

## · 实验研究 ·

## 芦丁通过抗氧化抗凋亡对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的保护作用

韩雨薇, 王晨辰, 李晓明\*

北部战区总医院 神经外科, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:** **目的** 探讨芦丁通过抗氧化抗凋亡对蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠早期脑损伤的保护作用。**方法** 颈内动脉穿刺法构建SAH模型。SD雄性大鼠分为假手术组、模型组和芦丁50 mg/kg组, 24 h后对SAH评分、神经功能评分、脑含水量和伊文思蓝渗出率进行考察。并利用ELISA法检测氧化应激指标丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性; 并采用免疫荧光检测凋亡相关蛋白p53、Bax、caspase-3和Bcl-2的表达情况。**结果** 与模型组比较, 芦丁50 mg/kg组SAH评分明显降低( $P < 0.05$ ), 神经功能评分明显提高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 芦丁50 mg/kg组大鼠左脑、右脑和小脑的脑水含量和伊文思蓝渗出率明显降低( $P < 0.05$ ), 提示芦丁能够减轻SAH大鼠血脑屏障的损伤。与模型组比较, 芦丁50 mg/kg组大鼠MDA水平显著降低( $P < 0.05$ ), SOD、CAT和GSH-Px水平显著升高( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提示芦丁具有改善SAH大鼠氧化应激的作用。芦丁50 mg/kg给药后p53、Bax和caspase-3表达量减少, Bcl-2表达增加。**结论** 芦丁能够通过抗氧化抗凋亡减轻SAH大鼠的早期脑损伤。

**关键词:** 芦丁; 蛛网膜下腔出血; 氧化应激; 凋亡; SAH评分; 神经功能评分; 伊文思蓝渗出率; 脑保护作用

**中图分类号:** R966; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)03-0421-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.006

## Protective effect of rutin on early brain injury in mice with subarachnoid hemorrhage by anti-oxidation and anti-apoptosis

HAN Yu-wei, WANG Chen-chen, LI Xiao-ming

Department of Neurosurgery, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of rutin on early brain injury in mice with subarachnoid hemorrhage (SAH) by anti-oxidation and anti-apoptosis. **Methods** SAH model was established by internal carotid artery puncture. SD male mice were divided into Sham group, model group, and rutin 50 mg/kg group. After 24 h, SAH score, neurological function score, cerebral edema, and Evans blue exudation were investigated. The activities of oxidative stress indexes MDA, SOD, CAT, and GSH-Px were detected by ELISA method. The expression of apoptosis related proteins p53, Bax, caspase-3, and Bcl-2 were detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the model group, SAH score in rutin 50 mg/kg group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), but neurological function score was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, cerebral edema and Evans blue exudation of left brain, right brain, and cerebellum in rutin 50 mg/kg group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), indicating that rutin could decrease the damage to the blood-brain barrier of mice with SAH. Compared with the model group, MDA level in rutin 50 mg/kg group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), but SOD, CAT, and GSH-Px levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), indicating that rutin could improve the effect of oxidative stress in mice with SAH. Rutin 50 mg/kg could decrease the expression of p53, Bax, and caspase-3, and increase the expression of Bcl-2. **Conclusion** Rutin can alleviate early brain injury in mice with SAH by anti-oxidation and anti-apoptosis.

**Key words:** rutin; subarachnoid hemorrhage; oxidative stress; apoptosis; SAH score; neurological function score; Evans blue exudation; brain protection

收稿日期: 2020-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81671174)

作者简介: 韩雨薇, 药师, 硕士, 研究方向为药理学。E-mail: hanmendy@163.com

\*通信作者 李晓明, 博士, 主任医师。Tel: (024)28851284 E-mail: lxm5668sw@yahoo.com

蛛网膜下腔出血 (SAH) 的早期脑损伤被认为与预后密切相关<sup>[1]</sup>。研究表明氧化应激和神经元凋亡是 SAH 后早期脑损伤的重要原因之一<sup>[2-3]</sup>。因此, 抗氧化应激和抗凋亡可能是早期脑损伤的有效治疗策略。氧化应激还可通过增加 p53 诱导细胞色素 c 释放和激活 caspase-3 来诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>。芦丁 (3,3',4',5,7-五羟基黄酮-3-鼠李糖苷) 是一种黄酮醇型黄酮类化合物, 在天花粉和植物性食品中含量丰富, 包括蔬菜、水果、茶叶、葡萄酒和草药。已有研究报道芦丁具有多种药理活性, 包括抗氧化、抗病毒、抗癌、细胞保护、抗血小板、抗血栓、血管保护、心脏保护和神经保护活性<sup>[5-6]</sup>。然而, 芦丁对 SAH 后氧化应激和神经细胞凋亡的影响及其可能的作用机制尚未被研究。因此, 本研究将探讨芦丁对 SAH 后早期脑损伤的影响及其可能的作用机制。

