

藏红花素预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤保护作用及机制研究

温 彬, 张 琪, 靳丽丽, 康丽娟, 于 洋

保定市第一中心医院, 河北 保定 071000

摘要: 目的 研究藏红花素预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法 采用四动脉阻断法复制全脑缺血再灌注大鼠模型; 藏红花素低、中、高剂量组分别于术前7 d开始1次/d ip给予10、20、40 mg/kg藏红花素, 另设假手术组、模型组和尼莫地平(阳性药, 1 mg/kg)组。测定脑电图恢复时间和翻正反射恢复时间; 术后24 h评卒中指数和神经功能缺失评分; 干湿比重法测定脑组织含水量; 伊文氏蓝法检测血脑屏障(BBB)通透性; HE染色法行大脑皮层神经元病理学检查并进行病变分级; 末端标记法(TUNEL)观察皮层神经元凋亡状况并计算凋亡指数; 生化分析法测定氧自由基(ROS)、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性; 酶联免疫吸附法(ELISA)测定白介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF- α)、IL-6、干扰素- γ (IFN- γ)水平。结果 与模型组比较, 藏红花素中、高剂量或尼莫地平预处理均明显缩短全脑缺血性脑损伤大鼠脑电图恢复时间和翻正反射恢复时间, 降低卒中指数和神经功能缺失评分, 抑制脑组织含水量升高和伊文氏蓝渗入, 抑制缺血大脑皮层神经元病理性形态结构改变和病变等级的升高, 抑制缺血大脑皮层神经元凋亡、降低凋亡指数, 抑制ROS、MDA含量升高和SOD、CAT活性降低, 抑制TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 含量升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 藏红花素预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 机制可能与抑制氧化应激损伤和抑制炎症级联反应有关。

关键词: 藏红花素; 全脑缺血再灌注损伤; 脑组织含水量; 血脑屏障; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)03-0429-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.03.011

Protective effect of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury in rats

WEN Bin, ZHANG Qi, JIN Lili, KANG Lijuan, YU Yang

Baoding First Central Hospital, Baoding 071000, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect and mechanism of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion in rats. **Methods** Four-artery occlusion was used to duplicate the rat model of cerebral ischemic injury. 7 days before operation, the low, medium and high dose crocin pretreatment groups were given 10, 20 and 40 mg/kg by ip injection once a day; another sham operation group, model group and nimodipine pretreatment group (positive drug, 1 mg/kg) were set up. The electroencephalogram recovery time and the righting reflex recovery time were measured; 24 h after operation, the stroke score and neurological symptom score were performed, the water content in brain tissue were determined by dry-wet specific gravity method, the permeability of blood brain barrier(BBB) was detected by evans blue method, the pathological examination of cerebral cortical neurons by HE staining and the pathological grading was carried out, the apoptosis of cortical neurons was detected by TUNEL and the apoptosis index was calculated; the content of oxygen free radicals (ROS), MDA and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined by biochemical analysis; the inflammatory cytokines content of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ were determined by ELISA. **Results** Compared with model control group, the pretreatment of crocin with medium, high dose or nimodipine could shorten the recovery time of EEG and righting reflex in rats with cerebral ischemic injury, reduce stroke score and neurological symptom score, inhibit the increase of brain tissue water content and the infiltration of evans blue, inhibit pathological morphological and structural changes of cerebral cortical neurons on ischemic side, inhibit the apoptosis of ischemic cerebral neuronal and reduce the apoptosis index, inhibit the increase of ROS, MDA content and the decrease of SOD, CAT activities, Inhibit

收稿日期: 2019-10-28

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2019367)

第一作者: 温 彬,女,研究生学历,主治医师,主要从事急诊医学疾病研究。E-mail: dayezi1229@163.com

the increase of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ content; all of the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** crocin pretreatment has a protective effect on global cerebral ischemic reperfusion injury, and the mechanism may be related to inhibition of oxidative stress injury and inhibition of inflammatory response.

