

葡萄籽原花青素预处理对幼龄小鼠深低温脑缺血/再灌注损伤的保护作用

王怡悦 何侃 叶芊

【摘要】 目的 探讨葡萄籽原花青素 (grape seed proanthocyanidin extract, GSPE) 预处理对小鼠脑缺血/再灌注损伤保护作用机制。**方法** 120 只 3 周龄 C57/BL6 小鼠随机分成 3 组:假手术组、模型组、GSPE 组 (每组再分为缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24、72 小时,4 个亚组, $n=10$),GSPE 组灌胃给药 2 mL/10 g (100 mg/kg),每天 1 次,共 2 周;同时假手术组与模型组给予等量双蒸水。GSPE 组于术前 30 分钟最后 1 次灌胃给药,模型组与假手术组则给予同体积双蒸水。分别于再灌注后 1、6、24、72 小时处死小鼠取脑,检测各组各时间点脑组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malonyldialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-px) 含量, TUNEL 法检测小鼠大脑皮层细胞凋亡。组间各时间点比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 法两两比较。**结果** GSPE 组在再灌注后 1、6、24 小时 SOD、GSH-px 均明显高于模型组 ($P<0.05$),GSPE 组 MDA 在 1、6、24 小时均高于假手术组 ($P<0.05$),但在 6、24 小时均低于模型组 ($P<0.05$);与假手术组比较模型组和 GSPE 组于再灌注各时间点均出现明显的病理凋亡 ($P<0.05$),GSPE 组各时间点病理凋亡均显著低于模型组 ($P<0.05$)。**结论** GSPE 可能通过诱导 SOD、GSH-Px 生成,清除 MDA,对深低温缺血再灌注脑起保护作用。

【关键词】 葡萄籽原花青素; 脑缺血再灌注; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛; 凋亡

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.09.005

作者单位: 210023 南京特殊教育师范学院康复科学学院

作者简介: 王怡悦 (1985-), 女, 硕士, 助教, 主治医师。研究方向: 深低温缺血再灌注脑保护。E-mail: yiyuew@163.com

通信作者: 何侃 (1963-), 女, 本科, 教授。研究方向: 特殊儿童心理康复。E-mail: 952729825@qq.com

Protection of rape seed proanthocyanidin extract on cerebral ischemia-reperfusion induced by deep hypothermia in mice WANG Yiyue, HE Kan, YE Qian. *Rehabilitation academy of sciences, Nanjing Normal University Of Special Education, Nanjing 210023, China*

【Abstract】 Objective To determine the protection mechanism of Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on rat model of cerebral ischemia/reperfusion (I/R) induced by deep hypothermic. **Methods** 120 three-week-old C57/BL6 mice were randomly divided into sham operation group, model group and GSPE group. Each group was redistributed into four subgroup of 1, 6, 24, 72h. The GSPE group was gavage with grape seed proanthocyanidin extract 2 ml/10 g (100 mg/kg), once a day for two weeks; while the sham group and model group was given the same amount of double-distilled water. The last intragastric administration were 30min before surgery, the model group and the sham group was treated with the same volume of double-distilled water. SOD, MDA, GSH-Px was detected in each time point, and the apoptotic level of cerebral cells was detected by Tunel staining. ANOVA and Bonferroni pairwise comparison method was used to compare each time point between the groups. **Results** SOD, GSH-px in GSPE group was significantly higher than those in the model group at different time points in reperfusion ($P < 0.05$), MDA in GSPE group were higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$) in 1, 6, 24h, but lower than those in the model group in 6, 24h ($P < 0.05$); compared with the sham operation group, the pathologic apoptosis was significantly in reperfusion at each time point in model group and GSPE group ($P < 0.05$), compared with the model group, the pathologic apoptosis in GSPE group at each time point was alleviated ($P < 0.05$). **Conclusion** GSPE has a protective effect against deep hypothermic cerebral I/R injury through inducing SOD, GSH-Px and eliminating MDA.

