

白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注的治疗作用

王世全 余良 郭宁 董海龙 熊利泽[△]

(第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的治疗作用及可能的机制。方法:将SD大鼠随机分为2组:对照组(n=16),白藜芦醇组(n=16)。对照组再灌注即刻腹腔给予0.5 ml生理盐水,白藜芦醇组再灌注即刻腹腔给予20 mg/kg白藜芦醇。再灌注22小时后,进行神经功能学评分、脑梗死容积测定,用分光光度计测定脑组织溶浆中SOD、MDA和MPO的含量。结果:再灌注22小时后,白藜芦醇治疗组可以改善大鼠神经功能学评分和降低脑梗死面积($P<0.05$),同时可以增加脑组织溶浆中SOD的活性,降低MDA和MPO的含量。结论:白藜芦醇通过减轻白细胞的浸润、提高自由基的清除率对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤发挥治疗作用。

关键词 白藜芦醇;局灶性脑缺血再灌注;治疗效应;自由基

中图分类号 Q95-3 R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)16-3057-03

The Treatment Effect of Resveratrol on Focal Cerebral Ischemic Rat

WANG Shi-quan, YU Liang, GUO Ning, DONG Hai-long, XIONG Li-ze[△]

(Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of resveratrol on rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury and the possible mechanism. **Methods:** The SD rats were randomly divided into two groups: control group (n=16) and resveratrol group (n=16). The rats in the control group were injected with 0.5 ml saline intraperitoneal, while rats in the resveratrol groups were given 20 mg/kg resveratrol after perfusion. The neurobehavioral scores, infarct volumes, the change of MPO, SOD and MDA were detected 22 hours after reperfusion. **Results:** Resveratrol treatment could improve neurobehavioral score and reduce infarct volumes after 22 h of reperfusion ($P<0.05$). Meanwhile, it could increase brain soluble SOD activity, and decrease the MDA and OMP content. **Conclusion:** Resveratrol play a therapeutic role on rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury by reducing leukocyte infiltration and increasing free radical scavenging rate.

Key words: Resveratrol; Focal cerebral ischemic; Treatment effect; Free radical

Chinese Library Classification: Q95-3, R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3057-03

前言

脑缺血性卒中是危害人类健康的常见病。脑缺血后如何减轻缺血再灌注损伤是目前研究的热点。白藜芦醇(resveratrol),化学名称为3,5,4-羟基苯二烯,是一类主要存在于葡萄、藜芦、虎杖等植物中的多酚类化合物^[1]。红酒和葡萄酒中含有白藜芦醇^[2],研究表明有规律的饮用红酒可以降低心血管病的发生率,且白藜芦醇对心肌、肾脏缺血再灌注损伤具有保护作用^[3-6]。本实验从白藜芦醇抑制大鼠大脑缺血再灌注引起的白细胞浸润和提高自由基清除能力两方面探讨了白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性SD大鼠32只(体重250~280 g),由第四军医大学实验动物中心提供。白藜芦醇粉剂,购自Sigma公司,SOD、

作者简介:王世全(1981-)男,硕士,医师,主要研究方向:脑保护机制研究,电话:13474122824,E-mail:wangshiquan-301@163.com

△通讯作者:熊利泽,主任医师,教授,电话:029-84775337,

E-mail:lxiong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-10-03 接受日期:2011-10-30)

MDA和OMP试剂盒购自南京建成公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 将SD大鼠随机分为2组:对照组(n=16),白藜芦醇组(n=16)。2组动物均进行大脑动脉阻断模型,术后2小时拔线,对照组在拔线即刻腹腔给予0.5 ml生理盐水,白藜芦醇组拔线即刻腹腔给予20 mg/kg白藜芦醇。

1.2.2 动物模型及取材 采用Nagasawa H等改进的方法制作动物模型^[7]。术中监测肛温,并用加热板将肛温维持在 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$,同时采用激光多普勒监测脑血流,阻断大脑中动脉时脑血流降至开始的30%,再灌时能恢复至开始值的70%视为造模成功,不符合以上条件的予以剔除。再灌22小时后,戊巴比妥钠深麻醉,迅速断头取脑,制成脑10%匀浆,离心后取上清,保存在深低温冰箱。

1.2.3 神经功能学评分及脑梗死面积测定 参考Garcia评分^[7],采用盲法原则,术后24 h,对大鼠运动神经功能进行评分。然后处死动物、取脑,沿冠状面切成2.0 mm厚的薄片6张,置于2%的TTC溶液中,最后将脑切片放入4%的多聚甲醛中固定。采用图像分析软件计算梗死面积。

1.2.4 测定脑组织中MPO、MDA和SOD的含量 按照南京建成试剂盒中的方法,采用分光光度计测定脑组织中MPO、

MDA 和 SOD 的含量。

1.3 统计处理

计量数据采用均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示 ,用 SPSS 13.0 软件进行统计分析 ,两独立样本均数间的比较采用 t 检验 , $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经行为学评分