Key words: crocin; cerebral ischemic; blood brain barrier; oxidative stress; inflammation

全脑缺血再灌注损伤多与休克、心脏骤停以及较大外科手术所致低压低氧有关,是致残、认知功能障碍并发症甚至死亡的重要原因之一^[1],缺血再灌注损伤病理机制复杂,与氧化应激、炎症反应密切相关^[2-3]。藏红花素是鸢尾科藏红花的主要活性成分,具有良好的抗氧化^[4]、抗炎^[5]等生物学作用,既往研究发现,藏红花素能够通过抑制氧化应激或抑制炎症反应而对胃^[6]、心肌^[7]、视网膜^[8]缺血缺氧性损伤发挥一定的保护作用,本实验将研究藏红花素对大鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用并探讨其机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级8周龄雄性SD大鼠,体质量(250 ± 10)g,购自河北省实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(冀)2018-004,动物合格证号20190520011;实验动物配合饲料、垫料购自河北实验动物中心。实验前适应性饲养1周,恒室温25℃,相对湿度55%~65%,光照黑暗周期12 h/12 h。

1.2 药物与主要试剂

藏红花素(质量分数 $\geq 98\%$,批号17304-1G),美国Sigma公司;尼莫地平注射液(规格20 mL:4 mg,批号1809013),购自扬子江药业集团有限公司;白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、干扰素- γ (IFN- γ)试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司;TUNEL试剂盒、MDA试剂盒,购自北京博奥森生物技术有限公司;活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

BL-420E型生物机能实验系统,成都泰盟科技有限公司;SZ-1型组织混匀器,金坛市晶玻实验仪器厂;Multiskan MK-3型酶标仪,芬兰Thermo公司;RM2125型石蜡切片机,德国Leica公司;BH-2型倒置光学显微镜,日本Olympus公司;UV759型紫外-可见分光光度计,上海圣科仪器设备有限公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药

144只实验用大鼠按照随机数字表法分为假手

术组,模型组,藏红花素低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)组和尼莫地平(阳性药,1 mg/kg)组,每组24只。

每100 mg藏红花素加入125 mL 0.9%氯化钠溶液中制备质量浓度为8 mg/mL的藏红花素溶液,并依次稀释为4、2 mg/mL。于术前7 d开始,藏红花素低、中、高剂量组分别ip相应浓度药液(5 mL/kg),尼莫地平组ip尼莫地平注射液(5 mL/kg),假手术组、模型组ip等体积0.9%氯化钠溶液,每天给药1次。

2.2 大鼠全脑缺血再灌注损伤模型的制备

参照雷晓鸣等^[9]报道的四动脉阻断法复制全脑缺血性脑损伤大鼠模型:麻醉后,于枕骨下正中切口,暴露第一颈椎横突,由翼小孔通路烧灼、闭塞双侧椎动脉;24 h后再次实施麻醉,然后沿颈部正中切口,钝性分离双侧颈总动脉并由无创动脉夹夹闭,15 min后松夹恢复血流灌注。造模结局判断:脑电图波幅下降程度 $\geq 75\%$ 、眼球变白、瞳孔扩散、翻正反射消失为造模成功标志。假手术组暴露椎动脉但不烧灼闭塞、暴露颈总动脉但不夹闭,其余同模型组。

2.3 监测翻正反射和脑电图恢复时间

实验过程中实施脑电图振幅监测,观测再灌注后脑电图振幅恢复时间(达假手术组75%以上),记录翻正反射恢复时间。

2.4 卒中指数和神经功能缺失评分

2.4.1 卒中指数 参照Ni等^[10]的报道评卒中指数,毛发脏乱颤抖,记1分;精神萎靡、反应迟钝,记1分;听觉、触觉迟钝,记3分;头抬起,记3分;后肢无力、外展,记3分;眼睑低垂,记1分;向缺血对侧转圈,记3分;并发惊厥,记3分;极度虚弱,记6分。 ≤ 3 分为无症状组;3~9分为中间组,可能有损伤; ≥ 9 分为有明显损伤。

2.4.2 神经功能缺失评分 参照Sanganalmath等^[11]报道的方法行神经功能缺失评分,活动减少但给予刺激能走、记1分;共济失调、记1分,贴地爬行、记2分,无步态、记3分;不能饮食、记1分,不能饮水、记1分;仅头或躯干运动、记1分,肢体无反应、记2分。2分正常,1~3分为轻度损伤,4~6分为中度损伤,

7~10分为严重损伤。

2.5 测定脑组织含水量

每组随机取6只大鼠,采用干湿比重法计算脑组织含水量:实施麻醉后,断头取脑并剪取缺血侧半脑,0.9%氯化钠溶液洗涤并擦拭干净后称湿质量;110℃烘烤24h至恒重后称干质量。

脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量

2.6 伊文氏蓝法检测血脑屏障(BBB)通透性

每组随机取6只大鼠,采用伊文氏蓝法检测BBB通透性:实施麻醉后iv浓度2%的伊文氏蓝(3 mL/kg),1h后处死大鼠并断头剥取脑组织,沿冠状切片、厚度2 mm,置二甲基甲酰胺溶液并恒温(37℃)放置48h,然后经组织混匀器匀浆处理,10 000×g离心15 min后取上清液,通过酶标仪测定632 nm处吸光度(A_{632nm})值,根据标准曲线计算伊文氏蓝含量。

2.7 HE染色法行大脑皮层神经元病理学检查和病变程度分级

①各组随机取6只大鼠,实施麻醉后开胸暴露心脏,左心室植入一灌注针头、右心耳做一切口,顺序灌注0.9%氯化钠溶液500 mL、4%多聚甲醛溶液500 mL(先快后慢),然后断头取脑并置于4%多聚甲醛溶液继续固定24 h。石蜡包埋、切片(切片厚度2 μ m),经二甲苯透明、梯度酒精脱蜡水化处理,然后行HE染色,二甲苯透明处理和中性树胶封片后通过倒置光学显微镜观察并照相保存。②大脑皮层神经元病变程度分级,0级:神经元形态、结构正常;1级:神经元形态基本正常,胞核周尼氏小体略减少;2级:神经元呈现肿胀,胞核周尼氏小体明显减少,胞浆着色均匀,胞核偏移,核仁无显著病变;3级:神经元体积变小,尼氏小体消失,核仁边界不清;4级:神经元胞质固缩、胞膜不清,尼氏小体消失,胞核裂解、核仁消失;5级:较4级病变严重,胞浆空白变性,出现坏死神经元。

2.8 TUNEL法观察皮层神经元凋亡状况并计算凋亡指数

取“2.7”项制备的脑组织石蜡切片,经二甲苯透明、梯度酒精脱蜡水化处理后,按照TUNEL试剂盒依说明书步骤操作,然后通过倒置光学显微镜观察(凋亡细胞为棕色,正常细胞为蓝紫色)并照相保存。凋亡指数计算:每只大鼠取5张切片并每张切片相同位置视野,分别计数每个视野细胞总数和凋亡细胞数。

凋亡指数=凋亡细胞数/细胞总数

2.9 生化分析法测定ROS、MDA含量和SOD、CAT活性

每组随机取6只大鼠,断头取脑,加入适量冷裂解液通过组织混匀器制备10%脑组织匀浆液,按照试剂盒说明依步操作,通过紫外-可见分光光度计检测ROS、MDA含量和SOD、CAT活性。

2.10 ELISA法检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量

取脑组织匀浆液,按照ELISA试剂盒说明依步操作后,通过酶标仪测定炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量。

2.11 统计学处理

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 形式,两两比较通过SPSS 15.0行最小显著差异LSD-*t*检验。

3 结果

3.1 对大鼠翻正反射和脑电恢复的影响

假手术组大鼠翻正反射正常,脑电图未见异常;模型组翻正反射恢复需要(27.31 $\pm$ 6.1)min、脑电恢复需要(25.14 $\pm$ 6.32)min;与假手术组比较差异显著($P<0.01$)。经藏红花素中、高剂量及尼莫地平预处理能够明显缩短全脑缺血再灌注损伤大鼠翻正反射和脑电恢复时间,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$);藏红花素高剂量组缩短翻正反射和脑电恢复时间的作用明显优于尼莫地平组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠翻正反射和脑电恢复时间($\bar{x} \pm s, n=24$)
Table 1 Righting reflex and EEG recovery time of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=24$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	翻正反射恢复 时间/min	脑电恢复时间/ min
假手术	—	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型	—	27.31 $\pm$ 6.15**	25.14 $\pm$ 6.32**
尼莫地平	1	22.49 $\pm$ 7.03##	19.90 $\pm$ 6.15##
藏红花素	10	25.02 $\pm$ 6.34	22.28 $\pm$ 6.59
	20	20.57 $\pm$ 5.28##	18.46 $\pm$ 5.87##
	40	18.62 $\pm$ 5.46### Δ	16.33 $\pm$ 5.26### Δ

与假手术组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:## $P<0.01$;藏红花素高剂量组与尼莫地平组比较: $\Delta P<0.05$

