

熊果酸对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

陈鹏*, 丁志杰

(邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056001)

[摘要] **目的:**研究熊果酸对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用并探讨其作用机制。**方法:**120只清洁级雄性SD大鼠随机分为假手术组、局灶性脑缺血再灌注模型组、熊果酸(20, 40, 80, 120 mg·kg⁻¹)治疗组, 每组20只。采用颈内动脉线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 术后通过尾静脉注射给药。6 h后, 盲法行神经功能评分, 测定脑梗死体积及脑组织含水量, 测定血清中肌酸激酶(CK), 乳酸脱氢酶(LDH), 丙二醛(MDA)含量以及总抗氧化能力(T-AOC); 检测脑组织中超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 过氧化氢酶(CAT)活性及MDA含量; 通过苏木精-伊红(HE)染色法观察脑组织病理形态学改变。**结果:**与假手术组比较, 局灶性脑缺血再灌注模型组大鼠出现明显的行为障碍, 血清中CK, LDH, MDA含量显著降低($P < 0.01$), T-AOC显著降低($P < 0.01$), 脑梗死体积和脑组织含水量显著升高($P < 0.01$), 脑组织中SOD, GSH-Px, CAT活性显著升高($P < 0.01$), 并且脑组织出现明显的病理性改变; 与脑缺血再灌注模型组相比, 熊果酸(40 ~ 120 mg·kg⁻¹)治疗组大鼠行为障碍显著好转($P < 0.05, P < 0.01$), 血清中CK, LDH, MDA含量显著降低($P < 0.05$), T-AOC显著升高($P < 0.05, P < 0.01$); 熊果酸(80, 120 mg·kg⁻¹)治疗组脑梗死体积和脑组织含水量显著降低($P < 0.05, P < 0.01$), 脑组织中SOD, GSH-Px, CAT活性显著升高($P < 0.05, P < 0.01$), MDA含量显著降低($P < 0.05$); 脑组织病理形态学改变明显减轻, 其中以熊果酸120 mg·kg⁻¹治疗组效果最为显著。**结论:**熊果酸对大鼠脑缺血再灌注损伤具有剂量依赖性的保护作用, 该作用可能与熊果酸有效改善抗氧化酶系统活性、减轻自由基损伤有关。

[关键词] 熊果酸; 脑缺血再灌注; 保护作用; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0129-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015120129

Protection and Mechanism of Ursolic Acid on Focal Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

CHEN Peng*, DING Zhi-jie (Handan Central Hospital, Handan 056001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protected effects and mechanism of ursolic acid (UA) against focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats. **Method:** Totally 120 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups as following: sham operation group, ischemic-reperfusion model group, UA 20, 40, 80, 120 mg·kg⁻¹ treated groups, 20 experimental animals every group, respectively. The model of focal cerebral ischemic reperfusion was established with Zea-Longa occluding suture in rats. Drugs were given immediately by tail injection when the suture was inserted. And 6 h later, the neurological deficits, ratio of infarct volume, water content of the brain were evaluated. Total antioxidative capacity (T-AOC) and the content of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) in serum were determined. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, (GSH-Px), catalase (CAT) and the content of MDA in brain tissue were determined, and the histopathological changes were observed by haematoxylin and eosin (HE) staining. **Result:** Compared with sham operation group, the neurological scores of focal cerebral ischemia-reperfusion model group was significantly decreased ($P < 0.01$); the content of CK, LDH, MDA in serum were significantly increased ($P < 0.01$), and the level of T-AOC was significantly decreased ($P < 0.01$); the ratio of infarct volume and water content of the brain were significantly increased ($P < 0.01$); the activity of SOD, GSH-Px, CAT in brain tissue were significantly decreased ($P < 0.01$), the content of MDA was significantly increased ($P < 0.01$); and the histopathological changes of brain tissue was appeared. Compared with focal cerebral ischemia-reperfusion model group, the neurological scores of UA (40, 80, 120 mg·kg⁻¹) treated groups was

[收稿日期] 20141102(003)

[通讯作者] * 陈鹏, 主管药师, Tel: 0310-2118004, E-mail: hdzxyyhp@163.com

significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the contents of CK, LDH, MDA in serum were also significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while T-AOC was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The ratio of infarct volume and brain water content of UA ($80, 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) treated groups were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the activity of SOD, GSH-Px, GST in brain tissue of UA ($80, 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) treated groups was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the histopathological changes of UA treated groups were significantly improved compared with ischemia-reperfusion model group. **Conclusion:** UA can protect focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats, which may be related with its pharmacological effects of enhancing the activity of antioxidant enzymes and free radical scavenging capacity.

