

芒果苷对缺氧缺血性脑损伤大鼠氧化应激反应及神经细胞凋亡的影响

雷敏, 吴丽荣, 刘英

(锦州医科大学附属第三医院, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 芒果苷; 缺氧缺血性脑损伤; 氧化应激; 神经细胞凋亡

[摘要] **目的** 研究芒果苷通过 PI3K/Akt/mTOR 途径对缺氧缺血性脑损伤大鼠的氧化应激反应及神经细胞凋亡的影响。**方法** 将 144 只 SD 新生大鼠按随机原则分为 6 组, 空白对照组、模型组、阳性对照组、芒果苷低剂量组、芒果苷中剂量组和芒果苷高剂量组, 每组 24 只。除空白对照组外其他各组复制缺氧缺血性脑损伤大鼠模型, 造模后空白对照组和模型组给予等体积的生理盐水, 阳性对照组给予尼莫地平 [0.4 mg/(kg·d)], 芒果苷低、中、高剂量组分别给予芒果苷 50、100、200 mg/(kg·d), 连续给药 4 周。检测各组大鼠神经功能损伤评分; 干湿重法检测各组大鼠脑组织含水量; HE 染色观察大鼠脑组织的病理形态学改变; 原位细胞凋亡检测 (TUNEL) 大鼠脑组织神经元凋亡情况; 生化检测法测定脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和总抗氧化能力 (T-AOC) 活力; 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 测定大鼠脑组织内 PI3K/Akt/mTOR mRNA 表达; 运用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测脑组织中 Caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL、Bad、Bax 蛋白含量。**结果** 模型组大鼠的神经损伤评分、脑组织含水量、神经细胞凋亡数、MDA 含量、PI3K 表达及 Caspase-3 含量显著高于空白对照组, 完整的神经元数量及脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 含量、Akt、mTOR 表达及 Bcl-2、Bcl-xL、Bad 含量显著低于空白对照组 ($P < 0.01$); 各药物组大鼠的神经损伤评分、脑组织含水量、神经细胞凋亡数、MDA 含量、PI3K 表达及 Caspase-3 含量显著低于模型组, 完整的神经元数量及脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 含量、Akt、mTOR 表达及 Bcl-2、Bcl-xL、Bad 含量显著高于模型组 ($P < 0.01$)。**结论** 芒果苷通过下调 Caspase-3 的表达、上调 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达, 增强 PI3K/Akt/mTOR 通路的表达来增强神经保护作用, 抑制神经细胞凋亡, 提高神经细胞存活率。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Effect of mangiferin on oxidative stress and neuronal apoptosis in rats with hypoxic-ischemic brain injury

LEI Min, WU Lirong, LIU Ying

(The Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] mangiferin; hypoxic-ischemic brain injury; oxidative stress; neuron apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To study effects of mangiferin on oxidative stress response and neuronal apoptosis in rats with hypoxic-ischemic brain injury by PI3K/Akt/mTOR pathway. **Methods** 144 neonatal SD rats were randomly divided into 6 groups: blank control group, model group, positive control group (Nimodipine), mangiferin low dose group (MAN-L), middle dose group (MAN-M) and high dose group (MAN-H). There were 24 rats in each group. The rat model of hypoxic-ischemic brain injury was made in all groups except the blank control group. After the model was made, the blank control group and the model group were given the same volume of normal saline, the positive control group was given nimodipine (0.4 mg/(kg·d)), and the mangiferin low, middle and high dose groups were given mangiferin 50, 100, 200 mg/(kg·d) for 4 weeks. The neurological injury score of rats in each group was measured, the water content of brain tissue in each group was measured by dry and wet weight method, the pathomorphological changes of brain tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the apoptosis of neurons in brain tissue of rats was detected by in situ

[收稿日期] 2019-01-28

[修回日期] 2019-04-09

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20170540381)

[作者简介] 雷敏, 主要研究方向为神经内科学, E-mail 为 naobajuziyan@163.com。

apoptosis. The activities of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and total antioxidant capacity (T-AOC) in brain tissue were measured by biochemical detection, and the expression of PI3K/Akt/mTOR mRNA in rat brain tissue was measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The contents of caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL, Bad and Bax proteins in brain tissue were detected by Western blot.

Results The nerve injury score, water content of brain tissue, apoptosis number of nerve cells, MDA content, PI3K expression and caspase-3 content in the model group were significantly higher than those in the blank control group. The number of intact neurons, the contents of SOD, GSH-Px, T-AOC, Akt, mTOR and the contents of Bcl-2, Bcl-xL and Bad in the brain tissue of the model group were significantly lower than those of the blank control group.

The nerve injury score, water content of brain tissue, apoptosis number of nerve cells, MDA content, PI3K expression and caspase-3 content in each drug group were significantly lower than those in the model group. The number of intact neurons, the contents of SOD, GSH-Px, T-AOC, Akt, mTOR and the contents of Bcl-2, Bcl-xL and Bad in the brain tissue of the drug group were significantly higher than those of the model group.