** $P<0.01$ vs sham group; ## $P<0.01$ vs model group; $\Delta P<0.05$ crocin high dose group vs nimodipine group

3.2 对卒中指数和神经病学症状评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑卒中指数、神经病学症状评分显著升高($P<0.01$);经藏红花素中、高剂量及尼莫地平预处理能够明显抑制卒中指

数和神经病学症状评分的升高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01);藏红花素高剂量组降低卒中指数作用显著优于尼莫地平预处理组($P<0.05$),两组间神经病学症状评分差异无统计学意义。见表2。

表2 各组大鼠脑卒中指数、神经病学症状评分 ($\bar{x}\pm s, n=24$)

Table 2 Stroke index and neurological symptom score of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=24$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	卒中指数	神经病学症 状评分
假手术	—	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	10.84±1.52**	5.72±1.34**
尼莫地平	1	9.06±1.97##	3.45±0.82##
藏红花素	10	9.96±2.18	5.13±1.07
	20	8.43±1.84##	4.86±0.92##
	40	7.80±1.65##△	3.34±0.78##

与假手术组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:## $P<0.01$;藏红花素高剂量组与尼莫地平组比较:△ $P<0.05$

** $P<0.01$ vs sham group; ## $P<0.01$ vs model group; △ $P<0.05$ crocin high dose group vs nimodipine group

3.3 对脑含水量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑含水量显著升高($P<0.01$);经藏红花素中、高剂量及尼莫地平预处理能够明显降低全脑缺血再灌注损伤大鼠脑含水量,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。藏红花素高剂量组脑含水量与尼莫地平组比较,差异无统计学意义。见表3。

3.4 对大鼠BBB通透性的影响

以伊文氏蓝渗入量表示BBB通透性,与假手术组比较,模型组大鼠伊文氏蓝渗入量显著升高($P<0.01$);经藏红花素低、中、高剂量及尼莫地平预处理能够抑制全脑缺血再灌注损伤大鼠伊文氏蓝渗入量的升高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。藏红花素高剂量组伊文氏蓝渗入量与尼莫地平组比较,差异无统计学意义。见表3。

3.5 对大鼠大脑皮层神经元病变的影响

如图1所示,假手术组大鼠大脑皮层神经元排列整齐、层次清晰、结构完整,核膜、核仁边界清楚,未见异常;模型组则呈现神经元胞浆固缩、空泡变性,核固缩深染,核膜、核仁边界不清等明显的病理性形态结构改变;与模型组比较,藏红花素各剂量及尼莫地平组均表现出对上述病理性形态结构改变的抑制作用,其中藏红花素高剂量组和尼莫地平

表3 各组大鼠脑含水量、BBB通透性($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Brain water content and BBB permeability of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	脑含水量/%	伊文氏蓝渗入 量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
假手术	—	78.01±0.97	0.97±0.13
模型	—	80.17±0.85**	3.86±0.45**
尼莫地平	1	79.05±0.82##	1.66±0.42##
藏红花素	10	79.84±1.03	3.29±0.41#
	20	79.57±0.96#	2.25±0.37##
	40	78.98±0.74##	1.74±0.35#

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

** $P<0.01$ vs sham group; ## $P<0.01$ vs model group

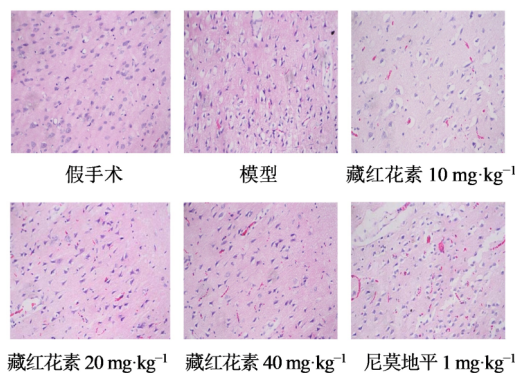


图1 各组大鼠大脑皮层神经元病理学检查结果(HE,×200)

Fig. 1 Pathological examination results of neurons in cerebral cortex of rats in each group (HE, ×200)

组效果较为显著。模型组大鼠大脑皮层神经元病变分级评分显著高于假手术组($P<0.01$);经藏红花素中、高剂量及尼莫地平预处理能够明显抑制病变分级评分的升高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01);藏红花素高剂量组病变分级评分与尼莫地平预处理组比较,差异无统计学意义,见表4。

