

率及增殖率，还对外周血白细胞及腹腔巨噬细胞的吞噬能力有显著提升作用。以上结果表明，红景天苷对小鼠免疫系统的免疫作用十分广泛，能够参与多种免疫应答反应，但也说明其特异性较差。而红景天另一主要成分昔元酪醇则能够特异性刺激 B 淋巴细胞的增殖和转化($P<0.05$)，且作用效果高于阳性药物组，这表明红景天昔元酪醇能够特异性作用于体液免疫应答系统。络塞维则对静止型 T 细胞向母细胞转化具有显著的促进作用($P<0.05$)。由此推断，红景天 3 种主要成分具有促进细胞和体液免疫功能的作用，不同的主要成分能作用于不同的免疫靶细胞，这为进一步揭示红景天对免疫系统的影响提供了实验和理论依据。

REFERENCES

[1] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 92-96.

- [2] 张晓丹, 余白云, 张茹. 红景天属植物的化学成分研究进展[J]. 航空航天医药, 2006, 17(1): 61-63.
- [3] 宋月英, 马玉珍, 韩慧文, 等. 红景天属植物化学成分研究及药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(2): 235-236.
- [4] 肖辉, 张月明, 冷爱枝. 红景天提取物的抗肿瘤实验[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43): 142-144.
- [5] 周凡, 陈雪梅, 范文玺, 等. 红景天属植物化学成分研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(7): 108-110.
- [6] 晨阳, 杨丽敏, 陶格斯, 等. 蒙药总黄酮对淋巴细胞转化和巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(4): 45-46.
- [7] 余曦明, 杨胜梅, 蔡明建, 等. 卡介菌多糖核酸对小鼠腹腔单核巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(10): 8-10.
- [8] 袁文丹, 崔勇, 刘巍, 等. 17 β -雌二醇对大鼠腹腔巨噬细胞免疫活性影响[J]. 济宁医学院学报, 2007, 30(4): 296-298.
- [9] 梁勇, 秦枫, 唐肖雷. 三七不同部位总皂苷溶血性及体外免疫活性研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4905-4907.
- [10] 李成义. 中药材鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 86-87.
- [11] 赵文, 蒋东升, 边庆荣, 等. 蔷薇红景天对小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用[J]. 营养学报, 2000, 22(1): 90-91.

收稿日期: 2015-06-03

柚皮苷对大鼠蛛网膜下腔出血后神经炎症的影响

苏静缘, 李晓明* (沈阳军区总医院神经外科, 沈阳 110016)

摘要: 目的 研究柚皮苷对蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)引起的脑组织神经炎症的影响。方法 54 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和柚皮苷组(80 mg·kg⁻¹)。各组大鼠过量麻醉致死, 断头取脑后干湿重法测水肿; 取冻存于液氮的患侧大脑皮质, 称重后用裂解液匀浆处理; 离心提蛋白, Western blot 定量检测炎症相关因子 NF- κ B; 各组大鼠断头取脑后置于 4% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋和切片, 免疫荧光染色半定量检测小胶质细胞标记钙离子结合调节因子(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1)和星形细胞标记胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)。结果 与模型组比较, 柚皮苷能明显减少 SAH 后脑组织水肿($P<0.05$)、NF- κ B 蛋白表达($P<0.05$)、抑制大脑皮质小胶质细胞 Iba-1 和星形胶质细胞 GFAP 的活化($P<0.05$)。结论 柚皮苷在 SAH 中有明显的抗炎作用。

关键词: 蛛网膜下腔出血; 柚皮苷; 炎症; NF- κ B; Iba-1; GFAP

中图分类号: R284.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)01-0042-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.011

Effects of Naringin on Cerebral Vasospasm and Apoptosis After Subarachnoid Hemorrhage in Rats

SU Jingyuan, LI Xiaoming* (Institute of Neurology, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of naringin on neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage(SAH) in rats. **METHODS** Fifty-four male SD rats were randomly divided into sham operation group, SAH group, and naringin group (80 mg·kg⁻¹). Rats were anesthetized overdose, after the rats were decapitated, the brain edema was detected by dry-wet weight method. Brain samples from the ipsilateral basal cortex were lysated, centrifuged, extract the protein. NF- κ B protein was

基金项目: 辽宁省科技攻关计划项目(2015225022)

作者简介: 苏静缘, 女, 硕士, 技师 Tel: 18640161441

E-mail: nijing5231@163.com

*通信作者: 李晓明, 女, 博士, 副主任医师

Tel: (024)28851284 E-mail: lxm5668sw@yahoo.com

detected by Western blot. Rats were fixed in 4% paraformaldehyde, and then were embedded in paraffin wax. Iba-1 and GFAP were detected by immunofluorescent staining. **RESULTS** Compared with SAH group, naringin treatment could significantly decrease brain edema, the expression of NF- κ B protein, and inhibit the activity of GFAP and Iba-1 ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Naringin has anti-inflammation effect on SAH.