【Key words】 Grape seed proanthocyanidin extract; Cerebral ischemia-reperfusion; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Malonyldialdehyde; Apoptosis

在小儿复杂先天性心脏病外科手术中往往需要采用深低温停循环或深低温低流量技术,但如果时间较长,均会造成不同程度的神经系统后遗症。葡萄籽原花青素 (grape seed proanthocyanidin extract, GSPE) 是存在于葡萄中的一种天然植物多酚,是一种天然的抗氧化剂,具有强大的对抗氧化应激及减少细胞凋亡作用^[1]。通过建立幼龄小鼠深低温缺血/再灌注模型,并检测各组各时间点小鼠脑组织细胞凋亡及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malonyldialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-px) 含量,探讨 GSPE 对脑损伤的影响及可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

3 周龄雌性健康 C57BL6 小鼠 120 只,体质量 15 ~ 17 g (南京大学模式动物研究所,13B6547); GSPE (美国隆思达公司,LS136011); 便携式铂电阻数字温度计 JM624 (天津今明仪器有限公司); SOD、MDA、NO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 细胞凋亡 (TUNEL) 检测试剂盒 (南京凯基生物发展公

司)。

1.2 实验动物分组及给药

小鼠 120 只,随机分成 3 组:假手术组、模型组、GSPE 组 (每组再分为缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24、72 小时,4 个亚组, $n = 10$)。GSPE 组灌胃给药 2 mL/10 g (100 mg/kg), 每天 1 次,共 2 周;同时假手术组与模型组给予等量双蒸水。GSPE 组于术前 30 分钟最后 1 次灌胃给药,模型组与假手术组则给予同体积双蒸水。灌胃给药过程中假手术组与 GSPE 组各死亡 1 只小鼠,模型组死亡 2 只小鼠。

1.3 模型制备

术前小鼠禁食 12 小时,禁水 4 小时,10% 水合氯醛 0.3 mL/10 g 腹腔注射麻醉小鼠,将铂电阻数字温度计探头插入小鼠肛门 1 cm 深处,将小鼠置于冰盒中,降温至 $(18.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,每分钟体温下降不超过 0.5°C 。将小鼠置于解剖台上固定四肢,取颈部正中切口,解剖游离两侧颈总动脉,予无创动脉夹阻断两侧颈总动脉,120 分钟后开放血流,将小鼠放置新生儿暖箱中复温,每分钟体温恢复不超过 0.5°C ,在 30 分钟内将体温逐渐恢复至 32°C 并至复苏。假手术组除不阻断颈总动脉和不予用药外,其余操作同前。本手术模型的可靠性在先前实验中

已得到验证^[2]。模型制备过程中,假手术组死亡 1 只小鼠,模型组死亡 3 只小鼠,GSPE 组死亡 2 只小鼠。

1.4 检测方法

SOD、MDA、GSH-px 测定及脑细胞凋亡测定:分别在再灌注后各个时间点将小鼠断头处死,取出新鲜脑组织,用生理盐水洗净后投入液氮冻存用于测定 SOD、MDA、GSH-px,各指标检测方法均按试剂盒说明。同时用 TUNEL 法检测各时间点小鼠大脑皮层脑组织细胞凋亡,细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI) = (凋亡细胞数 ÷ 细胞总数) × 100%。

1.5 统计学处理

计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,假手术组、模型组、GSPE 组间各时间点比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 法两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠脑组织 SOD 含量变化

模型组 SOD 在缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24、

72 小时均明显低于假手术组 ($P < 0.01$); GSPE 组 SOD 在缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24 小时点低于假手术组 ($P < 0.05$),但高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 小鼠脑组织 GSH-px 含量变化

模型组 GSH-px 在各时间点均明显低于假手术组 ($P < 0.05$),而 GSPE 组虽在缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24 小时低于假手术组 ($P < 0.05$),但显著高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 小鼠脑组织 MDA 含量变化