3.6 对大鼠大脑皮层神经元凋亡的影响

如图2所示,假手术组大鼠大脑皮层神经元未见凋亡,而模型组大鼠大脑皮层神经元凋亡数量明显多于假手术组,藏红花素各剂量及尼莫地平组神经元凋亡数量不同程度少于模型组,表现出对大脑皮层神经元凋亡的抑制作用。模型组凋亡指数显著高于假手术组($P<0.01$),经藏红花素中、高剂量及尼莫地平预处理能够明显抑制凋亡指数的升高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01);藏红花素高剂量组对凋亡指数升高的抑制作用优于尼莫地平组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表4。

表4 各组大鼠大脑皮层神经元病变指数评分、凋亡指数($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 neuronal lesion index score and apoptosis index of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	病变分级评分	凋亡指数/%
假手术	—	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	4.76±0.98**	68.12±9.83**
尼莫地平	1	3.48±0.78 [#]	51.94±9.38 [#]
藏红花素	10	4.43±1.02	57.30±10.41
	20	3.59±0.83 [#]	49.25±9.22 [#]
	40	3.20±0.69 ^{##}	33.08±7.16 ^{##△△}

与假手术组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$;藏红花素高剂量组与尼莫地平组比较: $\Delta P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ crocin high dose group vs nimodipine group

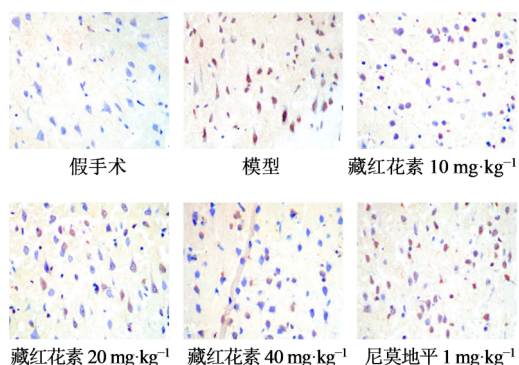


图2 各组大鼠大脑皮层神经元凋亡状况观察结果(TUNEL, ×200)

Fig. 2 observation results of neuron apoptosis in cerebral cortex of rats in each group(TUNEL, ×200)

3.7 对大鼠脑组织 ROS、MDA 含量和 SOD、CAT 活性的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 ROS、MDA 含量显著升高且 SOD、CAT 活性显著降低($P < 0.01$);经藏红花素中、高剂量预处理能够

抑制全脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 ROS、MDA 含量升高和 SOD、CAT 活性降低,经尼莫地平预处理能够抑制 ROS、MDA 含量升高和 SOD 活性降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05, 0.01$);藏红花素高剂量组对 ROS、MDA 含量升高和 CAT 活性降低的抑制作用优于尼莫地平组($P < 0.05, 0.01$),两组间 SOD 活性差异无统计学意义。见表 5。

3.8 藏红花素预处理对全脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量均显著升高($P < 0.01$);经藏红花素中、高剂量及尼莫地平预处理能够抑制全脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05, 0.01$);藏红花素高剂量组对 IL-1 β 、IL-6 含量升高的抑制作用显著优于尼莫地平组($P < 0.05, 0.01$),两组间 TNF- α 、IFN- γ 含量差异无统计学意义。见表 6。

4 讨论

目前,及时恢复血流灌注仍是临床治疗缺血性脑病的首选方案,但可能会进一步引发缺血再灌注损伤,其病理机制尚未完全明确,其中与氧化应激、炎症反应密切相关^[2-3],可作为靶点为防治缺血再灌注损伤药物研究提供了方向。四动脉阻断法制备的全脑缺血再灌注大鼠模型与人类患者临床病交接近,简单易操作,是目前国际公认的、实验中应用最多的全脑缺血动物模型制作方法^[12]。

藏红花素是存在于番红花中的一种天然化合物,抗氧化和抗炎作用显著,本实验通过四动脉阻断法制备全脑缺血 15 min 再灌注大鼠模型并于术前 7 d 每天一次 ip 不同浓度藏红花素进行研究,以尼莫地平做为阳性对照药物,发现经藏红花素预处

