

二氢杨梅素对小鼠急性脑缺血缺氧的保护作用*

韦坤璇¹, 邓之婧², 甘露², 庞逸敏², 何萍^{2△}, 郭哲^{3△}

(1. 广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021; 2 广西医科大学实验动物中心, 南宁 530021; 3. 广西医科大学第三附属医院, 南宁 530031)

摘要 目的:研究二氢杨梅素(DMY)对小鼠急性脑缺血缺氧的保护作用。**方法:**将雄性昆明小鼠随机分为空白对照组(或假手术组)、DMY高剂量组、DMY低剂量组和金纳多组,必要时设模型组,每组30只。DMY高、低剂量组分别灌胃DMY 500 mg/kg、250 mg/kg, 1次/d,共10 d。末次给药1 h后,采用小鼠断头实验,观察DMY对断头后小鼠喘气时间和喘气次数的影响;小鼠常压耐缺氧实验,观察DMY对小鼠存活时间、耗氧量和耗氧率的影响;小鼠结扎双侧颈总动脉实验,观察DMY对小鼠存活时间的影响。**结果:**与空白对照组或模型组比较,DMY高、低剂量可明显延长小鼠断头后喘气时间和喘气次数,降低常压缺氧小鼠耗氧率并延长双侧颈总动脉结扎小鼠的存活时间($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);此外,DMY高剂量还可延长常压缺氧小鼠存活时间($P < 0.05$)。**结论:**DMY对小鼠急性脑缺血缺氧具有一定的保护作用。

关键词 二氢杨梅素;急性脑缺血缺氧;小鼠

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2017)03-0347-04

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.03.006

Protective effect of dihydromyricetin on acute cerebral hypoxia-ischemia in mice

Wei Kunxuan¹, Deng Zhijing², Gan lu², Pang Yiming², Huang Xiaoliang², He Ping², Guo Zhe³. (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Laboratory Animal Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. The 3th Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China)

Abstract Objective: To study the protective effect of dihydromyricetin (DMY) on acute cerebral hypoxia-ischemia in mice. **Methods:** Male Kunming mice were randomly divided into control or sham group, high- and low-dose DMY group, ginaton group and model group. The mice in the high- and low-dose DMY group were administered 500 mg/kg and 250 mg/kg DMY respectively via intragastric gavage for 10 days. 1 h after the last administration, the gasping time and number of beheaded mice, survival time, oxygen consumption ratio in hypoxia tolerance mice, and survival time in bilateral carotid artery ligation (BCAO) mice were observed. **Results:** High- and low-dose DMY could significantly increased the gasping time and gasping number of beheaded mice, prolonged the oxygen consumption ratio of hypoxia tolerance mice and the survival time of BCAO mice. High-dosage of DMY also could prolong the surviving time of hypoxia tolerance mice. **Conclusion:** DMY exerts a protective effect on acute cerebral hypoxia-ischemia in mice.

Keywords dihydromyricetin; acute cerebral ischemia and hypoxia; mice

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81360056); 广西自然科学基金资助项目(No. 2012GXNSFCA053005; No. 2013GXNSFAA019147); 南宁市科学研究与技术开发计划项目(No. 20153105)

△通信作者

收稿日期:2016-11-18

在所有脑血管病中,约有80%是缺血性脑血管病。缺血性脑血管病具有发病率高、病死率高、复发率高、致残率高的特征,是三大严重威胁人类健康的疾病之一,并且在我国居民死亡原因中排名第二^[1],研究与开发抗缺血缺氧性脑血管疾病药物已成为药学工作者的当务之急。二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)是我国广西壮族自治区和湖南省的壮

族、瑶族民间习用草药藤茶的主要活性成分,含量高达 27%,具有抗炎、保肝护肝、降血脂、防癌抗癌、抗高血压、降血糖、清除自由基、抗氧化等多种药理生理活性,资源容易获得,价格便宜,毒性低,近年来逐渐被国内研究人员所关注^[2]。研究报道,DMY 对结扎大鼠双侧颈总动脉致全脑缺血引起的脑水肿具有抑制作用^[3]。本课题组前期研究发现,DMY 对大脑中动脉栓塞引起的小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[4]。本实验通过小鼠断头实验、常压耐缺氧实验、结扎双侧颈总动脉实验,进一步研究 DMY 对小鼠急性脑缺血缺氧的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 DMY,原料药,纯度 98.33% (开来生物工程有限公司,批号:K130311);银杏叶提取物片(金纳多,EGB),40 mg×20 片(德国威玛舒培博士药厂,批号:5961013);异氟烷(瑞沃德生命科技有限公司,批号:217151201)。DMY 及 EGB 临用前用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成混悬液。

