

欧前胡素对脑缺血再灌注大鼠海马区损伤及 ATP 酶活力的影响

赵康¹, 赵煦萌², 邢亚利³, 张忠霞⁴, 邱会卿⁵

摘要 目的 研究欧前胡素对脑缺血再灌注大鼠海马区损伤及 ATP 酶活力的影响。方法 建立脑缺血再灌注大鼠模型,将大鼠随机分为 6 组:假手术组、模型组、欧前胡素 25、50、100 mg/kg 组和尼莫地平组进行后续实验, Y 迷宫实验检测大鼠脑部学习记忆功能; HE 染色检测大鼠脑组织病理损伤; TUNEL 染色检测大鼠神经元细胞凋亡; 试剂盒检测总超氧化物歧化酶(SOD)含量、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)含量; 试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP 酶}$ 活力; Western blot 检测 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平。结果 与模型组相比较,假手术组及欧前胡素 50、100 mg/kg 组和尼莫地平组新异臂进入次数升高($P < 0.05$),新异臂潜伏期、起始臂进入次数、其他臂进入次数降低($P < 0.05$),病理损伤程度改善,凋亡阳性细胞数减少, Survivin 蛋白水平升高($P < 0.05$), Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平降低($P < 0.05$), SOD、GSH 含量升高($P < 0.05$), MDA 含量降低($P < 0.05$), LDH 活力降低($P < 0.05$), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP 酶}$ 活力升高($P < 0.05$)。结论 欧前胡素对脑缺血再灌注模型大鼠具有保护作用。

关键词 欧前胡素; 中风; 凋亡; 氧化应激

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1504-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.005

中风是一种急性脑血管疾病,由于缺血或出血导致脑供血不足,神经元及其连接损失导致脑损伤^[1]。目前批准的治疗缺血性中风的方法仅限于血管阻塞的快速再通和溶栓药物的药理学治疗。至今尚无药物能在中风发作后立即给药以减少随后发生的神经学问题,且有超过 50 种审计保护剂进入临床试验因疗效和毒性的问题宣告失败^[2]。中药在治疗中风的用药历史中,作为活血化瘀药、熄风药和益气药。欧前胡素是从白芷、蛇床子等植物中提取分离出来的活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗感染、抗凋亡、改善记

忆等药理作用^[3]。已有研究^[4]表明欧前胡素通过降低缺血再灌注损伤大鼠模型大鼠脑组织内促炎性细胞因子的含量,减少损伤后的炎症反应,保护神经元,改善脑缺血症状。但欧前胡素对中风的具体作用机制仍不清楚。该文旨在研究欧前胡素对脑缺血再灌注大鼠海马区神经元损伤及 ATP 酶活力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只雄性 SD 大鼠购自成都达硕实验动物有限公司,7 周龄,体质量(210 ± 15) g,许可证号: SYXK(川)2014-189,置于温控(22 ± 1) °C 和光控(200lux, 12 h/12 h 光暗循环)动物设施中常规饲养 7 d。

1.2 试验药物与主要试剂 欧前胡素(110826-201616)、尼莫地平(100270-201403)购自北京食品药品检定研究院,化学式: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$,分子量: 270.28,含量: 99.6%; 苏木精-伊红染液(D006-1-1)、TTC 染液(D025-1-3)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(A001-3-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(A003-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH)(A005-1-2)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(A020-2-2)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 测定试剂盒(A070-2-2)、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP 酶}$ (A070-3-1)购自南京建成生物工程研究所; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(C1091)购自上海碧云天生物技术研究所; Anti Survivin(ab469)、Caspase-3(ab13847)、Caspase-9(ab52298)购自美国 Abcam 公司。

1.3 动物模型建立^[5]与分组 将大鼠用 10% 水合氯醛溶液(360 mg/kg)进行麻醉,仰卧固定于手术台,于颈部正中切口剪开,随机均分为 6 组:假手术组、模型组、欧前胡素 25、50、100 mg/kg 组和尼莫地平组。除假手术组外,其余各组分离出颈动脉血管,动脉夹夹闭左颈内动脉,手术丝线结扎左颈总动脉和左颈外动脉近心端,松开动脉夹,左颈总动脉插入线栓,插入深度为 18~20 mm,2 h 后取出,血管复位后缝合切口,建立脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型。并灌胃欧前胡素