Conclusion Mangiferin can enhance the neuroprotective effect, inhibit neuronal apoptosis and improve the survival rate of nerve cells by down-regulating the expression of caspase-3, up-regulating the expression of Bcl-2 and Bcl-xL, and enhancing the expression of PI3K/Akt/mTOR pathway.

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain injury, HIBI)是新生儿死亡和引发神经系统并发症的主要原因之一^[1]。据调查数据显示,0.1%~0.2%的新生儿会由于围产期窒息而导致新生儿HIBI,约20%的死亡,HIBI引发的脑损伤是永久性的,幸存者中也会有40%的儿童出现癫痫、脑瘫、认知障碍、视觉和听力障碍等后遗症,已有研究证实,新生儿HIBI的病理生理学包括兴奋性毒性、氧化应激、神经炎症和神经细胞凋亡等^[2-5]。有文献研究表明,氧化应激是导致HIBI的主要原因,由于氧化和抗氧化因素之间的不平衡,导致过量产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)自由基,对生物分子造成损害,最终导致神经元的退化和死亡^[6-7]。因此,寻求一种外源性的抗氧化剂可以减少相关的细胞损伤,对HIBI有一定的治疗效果。

近年来,越来越多的研究证明中草药和植物中的一些衍生化合物在中风和缺血性脑损伤疾病方面有一定的神经保护作用^[8-9]。芒果苷(C-葡萄糖苷1,3,6,7-四羟基黄嘌呤)是一种天然存在于许多植物中的植物多酚,具有多种药理作用,如抗氧化、抗炎、抗肿瘤和治疗糖尿病等^[10-13]。鉴于芒果苷具有广泛的生物活性,本研究拟通过PI3K/Akt/mTOR途径研究芒果苷对HIBI大鼠的氧化应激反应及神经细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用大鼠均从锦州医科大学实验动物中

心购买(许可证号:SCXK(京)2018-0003),144只实验用大鼠均为出生7天的SD新生大鼠,雌雄各半,体质量22~30 g。在25±1℃、湿度50%~60%的条件下,12 h光/12 h暗周期,所有大鼠人工喂养饲料和水,适应性喂养1周后开始实验。本实验设计及过程均经本院动物伦理委员会批准。

1.2 主要药品与试剂

芒果苷(上海纯生生物科技有限公司,生产批号:P0226)、尼莫地平(山东健康药业有限公司,国药准字:H37022779)、HE染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,生产批号:G1120)、氧化应激指标试剂盒(上海如吉生物科技发展有限公司,生产批号:SHJ1884)、ELISA试剂盒(上海钰博生物科技有限公司,生产批号:YB-E4061)、抗体均购自美国Abcam公司。

1.3 仪器

AlphaEaseFC型灰度分析软件(美国Alpha Innotech公司)、T100型实时荧光定量PCR仪(北京伯辉生物科技有限公司)、TE77XP型半干转膜仪系统(美国Hoefer公司)、CUT4062型石蜡切片机与包埋机(德国SLEE公司)。

1.4 动物模型制备

出生7天的SD大鼠,参照文献^[2,14],采用Rice法建立HIBI新生大鼠模型,具体方法如下:采用10%水合氯醛溶液麻醉大鼠,在中位颈部切口,分离大鼠的左颈总动脉,用6-0号线进行血管结扎,确保同侧颈动脉没有血流,立即缝合切口,将大鼠置于各自的笼子内恢复2 h后,将大鼠置于37℃的水浴密闭缺氧环境中,持续给予8%氧浓度的混合气体进行缺氧处理2.5 h,空白对照组大鼠不做任何处

理。观察各组大鼠的自由活动情况,然后将其放入各自的笼子内,人工给予饲料和水。

1.5 动物分组及给药剂量

将 144 只 SD 新生大鼠按随机原则分为 6 组,空白对照组、模型组、阳性对照组及芒果苷低剂量组(MAN-L)、中剂量组(MAL-M)、高剂量组(MAN-H)。造模成功 24 h 后,空白对照组和模型组给予 20 mL/kg 的生理盐水,阳性对照组给予尼莫地平 0.4 mg/(kg·d),芒果苷低、中、高剂量组分别给予芒果苷 50、100、200 mg/(kg·d),连续给药 4 周,每组 24 只大鼠,在后续试验中每次取出 4 只大鼠进行一个指标的测定。

1.6 大鼠神经功能损伤评分检测

给药 4 周后,各组大鼠全部参照 Longa 等^[15]的方法采用 5 分制进行神经功能缺失评分。0 分:无神经功能缺损症状,活动正常;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:爬行时向偏瘫侧旋转;3 分:大鼠行走时会向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失;5 分:死亡。筛选出 0 分和 5 分的大鼠。

