

香椿子正丁醇提取物对脑缺血再灌注致多器官功能障碍综合征的保护作用

袁成¹, 陈超¹, 游艳¹, 付灿¹, 李浩¹, 潘娜¹, 何治^{1,2*}

1. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002

2. 三峡大学 国家中医药管理局中药药理三级实验室, 湖北宜昌 443002

摘要: **目的** 探讨香椿子正丁醇提取物对脑缺血再灌注致大鼠多器官功能障碍综合征的保护作用。**方法** 大鼠随机分为正常对照组, 假手术组, 模型组, 溶媒对照组, 香椿子正丁醇提取物低、高剂量 (20、30 mg/kg) 组, 阿司匹林 (10 mg/kg) 阳性对照组, 各给药组每天给药 1 次, 连续给药 7 d。第 8 天以大脑中动脉线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 造模后, 行神经行为学评分判断神经功能损伤程度, 伊文思蓝法观察血脑屏障通透性, 分光光度法测定胃肠组织中丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 的量和超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。**结果** 与模型组相比, 香椿子正丁醇提取物可以改善脑缺血再灌注大鼠神经功能损伤 ($P < 0.05$)、降低血脑屏障通透性 ($P < 0.05$); 减少胃和小肠组织 MDA 和 NO 的生成 ($P < 0.05$), 抑制 SOD、GSH-Px 活性升高 ($P < 0.05$)。**结论** 香椿子正丁醇提取物通过抗氧化应激效应对脑缺血再灌注致多器官功能障碍综合征发挥保护作用。

关键词: 香椿子; 脑缺血再灌注; 多器官功能障碍综合征; 抗氧化应激; 血脑屏障

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)03-0323-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.017

Protection of *n*-butanol extract from seeds of *Toon sinensis* on multiple organ dysfunction syndrome caused by brain ischemia-reperfusion in rats

YUAN Cheng¹, CHEN Chao¹, YOU Yan¹, FU Can¹, LI Hao¹, PAN Na¹, HE Zhi^{1,2}

1. Medical Science College, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Third Grade Pharmacological Laboratory of Chinese Materia Medica, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of *n*-butanol extract from the seeds of *Toon sinensis* (NESTS) on multiple organ dysfunction syndrome (MODS) caused by brain ischemia-reperfusion in rats. **Methods** Male SD rats were divided into seven groups, such as control, Sham, model, vehicle control, Aspirin (10 mg/kg, positive control), low- and high-dose (20 and 30 mg/kg) NESTS groups. The rats in the treated groups were ig administered once daily for 7 d. On the day 8 the focal cerebral ischemia-reperfusion rat model was established using middle cerebral artery suture method. After the model establishment, the neurological deficit score was evaluated; The permeability of the blood brain barrier (BBB) was evaluated by Evans Blue (EB) staining; The levels of malondialdehyde (MDA) and nitrogen oxide (NO), and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in gastrointestinal tissue were detected by spectrophotometer. **Results** NESTS improved the neurological deficit ($P < 0.05$), reduced the permeability of BBB ($P < 0.05$), decreased the production of MDA and NO in gastrointestinal tissue, and inhibited the increase of SOD and GSH-Px activities ($P < 0.05$). **Conclusion** NESTS could alleviate the MODS caused by brain ischemia-reperfusion in rats, which is partly mediated by its anti-oxidative stress effect.

Key words: seeds of *Toon sinensis*; brain ischemia-reperfusion; multiple organ dysfunction syndrome; anti-oxidative stress; blood brain barrier

多器官功能障碍综合征 (MODS) 是指机体在各种感染、炎症、创伤、休克及大手术等原发病发生 24 h 后, 同时或序贯性地发生两个或两个以上器官或系统功能不全的一种临床综合征, 继续发展可

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81100873); 湖北省卫生厅青年科技人才项目 (QJX2010-27); 三峡大学博士科研启动基金项目 (KJ2008B053)