## 1 方法与材料

### 1.1 仪器与试剂

芦丁 (质量分数 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司); p53、Bax (Cell signaling technology); caspase 3、Bcl2、 $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology); BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白酶磷酸酶抑制剂、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 化学发光试剂盒和 5×loading buffer 均购自碧云天生物技术公司; Evans Blue (Sigma 公司); MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 试剂盒 (南京建成科技有限公司); 冰冻切片机 (Thermo 公司); 黏附载玻片、盖玻片均购自江苏世泰实验器材有限公司; 尼康荧光显微镜; Thermo 酶标仪。

### 1.2 动物

雄性 Sprague-Dawle (SD) 大鼠, 体质量 250~280 g, 购于北部战区总医院实验动物科 (沈阳), 动物生产许可证号 SCXK (辽) 2014-0002。所有动物的使用流程均符合美国国立卫生研究院 1996 年出版的“实验动物护理和使用指南”。喂食充足的饲料和水。所有大鼠在固定灌注和手术前均处于麻醉状态。

### 1.3 SAH 大鼠模型的建立

SAH 大鼠模型采用血管内穿刺的方法制作<sup>[7]</sup>。大鼠 ip1% 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 麻醉。将鼠头固定在立体定向框架内。显露左侧颈总动脉、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA), 结扎切断 ECA。一条锐化的 4-0 单丝尼龙缝线从 ECA 残端沿吻部进入

颈内动脉。穿刺 15 s 后, 将缝线拨入 ECA 残端, 再灌注 ICA 形成 SAH。通过 SAH 评分和神经功能评分来判断模型是否成功。假手术组大鼠进行同样的手术, 没有穿刺。

### 1.4 分组和给药

根据前期研究<sup>[8]</sup>, 选择芦丁质量浓度 50 mg/kg 进行实验。将随机分为 3 组, 假手术组、模型组、芦丁 50 mg/kg 组, 每组 30 只。芦丁在二甲基亚砜 (DMSO) 中溶解, 注射前稀释于生理盐水中 (最终浓度为 10%)。SAH 后 0.5 h 芦丁 ip 给药。DMSO 溶解于等体积生理盐水中作为对照。

### 1.5 SAH 评分和神经功能评分<sup>[9]</sup>

采用 Sugawa 评分标准, 根据蛛网膜下腔血凝块的多少将基底池分为 6 个节段, 0~3 级。0 级: 无蛛网膜下腔出血; 1 级: 蛛网膜下腔微量出血; 2 级: 中度凝块; 3 级: 血块和可识别的动脉。每个节段内每级满分为 3 分, 出血量越大分级越高, 总分由所有区域得分相加计算, 满分为 18 分, 0~7 分为轻度 SAH, 8~12 分为中度 SAH, 13~18 分为严重 SAH。神经功能评分评估由 6 个测试组成, 分数可以是 0~3 或 1~3。这 6 项测试包括自发活动、四肢运动的对称性、攀登、身体本体感觉、前爪伸展以及对胡须刺激的反应。最高分为 18 分, 最低分为 3 分。分数越高, 功能越强。

### 1.6 对 SAH 大鼠血脑屏障的影响

**1.6.1 脑含水量** 处死大鼠后取大脑, 分为左右大脑半球和小脑, 称定各部分的湿质量。然后将脑标本在 110 °C 的烤箱中烘干 72 h, 称定干质量, 计算脑含水量。

$$\text{脑含水量} = (\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量}$$

**1.6.2 伊文思蓝渗出率** 将伊文思蓝染料 (2%, 5 mL/kg, Sigma 公司) 注入左股静脉 > 2 min, 允许循环 1 h, 麻醉后用生理盐水心内灌注处死大鼠, 取脑, 分为左右大脑半球和小脑, 称定质量后浸泡在甲酰胺中 (10 mL/g), 60 °C 孵育, 使用分光光度计测定渗出物在 620 nm 处的吸光度值。

