

[文章编号] 1007-3949(2006)14-08-0665-04

·实验研究·

## 原花青素对脑缺血再灌注小鼠脑组织细胞因子、一氧化氮合酶和血脑屏障的影响

吴秀香<sup>1</sup>, 卢晓梅<sup>2</sup>, 杜莉莉<sup>2</sup>, 金玉楠<sup>2</sup>, 张海鹏<sup>2</sup>

(1. 锦州医学院病理生理学教研室, 辽宁省锦州市 121001;

2. 中国医科大学基础医学院病理生理学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 原花青素对脑缺血再灌注的影响; 亲和素-生物素-酶复合物酶联免疫吸附法; 葡萄籽原花青素; 细胞因子; 一氧化氮合酶; 血脑屏障

[摘要] **目的** 探讨葡萄籽原花青素对缺血再灌注小鼠脑组织细胞因子、一氧化氮合酶和血脑屏障通透性的影响。**方法** 采用夹闭小鼠双侧颈总动脉 30 min 再灌注 72 h 的脑缺血再灌注模型, 并于双侧颈总动脉夹闭时及再灌注后每隔 24 h 分别腹腔注射蒸馏水、葡萄籽原花青素(10、20 及 40 mg/kg) 和尼莫地平(2 mg/kg)。在处死动物前 1 h 经尾静脉注射 2% 伊文思蓝, 采用 ABC-ELISA 法检测脑组织中白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 10 含量, 采用分光光度法检测脑组织中一氧化氮合酶活性及伊文思蓝含量。同时光镜观察小鼠海马 CA1 区脑组织的病理变化。**结果** 与假手术组相比, 缺血再灌注组脑组织中白细胞介素 1 $\beta$  含量、一氧化氮合酶活性及伊文思蓝含量明显增高( $P < 0.01$ ), 而白细胞介素 10 含量降低, 但无统计学意义。与缺血再灌注组相比, 葡萄籽原花青素及尼莫地平治疗组脑组织中白细胞介素 1 $\beta$  含量、一氧化氮合酶活性及伊文思蓝含量有不同程度的降低, 而白细胞介素 10 含量有不同程度的升高。病理学组织检查发现, 葡萄籽原花青素能改善脑缺血再灌注所造成的神经细胞损伤, 减少神经细胞坏死。**结论** 葡萄籽原花青素可能通过降低小鼠脑缺血再灌注时一氧化氮合酶活性和促炎因子白细胞介素 1 $\beta$  含量, 提高抗炎因子白细胞介素 10 含量进而降低血脑屏障的通透性而发挥脑保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Grape Seed Procyanidins on Cytokines, Nitric Oxide Synthase and Blood Brain Barrier After Cerebral Ischemia-Reperfusion in Mice

WU Xiur-Xiang, LU Xiaor-Mei, DU Lili, JIN Yur-Nan, and ZHANG Hai-Peng

(1. Department of Pathophysiology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China; 2. Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Grape Seed Procyanidins; Cytokines; Nitric Oxide Synthase; Blood Brain Barrier; Ischemia Reperfusion; Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of grape seed procyanidins on cytokines, nitric oxide synthase and blood-brain barrier and the pathological changes after cerebral ischemia-reperfusion in mice. **Methods** The incomplete cerebral ischemia-reperfusion mice models were induced by occlusion of both common carotid arteries for 30 min and reperfusion for 72 h. Distilled water, grape seed procyanidins (10, 20 and 40 mg/kg) or Nimodipine (2 mg/kg) was injected intraperitoneally during the bilateral common carotid arteries occlusion and again at 24 h after reperfusion. An injection of 2% Evans blue into tail veins was conducted 1 h before the animals were sacrificed. The levels of interleukin 1 $\beta$ , nitric oxide synthase activities and content of Evans blue in the brain tissue were examined by ABC-ELISA method and spectrophotometry respectively. Meanwhile, the pathological changes of CA1 area of hippocampus were observed by light microscope. **Results** The levels of interleukin 1 $\beta$ , nitric oxide synthase activities and content of Evans blue in the brain tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ), but the levels of interleukin 10 were decreased compared with those in the sham surgery group. The levels of interleukin 1 $\beta$ , nitric oxide synthase activities and content of Evans blue in the brain tissue in the grape seed procyanidins or Nimodipine treated group had different decrease while the levels of interleukin 10 had different increase compared with those in the ischemia-reperfusion group. Pathological examination showed that grape seed procyanidins could significantly protect brain from ischemia-reperfusion injury, reduce the necrosis of neuron. **Conclusion** Grape seed procyanidins exerted a protective effect on the cerebral ischemic reperfused brain as evidenced by increasing the levels of anti-inflammatory cytokine such as interleukin 10 but reducing the levels of proinflammatory cytokine such as interleukin 1 $\beta$ , nitric oxide synthase activities as well as permeability of blood brain barrier.

