器与试剂

1.1 仪器

FLYDWC50-IIA 型低压低氧动物实验舱(中航工业贵州雷航空军械有限责任公司); SpectraMax i3 全自动荧光酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);全自动样品快速研磨仪(上海净信实业有限公司); AE240 型分析天平(上海梅特勒-托利多); IMS-20 全自动制冰机(常熟市雪科电器有限公司);涡旋仪(其林贝尔公司);低温高速离心机(德国 Sigma 公司);恒温水浴箱(北京西城区医疗器械厂);免疫印迹分析仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 动物

SPF 级 Wistar ♂大鼠 52 只,体质量 180~220 g,购自联勤保障部队第九四〇医院动物实验科,实验动物生产许可证号: SCXX(军)2012-0020,使用许可证号: SYXK(军)2012-0029。

1.3 药物与试剂

7-HEC 按照本实验室报道的专利方法制备^[3];乙酰唑胺(武汉远城科技发展有限公司,批号: 100114;纯度 $\geq 98\%$);给药剂量按照前期实验确定(7-HEC, 300 mg·kg⁻¹;乙酰唑胺, 200 mg·kg⁻¹);BCA 法总蛋白定量试剂盒(批号: 20170519)、考马斯亮蓝法蛋白测试盒(批号: 20170524)、过氧化氢(H₂O₂,批号: 20170525)、丙二醛(MDA,批号: 20170528)、过氧化氢酶(CAT,批号: 20170527)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号: 20170525)、超氧化物歧化酶(SOD,批号: 20170524)、超微量 ATP 酶(批号: 20170531)检测试剂盒均购自南京建

成生物工程研究所。RIPA 裂解液、4×上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、增强型化学发光法(ECL)超敏发光液均购自北京索莱宝生物科技有限公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和 β -actin 抗体购自中杉金桥。Bcl-2、Bax 和 caspase-3 抗体购自 Abcam。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将 52 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组: 正常组、模型组、乙酰唑胺组、7-羟乙基白杨素组(7-HEC),每组 13 只。自分组之日起,连续灌胃 5 d,每天 1 次,正常组和模型组给予等量灭菌注射用水。

2.2 低压低氧致脑组织损伤模型

第 5 天末次给药后,除正常组外,将其余 3 组均放入大型低压低氧动物实验舱中,以 10 m·s⁻¹减压上升至 8 000 m 海拔,低压低氧处理 24 h,随后以 10 m·s⁻¹降至海拔 3 500 m,各组大鼠用 10% 水合氯醛溶液(0.3 mL 每 100 g 体质量)腹腔注射麻醉,解剖大鼠,取出脑组织。

2.3 脑组织病理观察

将每组 3 只大鼠脑组织立即用生理盐水清洗除去血污黏液,用 10% 中性甲醛溶液固定 24 h。石蜡包埋、组织切片、HE 染色后光学显微镜下观察脑组织形态。

2.4 脑组织中生化指标的测定

每组分别取 6 只大鼠脑组织标本,准确称重后,按质量(g): 体积(mL)=1: 9 加入生理盐水制成组织匀浆,低温(4 ℃) 3 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液分装后置于-80 ℃冰箱保存备用。脑组织中 H₂O₂ 和 MDA 的含量以及 T-SOD、CAT、GSH-Px、ATPase 活性按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行测定。

2.5 Western blotting 检测

每组分别取 4 只大鼠脑组织标本,准确称重后加入 9 倍冰生理盐水,使用组织匀浆器在冰水浴中匀浆,4 ℃ 12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清,采用 BCA 法计算蛋白浓度。蛋白样品中加入 4×上样缓冲液,100 ℃沸水煮 15 min,制备好的蛋白样品-80 ℃备用。取 30 μ g 样品上样,采用 5%SDS-PAGE 浓缩胶,10%SDS-PAGE 分离胶进行分离,湿法将蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,加入一抗,包括 Bcl-2(1: 1 000)、Bax(1: 500)、caspase-3(1: 300)、 β -actin(1:

2 000), 4 °C 过夜, 用 TBST 缓冲液漂洗 4 次, 每次 10 min。加入二抗(1:5 000 稀释), 室温孵育 2 h, 化学发光法显色, Tanon-4200SF 全自动数码凝胶图像分析系统曝光, 灰度值用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描测定。

2.6 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 SPSS 19.0 统计软件对数据中各组之间进行 one-way ANOVA 统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠脑组织 HE 染色

正常组大鼠脑组织细胞排列整齐、结构正常; 与正常组相比, 模型组大鼠脑组织细胞排列紊乱, 神经元细胞减少, 胞周间隙扩大, 皮质血管扩张, 具有深染的萎缩固缩核神经元; 与模型组相比, 乙酰唑胺组、7-HEC 组神经元排列趋向于正常组, 且神经元细胞增多, 核着色变浅。结果见图 2。

