

葡萄籽原花青素对小鼠脑缺血、再灌注及缺氧性损伤的影响

吴秀香¹ 杜莉莉¹ 卢晓梅¹ 张海鹏¹

摘要 目的:研究葡萄籽原花青素(GSP)对小鼠脑缺血、再灌注损伤及常压缺氧的影响。**方法:**采用小鼠常压耐缺氧实验和结扎双侧颈总动脉引起急性不完全脑缺血实验,观察 GSP 对缺氧(血)小鼠存活时间及耗氧量的影响;采用夹闭小鼠双侧颈总动脉 30min 再灌注 72h 的脑缺血再灌注模型,观察 GSP 对脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮合酶(NOS)活性,总抗氧化能力(T-AOC)及丙二醛(MDA)含量的影响。**结果:**GSP 能剂量依赖性地延长常压缺氧及脑缺血小鼠的存活时间,降低耗氧量;并能提高缺血再灌注小鼠脑组织中 SOD、CAT 活性,提高机体总抗氧化能力,降低 NOS 活性及 MDA 含量。**结论:**GSP 对小鼠脑缺血、再灌注及缺氧性损伤有明显的保护作用,其作用机制可能与其抗自由基、提高机体抗氧化能力,以及降低 NOS 活性有关。

关键词 葡萄籽原花青素;缺氧;脑缺血;再灌注损伤;抗氧化酶;总抗氧化能力;丙二醛;一氧化氮合酶

中图分类号: R332, R282.71, R322.81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2006)-02-0145-04

Effects of GSP on injuries of cerebral ischemia and reperfusion and anoxia in mice/WU Xiuxiang, DU Lili, LU Xiaomei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(2): 145—148

Abstract Objective:To study the effects of grape seed proanthocyanidins (GSP) on injuries of cerebral ischemia and reperfusion and anoxia in mice.**Method:**Acute anoxia in mice were produced by hypoxia under normal pressure and acute incomplete cerebral ischemia was induced by ligaturing bilateral carotid arteries. In these two models the survival time and oxygen consumption were observed. With the model of cerebral ischemia for 30min and reperfusion for 72h, effects of GSP on the superoxide dismutase(SOD) catalase(CAT) and nitric oxide synthase(NOS) activities, total antioxidative capacity(T-AOC) and malondialdehyde(MDA) content in brain tissue were studied.**Result:**GSP (10,20,40mg·kg⁻¹), in a dose-dependent manner, significantly prolonged the survival time and decreased oxygen consumption in mice subjected to anoxia and ischemia. Meanwhile, GSP was found to increase the SOD and CAT, enhance T-AOC and reduce the activities of NOS and the content of MDA in brain homogenate in cerebral ischemia and reperfusion mice.**Conclusion:**GSP had protective effects on cerebral ischemia and reperfusion and anoxia injuries that may relate to antioxidation, enhancing total antioxidative capacity and reducing the activities of NOS.

Author's address Dept. of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang, 110001

Key words grape seed proanthocyanidins; hypoxia; cerebral ischemia; reperfusion injury; antioxidation enzymes; total antioxidative capacity; malondialdehyde; nitric oxide synthase

葡萄籽原花青素 (grape seed proanthocyanidins, GSP) 是从葡萄籽中提取出的一种含有大量酚羟基的多酚化合物,主要成分是儿茶素类、原花青素类(即缩合鞣质类)。体内外的实验已经证明,它具有很强的抗氧化性和清除自由基的能力。这种能力显著高于维生素 C、维生素 E 和 β 胡萝卜素,与超氧化物歧化酶和过氧化氢酶相当^[1-3]。脑缺血再灌注损伤的发病机制复杂,其中氧自由基造成的损伤是其主要机制之一。因而推测 GSP 应具有保护脑缺血再灌注损伤的作用。基于以上观点,本文在动物缺氧、缺血及再灌注模型上,首次观察了 GSP 对实验性脑缺氧、缺血及再灌注损伤的影响,旨为新药开发提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、药品与试剂

实验采用昆明种小鼠,雌雄各半,由中国医科大学动物部提供。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>95%,用时用双蒸水溶解。尼莫地平(nimodipine, Nim)注射液(天津金耀氨基酸有限公司产品,批号:0401201)。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 及一氧化氮合酶 (nitric oxide

