

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

薛进华,王万辉,黄静瑶,黎晓,黄志华,李良东*,曾靖*
(赣南医学院,江西赣州 341000)

[摘要] **目的:**研究染料木素对脑缺血再灌注损伤的保护作用,并初步探讨其保护作用与炎症反应之间的关系。**方法:**雄性 SD 大鼠随机分成 5 组:假手术组、脑缺血再灌注损伤模型组、脑缺血再灌注损伤模型 + 溶剂对照组、脑缺血再灌注损伤模型 + 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 染料木素组、脑缺血再灌注损伤模型 + 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 染料木素组。采用大鼠大脑中动脉栓塞制作局灶性脑缺血再灌注损伤模型,缺血后 10 min,于背部皮下注射不同剂量的染料木素、溶剂或生理盐水。缺血 2 h,再灌注 24 h 后,麻醉后取脑,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色,测定脑梗死体积;取前脑称湿重,烘干后称干重,计算脑组织含水率;化学比色法测定血清、脑组织乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性;放射免疫学方法检测血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平。**结果:**与假手术组相比,模型组大鼠脑组织出现明显的白色梗死区,脑组织含水率升高($P < 0.05$)、LDH 活性降低($P < 0.05$),血清 LDH 活性升高($P < 0.01$),血清 IL-6($P < 0.001$)、IL-1 β ($P < 0.01$)及 TNF- α ($P < 0.05$)含量升高;与模型组相比,染料木素治疗组脑梗死范围减小,脑组织含水率降低($P < 0.05$),血清 LDH 活性降低($P < 0.05$),脑组织 LDH 活性升高($P < 0.05$),血清 IL-6($P < 0.001$)、IL-1 β ($P < 0.05$)及 TNF- α ($P < 0.01$)含量降低。**结论:**染料木素对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,其保护机制与降低炎症细胞因子 IL-6,IL-1 β 及 TNF- α 的合成进而减轻脑水肿有关。

[关键词] 染料木素; 脑缺血再灌注损伤; 脑水肿; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0197-04

[doi] 10.11653/syfj2013220197

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130917.1611.004.html>

[网络出版时间] 2013-09-17 16:11

Effect of Genistein on Inflammatory Cytokines Levels in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury

XUE Jing-hua, WANG Wan-hui, HUANG Jing-yao, LI Xiao, HUANG Zhi-hua, LI Liang-dong*, ZENG Jing*
(Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects of genistein (Gen) on cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and mechanism about inflammatory reaction and cytokine secretion. **Method:** A rat I/R injury was made through embolization of the middle cerebral artery, and rats were treated with Gen (0.75, 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) via sublingual vein injection. The volumes of infarction and water content in the cerebral tissue, the activities of lactate dehydrogenase (LDH) in serum and brain tissue, and the interleukin (IL) -6, IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum were measured. **Result:** Compare with the sham operation group, the rats in I/R group showed an obvious white infarction area, an increased water content ($P < 0.05$), and

[收稿日期] 20130610(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31360250);江西省自然科学基金项目(20114BAB205078,20122BAB205037);江西省教育厅科技项目(GJJ12554);江西省卫生厅科技项目(20121094)

[第一作者] 薛进华,讲师,在读博士,从事神经生物学研究,Tel:18970786296,E-mail:9075851@qq.com

[通讯作者] *曾靖,教授,硕士研究生导师,从事心血管药理、中草药药理研究,Tel:13879769873,E-mail:zengjing61@hotmail.com

*李良东,教授,硕士研究生导师,从事心脑血管疾病研究,Tel:13879750765,E-mail:lld_666@163.com

decrease LDH activity ($P < 0.05$) in brain tissue. Meanwhile, it showed advances LDH activity ($P < 0.01$) and IL-6 ($P < 0.001$). IL-1 β ($P < 0.01$) and TNF- α ($P < 0.05$) levels in serum. After treated with Gen, the rats with cerebral I/R injury showed decreases in the volumes of infarction, water content ($P < 0.05$), LDH activity ($P < 0.05$), and IL-6 ($P < 0.001$), IL-1 β ($P < 0.05$) and TNF- α ($P < 0.01$) levels in serum, and an increased in LDH activity in brain tissue ($P < 0.05$). **Conclusion:** Genistein has a therapeutic effect on rat with cerebral I/R injury because its down-regulating inflammatory cytokines levels such as IL-1 β , TNF- α , IL-6, suppresses inflammatory reaction, and then controls cerebral edema.

