

引用:李雪,江洪. 芹黄素对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 湖南中医杂志,2021,37(5):168-169,187.

芹黄素对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究

李 雪,江 洪

(重庆医科大学附属永川医院,重庆,402160)

[摘要] 目的:观察芹黄素对脑缺血再灌注损伤沙土鼠脑保护作用及炎症反应的影响。方法:采用双侧颈总动脉夹闭手术法建立脑缺血再灌注损伤沙土鼠模型,将其随机分为模型组、尼莫地平组(2 mg/kg)、芹黄素组(40 mg/kg)、假手术组,建模前1周开始腹腔注射给药,再灌注6 h内记录各组神经症状并做卒中评分,再灌注6 h后以免疫组化法测定脑组织海马CA1区核转录因子-κB(NF-κB)的表达。结果:芹黄素组和尼莫地平组脑缺血再灌注损伤沙土鼠的卒中评分、脑部海马CA1区NF-κB,与模型组相比,差异有统计学意义($P<0.01$);与假手术组脑部极低的NF-κB表达相比,模型组沙土鼠海马CA1区NF-κB表达明显升高($P<0.01$)。结论:芹黄素可抑制核转录因子的激活,调控炎症因子表达,减轻脑部炎症反应,实现对脑缺血再灌注损伤沙土鼠的脑保护作用。

[关键词] 脑缺血再灌注损伤;芹黄素;沙土鼠;实验研究

[中图分类号] R277.733.1 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.05.060

Protective effect of apigenin against cerebral ischemia/reperfusion injury

LI Xue,JIANG Hong

(Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University,Chongqing 402160,China)

[Abstract] Objective: To investigate the cerebral protection effect of apigenin against cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils and its effect on inflammatory response. Methods: Clipping operation of both common carotid arteries was used to establish a model of cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils, and then the gerbils were randomly divided into model group, nimodipine group (2 mg/kg), apigenin group (40 mg/kg), and sham-operation group. The drugs were intraperitoneally injected since 1 week before modeling. Neurological symptoms and stroke score were recorded within 6 hours of reperfusion, and after 6 hours of reperfusion, immunohistochemistry was used to measure the expression of nuclear factor-κB (NF-κB) in the hippocampal CA1 region. Results: There were significant differences in stroke score and the expression of NF-κB in the hippocampal CA1 region between the apigenin group and the model group and between the nimodipine group and the model group ($P<0.01$). Compared with the sham-operation group with an extremely low expression level of NF-κB in brain, the model group had a significant increase in the expression of NF-κB in the hippocampal CA1 region ($P<0.01$). Conclusion: Apigenin can inhibit the activation of NF-κB, regulate the expression of inflammatory factors, alleviate inflammatory response in brain, and thus exert a cerebral protection effect in gerbils with cerebral ischemia/reperfusion injury.

[Keywords] cerebral ischemia/reperfusion injury; apigenin; gerbil; experimental study

脑缺血再灌注损伤程度可严重影响缺血性脑血管病的预后,目前临床上尚缺乏针对脑缺血再灌注损伤的有效治疗手段。如何更好地保护脑神经、缓解脑组织损伤程度,是脑血管防治领域面临的重要课题。

芹黄素是一种广泛存在于多种植物中的黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗氧化、免疫调节、心脑血管

保护等多种生物学活性和药用价值^[1-2],在医药、保健等方面的应用前景广阔。近年来实验研究表明,芹黄素对脑缺血再灌注损伤动物具有神经保护效应^[3-4],但作用机制尚未明确。本研究通过制备沙土鼠脑缺血再灌注损伤模型,进一步探索芹黄素对脑神经的保护作用机制。现将实验结果报告如下。

第一作者:李雪,女,医学硕士,医师,研究方向:天然药物活性成分筛选的研究

通讯作者:江洪,男,主任医师,研究方向:耳鼻喉头颈疾病的临床研究,E-mail:2653264261@qq.com

1 实验材料

1.1 动物 选取健康清洁级长爪沙土鼠 40 只,雌雄各半,8 周龄,体质量(80~110)g,由浙江省医学科学院提供,合格证号:SCXK(浙)2014-0002。所有动物饲养于动物房屏障环境,相关操作均经本单位动物伦理委员会批准。