1 中国医科大学基础医学院病理生理教研室,沈阳,110001

作者简介:吴秀香,女,副教授,在读博士

收稿日期:2005-08-26

synthase, NOS) 的酶活力, 总抗氧化能力 (total antioxidative capacity, T-AOC) 及丙二醛 (MDA) 含量检测盒 (均为南京建成生物工程研究所产品, 批号为: 20041111, 20041110)。

1.2 主要仪器

美国 Sigma 公司产 3K-30 离心机, 上海第三仪器厂产 721 分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 小鼠常压耐缺氧模型^[4-5]: 小鼠体重为 21.89 ± 1.00 g 随机分为正常对照组, GSP10、20、40mg/kg 组和 Nim 2mg/kg 组, 每组 10 只, ip 给药 (或相同体积的溶剂), 25min 后将小鼠置于装有 10g 钠石灰的 150ml 密闭广口瓶中, 另备一量桶, 内盛一定量的水, 将与一段胶管相连的移液管放入量桶中, 胶管的另一端与通入缺氧瓶的玻璃管相连。随时间的推移, 当缺氧瓶内小鼠耗氧时, 装置的移液管内液面因瓶内负压而上升, 量桶内液面下降的毫升数即为小鼠的耗氧量。记录小鼠呼吸停止时间, 即存活时间, 同时观察 5、10、20、30min 小鼠的耗氧量。

1.3.2 小鼠急性不完全脑缺血模型^[6]: 小鼠体重为 21.69 ± 1.10 g 随机分为假手术组, 缺血模型组, GSP10、20、40mg/kg 组和 Nim 2mg/kg 组, 每组 10 只, ip 给药 (或相同体积的溶剂), 25min 后乙醚麻醉, 切开颈部正中皮肤, 分离两侧颈总动脉, 用手术丝线分别结扎带迷走神经的两侧颈总动脉, 记录小鼠存活时间。

1.3.3 小鼠脑缺血再灌注模型^[7]: 小鼠体重为 24.00 ± 3.00 g 乙醚麻醉, 仰位固定于手术台上 (温度保持在 37°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 30min, 然后松开动脉夹使血

流再通, 即复制出脑缺血再灌注模型。伤口洒青霉素粉抗感染, 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。缺血再灌注小鼠分别于缺血当时及缺血后每隔 24h ip 蒸馏水、不同剂量 GSP 及尼莫地平。再灌注 72h 后, 断头取脑, 测定 SOD、CAT、NOS 活性及总抗氧化能力和 MDA 含量。

1.4 SOD、CAT、NOS 活性及总抗氧化能力、MDA 含量测定

在冰盘上迅速取小鼠脑组织, 冷生理盐水 (NS) 洗去血液, 滤干称重。用 NS 制成 10% 脑组织匀浆液, 低温离心, 取上清液, 按试剂盒说明书分别测定脑组织中 SOD、CAT、NOS 活性及总抗氧化能力、MDA 含量。考马斯亮蓝法标定蛋白含量。

1.5 统计学分析

用 SPSS 统计学软件进行统计学处理, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 GSP 对常压缺氧小鼠存活时间的影响