1.7 干湿重法检测各组大鼠脑组织含水量

给药 4 周后,每组取出 4 只大鼠,采用干湿重法检测大鼠的脑组织含水量,具体方法如下:采用 10% 水合氯醛溶液麻醉大鼠,将大鼠断头处死,迅速取出脑组织,将新生大鼠的脑组织从矢状缝切开,称取大鼠的右脑组织的质量为湿重,然后将右脑组织放入 100 ℃ 的恒温干燥箱中干燥 24 h 后称重的质量为干重。计算脑组织含水量。

1.8 HE 染色法观察大鼠缺血缺氧侧皮质区组织病理变化

各组取出进行神经评分后的 4 只新生大鼠,采用 10% 水合氯醛溶液将其麻醉,迅速取出大鼠脑组织,将其固定于 4% 多聚甲醛溶液中,将脑组织常规脱水后进行石蜡包埋,采用石蜡切片机切制 5 μm 左右的冠状切片。采用 HE 染色试剂盒进行染色,将其置于显微镜下观察大鼠缺血缺氧侧脑组织神经细胞形态学异常。

1.9 TUNEL 检测大鼠脑组织神经细胞凋亡情况

给药 4 周后,每组取出 4 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉后将大鼠断头处死,取出大鼠大脑固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h,采用乙醇梯度脱水,二甲苯透明、石蜡包埋,采用石蜡切片机切制 5 μm 左右的冠状切片。严格按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒的操作步骤进行。每张切片随机选取 5 个视野,统计其凋亡细胞数(凋亡细胞为棕黄色)和

细胞总数,然后计算凋亡指数。凋亡指数(AI)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.10 大鼠脑组织中 SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC 含量的变化

给药 4 周后,每组取出 4 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉,断头处死,快速取出大鼠脑组织,脑组织左半球呈矢状切,右侧被丢弃,将左侧大脑半球的一半盐水冲洗去血,用滤器吸收组织上残留的盐水。测量左侧半脑的质量,以确定所加冰水的体积,将盐水和脑组织按盐水与脑组织之比(G)为 9:1 比例放入装有冰块的烧杯中,用玻璃匀浆器制成 10% 脑组织匀浆液,在 4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 10 min,在 -80 ℃ 保存待测。严格按照试剂盒说明书操作,黄嘌呤氧化法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性,硫代巴比妥酸显色法测定丙二醛(MDA)含量,分光光度法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量和总抗氧化活力(T-AOC)。

1.11 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测大鼠脑组织内 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达

给药 4 周后,每组取出 4 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉后将大鼠断头处死,取出大鼠脑组织,采用 Trizol 试剂盒按照说明书步骤提取脑组织中的总 RNA。在 7900 HT 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增并同时进行荧光定量,以 β-actin 为内参基因,采用 TaqMan miRNA 试剂盒检测 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达。引物序列如下:β-actin 为 5'-GGG GCT CTC TGC TCC CTC-3'和 5'-AGG CGT CCG ATA CGG CCA AAA-3';PI3K 为 5'-AAG AAG AGA ACC AGA AAC TCC-3'和 5'-TGA GAC CTC TTC AGT AAC CA-3';Akt 为 5'-AGG GAA ATC CGT GCG GAC AT-3'和 5'-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3';mTOR 为 5'-CGC TGA TCC CTT TAT CG-3'和 5'-ATG CTC AAA CAC CTC CAC C-3'。

1.12 Western blot 检测脑组织中 Caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL、Bad、Bax 蛋白含量

给药 4 周后,每组取出 4 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉后将大鼠断头处死,取出大鼠脑组织,用组织蛋白抽提试剂盒提取相应组织蛋白,采用 BCA 法检测蛋白的浓度,并将其制成含等量蛋白的蛋白组织样品。加入蛋白上样缓冲液并煮沸后,制作 12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳后分离,转移至 PVDF 膜上,分别加入相应的抗体(抗体的稀释倍数如下:Caspase-3 为 1:1 000;Bcl-2 为 1:500;Bcl-xL 为 1:1 000;Bad 为 1:500;Bax 为 1:500)和 β-actin 抗体(1:1 000),TBST 室温封闭过夜。

吐温 Tris 缓冲液洗膜 3 次, 10 min/次, 加入 HRP 标记的二抗辣根过氧化物酶, 室温振荡孵育 2 h, 暗室内 X 线片曝光显影, 扫描仪扫描底片, 采用 Quantity One 软件分析蛋白表达水平。

1.13 统计学方法

运用 SPSS21.0 统计软件进行试验数据分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 多组数据比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芒果苷对大鼠神经功能损伤评分的影响

与空白对照组相比, 模型组大鼠的神经功能损伤评分明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 阳性对照组和芒果苷低、中、高剂量组大鼠的神经功能损伤评分明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且神经功能损伤评分随着芒果苷浓度的增加而呈现下降趋势, 芒果苷低、中、高剂量组大鼠神经功能损伤评分明显高于阳性对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 芒果苷对大鼠神经功能损伤评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

Table 1. Effect of mangiferin on neurological injury scores ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