[**Key words**] ursolic acid; cerebral ischemic-reperfusion; protect; mechanism

缺血性脑血管病是临床常见病、多发病之一,根据世界卫生组织(WHO)统计,约 30% 缺血性脑血管病患者会由于溶栓治疗或自发性溶栓而实现血管再通,从而发生缺血再灌注损伤。脑缺血再灌注损伤过程是一个复杂的损伤级联反应,其中大量自由基的产生与过剩,进而造成脂质过氧化损伤是其重要的病理基础^[1]。熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸,是一种五环三萜类化合物,Nascimento P G 等^[2]多项研究发现,熊果酸具有明显的抗氧化作用,此外熊果酸还具有抗炎、降血脂、抗肿瘤、抗病毒等多种药理作用^[3-5],并且毒副作用低,具有良好的临床应用开发前景。笔者将通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究熊果酸对脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 熊果酸(陕西慧科植物开发有限公司,批号 120417,HPLC 检测纯度 $\geq 98\%$);肌酸激酶(CK)试剂盒(批号 130214),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 130406),总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(批号 121228),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 1300210),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 130103),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号 130519),过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号 130327),(南京建成生物工程研究所),氯化-2,3,5-三苯基四氮唑(TTC,中国医药集团上海化学试剂公司,批号 20120521),其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,250~300 g,鼠龄 4~5 个月,由河北省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(冀)2008-1003。

1.3 仪器 UV-1200 型紫外-可见光分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),310 型全自动生化分析仪(武汉精诚伟业医疗设备有限公司),SZ 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),FS-2 型组织匀浆机(金坛市盛威实验仪器厂),4062 型石蜡切片机(德

国 SLEE 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将 120 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为 6 组:假手术组、脑缺血再灌注模型对照组、熊果酸 20,40,80,120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,每组 20 只。

2.2 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备 参照 Longa 等^[6]报道的线栓法复制局灶性脑缺血再灌注大鼠模型:10% 水合氯醛 *ip* 麻醉,颈正中切口约 2 cm,依次钝性分离左侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA),颈内动脉(ICA)。结扎 CCA 的近心端和 ECA,用无创动脉夹夹闭 ICA,在 ECA 残端开一小口,插入浸过肝素钠的栓线,同时松开夹闭 ICA 的动脉夹,栓线插入至大脑前动脉止。栓线插入后在 ECA 插口近端用线结扎;2 h 后,打开缝合处,将栓线轻轻拔出。假手术组除不插入栓线外,其余操作同手术组。各组于插入栓线后立即通过尾静脉注射给药,假手术组和模型组分别给予等体积的生理盐水。

2.3 神经功能评分 参照 Zausinger 等^[7]的 5 分制评分方法,于术后 6 h 进行盲法评分。将动物置于地板上,不能自行行走计为 0 分;自由走动出现向一侧转圈计为 1 分;提起鼠尾,向缺血对侧旋转计为 2 分;向缺血对侧推挡阻力下降计为 3 分;缺血对侧前肢出现腕屈曲、肩内旋计为 4 分;无神经功能缺损症状计为 5 分,分值越低,说明动物行为障碍越严重。

2.4 脑梗死体积(IV)的测定 参照 Gotoh 等^[8]建立的方法,于术后 6 h 测定脑梗死体积:断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干,剩余部分沿冠状做 5 个连续大脑切片,置于 2% TTC 染色液中,37 °C 避光孵育 30 min,红色区域为正常脑组织,苍白色为梗死区。用图像分析软件 Imagepro Plus 6.0 分析梗死体积比。

