

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130908

莱菔硫烷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤炎症反应的影响

汪玲娥¹, 赵敬²

(1. 重庆钢铁公司总医院神经内科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤炎症反应的影响, 并进一步探讨其可能的机制。**方法:**利用线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 于 MCAO 后 1 h 腹腔注射 SFN 5 mg/kg。缺血 2 h, 再灌注 24 h 时, 检测大鼠神经功能缺损评分并用 TTC 染色测定脑梗死体积; 通过检测脑组织髓过氧化物酶的含量反映中性粒细胞浸润和炎症反应的程度; Western blot 检测核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及白介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达变化。**结果:**与模型组相比, 5 mg/kg SFN 治疗组均能改善大鼠缺血再灌注损伤后神经功能缺损[(2.49 $\pm$ 0.48)分 vs. (1.34 $\pm$ 0.62)分, $P=0.000$]、减少脑梗死体积[(0.41 $\pm$ 0.02)% vs. (0.26 $\pm$ 0.03)%], $P=0.000$], 降低髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的含量[(0.43 $\pm$ 0.02) U/g vs. (0.35 $\pm$ 0.02) U/g, $P=0.000$]。Western blot 的结果显示, SFN 组脑组织 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 蛋白表达与 MCAO 组比较表达明显降低, 分别为(0.39 $\pm$ 0.05) vs. (1.65 $\pm$ 0.05), $P=0.000$; (0.30 $\pm$ 0.05) vs. (0.91 $\pm$ 0.03), $P=0.000$; (0.49 $\pm$ 0.11) vs. (1.50 $\pm$ 0.03), $P=0.000$ 。**结论:**SFN 可以通过减轻炎症反应对大鼠脑缺血/再灌注损伤起神经保护作用, 其相关机制可能与其降低 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 表达有关。

【关键词】脑缺血/再灌注损伤; 莱菔硫烷; 炎症; 中风**【中国图书分类法分类号】**R 743.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-01-11

Effects of sulforaphane on inflammation of focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats

WANG Ling'e¹, ZHAO Jing²

(1. Department of Neurology, General Hospital, Chongqing Steel & Iron Corporation; 2. Teaching and Research Section of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the protective effects of sulforaphane(SFN) on inflammation of focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and its possible mechanism. **Methods:** Middle cerebral artery occlusion(MCAO) was induced by intraluminal suture. Five mg/kg SFN was administrated intraperitoneally at 60 min after MCAO. At 24 h after reperfusion, neurologic deficiency scores were detected and the infarct volume was evaluated by TTC staining. Myeloperoxidase(MPO) activities in rat brain were measured as an index of neutrophil infiltration. Expressions of nuclear factor- κ B(NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) in rat brain were determined by Western blot. **Results:** Neurological deficiency scores((2.49 $\pm$ 0.48) vs. (1.34 $\pm$ 0.62), $P=0.000$) were significantly improved, infarcted volume was diminished((0.41 $\pm$ 0.02)% vs. (0.26 $\pm$ 0.03)%, $P=0.000$) and activity of MPO in cerebral tissues((0.43 $\pm$ 0.02) U/g vs. (0.35 $\pm$ 0.02) U/g, $P=0.000$) was decreased in 5 mg/kg SFN group than in MCAO group. Results of Western blot showed that SFN could also decrease the expression of NF- κ B, TNF- α and IL-6 compared with those in MCAO group((0.39 $\pm$ 0.05) vs. (1.65 $\pm$ 0.05), $P=0.000$; (0.30 $\pm$ 0.05) vs. (0.91 $\pm$ 0.03), $P=0.000$; (0.49 $\pm$ 0.11) vs. (1.50 $\pm$ 0.03), $P=0.000$). **Conclusions:** SFN exerts the neuroprotective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through inhibiting the inflammatory response, which may be associated with the inhibition of NF- κ B, TNF- α and IL-6 expression.