表5 各组大鼠脑组织 ROS、MDA 含量和 SOD、CAT 活性($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Contents of ROS, MDA and activities of SOD and cat in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ROS/($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	SOD/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	CAT/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
假手术	—	4.27±0.31	16.80±3.24	172.43±15.97	5.30±1.13
模型	—	9.83±1.25**	29.98±6.26**	143.51±12.45**	2.98±0.79**
尼莫地平	1	8.21±0.87 [#]	21.91±3.40 [#]	158.35±10.72 [#]	3.14±0.74
藏红花素	10	8.86±1.04	26.49±4.31	145.28±13.81	3.08±0.84
	20	7.35±0.79 ^{##}	20.16±3.64 ^{##}	159.70±12.54 [#]	4.06±0.87 [#]
	40	6.48±0.85 ^{##△△}	17.18±3.79 ^{##△}	166.94±11.19 ^{##}	4.38±1.02 ^{#△}

与假手术组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$;藏红花素高剂量组与尼莫地平组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ crocin high dose group vs nimodipine group

表6 各组大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 6 Contents of IL-1 β , IL-6, TNF - α and IFN - γ in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(nmol·L ⁻¹)	IL-6/(nmol·L ⁻¹)	TNF- α /(nmol·L ⁻¹)	IFN- γ /(nmol·L ⁻¹)
假手术	—	501.32 $\pm$ 36.40	99.35 $\pm$ 13.69	24.97 $\pm$ 4.56	21.58 $\pm$ 4.27
模型	—	920.17 $\pm$ 74.32**	205.41 $\pm$ 22.80**	54.02 $\pm$ 6.61**	46.35 $\pm$ 6.09**
尼莫地平	1	784.81 $\pm$ 73.07##	168.76 $\pm$ 21.35#	42.82 $\pm$ 5.94#	39.06 $\pm$ 5.05#
藏红花素	10	866.83 $\pm$ 91.97	190.39 $\pm$ 24.25	50.18 $\pm$ 6.27	43.61 $\pm$ 5.80
	20	720.57 $\pm$ 71.45 $\Delta\Delta$	175.97 $\pm$ 21.81#	42.93 $\pm$ 5.86#	39.08 $\pm$ 5.13#
	40	671.36 $\pm$ 64.92 $\Delta\Delta$	133.15 $\pm$ 17.69 $\Delta\Delta$	37.85 $\pm$ 5.79##	35.75 $\pm$ 4.46##

与假手术组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:## $P < 0.01$;藏红花素高剂量组与尼莫地平组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs sham group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ crocin high dose group vs Nimodipine group

理能够有效缩短全脑缺血再灌注损伤大鼠翻正反射恢复时间和脑电恢复时间,抑制卒中指数和神经病学症状评分升高,抑制脑组织水肿,抑制缺血侧大脑皮层神经元病变和神经元凋亡,降低皮层神经元病变等级和凋亡指数,提示藏红花素预处理对全脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

Zhang 等^[13]研究发现,缺血性脑损伤能够上调表达并活化基质金属蛋白酶(MMPs,尤其是 MMP-9)而引发 BBB 通透性改变,此外 Zhang 等^[14]研究发现,藏红花素具有下调脑缺血大鼠 MMP-2、MMP-9 表达的作用,本研究发现,模型大鼠 BBB 通透性升高,而经藏红花素预处理能够有效抑制全脑缺血再灌注大鼠 BBB 通透性升高,可能与其抑制 MMPs 表达有关。

缺血后再灌注过程 ROS 大量生成、同时抗氧化酶失活和过度消耗是导致氧化应激损伤的根本原因,ROS 能够破坏细胞膜、损伤核酸、引发 DNA 断裂等;MDA 为脂质过氧化终产物,其与 ROS 含量呈正相关,是评价氧化应激损伤程度的敏感指标^[15]。藏红花素是一种天然优良抗氧化剂,本研究发现,藏红花素预处理能够明显抑制全脑缺血再灌注大鼠脑组织 ROS、MDA 含量的升高和抗氧化酶(SOD、CAT)活性的降低,提示藏红花素预处理具有抑制全脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的作用。

随着脑缺血再灌注损伤病理机制研究的逐步深入,炎症细胞因子所起的作用日益得到关注。Okuyama 等^[16]研究发现,缺血性脑病能够病理性刺激小胶质细胞和星形胶质细胞过度释放炎症因子,促进缺血区内皮细胞粘附分子表达而使炎症细胞、中性粒细胞向缺血区脑组织聚集,并且中性粒细胞分泌的细胞因子能够进一步活化小胶质细胞,从而形成炎症级联反应。活化的小胶质细胞、星形胶质细胞上调炎症细胞因子 IL-1 β 表达,并且 IL-1 β 水平

