

• 论著 •

芹菜素对大鼠急性脑缺血损伤的干预作用及机制研究

刘 焯, 涂丰霞, 陈 翔, 林晓燕, 张 浣, 梁艳苓

(温州医学院附属第二医院暨育英儿童医院康复中心和脑科中心, 浙江 温州 325000)

【摘要】 目的 探讨芹菜素在大鼠急性局灶性脑缺血/再灌注(I/R)损伤中的抗炎作用及意义。方法 将SD大鼠随机分为假手术组、模型组和芹菜素组,后两组按再灌注时间分为0.5h组和4h组,每组8只。采用改良大脑中动脉线栓法建立急性局灶性大鼠脑I/R模型;分别用于湿法和甲酰胺浸泡法定量测定各组大鼠脑组织含水量及伊文思蓝(EB)含量,用酶联免疫吸附法(ELISA)和比色法测定脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量以及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)活性。结果 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织含水量、EB含量及TNF- α 、IL-1 β 含量、iNOS活性均显著升高,并与时间呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。芹菜素组各时间点脑组织含水量、EB含量及TNF- α 、IL-1 β 含量、iNOS活性均较模型组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 芹菜素对急性局灶性脑I/R损伤的保护作用可能与抑制TNF- α 启动的炎症反应有关。

【关键词】 芹菜素; 缺血/再灌注损伤; 脑; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 诱生型一氧化氮合酶
中图分类号:R965;R743.3 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.017

Study on interventional effect of apigenin on acute cerebral ischemia injury in rats LIU Chan, TU Feng-xia, CHEN Xiang, LIN Xiao-yan, ZHANG Shuang, LIANG Yan-ling. The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China
Corresponding author: CHEN Xiang, Email: chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the anti-inflammatory effects of apigenin on rats with acute transient focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. Methods Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham-operated, model and apigenin-treated groups; each of the latter two groups was subdivided into 0.5 hour-reperfusion and 4 hour-reperfusion groups (each, $n=8$). The model of acute transient focal cerebral I/R was established by a modified method of creating cerebral artery thrombosis, inserting a nylon thread into the middle cerebral artery to let it stay there for 2 hours and then withdraw it from the artery. In these groups, brain water content and Evans blue (EB) content were measured quantitatively with wet and dry weight method and formamide immersion method respectively. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) of the brain in these rats were assayed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and chromometry respectively. Results The brain contents of water, EB, TNF- α , IL-1 β and the activity of iNOS in the model group were significantly higher than those in the sham-operated group; in the brain of model group, there were close positive correlations between the contents of TNF- α , IL-1 β , the activity of iNOS and the contents of brain water or EB respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The brain contents of water, EB, TNF- α , IL-1 β and the activity of iNOS in apigenin-treated group were obviously lower than those in the model group at each time point ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion Apigenin may play an important neuroprotective role in rats with acute transient focal cerebral I/R injury; the mechanism is probably related to the inhibition of TNF- α initiating inflammatory reaction.

【Key words】 apigenin; cerebral ischemia/reperfusion injury; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β ; inducible nitric oxide synthase

急性脑缺血是威胁人类健康的常见疾病,可导致瘫痪、失语、记忆丧失等严重后果,直接原因是供

基金项目:浙江省教育厅项目资助(20020448),浙江省温州市科技局国际合作项目(H20070034)

通信作者:陈翔,Email:chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

作者简介:刘焯(1980-),女(汉族),浙江人,硕士研究生,医师,Email:nastified@sohu.com.