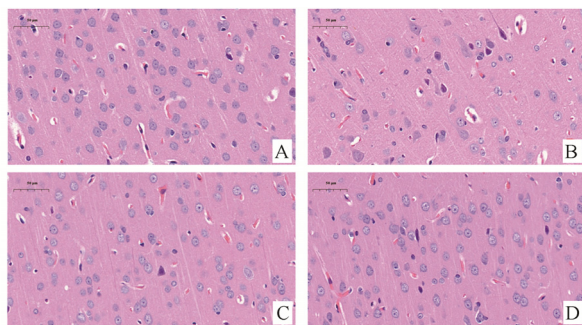


图 2 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织形态学的影响(HE, 400×)

A-正常组; B-模型组; C-乙酰唑胺组; D-7-HEC 组。

Fig. 2 Effect of 7-HEC on brain histomorphology of rats under hypobaric hypoxia condition(HE, 400×)

A-normal group; B-model group; C-acetazolamide group; D-7-HEC group.

3.2 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

与正常组相比, 模型组大鼠脑组织中 H_2O_2 和 MDA 含量明显升高($P < 0.01$), 表明低压低氧诱导脑组织出现氧化应激损伤。与模型组比, 经乙酰唑胺或 7-HEC 预处理后, 脑组织中 H_2O_2 和 MDA 水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 氧化应激状态得到缓解, 结果见图 3。

3.3 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中抗氧化酶活力的影响

与正常组比较, 模型组大鼠脑组织中抗氧化酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)的活性显著降低

($P < 0.01$)。与模型组比, 经乙酰唑胺或 7-HEC 预处理后能够逆转模型大鼠这种变化, 提高抗氧化酶活力($P < 0.01$), 说明 7-HEC 能够维持脑组织的抗氧化体系, 结果见图 4。

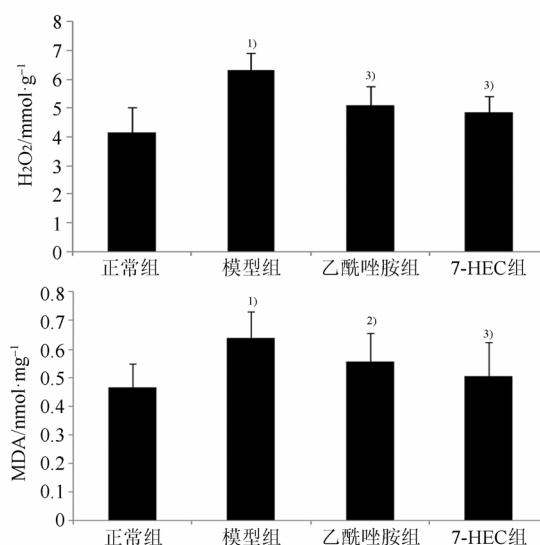


图 3 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中 H_2O_2 和 MDA 水平的影响

与正常组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Effect of 7-HEC on the level of H_2O_2 and MDA in rats' brain under hypobaric hypoxia condition

Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

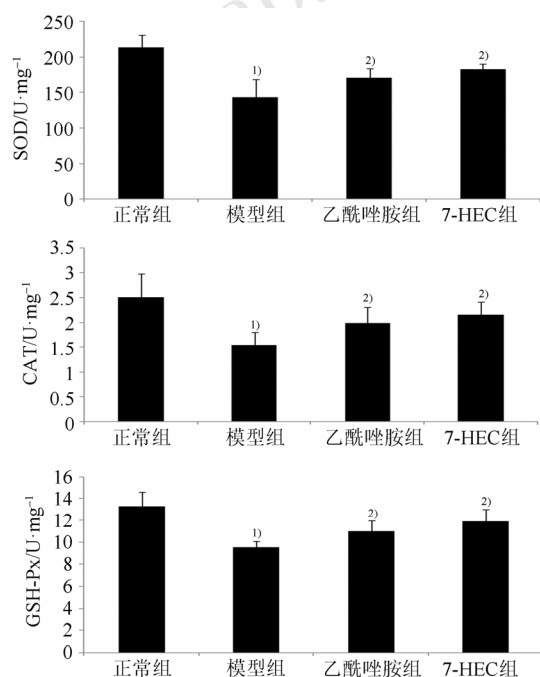


图 4 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中抗氧化酶的影响

与正常组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Effect of 7-HEC on the activity of antioxidant enzyme in rats' brain under hypobaric hypoxia condition

Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.01$.