2.5 脑组织含水量的测定 术后 6 h,断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干,称定大脑湿质量,然后置

于 110 ℃ 恒温干燥箱中烘烤 48 h 后称定干质量。计算脑含水量。

$$\text{脑含水量} = (\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量} \times 100\%$$

2.6 血清中 CK, LDH, MDA 含量以及 T-AOC 的检测 术后 6 h, 腹主动脉取血, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后取上层血清, 生化检测仪测定血清中 CK, LDH 含量; 紫外-可见分光光度计测定血清中 T-AOC, MDA 的含量。

2.7 脑组织中 SOD, GSH-Px, CAT 活性以及 MDA 含量的检测 术后 6 h, 断头取脑, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 将剩余部分剪碎加入适量冷裂解液后研磨匀浆, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 测定脑组织中 SOD, GSH-Px, CAT 活性和 MDA 含量。

2.8 脑组织病理形态学改变 术后 6 h, 断头取脑, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 将剩余部分置于 4% 多聚甲醛溶液中进行固定、石蜡包埋、切片, 进行 HE 染色, 光学显微镜下观察脑组织形态学变化。

2.9 统计学方法 应用统计软件 SPSS 13.0 分析处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间采用单因素方差分析进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能评分的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分显著降低 ($P < 0.01$); 经熊果酸 40 ~ 120 mg·kg⁻¹ 治疗后, 神经功能评分较模型组显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见表 1。

3.2 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响 与模型组比较, 经熊果酸 80, 120 mg·kg⁻¹

治疗后, 脑梗死体积显著减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

3.3 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织含水量的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织含水量显著升高 ($P < 0.01$); 经熊果酸 40 ~ 120 mg·kg⁻¹ 治疗后, 含水量较模型组显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见表 1。

表 1 熊果酸对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能评分、脑梗死体积及脑含水量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of ursolic acid on neurological scores, ratio of infarct volume and water content of brain of focal cerebral ischemic-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	神经功能评分 /分	脑梗死体积 /%	脑含水量 /%
假手术	-	5.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	78.2 ± 1.1
模型	-	1.4 ± 0.3 ²⁾	28.8 ± 2.5 ²⁾	85.4 ± 1.3 ²⁾
熊果酸	20	1.8 ± 0.5	26.7 ± 2.8	83.5 ± 1.0
	40	2.0 ± 0.5 ⁴⁾	25.3 ± 3.0	81.1 ± 0.8 ³⁾
	80	2.3 ± 0.7 ⁴⁾	22.7 ± 3.1 ³⁾	77.2 ± 1.2 ⁴⁾
	120	2.7 ± 0.6 ⁴⁾	19.0 ± 2.9 ⁴⁾	75.2 ± 0.9 ⁴⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.4 对局灶性脑缺血再灌注大鼠血清中 CK, LDH, MDA, T-AOC 的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 CK, LDH, MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), T-AOC 显著降低 ($P < 0.01$); 经熊果酸 40 ~ 120 mg·kg⁻¹ 治疗后, 血清中 CK, LDH, MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), T-AOC 显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

表 2 熊果酸对局灶性脑缺血再灌注大鼠血清中 CK, LDH, MDA 含量及 T-AOC 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of ursolic acid on content of CK, LDH, MDA and level of T-AOC in serum of focal cerebral ischemic-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CK /U·L ⁻¹	LDH /U·L ⁻¹	MDA /nmol·L ⁻¹	T-AOC /U·L ⁻¹
假手术	-	161.7 ± 39.2	183.4 ± 70.6	3.5 ± 1.2	16.4 ± 3.7
模型	-	354.6 ± 95.4 ²⁾	397.8 ± 103.4 ²⁾	7.6 ± 1.8 ²⁾	7.8 ± 2.2 ²⁾
熊果酸	20	327.6 ± 97.3	376.4 ± 82.5	5.8 ± 1.4 ³⁾	8.5 ± 2.6
	40	298.4 ± 86.8 ³⁾	326.2 ± 86.7 ⁴⁾	5.4 ± 1.3 ³⁾	9.2 ± 2.3 ³⁾
	80	263.1 ± 57.7 ⁴⁾	291.8 ± 70.4 ⁴⁾	4.9 ± 1.2 ⁴⁾	10.3 ± 3.1 ⁴⁾
	120	227.5 ± 50.9 ⁴⁾	246.7 ± 75.2 ⁴⁾	4.5 ± 1.2 ⁴⁾	11.5 ± 2.8 ⁴⁾

