

白藜芦醇保护缺血性脑卒中大鼠神经功能的作用机制研究^{*}

江海洋¹, 陈浩², 顾中华^{3△}

(1. 中国人民解放军第八二医院, 江苏 淮安 223001; 2. 徐州医科大学附属医院, 江苏 徐州 221000;
3. 海门市中医院, 江苏 海门 226100)

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠神经功能保护作用机制。**方法** 选择清洁级健康雄性SD大鼠75只, 将其分为对照组、模型组、白藜芦醇低剂量(10 mg/kg)、白藜芦醇中剂量(20 mg/kg)以及白藜芦醇高剂量组(30 mg/kg), 造模后比较各组大鼠神经功能障碍评分、脑梗死体积、脑组织含水量、脑组织p53及Notch1蛋白表达情况。**结果** 白藜芦醇可显著降低缺血性脑卒中大鼠神经功能障碍评分($P<0.05$), 随着白藜芦醇浓度的升高大鼠神经功能障碍评分明显降低($P<0.05$)。各手术组大鼠脑梗死体积及脑组织含水量较假手术组明显升高($P<0.05$), 而白藜芦醇各组大鼠脑梗死体积及脑组织含水量较模型组明显降低($P<0.05$), 随着白藜芦醇浓度的升高, 大鼠脑梗死体积及脑组织含水量明显降低($P<0.05$)。各手术组大鼠脑组织p53及Notch1蛋白表达量均较假手术组明显升高($P<0.05$), 白藜芦醇大鼠脑组织p53及Notch1蛋白表达量较模型组明显降低($P<0.05$), 且白藜芦醇浓度升高大鼠脑组织p53及Notch1蛋白表达量明显降低($P<0.05$)。**结论** 白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠具有显著的神经功能保护作用, 可有效改善大鼠脑梗死面积及脑水肿程度, 其神经保护作用机制可能与白藜芦醇对p53介导的凋亡通路及Notch1介导的炎症反应通路抑制作用有关。

关键词: 白藜芦醇; 缺血性脑卒中; 神经功能保护; 机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2018)03-0023-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.03.005

Protective Effect Mechanism of Resveratrol on Neurological Function in Rats with Ischemic Stroke

JIANG Haiyang¹, CHEN Hao², GU Zhonghua³

(1. The Eighth Second Hospital of Chinese People's Liberation Army, Huai'an 223001, China;
2. Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China;
3. Haimen Traditional Chinese Medicine Hospital, Haimen 226100, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the neuroprotective effect of resveratrol on ischemic stroke in rats and its mechanism. **Methods** 75 healthy male SD rats of clean grade were divided into control group, model group, low dose of resveratrol (10 mg/kg), middle dose of resveratrol (20 mg/kg) and high dose of resveratrol (30 mg/kg). The neurological impairment score, cerebral infarction volume, water content of brain tissue were compared after modeling. The expression of p53 and Notch1 protein in brain tissue. **Results** Resveratrol significantly decreased the neurological impairment score of ischemic stroke rats ($P<0.05$), and decreased the neurological impairment score with the increase of resveratrol concentration ($P<0.05$). The volume of cerebral infarction and water content of brain tissue in each operation group were significantly higher than those in sham operation group ($P<0.05$), while the volume of cerebral infarction and water content of brain tissue in resveratrol groups were significantly lower than those in model group ($P<0.05$), and the volume of cerebral infarction and water content of brain tissue were significantly decreased with the increase of resveratrol concentration ($P<0.05$). The

收稿日期: 2018-05-07

^{*} 基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2011382)

第一作者简介: 江海洋(1982-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 老年病学。

△通信作者: 顾中华, E-mail: 755234101@qq.com

expression of p53 and Notch1 protein in brain tissue of rats in each operation group was significantly higher than that in sham operation group ($P<0.05$), and the expression of p53 and Notch1 protein in resveratrol group was significantly lower than that in model group ($P<0.05$), and the expression of p53 and Notch1 protein in brain tissue of rats with resveratrol concentration increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Resveratrol has significant neuroprotective effect on ischemic stroke rats, and can effectively improve the area of cerebral infarction and the degree of cerebral edema in rats. The neuroprotective mechanism may be related to the inhibition of resveratrol on p53-mediated apoptosis pathway and Notch1-mediated inflammatory response pathway.

