

黄芩苷抗脑缺血再灌注损伤的作用机制

王文娟^{1,2}, 任欢欢¹, 韩吉春¹, 王博¹, 李鹏³, 郑秋生^{1*}

1. 石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832002;
2. 新疆生产建设兵团第一师医院, 新疆阿克苏 843000;
3. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100)

[摘要] 目的:探讨黄芩苷对脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制。方法:成年 SD 大鼠 50 只,体重 230~280 g,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为假手术组(Sham),模型组(Model),黄芩苷高、中、低剂量组(135,45,15 mg·kg⁻¹)。每天灌胃给药,假手术组和模型组灌服等容量蒸馏水,连续 7 d,末次给药 1 h 后采用大脑中动脉栓塞法制作脑缺血再灌注模型。缺血再灌注 24 h 后进行神经功能损伤评分,苏木素和伊红染色(HE),DNA 原位缺口末端标记(TUNEL)法检测脑组织形态学变化,试剂盒检测脑组织超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量。结果:与假手术组比较,模型组神经元出现大量凋亡,组织病理学损伤严重,神经功能损伤评分,MDA,TNF- α 及 IL-1 β 含量明显升高($P < 0.01$),SOD 活性明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芩苷能抑制神经元凋亡,改善组织病理学损伤,高剂量组能显著降低缺血再灌注大鼠神经功能评分($P < 0.01$),高、中剂量组显著提高脑组织 SOD 活性($P < 0.05$),降低 MDA,TNF- α ,IL-1 β 含量($P < 0.01$),黄芩苷低剂量组亦能显著降低 IL-1 β 含量($P < 0.01$)。结论:黄芩苷对脑缺血再灌注大鼠的脑保护作用,可能与其抑制细胞凋亡、减少自由基损伤、抑制炎症反应有关。

[关键词] 脑缺血再灌注; 自由基; 凋亡; 炎症; 黄芩苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0113-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010113

Anti-cerebral Ischemia/Reperfusion Mechanism of Baicalin in Rats

WANG Wen-juan^{1,2}, REN Huan-huan¹, HAN Ji-chun¹, WANG Bo¹, LI Peng³, ZHENG Qiu-sheng^{1*}

1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, School of Pharmacology, Shihezi University, Shihezi 832002, China;
2. The First Division Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Aksu 843000, China;
3. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of baicalin on cerebral ischemia/reperfusion in rats. **Method:** Fifty adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups as following: sham group, model group, 135 mg·kg⁻¹ baicalin group, 45 mg·kg⁻¹ baicalin group, 15 mg·kg⁻¹ baicalin group, with 10 in each group. The sham and model groups received distilled water *ig* at the same volume and time points as the baicalin groups. Drug or distilled water was administered once a day for 7 d. One hour later after the last administration with baicalin, the middle cerebral artery occlusion was adopted to establish the focal cerebral ischemia/reperfusion model. After 24 h of ischemia/reperfusion, the neurological deficit scores were evaluated. Histopathology changes were observed by hematoxylin and eosin (HE) and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in cerebral tissue were measured by commercial kit. **Result:** Compared

[收稿日期] 20150420(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31471338)

[第一作者] 王文娟, 硕士, 从事神经与心血管药理研究, Tel:18399195309, E-mail:394393654@qq.com

[通讯作者] * 郑秋生, 教授, 从事肿瘤药理与分子药理研究, Tel:13999328286, E-mail:zqsyt@sohu.com

with the sham group, the model group showed severe pathomorphological damages, significantly higher neurological deficit scores and neural apoptosis, MDA, TNF- α and IL-1 β ($P < 0.01$), but remarkably inactive ($P < 0.01$). Compared with the model group, baicalin could improve the histopathology injury, decrease neural apoptosis, baicalin high dose group significantly decreased neurological deficit scores ($P < 0.01$), baicalin middle and high dose groups significantly increased the activities of SOD ($P < 0.05$) and decreased the levels of MDA, TNF- α and IL-1 β ($P < 0.01$). Baicalin low dose group also significantly decreased the levels of IL-1 β ($P < 0.01$).

Conclusion: The baicalin had the cerebral protective effect on cerebral ischemia/reperfusion rats, the mechanism may be related to its characteristics of anti-apoptosis, reduction of free radical damage and suppression of inflammation.

