

凌霄花总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

方晓艳, 吴宿慧, 王琳琳, 郑雁, 苗明三*
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**研究凌霄花总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用,并探讨其作用机制。**方法:**SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,随机分为假手术组,模型组,阳性药组(阿司匹林片,50 mg·kg⁻¹),凌霄花总黄酮高、低剂量组(200,100 mg·kg⁻¹),除假手术组外,建立短暂性大脑中动脉阻塞大鼠模型(tMCAO),采用神经缺损评分(NDS)法评价行为学的改变、苏木素-伊红(HE)染色法评价脑组织病理形态的改变、酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中神经元特异性烯醇化酶(NSE)的水平及脑组织中细胞因子白细胞介素-10(IL-10),转化生长因子-β₁(TGF-β₁)的水平,探讨凌霄花总黄酮对脑缺血再灌注损伤的保护作用。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠神经缺损评分明显升高($P < 0.01$),脑组织病理损伤严重,血清 NSE 水平明显升高($P < 0.01$),脑组织中 IL-10, TGF-β₁ 水平明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,凌霄花总黄酮高剂量组可明显改善模型大鼠的神经缺损症状,降低神经缺损评分($P < 0.05$);凌霄花总黄酮高、低剂量组和阿司匹林组能明显减轻脑组织病理损伤程度($P < 0.01, P < 0.05$),降低血清中 NSE 水平($P < 0.05$),升高脑组织中 IL-10, TGF-β₁ 水平($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**凌霄花总黄酮对短暂性脑缺血再灌注大鼠有一定的保护作用,可能与降低 NSE 水平,升高抗炎细胞因子 IL-10, TGF-β₁ 的水平,减轻炎症损伤有关。

[关键词] 凌霄花总黄酮; 脑缺血再灌注; 神经缺损评分; 神经元特异性烯醇化酶; 抗炎细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0109-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160109

Protective Effects of Campsis Flos Total Flavonoids (CFTF) on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

FANG Xiao-yan, WU Su-hui, WANG Lin-lin, ZHENG Yan, MIAO Ming-san*
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects of total flavonoids from Campsis Flos (CFTF) on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Method:** Sixty SPF grade Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive drug group (aspirin, 50 mg·kg⁻¹), CFTF high dose and low dose groups (200, 100 mg·kg⁻¹). Models of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) were established in all the rats except those in sham operation group. The behavioral injury was detected by neurologic deficit scores (NDS); the cerebral histopathology was detected by HE staining; and the levels of neuron specific enolase (NSE) in serum, interleukin (IL)-10, and TGF-β₁ in brain homogenate were detected by ELISA, to discuss the protective effect of CFTF on cerebral ischemia reperfusion injury. **Result:** As compared with sham operation group, the neurologic deficit scores were significantly higher in rats of model group ($P < 0.01$), with serious cerebral histopathology injuries; and the level of NSE in serum was significantly increased ($P < 0.01$); the levels of IL-10, and TGF-β₁ in brain homogenate were decreased dramatically ($P < 0.01$). As compared with the model group, the neurologic deficit symptoms were significantly improved in CFTF high dose group (200 mg·kg⁻¹), with decreased neurologic deficit scores ($P < 0.05$); cerebral histopathology injury was significantly decreased ($P < 0.01, P <$

[收稿日期] 20150619(001)

[基金项目] 国家教育部科学技术重点项目(211104);河南中医学院博士基金项目(BSJJ2010-01)

[第一作者] 方晓艳,博士,副教授,从事中药防治脑缺血疾病研究, Tel:13598869300, E-mail:fxylele@yeah.net

[通讯作者] *苗明三,博士,教授,从事中药药理学研究, Tel:0371-65962546, E-mail:miaomingsan@163.com

0.05), NSE level in serum was decreased ($P < 0.05$), and levels of IL-10, TGF- β_1 in brain tissues were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in CFTF high dose and low dose groups (200, 100 mg·kg⁻¹) and aspirin group. **Conclusion:** CFTF had the protective effects on tMCAO rats by decreasing the level of NSE, increasing the levels of anti-inflammation cytokines (IL-10 and TGF- β_1), and attenuating the inflammation injury.

