

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.017

## 熊果苷对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响

张永刚<sup>1</sup> 蒋淑丽<sup>1</sup> 任志明<sup>1</sup> 赵剑波<sup>1</sup> 邵伟<sup>2△</sup>

(1 平邑县中医医院 山东 临沂 273300; 2 滨州医学院附属医院神经内科 山东 滨州 256603)

**摘要 目的:**本研究旨在探讨中药熊果苷对缺血再灌注损伤后脑细胞的影响,为中药熊果苷的临床应用提供理论依据。**方法:**昆明种小鼠 40 只,随机分成 4 组,即空白组、模型组、药物预防组和药物治疗组。根据缺血时脑损伤原理制成脑缺血再灌注损伤模型,以 TTC 染色、HE 染色观察细胞形态学变化,并检测脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的变化。**结果:**与模型组相比,药物预防组和药物治疗组分别 TTC 染色缺血区域都不如模型组坏死明显,HE 染色显示细胞损伤程度减轻,SOD、GSH-Px 活性提高有显著性差异,MDA 含量减少(均  $P < 0.05$ )。**结论:**药物熊果苷具有抗氧化作用,能有效地预防和保护脑细胞损伤。

**关键词:**小鼠;脑缺血再灌注损伤;抗氧化作用;熊果苷

**中图分类号:**R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1464-03

## The Effect of Arbutin on Mice Brain Cells after Ischemia-reperfusion Injury

ZHANG Yong-gang<sup>1</sup>, JIANG Shu-li<sup>1</sup>, REN Zhi-ming<sup>1</sup>, ZHAO Jian-bo<sup>1</sup>, SHAO Wei<sup>2△</sup>

(1 Pingyi County Chinese Medicine Hospital, Linyi, Shandong, 273300, China;

2 Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong, 256603, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of Arbutin on mice cerebral cells after ischemia-reperfusion injury, and provide a theoretical basis for clinical application of arbutin. **Methods:** Mice were randomly divided into four groups which were sham operation group, ischemia reperfusion group, and two Arbutin groups (the chemoprophylaxis group and the medication group). The TTC staining changes and the histological changes of brain tissue after ischemia-reperfusion injury in mice were detected. The content of malonic dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in brain tissue were also determined. **Results:** There was vitality injury after TTC staining (all  $P < 0.05$ ). SOD and GSH-Px, the antioxidant targets, significantly increased, while MDA decreased in the treatment group compared with that in the model group. **Conclusions:** Arbutin can effectively protect the mice brain cells with the effect of anti-oxidation.

**Keywords:** Mice; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Antioxidation; Arbutin

**Chinese Library Classification(CLC):** R743.3 **Document code:**A

**Article ID:** 1673-6273(2014)08-1464-03

### 前言

脑血管疾病是危害人类生命和健康的主要疾病之一,血栓栓塞性疾病是老年人的常见病,而栓塞后血液再通往往带来更严重的问题,导致氧自由基的大量生成,加重脑损伤程度。因此能够对抗氧自由基生成的药物可能会减轻脑组织的缺血再灌注损伤。熊果苷(arbutin,又名熊果甙、熊果素、熊果叶甙、熊果酚甙或杨梅甙),是一种源于杜鹃花科熊果属的多年生常绿小灌木植物熊果的叶子细胞的皮肤脱色成份。近年来,国内熊果苷的生产和相关化妆品的开发有了迅速的发展,国外对熊果苷的研究和开发更为深入,并取得了许多进展。已经证明熊果苷有抗炎<sup>[12]</sup>、镇咳、平喘<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗溃疡<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>及抗精子细胞冷冻损伤<sup>[7]</sup>等作用。本实验以药物熊果苷的抗氧化作用为依

据,探讨其对缺血损伤脑细胞的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物与分组

昆明种小鼠(山东省绿叶制药有限公司实验动物中心提供) 60 只,雌雄各半,体重(20±2)g。动物随机分为 4 组,即假手术组、模型组(I/R)、药物预防组和药物治疗组,各 15 只。

#### 1.2 药品与仪器

熊果苷:上海晶纯试剂有限公司;水合氯醛:分析纯,上海化学试剂公司;SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、GSH-PX 试剂盒、总蛋白测定盒(均由南京建成生物工程研究所提供)。

AL104 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),DZF-6050 型电子真空干燥箱(上海精宏试验设备有限公司),雷勃尔高速冷冻离心机(上海安亭仪器厂);DW-HL328 -86℃ 超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司);Spectra Max M5 多功能酶标仪(美国分子仪器公司);752 紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