[**Key words**] cerebral ischemia/reperfusion; free radical; apoptosis; inflammation; baicalin

脑缺血再灌注损伤是一个多种致病因子参与的复杂病理生理过程,损伤机制复杂。自由基和炎症与缺血再灌注损伤关系紧密^[1]。脑缺血再灌注可诱发大量自由基,自由基连锁反应是造成脑缺血损伤的核心环节^[2]。炎症级联反应通过多种机制进一步放大组织损伤,在缺血脑损伤中起着至关重要的作用^[3]。

黄芩苷(baicalin)是由唇形科植物黄芩的干燥根中提取的一种黄酮类化合物,其具有抗菌,抗炎镇痛^[4],抗氧化^[5],抗肿瘤^[6]等多种药理活性。黄芩苷对 H₂O₂ 介导的神经元损伤具有保护作用^[7],能抑制神经元凋亡^[8], Xu 等^[9]证实,黄芩苷能清除过氧亚硝酸盐,改善内源性过氧亚硝基介导的神经毒性。但是,黄芩苷对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制研究较少。本实验用大鼠大脑中动脉栓塞模型,观察大鼠脑缺血再灌注后神经功能损伤评分,组织病理学变化,测量脑组织中超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量,探讨黄芩苷对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其可能的机制。

1 材料

1.1 动物 成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 230 ~ 280 g, 新疆医科大学医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(新)2011-0003。

1.2 试剂 黄芩苷(成都曼思特生物科技有限公司,纯度 > 90%, HPLC, 批号 MUST-12112909), SOD 试剂盒(批号 20140415), MDA 试剂盒(批号 20140428), 均购于南京建成生物工程研究所, TNF- α 试剂盒(批号 201403), IL-1 β 试剂盒(批号 201404), 均购于 Tsz Biosciences, Greater Boston, USA, 其他试剂均为市售国产分析纯。

1.3 仪器 Thermo 3001 型多功能酶标仪(美国 Thermo), Eppendorf 5430R 型台式高速冷冻离心机

(德国 Eppendorf), BMJ-1 型石蜡包埋机(天津爱华), Leica RM-2235 型石蜡切片机(德国 Leica), Bx 60 型生物显微镜(日本 Olympus), T 50 型匀浆机(德国 IKA)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 大鼠 50 只随机分为 5 组, 假手术组, 模型组, 黄芩苷高, 中, 低剂量组(135, 45, 15 mg·kg⁻¹), 每组 10 只, 连续 ig 给药 7 d, 末次给药 1 h 后制备脑缺血再灌注模型, 假手术组, 模型组 ig 等容量的蒸馏水。

2.2 脑缺血再灌注模型的制备 参照 Longa^[10] 的线栓法制备大脑中动脉栓塞(MCAO)模型并加以改进。水合氯醛 ip 麻醉大鼠, 分离右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。结扎颈外动脉, 颈总动脉近心端、颈内动脉放置动脉夹, 颈总动脉远心端靠近三岔口处备线, 距三岔口 3 mm 处颈总动脉上剪一开口, 向颈内动脉插入鱼线, 自颈内动脉起始处进线至大脑中动脉开口处深度 18 ~ 20 mm 稍有阻力时停止。结扎颈总动脉和颈内动脉, 固定鱼线, 缝合皮肤。缺血 2 h 后, 将线栓拉出至三岔口处, 剪掉多余的线栓, 实现再灌注。手术过程中用白炽灯加热维持动物体温, 苏醒后放回鼠盒自由进食。假手术组仅分离颈总、颈内和颈外动脉, 不结扎血管, 不插入鱼线。

2.3 神经功能损伤评分 术后 24 h 进行神经功能损伤评分, 参照 Longa^[10] 5 分制评分标准: 0 分, 正常, 无神经功能损伤症状; 1 分, 不能完全伸展对侧前爪; 2 分, 提尾后向外侧转圈, 出现追尾现象; 3 分, 行走时向对侧倾倒, 不能站立; 4 分, 无自发活动, 意识丧失。

2.4 组织形态学检查 大鼠缺血再灌注 24 h 后, 每组选 5 只动物, 麻醉, 经左心室 4% 多聚甲醛灌注取脑, 去除嗅球及后部小脑, 放入 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜。取各实验组大鼠大脑视交叉至漏斗柄

冠状切面的脑组织,常规石蜡包埋,作连续切片,切片厚度为 5 μm,进行 HE 染色,TUNEL 染色。

2.5 生化指标检测 大鼠缺血再灌注 24 h 后,麻醉,断头取脑,去除嗅脑、脑干、小脑,用滤纸擦干余血,称重,用冰生理盐水按质量与体积比为 1:9 的比例冰浴下制备成 10% 的脑组织匀浆,1 万 × g 离心 10 min,收集上清,严格按照说明书测定组织中 SOD,MDA,TNF-α,IL-1β 含量。