[Key words] total flavonoids from Campsis Flos; cerebral ischemia reperfusion; neurologic deficit scores; neuron specific enolase; anti-inflammation cytokine

缺血性脑血管疾病,是威胁人类健康与生存的主要疾病之一,也是国家重点防治的病种,已成为社会广泛关注的疾病。中药具有毒副作用小、作用缓和持久、疗效稳定等特点,在防治缺血性脑血管疾病方面表现出了一定的优越性,而中药有效部位(成分)避开了中药复方组分复杂、有效成分分析困难、生物利用度低等弱点,显示出了绝对优势^[1]。因此从中药中寻找防治缺血性脑血管疾病的药物(有效部位、成分)已成为当前研究的热点。凌霄花为紫葳科植物凌霄的干燥花,始载于《神农本草经》,具有凉血、化痰、祛风的功效;目前凌霄花的临床应用并不广泛,偶有报道凌霄花入复方用于治疗椎基底动脉供血不足性眩晕^[2],更缺少其有效部位的现代药理研究。凌霄花总黄酮[total flavonoids from Campsis Flos(CFTF)]是从凌霄花中提取分离的黄酮类化合物。目前还没有关于 CFTF 抗脑缺血的药理作用报道,本文主要观察 CFTF 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)及白细胞介素-10(IL-10),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的影响,探讨其脑保护作用,为以后临床应用凌霄花防治缺血性脑血管疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 60 只,SPF 级,雄性,体重 280~300 g,山东鲁抗医药股份有限公司,合格证号 SCXK(豫)2013-0001。

1.2 药物及试剂 CFTF(由河南中医药大学药物分析学科提供,总黄酮质量分数 66%),阿司匹林片(石家庄康力药业有限公司,批号 120940),NSE 酶链免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海生工生物工程有限公司,批号 201402),TGF- β_1 及 IL-10 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 228955813,138969813)。

1.3 仪器 NIS-Elements 专业图像分析系统(日本尼康公司),680 Microplate Reader(美国 Bio-Rad 公司),MCAO 线栓(北京沙东生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 CFTF 的提取 取一定量的凌霄花,加 8 倍量

85% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并 2 次提取液,减压回收乙醇至无醇味,得凌霄花提取液,加水将凌霄花提取液调节至质量浓度为 0.5 g·mL⁻¹,按药材量-树脂量(1:8)通过径高比 1:12 的 D101 大孔吸附树脂柱,先用 10 倍柱体积蒸馏水,10% 乙醇洗脱,弃去,后用 85% 乙醇洗脱得总黄酮部位。回收乙醇,蒸干得 CFTF。采用紫外分光光度法,以芦丁为对照品,测得 CFTF 质量分数为 66%。

2.2 造模与分组给药 取大鼠随机分为 5 组,分别为假手术组,模型组,阳性药组(阿司匹林片 50 mg·kg⁻¹),CFTF 高、低剂量组(200,100 mg·kg⁻¹),连续给药 7 d。禁食 12 h 后,最后 1 次 *ig* 1 h 后,各造模组制作短暂性大脑中动脉阻塞(tMCAO)模型。(阿司匹林的剂量设置依据是参考文献剂量;CFTF 的剂量设置依据是按凌霄花临床常用量和黄酮含量折算成大鼠和人的等效剂量,并以预实验验证)。10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹) *ip* 麻醉,仰卧位固定,颈部正中切口,逐层分离暴露左侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA),结扎颈总动脉(CCA)和颈外动脉(ECA),以动脉夹夹闭颈内动脉远心端后,于颈总动脉上做一小切口,从切口处插入头端光滑尼龙线(线身直径 0.28 mm,线头直径(0.38±0.02) mm,距头端 20 mm 处作标记),插入深度 20 mm 左右,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。结扎入口处,尼龙线外留 1~2 cm,缝合皮肤。2 h 后轻轻提拉所留线头至略有阻力,实现再灌注。脑缺血及再灌注过程中保持室温 23~25 ℃。(假手术组只暴露左侧血管不做插线处理)。以动物清醒后左侧出现 Horner 征,提尾时右前肢内收屈曲,或爬行时向右侧旋转视为造模成功。在造模过程中,假手术组因麻醉失误死亡 2 只;模型组 4 只死亡;阿司匹林组 1 只昏迷,2 只死亡;凌霄花高剂量组 1 只造模不成功,2 只死亡;凌霄花低剂量组 3 只死亡。