升高可刺激 IL-6 表达上调^[17],而 IL-6 含量与脑组织梗死体积密切相关。TNF- α 是一种促炎细胞因子,缺血初期即可检测到 TNF- α 上调表达,Nawashiro 等^[18]研究发现,阻断 TNF- α 表达能够降低 DNA 碎片并减轻缺血侧脑损伤。此外,Seifert 等^[19]在局灶性脑缺血模型发现来源于脾脏的 IFN- γ 能够加重缺血性脑损伤。本研究发现,藏红花素预处理能够明显抑制全脑缺血再灌注大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量的升高,提示藏红花素预处理具有抑制全脑缺血再灌注大鼠炎症级联反应的作用。

藏红花素预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤具有保护作用,机制可能与抑制氧化应激损伤和抑制炎症级联反应有关。

参考文献

- [1] Wang W, Liu L, Jiang P, et al. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test [J]. Neurosci Lett, 2017, 636: 233-240.
- [2] Godinho J, de Sa-Nakanishi A B, Moreira L S, et al. Ethyl-acetate fraction of Trichilia catigua protects against oxidative stress and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 221: 109-118.
- [3] Liu X, Kiss G K, Mellender S J, et al. Activation of Akt by SC79 decreased cerebral infarct in early cerebral ischemia-reperfusion despite increased BBB disruption [J]. Neurosci Lett, 2018, 681: 78-82.
- [4] Elsherbiny N M, Salama M F, Said E, et al. Crocin protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathway [J]. Chem Biol Interact, 2016, 247: 39-48.
- [5] 吕明锐,王倩然,杨升东,等.藏红花及其组分抑制炎症因子表达的研究进展 [J]. 重庆医学, 2017, 46(13): 1850-

- 1853.
- [6] 徐曼秋, 苏贞, 甄玲玲, 等. 藏红花素预处理减轻大鼠胃缺血再灌注损伤作用与PI3K/Akt信号通路的关系[J]. 安徽医药, 2019, 23(9): 1715-1720.
- [7] 潘瑞蓉, 吴扬, 耿鹏, 等. 藏红花素对大鼠心肌细胞缺氧损伤的保护作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2011, 21(2): 131-134.
- [8] 常花蕾, 杨新光, 于敬妮, 等. 藏红花素对视网膜缺血再灌注损伤大鼠视网膜组织结构及肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 表达的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29(3): 300-304.
- [9] 雷晓鸣, 孟丽华, 蒋文军, 等. 槲皮素对大鼠全脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(9): 1254-1261.
- [10] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats [J]. Brain Res, 1994, 653(1/2): 231-236.
- [11] Sanganalmath S K, Gopal P, Parker J R, et al. Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 426(1/2): 111-127.
- [12] 何小苏, 邹红群, 李启艳, 等. 替格瑞洛对大鼠全脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(3): 413-418.
- [13] Zhang H T, Zhang P, Gao Y, et al. Early VEGF inhibition attenuates blood-brain barrier disruption in ischemic rat brains by regulating the expression of MMPs [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(1): 57-64.
- [14] Zhang X, Fan Z, Jin T, et al. Crocin protects against cerebral-ischemia-induced damage in aged rats through maintaining the integrity of blood-brain barrier [J]. Restor Neurol Neurosci, 35(1): 65-75.
- [15] Bagheri S, Sarabi MM, Khosravi P, et al. Effects of pistacia atlantica on oxidative stress markers and antioxidant enzymes expression in diabetic rats [J]. J Am Coll Nutr, 2019, 4: 1-8.
- [16] Okuyama S, Katoh M, Kanzaki T, et al. Auraptene/Naringin-Rich fruit juice of citrus kawachiensis (kawachi bankan) prevents ischemia-induced neuronal cell death in mouse brain through anti-inflammatory responses [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2019, 65(1): 66-71.
- [17] Hirano S, Zhou Q, Furuyama A, et al. Differential regulation of L-1 β and IL-6 release in murine macrophages [J]. Inflammation, 2017, 40(6): 1933-1943.
- [18] Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck J M, et al. Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 1997, 778(2): 265-271.
- [19] Seifert H A, Leonardo C C, Hall A A, et al. The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling [J]. Metab Brain Dis, 2012, 27(2): 131-141.