*通信作者 何治 (1978—), 男, 湖北黄冈人, 博士, 副教授, 主要从事抗脑缺血新药开发及脑缺血基础研究。

E-mail: hezhi2003@163.com

导致多器官功能衰竭。脑血管疾病是目前三大致死疾病之一, 发病率、致死率和致残率有逐年上升的趋势, 其中以缺血性脑血管病占绝大多数。急性脑血管疾病并发 MODS 的发生率为 11%~21%, 病死率高达 41.0%~87.1%^[1]。因此研发有效治疗 MODS 的药物成为当前基础和临床研究急需解决的问题。

香椿子为楝科植物香椿 *Toon sinensis* (A. Juss.) Roem. 的果实, 性温, 味辛苦, 无毒, 入肝、肺经, 具祛风、散寒、止痛之功效, 对胃和十二指肠溃疡、慢性胃炎、慢性萎缩性胃炎、头痛、偏头痛、胸痛等有治疗作用^[2]。香椿子提取物能降低心肌梗死模型大鼠的心肌梗死面积, 该作用与抑制氧化应激及血栓形成有关^[3]。氧化应激及血栓形成均参与了 MODS 的发生、发展过程, 故本实验考察香椿子提取物对脑缺血再灌注引起的大鼠多器官功能障碍综合征的保护作用, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

香椿子, 采集于湖北宜昌三峡地区, 由三峡大学湖北省天然产物研究与利用重点实验室陈超教授鉴定为香椿 *Toon sinensis* (A. Juss.) Roem. 的果实。香椿子正丁醇提取物 (主要成分为多酚和黄酮类), 三峡大学国家中医药管理局中药药理三级实验室制备 (得率 5%), 用 2% 聚山梨酯 80 配成所需浓度; 阿司匹林, 25 mg/片, 河北常山生化药业有限公司。聚山梨酯 80, 天津市大茂化学试剂厂; 水合氯醛, 天津科密欧化学试剂有限公司; 丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒, 南京建成生物工程有限公司。

1.2 动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 250~300 g, 华中科技大学实验动物中心提供, 许可证号: 00015257。

1.3 仪器

瑞士 TECAN GENios Pro 型多功能酶标仪。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠造模前 12 h 禁食不禁水, 参考 Longa 等^[4]的大脑中动脉线栓法 (MCAO) 并予改良制备大鼠持续性局灶性脑缺血模型。10% 水合氯醛 (0.35 mL/100 g) ip 麻醉大鼠, 依次分离右侧颈总动脉以及颈外、颈内和翼鄂动脉, 结扎右侧颈外和翼鄂动脉, 在靠近颈外、颈内动脉分叉处由颈总动脉沿颈

内动脉缓慢插入直径 0.26~0.28 mm 的尼龙栓线, 深度为 1.8~2.0 cm。假手术组栓线插入深度为 1.0 cm, 其余步骤同模型组。持续栓塞 2 h 后拔线再灌注 4 h, 大鼠苏醒后出现血管栓塞的同侧 Horner 征和对侧肢体运动障碍即为模型成功。

2.2 分组与给药

大鼠随机分为 7 组: 正常对照组, 假手术组, 模型组, 溶媒 (2% 聚山梨酯 80) 对照组, 香椿子正丁醇提取物 (NESTS) 低、高剂量 (20、30 mg/kg) 组, 阿司匹林 (10 mg/kg) 阳性对照组, 每组 7 只。各给药组术前每天 ig 给药 1 次, 连续给药 7 d, 正常对照组、假手术组和模型组给予等体积生理盐水, 阿司匹林组 ig 10 mg/kg 的阿司匹林。第 8 天除对照组外, 其余各组按“2.1”项方法造模, 术中保持肛温在 (37±0.5) °C。

2.3 评价指标

2.3.1 神经行为学评分 参考 Longa 等^[4]的 6 级评分法, 在术后 3 h 进行评分: 0 分, 无神经损伤症状; 1 分, 不能完全伸展对侧前爪; 2 分, 向栓塞对侧转圈; 3 分, 向对侧倾倒; 4 分, 不能自发行走, 昏迷; 5 分, 死亡。