1.2 药物 芹黄素(美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 97\%$),用 1%二甲基亚砷溶解后,再以 0.9%氯化钠注射液配成浓度为 0.4%的溶液。尼莫地平注射液(拜耳先灵医药保健股份公司),以 0.9%氯化钠注射液配成浓度为 0.02%的溶液。

1.3 主要试剂与仪器 核转录因子- κ B(NF- κ B)p65 多克隆抗体及免疫组织化学试剂盒(上海哈灵生物科技有限公司)。生物研究显微镜(日本奥林巴斯公司),医学影像分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司),自动匀浆机(金瑞鸿捷生物科技有限公司),动物脑电图实时监测仪(美国健康医疗仪器国际公司)。

2 实验方法

2.1 模型制备 采用双侧颈总动脉夹闭手术法^[5]进行造模。沙土鼠予戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,仰位固定,颈部消毒、切口、分离双侧颈总动脉,连接脑电图实时监测仪,用动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉以阻断血流(以脑电图变成基线为标志,本研究动物可全部实现脑缺血),10 min 后松开动脉夹,恢复血流灌注,关闭颈部切口,注意术后护理。假手术组沙土鼠不予夹闭双侧颈总动脉,其他手术操作同上。

2.2 分组与给药 将 40 只沙土鼠随机分为模型组(等体积溶媒)、阳性对照组(尼莫地平 2 mg/kg)、芹黄素组(40 mg/kg)、假手术组(等体积溶媒),每组各 10 只。建模前 1 周开始按 10 ml/kg 腹腔注射给药,每天 1 次,建模手术前 30 min 再给药 1 次。

2.3 观察指标

2.3.1 卒中评分 记录沙土鼠建模手术后 6 h 内的体征及行为,并做卒中评分^[6]。1 分:动作迟缓、活动减少,或触耳反应迟钝,或眼睑下垂,或毛发蓬乱竖起;3 分:有抬头征,或不闭眼,或后肢向外向后伸展,或出现旋转运动,或抽搐、阵挛;6 分:四肢无力,或呈衰弱状态。

2.3.2 海马 CA₁ 区 NF- κ B 表达 建模 6 h 后,各组沙土鼠处死,取脑部,分离出海马组织,清洗后置于 4%多聚甲醛中固定。采用免疫组化法检测海马 CA₁ 区 NF- κ B 的阳性表达,按试剂盒说明书进行操作,常规脱水、包埋、切片(5 μ m)、封片,于生物研究显微镜下拍摄,医学影像分析系统中处理分析,结果以积分光密度(IOD)值表示。

2.4 统计学方法 数据导入 SPSS 18.0 软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐采用单因素方差分析,两两相比行 LSD-t 检验;方差不齐则采用 Welch 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

各组沙土鼠卒中评分、海马 CA₁ 区 NF- κ B 表达比较:假手术组沙土鼠卒中评分均为 0 分,未记录到神经功能障碍

相关症状。与模型组相比,芹黄素组和尼莫地平组卒中评分下降,差异均有统计学意义。与假手术组脑部海马 CA₁ 区极低的 NF- κ B 表达相比,模型组沙土鼠再灌注 6 h 后,海马 CA₁ 区 NF- κ B 表达明显升高,差异有统计学意义;;与模型组相比,芹黄素组和尼莫地平组海马 CA₁ 区 NF- κ B 的表达均降低,差异有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组沙土鼠卒中评分、海马 CA₁ 区 NF- κ B 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	剂量(mg/kg)	卒中评分(分)	NF- κ B(IOD)值
假手术组	10	-	0	3.96 $\pm$ 0.89
模型组	10	-	17.60 $\pm$ 3.04	73.05 $\pm$ 14.49 ^a
芹黄素组	10	40	13.20 $\pm$ 2.15 ^b	51.63 $\pm$ 11.42 ^b
尼莫地平组	10	2	12.10 $\pm$ 2.67 ^b	40.78 $\pm$ 14.91 ^b