【Key words】cerebral ischemia/reperfusion injury; sulforaphane; inflammation; stroke

中风是危害人类生命和健康的常见病, 死亡率及致残率高。脑缺血再灌注损伤涉及复杂的病理生理过程, 其中, 炎症反应是缺血性脑损伤的重要病理生理环节之一。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是从

十字花科植物如西兰花等中提取出来的一种异硫氰酸盐。已有的研究证实 SFN 具有抗肿瘤、抗氧化应激损伤、抗炎、免疫调节等药理作用^[1-2], 且毒副作用低, 具有很高的科学研究价值和良好的临床应用潜力。近年来的研究证实 SFN 在脑血管疾病的保护方面具有良好的应用前景。本课题组前期研究也发现 SFN 在体外可以明显减轻原代神经元氧化应激

作者介绍: 汪玲娥, Email: 153968963@qq.com,

研究方向: 脑血管疾病。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30900457)。

损伤且 5 mg/kg SFN 能明显减少缺血再灌注损伤大鼠脑梗死体积,改善神经功能缺损,具有良好的神经保护作用^[3-4]。但是 SFN 对脑缺血再灌注损伤后炎症反应影响的研究还未见报道,本研究观察 SFN 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后炎症反应的影响,并进一步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

SFN 购自美国 Sigma 公司(纯度 $\geq 97\%$),溶解于二甲基亚砜中。TTC 染料购自美国 Sigma 公司。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒购自南京建成生物技术公司。兔抗大鼠核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及白介素-6(interleukin-6, IL-6)多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 动物分组及模型的制备

250~280 g 雄性 SD 大鼠共 54 只(均购自重庆医科大学实验动物中心),应用随机对照表将动物随机分为空白对照组、大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型组(MCAO 组)及 5 mg/kg SFN 组(SFN 组)。SFN 组于 MCAO 后 1 h 腹腔注射 SFN 5 mg/kg, MCAO 组给予同体积的生理盐水。采用改良的 Longa 法^[5]制备大鼠 MCAO 模型。使用 0.26 mm 鱼线(头端覆以石蜡,使头端成球形)做为线栓。术前禁食 12 h,自由饮水。以 0.35%水合氯醛 0.1 ml/kg 腹腔注射麻醉后,分离暴露大鼠左侧颈总动脉,线栓经颈总动脉插入颈内动脉,过颈动脉分叉处继续进线感觉到阻力时说明线栓已经到位,将线栓固定在颈总动脉上,缝合切口。围手术期间采取严密消毒措施,并用红外线恒温灯将大鼠体温维持在(37.0 $\pm$ 0.5)℃。栓塞 2 h 后拔出线栓再灌注 24 h。

1.3 神经功能缺损评分

大鼠术毕清醒后,观察其行为学变化,每组 6 只。按 Zea-longa 评分标准^[6]行神经功能缺损评分,分为 5 级:0 级,无神经缺损症状;1 分:不能伸展右侧前爪;2 分:行走时向右侧转圈;3 分:行走时向右侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。

1.4 脑梗死体积的测定

采用 TTC 法检测大鼠脑梗死体积。大鼠每组 6 只,于缺血 2 h 再灌注 24 h 后断头处死,取出完整大脑行冠状切片(2 mm/片)。将脑片浸入 2% TTC 溶液,放入(37 $\pm$ 0.5)℃恒温水浴振荡器中孵育 20 min,染色后用 4%多聚甲醛固定。数码相机拍照。结果评定:正常脑组织区域为玫瑰红色,梗死组织区为苍白色。用图像分析软件 Image J(ver 1.37c, NIH)测定脑梗死体积。依照 Swanson 法计算脑梗死体积:脑梗死体积(%)=(缺血对侧半球体积-缺血侧非梗死体积)/缺血对侧半球体积 $\times 100(\%)$ 。

1.5 测定脑组织中中性粒细胞浸润的程度

MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志,通过检测 MPO 的活性可反应中性粒细胞的浸润程度。大鼠每组 6 只,

