

原花青素对脑出血后脑水肿及继发性脑损伤炎症的作用研究*

石磊, 赵焱[△], 徐治强, 王建祥, 彭翔
(湖北省武汉市普爱医院神经外科 430033)

[摘要] **目的** 探讨原花青素对脑出血后脑水肿及继发性脑损伤炎症的作用。**方法** 48 只 C57BL6 小鼠分为 4 组: Sham+生理盐水组, Sham+原花青素(100 mg/kg)组, ICH+生理盐水组, ICH+原花青素(100 mg/kg)组。采用 Bederson 法检测术后小鼠神经功能评分, 干湿比重法检测小鼠脑组织含水量, 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠脑组织细胞形态改变, Western blot 法观察小鼠脑组织胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及离子钙结合蛋白受体 1(Iba1)的表达, TUNEL 及 Western blot 法观察小鼠脑组织细胞凋亡情况。**结果** 12 h 后与 ICH+生理盐水组相比, ICH+原花青素组的神经功能障碍症状评分明显降低($P<0.05$), 脑组织含水量明显降低($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 原花青素能减少脑出血小鼠神经细胞病变数量, 降低脑组织出血量。Western blot 结果显示, 原花青素能促进脑出血组织 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的表达, 降低 Bcl-2 相关 X 蛋白、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3、GFAP 和 Iba-1 的表达量。TUNEL 结果显示, 原花青素能抑制脑出血小鼠脑组织神经细胞的凋亡。**结论** 原花青素可能通过降低 GFAP 和 Iba-1 的表达抑制神经毒性物质的产生, 防治脑出血后继发性脑损伤。

[关键词] 原花青素类; 脑出血; 继发性脑损伤

[中图分类号] R651.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)10-1314-04

Effects of proanthocyanidins on cerebral edema and secondary brain injury inflammation following intracerebral hemorrhage*

SHI Lei, ZHAO Yan[△], XU Zhiqiang, Wang Jianxiang, PENG Xiang

(Department of Neurosurgery, Wuhan Municipal Puai Hospital, Wuhan, Hubei 430033, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of procyanidins on cerebral edema and inflammation of secondary brain injury after intracerebral hemorrhage. **Methods** Forty-eight C57BL6 mice were randomly divided into 4 groups: sham-operation+saline group, sham-operation+procyanidins (100 mg/kg) group, intracerebral hemorrhage (ICH)+saline group and ICH+procyanidins (100 mg/kg) group. The Bederson method was used to detect postoperative nerve function score in mice. The brain tissue water content was measured by wet-dry weight method. The variety of morphological in brain tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adapter molecule 1(Iba-1) in mouse brain tissue were observed by western blot. The apoptosis of brain tissue was observed by TUNEL and western blot method. **Results** Compared with the ICH+saline group after 12 h, the nerve function score in the ICH + proanthocyanidins group was significantly decreased ($P<0.05$), and the water content of brain tissue was also significantly decreased ($P<0.05$). The HE staining results showed that procyanidins decreased the number of neurocytes lesions in cerebral hemorrhage mice and reduced the amount of brain tissue hemorrhage. Western blot results showed that procyanidins promoted the expression of Bcl-2, decreased the expression of Bax, Caspase3, GFAP and Iba-1 in cerebral hemorrhage mice. The TUNEL results showed that procyanidins could inhibit the apoptosis of brain tissue neurons in mouse with intracerebral hemorrhage. **Conclusion** Procyanidins inhibits the production of neurotoxic substances possibly by reducing the expression of GFAP and Iba-1, and prevents and treats secondary brain injury after intracerebral hemorrhage.

[Key words] procyanidins; cerebral hemorrhage; secondary brain injury

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)指脑实质的非创伤性出血,是一种严重危害人们健康的疾

* 基金项目:武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WZ16C17)。 作者简介:石磊(1978—),主治医师,本科,主要从事神经系统肿瘤、颅脑损伤、脑血管疾病方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhaoyanpuai@163.com。

