

感染性脑损伤中橙皮苷对小鼠自主活动的影响*

吴健¹,刘红芝^{1△},温相如²,付燕燕¹,张磊³,孙颖³,张芳¹,刘永民²,董红燕¹,刘永海³,宋远见¹

(徐州医学院:1.基础学院神经生物学研究中心;2.公共教育学院化学教研室;

3.附属医院神经内科,江苏徐州 221004)

摘要:目的 探索橙皮苷对脂多糖(LPS)诱导的感染性脑损伤小鼠在暗场环境中自主活动的影响。方法 将 45 只 ICR 小鼠平均分为 3 组,即生理盐水组(对照组)、LPS 组、橙皮苷组,每组 15 只,以 ZH-ZFT 型自主活动视频分析系统考察各组小鼠活动路程和穿格次数的情况。结果 相对于对照组,LPS 组小鼠的活动路程缩短,穿格次数减少,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$);相对于 LPS 组,橙皮苷组小鼠的活动路程延长,穿格次数增加,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 橙皮苷可显著增强 LPS 诱导的感染性脑损伤小鼠在暗场环境中的自主活动能力。

关键词:脑损伤;橙皮苷;自主活动

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-2026-02

Effect of hesperidin on locomotor activity of mice with infective brain injury induced by LPS*

Wu Jian¹,Liu Hongzhi^{1△},Wen Xiangru²,Fu Yanyan¹,Zhang Lei³,Sun Yin³,Zhang Fang¹,Liu Yongmin²,Dong Hongyan¹,Liu Yonghai³,Song Yuanjian¹

(1. Neurobiology Research Center, School of Basic Medical Science; 2. Teaching and Researching

Section of Chemistry, College of Public Education; 3. Department of Neurology, Affiliated

Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To study the effect of hesperidin on the locomotor activity of mice with infective brain injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in the dark field environment. **Methods** 45 ICR mice were randomly divided into 3 groups: Saline group, LPS group and LPS+Hesperidin group, 15 mice in each group. The moving distance and the number of crossing line in the dark field were recorded using the ZH-ZFT locomotor activity video analysis system. **Results** The LPS group had significantly shorter moving distance as well as lower frequency of the number of crossing line than those of the Saline group ($P < 0.05$); compared with the LPS group, the Hesp group moved longer and crossed line more frequently, the differences between the two groups had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Hesperidin could significantly improve the capacity for action in the dark field of mice with infective brain injury induced by LPS.

Key words: brain injuries; hesperidin; locomotor activity

细菌或病毒感染可造成幼儿严重的神经细胞损伤,进而导致脑损伤。这也是早产儿、新生儿产生认知障碍、脑瘫、甚至死亡的重要原因。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是内毒素,为革兰阴性菌细胞壁的主要成分,含有 O 抗原。幼鼠的血脑屏障(blood brain barrier, BBB)尚不完善,LPS 能够透过 BBB 入脑,可用于建立幼鼠感染性脑损伤模型,以此开展幼儿感染性脑损伤的相关基础研究。橙皮苷(4'-methoxy-7-O-rutinosyl-3',5'-dihydroxyflavanone, Hesperidin)广泛存在于柑橘类水果中,属于多效药物,能够降低毛细血管的脆性,保护毛细血管,治疗高血压和心肌梗死等。另外,它还有抗氧化、抗炎、镇痛及抗癌作用。有研究表明,橙皮苷有很好的神经保护作用^[1-2],但是,它是否能对感染性脑损伤小鼠自主活动行为学指标起到调控作用,尚不明确。脑损伤可引起行为学指标的改变,在暗场环境中可以观察研究实验动物自主活动。通过对感染性脑损伤模型小鼠的暗场环境行为学观察研究,可以探明橙皮苷是否会对动物的自主行为产生影响,为进一步研究橙皮苷的作用机制提供实验基础。

1 材料与方法**1.1 实验动物** 3~4 周龄雄性 ICR 小鼠 45 只,体质量为 8~11 g,由徐州医学院实验动物中心提供。采用区组随机化分组法^[3]将小鼠平均分为生理盐水(对照组)、LPS 组、橙皮苷组 3 组,每组 15 只。