3.5 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织中 SOD, GSH-Px, CAT 活性及 MDA 含量的影响 局灶性脑缺血再灌注模型组大鼠脑组织中 SOD, GSH-Px, CAT 活性较假手术组显著降低 ($P < 0.01$), MDA 含

量显著升高 ($P < 0.01$); 经熊果酸 80 ~ 120 mg·kg⁻¹ 治疗后, 脑组织中 SOD, GSH-Px, CAT 活性显著升高且 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

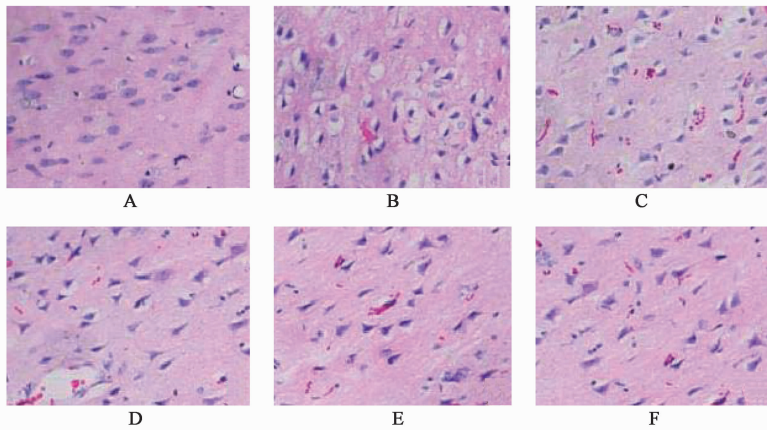
表 3 熊果酸对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织中 SOD, GSH-Px, CAT 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of ursolic acid on activity of SOD, GSH-Px, CAT and content of MDA in brain tissue of the focal cerebral ischemic-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹	CAT /U·mg ⁻¹	MDA /U·mg ⁻¹
假手术	-	15.3 ± 3.5	20.4 ± 3.8	4.5 ± 1.4	3.7 ± 1.2
模型	-	7.1 ± 2.5 ²⁾	9.7 ± 2.6 ²⁾	2.2 ± 0.8 ²⁾	7.2 ± 2.4 ²⁾
熊果酸	20	7.8 ± 2.3	10.2 ± 2.5	2.4 ± 0.9	6.8 ± 2.1
	40	8.2 ± 2.4	10.9 ± 2.4	2.6 ± 1.1	6.5 ± 2.2
	80	9.9 ± 2.3 ⁴⁾	12.7 ± 2.8 ³⁾	3.1 ± 1.0 ³⁾	5.7 ± 1.8 ⁴⁾
	120	11.8 ± 2.6 ⁴⁾	15.2 ± 3.1 ⁴⁾	3.8 ± 1.3 ⁴⁾	4.6 ± 1.3 ⁴⁾

3.6 对大鼠脑组织病理形态学改变的影响 假手术组大鼠大脑皮层神经元结构完整,排列有序,形态正常,未见病理形态学改变。局灶性脑缺血再灌注模型组大鼠缺血侧大脑皮质神经元出现明显的缺血

性病变:神经元排列紊乱,水肿变性,呈空泡状,胞质呈深伊红染色、胞浆疏松,胞核固缩、深染,核仁不清,神经元数量明显减少。熊果酸治疗组缺血区域神经元病理形态学改变明显减轻,见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 熊果酸 20 mg·kg⁻¹组; D. 熊果酸 40 mg·kg⁻¹组; E. 熊果酸 80 mg·kg⁻¹组; F. 熊果酸 120 mg·kg⁻¹组

图 1 熊果酸对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织形态学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effects of ursolic acid on brain tissue histopathological changes of focal cerebral ischemic-reperfusion injury rats (HE, ×400)