与正常对照组相比, GSP 和 Nim 能明显延长常压缺氧小鼠的存活时间, 减少耗氧量, 提高小鼠的耐缺氧能力, 并呈剂量依赖性 (表 1)。

2.2 GSP 对小鼠急性不完全脑缺血的影响

与缺血模型组比较, 各剂量组的 GSP 均能明显延长小鼠急性不完全脑缺血的存活时间, Nim 组也能明显延长小鼠的存活时间 (表 2)。

2.3 GSP 对小鼠脑缺血再灌注后脑组织 SOD、CAT 活性和 MDA 含量及总抗氧化能力的影响

缺血再灌注组小鼠脑组织中 SOD、CAT 活性及

表 1 GSP 对常压缺氧小鼠存活时间及耗氧量的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	剂量 (mg/kg)	存活时间 (min)	耗氧量 (ml)			
				5min	10min	20min	30min
对照组	10	—	21.75 ± 2.68	5.55 ± 0.80	9.08 ± 1.54	12.80 ± 1.40	13.43 ± 1.27 (n=7)
GSP 组	10	10	$28.60 \pm 4.27^{\text{①}}$	$2.67 \pm 0.80^{\text{①}}$	$4.75 \pm 1.48^{\text{①}}$	$9.70 \pm 2.16^{\text{①}}$	$11.15 \pm 1.56^{\text{①}}$
	10	20	$59.40 \pm 5.48^{\text{①}}$	$1.75 \pm 0.49^{\text{①}}$	$5.15 \pm 1.72^{\text{①}}$	$8.75 \pm 1.80^{\text{①}}$	$10.80 \pm 1.27^{\text{①}}$
	10	40	$66.30 \pm 3.89^{\text{①}}$	$0.69 \pm 0.22^{\text{①}}$	$2.89 \pm 1.40^{\text{①}}$	$6.57 \pm 1.99^{\text{①}}$	$10.35 \pm 1.25^{\text{①}}$
Nim 组	10	2	$44.10 \pm 3.11^{\text{①}}$	$2.24 \pm 0.23^{\text{①}}$	$5.80 \pm 0.71^{\text{①}}$	$9.90 \pm 0.74^{\text{①}}$	$11.32 \pm 1.30^{\text{①}}$

①与对照组比较 $P < 0.01$

表 2 GSP 对小鼠急性不完全脑缺血的影响

组别	动物数	剂量 (mg/kg)	存活时间 (min)
假手术组	10	—	全部存活
缺血组	10	—	4.30 ± 0.34
GSP 组	10	10	$5.52 \pm 0.79^{\text{①}}$
	10	20	$12.01 \pm 0.77^{\text{①}}$
	10	40	$13.48 \pm 0.97^{\text{①}}$
Nim 组	10	2	$16.45 \pm 1.40^{\text{①}}$

①与缺血组相比 $P < 0.01$

表 3 GSP 对小鼠脑缺血再灌注后脑组织 SOD、CAT 活性和 MDA 含量及总抗氧化能力的影响 (n=8)

组别	剂量 (mg/kg)	SOD (kU/gPro)	CAT (kU/gPro)	T-AOC (kU/gPro)	MDA (mmol/gPro)
假手术组	—	53.89 ± 11.15	17.80 ± 4.85	2.57 ± 0.40	1.70 ± 0.61
缺血再灌注组	—	$26.87 \pm 8.05^{\text{①}}$	$10.51 \pm 1.43^{\text{①}}$	$1.08 \pm 0.32^{\text{①}}$	$5.43 \pm 1.19^{\text{①}}$
GSP 组	10	$37.00 \pm 9.03^{\text{②}}$	12.44 ± 1.45	$1.83 \pm 0.10^{\text{③}}$	4.89 ± 0.89
	20	$39.47 \pm 10.59^{\text{②}}$	$13.35 \pm 2.16^{\text{②}}$	$2.06 \pm 0.32^{\text{③}}$	$4.00 \pm 0.48^{\text{③}}$
	40	$44.24 \pm 9.73^{\text{③}}$	$14.08 \pm 2.75^{\text{③}}$	$2.36 \pm 0.25^{\text{③}}$	$2.88 \pm 0.70^{\text{③}}$
Nim 组	2	$42.98 \pm 8.49^{\text{③}}$	$13.71 \pm 2.30^{\text{③}}$	$2.03 \pm 0.57^{\text{③}}$	$3.01 \pm 0.94^{\text{③}}$

①与假手术组相比 $P < 0.01$; 与缺血再灌注组相比 ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

总抗氧化能力较假手术组明显减少,MDA 含量明显增加。GSP 和 Nim 能不同程度的抑制缺血再灌注所致的 SOD、CAT 活性及总抗氧化能力的下降和 MDA 含量的增加(表 3)。

2.4 GSP 对小鼠脑缺血再灌注后脑组织 NOS 活性的影响

从表 4 可见脑缺血再灌注组 NOS 活性明显高于假手术组,GSP 和 Nim 能不同程度的抑制缺血再灌注所致的 NOS 活性的增高(表 4)。

表 4 GSP 对小鼠脑缺血再灌注后脑组织 NOS 活性的影响 (n=8)

组别	动物数	剂量(mg·kg ⁻¹)	NOS 活性(kU·g ⁻¹ Pro)
假手术组	8	—	0.62±0.18
缺血再灌注组	8	—	2.44±0.37 ^①
GSP 组	8	10	2.11±0.18 ^②
	8	20	1.54±0.20 ^③
	8	40	1.30±0.20 ^③
Nim 组	8	2	1.19±0.32 ^③