KEY WORDS: subarachnoid hemorrhage; naringin; cerebral vasospasm; apoptosis; NF- κ B; Iba-1; GFAP

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)能引起大脑实质和动脉血管的炎症反应。在SAH患者的脑脊液和血清中存在着大量的免疫复合物、激活的补体、以及大量增多的细胞因子和内皮黏附因子,这些炎症反应能够加重脑组织损伤或引起血管痉挛^[1]。研究表明,SAH引起的炎症反应与敏感性氧化还原转录因子NF- κ B密切相关^[2]。笔者前期的研究证实了熊果酸能通过抑制NF- κ B等炎症因子改善SAH的早期脑损伤^[3],说明NF- κ B及其炎症通路是引发SAH脑损伤的重要因子。

柚皮苷是一种类黄酮化合物,具有多种生物功能^[4]。在脑缺血的动物模型研究中发现,柚皮苷能显著抑制大鼠脑缺血所引发的NF- κ B炎症通路,进而起到脑保护作用^[5]。而柚皮苷在SAH引发的炎症反应中的作用及其相关的机制目前还没有被研究。本实验通过对SAH大鼠模型进行柚皮苷腹腔注射给药,观察柚皮苷对SAH引起的神经炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

柚皮苷(天津士兰科技有限公司,批号:10236-47-2,纯度:99%);兔抗NF- κ B、兔抗人胶质纤维酸性蛋白(gial fibrillary acidic protein, GFAP)、兔抗钙离子结合调节因子(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1)抗体(武汉博士德试剂公司,批号:10914-1-AP);辣根酶标记兔二抗和荧光标记兔二抗(北京中杉金桥,批号:K1427160);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天公司,批号:110466)。

1.2 动物和大鼠SAH模型的制备

清洁健康SD大鼠,♂,体质量210~260 g,由沈阳军区总医院实验动物中心提供,实验动物合格证号:0005095。术前12 h禁食,自由饮水。10%水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹)腹腔麻醉,仰卧位固定于手术台上,颈部正中纵向切口,暴露右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,分离右侧颈总动脉,在靠近颈外动脉根部结扎颈外动脉并剪断,分离颈动脉分叉部;夹闭颈总动脉,颈内动脉。将单丝尼龙线自颈外动脉剪口处插入,松开颈内动脉

血管夹,通过颈内动脉到大脑中动脉开口处,至有阻力感后再插入2 mm左右刺破willis环造成SAH,迅速将尼龙线拔出,整个过程不超过30 s。假手术组除不进线外,其余过程同模型组。以大鼠有明确的SAH或血凝块而无脑实质损害作为建模成功标准。

1.3 分组与给药

将54只SD大鼠随机分为3组:假手术组,模型组,柚皮苷组,每组18只。柚皮苷用生理药水稀释后,于SAH后0.5 h和23 h时腹腔注射,剂量80 mg·kg⁻¹。模型组给予等体积生理盐水。给药后24 h进行后续实验。

1.4 干湿重法测水肿

各组取6只大鼠过量麻醉致死,断头取脑后称重(湿重),把脑放于烤箱中烤干(110 °C, 72 h)称重(干重);脑水含量百分比=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.5 Western Blot 检测

各组另取6只大鼠过量麻醉致死,取冻存于液氮的患侧大脑皮质,称重后用组织裂解液匀浆处理;离心后取上清,BCA法测蛋白浓度,平衡蛋白浓度后变性处理;用10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转至NC膜;5%脱脂奶粉室温封闭1 h;一抗NF- κ B(1:100)4 °C孵育过夜, TBST漂洗后用过氧化物酶标记兔二抗室温孵育1 h; TBST漂洗后经Pro-light HRP化学发光检测试剂发光,用X-ray显影。

1.6 免疫荧光染色

各组另取6只大鼠过量麻醉致死,断头取脑后置于4%中性甲醛固定,常规脱水、透明、石蜡包埋和切片。石蜡切片常规脱蜡至水,蒸馏水洗净后柠檬酸微波修复15 min,自然冷却至室温, PBS洗;3%过氧化氢孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶, PBS洗;10% BSA封闭10 min;滴加一抗(GFAP)(1:50), Iba-1(1:50),放于湿盒中,4 °C孵育过夜, PBS冲洗;滴加荧光标记的二抗,37 °C孵育1 h, PBS冲洗;用DAPI复染细胞核,于荧光显微镜下观察。每例大鼠随机取6张切片,

