

余甘子提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制

章江生¹, 吴婷^{2*}, 唐琪晶³, 高建莉³, 陈素红^{3,4}

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052

2. 杭州迪生医药有限公司, 浙江 杭州 310004

3. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

4. 温州医科大学, 浙江 温州 325035

摘要: **目的** 研究余甘子提取物对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制。**方法** 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 余甘子提取物高、中、低剂量(生药 6.0、3.0、1.5 g/kg)组和阳性药组(银杏叶提取物 100 mg/kg), 各给药组每天 ig 给药 1 次, 连续给药 10 d。末次给药后 30 min, 大脑中动脉线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 造模后, 行神经功能学评分, 测定脑梗死面积和脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、诱导性一氧化氮合酶(iNOS)、核转录因子(NF- κ B)的水平。**结果** 与模型组相比, 余甘子提取物能减少局灶性脑缺血再灌注大鼠的神经功能评分和脑梗死面积($P < 0.05$), 提高脑组织 SOD 活性($P < 0.05$), 降低 MDA、NO、IL-1 β 、IL-6、iNOS 和 NF- κ B 的水平($P < 0.05$)。**结论** 余甘子提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用, 其机制可能与抗氧化和抑制炎症有关。

关键词: 余甘子; 脑缺血再灌注; 抗氧化; 炎症; 大脑中动脉线栓法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3590-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.017

Protection of extract from *Phyllanthus emblica* on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism

ZHANG Jiang-sheng¹, WU Ting², TANG Qi-jing³, GAO Jian-li³, CHEN Su-hong^{3,4}

1. Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China

2. Hangzhou Addisun Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310004, China

3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

4. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To study the protection of extract from *Phyllanthus emblica* (EPE) on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism. **Methods** Male SD rats were divided into six groups such as Sham, model, *Ginkgo biloba* extract (100 mg/kg, positive control), low-, mid-, and high-dose (crude drug 6.0, 3.0, and 1.5 g/kg) EPE groups. The rats in the treatment groups were ig administered once daily for 10 d. On day 10 the focal cerebral ischemia-reperfusion rat model was established using middle cerebral artery occlusion method. After the model establishment, the neurological function scores were observed, the infarct size was measured by TTC staining, and the contents of SOD, MDA, NO, IL-1 β , IL-6, iNOS, and NF- κ B in brain tissue were measured. **Results** Compared with the model group, EPE could significantly reduce the neurological function scores ($P < 0.05$), decrease the cerebral infarct size ($P < 0.05$), increase the activity of SOD ($P < 0.05$), and reduce the contents of MDA, NO, IL-1 β , IL-6, iNOS, and NF- κ B ($P < 0.05$) in brain tissue. **Conclusion** EPE has the significant protection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats due to increasing the anti-oxidant activity and inhibiting the inflammatory reaction.

Key words: *Phyllanthus emblica* L.; cerebral ischemia-reperfusion; anti-oxidant; inflammation; middle cerebral artery occlusion

余甘子为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实, 清热凉血、消食健胃、生津止咳; 用于血热血瘀、消化不良、腹胀、咳嗽、喉痛、口干。余甘子果实富含鞣质及有关多元酚类

收稿日期: 2014-03-10

作者简介: 章江生(1976—), 男, 浙江杭州人, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: (0571)87774801 E-mail: wtzjshr@126.com

*通信作者 吴婷(1974—), 女, 浙江杭州人, 工程师。Tel: 13666691312 E-mail: wotinger@126.com

化合物,其量高达 11.4%^[1]。余甘子多酚是余甘子最主要的抗氧化成分,其可以通过抑制诱导性一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)表达以及抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路而降低氧化应激的损伤^[2-3]。此外,余甘子果实还含有黄酮、多糖、三萜、甾醇、脂肪酸、萜醌、维生素、氨基酸、蛋白质等成分^[4]。现代药理学研究表明,余甘子果实具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗突变、抗癌、抗氧化、调血脂、抗动脉粥样硬化、保肝、保护胃肠道、抗辐射及免疫调节等多种活性^[5],是一种具有较高食用和药用价值的野生植物资源。为更好开发利用余甘子植物资源,本研究通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究余甘子提取物对脑组织的保护作用,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,雄性,清洁级,体质量200~250g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(浙)2008-0033。