2.6 数据处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠神经功能损伤的影响 假手术组未见神经功能损伤。与假手术组比较,模型组大鼠出现明显的神经功能障碍 ($P < 0.01$),提示造模成功;与模型组相比,黄芩苷高剂量组可降低神经功能损伤评分 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 黄芩苷对脑缺血再灌注大鼠神经功能损伤评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of baicalin on neurological deficit scores of cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

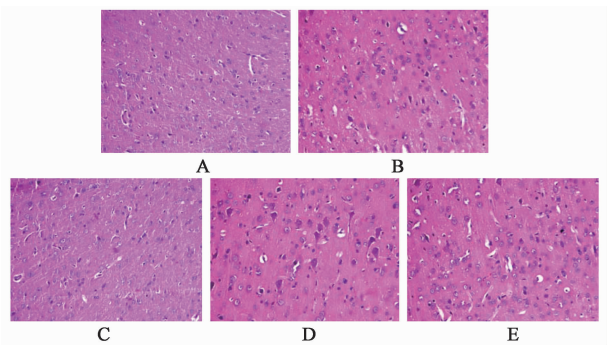
分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	神经功能损伤评分 /分
假手术	-	-
模型	-	2.67 ± 0.47 ¹⁾
黄芩苷	135	1.67 ± 0.47 ³⁾
	45	2.00 ± 0.58
	15	2.17 ± 0.37

注: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 2~3 同)。

3.2 对脑缺血再灌注大鼠脑组织形态学的影响 光镜下观察大鼠脑组织形态,假手术组神经元,胶质细胞及毛细血管形态正常,核仁清晰可见,神经纤维密集,排列整齐;模型组神经元结构变得疏松,排列紊乱,细胞外间隙呈网状增大,神经元肿胀和间质水肿较为明显,有程度不同的神经元变形,核固缩,细胞坏死等现象。黄芩苷明显减少缺血再灌注对大鼠脑组织损伤,细胞肿胀和间质水肿明显缓解。见图 1。

TUNEL 染色观察细胞凋亡情况,凋亡细胞呈棕色,细胞核深染。假手术组有极少凋亡细胞,模型组细胞凋亡显著,细胞皱缩,核深染;黄芩苷组神经细胞凋亡减少,尤其黄芩苷高剂量组效果显著。见图 2。

3.3 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD 活性和



A. 假手术组; B. 模型组; C. 黄芩苷 135 mg·kg⁻¹ 组; D. 黄芩苷 45 mg·kg⁻¹ 组; E. 黄芩苷 15 mg·kg⁻¹ 组(图 2 同)

图 1 黄芩苷对脑缺血再灌注大鼠脑组织形态学的影响(HE, ×200)
Fig.1 Effect of baicalin on histopathological changes of cerebral ischemia/reperfusion in rats (HE, ×200)

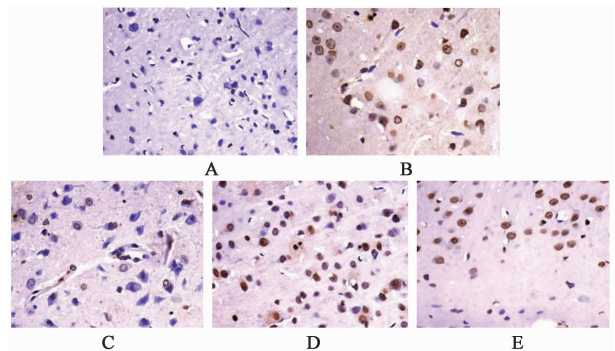


图 2 黄芩苷对脑缺血再灌注大鼠脑组织细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig.2 Effect of baicalin on cerebral cell apoptosis of cerebral ischemia/reperfusion in rats (TUNEL, ×400)

MDA 含量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芩苷高、中剂量可显著降低大鼠 MDA 含量 ($P < 0.01$),显著提高大鼠 SOD 活性 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 黄芩苷对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of baicalin on activities of SOD and levels of MDA in brain tissue of cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
假手术	-	2.04 ± 0.27	143.94 ± 26.05
模型	-	5.25 ± 0.51 ¹⁾	77.57 ± 6.62 ¹⁾
黄芩苷	135	3.03 ± 0.26 ³⁾	111.80 ± 22.81 ²⁾
	45	3.99 ± 0.36 ³⁾	94.19 ± 10.19 ²⁾
	15	4.69 ± 0.23	85.04 ± 5.78

3.4 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 TNF-α, IL-1β 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 TNF-α, IL-1β 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,黄