#### 1.3 实验方法

作者简介:张永刚(1970-),男,副主任医师,在读研究生,研究方向:普通外科、神经外科,E-mail: jchdbj-1@163.com

△通讯作者:邵伟(1978-),男,主治医师,硕士研究生,研究方向:神经外科,电话:13188720076

(收稿日期:2013-08-05 接受日期:2013-08-30)

**1.3.1 制备脑缺血再灌注模型** 假手术组动物仅用玻棒小心分离双侧迷走神经和颈总动脉,不夹闭颈总动脉,暴露 3h 后快速断头开颅取脑。模型组和给药组动物均按文献方法<sup>[8-9]</sup>复制脑缺血再灌注模型:用 4%水合氯醛按 0.1 mL/10g 体重的剂量腹腔注射麻醉动物,颈部正中切口,用玻棒小心分离迷走神经,用动脉夹夹闭双侧颈总动脉 1 h,放开动脉夹恢复脑供血,再灌注 2 h 后快速断头开颅取脑。药物预防组在麻醉前 1 h 腹腔注射 1%熊果苷溶液(100 mg/kg),麻醉后复制脑缺血再灌注模型,再灌注完成后颈椎脱臼处死,取脑。药物治疗组在再灌注时腹腔注射 1%药物熊果苷溶液(100 mg/kg),再灌注完成后颈椎脱臼处死,取脑。脑组织于 -4℃ 生理盐水中洗净,用吸水纸吸干称重后,分别做 TTC 染色、HE 染色和测定脑组织中。取大脑左半球组织作组织标本,置于 4%中性福尔马林固定液中,4℃ 下固定 24 小时以上。将固定好的脑组织,进行 HE 染色,制成光镜标本,观察脑组织病理学改变;切取大脑右侧前 1/2 半球,制成 10%的脑组织匀浆,按试剂盒方法分别测定脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。

**1.3.2 TTC 染色** 脑块置冰箱(-20℃)内 10 分钟后,自距额极 2 mm 开始,以视交叉水平为中心,间隔 2 mm 做连续冠状切片(片厚约 2 mm),每个脑块切 5 片,迅速置于 2%TTC 溶液(37℃)中染色避光孵育 30 min 左右。观察缺血区范围。

**1.3.3 HE 染色** 取大脑左半球组织作组织标本,置于 4%中性福尔马林固定液中,4℃ 下固定 24 小时以上。将固定好的脑组织,进行 HE 染色,制成光镜标本,观察脑组织病理学改变。

**1.3.4 脑组织 SOD 活性、MDA 含量及 GSH-Px 活性的测定** 切取大脑右侧前 1/2 半球,制成 10%的脑组织匀浆,按试剂盒方法分别测定脑组织中 SOD 活性、MDA 含量及 GSH-Px 活性。

#### 1.4 统计学方法

统计处理用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,计量资料数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

表 1 熊果苷对脑细胞 SOD 活性、MDA 含量、GSH-Px 活性的影响

Table 1 Changes of SOD activity, MDA content, GSH-Px activity of brain cells in each group

| Groups                     | SOD activity<br>(U/mgprot) | MDA content<br>(nmol/mgprot) | GSH-Px activity<br>(U/mgprot) |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Sham operation group       | 27.5984± 0.3254            | 3.4462± 0.7537               | 2.5601± 0.4485                |
| Ischemia-reperfusion group | 12.5486± 0.5846*           | 8.7096± 0.9792*              | 1.3426± 0.3247*               |
| Chemoprophylaxis group     | 24.2111± 0.2516▲           | 1.7564± 0.3876▲              | 1.8770± 0.3398▲               |
| Medication group           | 22.4359± 0.1692▲           | 2.0670± 0.4064▲              | 2.1001± 0.8879▲               |

## 3 讨论

脑血管疾病是危害人类生命和健康的主要疾病之一,血栓栓塞性疾病是老年人的常见病,而栓塞后血液再通往往带来更严重的问题,导致氧自由基的大量生成,加重脑损伤程度。脑缺血预处理可以诱导脑组织缺血耐受,通过启动一系列的内源性

## 2.1 形态学变化

模型组 TTC 染色结果明显,表现为弥漫性皮下梗死,药物治疗组和预防组与正常对照组相比有一些皮下梗死,但相比模型组明显减少。模型组 HE 染色与正常对照组相比表现为明显的核固缩,出现大量圆泡,毛细血管有出血,细胞损伤严重,而药物治疗组与模型组相比有明显的改善。见图 1。