模型组 MDA 在缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24 小时均高于假手术组 ($P < 0.01$),GSPE 组 MDA 在缺血 120 分钟再灌注后 1、6、24 小时均高于假手术组 ($P < 0.05$),但在缺血 120 分钟再灌注后 6、24 小时均低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 小鼠脑细胞凋亡测定

与假手术组比较,模型组与 GSPE 组小鼠脑组织在缺血 120 分钟再灌注后 6、24 小时即出现明显凋亡 ($P < 0.01$),而 GSPE 组小鼠在缺血 120 分钟再灌注后 6、24 小时脑组织凋亡均明显轻于模型组 ($P < 0.05$)。见表 4、图 1。

表 1 各组小鼠各时间点脑组织 SOD 含量 ($\bar{x} \pm s$, UN/mg protein)

| 组别 | <i>n</i> | 缺血 120 分钟 再灌注后 1 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 6 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 24 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 72 小时 |
|--------|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 9 | 232.4 ± 3.4 | 223.1 ± 3.9 | 210.2 ± 4.5 | 220.2 ± 3.1 |
| 模型组 | 7 | 180.7 ± 3.9 ^c | 171.3 ± 4.1 ^c | 163.5 ± 2.8 ^c | 159.5 ± 2.7 ^c |
| GSPE 组 | 8 | 207.4 ± 2.5 ^{ab} | 198.5 ± 3.2 ^{ab} | 186.7 ± 3.9 ^{ab} | 230.7 ± 3.6 |

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与假手术组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

表 2 各组小鼠各时间点脑组织 GSH-px 含量 ($\bar{x} \pm s$, UN/mg protein)

| 组别 | <i>n</i> | 缺血 120 分钟 再灌注后 1 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 6 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 24 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 72 小时 |
|--------|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | 9 | 10.2 ± 3.4 | 10.1 ± 2.2 | 9.9 ± 3.2 | 10.4 ± 2.8 |
| 模型组 | 7 | 8.0 ± 1.9 ^c | 7.3 ± 4.1 ^c | 6.0 ± 2.8 ^c | 9.2 ± 2.7 ^b |
| GSPE 组 | 8 | 8.9 ± 2.5 ^{ab} | 8.3 ± 1.5 ^{ab} | 7.7 ± 3.1 ^{ab} | 9.8 ± 2.1 |

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与假手术组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

表 3 各组小鼠各时间点脑组织 MDA 含量 ($\bar{x} \pm s$, nmol/mg)

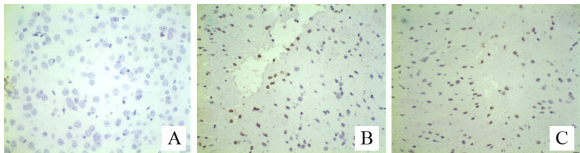
| 组别 | <i>n</i> | 缺血 120 分钟 再灌注后 1 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 6 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 24 小时 | 缺血 120 分钟 再灌注后 24 小时 |
|--------|----------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | 9 | 15.4 ± 2.9 | 16.1 ± 2.5 | 16.1 ± 3.1 | 15.3 ± 2.3 |
| 模型组 | 7 | 19.2 ± 2.1 ^c | 22.8 ± 1.3 ^c | 24.8 ± 3.1 ^c | 16.0 ± 3.4 |
| GSPE 组 | 8 | 19.0 ± 3.2 ^b | 18.5 ± 3.1 ^{ab} | 19.6 ± 2.8 ^{ab} | 15.8 ± 3.6 |

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与假手术组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

表 4 各组小鼠脑组织缺血 120 分钟再灌注后 6、24 小时凋亡指数($\bar{x}\pm s, \%$)

| 组别 | 缺血 120 分钟再灌注后 6 小时 | 缺血 120 分钟再灌注后 24 小时 |
|--------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 4.98±2.01 | 5.06±2.17 |
| 模型组 | 55.15±3.56 ^c | 60.86±4.68 ^c |
| GSPE 组 | 41.52±4.02 ^{ac} | 46.92±3.18 ^{ac} |