1.1.2 主要仪器设备 XTZ-D 解剖显微镜(上海光学五厂);R580 小动物麻醉机(瑞沃德生命科技有限公司);测氧仪(广西医科大学实验生理学教研室自制)。

1.1.3 实验动物 SPF 级健康雄性昆明小鼠,体重 25~30 g,由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(桂)2014-0002。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药 将雄性昆明小鼠随机分为空白对照组(或假手术组)、DMY 高剂量组、DMY 低剂量组和 EGB 组,必要时设模型组,每组 30 只。DMY 高、低剂量组按 10 mL/kg 持续灌胃 DMY 500 mg/kg、250 mg/kg,1 次/d,共 10 d;EGB 组同期灌胃 EGB 40 mg/kg;空白对照组(或假手术组)和模型组同期灌胃给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠。

1.2.2 小鼠断头致急性全脑缺血缺氧实验 随机取空白对照组、DMY 高剂量组、DMY 低剂量组和 EGB 组小鼠,每组 10 只,末次给药 1 h 后,迅速用大剪刀在小鼠的耳后 2 mm 处断头,造成全脑处于缺

血缺氧状态,观察记录断头后小鼠喘气次数变化和 小鼠张口喘气时间。

1.2.3 常压耐缺氧实验 随机取空白对照组、DMY 高剂量组、DMY 低剂量组和 EGB 组小鼠,每组 10 只,末次给药 1 h 后,将小鼠置于 250 mL、内盛适量钠石灰的广口玻璃瓶内,用凡士林密封瓶口。该瓶口与自制测氧仪相连橡皮塞连接。观察各组小鼠在缺氧密闭条件下的存活时间,使用测氧仪测定装置内耗氧量并按下式计算耗氧率。

$$\text{耗氧率}(\text{mL}/\text{min} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{总耗氧量}(\text{mL})}{\text{体重}(\text{g}) \times \text{存活时间}(\text{min})}$$

1.2.4 小鼠结扎双侧颈总动脉实验 随机取假手术组、模型组、DMY 高剂量组、DMY 低剂量组和 EGB 组小鼠,每组 10 只,末次给药 1 h 后,于体视显微镜下行双侧颈总动脉结扎术,具体步骤如下:小鼠异氟烷吸入性麻醉后,仰卧固定,解剖显微镜下行颈部正中切口,用显微镊分离结扎双侧颈总动脉,期间应注意避免牵拉、损伤迷走神经。缝合切口后停止异氟烷吸入,动物在 1~2 min 内苏醒,苏醒后单独置于饲养笼中;假手术组只分离双侧颈总动脉但不结扎。观察记录每组小鼠结扎双侧颈总动脉后存活时间,超过 1 h 死亡者,其存活时间均记为 60 min。

1.3 统计学方法 实验数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DMY 对小鼠断头实验的影响

与空白对照组相比,DMY 高、低剂量组及 EGB 组小鼠的喘息时间和喘气次数均明显延长($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见表 1。

2.2 DMY 对小鼠常压缺氧实验的影响

各组动物体重无明显差异($P > 0.05$)。与空白对照组相比,DMY 高剂量组和 EGB 组小鼠的存活时间明显延长($P < 0.05$);各组耗氧量虽无明显差异($P > 0.05$),但 DMY 高、低剂量组及 EGB 组耗氧率均较空白对照组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2。

表1 DMY对断头小鼠喘息时间与喘息次数影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	体重/g	喘息时间/s	喘息次数/次
空白对照组	26.71±2.72	16.16±2.67	11.2±3.33
DMY高剂量组	27.50±2.42	20.99±4.05**	15.4±3.60*
DMY低剂量组	25.65±3.03	19.20±3.65*	14.60±3.69*
EGB组	25.06±1.73	19.61±3.30*	15.10±4.12*