结果显示 ,治疗组和对照组评分分别为 8.6 ± 1.4 , 11.5 ± 1 ,白藜芦醇治疗组可以明显改善大鼠行为学。

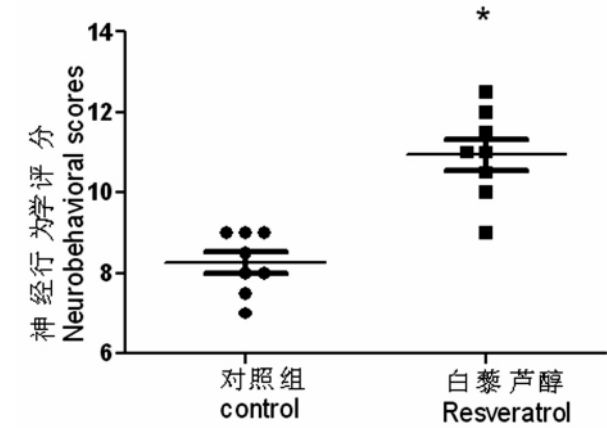


图 1 白藜芦醇治疗后对大鼠 MCAO 术后神经功能评分影响 (* $P<0.05$ VS 对照组)

Fig.1 Neurobehavioral scores of Resveratrol postconditioning (* $P<0.05$ compared with control group)

2.2 脑梗死面积比较

TTC 染色结果所示(图 2 白色为梗死部位) ,对照组($n=8$)和白藜芦醇治疗组 ($n=8$) 脑梗死面积结果为对照组梗死面积 (39 ± 2.3)% ,白藜芦醇治疗组梗死面积 (26 ± 4.1)% ,两组之间差异显著($P<0.05$)。

2.3 髓过氧化物酶(MPO)、抗氧化物酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的测定

将对照组($n=8$)和治疗组($n=8$)动物再灌 22 小时后处死 ,患侧脑组织制成 10%的溶浆 ,然后用分光光度计测量脑组织中 MPO、SOD 和 MDA 的含量。结果显示 ,对照组 MPO、SOD 和

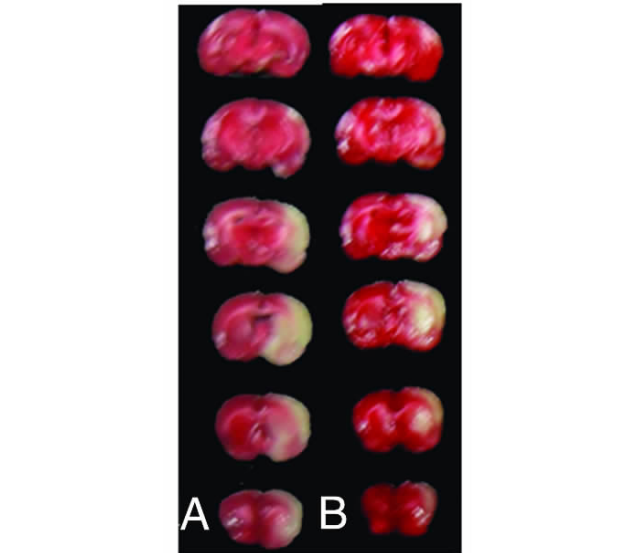


图 2 TTC 染色 A :对照组 C :白藜芦醇治疗组
Fig. 2 Dyed by TTC A :Control group; C: Resveratrol post conditioning group

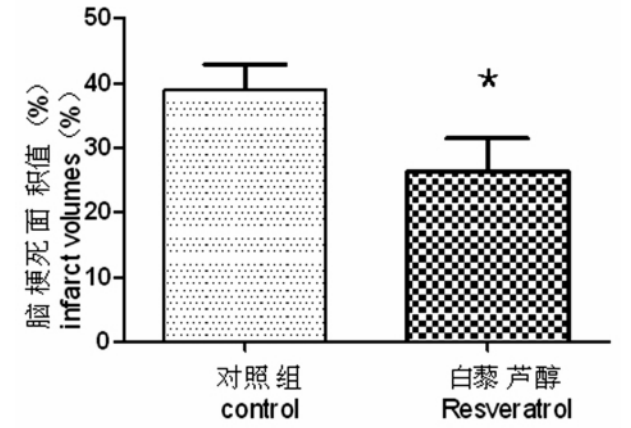


图 3 对照组和治疗组脑梗死面积百分比 (* $P<0.05$ VS 对照组)
Fig. 3 Percentage of infarct volumes (* $P<0.05$ compare with control group)

MDA 的含量分别为 3.68 ± 0.2 、 135.29 ± 9.65 和 5.08 ± 0.38 ,白藜芦醇治疗组 MPO、SOD 和 MDA 的含量为别为 2.85 ± 0.17 、 181.05 ± 18.69 和 4.55 ± 0.2 ,表明 MPO、SOD 和 MDA 的含量在两组之间均存在显著差异。

表 1 各组 MPO、SOD 和 MDA 的含量(* $P<0.05$ VS 对照组)
Table 1 The content of MOP, SOD and MDA(* $P<0.05$ VS control)

Group	MPO	SOD	MDA
Control group	3.68 ± 0.2	135.29 ± 9.65	5.80 ± 0.38
Resveratrol group	$2.85 \pm 0.17^*$	$181.05 \pm 18.69^*$	$4.55 \pm 0.2^*$