[**Key words**] genistein; cerebral ischemia/reperfusion injury; cerebral edema; cytokine

自 Setehell 和 Adlererertz 首次证实异黄酮和木醋体与哺乳动物雌激素结构的相似性,并阐述它们可能具有防癌作用以来,植物雌激素就受到人们的广泛关注^[1]。由于植物雌激素具有弱雌激素作用的同时能减少雌激素带来的一系列不良反应,因此在临床应用方面具有广阔的前景。染料木素(又名金雀异黄素、染料木黄酮)(genistein, Gen),为植物雌激素的一种,具有抑制酪氨酸激酶活性^[2],常作为工具药用以研究酪氨酸激酶介导的信号通路。同时,Gen 结构与雌二醇相似,能与雌激素胞膜及胞内受体结合发挥作用,如抗肿瘤作用、神经保护作用、调节骨代谢与脂代谢、心血管保护等作用^[3-10]。本实验通过应用大鼠中动脉栓塞所致的局灶性脑缺血再灌注损伤模型研究 Gen 对脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其保护作用与炎症细胞因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的关系。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重 250 ~ 280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2009-0004,动物合格证号 HNASLKJ20120217。

1.2 药品和试剂 染料木素由沈阳药科大学中药学院植化教研室提供,纯度为 99%,实验前用二甲基亚砜(DMSO)溶解,使用时用生理盐水稀释至所需浓度。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)(上海试剂三厂,批号 971218),IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 放免试剂盒由解放军总医院东亚放免所提供,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 SN-695 型智能放免测量仪(上海核福光电仪器有限公司),ZS83-1 型内切式组织匀浆器(浙西机械厂),BS224S 型电子天平(美国赛多利

斯),DHG9246A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 实验分组与大鼠脑缺血再灌注损伤模型的制备 雄性 SD 大鼠 120 只,250 ~ 280 g,随机分成 5 组,分别为假手术组、脑缺血再灌注损伤模型组、脑缺血再灌注损伤模型 + 溶剂对照组、脑缺血再灌注损伤模型 + 0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gen 组、脑缺血再灌注损伤模型 + 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gen 组。大鼠用 10% 水合氯醛溶液(350 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip)麻醉,参照 Longa 等^[11]的方法制备大鼠中动脉阻断模型,将一尼龙线(长 4 cm,直径 0.26 mm)经颈总动脉主干切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进,以颈总动脉分叉处为标记,推进 18 ~ 20 mm 感到轻微阻力时,即到达较细大脑前动脉,阻断大脑中动脉的所有血液供应,2 h 后,拔出尼龙线并扎紧颈总动脉,缝合皮下组织和皮肤,完成脑缺血再灌注损伤模型。假手术组大鼠只暴露和分离出颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,不闭塞大脑中动脉。术中严格控制室温在 23 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。药物组于缺血后分别皮下注射不同剂量的 Gen 或溶剂,假手术及模型组给予同体积的生理盐水皮下注射。

2.2 神经功能行为评分 缺血 1 h 再灌注 2 h 后,按 Longa 法对动物的神经功能行为进行评分,标准如下:①0 分,未观察到神经功能缺陷症状;②1 分,不能完全伸展手术对侧前爪(轻度局灶性神经功能缺陷);③2 分,向手术对侧转圈(中度局灶性神经功能缺陷);④3 分,向手术对侧倾倒(重度神经功能缺陷);⑤4 分,不能自发行走,意识昏迷。评分为 1 ~ 3 分大鼠为模型制作成功。

2.3 脑梗死范围检测 再灌注 24 h,麻醉后,断头处死大鼠。取脑,盐水洗净后滤纸吸干,将前脑沿冠状面切成厚度基本相同的 5 片,脑片置于 5 mL 2% TTC 染色溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。经染色后