2020-07-02 接收

基金项目: 河北省卫健委课题(编号: 20160211)

作者单位: 河北医科大学第一医院¹ 急诊科、³ 神经外科、⁴ 神经内科、⁵ 老年病科, 石家庄 050000

² 河北医科大学第二医院心身医学科, 石家庄 050000

作者简介: 赵康,男,硕士,主治医师,责任作者, E-mail: sjnk-kang123@163.com

(25、50、100 mg/kg) 和尼莫地平(20 mg/kg), 连续 14 d, 每日灌胃 1 次。假手术组和模型组灌胃等量生理盐水。最后 1 次灌胃后 12 h 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(360 mg/kg) 麻醉, 快速断头取脑组织, 参照大鼠脑立体定位图谱快速取右侧半球海马组织置入收集管中, 液氮中保存。

1.4 Y 迷宫实验检测大鼠学习记忆功能 Y 迷宫具有 3 个臂, 分为起始臂、新异臂和其他臂。将新异臂用隔板挡住, 大鼠由起始臂放入, 在起始臂和其他臂中自由活动 10 min, 训练结束后, 大鼠被放回饲养笼。训练结束后 4 h 进行, 抽开新异臂隔板, 大鼠由起始臂放入, 在 3 个臂中自由活动 5 min。录像记录 5 min 内每只大鼠在各个臂停留的时间和穿梭次数。统计并分析大鼠在各个臂停留时间占总时间百分比、进入次数及新异臂潜伏期。

1.5 HE 染色 将脑组织用 10% 福尔马林固定并进行石蜡包埋切片, 采用苏木精-伊红染液, 将石蜡切片脱蜡, 蒸馏水润湿组织, 核染液染色 5 min, 水洗 5 s, 浆染液染色 30 s, 水洗后, 滤纸吸干, 无水乙醇脱水 2 次后封片, 在荧光显微镜下观测。并参照谢淑玲等^[6]脑组织病理评分表进行脑组织病理评分。

1.6 TTC 染色 按照染液说明书, 将新鲜脑组织切片置于装有 TTC 染液的培养皿中, 37 °C 避光孵育 30 min, 用组织冲洗应用液将组织表面多余染色液冲洗掉, 拍照并观察样本颜色变化, 切片非梗死区呈玫瑰红色, 梗死区组织发白, 红色区与灰色区之前未缺血区, 计算梗死面积比例。

1.7 TUNEL 染色 将脑组织石蜡切片脱蜡处理, 滴加 20 μg/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K, 20~37 °C 作用 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 50 μl TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min, 用 PBS 洗涤 1 次, 滴加 0.2 ml 标记反应终止液, 室温孵育 10 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 继续在样品上加 50 μl Streptavidin-HRP 工作液, 室温孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 最后滴加 0.3 ml DAB 显色液后在荧光显微镜下观测。每张切片随机选择 10 个视野, 细胞凋亡率(%) =

平均光密度 × 阳性细胞百分比 × 100%。

1.8 SOD、MDA、GSH 含量测定 按照试剂盒说明书, 采用酶标仪测定总 SOD 含量, 采用可见分光光度计测定 MDA、GSH 含量。SOD 在 450 nm 处测吸光度(optical density, OD) 值, MDA 在 532 nm 处测 OD 值, GSH 在 412 nm 处测 OD 值。

1.9 LDH、Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力测定 按照试剂盒说明书, 采用酶标仪测定 LDH、Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力。Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶在 636 nm 处测 OD 值, LDH 在 450 nm 处测 OD 值。