病,常发生于 50 岁以上患者,占急性脑血管病的 20%~30%。我国每年因 ICH 死亡的人数高达 100 万,在急性脑血管病中病死率最高^[1]。无论保守治疗还是手术治疗,脑血管病病情的恶化均与 ICH 后脑水肿和继发性脑损伤密切相关^[2]。然而,目前尚缺乏有效的预防手段及治疗脑水肿及继发性脑损害的药物。原花青素是一大类多酚化合物的总称,具有强效的抗氧化作用,且具有抗炎、抗糖尿病、保护缺血性脑损伤、保护心血管等药理作用,是极具发展前景的天然植物提取物^[3]。本研究探讨原花青素对 ICH 后脑水肿及继发性脑损伤的影响及其机制,进一步明确原花青素的药理作用及应用前景,为预防及治疗 ICH 后继发性脑损伤提供一定的实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物:健康 C57BL6 雄性小鼠 48 只,体质量(250±30)g,由湖北省实验动物中心提供,动物饲养室为屏蔽环境,控制室温约为 22℃,室内湿度约为 55%。动物实验过程符合实验动物伦理学要求。试剂:原花青素(含量大于 95%,Solarbio 公司,中国),胶质纤维酸性蛋白(gliofibrillary acidic protein,GFAP)抗体及小胶质细胞/巨噬细胞特异性蛋白抗体(ionized calcium binding adapter molecule 1,Iba-1)抗体(Abcam 公司,英国),正置显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型分组及给药 根据前期实验摸索,原花青素浓度使用中浓度(100 mg/kg)比较合适。8 月龄健康 C57BL6 雄性小鼠分为 4 组,Sham+生理盐水组、Sham+原花青素(100 mg/kg)组、ICH+生理盐水组、ICH+原花青素(100 mg/kg)组。4 组小鼠分别灌胃给药 7 d 后取材。

1.2.2 ICH 模型制备 C57BL6 小鼠用 3%水合氯醛腹腔注射麻醉后,暴露前囟,将小鼠放置于立体定位仪上,在前囟后 0.2 mm,中线右 3.0 mm 处钻孔,微量加样器沿颅骨孔垂直进针 6.0 mm,缓慢注入自体尾动脉血 20 μL,对照组注入等量的生理盐水。手术结束后记录时间,各组小鼠正常饮食,分笼饲养。

1.2.3 神经功能评分 观察术后各组小鼠,Bederson 法对神经功能进行初步评估^[4]。Bederson 法:轻抓尾巴,提起高于桌面 10 cm,正常小鼠前爪伸直。0 分:无神经功能缺损;1 分:脑部病变对侧腕关节、肘关节屈曲,肩内收屈曲;2 分:上述体征+向麻痹侧推阻力下降;3 分:活动是向麻痹侧打圈(追尾状)。以造模后 4、8、12、24 h 为时间点,对各组小鼠进行神经功能评分。

1.2.4 干湿比重法测定脑组织含水量 造模后 24 h 处死小鼠,在冰盘上断头取脑,用冰生理盐水冲洗 3 次,洗去积血。迅速切取进针孔前半部分脑组织,精确称重(0.1 mg)。然后将称好的脑组织置于恒温烘

干箱中烘干,准确称取干重。根据 Elliott 公式计算脑组织含水量:脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色 造模后 24 h 向小鼠腹腔注射 4%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,迅速开腔,从右心耳先后灌注 0.9%生理盐水约 150 mL,4%多聚甲醛约 300 mL。待彻底灌注完成后,断头取脑,切取部分脑组织,进行组织包埋、切片及 HE 染色,显微镜下观察出血区及周围的神经细胞的形态改变。

1.2.6 Western blot 检测 取各组小鼠脑海马区组织,将其剪成细小碎片,按 250 μL/20 mg 将含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液加入碎片组织,使用匀浆器将其匀浆至完全裂解。然后将完全裂解的组织样本置入 4℃下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行蛋白定量后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)跑胶,然后转膜,利用一抗 GFAP 抗体(1:200)、Iba-1 抗体(1:1 000)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)抗体(1:500)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)抗体(1:500)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(1:500)室温孵育 1 h 后,磷酸盐缓冲液吐温 20(phosphate buffered solution Tween-20,PBST)洗涤,用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗(1:200)室温孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次。取适量电学发光(ECL)发光液膜正面进行显色处理后在化学发光分析仪中检测。