应特定脑组织区域的血流被阻断或减少。溶栓治疗能使阻塞的血管再通,但血管再通却可导致脑缺血/再灌注(I/R)损伤的发生,又可加重神经细胞的损伤甚至死亡^[1]。芹菜素是一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于多种水果、蔬菜、豆类和茶叶中,因其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用而备受关注。研究发

现,急性脑 I/R 损伤时存在广泛的细胞因子介入,其促发的免疫炎症反应对缺血脑组织有损伤作用^[2]。本研究中通过观察芹菜素对急性局灶性脑 I/R 模型大鼠炎症介质的影响,进一步探讨芹菜素对急性脑 I/R 损伤的神经保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组:清洁 I 级健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重(250±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号 SCXK[(沪)2003-0003]。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组和芹菜素组,后两组再分为再灌注 0.5 h 和 4 h 两个亚组,每组 8 只。芹菜素组于制模前 24 h 和再灌注即刻分别腹腔注射芹菜素 25 mg/kg;假手术组、模型组给予等量生理盐水。处死大鼠前 0.5 h 经阴茎背静脉注射质量分数为 3% 的伊文思蓝(EB)2 ml/kg。

1.2 动物模型制备及标本采集:参照 Longa 等^[3]报道的线栓法进行改良,制备大鼠急性大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,分别于栓塞后 0.5 h 和 4 h 时将栓线拉出进行再灌注。假手术组只将栓线插到颈内、外动脉的分叉处,不栓塞。各组动物观察至规定时间点后用颈椎脱臼法处死,断头开颅,经纵裂切分为左右半球,将左侧大脑半球(I/R 侧或假手术侧)以视交叉和脚间窝两个冠状面为切面分为前、中、后三部分,前部检测脑 EB 含量,后部检测脑含水量,中间部分制备成匀浆后取上清液,检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)含量及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)活性。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 脑含水量检测:采用干湿重法的 Elliott 公式计算脑含水量^[4]。

1.3.2 脑 EB 含量检测:采用甲酰胺浸泡法定量测定。取 I/R 侧或假手术侧大脑半球前部脑组织,称重后加入甲酰胺 3 ml,经 37 °C 水浴孵育 48 h 后,吸出上清液测其吸光度(A)值,蒸馏水作为空白对照,按标准曲线计算 EB 含量(μg/g)。

1.3.3 脑组织 TNF-α、IL-1β 含量检测:采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测,按 TNF-α、IL-1β ELISA 检测试剂盒说明书进行操作,试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3.4 脑组织 iNOS 活性检测:采用比色法检测,按 iNOS 活性试剂盒说明书进行操作,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 统计学分析:采用 SPSS 11.5 软件。检测结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据进行正态性

检验,组间比较采用单因素方差分析,两变量的相关采用直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑含水量变化(表 1):模型组与芹菜素组脑含水量均明显高于假手术组(P 均 < 0.01),且模型 4 h 组较 0.5 h 组增高更显著($P < 0.05$);芹菜素 0.5 h 和 4 h 组均较模型组同期明显降低,差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。

表 1 各组大鼠脑组织含水量和 EB 含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	脑含水量(%)	脑 EB 含量(μg/g)
假手术组	8	78.93±0.58	5.59±0.83
模型 0.5 h 组	8	81.89±1.16 ^b	6.57±0.94
模型 4 h 组	8	82.75±1.10 ^{bd}	11.96±1.39 ^{bc}
芹菜素 0.5 h 组	8	80.19±0.53 ^{bc}	5.86±0.75
芹菜素 4 h 组	8	80.76±0.41 ^{bc}	10.27±1.23 ^{bc}

注:与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较,^c $P < 0.01$;与本组 0.5 h 比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$

2.2 脑 EB 含量变化(表 1):模型 4 h 组与芹菜素 4 h 组脑 EB 含量均明显高于假手术组,而芹菜素 4 h 组明显低于模型 4 h 组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01);且模型 4 h 和芹菜素 4 h 组 EB 含量均较相应 0.5 h 组明显增高,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。

2.3 脑组织 TNF-α 含量变化(表 2):模型 0.5 h、4 h 组和芹菜素 4 h 组脑组织 TNF-α 含量明显高于假手术组,且以模型 4 h 组增高更为显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);芹菜素 0.5 h 和 4 h 组均较模型组同期明显降低,差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。