2.3.2 伊文思蓝法测定血脑屏障通透性 大鼠手术后 6 h, 尾 iv 2% 伊文思蓝 (3 mL/kg)。30 min 后, 大鼠用 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) ip 麻醉, 开胸, 用肝素化生理盐水 0.25 L/kg 灌注升主动脉, 断头取脑, 称湿质量, 用生理盐水适度匀浆后放入一装有 1 mol/L KOH 溶液 0.5 mL 离心管中, 37 °C 过夜, 用 1 mol/L H₃PO₄ 溶液 0.75 mL 中和碱性, 加入 2.25 mL 丙酮, 3 500×g 离心 3 次, 每次 15 min。取上清液于 620 nm 处测定吸光度 (A) 值, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算每克脑组织中伊文思蓝的量。

2.3.3 胃肠组织中 MDA、NO 量以及 SOD、GSH-Px 活性测定 大鼠手术后 6 h, 用 10% 水合氯醛 (0.35 mL/100 g) ip 麻醉, 取胃和小肠组织, 其余操作均按照相关试剂盒说明书进行。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析及 Fisher LSD 检验。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠神经行为学评分和血脑屏障通透性的影响

与假手术组相比, 造模后各组大鼠的神经行为

学评分、血脑屏障通透性均有不同程度的提高；与模型组比较，香橼子正丁醇提取物及阿司匹林均可使神经行为学评分、血脑屏障通透性不同程度地降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

3.2 对脑缺血再灌注大鼠胃和小肠组织 MDA、NO 的量和 SOD、GSH-Px 活性的影响

与假手术组相比，模型组大鼠胃和小肠组织中 MDA、NO 的量以及 SOD、GSH-Px 活性均显著增加 ($P < 0.01$)；与模型组相比，香橼子正丁醇提取物及阿司匹林可使这 4 项指标不同程度地降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 2 和 3。

4 讨论

脑缺血后神经-体液内分泌系统激活，产生应激反应，各种缩血管物质释放入血，引起诸如肝、肾、胃肠、皮肤等脏器血管收缩，导致这些器官缺血再灌注损伤，引起肠道细菌易位，内毒素入血，同时

表 1 香橼子正丁醇提取物对脑缺血再灌注大鼠神经行为学评分和血脑屏障通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effects of NESTS on neurological deficit score and permeability of BBB in brain ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	神经行为学评分	脑组织中伊文思蓝量 / (μg·g ⁻¹)
正常对照	—	0	16.59 ± 3.28
假手术	—	0	14.23 ± 4.15
模型	—	2.86 ± 1.35**	49.27 ± 10.54**
溶媒对照	—	2.79 ± 0.89	47.99 ± 11.23
香橼子正丁醇	20	2.14 ± 0.69###	41.43 ± 11.59#
提取物	30	1.42 ± 0.53###	28.45 ± 4.22###
阿司匹林	10	1.57 ± 0.53###	30.41 ± 9.43###

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

表 2 香橼子正丁醇提取物对脑缺血再灌注大鼠胃组织中 MDA、NO 的量和 SOD、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effects of NESTS on levels of MDA and NO, and activities of SOD and GSH-Px in gastric tissue of brain ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)	NO / (mol·g ⁻¹)	SOD / (nU·mg ⁻¹)	GSH-Px / (U·mg ⁻¹)
正常对照	—	0.58 ± 0.11	36.87 ± 5.31	15.32 ± 3.67	2 499.98 ± 387.19
假手术	—	0.60 ± 0.09	33.29 ± 6.21	16.65 ± 4.13	2 563.28 ± 400.28
模型	—	1.14 ± 0.35**	67.68 ± 20.18**	19.69 ± 3.28*	3 265.97 ± 632.01**
溶媒对照	—	1.22 ± 0.24	57.94 ± 19.55	19.48 ± 3.98	3 329.78 ± 521.78
香橼子正丁醇提取物	20	0.97 ± 0.11#	44.72 ± 11.27###	17.65 ± 4.11#	2 863.77 ± 199.36#
	30	0.91 ± 0.32#	39.39 ± 10.23###	14.73 ± 2.36###	2 400.84 ± 456.39###
阿司匹林	10	0.82 ± 0.31###	25.40 ± 4.88###	12.87 ± 2.38###	2 630.88 ± 269.87###