1.10 Western blot 将各组大鼠脑组织在冰上溶解 25 min, 再加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取, BCA 试剂盒测定蛋白质含量; 提取等量的蛋白质样品(20 mg), 100 °C 变性 5 min。然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转移至 PVDF 膜, 5% 的 BSA 室温封闭 1~2 h 后加入一抗 Survivin(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)、Caspase-9(1:1 000) 4 °C 过夜孵育, 次日, 清洗后再加入辣根过氧化物酶标记的 IgG(1:10 000), 室温孵育 1 h, 清洗。最后加入发光液后, 于凝胶成像仪进行曝光拍照, 并用 ImageJ 软件统计灰度值计算相对表达量。GAPDH 作为上样量参照, 至少重复 3 个独立的实验。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较用独立的 *t* 检验, 组间差异采用单因素方差分析进行检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠脑部功能的影响 采用 Y 迷宫实验检测各组大鼠脑部功能结果如表 1 所示。与假手术组比较, 模型组新异臂进入次数降低(*t* = 5.066, *P* < 0.05), 新异臂潜伏期、起始臂进入次数、其他臂进入次数升高(*t* = 1.265、7.178、3.544, *P* < 0.05)。与 MCAO 模型组比较, 欧

表 1 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠脑部功能的影响(*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 新异臂进入次数 | 新异臂潜伏期(s) | 起始臂进入次数 | 其他臂进入次数 |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术 | 6.43 ± 1.36 | 3.13 ± 0.69 | 3.12 ± 0.92 | 3.65 ± 1.32 |
| 模型 | 4.31 ± 1.12* | 26.78 ± 4.45* | 4.13 ± 1.03* | 6.52 ± 0.84* |
| 欧前胡素 25 mg/kg | 4.45 ± 1.67 | 25.95 ± 3.94 | 4.06 ± 1.28 | 6.12 ± 1.73 |
| 欧前胡素 50 mg/kg | 6.12 ± 1.54 [#] | 9.34 ± 2.42 [#] | 3.54 ± 1.33 [#] | 4.26 ± 1.17 [#] |
| 欧前胡素 100 mg/kg | 6.87 ± 1.49 [#] | 3.07 ± 0.87 [#] | 3.25 ± 1.02 [#] | 3.97 ± 0.93 [#] |
| 尼莫地平 | 6.64 ± 1.93 [#] | 3.58 ± 1.14 [#] | 3.37 ± 0.85 [#] | 4.02 ± 1.11 [#] |

与假手术组比较: * *P* < 0.05; 与模型组比较: [#] *P* < 0.05

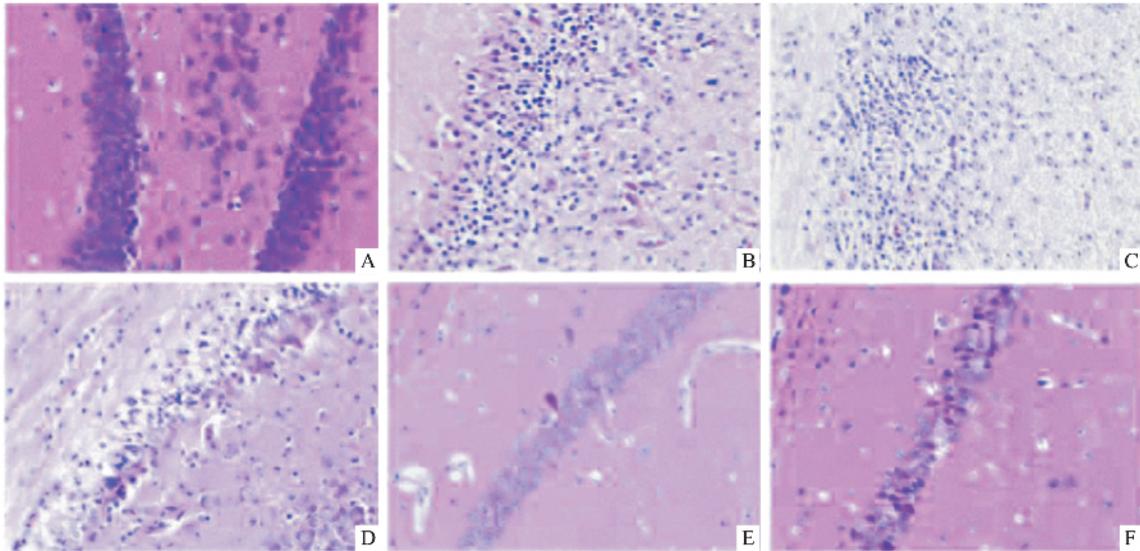


图1 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠脑组织病理损伤的影响 HE 染色 × 200

A: 假手术组; B: 模型组; C: 欧前胡素 25 mg/kg 组; D: 欧前胡素 50 mg/kg 组; E: 欧前胡素 100 mg/kg 组; F: 尼莫地平组