1.2.7 TUNEL 染色 石蜡包埋的组织切片经脱蜡水化后,滴加蛋白酶 K 室温孵育 20 min 后,加入 50 μL TUNEL 反应混合液,湿盒暗室中 37℃孵育 1 h,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,再加入 50 μL 转化-POK,37℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,滴加 50 μL 二氨基联。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原花青素对 ICH 小鼠神经功能的作用 术后 Sham 各组小鼠出现轻微不适,但没有明显神经功能缺损症状。ICH 各组小鼠神经功能缺损症状比较严重,主要表现为前肢肘关节屈曲、不停地转圈、偏瘫,神经行为学评分比较有差异。在 4 h 时间点,ICH+原花青素组小鼠的神经行为学评分有所降低,但与 Sham+原花青素组小鼠相比差异无统计学意义($P>0.05$);12 h 后,与 ICH+生理盐水鼠相比,ICH+原花青素组小鼠神经功能评分明显降低($P<0.05$),见表 1。

2.2 原花青素对 ICH 小鼠脑组织含水量的影响 与 Sham+生理盐水组[(75.65±0.74)%]比较,ICH+生理盐水组小鼠[(83.16±1.09)%]脑含水量明显升

高($P < 0.05$)。而原花青素给药治疗后,与 ICH+生理盐水组比较,ICH+原花青素组小鼠[(80.38±0.98)%]脑组织含水量有明显降低,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 ICH 小鼠不同时间点神经功能评分($\bar{x} \pm s$)

组别	4 h	8 h	12 h	24 h
Sham+生理盐水组	2.1±0.4	1.7±0.5	1.2±0.3	0.8±0.4
Sham+原花青素组	2.2±0.5	1.5±0.6	1.1±0.3	0.7±0.4
ICH+生理盐水组	2.8±0.3	2.8±0.4 ^a	2.7±0.4 ^a	2.6±0.5 ^a
ICH+原花青素组	2.5±0.5	2.4±0.5	2.3±0.4 ^b	2.1±0.3 ^b

^a: $P < 0.05$,与 Sham+生理盐水组比较;^b: $P < 0.05$,与 ICH+生理盐水组比较

2.3 原花青素对 ICH 小鼠脑组织细胞形态的改变

Sham+生理盐水组的小鼠脑组织结构相较正常,形态正常,细胞着色均匀,排列整齐,没有明显出血症状。ICH+生理盐水组小鼠神经细胞肿胀变形,出现自溶空泡现象,并且有大量红细胞血块聚集,血块周围组织松散,细胞核固缩。原花青素给药后,ICH+

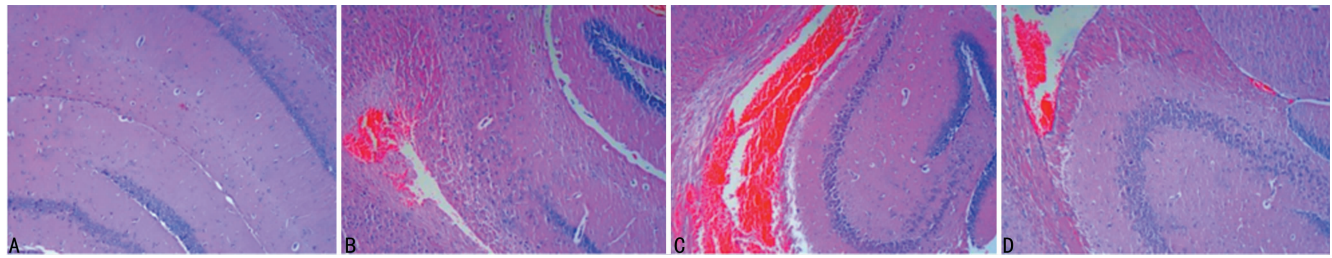
原花青素组小鼠神经细胞变形发生空泡数量减少,红细胞聚集明显降低,组织结构趋近紧密,细胞核固缩现象减少,见图 1。

2.4 原花青素对 ICH 小鼠脑组织细胞凋亡的作用

Sham+生理盐水组和 Sham+原花青素组小鼠海马区脑组织偶见凋亡细胞,ICH+生理盐水组小鼠海马区脑组织见大量凋亡细胞表达,多见于高密度细胞层,染色质浓缩,核固缩。与 ICH+生理盐水组小鼠比较,ICH+原花青素组小鼠海马区脑组织细胞凋亡密集度较低,核内染色质浓缩程度偏低,染色阳性的棕黄色颜色相对较浅,细胞凋亡数较少,见图 2。