分 组	剂 量	神经功能损伤评分 (分)
空白对照组	—	0
模型组	—	3.25 ± 0.68 ^a
阳性对照组	0.4 mg/(kg · d)	1.76 ± 0.21 ^b
芒果苷低剂量组	50 mg/(kg · d)	2.38 ± 0.25 ^{bc}
芒果苷中剂量组	100 mg/(kg · d)	1.94 ± 0.18 ^{bcd}
芒果苷高剂量组	200 mg/(kg · d)	1.81 ± 0.14 ^{bd}

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与模型组相比; c 为 $P < 0.05$, 与阳性对照组相比; d 为 $P < 0.01$, 与芒果苷低剂量组相比。

2.2 芒果苷对大鼠脑组织含水量的影响

与空白对照组相比, 模型组大鼠脑组织含水量明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 阳性对照组和芒果苷低、中、高剂量组大鼠脑组织含水量明显降低, 且芒果苷低、中、高剂量组的大鼠脑组织含水量随着剂量的增加而降低, 呈现出剂量依赖性, 但均显著高于阳性对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 芒果苷对大鼠脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2. Effect of mangiferin on water content in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

分 组	剂 量	脑组织含水量 (%)
空白对照组	—	82.72 ± 3.91
模型组	—	92.93 ± 4.07 ^a
阳性对照组	0.4 mg/(kg · d)	83.27 ± 5.19 ^b
芒果苷低剂量组	50 mg/(kg · d)	88.99 ± 4.20 ^{bc}
芒果苷中剂量组	100 mg/(kg · d)	85.06 ± 3.97 ^{bcd}
芒果苷高剂量组	200 mg/(kg · d)	83.79 ± 4.12 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型组相比; c 为 $P < 0.05$, 与阳性对照组相比; d 为 $P < 0.05$, 与芒果苷低剂量组相比。

2.3 芒果苷对大鼠缺血缺氧侧皮质区组织的影响

空白对照组大鼠的神经细胞结构层次排列整齐有序, 细胞形态正常, 无空泡形成, 胞质成淡红色, 胞核蓝色; 模型组大鼠的神经细胞排列紊乱, 而且神经细胞发生改变, 出现了水肿、坏死的现象, 胞质固缩深染, 胞质空泡样变性; 阳性对照组大鼠的神经细胞排列有序, 神经细胞水肿、坏死、变性现象不明显, 且神经细胞轮廓和核仁清晰可见; 芒果苷低剂量组大鼠的神经细胞改变与模型组变化相似, 神经细胞发生改变, 出现了水肿、坏死的现象; 芒果苷中剂量组大鼠的神经细胞排列紊乱, 细胞轮廓不清晰, 且有神经细胞死亡、丢失的现象; 芒果苷高剂量组大鼠的神经细胞结构改变和损伤明显改善 (图 1)。

2.4 芒果苷对大鼠脑组织神经细胞凋亡的影响

空白对照组基本没有出现大脑组织神经细胞的凋亡, 模型组大鼠大脑皮质区可见大量的凋亡细胞, 凋亡细胞核被染成棕褐色, 胞体缩小变形、破裂成小碎片; 与模型组比较, 阳性对照组和芒果苷低、中、高剂量组大鼠皮质区凋亡细胞阳性率显著降低, 且芒果苷低、中、高剂量组的脑组织神经细胞凋亡数随着剂量的增加而降低, 呈现出剂量依赖性, 芒果苷中、高剂量组大鼠脑组织神经细胞凋亡数明显低于阳性对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 3 和图 2)。

2.5 芒果苷对大鼠脑组织中 SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC 含量的影响

与空白对照组相比, 模型组大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 含量显著降低, 脑组织中 MDA 的含量显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 阳性对照组及芒果苷中、高剂量组

大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 含量显著升高,脑组织中 MDA 的含量显著降低,且芒果苷低、中、高剂量组大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 含量随着剂量的增加而增加,MDA 的含量随着剂量的增加而降低,呈现出剂量依赖性,芒果苷低、中剂量组大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 含量低于阳性对照组,MDA 的含量高于阳性对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$;表 4)。

表 3. 芒果苷对大鼠脑组织神经细胞凋亡的影响($n=4$)
Table 3. Effect of mangiferin on neuronal apoptosis in brain tissue of rats($n=4$)

分 组	剂量	细胞凋亡率(%)
空白对照组	-	14.23±2.17
模型组	-	75.36±4.29 ^a
阳性对照组	0.4 mg/(kg·d)	26.67±3.10 ^b
芒果苷低剂量组	50 mg/(kg·d)	54.68±3.24 ^b
芒果苷中剂量组	100 mg/(kg·d)	41.55±2.48 ^{bcd}
芒果苷高剂量组	200 mg/(kg·d)	30.20±1.98 ^{bcd}

a 为 $P<0.01$,与空白对照组相比;b 为 $P<0.01$,与模型组相比;c 为 $P<0.05$,与阳性对照组相比;d 为 $P<0.05$,与芒果苷低剂量组相比。