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

4 讨 论

脑缺血再灌注损伤的病理生理机制目前尚未阐明,故临床防治脑损伤程度和保护脑神经的难度大。有报道称采用药物预处理的方式,提前激活内源性神经保护途径,可以缓解脑缺血再灌注带来的脑损伤^[7]。本研究探索了芹黄素于再灌注损伤发生前 1 周开始给药的脑保护作用,结果表明芹黄素预处理能显著缓解脑缺血再灌注损伤沙土鼠的神经症状,降低其卒中评分,提示芹黄素具有保护脑神经的作用。

脑缺血再灌注所伴随的炎症反应是导致继发性脑损伤的重要原因之一,研究发现抑制炎症反应能有效减轻缺血性脑血管病的脑组织损伤^[8]。脑缺血再灌注损伤涉及的炎症细胞和炎症因子众多,其中核转录因子 NF- κ B 被认为在炎症反应的起始阶段发挥了不容忽视的作用。NF- κ B 主要存在于神经胶质细胞和血管内皮细胞中,当脑缺血再灌注损伤发生时,NF- κ B 被激活,活化后的 NF- κ B 调控下游的黏附分子和细胞因子等靶基因,促进这些炎症介质的表达。炎症介质的释放又促使 NF- κ B 活化,导致炎症级联反应,炎症信号被无限放大^[9]。国内外研究均证实,NF- κ B 在再灌注后缺血区大脑半球的神经元、神经胶质细胞、血管上皮细胞及浸润到脑组织的淋巴细胞中有很高的表达^[10]。另有报道称,啮齿类动物脑缺血模型脑组织 NF- κ B 的表达会在再灌注 6 h 左右达到高峰^[11]。因此,本研究调查了脑缺血沙土鼠再灌注 6 h 时脑部海马 CA₁ 区的 NF- κ B 表达水平及芹黄素对其的影响。结果发现,脑缺血再灌注损伤沙土鼠脑部海马 CA₁ 区 NF- κ B 表达水平有显著增高,提示脑组织 NF- κ B 大量活化,并可调控炎症靶基因的表达,共同参与炎症反应。芹黄素能抑制再灌注脑组织中 NF- κ B 的激活,进而减少炎症介质的分泌,缓解缺血区脑组织的炎症级联反应。这与 Bougioukas I 等^[12]关于芹黄素抑制 NF- κ B 表达、减轻动物肺缺血再灌注损伤的研究结果类似。

鉴于脑缺血再灌注病理过程的复杂性及脑损伤相关因子表达的时效性,芹黄素防治脑缺血再灌注损伤的作用机制仍需进一步研究。
(下转第 187 页)