3 讨论

脑缺血再灌注损伤是由多因素共同参与 ,其相互作用最终引起大脑不可逆性损伤。其中能量代谢障碍、氧自由基、钙离子超载等因素在脑缺血损伤中发挥关键作用。由于脑组织中含有大量不饱和脂肪酸 ,对氧化损伤十分敏感 ,而氧自由基具有极

强的氧化性 ,很容易引起脂质过氧化 ,引起脑的继发性改变 ,而造成严重的炎症发生^[1] ,最终导致神经细胞变性坏死和出血水肿加重。

本实验中 Garcia 神经功能学评分结果显示白藜芦醇组大鼠虽然也出现脑卒中的状况 ,但与对照组相比程度较轻。脑组织切片显示 ,白藜芦醇组脑梗死面积较对照组小 ,说明白藜芦

醇具有抗缺血再灌注损伤的作用。

脑缺血时存在着明显的白细胞浸润显现,浸润的白细胞可以阻塞微循环,加重脑缺血,释放氧自由基和蛋白水解酶,直接损害神经细胞及诱导细胞凋亡^[8-10]。浸润白细胞的成分主要是中性粒细胞,中性粒细胞含有MPO(髓过氧化物酶),因此测定MPO的活力可以定量反映浸润脑组织内的白细胞数量^[8]。本研究发现,白藜芦醇预处理后可以显著降低大鼠缺血再灌注引起MPO的增加。从而说明白藜芦醇预处理可以减轻大鼠脑缺血再灌注引起的白细胞浸润,这将有利于改善脑缺血区微循环供应情况,同时也减少中性粒细胞所释放的活性物质对组织的损害。超氧化物歧化酶(SOD)能够清除氧阴离子自由基,保护细胞,间接反应了机体清除自由基的能力^[11-15]。MDA是氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸形成脂质过氧化物的一种,其量的变化常常反映体内脂质过氧化的程度,间接反应细胞损伤的程度^[11,15]。脑缺血再灌注时SOD的含量明显降低,MDA的含量明显升高,本实验证实白藜芦醇治疗后能明显改善缺血再灌注引起的SOD的降低和MDA的升高。总之,本研究结果表明:白藜芦醇通过减轻白细胞的浸润、提高自由基的清除率来发挥脑保护作用。

参考文献(References)

- [1] Li-man Huang. Beneficial effects of astringinin, a resveratrol analogue, on the ischemia and reperfusion damage in rat heart[J]. Original contribution, 2001, 30(8): 877-883
- [2] Wang Qun. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils[J]. Brain Research, 2002, 958: 439-447
- [3] Yu H hsieh, MS. Resveratrol Attenuates Ischemia -Reperfusion-Induced Leukocyte-Endothelial Cell Adhesive Interactions and Prolongs Allograft Survival Across the MHC Barrier[J]. Circ J, 2007,71: 423-428
- [4] Dakuan GAO. Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. Life Science, 2006,78: 2564-2570
- [5] Seema Y. Resveratrol exerts its neuro-protective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral

ischemia[J]. Brain Research, 2009, 1250: 242-253

- [6] Taku S. Reactive Oxygen Radicals and Pathogenesis of Neuronal Death After Cerebral Ischemia [J]. Antioxidants & redox signaling, 2003, 5(5): 1-14
- [7] Nagasawa H, Kodure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral, artery occlusion[J]. Stroke, 1998, 20(8): 1037-1043
- [8] Akopv SE, Simonian NA. Dynamics of polymorphnuclear leukocyte with brain tissue damage [J]. Stroke, 2003, 27: 1739-1743
- [9] Taku S, Wara P. Reactive Oxygen radicals and pathogenesis of Neuronal death after cerebral ischemia [J]. Antioxidants and Redox signaling, 2003, 5:597-607
- [10] 刘玉华, 何冰. 益气醒脑饮对缺血再灌注大鼠脑保护作用的研究[J]. 中华药理与临床, 2006, 16(2): 18-22
Liu Yu-huan, He Bing. Experimental study on protection effect of "yiqi xingnaoyin" In cerebral ischemia and reperfusion rat [J]. Pharmacology and clinics of chinese materia medica, 2006,16(2): 18-22
- [11] Edward D.H. Antioxidant Therapies for Traumatic Brain injury[J]. The American society for Experimental Neuro Therapeutics, 2010, 7: 51-61
- [12] 韩杰. 维奥欣对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(1): 50-52
Han Jei. Effect of Viocin in protection of cerebral ischemic reperfusion injury in rats [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2005, 14(1): 50-52
- [13] Petra K. Transient Forebrain Ischemia Impact on Lymphocyte DNA Damage, Glutamic Acid Level, and SOD Activity in Blood [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29:887-894
- [14] Kuniyasu N. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinant of ischemic neuronal death and survival [J]. Journal of neurochemistry, 2009,109(1): 133-138
- [15] Demirkaya S, Topcuoglu MA, Aydin A. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia[J]. Eur J Neuro1, 2001, 8:43-51