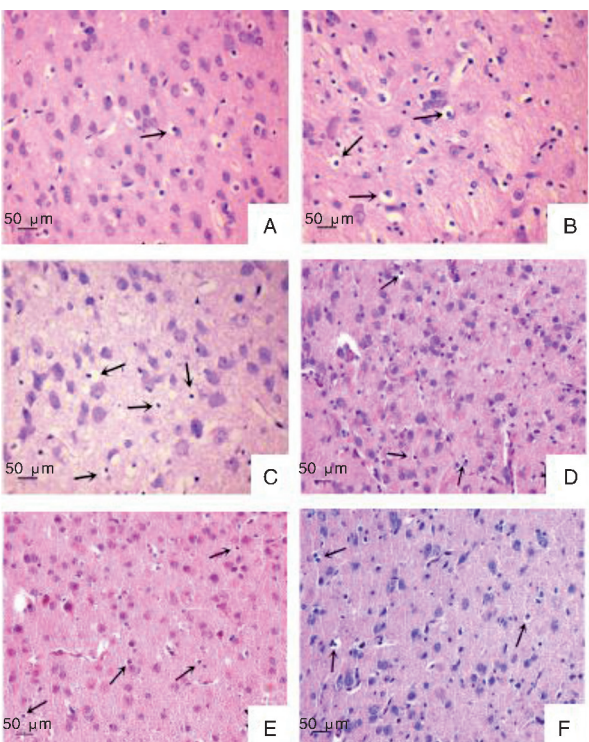


图 1. 芒果苷对大鼠缺血缺氧侧皮质区组织的影响 A 为空白对照组,B 为模型组,C 为阳性对照组,D 为芒果苷低剂量组,E 为芒果苷中剂量组,F 为芒果苷高剂量组。

Figure 1. Effect of mangiferin on cortical tissue of ischemic and anoxic side in rats

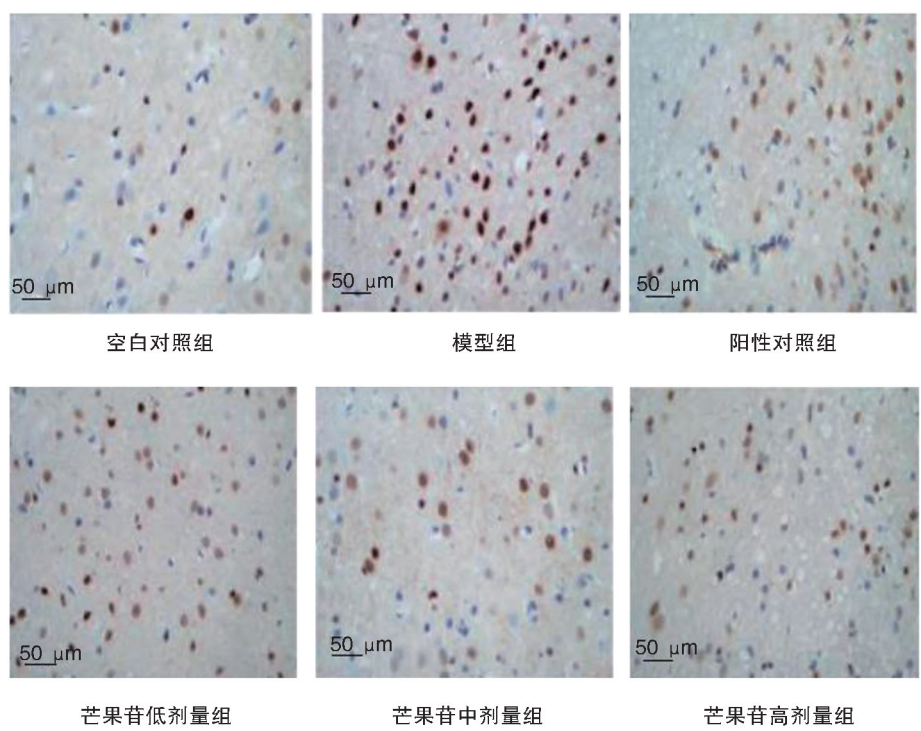


图 2. 芒果苷对大鼠脑组织神经细胞凋亡的影响(HE, $n=4$)

Figure 2. Effect of mangiferin on neuronal apoptosis in brain tissue of rats(HE, $n=4$)

表 4. 芒果苷对大鼠脑组织中 SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC 含量的影响($n=4$)Table 4. Effects of mangiferin on the contents of SOD, MDA, GSH-Px and T-AOC in rat brain($n=4$)