与空白对照组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

表2 DMY对常压缺氧小鼠的存活时间、耗氧量和耗氧率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	体重/g	存活时间/min	耗氧量/mL	耗氧率/ (mL/min·g ⁻¹)
空白对照组	27.03±2.12	8.21±1.66	8.80±1.14	0.041±0.008
DMY高剂量组	27.70±2.04	10.10±2.24*	8.05±1.12	0.030±0.008**
DMY低剂量组	28.05±2.90	9.16±1.03	8.20±1.16	0.033±0.008*
EGB组	26.95±1.77	9.79±1.52*	8.40±1.26	0.032±0.006*

与空白对照组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

2.3 DMY对小鼠结扎双侧颈总动脉实验的影响

与模型组相比,DMY高、低剂量及EGB组均明显延长了双侧颈总动脉结扎小鼠的存活时间(均 $P < 0.01$),见表3。

表3 DMY对小鼠双侧颈总动脉结扎致全脑缺血小鼠存活时间的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	体重/g	存活时间/min
假手术组	25.60±1.84	60.00±0.00
模型组	26.44±1.93	21.30±4.67#
DMY高剂量组	25.50±1.65	54.10±13.91**
DMY低剂量组	26.70±2.11	48.40±13.43**
EGB组	25.64±2.36	51.50±12.99**

与假手术组比较,# $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

3 讨论

脑缺血是一种脑软化或局限性脑组织缺血性坏死的疾病,主要由脑部血流供应不足,引起缺氧和缺血所致^[5]。抗整体小鼠缺血缺氧实验是筛选治疗心脑血管组织因缺血缺氧引起功能障碍的常用方法^[6]。本研究采用小鼠断头实验、常压耐缺氧实验、结扎双侧颈总动脉实验等脑缺血缺氧模型,观察DMY在脑部缺血缺氧状态下,对脑部的保护作用。本研究选择雄性小鼠进行实验,因雌性与雄性小鼠体内的激素水平有差异,而双性别会给实验增加不必要的影响因素而干扰结果,影响结论。此外,有研究显示,雌激素对脑缺血损伤具有保护作用,而雄激素可加剧缺血损伤引发的氧化应激和炎症反应^[7]。缺氧会导致机体代谢,特别是氧化、供能方面,使重要器官

呈现缺氧供能不足,进而发生死亡。在小鼠常压耐缺氧实验中,常压密闭缺氧为非特异性缺氧,在密闭容器中小鼠由于缺氧,以及体内二氧化碳和酸性代谢产物的蓄积,最终导致脑组织死亡的发生。本实验结果显示,DMY可降低常压缺氧小鼠耗氧率并延长常压缺氧小鼠存活时间($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明其能改善组织代谢,降低耗氧量而保护缺血脑组织。

小鼠断头之后,其脑部血液供应完全中断,在脑组织能量耗竭之前,小鼠继续维持张口喘息动作一段时间,直至脑内能量耗竭,喘息动作便停止。该模型建模简单、经典,便于观察,容易获得,许多研究均采用这一模型来完成^[8]。本实验结果表明,DMY可明显增加小鼠断头后喘气次数,延长喘气时间($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明其可降低脑组织耗氧量,增强神经细胞缺氧耐受力,脑组织缺血缺氧后,对脑功能的维持有一定的作用。结扎小鼠双侧颈总动脉造成全脑不完全性缺血已成为脑缺血实验的常用动物模型,具有成功率高,缺血指标的观察明确、简单,并且可以根据实验需要,通过结扎双侧颈总动脉的时间长短而控制脑缺血的程度的优点^[9]。本实验结果显示,DMY能明显地延长小鼠存活时间($P < 0.01$),对脑缺血具有一定保护作用。

综上所述,DMY在小鼠断头实验、常压耐缺氧实验及结扎双侧颈总动脉实验等急性脑缺血缺氧实验中均提示DMY对急性脑缺血缺氧小鼠有一定的保护作用,且高、低剂量DMY在这3种实验情况下的抗脑缺血缺氧效果与EGB相当($P > 0.05$),其具体机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张振强,宋军营,贾亚泉. 缺血性脑血管疾病研究进展[J]. 河南大学学报(医学版),2003,31(4):66-69.