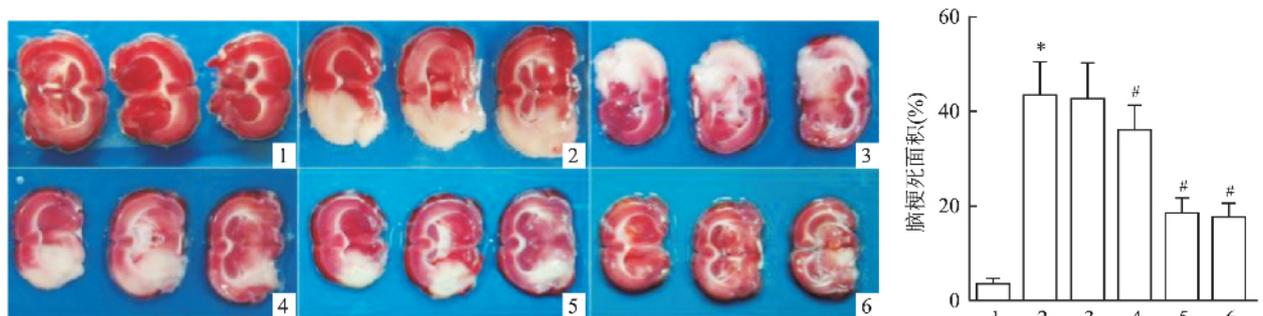


图2 欧前胡素对大鼠脑梗死面积的影响

1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 欧前胡素 25 mg/kg 组; 4: 欧前胡素 50 mg/kg 组; 5: 欧前胡素 100 mg/kg 组; 6: 尼莫地平组; 与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

前胡素 50、100 mg/kg 组和尼莫地平组新异臂进入次数升高 ($F = 1.687, P < 0.05$)，新异臂潜伏期、起始臂进入次数、其他臂进入次数降低 ($F = 53.30, 0.515, 0.4316, P < 0.05$)。

2.2 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠脑组织病理损伤的影响 采用 HE 染色检测各组大鼠脑组织海马区神经元病理学变化结果(图 1)，并对脑组织进行病理评分(表 2)。假手术组细胞组织纹理清晰，着色均匀。模型组较假手术组神经元细胞萎缩，着色深浓，纹理紊乱，呈现脑组织病理损伤，病理评分升高 ($t = 1.338, P < 0.05$)。欧前胡素 50、100 mg/kg 组和尼莫地平组较 MCAO 模型组病理损伤程度均有改善，病理评分降低 ($F = 17.94, P < 0.05$)。

2.3 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠脑梗死面积的影响 通过 TTC 染色检测各组大鼠脑梗死面积结果如图 2。与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死面积显著升高 ($t = 1.162, P < 0.05$)。与模型组比较，

欧前胡素 50、100 mg/kg 组和尼莫地平组大鼠脑梗死面积显著降低 ($F = 15.95, P < 0.05$)。

表 2 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠脑组织病理评分的影响 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 病理评分 |
|----------------|--------------|
| 假手术 | 0.38 ± 0.16 |
| 模型 | 2.63 ± 0.22* |
| 欧前胡素 25 mg/kg | 1.71 ± 0.14 |
| 欧前胡素 50 mg/kg | 1.68 ± 0.21# |
| 欧前胡素 100 mg/kg | 1.64 ± 0.19# |
| 尼莫地平 | 1.66 ± 0.17# |

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.4 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠神经元细胞凋亡的影响 采用 TUNEL 染色观察神经元细胞凋亡，结果如图 3。细胞核呈现黄褐色为阳性细胞，即凋亡细胞。与假手术组比较，模型组细胞凋亡率显著升高 ($t = 1.055, P < 0.05$)。与模型组比较，欧前胡素 50、100 mg/kg 组和尼莫地平组细胞凋亡率显著