于缺血 2 h 再灌注 24 h 后断头处死,取大鼠缺血侧脑组织在冰上剪成碎片,迅速、充分匀浆,离心后,按试剂盒说明书步骤操作,计算 MPO 活性。

1.6 脑组织总蛋白的提取

于缺血 2 h 再灌注 24 h 后处死大鼠,取端脑,分开左右半球,迅速放入液氮,-80℃保存备用。在玻璃匀浆器中放入缺血侧端脑(150 mg),加入 500 μ l 预冷的蛋白裂解液,冰上操作,迅速、充分匀浆 20~40 次,直到 95%的细胞被破碎。将匀浆液于 4℃,12 000 r/min 离心 15 min。收集上清液,即得到组织总蛋白产物。采用 Bradford 法测定蛋白浓度后,-80℃保存备用。

1.7 Western blot 检测 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 的表达

准备等量的上述蛋白,加入等量的 2 $\times$ 上样缓冲液,100℃煮沸变性后上样行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,采用半干式转移法将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上。10%脱脂牛奶/TBS 4℃封闭过夜,更换 5%脱脂牛奶/TBS 稀释的一抗(兔抗鼠 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 多抗,1:1 000;兔抗鼠 β -actin 单抗,1:1 000),室温 2 h。TBST 漂洗 10 min,3 次。加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000),室温 1 h。TBST 漂洗 10 min,3 次。ECL 进行化学发光检测后压片曝光。

1.8 统计学处理

应用 SPSS16.0 软件进行统计分析。大鼠神经功能评分数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,脑梗死体积经平方根反正弦后用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析进行,组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 SFN 对大鼠脑缺血再灌注后神经功能损伤和脑梗死体积的影响

如表 1 所示,与 MCAO 组大鼠相比,SFN 组能够明显降低大鼠缺血再灌注损伤后神经功能损伤($P<0.05$)。TTC 染色显示,空白对照组未见梗死灶,脑缺血/再灌注损伤 24 h 后大鼠脑梗死体积明显增加(0.41 $\pm$ 0.02),而 5 mg/kg SFN 处理后,脑梗死体积较明显减小(0.26 $\pm$ 0.03),与 MCAO 组相比,SFN 组差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 SFN 对大鼠脑缺血再灌注后神经功能评分及脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.1 Effects of SFN on neurological deficiency scores and infarcted volume after cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	神经功能评分(分)	脑梗死体积(%)
空白对照组	0	0
MCAO 组	2.49 $\pm$ 0.48 ^a	0.41 $\pm$ 0.02 ^a
SFN 组	1.34 $\pm$ 0.62 ^{ab}	0.26 $\pm$ 0.03 ^{ab}
F 值	64.6	296.7
P 值	0.000	0.000

注:a,与空白对照组比较, $P=0.000$;b,与 MCAO 组比较, $P=0.000$

2.2 SFN 对大鼠脑缺血再灌注损伤中性粒细胞浸润的抑制作用

如表 2 所示,空白对照组 MPO 活性很低(0.14 ± 0.03) U/g,大鼠脑缺血再灌注损伤 24 h 后,缺血脑组织 MPO 活性明显增高(0.43 ± 0.02) U/g,而 5 mg/kg SFN 处理后可减轻缺血脑组织 MPO 的活性(0.35 ± 0.02) U/g,即抑制脑组织中中性粒细胞的浸润,与 MCAO 组相比,SFN 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 SFN 对大鼠脑缺血再灌注损伤中性粒细胞浸润的作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

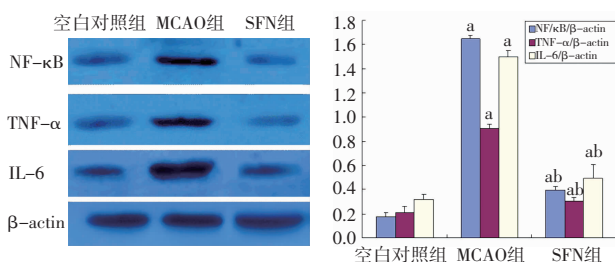
Tab.2 Effects of SFN on neutrophil infiltration after cerebral ischemia/reperfusion in rat ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MPO 活性 (U/g)
空白对照组	0.14 ± 0.03
MCAO 组	0.43 ± 0.02^a
SFN 组	0.35 ± 0.02^{ab}
F 值	343.6
P 值	0.000