### 1.7 氧化应激指标的测定

收集各组血清标本, 使用南京建成生物工程研究所生产的丙二醛 (MDA) 试剂盒按照说明书方法测定脂质过氧化产物 MDA 水平。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性均使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒检测, 检测方法参照说明书。

### 1.8 免疫荧光染色

麻醉后快速取出大鼠脑组织,用 PBS 洗涤 2 次,固定在 4% 甲醛溶液中 24 h, 分别用 p53 抗体 (1:50)、Bax 抗体 (1:50)、Bcl2 抗体 (1:50) 孵育过夜,温度为 4 ℃。荧光二抗以 1:100 稀释,室温孵育 1 h。荧光显微镜拍照。

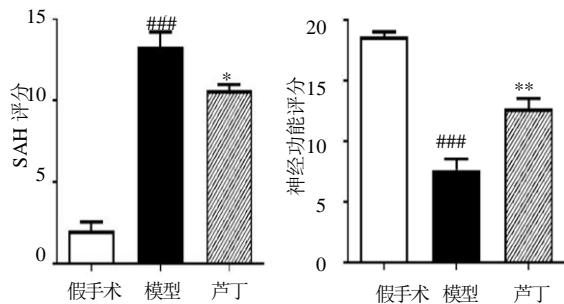
### 1.9 统计学分析

使用统计分析 GraphPad Prism 软件进行数据分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组之间使用 ANOVA 分析。

## 2 结果

### 2.1 芦丁对 SAH 大鼠的 SAH 评分和神经功能评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 SAH 评分明显升高 ( $P < 0.001$ ),神经功能评分明显降低 ( $P < 0.001$ ),表示建模成功。与模型组比较,芦丁 50 mg/kg 组 SAH 评分明显降低 ( $P < 0.05$ ),神经功能评分明显提高 ( $P < 0.01$ ),见图 1。



与假手术组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group

图 1 芦丁对 SAH 大鼠的 SAH 评分和神经功能评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

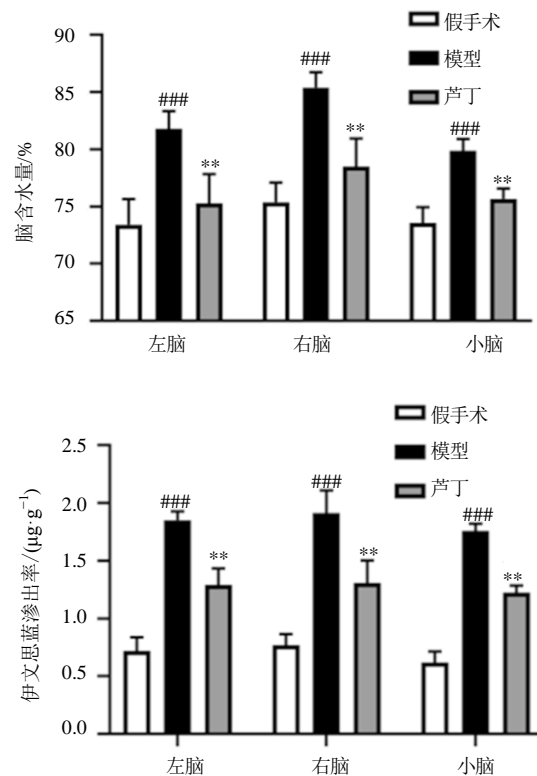
Fig. 1 Effect of rutin on SAH score and neurological function score in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

### 2.2 芦丁对 SAH 大鼠血脑屏障的影响

与假手术组比较,模型组大鼠左脑、右脑和小脑的脑水含量和伊文思蓝渗出率明显升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较,芦丁 50 mg/kg 组大鼠左脑、右脑和小脑的脑水含量和伊文思蓝渗出率明显降低 ( $P < 0.05$ ),提示芦丁能够减轻 SAH 大鼠血脑屏障的损伤。见图 2。

### 2.3 芦丁对 SAH 大鼠氧化应激指标的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 MDA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平显著