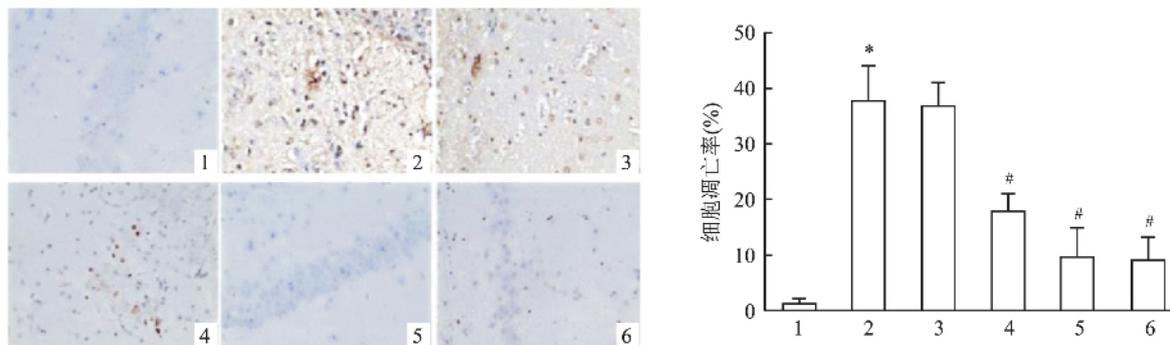


图3 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠神经元细胞凋亡的影响

1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 欧前胡素 25 mg/kg 组; 4: 欧前胡素 50 mg/kg 组; 5: 欧前胡素 100 mg/kg 组; 6: 尼莫地平组; 与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

降低 ($F = 22.73, P < 0.05$)。

2.5 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平的影响 Western blot 检测各组大鼠 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平结果如图 4、表 3 所示。与假手术组比较,模型组 Survivin 蛋白水平降低 ($t = 1.364, P < 0.05$), Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平升高 ($t = 1.154, 1.065, P < 0.05$)。与模型组相比较,欧前胡素 50、100 mg/kg 组和尼莫地平组 Survivin 蛋白水平升高 ($F = 21.56, P < 0.05$), Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平降低 ($F = 79.42, 71.15, P < 0.05$)。

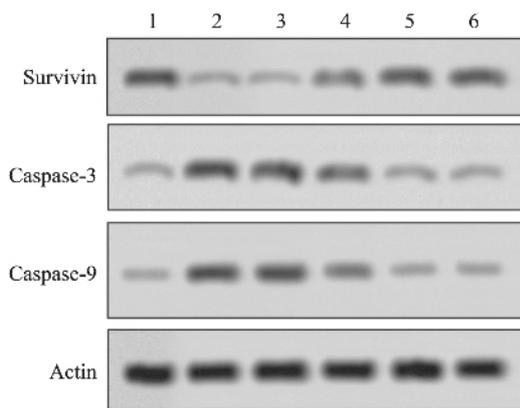


图4 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平

1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 欧前胡素 25 mg/kg 组; 4: 欧前胡素 50 mg/kg 组; 5: 欧前胡素 100 mg/kg 组; 6: 尼莫地平 20 mg/kg 组

2.6 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠 SOD、GSH、MDA 含量的影响 试剂盒检测各组大鼠 SOD、MDA、GSH 含量结果如表 4 所示。与假手术组比较,模型组 SOD、GSH 含量降低 ($t = 1.959, 2.585, P < 0.05$), MDA 含量升高 ($t = 1.843, P < 0.05$)。与 MCAO 模型组相比较,欧前胡素 50、100 mg/kg 组和

尼莫地平组 SOD、GSH 含量升高 ($F = 11.18, 13.37, P < 0.05$), MDA 含量降低 ($F = 5.364, P < 0.05$)。