- [8] 梁伟,熊祖应,罗琼,等. 18例多发性骨髓瘤并肾损害的临床特点分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2011,12(7):626-628.
- [9] 路瑾. 立足中国实际的骨髓瘤诊治——《中国多发性骨髓瘤诊治指南(第四版)》解读[J]. 中国实用内科杂志,2016,36(5):376-378.
- [10] 蒋洁,张晨露,黄红铭,等. 多发性骨髓瘤肾损害患者的临床特征分析[J]. 临床血液学杂志,2019,32(4):538-540.
- [11] KEELING J, HERRERA GA. An in vitro model of light chain deposition disease[J]. *Kidney International*, 2009, 75(6):634-645.
- [12] 唐江涛,李立新,冯伟华,等. 免疫固定电泳和轻链比值诊断以肾脏损伤为首发症状的多发性骨髓瘤的价值[J]. 四川大学学报:医学版,2016,47(4):551-555.
- [13] HUNGRIA VTM, CRUSOE EQ, BITTENCOURT RI, et al. New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma[J]. *Hematol Transfus Cell Ther*, 2019, 41(1):76-83.
- [14] EMILIE G, MICHELE RR, JOELLE V. Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2010, 10(3):232-256.
- [15] 邢志佳,张叶叶,马宇衡,等. 针对 20S 蛋白酶体的抗肿瘤药物研究进展[J]. 天津药学,2015,27(1):55-57.
- [16] MÜCHTAR E, GERTZ MA, MAGEN H. A practical review on carfilzomib in multiple myeloma[J]. *Eur J Haematol*, 2016, 96(6):564-577.
- [17] BADROS AZ, VIJ R, MARTIN T, et al. Carfilzomib in multiple myeloma patients with renal impairment: pharmacokinetics and safety[J]. *Leukemia*, 2013, 27(8):1707-1714.
- [18] SUZUKI K. Diagnosis and treatment of multiple myeloma and AL amyloidosis with focus on improvement of renal lesion[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2012, 16(5):659-671.
- [19] HOLSTEIN SA, MCCARTHY PL. Immunomodulatory drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience[J]. *Drugs*, 2017, 77(5):505-520.
- [20] MANAPURAM S, HASHMI H. Treatment of multiple myeloma in elderly patients: a review of literature and practice guide-lines[J]. *Cureus*, 2018, 10(12):3669-3676.
- [21] 周学华,任莉. 沙利度胺联合 MP 方案治疗多发性骨髓瘤肾损害的临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2017,18(10):908-909.
- [22] SHI H, ZHANG W, LI X, et al. Application of RIFLE criteria in patients with multiple myeloma with acute kidney injury: a 15-year retrospective, single center, cohort study[J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2014, 55(5):1076-1082.
- [23] HUTCHISON CA, HEYNE N, AIRIA P, et al. Immunoglobulin free light chain levels and recovery from myeloma kidney on treatment with chemotherapy and high cut-off haemodialysis[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012, 27(10):3823-3828.
- [24] 黄智莉,陈志雄,于天启,等. 多发性骨髓瘤中医证型聚类分析研究[J]. 新中医,2011,43(10):39.
- [25] 冯贺妍,孙莉娜,程华,等. 刘玉宁教授治疗多发性骨髓瘤肾损害的临床经验[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2019,20(7):1.
- [26] 曹微,张磊,刘剑华,等. 中医辨证论治对多发性骨髓瘤肾病理疗效的影响[J]. 中医药临床杂志,2016,28(12):1713-1715.
- [27] 刘海英. 中医辨证论治配合化疗治疗多发性骨髓瘤肾病及对患者生存质量的影响[J]. 陕西中医,2015,36(4):407-408.
- [28] 王翠竹,沙锁,严爱婷. 血府逐瘀汤联合 VD 方案在多发性骨髓瘤中的应用效果[J]. 癌症进展,2019,17(17):15.

(收稿日期:2020-11-27)

(上接第 169 页)

参考文献

- [1] NABAVI SF, KHAN H, D'ONOFRIO G, et al. Apigenin as neuro-protective agent: of mice and men[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 128(1):359-365.
- [2] SALEHI B, VENDITTI A, SHARIFI-RAD M, et al. The therapeutic potential of apigenin[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6):1305.
- [3] 邢娟,范崇桂,沈雷,等. 芦黄素对缺血缺氧性脑损伤大鼠的神经保护作用[J]. 神经解剖学杂志,2019,35(5):515-520.
- [4] LING C, LEI C, ZOU M, et al. Neuroprotective effect of apigenin against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(9):0300060520945859.
- [5] PARK CW, LEE TK, CHO JH, et al. Rufinamide pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in the gerbil hippocampus[J]. *Neuro Res*, 2017, 39(11):941-952.
- [6] ITO U, HAKAMATA Y, YAMAGUCHI T, et al. Cerebral ischemia model using mongolian gerbils—comparison between unilateral and bilateral carotid occlusion models[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2013, 118(1):17-21.
- [7] WU PF, ZHANG Z, WANG F, et al. Natural compounds from traditional medicinal herbs in the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(12):1523-1531.
- [8] HUANG YG, TAO W, YANG SB, et al. Autophagy: novel insights into therapeutic target of electroacupuncture against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(6):954-961.
- [9] ZHAO H, CHEN Z, XIE LJ, et al. Suppression of TLR4/NF- κ B signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5):4311-4319.
- [10] 辛青,程葆华,王琳,等. 炎症因子在脑缺血—再灌注不同时期的基因表达[J]. 济宁医学院学报,2014,37(4):240-243.
- [11] ZHANG FB, WANG JP, ZHANG HX, et al. Effect of β -patchoulene on cerebral ischemia-reperfusion injury and the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5):3335-3342.
- [12] BOUGIOUKAS I, DIDILIS V, EMMERT A, et al. Apigenin reduces NF- κ B and subsequent cytokine production as protective effect in a rodent animal model of lung ischemia-reperfusion injury[J]. *J Invest Surg*, 2018, 31(2):96-106.

(收稿日期:2020-10-05)