分 组	剂量	SOD(kU/g)	MDA(mol/mg)	GSH-Px(kU/g)	T-AOC(kU/g)
空白对照组	—	32.55±7.09	1.03±0.24	44.79±8.41	1.58±0.12
模型组	—	11.90±2.95 ^a	3.17±0.44 ^a	10.56±3.53 ^a	0.32±0.15 ^a
阳性对照组	0.4 mg/(kg·d)	30.45±5.34 ^c	1.36±0.35 ^c	39.48±6.11 ^c	1.10±0.25 ^c
芒果苷低剂量组	50 mg/(kg·d)	23.73±2.86 ^{cd}	2.49±0.59 ^{cd}	24.78±5.66 ^{cd}	0.57±0.19 ^{bd}
芒果苷中剂量组	100 mg/(kg·d)	25.55±4.66 ^{cde}	2.06±0.63 ^{ce}	32.37±7.20 ^{cde}	0.84±0.20 ^{cde}
芒果苷高剂量组	200 mg/(kg·d)	29.62±3.00 ^{ce}	1.45±0.39 ^{ce}	36.17±8.80 ^{ce}	0.99±0.31 ^{ce}

a 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与模型组相比; d 为 $P<0.05$, 与阳性对照组相比; e 为 $P<0.05$, 与芒果苷低剂量组相比。

2.6 芒果苷对大鼠脑组织内 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠脑组织内 Akt、mTOR mRNA 表达明显降低,PI3K mRNA 表达显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,阳性对照组和芒果苷低、中、高剂量组大鼠脑组织内 Akt、mTOR mRNA 表达明显升高,PI3K mRNA

表达显著降低,且芒果苷低、中、高剂量组大鼠脑组织内 Akt、mTOR mRNA 表达随着剂量的增加而增加,PI3K mRNA 表达随着剂量的增加而降低,呈现出剂量依赖性,芒果苷低、中剂量组大鼠脑组织内 Akt、mTOR mRNA 表达低于阳性对照组,芒果苷低剂量组 PI3K mRNA 高于阳性对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$;图 3)。

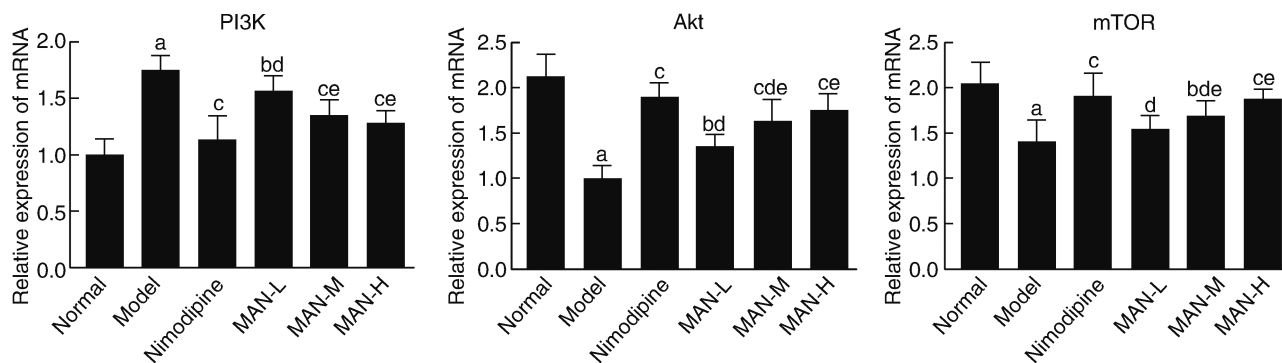


图 3. 芒果苷对大鼠脑组织内 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达的影响($n=4$) a 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与模型组相比; d 为 $P<0.05$, 与阳性对照组相比; e 为 $P<0.05$, 与芒果苷低剂量组相比。

Figure 3. Effects of mangiferin on the expression of PI3K, Akt and mTOR mRNA in rat brain($n=4$)

2.7 芒果苷对大鼠脑组织中 Caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL、Bad、Bax 蛋白含量的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠脑组织中 Bcl-2、Bcl-xL、Bad 蛋白含量明显降低,脑组织中 Caspase-3 蛋白含量显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组和芒果苷中、高剂量组大鼠脑组织中 Bcl-2、Bcl-xL、Bad 蛋白含量明显升高,脑组织中 Caspase-3 蛋白含量显著降低,且芒果苷低、中、高剂量组大鼠脑组织中 Bcl-2、Bad 蛋白含量随着剂量的增加而增加,呈现出剂量依赖性,差异具有统计学意义($P<0.05$),Bax 蛋白含量的变化与芒果苷剂量之间无相关性(图 4)。

3 讨 论

HIBI、新生儿脑病或围产期动脉卒中的脑瘫、认知功能障碍、发育迟缓和癫痫在新生儿中的发生率较高。临床 MRI 研究报告,新生儿 HIBI 的特点是脑灰质结构发生病变,如基底节、丘脑和皮质,在较小程度上是白质的梗死,其严重程度的增加预示着神经发育较差。目前,唯一可用的治疗方法是治疗性低温,如果在 6 h 内开始治疗,可以改善神经系统的预后^[16]。研究表明,随着妊娠期的推进,发育中的大脑越来越容易受到缺氧缺血的影响,而且神经细胞死亡的可能性更大,部分原因在于它们的高