表3 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | Survivin /Actin | Caspase-3 /Actin | Caspase-9 /Actin |
|----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 假手术 | 0.13 ± 0.04 | 0.03 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| 模型 | 0.02 ± 0.01* | 0.42 ± 0.06* | 0.32 ± 0.05* |
| 欧前胡素 25 mg/kg | 0.02 ± 0.01 | 0.41 ± 0.05 | 0.31 ± 0.04 |
| 欧前胡素 50 mg/kg | 0.06 ± 0.02# | 0.14 ± 0.03# | 0.05 ± 0.02# |
| 欧前胡素 100 mg/kg | 0.11 ± 0.02# | 0.04 ± 0.02# | 0.03 ± 0.02# |
| 尼莫地平 | 0.15 ± 0.03# | 0.03 ± 0.01# | 0.03 ± 0.01# |

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

表4 欧前胡素对各组大鼠 SOD、MDA、GSH 含量的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | SOD (U/mg) | MDA (nmol/mg) | GSH (nm/mg) |
|----------------|---------------|---------------|---------------|
| 假手术 | 11.23 ± 2.34 | 1.42 ± 0.39 | 43.93 ± 4.36 |
| 模型 | 3.64 ± 0.94* | 4.79 ± 1.85* | 19.42 ± 3.23* |
| 欧前胡素 25 mg/kg | 4.08 ± 0.62 | 4.66 ± 1.34 | 20.46 ± 3.16 |
| 欧前胡素 50 mg/kg | 7.35 ± 1.34# | 2.31 ± 0.82# | 31.02 ± 5.18# |
| 欧前胡素 100 mg/kg | 10.46 ± 2.21# | 1.55 ± 0.67# | 42.38 ± 5.44# |
| 尼莫地平 | 9.12 ± 1.35# | 1.68 ± 0.74# | 36.06 ± 4.23# |

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.7 欧前胡素对 MCAO 模型大鼠 LDH、Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力的影响 试剂盒检测各组大鼠血清 LDH、Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力结果如表 5 所示。与假手术组比较,模型组 LDH 活力升高 ($t = 2.292, P < 0.05$), Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力降低 ($t = 2.188, 3.645, P < 0.05$)。与模型组比较,欧前胡素 50、100 mg/kg 和尼莫地平组 LDH 活力降低 ($F = 26.26, P < 0.05$), Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP

酶活力升高($F = 19.33, 2.701, P < 0.05$)。

表5 欧前胡素对各组大鼠 LDH、Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | LDH (U/mg) | Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol/L/mg/h}$) | Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol/L/mg/h}$) |
|----------------|-------------------|--|---|
| 假手术 | 923.17 ± 129.13 | 4.08 ± 0.39 | 3.53 ± 0.45 |
| 模型 | 2351.73 ± 237.06* | 1.52 ± 0.45* | 2.01 ± 0.43* |
| 欧前胡素 25 mg/kg | 2217.69 ± 215.19 | 1.58 ± 28.54 | 2.33 ± 0.56 |
| 欧前胡素 50 mg/kg | 1732.36 ± 196.35# | 2.83 ± 0.42# | 3.09 ± 0.88# |
| 欧前胡素 100 mg/kg | 1093.21 ± 201.53# | 4.26 ± 0.37# | 3.56 ± 0.64# |
| 尼莫地平 | 1132.32 ± 159.65# | 3.31 ± 0.54# | 3.12 ± 0.75# |

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与 MCAO 模型组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

中风为古代中医“风、痲、腑、膈”四大难病之首,是以高发病率、高死亡率和高复发率等特点严重威胁人类健康的一种疾病^[7]。中药以其多途径多靶点的作用,在中风的治疗中取得了疗效。欧前胡素是中药白芷、独活和当归中的有效成分,已有研究^[8]表明欧前胡素在中枢神经系统疾病中发挥神经保护作用。本实验通过构建 MCAO 大鼠模型发现欧前胡素具有改善脑缺血再灌注模型大鼠脑组织病理损伤的作用。

Y 迷宫实验主要研究啮齿类动物的空间识别记忆能力,该迷宫利用了啮齿类动物对新异环境天然探究的自然习性,不需要动物学习任何规则趋利避害,能有效反映动物对新异环境的识别记忆能力。本研究表明欧前胡素具有改善脑缺血再灌注模型大鼠对新环境空间认知、行为辨别及记忆能力,提示欧前胡素可增强脑缺血再灌注模型大鼠对新环境的探索及记忆能力。