表 2 各组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β 含量及 iNOS 活性变化($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TNF-α(ng/g)	IL-1β(ng/g)	iNOS(U/mg)
假手术组	8	3.47±0.82	5.13±0.90	5.62±0.95
模型 0.5 h 组	8	5.81±1.19 ^b	5.72±0.54	6.44±0.68
模型 4 h 组	8	6.98±1.02 ^{bd}	9.45±1.16 ^{bc}	13.76±2.50 ^{bc}
芹菜素 0.5 h 组	8	4.06±1.19 ^c	5.54±0.74	5.43±0.63
芹菜素 4 h 组	8	4.81±1.20 ^{bc}	6.32±0.68 ^{bc}	10.17±2.71 ^{bc}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较,^c $P < 0.01$;与本组 0.5 h 比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$

2.4 脑组织 IL-1β 含量变化(表 2):模型 4 h 及芹菜素 4 h 组脑组织 IL-1β 含量均明显高于假手术组,且芹菜素组明显低于模型组,差异有统计学意义(P 均 < 0.01);且模型 4 h 组较 0.5 h 组增高显著($P < 0.01$)。

2.5 脑组织 iNOS 活性变化(表 2):模型 4 h 组及

芹菜素 4 h 组脑组织 iNOS 活性均明显高于假手术组,且芹菜素组明显低于模型组,差异有统计学意义(P 均 <0.01);模型 4 h 组与芹菜素 4 h 组均较相应 0.5 h 组明显增高(P 均 <0.01)。

2.6 脑组织含水量、EB 与 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 的相关性分析:模型组脑含水量与 EB 呈正相关(0.5 h $r=0.872$, 4 h $r=0.843$, P 均 <0.01),与 TNF- α 呈正相关(0.5 h $r=0.796$, $P<0.05$; 4 h $r=0.928$, $P<0.01$),与 IL-1 β 呈正相关(4 h $r=0.908$, $P<0.01$),与 iNOS 呈正相关(0.5 h $r=0.875$, 4 h $r=0.930$, P 均 <0.01)。EB 与 TNF- α 呈正相关(4 h $r=0.715$, $P<0.05$),与 IL-1 β 呈正相关(4 h $r=0.744$, $P<0.05$),与 iNOS 呈正相关(0.5 h $r=0.895$, $P<0.01$; 4 h $r=0.812$, $P<0.05$)。

3 讨论

研究证明,脑水肿为脑 I/R 损伤的重要机制之一,脑含水量的测定是反映脑组织 I/R 损伤的一个经典指标^[5]。本实验研究显示,模型组脑含水量较假手术组明显升高,且随着再灌注时间延长,脑含水量逐渐增高,说明在局灶性脑缺血的病变基础上出现了脑水肿,并随再灌注时间延长不断加剧。再灌注 4 h 时脑 EB 含量明显升高,考虑是在局灶性脑缺血病变基础上出现血脑屏障破坏,毛细血管通透性增高所致。脑 I/R 损伤后,损伤区内皮细胞、神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞及血管周围炎性细胞被激活,释放 TNF- α 、IL-1 β 而触发炎症反应,随后释放趋化因子 IL-6 和 IL-8,这些细胞因子与其他炎性代谢产物共同促使白细胞释放大蛋白水解酶、氧自由基和其他效应分子,这是造成脑损伤的重要病理机制之一,所以 TNF- α 、IL-1 β 作为炎症反应的起始因子,在脑 I/R 损伤中具有重要作用^[2,6],检测其含量对衡量脑 I/R 损伤有重要意义。

一氧化氮(NO)既是信使分子,又是神经毒素;一氧化氮合酶(NOS)是 NO 合成的关键因素。在脑缺血早期阶段,来源于内皮细胞的 NO 扩血管作用大于来源于神经元的 NO 神经毒性作用,缺血后几小时,NO 的扩血管效果不再有对抗缺血性脑损伤的保护作用,主要成为神经毒性物质^[7-8]。iNOS 只有在缺血、缺氧和某些细胞因子如 TNF 等激活下方可诱导产生,实验表明,iNOS 被诱导而持续产生的 NO 加剧了脑缺血晚期脑损伤^[9]。