4 讨论

缺血性脑血管疾病是发病率和致死率都非常高的疾病,严重危害着人类的生命和健康。目前,及时溶栓恢复血流再灌注以减轻缺血性脑损伤是临床上常用的治疗手段,但将引起“再灌注损伤”^[9]。再灌注损伤是一个复杂的病理生理过程,其中自由基过剩而导致的过氧化发挥着重要作用^[10-11]。

大脑是对氧非常敏感的器官,血流被阻断后几分钟内脑组织将出现无氧酵解,乳酸大量生成而导致酸中毒,致使 CK, LDH 外漏,血清中二者浓度陡然升高,故可作为神经细胞损伤的检测指标^[12]。血清中 T-AOC 水平能够反映机体整体抗氧化能力,脂质过氧化主要终产物 MDA 能够间接反映机体过氧化损伤程度,也能间接反映体内自由基水平^[13]。

SOD 是体内氧自由基的“清道夫”,它能够与氧自由基特异性结合,提供氢原子配体而生成过氧化氢,从而阻断自由基诱导产生的级联反应;GSH-Px 和 CAT 能够催化过氧化氢还原生成对人体无害的 H₂O 和 O₂,进一步降低过氧化损伤^[14-15];所以 SOD, GSH-Px 和 CAT 共同构成了机体的氧化防御系统。

UA 是一种天然存在的五环三萜类化合物,具有抗氧化、抗炎、降血脂等多种生理功能。本实验通过大鼠局灶性脑缺血再灌注模型研究发现,熊果酸能够有效减轻脑组织缺血性病变、减小梗死面积、降低脑组织水肿程度,提示熊果酸对局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,该作用可能与熊果酸能够有效改善抗氧化酶系统活性、降低自由基损伤有关。

[参考文献]

- [1] 张艳波, 王军, 王勇, 等. 小檗碱对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织 BC-12, Bax 表达及凋亡活性影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(2):126-129.
- [2] Nascimento P G, Lemos T L, Bizerra A M, et al. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives [J]. *Molecules*, 2014, 19(1):1317-1327.
- [3] Sundaresan A, Radhiga T, Pugalendi K V. Effect of ursolic acid and Rosiglitazone combination on hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed C57BL/6J mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 741:297-305.
- [4] 张凯, 孙坤, 张皓, 等. 熊果酸和紫杉醇对胃癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华消化杂志, 2014, 34(5):337-339.
- [5] Chen J, Fu H, Wang Z, et al. A new synthetic ursolic acid derivative IUA with anti-tumor efficacy against osteosarcoma cells via inhibition of JNK signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3):724-733.
- [6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in the rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [7] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms[J]. *Brain Res*, 2000, 863(1/2):94-105.
- [8] Gotoh O, Asano T, Koide T, et al. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rats [J]. *Stroke*, 1985, 16(3):100-113.
- [9] 邓海英, 赖为国. 心肌缺血再灌注损伤的机制研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(1):63-64.
- [10] Zhao Y J, Wang Y L, Du L J, et al. Effect of spermine preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury and cardiomyocyte apoptosis in isolated perfused rat heart [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, 28(8):1135-1140.
- [11] Han S X, Yao H L, Li Y Y, et al. Protective effects of *Cuscuta chinensis* Lam. extract on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(4):533-536.
- [12] Sun Y, Pu L Y, Lu L, et al. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41):15289-15298.
- [13] 洪森荣, 尹明. 银杏叶提取物对缺血/再灌注小鼠脑细胞凋亡的保护作用[J]. 中草药, 2007, 38(12):1864-1867.
- [14] Jin Y, Liu K, Peng J, et al. Rhizoma Dioscoreae Nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H₂O₂-induced injury by regulating PPAR γ factor and the NADPH oxidase/ROS-NF- κ B signal pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 232(1):149-158.
- [15] Zhang H, Guo Q, Yang J, et al. Cadmium accumulation and tolerance of two castor cultivars in relation to antioxidant systems [J]. *J Environ Sci (China)*, 2014, 26(10):2048-2053.

[责任编辑 聂淑琴]