凋亡是细胞死亡的抑制,在正常成年组织的早期发育和生长中起着重要的作用。在中枢神经系统的正常发育过程中,这是一种常见的现象。然而在成年人的大脑中,神经元的存活对人整个生命周期的正常功能来说更为必要。Survivin 是目前发现的作用最强的凋亡抑制基因,Survivin 通过直接抑制凋亡终末效应酶半胱氨酸天冬酰胺酶 Caspase-3 和 Caspase-7 活性来阻断细胞凋亡过程。通过调控 Survivin 的表达,可刺激神经兴奋。Caspase-3 是多种凋亡途径最主要的下游效应因子之一,是细胞凋亡的关键酶,在各种因素启动的凋亡程序中起最后枢纽作用,直接参与细胞凋亡的发生,导致脑缺血再灌注损伤,而活化的 Caspase-9 可激活 Caspase-3。在缺血性神经损伤中,抑制 Caspase-3、Caspase-9 活

性可产生明显的神经保护作用^[9]。Wang et al^[10]研究发现欧前胡素通过抑制氧糖剥夺/再灌注诱导的人神经母细胞瘤细胞模型凋亡保护神经元。本研究显示欧前胡素具有上调 Survivin 蛋白水平,下调 Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平的作用。提示欧前胡素通过抑制神经元细胞凋亡改善脑缺血再灌注模型大鼠神经元损伤。

氧化应激在脑缺血再灌注中起到重要作用,由于脑组织代谢旺盛、需氧量高,导致生成较多的活性氧,但脑组织自身缺少抗氧化物质,导致氧化损伤。MDA 是体内脂类物质遭受自由基攻击后断裂形成的氧化产物,其水平高低可反映氧化应激程度^[11]; GSH、SOD 是体内最重要的抗氧化物酶,可清除细胞中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),具有保护细胞免受氧化损伤的作用。He et al^[12]研究发现欧前胡素通过降低 MDA 含量使大脑免受脑缺血再灌注引起的过度氧化应激损伤,进而发挥脑保护作用。余盈等^[13]研究发现欧前胡素通过升高 SOD、GSH 含量减轻阿尔茨海默病模型小鼠氧化应激损伤。本研究显示欧前胡素具有升高脑缺血再灌注模型大鼠 SOD、GSH 含量,降低 MDA 含量的作用,提示欧前胡素可能通过抗氧化途径减少神经元细胞内氧化应激反应,起到治疗脑缺血再灌注大鼠的作用。

血清 LDH 作为评价脑组织损伤的指标,在脑缺血后脑细胞通透性增加,脑组织中 LDH 活性降低^[14]。Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶参与细胞间及组织间物质转运,由于其活性维持依赖于 ATP 的支持,所以其活性高低可体现细胞能量代谢水平。张祎等^[15]研究发现泄心汤通过增强 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性保护缺血脑组织。本研究显示欧前胡素具有升高脑缺血再灌注大鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力,降低 LDH 活力的作用。提示欧前胡素通过维持细胞渗透压,细胞正常结构和功能改善脑缺血再灌注大鼠病理损伤。

综上,欧前胡素对脑缺血再灌注大鼠具有保护作用。通过改善病理损伤、新环境识别能力,抑制神经元细胞凋亡,抗氧化应激。本文揭示了欧前胡素临床治疗中风的潜力,下一步计划研究欧前胡素在体外对脑缺血再灌注模型的影响。