1.2 药物与试剂

余甘子提取物(含总多酚35%,浙江现代中药与天然药物研究院提供,为50%乙醇提取经树脂纯化,浸膏生药质量浓度为3g/mL);银杏叶提取物(含总黄酮醇苷24%、总萜内酯6%,浙江现代中药与天然药物研究院提供);氯化-2,3,5-三苯基四氮唑(TTC),美国Sigma公司;超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、一氧化氮(NO)检测试剂盒,南京建成生物工程公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 ELISA试剂盒,武汉博士德生物科技有限公司; iNOS 试剂盒,北京邦定泰克生物试剂公司; NF- κ B ELISA 试剂盒,福建迈新生物科技有限公司。

1.3 仪器

美国 Bio-Rad 680 型酶标仪;日本 Shimadzu UV2450 紫外分光光度计;日本日立 CR21G 型高速离心机;德国 Sartorius BP121S 型电子天平。

2 方法

2.1 分组与给药

动物随机分为6组:假手术组,模型组,余甘子提取物高、中、低剂量(生药6.0、3.0、1.5g/kg)组和银杏叶提取物组(阳性药,100mg/kg),每组20只。各组大鼠按所设剂量ig给药,连续10d,每天1次,假手术组和模型组给予等体积生理盐水。

于末次给药后30min造模。

2.2 大鼠脑缺血再灌注模型的制备

参照文献方法^[6]制备大脑中动脉栓塞(MCAO)模型:大鼠麻醉后,仰位固定,颈正中切开,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)。结扎ECA、CCA近心端,在ECA近端备线,用无损伤动脉夹暂时夹闭其远端,在CCA分叉处做一切口,插入栓线,至不能再深入为止,略微回抽,栓线插入深度18~20mm。将栓线固定在ICA上,缝合手术切口,外留1cm长线头,缺血2h后,将栓线外拉,实现再灌注。假手术组仅分离血管,不插线栓。

2.3 神经功能评分

再灌注22h后,按文献方法^[7]对大鼠行为障碍进行分级评分。

2.4 脑梗死面积的测定

在神经功能评分后,即再灌注22h后,每组取10只动物,断头取脑,去除小脑、嗅球和低位脑干,冠状面切4刀,共5片,用0.25% TTC 溶液孵育30min后(37℃,避光),再用10%福尔马林溶液固定4h,取出染色后的脑组织,利用形态分析系统计算梗死面积。

2.5 脑组织各指标的测定

在神经功能评分后,即再灌注22h后,各组取10只大鼠,断头取脑,去掉小脑、嗅球和低位脑干,取手术侧大脑,用预冷的生理盐水(1:9)制成10%脑组织匀浆,4000r/min离心15min,取上清,按试剂盒说明书,对脑组织中SOD、iNOS活性及MDA、NO、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B水平进行测定。

2.6 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0软件进行统计分析,采用Dunnett *t*-test方法进行组间比较。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能评分和脑梗死面积的影响

造模后,各组动物均出现不同程度的神经功能损伤症状,与模型组比较,余甘子提取物高、中剂量组能显著降低大鼠神经功能缺失症状评分($P < 0.01$);低剂量组有降低神经功能评分的趋势,但无显著性差异($P > 0.05$)。脑梗死面积测定结果表明余甘子各剂量组均能显著减少大鼠脑梗死面积($P < 0.05$ 、0.01),呈剂量依赖关系,结果见表1。

表 1 余甘子提取物对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能评分和脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of EPE on neurological function score and infarct size of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	神经功能评分	梗死面积 / %
模型	—	2.8 ± 0.4	29.3 ± 5.2
银杏叶提取物	0.1	1.6 ± 0.5**	22.2 ± 4.5**
余甘子提取物	6.0	1.3 ± 0.5**	18.9 ± 3.8**
	3.0	1.7 ± 0.5**	22.6 ± 4.4**
	1.5	2.3 ± 0.7	24.5 ± 4.4*