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ ，下表同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 3 香橼子正丁醇提取物对脑缺血再灌注大鼠小肠组织中 MDA、NO 的量和 SOD、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effects of NESTS on levels of MDA and NO, and activities of SOD and GSH-Px in intestinal tissue of brain ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)	NO / (mol·g ⁻¹)	SOD / (nU·mg ⁻¹)	GSH-Px / (U·mg ⁻¹)
正常对照	—	0.83 ± 0.21	39.48 ± 6.28	12.11 ± 3.84	3 521.93 ± 400.18
假手术	—	0.75 ± 0.19	41.25 ± 9.37	11.50 ± 3.21	3 652.13 ± 621.28
模型	—	1.22 ± 0.32**	85.29 ± 32.11**	14.60 ± 6.33*	6 523.98 ± 1 203.58**
溶媒对照	—	1.17 ± 0.14	79.54 ± 20.17	14.18 ± 4.10	6 869.33 ± 1 236.42
香橼子正丁醇提取物	20	0.71 ± 0.26###	70.23 ± 15.66#	10.18 ± 2.25###	5 236.11 ± 1 024.27#
	30	0.82 ± 0.30###	58.39 ± 20.38###	10.47 ± 3.21###	4 293.83 ± 1 029.68###
阿司匹林	10	0.90 ± 0.27#	60.69 ± 19.32###	9.80 ± 1.36###	4 328.46 ± 967.34###

免疫系统反应增强, 相继引发炎症级联反应, 进一步加重各脏器的微循环障碍。如果病情没有得到有效控制, 将进一步发展成全身炎症反应综合征 (SIRS), 导致 MODS 的发生^[5]。

缺血性脑血管疾病常导致血脑屏障的受损和破坏, 从而伴发脑水肿, 本实验结果显示, 香椿子正丁醇提取物可降低脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性, 改善大鼠神经行为学评分, 对脑缺血再灌注大鼠发挥神经保护作用。缺血再灌注时的各器官病理损害涉及的病理生理变化比较复杂, 包括兴奋性氨基酸毒性作用、钙超载、氧化应激等^[6]。氧化应激损害是目前广泛认可的 MODS 机制之一。缺血性损伤后, 自由基生成增多, 脂质过氧化产物 MDA 急剧增加, 并伴随对抗自由基引起组织细胞损坏的主要防御工具 SOD、GSH-Px 活性的升高。轻微的缺血损伤可引起 SOD、GSH-Px 基因表达增加, 并对随后更为严重的缺血性损伤起到保护作用^[7], NO 亦是氧自由基重要来源之一。前期研究表明, 香椿子提取物对心肌缺血再灌注组织表现出很强的抗氧化作用, 并可有效降低心肌梗死模型大鼠心肌梗死面积^[8]。本实验结果表明, 香椿子正丁醇提取物能降低缺血再灌注大鼠胃和小肠组织中 MDA、NO 的量, 抑制 SOD、GSH-Px 活性的升高, 表现出良好的抗氧化作用, 故推测香椿子正丁醇提取物的抗氧

化作用可能是其发挥 MODS 保护作用的机制之一。除此之外, 亦可能有其他机制参与香椿子正丁醇提取物的抗 MODS 作用, 因此尚需要进一步研究其毒理、药理作用, 阐明其抗 MODS 的作用机制。

参考文献

- [1] 王拥军, 卢德宏, 崔丽英, 等. 现代神经病学进展 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2001.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 (下册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [3] 陈超, 孙莲芬. 治疗血栓栓塞性疾病的药物及制备方法: 中国, CN200710051223.0 [P]. 2011-06-15.
- [4] Longa Z E, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] 宋小丽, 李卫平. 脑缺血与多器官功能障碍综合征 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(3): 380-382.
- [6] Guo M F, Yu J Z, Ma C G. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia [J]. *Folia Neuropathol*, 2011, 49(2): 78-87.
- [7] Kato H, Kogure K, Araki T, *et al.* Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemia tolerance [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15(1): 60-70.
- [8] 李红月, 陈超. 香椿子总多酚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的干预作用观察 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(1): 58-60.