①与假手术组相比 $P<0.01$; 与缺血再灌注组相比② $P<0.05$,③ $P<0.01$

3 讨论

缺血性脑血管病是目前公认为危害人类健康最重要的疾病之一。目前采用的溶栓疗法在取得显著疗效的同时也易通过氧自由基和兴奋性氨基酸的过度释放、细胞内钙超载、炎性细胞因子和细胞黏附分子的高表达、NO 的细胞毒作用、血脑屏障的异常开放等机制导致再灌注损伤,使缺血脑组织病理性损害进一步加重,严重影响患者的预后^[8-9]。目前认为,自由基是脑缺血再灌注损伤的重要因素之一。脑缺血再灌注损伤过程中可产生大量自由基,如 O[·]、NO₂·、H₂O₂、OH·等,同时,白细胞激活也是产生自由基的一个重要来源。过量的自由基可攻击细胞膜的不饱和脂肪酸,使之发生脂质过氧化反应,造成生物膜结构和功能破坏^[10],还能抑制蛋白质的功能,破坏核酸及染色体。此外,脑缺血后 ATP 生成减少,能量代谢障碍引发的乳酸堆积也会加重脑水肿,它与自由基之间的相互作用可导致更为广泛的脑损伤。机体内同时存在对抗自由基和过氧化物的防御系统,主要通过 SOD、CAT 等酶清除自由基。当自由基的产生超过机体的清除能力时就会通过上述机制造成机体的损伤。因此,增强自由基清除系统如 SOD 的功能,降低耗氧量,提高机体的耐缺氧能力是有效防治脑缺血及再灌注损伤的重要环节。MDA 为脂质过氧化反应的主要终产物,测定其含量可间接反映机体中自由基水平及脂质过氧化反应程度^[11]。脑细胞内含有 CAT,可以清除 H₂O₂,以避免高毒性的 OH·

的产生。SOD 是一种金属蛋白,可以通过歧化反应清除 O[·],从而保护细胞不受毒性氧自由基的损害。T-AOC 可以很好地反映机体防御系统抗氧化能力的强弱。本实验在小鼠脑缺血再灌注模型上观察到:缺血再灌注组小鼠脑组织中 SOD、CAT 活性及总抗氧化能力较假手术组明显减少,MDA 含量明显增加。表明在脑缺血再灌注过程中,机体抗氧化酶类及总抗氧化能力降低,自由基的生成增加。与缺血再灌注组相比,GSP 能明显提高小鼠脑缺血再灌注时脑组织中降低的 SOD、CAT 活性及 T-AOC,减少脂质过氧化产物 MDA 的生成,表明 GSP 具有抗自由基的产生,提高机体抗氧化能力的作用。此作用与目前临床广泛应用的钙通道阻滞剂尼莫地平的作用相似。有学者在大鼠心肌缺血再灌注模型上也证实了 GSP 的这一作用^[3,12-13],并认为其机制在于通过自由基捕获清除自由基,抑制脂质过氧化反应。

在小鼠常压耐缺氧和急性不完全脑缺血的模型上观察到,GSP 能明显延长常压缺氧和急性不完全脑缺血小鼠的存活时间,提高小鼠耐缺氧能力,降低耗氧量,这进一步证明 GSP 对脑缺氧、缺血及再灌注损伤具有保护作用。

近年来的研究表明,NO 参与了脑缺血再灌注损伤的病理过程^[14]。由于 NO 是由 NOS 催化左旋精氨酸生成的,因此通过检测脑组织中 NOS 活性可判断脑组织中 NO 含量。原花青素对 NO 的代谢具有双向调节作用,在血管内皮细胞具有正向调节(增加 NO 浓度),而在小鼠巨噬细胞 RAW264.7,则产生负向调节(降低 NO 浓度)作用,巨噬细胞被细菌壁上的脂质多糖和干扰素(γ-IFN)激活,引发大量 NO 合成酶的表达,而在前培养中加人生理浓度的原花青素能显著降低 NO 产生,这种现象涉及原花青素的多种生物学活性,如 NO 的清除活性,抑制 NO 合成酶及其 mRNA 表达活性,原花青素的这种作用使之可能成为多种疾病的治疗因子^[15]。本实验观察到,GSP 组 NOS 的活性明显低于脑缺血再灌注组,表明 GSP 可通过降低脑缺血再灌注损伤中 NOS 活性而发挥脑保护作用。

4 结论

GSP 对脑缺氧、缺血及再灌注损伤具有明显的保护作用,有可能开发成治疗脑缺血再灌注损伤的药物,其主要机制可能与其抗自由基,增强机体的抗氧化能力,降低 NOS 活性,从而减少 NO 的毒性作用有关。