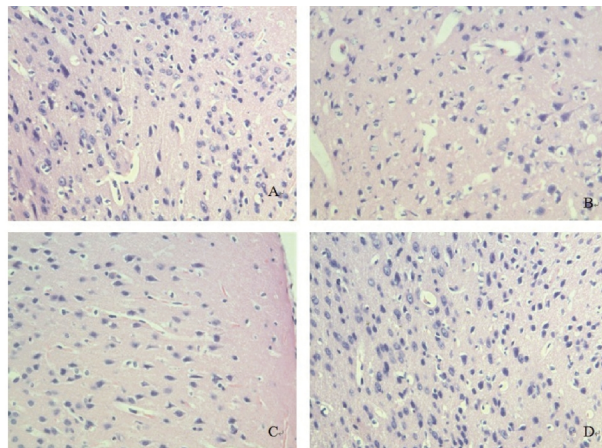


图 1 熊果苷对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 HE 染色(× 400)

A 假手术组 B 模型组 C 熊果苷预防组 D 熊果苷治疗组

Fig.1 The effect of Arbutin on mice brain cells after Ischemia-reperfusion injury HE staining(× 400)

A sham operation group B ischemia-reperfusion group

C Arbutin chemoprophylaxis group D Arbutin medication group

## 2.2 熊果苷对脑细胞 SOD 活性、MDA 含量、GSH-Px 活性的影响

缺血损伤模型组小鼠脑皮层中 SOD、GSH-Px 活力均明显低于正常对照组,熊果苷治疗组和预防组脑细胞中 SOD、GSH-Px 活力比缺血损伤模型组明显提高( $P < 0.05$ ),MDA 含量明显升高。熊果苷药物治疗组和预防组小鼠脑皮层中 MDA 含量相对于缺血损伤模型组含量明显降低,说明药物熊果苷对小鼠脑细胞缺血损伤有确切的治疗和预防作用(见表 1)。

保护机制脑组织对以后较长时间的缺血损伤产生显著的耐受。Moncayo 等的研究发现 TIA 发作病史与脑梗死的良好预后具有相关性,病前无 TIA 病史的脑梗死患者病情更严重,神经功能缺损更明显<sup>[10]</sup>。但以缺血为预处理的方法很难应用于人体,药物预处理的提出,使寻找一种能启动和促进内源性保护机制的方法成为国内外一个研究热点。

缺血再灌注损伤是指机体器官缺血一定时间后再恢复血液灌注,组织损伤反而进行性加重<sup>[1]</sup>。脑正常的功能活动依赖足量的氧和葡萄糖。脑缺血时 ATP 合成减少,离子泵功能部分失效,导致细胞内游离的  $\text{Ca}^{2+}$  超载,再灌注时使自由基生成增多,引起膜脂质过氧化,导致细胞膜损伤,线粒体功能障碍,引起细胞溶解和组织水肿。SOD 是一种重要的内涵性金属酶,催化超氧自由基( $\text{O}_2^-$ )歧化为过氧化氢,而 GSH-Px 进一步将过氧化氢转化成水,从而清除体内的超氧自由基。当机体清除自由基的功能下降时,化学性质活泼的自由基就会与细胞生物大分子迅速发生作用导致强烈损害,其中氧自由基能使不饱和脂肪酸氧化成过氧化物(如 LPO),该过氧化物又可进一步分解为 MDA,MDA 具有很强的生物毒性,极易与磷脂、蛋白质等发生反应而致使机体功能的障碍。脑缺血时脂质过氧化活跃,MDA 生成增多,SOD 则因大量消耗而减少。因而 MDA 含量、SOD 活性可间接反映机体清除氧自由基的能力<sup>[2]</sup>。MDA 的高低也间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。除了脂质过氧化之外,细胞凋亡在脑缺血再灌注损伤的发生发展过程中也起着重要的作用<sup>[3]</sup>。能够抑制促凋亡基因 Bax 表达和促进抑凋亡基因 Bcl-2 表达的药物,对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。