在出血侧大脑皮质区随机选取 10 个不重叠高倍镜视野(400×), 计数阳性细胞数。

1.7 统计学分析

统计分析应用 SAS 9.1.3 统计软件数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检测采用方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮苷治疗对 SAH 后脑水肿的影响

与假手术组比较, 模型组脑组织含水量明显升高($P < 0.01$), 表明 SAH 造模成功; 与模型组比较, 柚皮苷组脑组织含水量明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 提示柚皮苷能缓解 SAH 模型大鼠的脑水肿。结果见表 1。

表 1 柚皮苷对 SAH 大鼠脑水肿的影响($n=6$)

Tab. 1 The effect of naringin on brain edema after SAH ($n=6$)

组别	含水量/%
假手术组	79.86±0.76
模型组	85.05±0.43 ¹⁾
柚皮苷组	81.98±0.22 ²⁾³⁾

注: 与假手术组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。
Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ compared with model group, ³⁾ $P < 0.05$.

2.2 柚皮苷治疗对 NF-κB 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组和柚皮苷组 NF-κB 蛋白含量均明显增多($P < 0.01$ 或 0.05); 与模型组比较, 柚皮苷组 NF-κB 蛋白含量减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 结果表明柚皮苷能抑制 SAH 引起的 NF-κB 蛋白含量的增加。结果见图 1。

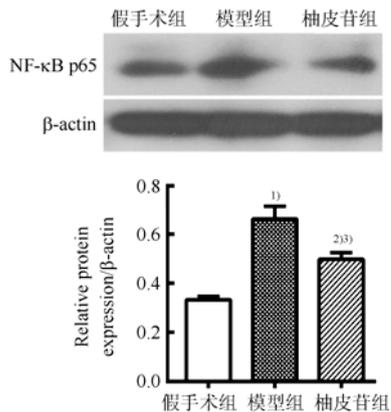


图 1 Western blot 检测柚皮苷对 SAH 后 NF-κB 蛋白表达的影响

与假手术组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 The effect of naringin on NF-κB protein after SAH by Western blot

Compared with sham group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; compared with model group, ³⁾ $P < 0.05$.

2.3 柚皮苷治疗对 SAH 大脑皮质小胶质细胞和星型胶质细胞的影响

通过组织免疫荧光标记的方法分别用 Iba-1 和 GFAP 标记小胶质细胞和星型胶质细胞, 观察柚皮苷对这 2 种细胞的影响。结果显示, 与假手术组比较, SAH 能使活化的小胶质细胞和星型胶质细胞增多, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而柚皮苷能显著抑制 SAH 引起的小胶质细胞和星形胶质细胞的激活, 即 Iba-1 和 GFAP 阳性的细胞显著减少。与模型组比较, 具有显著差异($P < 0.05$), 结果见图 2 和表 2。

表 2 柚皮苷对 SAH 后大脑皮质星型胶质细胞和小胶质细胞表达的影响

Tab. 2 The effect of naringin on the expression of GFAP and Iba-1

组别	Iba-1	GFAP
假手术组	4.67±0.45	7.08±0.36
模型组	13.32±0.83 ¹⁾	20.78±0.67 ¹⁾
柚皮苷组	8.45±0.76 ²⁾³⁾	14.45±0.56 ²⁾³⁾

注: 与假手术组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。
Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; compared with model group, ³⁾ $P < 0.05$.

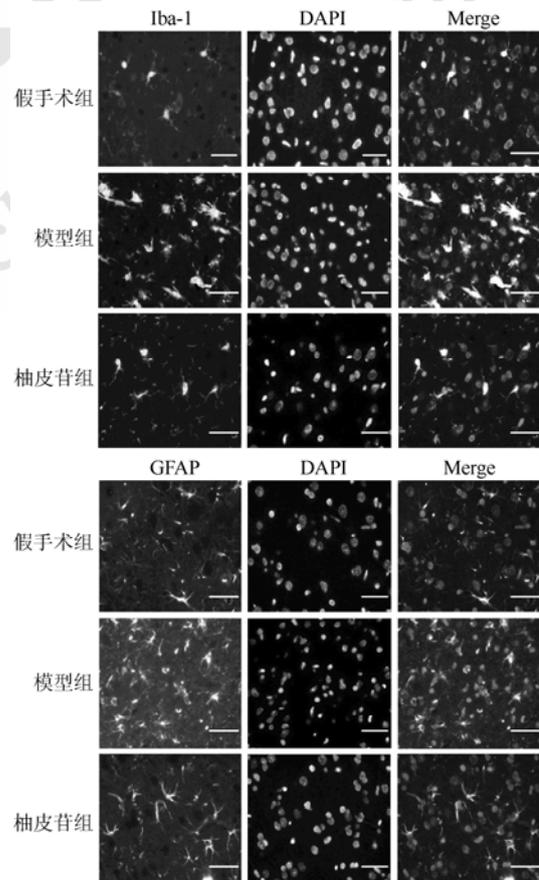


图 2 免疫荧光染色(200×)