芩苈各剂量组显著降低 IL-1 β 的含量 ($P < 0.01$), 黄芩苈高剂量组 TNF- α 的含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 黄芩苈对脑缺血再灌注大鼠脑组织 TNF- α , IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of baicalin on levels of TNF- α and IL-1 β in brain tissue of cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹
假手术	-	288.1 \pm 16.8	43.2 \pm 3.0
模型	-	500.7 \pm 33.5 ¹⁾	71.8 \pm 6.5 ¹⁾
黄芩苈	135	382.3 \pm 17.3 ³⁾	51.9 \pm 2.0 ³⁾
	45	419.4 \pm 72.7	57.5 \pm 1.3 ³⁾
	15	454.0 \pm 13.7	61.0 \pm 1.0 ³⁾

4 讨论

脑缺血再灌注导致自由基过度累积,引起脂质过氧化反应“瀑布”,这些自由基导致 DNA 断裂,核酸、蛋白质、细胞膜过氧化,最终加重脑组织损伤^[11]。自由基和细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,MDA 是脂质过氧化反应的产物,间接反映组织受自由基损伤程度。SOD 是重要的内源性自由基清除酶,保护机体免受自由基攻击。缺血再灌注损伤时,SOD 能产生超氧化物,抑制缺血再灌注大鼠脑组织的 DNA 损伤^[12]。本研究结果显示,模型组大鼠脑组织 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低,黄芩苈高、中剂量组大鼠脑组织 MDA 含量明显下降,SOD 活性明显升高,说明黄芩苈能有效清除缺血再灌注产生的自由基,抑制脂质过氧化反应,进而保护缺血脑组织。

脑缺血再灌注损伤诱发炎症反应。受损的神经细胞释放损伤相关蛋白,神经胶质细胞受到缺氧刺激后被激活,激活的小胶质细胞可产生 TNF- α ,细胞活化因子 IL-1 β ,活性氧和其他炎性介质,导致外周免疫细胞浸润,脑内的炎症反应加重。本研究结果显示,缺血再灌注导致脑组织炎性细胞因子 TNF- α , IL-1 β 显著升高,证实了缺血再灌注能导致炎症反应,黄芩苈剂量依赖性的降低 TNF- α , IL-1 β 含量,提示黄芩苈能抑制缺血再灌注引起的炎症反应。

缺血后细胞内自由基生成以及炎症介质激活,均能导致神经元死亡。本实验通过 HE, TUNEL 染色观察到缺血再灌注后神经元结构被破坏,出现大量坏死,凋亡。黄芩苈高剂量组神经元形态改变得到改善,凋亡神经元数量明显减少。提示黄芩苈能维持脑缺血状态下神经元的正常形态及功能,延缓并减轻细胞死亡。

本文实验结果显示,黄芩苈可能通过降低缺血再灌注自由基产生,提高 SOD 活性,提高组织清除自由基的能力,降低 MDA 含量,对抗脂质过氧化损伤,抑制缺血组织炎性因子 TNF- α , IL-1 β 的产生,抑制炎症反应,维持神经元正常形态,抑制神经细胞凋亡和坏死来发挥脑缺血再灌注保护作用。

[参考文献]

[1] 薛进华,王万辉,黄静瑶,等. 脑缺血再灌注损伤时细胞因子的改变及染料木素的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):197-200.

[2] Buch P, Patel V, Ranpariya V, et al. Neuroprotective activity of cymbopogon martinii against cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142(1):35-40.

[3] 李冠,夏振. 姜黄素对大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应和血脑屏障通透性的作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2015,24(8):814-816,877.

[4] 王玉秀,王玉璧,张虹. 黄芩苈滴丸抗炎镇痛作用研究[J]. 中国药事,2012,26(5):446-448.

[5] 郭少英,程发峰,钟相根,等. 黄芩苈的体外抗氧化研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):9-11.

[6] 张珍,闵玮,林秉奖,等. 黄芩苈对 HaCaT 细胞影响的蛋白组学研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志,2011,10(2):83-86.

[7] Zheng W X, Wang F, Cao X L, et al. Baicalin protects PC-12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide via anti-apoptotic effects[J]. Brain Inj, 2014, 28(2):227-234.

[8] Zhou Q B, Duan C Z, Jia Q, et al. Baicalin attenuates focal cerebral ischemic reperfusion injury by inhibition of protease-activated receptor-1 and apoptosis[J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(2):116-122.

[9] Xu M, Chen X, Gu Y, et al. Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(1):116-124.

[10] Long 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.

[11] Wang Z, Liu T, Gan L, et al. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 643(2/3):211-217.

[12] Mansoorali K P, Prakash T, Kotresha D, et al. Cerebroprotective effect of Eclipta alba against global model of cerebral ischemia induced oxidative stress in rats[J]. Phytomedicine, 2012, 19(12):1108-1116.

[责任编辑 聂淑琴]