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与假手术组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。



注:A:假手术组;B:模型组;C:GSPE 组

图 1 各组大脑皮层 TUNEL-staining 结果(TUNEL×40)

3 讨论

尽管深低温具有脑保护作用^[3],但长时间缺血后再灌注对脑组织损伤仍不可避免。本实验模型接近于临床心脏直视手术中 DHLF 时脑缺血再灌注状况,可明显损伤脑组织,且与细胞凋亡有关^[2]。本实验 TUNEL-staining 结果显示模型组在再灌注 6 小时后凋亡明显,而 GSPE 组再灌注 6 小时后与模型组比较凋亡明显减少,提示 GSPE 可以减轻缺血再灌注损伤。

脑缺血再灌注损伤机制十分复杂,近年来人们逐渐证实自由基连锁反应是脑缺血病理反应中的核心环节。自由基是机体正常代谢产物,在机体多种生理活动中是不可缺少的。但如果自由基过多堆积,超出机体抗氧化系统拮抗能力时就可损伤正常组织功能。缺血后再灌注可以使自由基连锁反应激化,加重缺血损伤^[4]。SOD 可有效地清除自由基反应的启动因子来抑制自由基反应,因此组织中 SOD 活性的高低间接反映机体清除氧自由基的能力;GSH-Px 能有效地阻断或减轻脂质过氧化链锁反应,减少脂自由基对生物体的损害;而 MDA 是自由基脂质过氧化反应的终产物,MDA 的高低可间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度^[5]。本实验模型组中脑组织 MDA 含量于再灌注后 6 小时即开

始上升,24 小时达到高峰,而脑组织 SOD 活性由于消耗过多在术后 1 小时即开始下降,72 小时降至最低水平,GSH-Px 于再灌注 6 小时后开始下降,24 小时降至最低,随后逐渐恢复正常。GSPE 组相应时间点 MDA 含量、GSH-Px 含量及 SOD 活力与模型组比较差异均具有统计学意义。

先前实验研究发现 GSPE 对小鼠深低温缺血再灌注脑的保护作用与 AKT-Caspase3 有一定的关联^[6],另外 Gemma 等^[7]研究表明 GSPE 能够诱导胰岛素自主磷酸化从而上调葡萄糖,由此可见在深低温缺血再灌注过程中,GSPE 可通过多种途径发挥其脑保护作用,其中诱导 SOD、GSH-Px 生成,清除 MDA 是一条重要途径。

参 考 文 献

[1] Feng Y, Liu YM, Leblanc MH, et al. Grape seed extract given three hours after injury suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Pediatr Res*, 2007, 61(3):295-300.

[2] 马志飞,莫绪明,杨中洲,等. 深低温低流量 AKT1+/-转基因小鼠模型的构建与初步表型分析[J]. *江苏医药*, 2010, 36(8):909-912.

[3] Ananiadou OG, Bibou K, Drossos GE, et al. Effect of profound hypothermia during circulatory arrest on neurologic injury and apoptotic repressor protein Bcl-2 expression in an acute porcine model[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133(4):919-926.

[4] 崔福爱,安玉会,王秀丽,等. 酸性神经肽 1 对 VD 小鼠脑内 SOD、MDA 和 NO 的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2003, 41(1):14-15.

[5] 何晓敏,莫绪明,陈凤,等. 去铁胺预处理对幼龄大鼠深低温脑缺血/再灌注损伤的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(12):909-912.

[6] 王怡悦,莫绪明,马志飞,等. 葡萄籽原花青素可能通过 AKT-Caspase3 途径对深低温缺血再灌注脑起保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(12):2177-2179.

[7] Gemma M, Sheela O, Montserrat V, et al. Oligomers of grape-seed procyanidin extract activate the insulin receptor and key targets of the insulin signaling pathway differently from insulin[J]. *J Nutr Biochem*, 21(6):476-486.

(收稿日期: 2016-09-24)
(本文编辑: 禹佳)