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01, 下同
*P<0.05 **P<0.01 vs model group, same as below

3.2 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 SOD 活性和 MDA 水平的影响

模型组大鼠脑组织 SOD 活性显著低于假手术组 ($P<0.01$), MDA 水平显著高于假手术组 ($P<0.01$), 说明缺血再灌注后脑组织抗氧化能力下降。余甘子提取物能显著抑制大鼠脑组织 MDA 的水平, 提高 SOD 的活性, 与模型组比较, 余甘子提取物各剂量组差异显著 ($P<0.05, 0.01$), 且呈剂量依赖关系, 结果见表 2。

表 3 余甘子提取物对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NO、IL-1β、IL-6、iNOS 和 NF-κB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of EPE on levels of NO, IL-1β, IL-6, iNOS, and NF-κB in brain tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	IL-1β / (pg·mg ⁻¹)	IL-6 / (pg·mg ⁻¹)	NO / (nmol·mg ⁻¹)	iNOS / (U·mg ⁻¹)	NF-κB / (pg·mg ⁻¹)
假手术	—	52.65 ± 11.95	43.35 ± 6.13	2.03 ± 0.59	1.96 ± 0.42	238.1 ± 38.4
模型	—	102.68 ± 23.62 ^{###}	136.12 ± 24.28 ^{###}	4.68 ± 0.84 ^{###}	4.15 ± 0.96 ^{###}	508.2 ± 78.0 ^{###}
银杏叶提取物	0.1	81.51 ± 18.57*	95.74 ± 19.81**	3.58 ± 0.69**	2.79 ± 0.45**	350.6 ± 55.7**
余甘子提取物	6.0	64.13 ± 70.07**	89.94 ± 13.62**	3.35 ± 0.59**	2.55 ± 0.68**	312.0 ± 47.5**
	3.0	78.52 ± 19.31*	99.56 ± 18.90**	3.63 ± 0.66**	2.76 ± 0.64**	344.1 ± 50.0**
	1.5	92.58 ± 17.36	118.36 ± 18.27	4.07 ± 0.82	3.26 ± 0.56*	451.1 ± 65.1

4 讨论

大脑中动脉是脑卒中的多发部位, 在脑梗死患者中, 大脑中动脉主干分布区梗死占 82.2%, 因此, 阻断大脑中动脉造成局灶性脑缺血模型被认为是一种理想的动物模型。再灌注是加重脑组织损伤的重要原因, 由此产生的自由基连锁反应是脑缺血再灌注损伤的核心环节^[8]。活性氧不但可引起脂质过氧化及膜降解, 直接破坏 DNA、蛋白质, 促进多糖分子聚合和降解^[9], 还会通过影响下游信号通路, 诱导大量的炎症因子表达, 造成二级损伤, 加重脑

表 2 余甘子提取物对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of EPE on SOD activity and MDA level in brain tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	SOD / (U·mg ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
假手术	—	190.69 ± 30.24	13.95 ± 2.39
模型	—	138.71 ± 22.19 ^{###}	28.82 ± 4.13 ^{###}
银杏叶提取物	0.1	168.45 ± 24.07**	22.35 ± 5.12**
余甘子提取物	6.0	172.80 ± 24.07**	19.55 ± 3.49**
	3.0	162.01 ± 21.54*	22.05 ± 5.29**
	1.5	157.96 ± 16.98*	24.25 ± 4.38*

与假手术组比较 ^{###}P<0.01, 下同
^{###}P<0.01 vs Sham group, same as below

3.3 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NO、IL-1β、IL-6、iNOS、NF-κB 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 NO、IL-1β、IL-6、iNOS、NF-κB 水平均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 余甘子提取物高、中剂量组均可明显降低 NO、IL-1β、IL-6、NF-κB 的水平 ($P<0.05, 0.01$), 余甘子提取物高、中、低剂量组均可明显降低 iNOS 的水平, 结果见表 3。