非缺血区呈玫瑰红色,梗死区呈白色。再将脑片置10%甲醛中固定24 h后,扫描仪采取图像。

2.4 脑组织含水率测定 再灌注24 h,上述方法取前脑称湿重,再将脑组织烘干(105 °C × 24 h)后称重,按干湿重法,计算脑组织含水量。

脑组织含水率 = (脑湿重 - 脑干重) / 脑湿重 × 100%

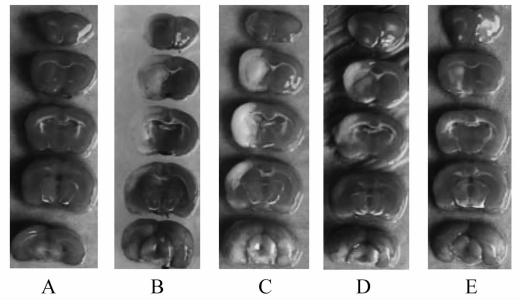
2.5 血清及脑组织 LDH 活性测定 再灌注24 h,麻醉后,断头取血及大脑组织。2 000 r·min⁻¹,离心10 min,分离血清于-80 °C冰箱中保存。脑组织置于玻璃试管中,按质量与体积比为1:99比例冰浴下以冰生理盐水制备成1%的脑组织匀浆,3 500 r·min⁻¹,离心10 min,分离上清于-80 °C冰箱保存。严格按照试剂盒说明,化学比色法测定血清及脑组织 LDH 活性。

2.6 血清 IL-6, IL-1 β , TNF- α 含量测定 上述方法分离血清于-80 °C冰箱中保存。严格按试剂盒说明,放射免疫学方法检测血清 IL-6, IL-1 β , TNF- α 含量。

2.7 统计学方法 应用 Prism 5.0 统计学软件进行统计学分析。各测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各测定指标的总体比较采用单因素方差分析,组内各指标的多重比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注损伤时大鼠脑梗死范围的影响 假手术组脑组织染色呈玫瑰红色,无明显脑组织损伤;与模型组相比,各剂量的 Gen 组脑组织坏死区(呈灰白色)体积减小,且表现出一定的剂量依赖性,1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gen 组效果更好。见图 1。



A. 对照组;B. 模型组;C. 溶剂组;

D. 0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gen 组;E. 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gen 组

图 1 Gen 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死体积的影响(TTC 染色)

3.2 对脑缺血再灌注损伤时大鼠血清、脑组织 LDH 活性及脑组织含水率的影响 与假手术组大鼠相比,模型组($P < 0.01$)及溶剂组血清 LDH 活性升高($P < 0.01$);与模型组相比,高、低剂量 Gen 治疗后血清 LDH 活性均降低($P < 0.05$);与假手术组大鼠相比,模型组及溶剂组脑组织 LDH 活性降低($P < 0.05$);与模型组相比,高、低剂量 Gen 治疗后脑组织 LDH 活性均升高($P < 0.05$);与假手术组大鼠相比,模型组($P < 0.05$)及溶剂组($P < 0.05$)大鼠的脑组织含水率升高,脑水肿明显;与模型组相比,高剂量及低剂量 Gen 治疗后脑组织含水率均降低($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对脑缺血再灌注损伤时大鼠血清 IL-6, IL-1 β , TNF- α 水平的影响 如表 2 所示,与假手术组相比,模型组及溶剂组血清 IL-6, IL-1 β 及 TNF- α 水平升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与模型组相比,低、高剂量 Gen 治疗后血清 IL-6, IL-1 β 及 TNF- α 水平降低($P < 0.001$, $P < 0.05$)。见表 2。

表 1 Gen 对脑缺血再灌注损伤大鼠血清、脑组织 LDH 及脑组织含水率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	血清 LDH/U·mL ⁻¹	脑组织 LDH/U·g ⁻¹	脑组织含水率/%
假手术	-	1 266.67 ± 176.43 ²⁾	4 977.50 ± 847.51 ¹⁾	77.36 ± 0.38 ¹⁾
模型	-	2 049.17 ± 362.00	3 997.50 ± 491.88	79.48 ± 0.92
溶剂	-	2 020.67 ± 473.56	3 889.17 ± 676.57	79.34 ± 0.87
Gen	0.75	1 652.33 ± 350.91 ¹⁾	5 322.50 ± 657.31 ¹⁾	78.15 ± 0.64 ¹⁾
	1.5	1 451.33 ± 287.06 ¹⁾	5 178.33 ± 973.80 ¹⁾	78.39 ± 0.52 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

4 讨论

大脑中动脉栓塞诱导的局灶性脑缺血再灌注损伤模型是国内外研究卒中中经典动物模型。正常脑组织 TTC 染色后呈玫瑰红色,而脑梗死区呈灰白色,常用于判断脑梗死灶大小而衡量脑缺血再灌注损伤的程度。LDH 是一种糖酵解酶,存在于机体所