[收稿日期] 2005-10-08

[修回日期] 2006-07-12

[作者简介] 吴秀香, 博士研究生, 教授, 主要从事脑血管疾病防治的研究, E-mail 为 wuxiuxiang64@yahoo.com.cn。卢晓梅, 硕士研究生, 主要从事脑血管疾病的研究。通讯作者张海鹏, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高压氧治疗脑血管疾病的机制研究。

脑缺血再灌注损伤的病理过程极为复杂,涉及多个环节,如脑组织能量代谢紊乱、自由基损伤、炎症反应、一氧化氮(nitric oxide, NO)的细胞毒作用以及血脑屏障异常开放等<sup>[1]</sup>。脑缺血再灌注时伴随着细胞因子,如促炎因子白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及抑炎因子白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的表达,在脑缺血再灌注的病理发生中起着主要的炎症、免疫作用和神经毒性作用,使血脑屏障的通透性发生改变<sup>[2]</sup>。原花青素是一类在植物界中广泛存在的多酚化合物,它主要存在于植物的果实、种子、花和皮中。葡萄籽原花青素(grape seeds procyanidins, GSP)具有多种生物活性、药理作用和临床疗效<sup>[3-5]</sup>,但其对小鼠脑缺血再灌注损伤后细胞因子及其介导的炎症反应、NOS活性和血脑屏障通透性的影响未见报道。本研究旨在探讨GSP的脑保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

GSP为棕红色粉末,由天津尖锋天然产物公司提供,其中原花青素含量大于95%,用双蒸水溶解。尼莫地平注射液为天津金耀氨基酸有限公司产品。ABC-ELISA检测盒为上海森雄科技实业有限公司,进口分装。NOS酶活力检测盒为南京建成生物工程研究所产品。伊文思蓝(进口分装);甲酰胺(沈阳市新西试剂厂)。

### 1.2 主要仪器

Wellsan MK<sub>2</sub>型酶标仪(芬兰Labsystem公司);三K30离心机(Sigma公司);721分光光度计(上海第三仪器厂)。

### 1.3 实验动物及分组

实验采用健康昆明种小鼠,雌雄各半,体重为24.00 $\pm$ 3.00 g(由中国医科大学动物部提供),随机分为假手术组、脑缺血再灌注组、GSP(10、20及40 mg/kg)组和尼莫地平(2 mg/kg)组。

### 1.4 小鼠脑缺血再灌注模型的复制及给药方法

参照文献[6],小鼠乙醚麻醉,仰位固定于手术台上(温度保持在37 $^{\circ}$ C),颈部正中切口,分离双侧颈总动脉并用无损伤动脉夹夹闭30 min,然后松开动脉夹使血流再通,即复制出脑缺血再灌注模型。术口用青霉素粉抗感染,无菌缝合皮肤,回笼饲养。假手术组仅分离双侧颈总动脉,不夹闭。缺血再灌注组小鼠分别于缺血当时及缺血后每隔24 h腹腔

注射蒸馏水、不同剂量GSP及尼莫地平。

### 1.5 标本采集与细胞因子的测定

再灌注72 h后断头处死小鼠,于冰盘上快速剥离脑组织,以冰冷的PBS冲洗,滤纸吸干,立即于电子天平称重,配成10%脑组织匀浆,匀浆液于4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min离心15 min,取上清液,采用双抗体夹心亲和素-生物素-酶复合物酶联免疫吸附法在波长492 nm处检测IL-1 $\beta$ 和IL-10的含量。

### 1.6 脑组织一氧化氮合酶活性测定

用0.9%生理盐水制成10%脑组织匀浆液,低温离心,取上清液,按试剂盒说明书测定脑组织中NOS活性,考马斯亮蓝法标定蛋白含量。

### 1.7 脑组织伊文思蓝含量的测定

参照文献[8],在处死动物前1 h经尾静脉注射2%伊文思蓝,在检测前20 min进行在体心脏灌注,直至心房流出清亮的液体为准。术后72 h处死小鼠,摘取脑组织用电子天平精确称量其湿重后,投入试管,分别加入3 mL甲酰胺,加盖后于45 $^{\circ}$ C的水浴箱孵育48 h,轻轻摇匀,离心15 min(3 000 r/min),取上清液用721型分光光度计比色( $\lambda=620$  nm)。