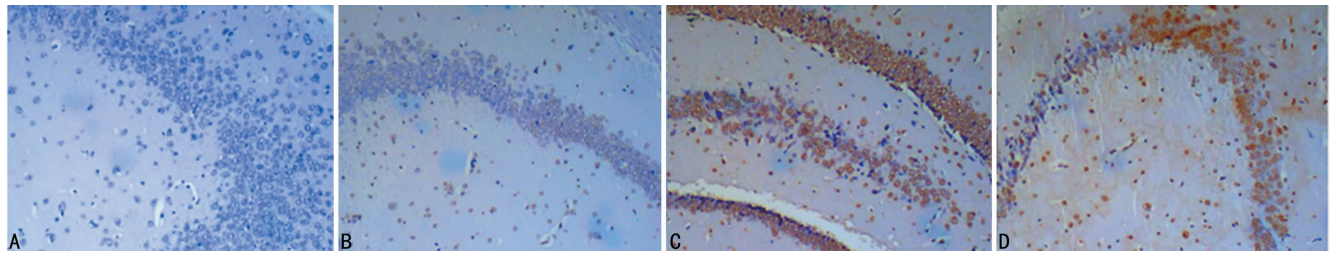
2.5 Western blot 检测 ICH 发生后,小鼠脑细胞

Bcl-2 表达下调,Bax 和 Caspase-3 表达上调,脑组织细胞发生明显凋亡。原花青素给药后,ICH 小鼠脑细胞 Bcl-2 表达上调,Bax 和 Caspase-3 表达下调;ICH 小鼠脑组织 GFAP 和 Iba-1 表达上调,而原花青素给药治疗后,ICH 小鼠脑组织 GFAP 和 Iba-1 表达下调,见图 3。



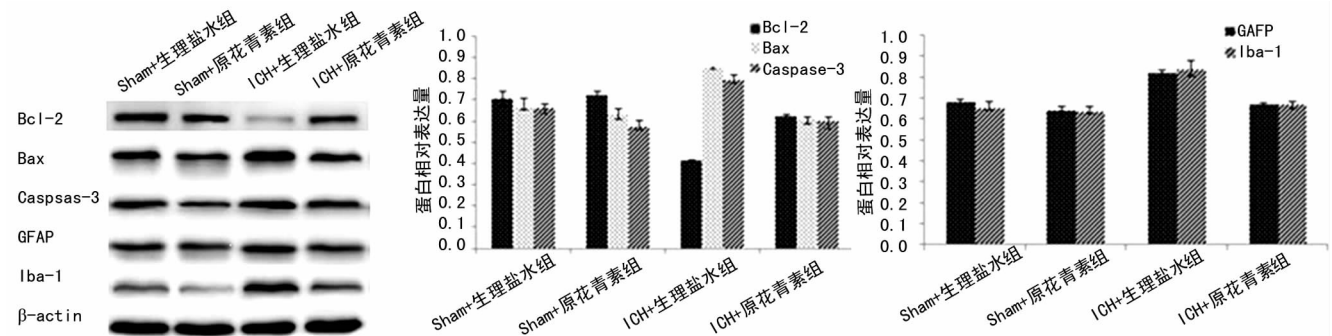
A:Sham+生理盐水组;B:Sham+原花青素组;C:ICH+生理盐水组;D:ICH+原花青素组

图 1 原花青素对 ICH 小鼠脑组织结构形态的影响(HE,×200)



A:Sham+生理盐水组;B:Sham+原花青素组;C:ICH+生理盐水组;D:ICH+原花青素组

图 2 原花青素对 ICH 小鼠脑组织细胞凋亡的影响(HE,×200)



A:Western blot 凝胶图;B:细胞凋亡因子的表达水平;C:细胞 GFAP 和 Iba-1 的表达水平

图 3 Western blot 检测图

3 讨 论

小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞,激活的小胶质细胞针对受损的细胞发挥免疫调节、修复等作用^[5],但小胶质细胞过度激活后会对细胞产生毒性影响^[6]。Iba1 是小胶质细胞标志物。研究发现,ICH 发生后血肿周围的细胞破坏裂解后释放大量的三磷酸腺苷(ATP),诱导小胶质细胞分泌多种细胞因子,促进炎症反应的发生^[7]。小胶质细胞在 ICH 后异常活跃,并且可以检测到小胶质细胞分泌的促炎症因子,对血灶周围的正常细胞产生神经毒性及炎症反应,诱导脑细胞的凋亡坏死^[8]。本研究结果发生 ICH 后,脑组织小胶质细胞标志物 Iba1 表达明显升高,与之前研究结果一致。