KEY WORDS: resveratrol; ischemic stroke; neuroprotection; mechanism

脑卒中是一种发病机制极为复杂且危害性严重的一种脑血管疾病,其中主要以缺血性脑卒中为主,研究显示,长期脑缺血可能导致患者出现永久性的神经损伤以及神经元凋亡^[1-2]。目前对于缺血性脑卒中治疗方法主要包括溶栓、抗血小板聚集、调节血脂、调节血压等,然而在患者疾病治疗早期,神经保护剂的使用也是不容忽视^[3]。白藜芦醇是一种具有多种生物学的小分子化合物,常见于红酒、葡萄皮、坚果等多种食物中^[4]。研究显示^[5-6],白藜芦醇具有抗衰老、抗炎、抗氧化以及抗细胞凋亡作用,此外,可改善脑缺血以及一些退行性疾病所引起的神经元损伤症状。近年来白藜芦醇对脑血管疾病的保护作用及其分子机制成为研究热点,本研究探讨分析白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠神经功能保护作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择 7~9 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 75 只,大鼠体质量(300 ± 20)g,常规饲养,温度 25℃,术前 12 h 禁食,不禁饮。

1.2 主要试剂及仪器 白藜芦醇(购于美国 sigma 公司);兔抗鼠 p53 多克隆抗体(美国 abcam 公司);兔抗鼠 Notch1 多克隆抗体(美国 abcam 公司);ABC 试剂盒(北京中杉金桥);DMSO(美国 sigma 公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天);兔抗 β -actin 单克隆抗体(北京博奥森);PVDF 膜(美国 Millipore)。凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad);Western 电泳、电转槽(美国 Bio-Rad);实验室用超纯水过滤系统(美国 Millipore)。

1.3 实验方法

1.3.1 脑缺血/再灌注(MCAO)模型建立 采用改良 Longa 等大鼠中动脉栓塞法(MCAO)建立大鼠脑缺血损伤模型。采用 3.5%水合氯醛溶液按照 1 mL/100 mg 腹腔注射麻醉,大鼠颈部去毛、消毒,沿颈部正中切开皮肤并钝性分离颈外动脉、颈总动脉以及颈内动脉,

并结扎大鼠颈总动脉以及颈外动脉,使用动脉夹夹住颈内动脉远心端,在颈总结扎处远心侧剪一个小切口,然后将备好的线栓插入颈内动脉,然后将动脉夹松开,微感阻力即可停止插入,栓线插入深度距动脉分叉处约 18~20 mm,将大鼠皮肤缝合后放回笼内。大鼠栓线保留 2h 后拔出,形成缺血/再灌注。大鼠苏醒后呈右侧 Horner 征,提尾时大鼠左前肢屈曲以及前行时向左侧划圈即为手术造模成功。假手术组大鼠手术操作同上,但线栓插入 10 mm 即可。

1.3.2 分组 将 75 只大鼠随机分为 5 组,每组 15 只,即为假手术组、模型组、低剂量组、中剂量组以及高剂量组。低剂量组、中剂量组以及高剂量组大鼠术前连续 7 d 经腹腔给药,1 次/d,术前 30 min 给药 1 次,一共给药 8 次,给药剂量分别为 10 mg/kg、20 mg/kg 以及 30 mg/kg。

1.3.3 神经功能障碍评分 各组大鼠行 MCAO 术后 24 h,参照 Longa 提出的评分标准对大鼠神经功能障碍进行评分。0 分:大鼠无明显的神经功能缺失症状;1 分:大鼠提尾左侧前肢屈曲不能伸展;2 分:大鼠走向左侧划圈或出现追尾症状;3 分:大鼠行走困难,躯体向左侧倾倒;4 分:大鼠不能自行行走或呈昏迷状态。评分 1~3 分作为造模有效,剔除 0 分以及 4 分大鼠,剔除后在后续实验中随机补充入组,保证每组大鼠的数目不变。

1.3.4 脑梗死体积测定 各组大鼠随机抽取 5 只术后 24 h 断头取脑,置于-20℃速冻 15 min 后将其取出,然后将大鼠低位脑干、嗅脑以及小脑去除,冠状位切成 6 等份,将其置于 2% TTC 溶液中,在 37℃下避光孵育半小时,使用 4%多聚甲醛固定拍照,分离白色以及红色组织并分别称重,并计算各组大鼠脑梗死体积。脑梗死体积(%)=苍白区重量/总重量 $\times 100\%$ 。

1.3.5 脑组织含水量测定 各组大鼠随机抽取 5 只术后 24 h 断头取脑,使用滤纸将缺血侧脑组织表面

水分小心擦拭,称其湿重后将其置于 100 ℃烤箱内烘烤至恒重,然后称其干重,计算各组大鼠脑组织含水量。脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.6 Western-blot 检测各组大鼠 将各组大鼠余下的 5 只大鼠术后 24 h 断头取脑,提取大鼠脑组织总蛋白,采用 Western-blot 检测各组大鼠脑组织 p53 及 Notch1 表达情况,采用 Quantity One 软件测定蛋白条带灰度值并进行分析,目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/同一标本内参 β -actin 条带灰度值。