注:a,与空白对照组比较, $P=0.000$;b,与 MCAO 组比较, $P=0.000$

2.3 SFN 对脑缺血再灌注后 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 蛋白表达的影响

Western blot 的结果显示,空白对照组 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 蛋白表达分别为 0.18 ± 0.03 、 0.21 ± 0.03 、 0.31 ± 0.03 。而 5 mg/kg SFN 处理后,脑组织 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 蛋白表达分别为 0.39 ± 0.05 、 0.30 ± 0.05 、 0.49 ± 0.11 ,与 MCAO 组的 1.65 ± 0.05 、 0.91 ± 0.03 、 1.50 ± 0.03 相比,表达明显降低。单因素方差分析 F 值分别为 1 144.2、714.9、2 102.7,差异均有统计学意义($P=0.000$)。图 1 所示。



a,与空白对照组相比, $P<0.05$;b,与 MCAO 组相比, $P<0.05$

图 1 SFN 对脑缺血再灌注后 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of SFN on expression of NF- κ B, TNF- α and IL-6 after cerebral ischemia/reperfusion

3 讨论

脑缺血再灌注损伤涉及一系列复杂的病理生理过程,主要包括线粒体能量代谢障碍、兴奋性氨基酸毒性作用、钙超载、氧化应激损伤、炎症反应、神经元迟发性凋亡等。其中炎症反应在脑缺血再灌注损伤机制中担负着重要角色。目前,脑缺血再灌

注损伤后抑制炎症反应的发生也是神经保护的重要方向,大量实验证实,脑缺血后的炎症反应是造成脑组织继发性损伤的因素之一,它可与其他因素相互作用,共同加重再灌注损伤^[6]。目前临床上尚未有明确有效具有抗炎作用的神经保护剂应用,因此,寻找有效、低毒的具有抗炎作用神经保护剂也是目前努力的方向。

SFN 广泛存在于十字花科植物中,在西兰花中含量最多,自然资源极其丰富且具有多种药理学活性,其中其抗炎及抗氧化作用更是受到广泛关注。本课题前期研究证实 2.5、5.0、10.0 mg/kg SFN 均能改善大鼠的神经行为缺损症状和减少大鼠脑梗死体积。其中 SFN 5 mg/kg 减少大鼠脑梗死体积最明显,当给药剂量的增加到 10 mg/kg 时虽仍有脑保护作用,但减少脑梗死体积作用弱于 SFN 5 mg/kg^[4]。本课题组认为 5 mg/kg 为筛选药浓度中的最佳有效给药浓度,因此该研究中直接选择了此浓度来探讨其抗炎作用及其机制。本研究也证实了 SFN 能够明显减轻再灌注损伤后的缺血区中性粒细胞的浸润,提示其能通过抗炎实现其神经保护作用,进一步探讨了其抗炎作用的机制。

已有研究证实,在脑缺血再灌注损伤过程中, NF- κ B 在缺血损伤后的神经细胞中会持续活化,并通过激活其它信号通路诱导多种炎症相关基因的表达如 TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 和 IL-12,干扰素- γ 等,进而诱导炎症反应的发生,加重脑缺血损伤^[7]。其中 TNF- α 在脑缺血早期生成的增加是脑梗塞形成的主要原因^[8]。IL-6 对于多种细胞的生长、分化与调控都有影响,其过度表达与缺血性脑损伤密切相关。缺血再灌注大鼠与临床卒中患者的中枢神经系统均可以产生 IL-6,其表达水平的高低是评价缺血再灌注损伤程度的一个重要指标^[9]。本研究证实 SFN 能够明显降低脑缺血后 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 蛋白表达水平,提示其抗炎作用可能与此有关。

综上所述,SFN 具有抵抗脑缺血再灌注损伤后炎症反应的作用,其机制可能与降低 NF- κ B、TNF- α 以及 IL-6 表达有关。而关于其对于缺血性脑损伤炎症反应的影响,本研究只是做了一些初步的研究,有关其调控的机制尚有待今后进一步拓宽与深化。