本实验中模型组 TTC 染色结果明显,表现为弥漫性皮下梗死,药物治疗组和预防组与正常对照组相比有一些皮下梗死,但相比模型组明显减少,可以说明药物熊果苷有一定的治疗和预防作用。模型组 HE 染色与正常对照组相比表现为明显的核固缩,出现大量圆泡,细胞损伤严重,而药物治疗组与模型组相比有明显的改善。本实验对小鼠脑组织内抗氧化物的研究表明,熊果苷显著提高脑组织内 SOD 与 GSH-Px 活力,同时降低 MDA 含量,降低组织内脂质过氧化水平,说明药物熊果苷能通过提高脑组织中内源性的抗氧化体系来提高自身的抗氧化能力,进而起到保护作用。本实验中不同熊果苷组 MDA 含量、SOD 活性和 MDA/SOD 比值均明显高于模型组,其中药物治疗组更明显,提示熊果苷能够降低脑组织中 MDA 含量和提高 SOD 活性,降低 MDA/SOD 的比值,从而改善自由基与清除自由基酶之间的平衡,抑制自由基的损伤及其引起的脂质过氧化反应,保护脑组织免受损伤。

综上所述,熊果苷对小鼠缺血再灌注脑损伤起到一定的保护作用,其主要作用机制可能是熊果苷提高脑组织中内源性的抗氧化体系来提高自身的抗氧化能力,进而保护缺血再灌注引起的脑组织损伤。熊果苷对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制是否与抑制细胞凋亡、减少 IL-1 等炎症细胞因子或核转录因子表达有关尚待进一步研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(8): 817-825
- [2] 王佩,赖瑛,吴锡铭,等.熊果苷抗炎作用的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(9): 1933-1935  
Wang Pei, Lai Ying, Wu Xi-ming, et al. Research on anti-inflammation effects of arbutin [J]. *Chinese archives of traditional Chinese medicine*, 2008, 26(9): 1933-1935
- [3] 王亚芳,周宇辉,张建辉.熊果苷镇咳、祛痰及平喘的药效学研究[J]. *中草药*, 2003, 34(8): 739-741  
Wang Ya-fang, Zhou Yu-hui, Zhang Jian-hui. Pharmacodynamics of arbutin on relieving cough, dispelling phlegm and preventing asthma [J]. *Chinese traditional and herbal drugs*, 2003, 34(8): 739-741
- [4] Dong Q, Zhang CJ, Zhou HB, et al. The study of arbutin against the damage caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in ECV-304 cells [J]. *Journal of Hebei medical university*, 2005, 8(2): 142-144
- [5] Taha MM, Salga MS, Ali HM, et al. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. [J]. *Ethnopharmacol.*, 2012, 141(1): 273-281
- [6] Li H, Jeong YM, Kim SY, et al. Arbutin inhibits TCCSUP human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p21 [J]. *Pharmazie*, 2011, 66(4): 306-309
- [7] Aboagla EM, Maeda T. Arbutin's suppression of cryodamage in goat sperm and its mechanism of cryoprotection [J]. *Theriogenology*, 2011, 76(3): 538-46
- [8] 赵雍,杜贵友,崔海峰,等.复方葛根素对脑缺血损伤保护的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(7): 548-551  
Zhao Yong, Du Gui-you, Cui Hai-feng, et al. Experimental study of protective effect of pueraria compound on the cerebral ischemic injury [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(7): 548-551
- [9] 马丛,王蕾.小鼠脑缺血再灌注模型方法及中药的药理作用[J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(2): 280-282  
Ma Cong, Wang Lei. Method of Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion in Mice and Pharmacological Effect of TCM [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2008, 26(2): 280-282
- [10] Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, et al. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect [J]. *Neurology*, 2000, 54(11): 2089
- [11] Zhang S, Li H, Yang SJ. Tribulosin protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(6): 671-678
- [12] 方芳,王婉灵,余木宜,等.后适应对大鼠实验性局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(4): 476-479  
Fang Fang, Wang Wan-ling, Yu Shu-yi, et al. Effect of ischemic postconditioning on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2007, 23(4): 476-479
- [13] 张雪,姚文龙,邱瑾,等.全脑缺血再灌注损伤大鼠海马区 skp2 的表达变化[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2011, 40(5): 542-545  
Zhang Xue, Yao Wen-long, Qiu Jin, et al. Neuron protective effect of qingre huayu prescription preconditioning on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Acta medicinae universitatis scientiae et technologiae huazhong*, 2011, 40(5): 542-545
- [14] 肖峰,周晓清,李元涛,等.异丙酚对大鼠缺血再灌注海马区 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2010, 39(1): 115, 119  
Xiao Feng, Zhou Xiao-qing, Li Yuan-tao, et al. The effect of propofol on Bax and Bcl-2 expression in rat hippocampi following ischemic brain damage [J]. *Acta medicinae universitatis scientiae et technologiae huazhong*, 2010, 39(1): 115, 119