与假手术组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$   
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

图 2 芦丁对 SAH 大鼠血脑屏障的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )  
Fig. 2 Effect of rutin on blood brain barrier in mice with SAH ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较,芦丁 50 mg/kg 组大鼠 MDA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ),提示芦丁具有改善 SAH 大鼠氧化应激的作用,见图 3。

### 2.4 芦丁对凋亡相关蛋白的影响

免疫荧光结果显示模型组 p53、Bax 和 caspase3 的表达量增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达降低。而芦丁 50 mg/kg 给药后 p53、Bax 和 caspase-3 表达减少,Bcl-2 表达增加,见图 4。

## 3 讨论

SAH 是一种常见而严重的脑血管病,尽管诊断和治疗技术已有进步,但仍缺乏有效的治疗措施,临床疗效仍不理想。据报道,早期脑损伤是 SAH 患者高死亡率的最重要原因<sup>[2]</sup>。大量研究表明氧化应激和细胞凋亡与 SAH 诱导的早期脑损伤的发病机制密切相关<sup>[10]</sup>。氧化应激,包括脂质过氧化,在 SAH 后由于氧合血红蛋白和酶反应产生过多的自由基而发生,在急性脑损伤的发病机制和血脑屏障

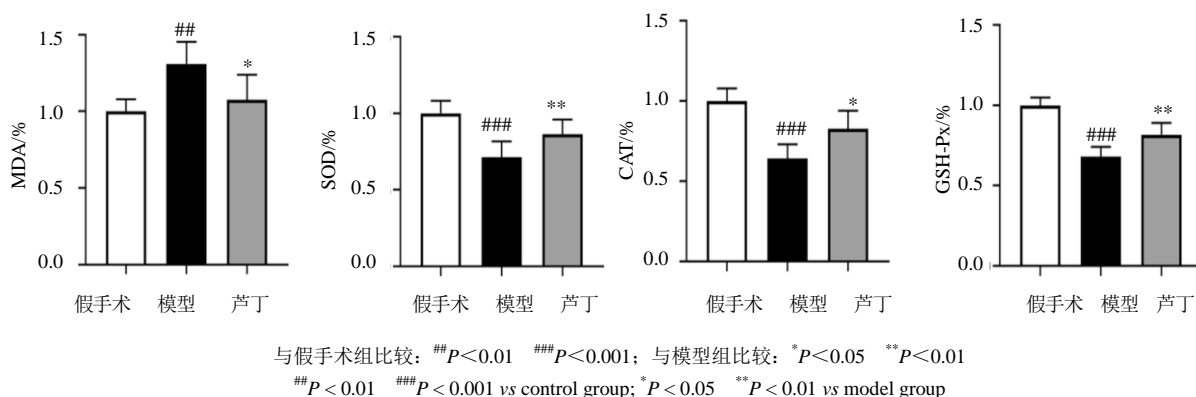


图 3 芦丁对 SAH 大鼠氧化应激指标 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )  
 Fig. 3 Effect of rutin on oxidative stress indexes MDA, SOD, CAT, and GSH-Px in mice with SAH ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

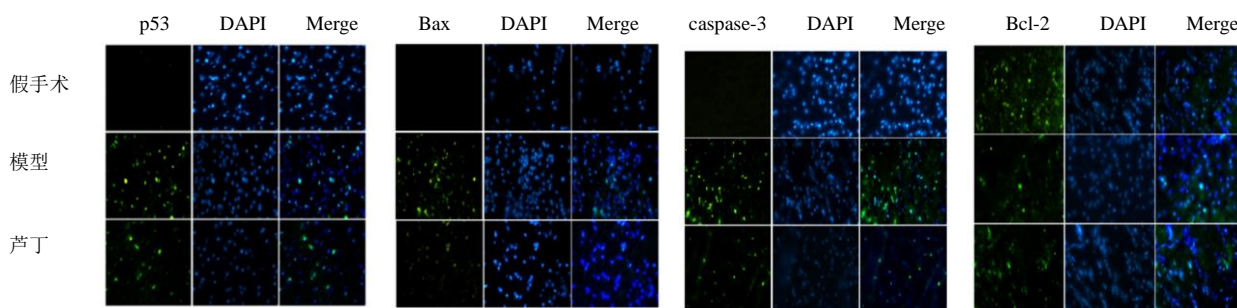


图 4 芦丁对 SAH 大鼠凋亡相关蛋白 p53、Bax、caspase-3 和 Bcl-2 的影响  
 Fig. 4 Effect of rutin on apoptosis related proteins p53, Bax, caspase-3, and Bcl-2 in mice with SAH