参考文献

[1] 李俊杰, 黄亚萍. 大黄酚抑制 ERS 减少 OGD/R 大鼠海马神经

- 元凋亡[J]. 医学分子生物学杂志 2019, 16(4): 328-32.
- [2] 张首国, 李深. 中风的药物治疗策略[J]. 国外医学(药学分册) 2007(3): 216-8.
- [3] Wang K S, Lv Y, Wang Z, et al. Imperatorin efficiently blocks TNF- α -mediated activation of ROS/PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3397-404.
- [4] 何蔚, 周钰梅, 陈伟伟, 等. 欧前胡素对大鼠脑缺血再灌注损伤后炎症反应的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志 2014, 28(4): 662-3.
- [5] 顾媛媛, 姜波, 刘旭, 等. 二氢槲皮素对脑缺血损伤模型大鼠炎症因子、氧化应激水平以及脑组织能量代谢影响[J]. 辽宁中医药大学学报 2019, 21(6): 36-8.
- [6] 谢淑玲, 廖菁, 范子焯, 等. 芪红脑苏汤对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护机制研究[J]. 中药药理与临床 2016, 32(6): 171-5.
- [7] 王梅平, 詹增士, 朱敏. 脑缺血再灌注损伤大鼠 CREB 信号通路调控及电针足三里作用机制[J]. 临床误诊误治 2018, 31(12): 94-8.
- [8] 廖祥萍, 王怀伟, 刘南海, 等. 欧前胡素在中枢神经系统疾病治疗中的研究进展[J]. 赣南医学院学报 2019, 39(1): 97-100.
- [9] Chelluboina B, Klopfenstein J D, Gujrati M, et al. Temporal regulation of apoptotic and anti-apoptotic molecules after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion[J]. *Mol Neurobiol* 2014, 49(1): 50-65.
- [10] Wang N, Wu L, Cao Y, et al. The protective activity of imperatorin in cultured neural cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury via anti-apoptosis[J]. *Fitoterapia*, 2013, 90(20): 38-43.
- [11] 黄娟, 胡维熊, 熊丹. 血清 LDL 与 2 型糖尿病周围神经病变的相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志 2018, 10(05): 352-5, 360.
- [12] He W, Chen W W, Huang X H, et al. Protective effects of imperatorin against cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress through Nrf2 signaling pathway in rats[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2017, 31(10): 988.
- [13] 余盈, 于罡, 何蔚. 欧前胡素对 A β ₍₁₋₄₂₎ 致阿尔茨海默病模型小鼠海马组织氧化应激反应的影响[J]. 天然产物研究与开发 2018, 30(8): 1423-6, 1409.
- [14] Homi H M, Freitas J J, Curi R, et al. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 333(1): 37-40.
- [15] 张祎, 陈文, 孟宪丽. 三黄泻心汤对全脑缺血再灌注大鼠氧化应激及炎症损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床 2014, 30(4): 1-5.

Effects of imperatorin on hippocampal injury and atpase activity in cerebral ischemia reperfusion rats

Zhao Kang¹, Zhao Xumeng², Xing Yali³, et al

(¹Dept of Emergency, ³Dept of Neurosurgery, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000;

²Dept of Psychosomatic Medicine, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To investigate the effects of imperatorin on hippocampal injury and atpase activity in rats after cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** The rat model of cerebral ischemia-reperfusion was established, and the rats were randomly divided into 6 groups: healthy control group, model group, imperatorin 25, 50, 100 mg/kg group and nimodipine group for follow-up experiments. Y maze experiment detected the learning and memory function of rat brain. HE staining was used to detect pathological damage of brain tissue in rats. Apoptosis of rat neurons was detected by TUNEL staining. The contents of total superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH) were detected by the kit. The activity of lactate dehydrogenase (LDH), Na⁺-K⁺-ATP and Ca²⁺-Mg²⁺-ATP were detected by the kit. Survivin, Caspase-3 and Caspase-9 were detected by Western blot. **Results** Compared with model group, healthy controls and extraneous imperatorin 50, 100 mg/kg and nim horizon group armed into a significant rise in number of incubation period ($P < 0.05$), the extraneous arms, starting arm into the number, the other arm into number significantly reduced ($P < 0.05$), significantly improved pathological damage degree and the apoptosis positive cells were significantly reduced, Survivin protein level significantly increased ($P < 0.05$), Caspase 3, Caspase-9 proteins significantly reduced ($P < 0.05$), SOD and GSH contents significantly increased ($P < 0.05$), MDA content significantly decreased ($P < 0.05$), LDH activity significantly decreased ($P < 0.05$), Na⁺-K⁺-ATP, Ca²⁺-Mg²⁺-ATP activity significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Imperatorin has a protective effect on cerebral ischemia and reperfusion in rats.

Key words imperatorin; stroke; apoptosis; oxidative stress