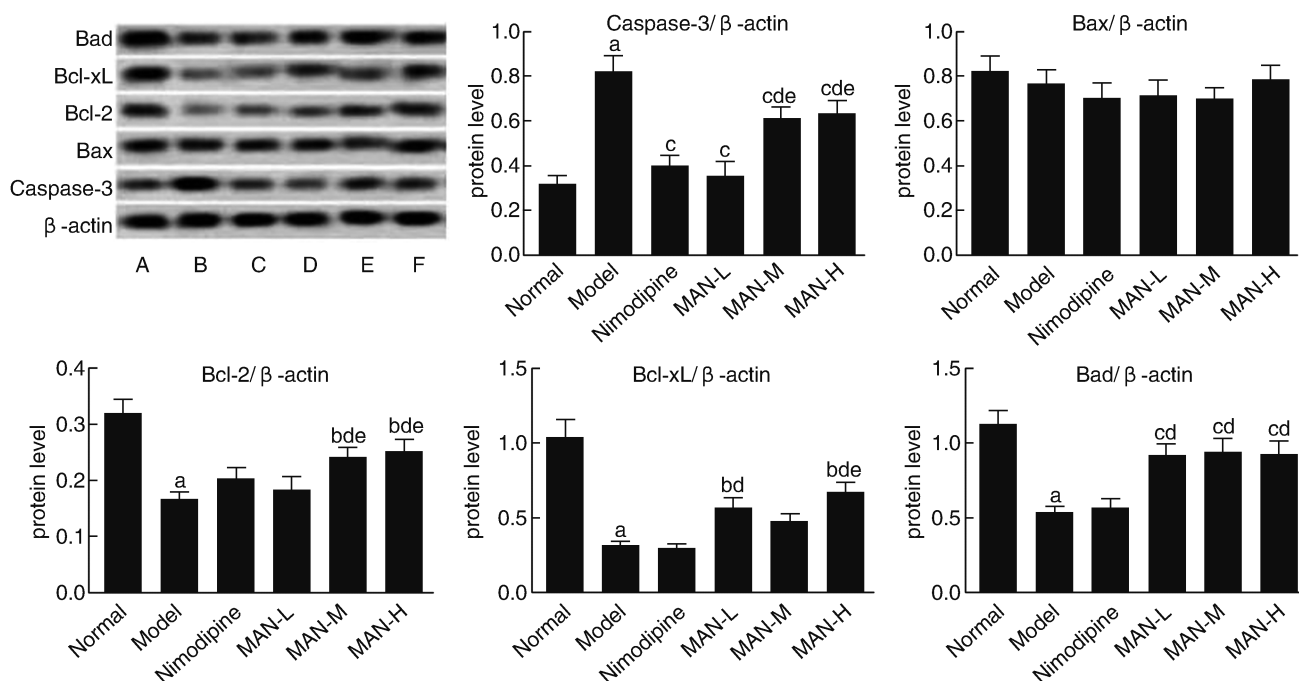


图 4. 芒果苷对大鼠脑组织中 Caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL、Bad、Bax 蛋白含量的影响 ($n=4$) A 为空白对照组, B 为模型组, C 为阳性对照组, D 为芒果苷低剂量组, E 为芒果苷中剂量组, F 为芒果苷高剂量组。a 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与模型组相比; d 为 $P<0.05$, 与阳性对照组相比; e 为 $P<0.05$, 与芒果苷低剂量组相比。

Figure 4. Effects of mangiferin on the expression of Caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL, Bad and Bax proteins in rat brain ($n=4$)

代谢需求。缺氧缺血发生后,细胞最初经历脑氧化代谢受损、肿胀和细胞外兴奋性氨基酸积累,并在次生能量衰竭时期之前短暂恢复,在随后的几个小时到几天,第二阶段的损伤机制导致神经细胞死亡,包括兴奋性毒性、线粒体功能的恶化、炎症、活性氧的产生和一氧化氮合酶的激活以及胞内 Ca^{2+} 的积累^[17]。我们发现,芒果苷可以减少神经细胞的损伤,抑制神经细胞的凋亡,说明芒果苷具有一定的神经保护作用。此外,免疫组织化学分析显示 Caspase-3 (凋亡细胞死亡的标志之一) 的表达下调。众所周知,促凋亡蛋白 (Bad 和 Bax) 与抗凋亡蛋白 (Bcl-2 和 Bcl-xL) 之间的平衡对细胞存活有重要的调节作用^[18]。Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达上调表明芒果苷可以抑制神经细胞凋亡。

氧化应激是指当机体遭受到有害刺激时,体内就会产生过多的高活性分子,如活性氧自由基和活性氮自由基,机体的氧化程度超出了氧化清除能力,使得氧化系统和抗氧化系统失衡,从而导致组织损伤。当发生脑缺血缺氧时,脑组织缺乏营养物质和氧气的供应,再灌注时脑组织瞬间得到过多的营养物质和氧气的供应,产生刺激从而引起氧化应激反应,并产生一系列的代谢底物^[19]。氧化应激是 HIBI 病理生理的主要贡献者,由于缺乏足够的抗氧