损伤程度^[10]。因此, 氧化应激和炎症反应是脑缺血再灌注过程中联系密切的两个病理过程。

SOD 是内源性抗氧化系统组成之一, 对再灌注损伤过程中大量产生的氧自由基有很好的清除作用, 过量表达 SOD 可显著减小缺血再灌注大脑的梗死面积^[11]。本研究结果表明余甘子提取物可以显著增加缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 SOD 的活性, 降低脂质过氧化物 MDA 的水平, 改善动物的神经功能症状, 减少脑组织的梗死面积, 提示余甘子提取物对抗脑缺血再灌注脑损伤可能与其抗氧化作

用有关。

另一方面,炎症反应加重了缺血再灌注脑组织和神经的损伤^[12]。NF- κ B 是一种存在于真核细胞中的转录因子,在脑缺血再灌注损伤中,可被活性氧激活,向核内转录,并在活性氧诱导炎症因子表达的通路中起到枢纽作用^[10]。NF- κ B 被激活后,iNOS 的表达量大量增加^[13]。另有研究证实,脑缺血过程中,iNOS 在胶质细胞中的表达依赖于 NF- κ B 的转录^[14]。在缺血中后期,缺血脑组织中的巨噬细胞、单核细胞、胶质细胞通过诱导表达 iNOS^[15],产生大量具有细胞毒性的 NO,与氧自由基生成毒性强大的 ONOO⁻,导致脑组织出现持久性的损伤,进一步促进半暗带转变为梗死区。本研究结果发现,脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NF- κ B 的活性被激活,其调控通路下游 iNOS 的表达量明显增加,产生了大量 NO 自由基和炎症因子 IL-1 β 、IL-6,使模型组大鼠脑损伤和神经损伤程度进一步加剧。余甘子提取物通过抑制 NF- κ B 的活性,并改善缺血脑组织的炎症反应,从而发挥脑组织保护作用。这一结果与 Yokozawa 等^[2]的研究结果一致。

综上所述,余甘子提取物对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用机制可能为提高机体的抗氧化能力,减少由氧化应激带来的一级损伤;干预氧化应激下游的炎症损伤途径,减少由炎症反应带来的二级损伤,从而双管齐下,发挥脑组织保护作用。

参考文献

- [1] 孙忠文,刘汉清,黄一平,等.藏药余甘子中总鞣质和没食子酸的含量测定 [J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(3): 60-62.
- [2] Yokozawa T, Kim S H, Kim H J, et al. Amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) attenuates age-related renal dysfunction by oxidative stress [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(19): 7744-7752.
- [3] Jeena K J, Ramadasan K. Hepatoprotective activity of *Emblica officinalis* and chyavanaprash [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(1/2): 135-140.
- [4] 刘延泽,李海霞,许利嘉,等.药食兼用余甘子的现代研究概述及应用前景分析 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1700-1706.
- [5] 杨万政,刘新帅,白音夫.中国余甘子果实化学成分初步研究(一) [J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(5): 37-38.
- [6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] 徐淑云. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [8] 吴常青,汪春彦,邵旭,等.补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 114-117.
- [9] Silvestrelli G, Corea F, Paciaroni M, et al. The Perugia hospital-based Stroke Registry: report of the 2nd year [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2002, 24(7/8): 485-491.
- [10] Chan P H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(1): 2-14.
- [11] Wang Q, Tang X N, Yenari M A. The inflammatory response in stroke [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1/2): 53-68.
- [12] Kim G W, Kondo T, Noshita N, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals [J]. *Stroke*, 2002, 33(3): 809-815.
- [13] Togashi H, Sasaki M, Frohman E, et al. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(6): 2676-2680.
- [14] Dong K N, Xu W, Yang J, et al. Neuroprotective effects of tanshinone II_A on permanent focal cerebral ischemia in mice [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(5): 608-613.
- [15] Zhu D Y, Liu S H, Sun H S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1): 223-229.