2.3 取材和指标检测

2.3.1 神经功能缺损评分(NDS) 按照 Zea Longa 5 级评分法^[3],于术后 24 h(即再灌注 22 h)进行评定。评分标准:无明显神经症状,0 分;不能完全伸

展对侧前爪,1 分;行走时向对侧旋转,2 分;行走时向对侧倾倒,3 分;不能自行行走,4 分。0 分视为造模不成功,0 分、昏迷不醒者和死亡的动物不纳入结果统计。

2.3.2 NSE, TGF-β₁, IL-10 含量测定 在手术后 24 h 麻醉动物,腹主动脉取血,分离血清,ELISA 法检测血清中 NSE 水平。冠状取患侧脑前极到视交叉处脑组织,称重,用生理盐水制备 10% 脑匀浆,ELISA 法检测脑组织中 TGF-β₁, IL-10 的含量。

2.3.3 脑组织病理形态观察 每组随机取 6 只动物,冠状取视交叉后脑组织,40 g·L⁻¹ 多聚甲醛固定做 HE 染色。参照 Kato 等^[4] 分级方法,于光学显微镜下对缺血侧皮质区组织学改变进行分级,标准如下: I 级,皮层神经元细胞水肿,变性,少数神经元死亡; II 级,较少量神经元死亡,梗死面积小于缺血侧皮质总面积的 1/3; III 级,成片神经元死亡,梗死面积大于缺血侧皮质总面积的 1/3 小于总面积的 2/3; IV 级,大片神经元死亡,梗死面积大于缺血侧皮质总面积的 2/3。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 进行数据资料的统计学处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。计数资料用频率指标描述,采用 Kruskal-Wallis 法进行多样本等级资料的秩和检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney U 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 tMCAO 大鼠 NDS 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 NDS 明显升高 ($P < 0.01$)。表现为右侧前爪不能完全伸展,行走时向右侧旋转或倾倒,甚至不能行走。与模型组比较,CFTF 高剂量可明显改善缺血再灌注损伤大鼠的神经缺损症状,降低神经缺损评分 ($P < 0.05$),阿司匹林组与模型组比较,神经缺损评分有所降低,但没有统计学差异。见表 1。

3.2 对 tMCAO 大鼠脑组织病理形态变化的影响

3.2.1 脑组织外观变化 假手术组大鼠两侧大脑半球对称,未见水肿。模型组大鼠可见缺血侧大脑半球明显水肿,中线移位,大脑冠状切面可见缺血侧(左侧)大脑中动脉供血中心区有明显的缺血坏死灶。

3.2.2 脑组织切片 HE 染色 假手术组大鼠皮层脑组织结构完整,神经元密集,层次清晰,胞浆丰富,胞核居中染色清楚,形态正常。模型组大鼠脑病灶

表 1 CFTF 对 tMCAO 大鼠 NDS 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of CFTF on neurologic deficit scores of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	NDS/分
假手术	10	-	0 ²⁾
模型	8	-	2.63 ± 0.74
阿司匹林	9	0.05	2.22 ± 0.83
CFTF	9	0.2	1.78 ± 0.67 ¹⁾
	9	0.1	2.00 ± 0.71

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

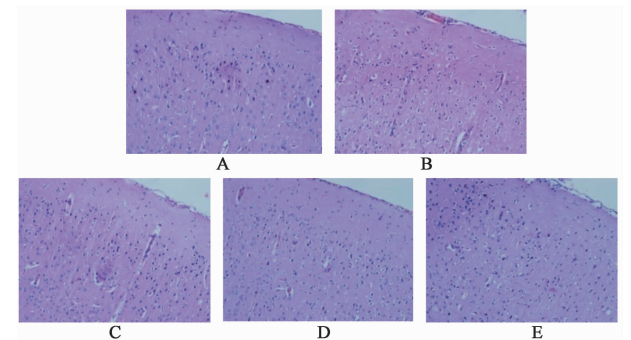
区明显水肿,着色明显变浅,可见神经元排列散乱,大量变性坏死,密度降低,胞核不清,固缩深染,胞体皱缩,胞膜与周围分界明显,神经元脱失。给药各组与模型组相比,正常神经细胞数量明显增多,变性坏死组织范围缩小、程度减轻。与模型组比较,阿司匹林组及 CFTF 高、低剂量组能明显减轻缺血侧脑组织的病理损伤 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与阿司匹林组比较,CFTF 各组没有显著性差异。见表 2,图 1。