1.4 统计学分析 采用统计学软件 SPSS 22.0 进行数据分析,计量资料比较采用 t 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能障碍评分比较 假手术组大鼠神经功能障碍评分 0.00 分,模型组大鼠神经功能障碍评分(3.18±0.75)分,低剂量组大鼠神经功能障碍评分(2.87±0.67)分,中剂量组大鼠神经功能障碍评分(2.16±0.59)分以及高剂量组大鼠神经功能障碍评分(1.79±0.52)分。白藜芦醇可明显降低降低缺血性脑卒中大鼠神经功能障碍评分($P<0.05$),随着白藜芦醇浓度的升高大鼠神经功能障碍评分明显降低($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠脑梗死体积及脑组织含水量比较 各手术组大鼠脑梗死体积及脑组织含水量较假手术组显著升高($P<0.05$),而白藜芦醇各组大鼠脑梗死体积及脑组织含水量较模型组显著降低($P<0.05$),随着白藜芦醇浓度的升高大鼠脑梗死体积及脑组织含水量显著降低($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠脑梗死体积及脑组织含水量比较($\bar{x}\pm s, \%, n=5$)		
组别	脑梗死体积	脑组织含水量/%
假手术组	0.00±0.00	72.94±1.36
模型组	46.94±3.31*	83.46±1.18*
低剂量组	38.75±4.22#	80.68±1.63#
中剂量组	31.75±2.60*#△	77.95±1.05*#△
高剂量组	25.48±2.94*#△○	75.16±1.30*#△○

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与低剂量组比较,△ $P<0.05$;与中剂量组比较,○ $P<0.05$

2.3 各组大鼠脑组织 p53 及 Notch1 蛋白表达 各

手术组大鼠脑组织 p53 及 Notch1 蛋白表达量均较假手术组显著升高($P<0.05$),白藜芦醇大鼠脑组织 p53 及 Notch1 蛋白表达量较模型组显著降低($P<0.05$),且白藜芦醇浓度升高大鼠脑组织 p53 及 Notch1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$),见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠脑组织 p53 及 Notch1 蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=5$)		
组别	p53	Notch1
假手术组	0.281±0.031	0.417±0.027
模型组	0.695±0.75*	0.774±0.108*
低剂量组	0.582±0.043**	0.696±0.113**
中剂量组	0.506±0.039*#△	0.621±0.097*#△
高剂量组	0.438±0.037*#△○	0.589±0.110*#△○

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与低剂量组比较,△ $P<0.05$;与中剂量组比较,○ $P<0.05$

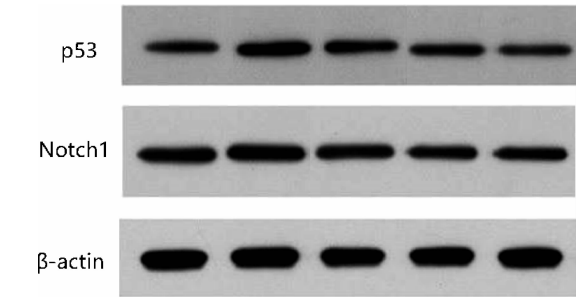


图 1 各组大鼠 p53 及 Notch1 蛋白表达

3 讨论

白藜芦醇作为一种天然存在的抗氧化产物物质,是从植物中提取的一种具有广泛生物学活性的物质,如抗肿瘤发生发展、神经元保护、抗氧化应激损伤、抗血管动脉粥样硬化形成等作用^[7-9]。目前研究证实,白藜芦醇对缺血缺氧后脑神经元损伤具有着一定的保护作用,且对某些中枢神经系统病变具有着积极意义^[9]。脑缺血后,机体缺血中心区神经细胞迅速发生细胞坏死,而缺血半暗带区神经细胞则出现细胞凋亡,从而影响着患者神经功能^[10]。本研究探讨分析白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠神经功能保护作用及其可能的作用机制。研究结果显示^[11],使用白藜芦醇后大鼠神经功能障碍评分显著降低,且随着白藜芦醇浓度的升高,对缺血性脑卒中大鼠神经功能保护功能越好。此外,白藜芦醇可显著减轻缺血性脑卒中大鼠脑梗死体积以及脑组织含水量,与学者相关研究结果相似^[12-13]。

p53 蛋白是由 p53 基因编码的一个由 393 个氨

基酸组成的含磷蛋白,是一种促凋亡因子^[14]。研究显示,在多种脑缺血动物模型中均检测 p53 蛋白表达的上上调,并作为一种促凋亡因子在细胞凋亡损伤时发挥其促凋亡作用^[15-16]。本研究结果显示,白藜芦醇可显著降低缺血性脑卒中大鼠脑组织 p53 蛋白表达,推测白藜芦醇对缺血性脑卒中的神经保护作用可能与抑制脑神经细胞凋亡有关。