3.4 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中 ATP 酶活力的影响

与正常组比较, 低压低氧使大鼠脑组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 的活力显著降低($P<0.01$)。与模型组比, 经 7-HEC 和乙酰唑胺预处理均能显著提高 ATP 酶活力($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 结果见图 5。

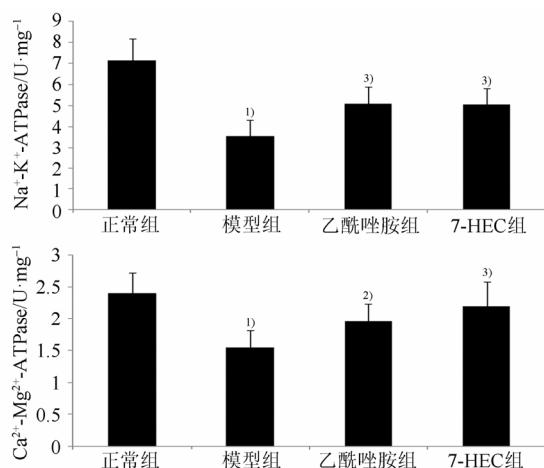


图 5 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中 ATP 酶的影响
与正常组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of 7-HEC on the activity of ATPase in rats' brain under hypobaric hypoxia condition

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.5 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中凋亡相关蛋白的影响

与正常组比较, 模型组大鼠脑组织中促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 的表达上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的显著下调, 造成 Bax/Bcl-2 的比值显著升高($P<0.01$)。与模型组比, 经 7-HEC 和乙酰唑胺预处理均能促进 Bcl-2 的表达, 而降低 Bax、caspase-3 的表达和 Bax/Bcl-2 的比值($P<0.01$), 显著抑制低压低氧诱导的细胞凋亡, 结果见图 6。

4 讨论

近年来, 随着“一带一路”国家战略的稳步推进, 进驻高原地区的人群增长显著。高原地区特殊的低压低氧环境会对机体心、脑、肺、肾脏等多个脏器造成损伤。脑组织是机体最大的耗氧器官之一, 同时含有丰富的不饱和脂肪酸, 但是抗氧化体系较为薄弱, 这些特征使得其对低压低氧诱导的损伤极为敏感^[5-6]。本研究结果显示, 低压低氧造成大鼠脑细胞排列出现紊乱, 神经元细

胞减少, 核异形且着色变深; 经 7-HEC 预处理后, 能够缓解高原缺氧诱导的脑组织损伤。

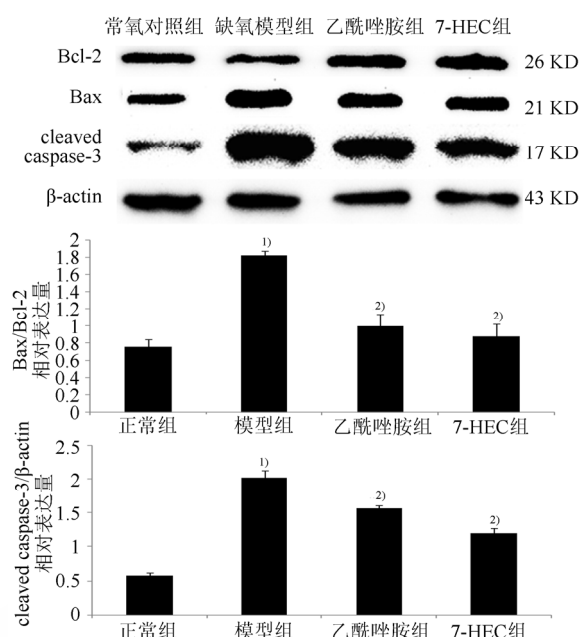


图 6 7-HEC 对低压低氧大鼠脑组织中凋亡相关蛋白表达的影响

与正常组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effect of 7-HEC on the expression of apoptosis-related protein in rats' brain under hypobaric hypoxia condition

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

本研究发现, 低压低氧能够诱导脑组织中 ROS 的大量生产, 造成 H_2O_2 水平明显升高; 过量的 ROS 通过与细胞膜中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 造成 MDA 蓄积^[7]。抗氧化酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)一直被认为是机体抵抗氧化应激损伤的重要屏障, 通过抑制 ROS 生成和脂质过氧化反应^[8]。而低压低氧在大量产生 ROS 的同时还降低抗氧化酶的活性, 进一步造成自由基稳态的失衡, 加剧细胞损伤^[9]。7-HEC 能够清除 ROS, 抑制脂质过氧化, 同时显著提高抗氧化酶的活力, 缓解低压低氧对脑组织造成的氧化应激损伤。

ATPase 是细胞内膜结合酶, 对维持细胞内的离子稳态具有重要作用。其中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 介导了 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 在细胞膜上的转运, 保持低 Na^+ 、 Ca^{2+} 高 K^+ 的细胞内环境和静息电位^[10-11]。研究表明, 低压低氧能够抑制脑组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 活性, 使细胞内 Na^+ 蓄积, Ca^{2+} 超载, 增加细胞膜的