### 1.8 病理组织学检查

再灌注72 h后,以10%乌拉坦(1 g/kg)麻醉动物,剪开胸腔,暴露心脏,从心尖插入灌注针至左心室,并剪开右心耳形成灌注液排除通道,从左心室快速灌注37 $^{\circ}$ C生理盐水100 mL,继以4 $^{\circ}$ C、4%多聚甲醛200 mL灌注固定,于30~40 min灌注完毕,迅速取脑置4 $^{\circ}$ C、4%多聚甲醛中后固定12 h,流水冲洗24 h后,按常规方法制作病理切片,HE染色,用光学显微镜对各组海马CA1区脑组织切片进行病理学检查。

### 1.9 统计学处理

应用SPSS 11.5统计软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行方差分析和组间 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 葡萄籽原花青素对缺血再灌注小鼠脑组织白细胞介素 1 $\beta$ 和 10 含量的影响

脑缺血再灌注组与假手术组相比脑组织中IL-1 $\beta$ 含量显著升高,而IL-10含量降低。不同剂量的GSP及尼莫地平能不同程度的降低脑组织IL-1 $\beta$ 含量,增加脑组织IL-10含量(表1)。

表 1. 葡萄籽原花青素对缺血再灌注小鼠脑组织白细胞介素  $1\beta$  和  $10$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

分 组	n	IL-1 $\beta$	n	IL-10
假手术组	7	9.42 $\pm$ 1.23	8	31.09 $\pm$ 14.19
脑缺血再灌注组	7	12.81 $\pm$ 2.29 <sup>a</sup>	8	24.33 $\pm$ 37.56
GSP 组 10 mg/kg	7	12.05 $\pm$ 1.2	8	837.56 $\pm$ 11.19 <sup>b</sup>
20 mg/kg	7	10.44 $\pm$ 1.08 <sup>c</sup>	8	48.44 $\pm$ 11.69 <sup>c</sup>
40 mg/kg	7	9.40 $\pm$ 1.17 <sup>c</sup>	8	38.05 $\pm$ 14.67 <sup>b</sup>
尼莫地平组	7	10.27 $\pm$ 2.15 <sup>c</sup>	7	38.92 $\pm$ 13.44 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组相比; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与脑缺血再灌注组相比。

## 2.2 葡萄籽原花青素对缺血再灌注小鼠脑组织一氧化氮合酶活性和伊文思蓝含量的影响

脑缺血再灌注组脑组织中 NOS 活性及伊文思蓝含量明显高于假手术组, 不同剂量的 GSP 和尼莫地平能不同程度的降低脑缺血再灌注组脑组织中 NOS 活性及伊文思蓝含量(表 2)。

表 2. 葡萄籽原花青素对缺血再灌注小鼠脑组织一氧化氮合酶活性和伊文思蓝含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分 组	伊文思蓝含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	NOS 活性 ( $\text{ku/g}$ )
假手术组	2.78 $\pm$ 0.91	0.62 $\pm$ 0.18
脑缺血再灌注组	8.35 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	2.44 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
GSP 组 10 mg/kg	6.99 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	2.11 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
20 mg/kg	6.10 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	1.54 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
40 mg/kg	4.72 $\pm$ 0.80 <sup>c</sup>	1.30 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
尼莫地平组	4.19 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>	1.19 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组相比; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与脑缺血再灌注组相比。

## 2.3 葡萄籽原花青素对缺血再灌注小鼠海马 CA1 区脑组织病理形态学的影响

假手术组神经细胞胞膜清晰完整, 无变形、水肿, 核仁清晰可见。脑缺血再灌注组神经细胞肿胀变形, 胞膜不清, 出现不同程度的核深染、核固缩、核体不规则, 间质水肿明显, 细胞间隙增大。尼莫地平及 GSP 能不同程度的改善神经细胞的核深染、核固缩程度, 减少细胞及间质的水肿, 使胞膜清楚, 形态正常, 核仁清晰可见的神经细胞数目增多(图 1)。