参考文献

- [1] Bagchi D, Garg A, Krohn RL, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 5(2):179—189.
- [2] Bagchi D, Bagchi M, Stohs SI, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention[J]. Toxicology, 2000, 48(2—3):187—97.
- [3] Pataki T, Bak I, Kovacs P, et al. Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts[J]. Am J Clin Nutr, 2002, 75(5):894—899.
- [4] 徐超. 小鼠耐缺氧实验. 见: 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编[M]. 药理学实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 948.
- [5] 罗德成. 影响缺氧耐受性的因素. 见: 张希贤主编, 尤家禄, 金丽娟副主编. 病理生理学实习指导[M]. 第 1 版. 北京: 科学技术文献出版社出版, 1988. 59—61.
- [6] 张广钦, 陈世忠, 郝雪梅, 等. 厚朴酚对脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(9):1020—1023.
- [7] 赵红, 朱丽娜, 陈学新, 等. 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.
- [8] Crack PJ, Taylor JM, De Haan JB, et al. Glutathione peroxidase-1 contributes to the neuroprotection seen in the superoxide dismutase-1 transgenic mouse in response to ischemia/reperfusion injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(1):19—22.
- [9] Bromont C, Marie C, Bralet J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats[J]. Stroke, 1989, 20(7):918—924.
- [10] Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage [J]. Stroke, 1996, 27(6):1124—1129.
- [11] Lowes S. Oxidative stress in brain ischemia [J]. Brain Pathol, 1999, 9(1):119—131.
- [12] Sato M, Aulik G, Pay PS, et al. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(6):1289—1297.
- [13] 汪晨静, 高明堂. 原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(2):173—175.
- [14] 孙翠梅, 孙圣刚. 一氧化氮及合成酶与脑梗塞[J]. 脑与神经疾病杂志, 2001, 9(5):319—320.
- [15] 范明远, 叶青. 体内自由基清除剂及抗氧化剂—原花青素的研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2001, 2(4):303—305.

首届实用康复医学论坛招生通知

为建立与国际接轨的康复医学继续教育和学术交流平台, 促进本学科发展, 2006 年 5 月 19—23 日将在南京举办实用康复医学论坛。

论坛采用多个国家级继续教育班、自由论坛、研究生答辩和新技术/新设备/新药品介绍同时举办的形式, 也将开展社区康复教育、大型科普讲座和专家义诊, 以利于参加者可以汲取自己最感兴趣的知识。为了提高学术层次, 论坛特邀请了美国、日本、以色列、韩国等国际一流专家和国内知名专家参加。

优惠举措: 对提早网络注册并交费者将给与费用优惠。对于来自边远/贫困地区和基层单位的学员也将有优惠待遇。

联系方式: 南京市珞珈路 30 号 611 房间 (210024), 高秋野; 电话/传真: 025-83318752; 电子邮件: gaoqiuye@carm.org.cn; 详情请见中国康复医学会网站: www.carm.org.cn。

第十二届全国小儿脑性瘫痪现代康复技术培训班通知

第十二届全国小儿脑性瘫痪康复技术培训班受卫生部委托, 由卫生部医政司佳木斯康复医学人才培养中心、佳木斯大学康复医学院暨黑龙江省小儿脑性瘫痪防治治疗育中心承办, 授国家级继续教育学分 24 学分。培训班主要学习小儿脑性瘫痪现代康复的基本知识、基本理论及基本技能, 以适应综合医院康复科、儿科、残疾儿童康复中心、儿童福利院和社区康复的需要, 并学习目前国际上广泛应用的小儿脑性瘫痪现代康复技术及综合康复治疗的新技术、新方法与新进展。拟开班时间为 2006 年 7 月上旬, 为期两周。学费 1000 元, 资料费 100 元, 食宿统一安排, 费用自理。培训班拟邀请国内外著名专家进行讲学指导。拟参加培训班的同志务必于 2006 年 5 月 15 日前将姓名、性别、年龄、职称、详细通讯地址 (含邮编)、单位介绍信寄到培训中心, 中心负责发报到通知, 凭报到通知报到。也可直接与培训中心联系。联系地址: 黑龙江省佳木斯市德祥街 419 号黑龙江省小儿脑性瘫痪防治治疗育中心, 联系人: 鲍秀芹、邹春玉。邮编: 154003, 电话: 0454-8623645, 0454-8673024。

卫生部医政司佳木斯康复医学培训中心
黑龙江省小儿脑性瘫痪防治治疗育中心