通透性,造成能量代谢紊乱,ATP生成减少^[12-13]。本实验结果与前期研究结论一致,模拟海拔8000 m处理24 h后,大鼠脑组织中Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性显著下降,7-HEC可以上调ATPase的活力,维持脑组织细胞能量代谢稳态。

除氧化应激外,低压低氧诱导的脑组织损伤与细胞凋亡密切相关^[14]。因此,本研究对凋亡相关蛋白的表达进行了考察。Bcl-2是目前首个公认的抗凋亡蛋白,能够抑制细胞凋亡。Bax作为重要的促凋亡蛋白,能够促进细胞色素C(Cytc)从线粒体释放到胞质中与caspase-9结合,从而激活下游caspase-3,启动凋亡过程,诱导细胞凋亡^[15]。Bax-Bax同二聚体能够诱导细胞凋亡,而Bcl-2-Bax异二聚体则能够促进细胞存活,因此,Bax/Bcl-2的比值通常用于反映细胞凋亡状态^[16]。本研究结果显示,低压低氧导致大鼠脑组织中促凋亡蛋白caspase-3的表达和Bax/Bcl-2的比值显著升高;而7-HEC预处理可以降低caspase-3的表达和Bax/Bcl-2的比值。上述实验证明:7-HEC能够显著抑制低压低氧诱导的大鼠脑组织细胞凋亡。

综上所述,7-HEC对低压低氧大鼠脑组织具有较好的保护作用,其作用机制与其清除过量ROS,降低脂质过氧化,缓解氧化应激,改善能量代谢和抑制细胞凋亡有关。

REFERENCES

- [1] MANI R, NATESAN V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action [J]. *Phytochemistry*, 2018(145): 187-196.
- [2] QU Y, ZHANG Y, XIONG T, et al. Research progress in the preparations of chrysin [J]. *China Pharm(中国药师)*, 2018, 21(4): 714-717.
- [3] MA H P, JING L L, FAN P C, et al. Synthesis method of 7-hydroxyethyl chrysin and application of 7-hydroxyethyl chrysin in preparation of anti-hypoxia medicines: China, CN104926769A [P]. 2015-09-23.
- [4] WU J H. The anti-cerebral ischemia effect of chrysin and

hydroxyethyl chrysin on rats [D]. Lanzhou: Lanzhou University(兰州大学), 2015.

- [5] DOSEK A, OHNO H, ACS Z, et al. High altitude and oxidative stress [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158(2/3): 128-131.
- [6] ASKEW E W. Work at high altitude and oxidative stress: Antioxidant nutrients [J]. *Toxicology*, 2002, 180(2): 107-119.
- [7] MAITI P, SINGH S B, SHARMA A K, et al. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain [J]. *Neurochem Int*, 2006, 49(8): 709-716.
- [8] SHI Q H, FU J F, GE D, et al. Huperzine A ameliorates cognitive deficits and oxidative stress in the Hippocampus of rats exposed to acute hypobaric hypoxia [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(9): 2042-2052.
- [9] GONG G, YIN L, YUAN L B, et al. Ganglioside GM1 protects against high altitude cerebral edema in rats by suppressing the oxidative stress and inflammatory response via the PI3K/AKT-Nrf2 pathway [J]. *Mol Immunol*, 2018(95): 91-98.
- [10] BOGDANOVA A, PETRUSHANKO I Y, BOLDYREV A, et al. Oxygen- and redox-induced regulation of the Na/K ATPase [J]. *Curr Enzym Inhib*, 2006, 2(1): 37-59.
- [11] ABDULKAREEM A O, OLAFIMIHAN T F, AKINBOBOLA O O, et al. Effect of untreated pharmaceutical plant effluent on cardiac Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activities in mice(*mus musculus*) [J]. *Toxicol Rep*, 2019(6): 439-443.
- [12] MA H P, FAN P C, JING L L, et al. Anti-hypoxic activity at simulated high altitude was isolated in petroleum ether extract of *Saussurea involucreata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1510-1515.
- [13] WANG X B, HOU Y, LI Q Y, et al. *Rhodiola crenulata* attenuates apoptosis and mitochondrial energy metabolism disorder in rats with hypobaric hypoxia-induced brain injury by regulating the HIF-1 α /microRNA 210/ISCU1/2(COX10) signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111801. Doi: 10.1016/j.jep.2019.03.028.
- [14] MAITI P, SINGH S B, MALLICK B, et al. High altitude memory impairment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum [J]. *J Chem Neuroanat*, 2008, 36(3/4): 227-238.
- [15] TAYLOR R C, CULLEN S P, MARTIN S J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 231-241.
- [16] BASU A, HALDAR S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death [J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(12): 1099-1109.

收稿日期: 2019-06-20

(本文责编: 沈倩)