表 2 CFTF 对 tMCAO 大鼠脑皮层病理形态学变化的影响 ($n = 6$)

Table 2 Effects of CFTF on histopathology changes in cortex of tMCAO rats ($n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	分级/级			
		I	II	III	IV
假手术	-	0	0	0	0 ²⁾
模型	-	0	1	1	4 ⁴⁾
阿司匹林	0.05	2	2	1	1 ¹⁾
CFTF	0.2	3	2	1	0 ²⁾
	0.1	3	1	1	1 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与阿司匹林组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 阿司匹林组; D. CFTF 0.2 g·kg⁻¹ 组; E. CFTF 0.1 g·kg⁻¹ 组

图 1 CFTF 对 tMCAO 大鼠脑组织病理形态学变化的影响 (HE, × 200)

Fig. 1 Effects of CFTF on histopathology changes in cortex of tMCAO rats (HE, × 200)

3.3 对 tMCAO 大鼠血清 NSE 水平的影响 与假手术组比较,模型组血清中 NSE 水平明显升高 ($P < 0.01$),说明脑缺血急性期神经元细胞受损,NSE 从神经元漏出,进入血液。与模型组比较,阿司匹林组及 CFTF 高、低剂量组能明显降低血清中 NSE 水平 ($P < 0.05$);与阿司匹林组比较,CFTF 各组没有显著性差异。见表 3。

表 3 CFTF 对 tMCAO 大鼠血清 NSE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effects of CFTF on content of NSE in serum of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	NSE/ng·L ⁻¹
假手术	10	-	295.45 ± 14.98 ²⁾
模型	8	-	326.53 ± 21.42 ³⁾
阿司匹林	9	0.05	308.08 ± 11.46 ¹⁾
CFTF	9	0.2	307.64 ± 12.32 ¹⁾
	9	0.1	310.97 ± 12.28 ¹⁾

3.4 对 tMCAO 大鼠脑组织中 TGF-β₁, IL-10 水平的影响 与假手术组比较,模型组脑组织中 IL-10, TGF-β₁ 水平明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,CFTF 高、低剂量组均能明显升高 IL-10, TGF-β₁ 的水平 ($P < 0.01, P < 0.05$),阿司匹林组能明显升高 IL-10 的水平 ($P < 0.01$),有升高 TGF-β₁ 的趋势,但没有统计学差异;与阿司匹林组比较,CFTF 各组没有显著性差异。见表 4。

表 4 CFTF 对 tMCAO 大鼠脑组织中 TGF-β₁, IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of CFTF on contents of TGF-β₁, IL-10 in brain tissue of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁	IL-10
假手术	10	-	45.05 ± 13.78 ²⁾	56.99 ± 11.67 ²⁾
模型	8	-	25.74 ± 8.07	31.71 ± 12.36 ⁴⁾
阿司匹林	9	0.05	38.01 ± 10.89	51.33 ± 16.91 ²⁾
CFTF	9	0.2	43.48 ± 14.73 ²⁾	55.18 ± 15.55 ²⁾
	9	0.1	40.79 ± 16.10 ¹⁾	50.57 ± 17.57 ¹⁾

4 讨论

中药有效部位(成分)防治缺血性脑血管疾病的研究取得了显著成就,有些中药有效部位(成分)已在临床广泛应用,如三七皂苷注射液、川芎嗪注射液、灯盏花素注射液等^[5-7]。多数文献显示,中药有效部位(成分)抗脑缺血的研究主要集中在抗自由基、兴奋性氨基酸、神经元凋亡等方面,本文主要研究凌霄花有效部位 CFTF 对神经元损伤的标志酶 NSE 及抗炎细胞因子 IL-10, TGF-β₁ 等的影响,观察

CFTF 抗脑缺血作用。

脑缺血再灌注损伤时,NSE 是反映神经元损伤的特异性生化指标,且为最灵敏的生化指标,其水平变化能够反映神经元损伤程度及疾病预后。在新生儿缺血缺氧脑病和败血症相关脑病病人血清中 NSE 水平明显升高,可作为疾病诊断和预后的一个生物标志物^[8-9]。动物实验也显示局灶性脑缺血大鼠血清 NSE 水平明显升高^[10]。