本研究结果显示,脑 I/R 0.5 h 后,大鼠脑组织 TNF- α 含量显著升高,并具有时间依赖性,表明 TNF- α 参与了脑 I/R 损伤的发生发展,这与国内外

已有的文献报道^[10-11]类似。而 IL-1 β 与 iNOS 活性的改变发生在再灌注 4 h 后,时间上迟于 TNF- α 的改变,推测 TNF- α 可能是细胞因子的重要启动因子,可诱导 IL-1 β 的表达,与许多实验提出的“瀑布效应”一致;同时可激活 iNOS,促使 iNOS 诱导产生的 NO 参与脑 I/R 损伤过程。直线相关分析显示, TNF- α 、IL-1 β 含量和 iNOS 活性与脑含水量及 EB 含量均有高度相关性,提示 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 参与了脑 I/R 损伤过程。

已证实芹菜素是中枢神经系统的一种保护剂,具有镇静、保护神经元、抗氧化和抗脂质过氧化等作用^[12-13]。本研究表明,芹菜素可降低脑 I/R 损伤后毛细血管通透性,减轻脑水肿;同时,可显著降低脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 含量和 iNOS 活性,从而减少 NO 的生成量,减轻脑缺血引起的 NO 毒性作用,对缺血性脑损伤起到一定的神经保护作用。

参考文献

- [1] White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury [J]. *J Neurol Sci*, 2000, 179(S 1-2): 1-33.
- [2] 王涛,文亮,李大江. 全脑缺血/再灌注损伤后炎性细胞因子的变化及其意义[J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(5): 290-292.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] 陈翔,杨于嘉,陶永光,等. 百日咳杆菌诱导大鼠急性感染性脑水肿模型[J]. *湖南医科大学学报*, 1996, 21(3): 214-216.
- [5] 王至婉,李建生,周清安,等. 补肾活血和泻下方药及其配伍对老龄大鼠脑缺血自由基损伤的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10(1): 22-25.
- [6] 李建生,高剑峰,周友龙,等. 老年脑缺血/再灌注大鼠炎症级联反应变化及其意义[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(5): 278-281.
- [7] Beray-Berthet V, Palmier B, Plotkine M, et al. Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress, and NO synthase activity in severe brain ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2003, 182(2): 446-454.
- [8] Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, et al. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(21): 7767-7775.
- [9] Jiang H, Koubi D, Zhang L, et al. Inhibitors of iNOS protects PC12 cells against the apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 375(1): 59-63.
- [10] Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1363-1368.
- [11] 陈燕启,刘德红,杨光田. 葛根素在大鼠全脑缺血/再灌注时对核因子- κ B 表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(1): 21-24.
- [12] Campbell EL, Chebib M, Johnston GA. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recom-

binant GABA(A) receptors[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68 (8):1631-1638.

neuroblastoma cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14(9): 2261-2264.

[13] Kang SS, Lee JY, Choi YK, et al. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y

(收稿日期: 2009-03-20)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

血液灌流治疗急性中毒性肝衰竭临床观察

李铁刚, 魏学婷, 刘伟, 王林, 沈海涛
(中国医科大学附属盛京医院急诊科, 辽宁 沈阳 110000)

【关键词】 血液灌流; 中毒; 丙氨酸转氨酶; 天冬氨酸转氨酶

中图分类号: R459.5 文献标识码: B DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.018

中毒可导致肝功能迅速衰竭, 出现严重代谢紊乱和肝内毒素蓄积, 病情呈进行性加重, 且容易出现肝昏迷、出血、感染等严重并发症, 常规内科治疗效果差, 病死率高。采用 HA330-I 型树脂血液灌流器治疗 13 例中毒后肝衰竭患者疗效显著, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例及血液灌流方法: 2008 年 11 月—2009 年 2 月本院收治的中毒患者 26 例, 男 15 例, 女 11 例; 年龄 18~60 岁; 毒物种类有氟乙酰胺、有机磷、对乙酰氨基酚、百草枯等。就诊时间 30 min~6 h, 患者均出现了急性肝衰竭, 13 例接受血液灌流治疗(灌流组), 13 例未接受血液灌流治疗(对照组)。深静脉穿刺术建立血管通路, 全身肝素化, 每次灌流 2 h, 1~2 d 治疗 1 次, 3 次为 1 个疗程。