1.2 仪器与试剂 LPS 购自 Sigma 公司。Hesperidin 购自郑州荔诺生物科技有限公司。实验系统为淮北正华公司的 ZH-ZFT 型自主活动实验视频分析系统,活动箱大小为 500 mm×500 mm×300 mm,采用 Stoelting 公司的 Any-maze system 4.72 软件进行记录分析。

1.3 方法

1.3.1 动物模型制备 LPS 组:对小鼠腹腔注射含 LPS 的生理盐水溶液,剂量为 5 mg/kg;对照组:腹腔注射生理盐水(与 LPS 等体积);橙皮苷组:先腹腔注射 LPS(5 mg/kg),再用橙皮苷 200 mg/kg,混悬于 0.5%羟甲基纤维素钠中灌胃。将以上各组动物于 6 h 后置于暗场环境观察其自主活动行为。

1.3.2 小鼠自主行为研究 应用 ZH-ZFT 型自主活动实验视频分析系统记录与分析各组小鼠的行为。用 Any-maze system 软件将活动箱空间平均划分为 9 个区域。先将小鼠置于活动箱中适应 2 min 取出,再从活动箱的中央位置放入,记录其 5 min 的行为学指标,包括活动时间、总路程(总活动度)、轨

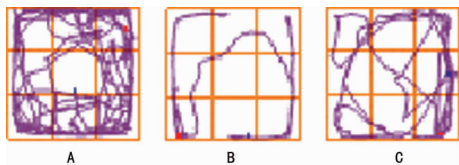
* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100762,81371300);江苏省高校自然科学基金项目(11KJB310013,13KJB310021);徐州医学院院长基金资助项目(2012KJZ06)。作者简介:吴健(1970—),硕士,讲师,主要从事脑损伤的研究。△ 通讯作者,E-mail:869133848@qq.com。

迹、区域分布,对运动总路程和穿格次数进行统计分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠在暗场环境中的运动轨迹比较 在暗场环境中,对照组、LPS 组和橙皮苷组小鼠的运动轨迹不同,大体有 3 种类型,见图 1。(1)复杂型,对照组小鼠运行轨迹复杂,图中可见暗箱四角、四边轨迹较多,中央格较少;(2)简洁型,LPS 组小鼠运行轨迹最为简洁,中央格基本没有轨迹;(3)居间型,橙皮苷组小鼠运行轨迹的复杂程度居于前二者之间,四角、四边的轨迹相对较多,中央格轨迹少。



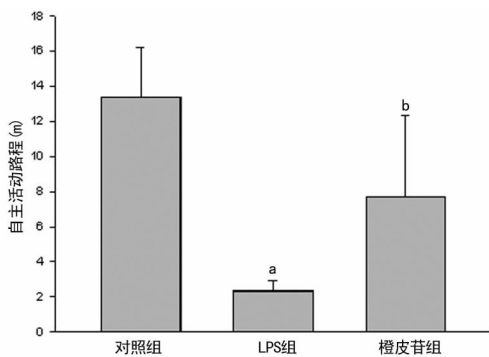
A: 对照组; B: LPS 组; C: 橙皮苷组。

图 1 3 组小鼠在暗场环境中的运动轨迹

表 1 3 组小鼠在暗场环境中的活动路程和穿格次数 ($\bar{x} \pm s$)

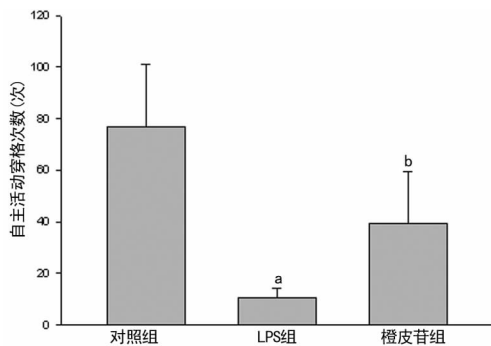
组别	活动路程(m)	穿格次数(次)
对照组	13.38 ± 2.82	77.00 ± 24.04
LPS 组	2.33 ± 0.61 ^a	10.67 ± 3.51 ^a
橙皮苷组	7.67 ± 4.65 ^b	39.50 ± 20.12 ^b