参考文献

- [1] Lin W, Wu R T, Wu T, et al. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130909

三七、黄连、骨碎补凝胶对牙周骨缺损再生疗效的实验研究

左 燕¹, 刘国良¹, 钟晓波¹, 黄孝庆²

(1. 重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科、重庆市口腔疾病与生物医学研究中心, 重庆 400015;

2. 重庆医科大学附属口腔医院牙周黏膜科, 重庆 400015)

【摘要】目的:探讨三黄补凝胶对实验性大鼠牙周骨开窗缺损牙周再生修复的作用。**方法:**选取 SD 雄性大鼠 36 只制备下颌骨磨牙区的牙周骨开窗缺损模型, 将其配对分组为含三七总皂苷、小檗碱、骨碎补柚皮苷 3 种中药的壳聚糖凝胶组和不含中药的壳聚糖凝胶组以及空白对照组。分别于术后 14 d ($n=18$) 和 28 d ($n=18$) 处死大鼠, 取术区组织, HE 染色, 显微镜下观察新生骨形成的情况。**结果:**术后 14 d 和 28 d 载药凝胶组新生牙槽骨面积明显大于空白凝胶组和空白对照组且均有统计学差异 ($P=0.000$); 空白凝胶组新生牙槽骨面积大于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。**结论:**三黄补凝胶能促进牙槽骨的生长, 有利于牙周组织的再生修复。

【关键词】三七总皂苷; 小檗碱; 骨碎补柚皮苷; 牙周骨开窗**【中国图书分类法分类号】**R781.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-12-20Study of the chitosan thermosensitive hydrogel loading *Drynaria Rhizome*, *Coptis chinensis* and *Panax notoginseng* in experimental regeneration of periodontal defectZUO Yan¹, LIU Guoliang¹, ZHONG Xiaobo¹, HUANG Xiaoqing²

(1. Department of Endodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University; Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science; 2. Department of Periodontology, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To discuss the effect of the chitosan thermosensitive hydrogel loading *Drynaria Rhizome*, *Coptis chinensis* and *Panax notoginseng* (sanhuangbu) on the repair of periodontal defects. **Methods:** Totally 36 male SD rats were enrolled and periodontal fenestration model in mandibular molar area was prepared. Then all rats were divided into three groups in matched pair: group filled with chitosan thermosensitive hydrogel loading sanhuangbu (hydrogel and medicine group), group filled with nothing or filled only with

作者介绍: 左 燕, Email: 1215131810@qq.com,

研究方向: 牙周病学。

通信作者: 刘国良, Email: lgl_cq@sina.com。

基金项目: 重庆市卫生局科研资助项目 (编号: 2006-B-47)。

pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(8): 967-973.

[2] Soane L, Li Dai W, Fiskum G, et al. Sulforaphane protects immature hippocampal neurons against death caused by exposure to hemin or to oxygen and glucose deprivation[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(6): 1355-1363.

[3] 吴雪梅, 巫静娴, 喻姗姗, 等. 莱菔硫烷对神经元氧糖剥夺/复氧损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(18): 1907-1911.

Wu X M, Wu J X, Yu S S, et al. Protective effect of sulforaphane on oxygen glucose deprivation (OGD)/reoxygenation injury[J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(18): 1907-1911.

[4] 李 澜, 喻姗姗, 李玲玉, 等. 莱菔硫烷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(4): 301-304.

Li L, Yu S S, Li L Y, et al. Protective effect and mechanism research of sulforaphane on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Jour-

nal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2012, 29(4): 301-304.

[5] Longa E Z, Weinstein P R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[6] Chen B, Liao W Q, Xu N, et al. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action[J]. Brain Res, 2009, 1273(4): 129-137.

[7] Ridder D A, Schwanninger M. NF- κ B signaling in cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2009, 158(3): 995-1006.

[8] Clark I A, Allea L M, Vissel B, et al. The roles of TNF in brain dysfunction and disease[J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(3): 519-548.

[9] Suzuki S, Tanaka K, Nagata E, et al. Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils[J]. Neurosci Lett, 1999, 262(2): 117-120.

(责任编辑: 冉明会)