[2] 朱哲,杨悟新,强烈应,等. 二氢杨梅素研究进展[J]. 武警医学院学报,2011,20(7):600-604.

[3] 覃潇,韦玉娜. 二氢杨梅素活血化痰作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2011,18(1):36-38.

[4] 邓之婧,陈永畅,柯晶晶,等. 二氢杨梅素对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理,2015,5(26):299-302.

[5] KULIK T,KUSANO Y,ARONHIME S,et al. Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain[J]. Neuropharmacol,2008,55(3): 281-288.

[6] 王晓炜,郑俊霞,魏小龙,等. 抗缺氧药物的研究进展[J]. 中国现代药物应用,2009,3(21):187-189.

[7] 郭淑娟,王琮民. 雌、雄性大鼠局灶性脑缺血-再灌注早期脑损伤的研究[J]. 贵阳医学院学报,2016,41(2): 166-169.

[8] AIMS NR,FINEGAN JM,BLASS JP. Effects of post-decapitative ischemia on mitochondrial respiration in brain tissue homogenate[J]. J Neurochem 1986,47(2): 506-511.

[9] 张綦慧,张允岭,陈志刚,等. 脑缺血动物模型研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(8):1618-1620.

(本文编辑:王春苗)

广西医科大学学报 2017 Mar;34(3)

枸杞多糖联合替莫唑胺对大鼠脑胶质瘤的作用及机制研究

李晓飞,刘劲睿,廉晓宇,王德超,张明石[△]

(佳木斯大学附属第一医院神经外科,绥棱 154001)

摘要 目的:探讨枸杞多糖(LBP)联合替莫唑胺(TMZ)治疗对大鼠脑胶质瘤的作用机制。**方法:**将SD大鼠分为空白对照组、模型组、TMZ组和LBP+TMZ组,除空白对照组外,其他3组分别于颅内接种C6脑胶质瘤细胞。TMZ组给予TMZ灌胃,LBP+TMZ组给予TMZ及LBP分别灌胃,空白对照组和模型组给予等量生理盐水。各组干预28d后测量肿瘤体积,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清白介素-17(IL-17)水平,RT-PCR检测Foxp3 mRNA相对表达量,流式细胞术检测C6脑胶质瘤组织Th17、Treg细胞比率。体外培养C6脑胶质瘤细胞,分为模型组、TMZ组和LBP+TMZ组,培养72h后检测细胞上清液IL-17水平和细胞Foxp3 mRNA相对表达量。**结果:**治疗后,LBP+TMZ组的肿瘤体积显著小于TMZ组($P < 0.05$)。LBP+TMZ组IL-17水平显著低于TMZ组($P < 0.05$)。LBP+TMZ组Foxp3 mRNA相对表达量较模型组、TMZ组显著降低($P < 0.05$)。LBP+TMZ组Treg细胞比率较TMZ组减少($P < 0.05$),Th17/Treg比值显著高于模型组和TMZ组($P < 0.05$)。**结论:**LBP联合TMZ可有效抑制大鼠脑胶质瘤,其机制可能与调节免疫细胞Th17、Treg的表达有关。

关键词 脑胶质瘤;枸杞多糖;替莫唑胺;T细胞

中图分类号:R739.41 **文献标志码:**A **文章编号:**1005-930X(2017)03-0350-05

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.03.007

The effects and mechanisms of combined lyceum bararum polysaccharides with temozolomide on brain glioma in rats

Li Xiaofei, Liu Jinrui, LianXiaoyu, Wang Dechao, Zhang Mingshi. (Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Suileng 154001, China)

Abstract Objective: To explore the effects and mechanisms of combined lyceum bararum polysaccharides (LBP) with temozolomide (TMZ) on brain glioma in rats. **Methods:** SD rats were divided into 4 groups: a control group, a model group, a TMZ

[△]通信作者,E-mail:heilongjianglxf@163.com

收稿日期:2016-09-01