星形胶质细胞(astrocyte, Ast)是中枢神经内数量最多的神经胶质细胞,是中枢神经系统重要细胞。有研究发现星形胶质细胞是脑缺血时的主要受累细胞^[9]。在受到创伤及脑损伤后星形胶质细胞活化适应损伤,表现为细胞数量增加,突起长度变化^[10]。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP),是星形胶质细胞标志物,主要分布在活化的星形胶质细胞中^[11]。活化的 Ast 产生大量的 NO,导致神经细胞的凋亡坏死,介导细胞的炎症反应^[12]。因此星形胶质细胞对 ICH 引发的脑水肿和继发性脑损伤具有重要研究意义。这与本研究结果 ICH 发生后星形胶质细胞标志物 GFAP 表达明显升高一致。

原花青素来自于传统中药-莲、松树皮等,是一种强效的抗氧化剂,是极具发展前景的天然植物提取物。近来有研究表明,原花青素有较强的清除自由基,抗肿瘤,预防动脉粥样硬化、降脂、降压,以及改善人体微循环等多重功效^[13-16]。原花青素可以通过减轻脑水肿、抗炎、抗氧化及抑制缺血脑组织 ASIC1a 的表达,有效减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤^[17]。与本研究结果原花青素可以缓解脑出血后神经功能损伤,降低脑出血后脑组织含水量和脑组织出血量,通过促进 Bcl-2 表达,抑制 Bax 和 Caspase-3 表达进而抑制脑组织神经细胞凋亡一致。

综上,原花青素能缓解 ICH 后脑组织水肿症状,对 ICH 小鼠的脑损伤有一定的保护作用,其机制可能是因为原花青素能够通过降低 GFAP 和 Iba-1 的表达,减少胶质细胞的活化数量,抑制神经毒性物质的产生,减轻脑水肿及细胞凋亡进而缓解继发性脑损伤。

参考文献

[1] XI G, HUA Y, KEEP R F, et al. Systemic complement de-

pletion diminishes perihematomal brain edema in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(1):162-167.

- [2] 程娟,柯开富. 脑出血后继发性脑损伤机制[J]. *国际脑血管病杂志*, 2010, 18(10):787-791.
- [3] 高羽,董志. 原花青素的药理学研究现状[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(6):651-655.
- [4] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [5] TAYLOR R A, SANSING L H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013:746068.
- [6] 梁瑞,吴鹤,戚基萍. 活化的小胶质细胞在脑出血后的作用[J]. *现代医学*, 2015, 43(2):262-265.
- [7] INOUE K. Microglial activation by purines and pyrimidines[J]. *Glia*, 2002, 40(2):156-163.
- [8] 王新,李明军,张坤,等. 脑出血与小胶质细胞介导的炎症相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(13):3268-3270.
- [9] PANICKAR K S, NOREMBERG M D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations[J]. *Glia*, 2005, 50(4):287-298.
- [10] BARKER A J, ULLIAN E M. Astrocytes and synaptic plasticity[J]. *Neuroscientist*, 2010, 16(1):40-50.
- [11] LOVE S, MCLEAN C. Overview and recent advances in neuropathology[J]. *Pathology*, 2011, 43(2):87.
- [12] NORDEN D M, FENN A M, DUGAN A, et al. TGFβ produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation[J]. *Glia*, 2014, 62(6):881-895.
- [13] 凌智群,谢笔钧. 莲房原花青素对氧自由基和脂质过氧化的作用[J]. *营养学报*, 2002, 24(2):121-125.
- [14] 何佳声,黄学锋. 原花青素对人结肠癌细胞 SW620 增殖和凋亡的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2010, 16(4):439-442.
- [15] 马亚兵,高海青,伊永亮,等. 葡萄籽原花青素降低动脉粥样硬化兔血清 C 反应蛋白水平[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(5):549-552.
- [16] 薛燕滩,王峰. 葡萄籽原花青素预防大鼠动脉粥样硬化作用机制研究[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(13):44-45.
- [17] 陆景红,任明山,李光武,等. 葡萄籽原花青素对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(45):99-101.

(收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-12-14)