Fig. 2 Immunofluorescence staining(200×)

3 讨论

本实验应用血管内穿刺法制备大鼠 SAH 模型, 在 SAH 后立即给予柚皮苷进行干预治疗, 发现柚皮苷能明显减轻 SAH 引起的脑水肿; 应用 Western blot 法定量 NF- κ B 蛋白发现柚皮苷能减少 NF- κ B 的表达, 进而抑制炎症反应; 同时对 Iba-1 和 GFAP 免疫荧光半定量发现柚皮苷能有效抑制 SAH 大鼠皮质小胶质细胞和星形胶质细胞的激活。

炎症反应是 SAH 后引发急性脑损伤的重要病理因素。NF- κ B 对其炎症通路下游的相关因子的表达起重要的调节作用。在正常脑组织中 NF- κ B 存在于细胞质中, 脑组织受到损伤刺激后 NF- κ B 被激活, 它就会从胞质转移至细胞核中, 介导多种炎症因子的活化, 其中包括 ICAM-1、诱导性 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 等。已有研究显示, NF- κ B 活化能调节超过 500 个炎症相关基因产物^[1]。因此, 若能有效的抑制 NF- κ B 的活化, 就能够有效的抑制 SAH 引起的炎症反应。

柚皮苷是一种可以从葡萄柚等水果中提取的类黄酮化合物, 是一种有效的自由基清除剂, 具有抗氧化和抗炎的作用, 更重要的是它能够穿越血脑屏障。Yu 等^[6]发现, 柚皮苷在脂多糖引起的人支气管上皮细胞(NHBE)损伤中, 能通过阻止 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的活化, 以抑制 TNF- α 和 IL-6mRNA 水平的表达和蛋白的分泌, 说明柚皮苷有潜在的抗炎作用。RAZA 等^[5]应用柚皮苷治疗大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤, 发现柚皮苷能明显改善大鼠神经功能, 并且能抑制 NF- κ B 介导的炎症反应发挥神经保护作用。应用柚皮苷治疗红藻氨酸引起的大鼠癫痫也发现其有抗炎作用^[7]。本研究发现, 在 SAH 模型的大鼠中, 柚皮苷通过减少 NF- κ B 的表达抑制了 SAH 后大脑皮质氧化应激反应和神经元凋亡。

已有研究发现, SAH 能引起星形细胞胶质化, 进而促使炎症因子释放和限制轴突再生; SAH 还能

引起小胶质细胞活化, 进而使 HMGB1 活化并分泌从而引发脑组织的炎症反应^[8]。本研究发现, 柚皮苷能明显的抑制星形胶质细胞和小胶质细胞的激活, 证明了柚皮苷能抑制 SAH 后脑组织炎症反应。

综上所述, 柚皮苷通过抑制 NF- κ B 的活化减少 SAH 后炎症反应, 减少星形胶质细胞和小胶质细胞的活化和脑组织水肿, 从而提供神经保护作用。该研究为探讨柚皮苷抗 SAH 作用机制及临床治疗提供实验依据。

REFERENCE

- [1] PRUNELL G F, SVENDGAARD N A, ALKASS K, et al. Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 1996, 56(5): 1082-1092. discussion 1082-1092.
- [2] ZHUANG Z, SUN X J, ZHANG X, et al. Nuclear factor-kappaB/Bcl-XL pathway is involved in the protective effect of hydrogen-rich saline on the brain following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(12): 1599-1608.
- [3] ZHANG T, SU J, GUO B, et al. Ursolic acid alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by suppressing TLR4-mediated inflammatory pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 585-591.
- [4] LIN G R. Study on enrichment and function of naringin from shaddock peel [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2014, 31(10): 1197-1202.
- [5] RAZA S S, KHAN M M, AHMAD A, et al. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-kappaB signaling pathway in experimental stroke [J]. *Neuroscience*, 2013, 230: 157-171.
- [6] YU D H, MA C, YUE Z Q, et al. Protective effect of naringenin against lipopolysaccharide-induced injury in normal human bronchial epithelium via suppression of MAPK signaling [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 195-204.
- [7] GOLECHHA M, CHAUDHRY U, BHATIA J, et al. Naringin protects against kainic acid-induced status epilepticus in rats: evidence for an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective intervention [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(3): 360-365.
- [8] MURAKAM K, KOIDE M, DUMONT T M, et al. Subarachnoid hemorrhage induces gliosis and increased expression of the pro-inflammatory cytokine high mobility group Box 1 protein [J]. *Transl Stroke Res*, 2011, 2(1): 72-79.

收稿日期: 2015-06-23