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 LPS 组比较。



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 LPS 组比较。

图 2 3 组小鼠在暗场环境中的自主活动路程



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 LPS 组比较。

图 3 3 组小鼠在暗场环境中的穿格次数

2.2 3 组小鼠在暗场环境中的自主活动路程及穿格次数比较

LPS 对小鼠暗场环境的自主活动有显著影响,对照组小鼠在暗场环境 5 min 的记录时间内,活动路程平均为 13.38 m,平均穿格 77 次。同对照组相比,LPS 组小鼠的活动路程显著缩短,仅 2.33 m,穿格次数也大幅减少,仅为 11 次,两个指标间的差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。橙皮苷可使小鼠在暗场环境中的自主活动明显恢复橙皮苷组活动路程延长至平均 7.67 m,穿格次数增加至 39.5 次,与 LPS 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1,图 2、图 3。

3 讨论

早产儿、新生儿、小儿可因感染而导致脑损伤,进而引起行为障碍、脑瘫甚至死亡。此类损伤直接影响小儿远期预后,是神经系统发育异常的重要原因。小儿发生脑损伤时,没有特异性的神经系统症状、体征,主要依靠影像学手段、脑电生理检查进行诊断,同时缺乏有效的防治手段,一般采用物理康复、视听功能训练等方法进行防治,效果尚不理想^[4]。脑损伤后的神经保护和修复是有效治疗该病的重要途径。小儿发生脑损伤时,往往表现出自主活动减少^[5]。因此,探明此类自主活动的变化,研究药物对自主活动的影响具有重要意义。

神经精神类疾病的研究中,可用穿梭箱等研究动物的学习记忆,可通过研究自主活动的变化来考察动物的神经精神变化^[6-7]。在开环环境中,研究表明何首乌、黄芩、参附注射液等对动物的神经精神有影响的药物对动物的自主活动没有显著影响^[8-9]。小鼠昼伏夜出,黑暗环境下自主活动增多,因此暗场行为实验更真实地反映小鼠的自主活动,探究在暗场环境中动物的行为学变化有更重要的意义。

LPS 会引起实验动物的炎症反应,对于幼年小鼠,BBB 不完善,ICR 小鼠第 3~4 周断乳,本研究选取这一阶段的雄性小鼠,腹腔注射的 LPS 会透过 BBB 入脑导致感染性脑损伤^[10-11]。本研究发现,小鼠感染性脑损伤后,小鼠毛色在数小时内即有变化,6 h 后通过暗场环境行为实验,发现小鼠的行为亦发生变化,自主活动能力显著降低。表现在总的活动路程大幅减少,同时穿格次数明显减少,表明小鼠的探索性行为受到抑制,探索活动减少。

橙皮苷是多效药物^[12],本研究发现 LPS 诱导的小鼠感染性脑损伤会影响小鼠暗场环境下的自主活动行为,而橙皮苷可以逆转 LPS 的感染性脑损伤小鼠的该行为学效应,活动路程明显增加的同时,探索性活动也显著增多。下一步,本实验室还将通过免疫印迹和免疫组化等手段研究相关炎症因子的变化,以期深入揭示橙皮苷在 LPS 诱导的感染性脑损伤中的作用机制。

参考文献:

[1] Lee KH, Yeh MH, Kao ST, et al. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor- κ B in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Toxicol Lett, 2010, 194 (1): 42-49.

[2] Hwang SL, Yen GC. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(3): 859-864.

[3] 万霞, 刘建平. 临床试验中的随机分组方法[J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 216-219.