## 3 讨论

血脑屏障对于维持中枢神经系统的正常功能非常重要。脑缺血再灌注损伤能使血脑屏障完整性遭

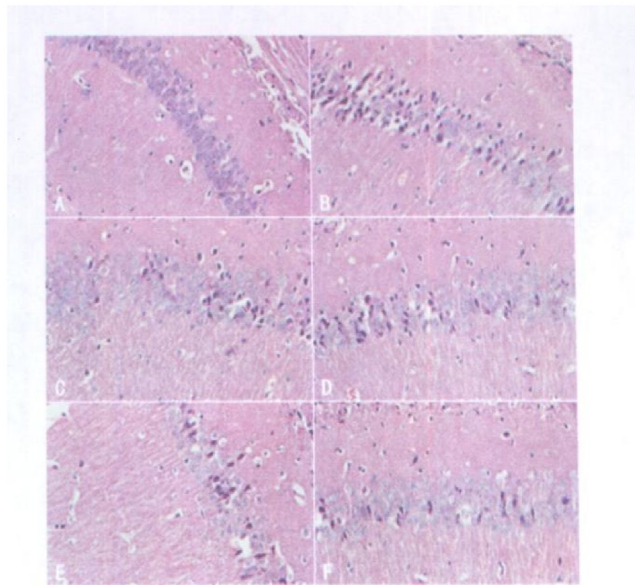


图 1. 各组海马 CA1 区脑组织病理形态学改变 (400 $\times$ )

A 为假手术组, B 为脑缺血再灌注组, C 为 10 mg/kg GSP 组, D 为 20 mg/kg GSP 组, E 为 40 mg/kg GSP 组, F 为尼莫地平组。

到破坏, 而血脑屏障的破坏又加重脑损伤。渗入到脑组织内的伊文思蓝含量, 可作为判断血脑屏障损伤程度的定性指标<sup>[7]</sup>。有研究显示, 缺血再灌注可激活小胶质细胞和星形胶质细胞, 分泌大量的触发炎症反应的重要介质 IL-1 $\beta$ 。IL-1 $\beta$  主要通过促进白细胞和内皮细胞粘附而激发炎症反应<sup>[8]</sup>。本实验观察到, 脑缺血再灌注组脑组织中 IL-1 $\beta$  及伊文思蓝含量明显高于假手术组, 表明脑缺血再灌注可引起血脑屏障通透性增强, 此通透性的增强可能与脑缺血再灌注时 IL-1 $\beta$  生成增多有关。IL-10 是由单核巨噬细胞、淋巴细胞等产生的抗炎细胞因子之一, 主要通过抑制促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及白细胞的聚集和趋化因子的产生, 减轻其介导的炎症反应, 保护血脑屏障<sup>[9]</sup>。本实验发现, 在血脑屏障通透性增强的同时, IL-10 的含量较假手术组降低, 提示此通透性增强与脑缺血再灌注时 IL-10 生成减少有关。

有研究表明, NO 是调节血脑屏障的候选介质。生理条件下对其有保护作用, 病理条件下(缺血、炎症、肿瘤等)可致血脑屏障通透性增强, 导致脑水肿<sup>[10]</sup>。由于 NO 是由 NOS 催化左旋精氨酸生成的, 因此, 可以通过检测脑组织中 NOS 活性来间接判断脑组织中 NO 含量。本实验观察到, 脑缺血再灌注组脑组织中 NOS 活性明显增高, 并与经尾静脉注射伊文思蓝在脑部通透量增多相一致。表明脑缺血再灌注时 NOS 增加是造成血脑屏障通透性增强的因素之一。

葡萄籽原花青素(GSP)是自然界中广泛存在的



多酚类化合物, 该类化合物具有多种生物活性, 以其高效、低毒、高生物利用度而著称, 是近年来不断研究开发的一种极强体内活性功能因子。李文广等<sup>[11]</sup>研究表明, GSP 对大鼠和小鼠实验性炎症有明显的抗炎作用, 其抗炎机理和清除氧自由基、抗脂质过氧化和减少细胞因子的生成有关。Kalin 等<sup>[12]</sup>发现 GSP 的抗炎效应与其下调一些粘附分子如 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素有关。Yoshimura 等<sup>[13]</sup>用 TMA-PTIO/NOC 7 系统评价了 GSP 的 NO 清除能力, 发现纯度 > 95% 的原花青素具有很强的清除 NO 的能力。本实验观察到, 不同剂量的 GSP 组和尼莫地平组脑组织中 IL-1 $\beta$ 、NOS 活性及伊文思蓝含量有不同程度的降低, 而 IL-10 含量有不同程度的升高。病理组织学检查显示, GSP 能改善脑缺血再灌注造成的神经细胞的损伤, 减少神经细胞坏死。此结果表明, GSP 可能通过调节促炎、抗炎因子的分泌及降低 NOS 活性而发挥脑保护作用。此保护作用与临床广泛使用的治疗脑血管疾病的钙受体拮抗剂尼莫地平的作用相类似。因此有望开发 GSP 成为治疗脑缺血再灌注损伤的新药。