的破坏中起重要作用<sup>[11]</sup>。大量证据表明 SAH 后氧化应激水平显著升高,抗氧化治疗在实验性 SAH 和临床试验中的效果显著<sup>[12]</sup>。因此,使用自由基清除剂治疗 SAH 引起了广泛关注。

芦丁具有减轻大鼠脑缺血损伤的作用<sup>[13]</sup>。并且芦丁具有改善神经元细胞氧化应激和抗凋亡的作用<sup>[14]</sup>。而芦丁在 SAH 中的作用及其作用机制研究仍未阐明。因此,本研究对芦丁在 SAH 中的影响进行了探讨。结果发现,与假手术组相比,模型组大鼠 MDA、CAT、GSH 水平显著升高,SOD 水平明显降低,而芦丁给药组则使其接近正常水平。此外,芦丁给药改善了神经预后,减轻了脑水肿和血脑屏障通透性的损伤。提示芦丁作为一种潜在的抗氧化剂,在减轻 SAH 后的早期脑损伤中起着重要的作用。

另有报道表明氧化应激能够激活 caspase-3,精活的 caspase-3 上调 Bax<sup>[16]</sup>。本研究发现,芦丁可以逆转 caspase-3、Bax 和 p53 等凋亡相关蛋白的表达上调,提示芦丁对 SAH 后早期脑损伤诱导的神经细胞凋亡具有保护作用。

本研究阐明了芦丁对 SAH 后早期脑损伤抗氧化和抗凋亡的作用。先前的研究表明芦丁减轻 SAH 后的早期脑损伤。如上所述,芦丁给药通过抗氧化和抗凋亡作用改善早期脑损伤。然而本研究存在一定的局限性,首先芦丁对 SAH 后迟发性血管痉挛的影响未进行考虑,其次芦丁对 SAH 后早期脑损伤的作用机制尚不清楚,这些问题值得下一步研究,以进一步阐明芦丁在 SAH 中的作用机制。

参考文献

[1] Rass V, Helbok R. Early brain injury after poor-grade subarachnoid hemorrhage [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19: 78  
 [2] Ostrowski R P, Colohan A R, Zhang J H. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurol Res*, 2006, 28(4): 399-414  
 [3] Ayer R E, Zhang J H. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 104: 33-41.  
 [4] Fiskum G, Rosenthal R E, Vereczki V, et al. Protection against ischemic brain injury by inhibition of

- mitochondrial oxidative stress [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, 36: 347-352.
- [5] Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(4): 989-993.
- [6] 丁 玥, 曹泽或, 柯志鹏, 等. 芦丁对流感病毒的体外抑制作用及其机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(12): 1431-1436.
- [7] Abraham M K, Chang W W. Subarachnoid hemorrhage [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2016, 34(4): 901-916.
- [8] Hao G, Dong Y, Huo R, *et al.* Rutin inhibits neuroinflammation and provides neuroprotection in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage, possibly through suppressing the rage-nf-kappab inflammatory signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(6): 1496-1504.
- [9] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, *et al.* A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 167(2): 327-334.
- [10] Chen S, Feng H, Sherchan P, *et al.* Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115: 64-91.
- [11] Echigo R, Shimohata N, Karatsu K, *et al.* Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 80.
- [12] Gaetani P, Pasqualin A, Rodriguez y Baena R, *et al.* Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage [J]. *J Neurosurg*, 1998, 89(5): 748-754.
- [13] Liu H, Zhong L, Zhang Y, *et al.* Rutin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats via estrogen receptor-mediated BDNF-TrkB and NGF-TrkA signaling [J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(5): 672-681.
- [14] Sivanantham B, Krishnan U, Rajendiran V. Amelioration of oxidative stress in differentiated neuronal cells by rutin regulated by a concentration switch [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 15-26.
- [15] Prunell G F, Svendgaard N A, Alkass K, *et al.* Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain [J]. *J Neurosurg*, 2005, 102(6): 1046-1054.