化剂来对抗过量的活性氧,新生儿的大脑极易受到氧化应激的影响,从而导致神经毒性^[20]。在我们的研究中, SOD、GSH-Px、T-AOC 水平的降低以及脑组织中 MDA 水平的升高反映了 HIBI 后的氧化应激。抗氧化剂 GSH 水平的升高表明细胞对氧化应激的防御反应,芒果苷降低了 MDA 水平,升高了 SOD、GSH-Px、T-AOC 水平,有助于降低氧化应激水平。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路在中枢神经系统发育过程中广泛表达,介导细胞存活、分化和细胞代谢,参与神经细胞营养, mTOR 是该通路的主要下游分子之一, Akt 与脑损伤有关,也被证实可以抑制细胞凋亡,结果说明, PI3K/Akt/mTOR 通路的激活增强了神经保护和神经细胞存活^[21-22]。Liu 等^[23] 探讨氧化苦参碱对新生大鼠 HIBI 的特异性作用及机制,结果发现氧化苦参碱通过调控 NR2B/PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路,减轻新生儿 HIBI 和细胞损伤。本研究结果发现,芒果苷通过增强 PI3K/Akt/mTOR 通路的表达来增强神经保护作用,抑制神经细胞凋亡,提高神经细胞存活率。芒果苷是治疗新生儿缺血性脑损伤的一种很有前途的药物,为临床研究奠定了一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 55: 158-63.
- [2] 段 森, 黄 婷, 张 苹林, 等. 促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤模型新生大鼠认知功能的影响及对相关 PARP-1/AIF 信号通路的调控机制研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(18): 2492-2497.
- [3] Sasaoka N, Kawaguchi M, Kawaraguchi Y, et al. Isoflurane exerts a short-term but not a long-term preconditioning effect in neonatal rats exposed to a hypoxic-ischaemic neuronal injury[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53: 46-54.
- [4] Ferriero DM, Bonifacio SL. The search continues for the elusive biomarkers of neonatal brain injury [J]. *J Pediatr*, 2014, 164(3): 438-440.
- [5] Arteaga O, Revuelta M, Urigüen L, et al. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): 1-25.
- [6] Rocha-Ferreira E, Rudge B, Hughes MP, et al. Immediate remote ischemic postconditioning reduces brain nitrotyrosine formation in a piglet asphyxia model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1-11.
- [7] Tataranno ML, Perrone S, Longini M, et al. New antioxidant drugs for neonatal brain injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 1-10.
- [8] Tu XK, Yang WZ, Chen JP, et al. Curcumin inhibits TLR2/4-NF- κ B signaling pathway and attenuates brain damage in permanent focal cerebral ischemia in rats [J]. *Inflammation*, 2014, 37(2): 1544-1551.
- [9] Lv Y, Qian Y, Fu L, et al. Hydroxysafflor yellow A exerts neuroprotective effects in cerebral ischemia reperfusion-injured mice by suppressing the innate immune TLR4-inducing pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 769(15): 324-332.
- [10] Garcia-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, et al. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive antitumor effects of *Mangifera indica* L. bark in MDAMB231 breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2011, 305(1): 21-31.
- [11] Li X, Cui X, Sun X, et al. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(6): 893-899.
- [12] Dilshara MG, Kang CH, Choi YH, et al. Mangiferin inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression and cellular invasion by suppressing nuclear factor- κ B activity [J]. *BMB Rep*, 2015, 48(10): 559-564.
- [13] Prabhu S, Jainu M, Sabitha KE, et al. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(1): 126-133.
- [14] Demarest TG, Waite EL, Kristian T, et al. Sex-dependent mitophagy and neuronal death following rat neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Neuroscience*, 2016, 335: 103-113.
- [15] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [16] Alderliesten T, Nikkels PG, Benders MJ, et al. Antemortem cranial MRI compared with postmortem histopathologic examination of the brain in term infants with neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2013, 98: F304-F309.
- [17] Thornton C, Baburamani AA, Kichev A, et al. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in the development of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury [J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(5): 1067-1076.
- [18] Cooper DJ. Induced hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: pathophysiology, current treatment, and nursing considerations [J]. *Neonatal Netw*, 2011, 30(1): 29-35.
- [19] 石腾腾. 代谢底物与氧化应激对脑组织缺血缺氧及再灌注过程中 ATP 生成的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [20] Dai C, Liu Y, Dong Z. Tanshinone I alleviates motor and cognitive impairments via suppressing oxidative stress in the neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Mol Brain*, 2017, 10: 52.
- [21] Zhang J, Yu XH, Yan YG, et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 182-192.
- [22] Wang T, Gu J, Wu PF, et al. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: Involvement of JNK, SIRT1, and NF- κ B pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(3): 229-240.
- [23] Liu Y, Wang H, Liu N, et al. Oxymatrine protects neonatal rat against hypoxic-ischemic brain damage via PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Life Sci*, 2019. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.070.

(此文编辑 许雪梅)