#### [参考文献]

- [1] Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2000, **106** (6): 723-731
- [2] Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon [J]. *Neurosurgery*, 1998, **43** (6): 1 382-397
- [3] Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and c-JUN [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, **31** (6): 729-737
- [4] Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, **22** (12): 1 117-120
- [5] Nair N, Mahajan S, Chawda R, Kandaswami C, Shanahan TC, Schwartz SA. Grape seed extract activates Th1 cells in vitro [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, **9**(2): 470-476
- [6] 赵红, 朱丽娜, 陈学新, 卢晓梅, 张海鹏. 高压氧对脑缺血再灌注小鼠明胶酶、一氧化氮合酶及血脑屏障的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (5): 668-671
- [7] 王新高, 董萼塘, 孙圣刚. 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (5): 579-582
- [8] Yang CY, Gong C, Qin Z, Liu XH, Morris Betz A. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, **69** (1): 135-143
- [9] Ajuebor MN, Das AM, Virag L, Flower RJ, Szabo C, Perretti M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10 [J]. *J Immunol*, 1999, **162** (3): 1 685-691
- [10] 赵志鸿. 一氧化氮与缺血性脑血管病 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 542-544
- [11] 李文广, 张小郁, 吴勇杰, 田暄. 葡萄籽中原花青素的抗炎作用及机制 [J]. *中国药理学报*, 2001, **22** (12): 1 117-120
- [12] Kalin R, Righi A, Del Rosso A, Bagchi D, Generini S, Cerinic MM, et al. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis [J]. *Free Radic Res*, 2002, **36** (8): 819-825
- [13] Yoshimura Y, Nakazawa H, Yamaguchi F. Evaluation of the NO scavenging activity of procyanidin in grape seed by use of the TMA-PTIO/NOC 7 ESR system [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, **51** (22): 6 409-412

(此文编辑 文玉珊)

(上接第 65 页)

此外, 浙江伊利康生物技术有限公司、日本第一化学药品株式会社、日本协和医药株式会社、上海申索佑福医学诊断用品有限公司的代表就血脂测定的最新方法和技术作了介绍。

本次大会为中青年学者提供了展示才华的平台, 26 位莅会的中青年学者在大会作了精彩的报告。大会评选了中青年优秀论文奖, 其中一等奖 3 名, 二等奖 4 名, 三等奖 8 名, 优秀奖 11 名。

会议期间, 中国生物化学与分子生物学会专职副秘书长兼办公室主任王同喜高级工程师主持了中国生物化学与分子生物学会第五届脂蛋白专业委员会的选举, 经过参会代表选举产生的第五届脂蛋白专业委员会由 19 名委员组成, 他们是(按姓氏笔画顺序排列): 方定志、王贤理、王绿娅、刘德培、沃兴德、李子樵、李伯良、陈保生、宋保亮、宋剑南、吴满平、屈伸、周新、钱士匀、郭刚、温进坤、解用虹、鄢盛恺、黎健。在第五届脂蛋白专业委员会第一次会议上, 按学会分支机构组织结构原则选举产生了第五届脂蛋白专业委员会主任委员、副主任委员、常务委员、秘书长和副秘书长。刘德培当选为主任委员, 陈保生、吴满平、周新当选为副主任委员, 刘德培、李伯良、陈保生、吴满平、周新、温进坤、黎健当选为常务委员, 黎健任秘书长, 王绿娅、方定志任副秘书长。

浙江伊利康生物技术有限公司作为协办单位, 为会议的成功举办投入了大量的人力、财力和物力; 日本第一化学药品株式会社、日本协和医药株式会社、上海申索佑福医学诊断用品有限公司、上海蓝怡科技有限公司、浙江东鸥生物工程有限公司、上海北加生化试剂公司等也给予了大力支持, 到会代表对此深表谢意。

(黎健、郑芳、王贤理整理, 此文编辑 胡必利)