1.2 检测指标及方法: ①于灌流前后测定丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST); ②首次灌流后测定肝、肾功能指标; ③住院时间及预后。

1.3 统计学分析: 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血液灌流前后肝功能变化(表 1): 灌流后患者 ALT、AST 显著下降(P 均 <

0.01), 说明血液灌流对中毒患者的肝功能有明显改善作用。

表 1 13 例患者灌流前后 ALT 和 AST 水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

时间	ALT(U/L)	AST(U/L)
灌流前	382.00±185.41	480.27±188.78
灌流后	105.67±88.95 ^a	103.01±75.64 ^a

注: 与灌流前比较, ^a $P < 0.01$

2.2 两组患者出院时肝、肾功能指标比较(表 2): 灌流组 ALT、AST、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、总蛋白(TP)均较对照组明显下降, 白蛋白(Alb)明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)与对照组比较差异无统计学意义。

2.3 预后(表 3): 灌流组患者住院时间较对照组明显缩短, 治愈率较对照组明显升高(P 均 < 0.01)。

表 3 两组患者转归情况

组别	例数	住院时间($\bar{x} \pm s, d$)	治愈率 [% (例)]
灌流组	13	8.07±4.20 ^b	92.3(12) ^b
对照组	13	17.43±9.05	30.8(4)

注: 与对照组比较, ^b $P < 0.01$

3 讨论

治疗中毒以促使毒物排出体外, 纠

正毒物带来的或因治疗引起的内环境紊乱为目的。中毒后毒物在肝脏内大量蓄积, 造成肝细胞严重破坏、免疫病理损伤及肝脏屏障功能受损, 内毒素刺激肝内外单核/巨噬细胞释放大细胞因子而造成肝细胞继发性损害叠加, 自身清除毒物的能力也受到限制, 此时采用血液净化治疗, 通过体外循环方法清除毒物成为一种选择^[1]。

本组结果显示, 接受血液灌流的患者 CK、CK-MB 及肝功能指标均较对照组明显下降, 其转归也好于对照组。谢后雨等^[2]观察到, 血液灌流能暂时替代肝脏的解毒功能, 解除临床症状, 同时为受损的肝细胞创造再生和功能恢复的内环境, 对改善中毒患者的肝功能有明显的效果, 可明显提高急性有机磷农药中毒患者治愈率, 降低病死率。李明琼^[3]认为, 对急性药物、毒物中毒患者进行血液灌流治疗应及时、且不应轻易停止, 以免丧失抢救时机。

参考文献

- [1] 黎磊石, 李大玺. 连续性血液净化[M]. 南京: 东南大学出版社, 2004: 267-268.
- [2] 谢后雨, 陈海水, 孙军, 等. 血液灌流治疗重度有机磷农药中毒 82 例[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(10): 610.
- [3] 李明琼. 血液灌流抢救重症药物或毒物中毒 12 例[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(10): 598.

表 2 两组患者出院时肝、肾功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT(U/L)	AST(U/L)	CK(kU/L)	CK-MB(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)	Alb(g/L)	TP(g/L)
灌流组	13	105.01±76.84 ^b	100.17±65.13 ^b	1.22±0.58 ^b	61.04±21.41 ^b	8.02±4.67	45.60±39.30	45.05±5.54 ^a	178.90±74.09 ^b
对照组	13	541.19±167.45	566.27±176.46	7.89±3.01	2111.10±1080.77	7.89±4.44	78.43±54.06	34.55±6.07	255.21±87.02

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

(收稿日期: 2009-03-07)

作者简介: 李铁刚(1978-), 男(汉族), 辽宁省人, 讲师。

(本文编辑: 李银平)