脑缺血发生后组织损伤机制非常复杂,主要包括炎症反应、兴奋毒性氨基酸作用、细胞凋亡、线粒体损伤、氧化自由基损伤等^[17-18]。Notch 信号通路通过调节多种炎症细胞分化、发育以及功能来调控炎症反应的发生,Notch1 作为 NF- κ B 上游基因调控 NF- κ B 转录,从而影响细胞因子的表达,促进机体炎症反应^[19-20]。本研究显示,缺血性脑卒中大鼠脑组织内 Notch1 蛋白表达显著升高,而白藜芦醇可显著降低缺血性脑卒中大鼠脑组织 Notch1 表达,提示白藜芦醇可通过降低缺血后脑组织中 Notch1 表达,而起到抑制炎症反应作用。

综上所述,白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠具有明显的神经功能保护作用,可有效改善大鼠脑梗死面积及脑水肿程度,其神经保护作用机制可能与白藜芦醇对 p53 介导的凋亡通路及 Notch1 介导的炎症反应通路抑制作用有关。

参考文献:

- [1] 王宇,黄清,董明睿,等. 白藜芦醇对 β -淀粉样蛋白致小鼠学习记忆障碍改善作用的机制研究 [J]. 中风与神经疾病杂志,2015,32(6):518-521.
- [2] 李华,马明义. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后缺血核心区 NCCa-ATP 通道的表达变化 [J]. 昆明医科大学学报,2013,34(9):46-50.
- [3] 张莉峰. 白藜芦醇对缺血再灌注大鼠脑损伤中的保护作用的研究[D]. 郑州:郑州大学,2016.
- [4] 邱季,方芳,李珍,等. ERK-CREB 信号通路在白藜芦醇预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤神经保护中的作用[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(10):1152-1155.
- [5] ZHANG L, MA J, JIN X, et al. L-PGDS Mediates vagus nerve stimulation-Induced neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by suppressing the apoptotic response [J]. Neurochemical Research,2017,42(2):644-655.
- [6] 张莉峰,滕军放,袁学谦,等. 白藜芦醇通过抑制 TNF- α 表达保护大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 中国动脉硬化杂志,

2017,25(1):32-36.

- [7] ANDERSEN S D, SKJØTH F, YAVARIAN Y, et al. Multiple silent lacunes are associated with recurrent ischemic stroke[J]. Cerebrovascular Diseases,2016,42(1):73-80.
- [8] 石瑶,郭倩,周也涵,等. 白藜芦醇通过 Sirtuins 1 通路促进自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. 基础医学与临床,2015,35(4):496-501.
- [9] 张贵娟,杨涛,罗非君,等. 白藜芦醇的提取与检测方法研究进展[J]. 食品与机械,2013,29(2):234-237.
- [10] 高轩,陈荔枝,刘振红,等. 白藜芦醇通过抑制内质网应激减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中国免疫学杂志,2016,32(1):92-96.
- [11] 郭倩,余音,潘乾广,等. 白藜芦醇保护脑缺血/再灌注损伤与自噬关系的研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(7):995-998.
- [12] 李薇娜,陈莉芬. 白藜芦醇在脑缺血再灌注损伤中的神经保护作用及其机制的研究进展 [J]. 中国中医急症,2014,23(6):1117-1120.
- [13] TONG X, WANG C, LIAO X, et al. Smoking-Thrombolysis relationship depends on ischemic stroke subtype [J]. Stroke,2016,47(7):1811-1816.
- [14] 万丹. 白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2016.
- [15] Brookes R L, Crichton S, Wolfe C D A, et al. Sodium Valproate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Is Associated With Reduced Stroke Risk After Previous Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack [J]. Stroke,2018,49(1):54-61.
- [16] 张莉峰,滕军放,袁学谦,等. 不同浓度白藜芦醇对脑缺血-再灌注大鼠 HSP20 表达的影响 [J]. 中国急救医学,2017,37(7):653-658.
- [17] 赵刚,王伟民,杨帅,等. 白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用研究 [J]. 中华神经医学杂志,2014,13(1):26-29.
- [18] 周佳丽,祝慧凤,万东,等. 脑卒中大鼠神经功能修复的行为学评估方法 [J]. 中国全科医学,2014,17(18):2147-2150.
- [19] 陈纯白,都霞,赵乐萍,等. 反式白藜芦醇对卵巢摘除小鼠的抗抑郁作用 [J]. 温州医学院学报,2013,43(3):161-165.
- [20] RYU W S, PARK J B, KO S B, et al. Diastolic dysfunction and outcome in acute ischemic stroke[J]. Cerebrovascular Diseases,2016,41(4):148-155.