[4] 周丛乐. 早产儿脑损伤的诊治进展[J]. (下转第 2031 页)

总之,本实验结果表明,补充 AM 及 AMBP-1 对梗阻性黄疸大鼠的肠屏障功能具有保护作用,这可能为梗阻性黄疸后肠源性感染的防治提供新的思路。但是,在具体分子机制中,AM 及 AMBP-1 是否通过 cAMP/PKA 或 Akt-GSK 等作用途径抑制细胞凋亡^[15-16],尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Sewnath ME, Karsten TM, Prins MH, et al. A meta-analysis on the efficacy of preoperative biliary drainage for tumors causing obstructive jaundice[J]. *Ann Surg*, 2002, 236(1):17-27.
- [2] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(2):553-560.
- [3] Elsasser TH, Kahl S, Martinez A, et al. Adrenomedullin binding protein in the plasma of multiple species: characterization by radioligand blotting [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(10):4908-4911.
- [4] Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, et al. Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15):12292-12300.
- [5] Higuchi S, Wu R, Zhou M, et al. Gut hyperpermeability after ischemia and reperfusion: attenuation with adrenomedullin and its binding protein treatment [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008, 1(5):409-418.
- [6] Yang J, Wu R, Zhou M, et al. Human adrenomedullin and its binding protein ameliorate sepsis-induced organ injury and mortality in jaundiced rats[J]. *Peptides*, 2010, 31(5):872-877.
- [7] Fujiyoshi N, Feketeova E, Lu Q, et al. Amiloride moderates increased gut permeability and diminishes mesenteric lymph-mediated priming of neutrophils in trauma/hemorrhagic shock[J]. *Surgery*, 2006, 140(5):810-817.
- [8] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal

lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4):478-483.

- [9] Parks RW, Halliday MI, McCrory DC, et al. Host immune responses and intestinal permeability in patients with jaundice [J]. *Bri J Surg*, 2003, 90(2):239-245.
- [10] Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW, et al. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice[J]. *Hepatology*, 1992, 15(6):1132-1136.
- [11] Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, et al. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apoptosis in experimental obstructive jaundice[J]. *Ann Surg*, 2005, 241(1):159-167.
- [12] Yang R, Harada T, Li J, et al. Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(5):709-717.
- [13] Lutgendorff F, Nijmeijer RM, Sandstrom PA, et al. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis[J]. *PloS One*, 2009, 4(2):e4512.
- [14] Wang N, Yu H, Ma J, et al. Evidence for tight junction protein disruption in intestinal mucosa of malignant obstructive jaundice patients [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45(2):191-199.
- [15] Yin H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling[J]. *Hypertension*, 2004, 43(1):109-116.
- [16] Wang SM, Yang WL. Circulating hormone adrenomedullin and its binding protein protect neural cells from hypoxia-induced apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(5):361-367.

(收稿日期:2013-11-08 修回日期:2014-02-22)

(上接第 2027 页)

- 中国实用儿科杂志, 2006, 21(9):650-653.
- [5] 张善纲, 范建中, 徐军, 等. 脑损伤认知障碍康复评定的进展[J]. *国外医学:物理医学与康复学分册*, 2004, 24(4):183-185.
- [6] 卓豫, 吴宝明, 王景周, 等. 一种全程控制的大鼠穿梭箱主动回避反应实验系统及其应用[J]. *重庆医学*, 2006, 35(10):926-927.
- [7] Tomobe K, Fujii H, Sun B, et al. Modulation of infection-induced inflammation and locomotive deficit and longevity in senescence-accelerated mice-prone (SAMP8) model by the oligomerized polyphenol oligonol[J]. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61(7):427-434.
- [8] 王君明, 朱新瑞. 何首乌提取物抗抑郁活性研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2012, 35(7):449-451, 455.
- [9] 李桂琼, 柯大智. 参附注射液对 β 淀粉样蛋白所致阿尔茨

海默病大鼠认知行为和脑组织氧化应激的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(2):156-158.

- [10] Erickson MA, Hansen K, Banks WA. Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: protection by the antioxidant N-acetylcysteine[J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26(7):1085-1094.
- [11] Seshia SS, Bingham WT, Kirkham FJ, et al. Nontraumatic coma in children and adolescents: diagnosis and management[J]. *Neurol Clin*, 2011, 29(4):1007-1043.
- [12] Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15):6185-6205.

(收稿日期:2013-12-20 修回日期:2014-02-23)