TGF-β₁ 是一种多功能细胞因子,参与细胞生长、分化、炎症和组织修复等多种过程,被认为是神经元存活的标志。TGF-β₁ 在正常脑组织中很少表达,在脑组织受损、缺血、缺氧等条件的刺激下表达明显增加^[11]。研究发现大鼠脑缺血再灌注 6 h 缺血灶周围神经元和胶质细胞 TGF-β₁ 表达增多,24 h 达高峰,一直到 72 h 仍有较高的表达^[12]。IL-10 在脑缺血损伤过程中具有抗炎、抗自由基、抗凋亡等多重脑保护作用。MCAO 大鼠侧脑室预先注射 IL-10,脑梗死的体积明显减少,且坏死的神经元计数也显著减少,表明 IL-10 可以减轻脑缺血的组织损伤程度^[13]。脑缺血早期小胶质细胞被激活,释放炎症细胞因子如 TNF-α, IL-1β, 活性氧、氮簇等,引起脑损伤;但同时也释放抗炎细胞因子 IL-10, TGF-β₁ 等减轻炎症损伤^[14]。但仅仅靠缺血刺激产生的 TGF-β₁, IL-10 量小且维持时间短暂,不足以对抗缺血所引起的神经元损伤,因此采取有效的药物治疗手段,提高脑组织中 TGF-β₁, IL-10 的水平,抗脑缺血损伤具有质量意义。

综上所述,CFTF 能明显降低模型大鼠血清中 NSE 水平,相应的神经功能缺损评分和脑组织病理损伤也明显减轻,且能明显升高 IL-10, TGF-β₁ 的水平,说明 CFTF 对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用,其作用机制可能与升高抗炎细胞因子水平,抑制脑缺血炎症反应,减轻神经元损伤有关。本文首次研究了 CFTF 对脑缺血再灌注损伤的保护作用,为临床应用凌霄花防治缺血性脑血管疾病提供了实验依据,也为以后开发 CFTF 提供了理论基础。

[参考文献]

[1] 张爱林,张家玮,徐秋萍,等. 中药有效部位及成分防治脑缺血药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002,9(3):77-79.

[2] 王贤斌,王英. 凌霄花汤治疗椎基底动脉供血不足性眩晕[J]. 湖北中医杂志, 2002,24(9):26.

[3] 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.
- [4] Kato H, Liu Y, Araki T, et al. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects [J]. Brain Res, 1991, 553(2): 238-342.
- [5] 马立, 吴明华, 梁森, 等. 三七总皂苷对脑缺血后神经血管的保护机制[J]. 吉林中医药, 2013, 33(7): 720-723.
- [6] 胡长鹏, 唐勤, 邢茂. 川芎嗪抗脑缺血再灌注损伤作用机制的研究进展[J]. 中国中医急症, 2014, 23(9): 1680-1682.
- [7] 尹明华, 徐晓红, 李怡佳. 灯盏花素对缺血再灌注小鼠脑细胞凋亡的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(3): 184-188.
- [8] Pei X M, Gao R, Zhang G Y, et al. Effects of erythropoietin on serum NSE and S-100B levels in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(7): 705-708.
- [9] Yao B, Zhang L N, Ai Y H, et al. Serum S100 β is a better biomarker than neuron-specific enolase for sepsis-associated encephalopathy and determining its prognosis: a prospective and observational study [J]. Neurochem Res, 2014, 39(7): 1263-1269.
- [10] 甄丽芳, 罗远带, 黄福开. 七十味珍珠丸对局灶性脑缺血大鼠的神经保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 90-92.
- [11] 田军彪, 臧春柳, 崔媛. 复方菖蒲益智汤对脑缺血再灌注损伤小鼠 IL-1 β 及 TGF- β_1 表达水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2309-2311.
- [12] 赵敏, 李江华, 霍晓东. 高血压大鼠脑缺血再灌注后 TGF- β_1 、Caspase-3 的表达与细胞凋亡[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 205-206.
- [13] 刘楠, 陈荣华, 郑安, 等. IL-10 对大鼠脑缺血损伤保护作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(13): 988-990.
- [14] Amantea D, Micieli G, Tassorelli C, et al. Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke[J]. Front Neurosci, 2014, 9(2): 2366-2378.
- [责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》社声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名, 冒用本刊名义, 骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明: ① <http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名, 其他域名均非本刊。

② 本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③ 投稿成功后, 为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为, 本刊将通过法律程序进行维权。