有组织细胞的胞质内,当组织损伤时,细胞内的 LDH 释放出细胞,通过组织液进入血液循环,引起血清中 LDH 活性升高,而组织内的 LDH 活性降低,因此,检测血清及组织中 LDH 活性可以反映组织及细胞损伤程度。本实验结果显示,染料木素(0.75、1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)治疗后大鼠脑组织坏死区体积减

表 2 Gen 对脑缺血再灌注损伤大鼠血清细胞因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-6	IL-1 β	TNF- α
假手术	-	256.48 \pm 16.34 ³⁾	105.12 \pm 25.88 ²⁾	1.65 \pm 0.21 ¹⁾
模型	-	379.76 \pm 28.14	171.67 \pm 27.87	2.20 \pm 0.19
溶剂	-	336.48 \pm 43.48	155.14 \pm 37.28	2.11 \pm 0.16
Gen	0.75	202.99 \pm 43.03 ³⁾	121.67 \pm 30.61 ¹⁾	1.38 \pm 0.43 ²⁾
	1.5	243.19 \pm 63.74 ³⁾	106.67 \pm 26.58 ²⁾	1.87 \pm 0.42 ¹⁾

小,脑组织 LDH 活性升高,血清 LDH 活性降低,说明染料木素对大鼠脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

脑缺血再灌注损伤是一个复杂的病理生理过程,以白细胞浸润及刺激炎症因子产生为基础的炎症级联反应在缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用,作为主要的促炎细胞因子,IL-6,IL-1 β ,TNF- α 参与了这个过程^[12]。炎性细胞因子的过度表达可刺激细胞表面黏附分子的数量和功能,造成白细胞与内皮细胞的黏附,阻断微循环,影响缺血半暗带区血供,并使血浆成分聚集于管壁,导致管壁增厚、狭窄和脑梗死,加重脑缺血缺氧损伤。脑缺血再灌注损伤时炎症反应亢进,脑组织水肿,加重缺血半暗带区的损伤。本研究表明,染料木素(0.75, 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)治疗后均能降低脑缺血再灌注损伤时血清 IL-6,IL-1 β 和 TNF- α 水平及脑组织含水率,可见染料木素能通过减少致炎细胞因子的释放,抑制脑缺血再灌注损伤急性期的炎症反应,减轻脑水肿的发生,从而对脑缺血再灌注损伤起保护作用。

综上所述,染料木素对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,其保护机制与降低炎性细胞因子的合成进而减轻脑水肿有关。染料木素调控炎性细胞因子分泌的机制还有待于进一步的研究。

[参考文献]

[1] Rose V L. AAP issues recommendations for the use of soy protein-based formulas in infant feeding [J]. Am Fam Physician, 1998, 57(11):2876.

[2] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases [J]. J Biol Chem, 1987, 262(12):5592.

[3] Lin A H, Leung G P, Leung S W, et al. Genistein enhances relaxation of the spontaneously hypertensive rat aorta by transactivation of epidermal growth factor receptor following binding to membrane estrogen

receptors- α and activation of a G protein-coupled, endothelial nitric oxide synthase-dependent pathway [J]. Pharmacol Res, 2011, 63(3):181.

[4] Ono M, Koga T, Ueo H, et al. Effects of dietary genistein on hormone-dependent rat mammary carcinogenesis induced by ethyl methanesulphonate [J]. Nutr Cancer, 2012, 64(8):1204.

[5] Park Y J, Jang Y, Kwon Y H. Protective effect of isoflavones against homocysteine-mediated neuronal degeneration in SH-SY5Y cells [J]. Amino Acids, 2010, 39(3):785.

[6] Ming L G, Chen K M, Xian C J. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(3):513.

[7] Choi J S, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats [J]. Nutrition, 2009, 25(6):676.

[8] Babu P V, Si H, Fu Z, et al. Genistein prevents hyperglycemia-induced monocyte adhesion to human aortic endothelial cells through preservation of the cAMP signaling pathway and ameliorates vascular inflammation in obese diabetic mice [J]. J Nutr, 2012, 142(4):724.

[9] 睦荣燕,王万辉,连磊凡,等.染料木素对 Iso 致心肌肥厚大鼠的抗氧化及抑制炎症反应作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(19):175.

[10] 胡志苹,黄志华,吴亮亮,等.染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(13):163.

[11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlsons, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84.

[12] Terao S, Yilmaz G, Stokes K Y, et al. Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice [J]. Stroke, 2008, 39(3):943.

[责任编辑 聂淑琴]