

茶黄素对大鼠缺血性脑损伤的预防作用

李红月^{*}，王清，刘红美，王淑琴
(湖北三峡职业技术学院 医学院，湖北 宜昌 443000)

【摘要】 目的:观察茶黄素对大鼠缺血性脑损伤的预防作用。**方法:**64 只健康成年 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组与茶黄素低、高剂量组。茶黄素低、高剂量组分别 *ig* 20,40 mg·kg⁻¹ 茶黄素,假手术组和模型组分别 *ig* 等体积生理盐水。连续给药 7 d 后,采用大脑中动脉线栓法(MCAO)复制大鼠实验性脑缺血模型。缺血 24 h 后,观察大鼠行为并用 Longa 法进行神经行为学评分。从每组中随机取 6 只计算大鼠的脑组织含水量,其余 10 只测定脑组织超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)水平。**结果:**与假手术组相比,模型组大鼠出现明显的行为学障碍,脑组织含水量,MDA,NO 含量升高,SOD 活性降低。与模型组相比,茶黄素低、高剂量组大鼠行为学评分显著提高,脑组织含水量和 MDA 含量显著降低,SOD 活性显著提高,高剂量组 NO 含量显著降低。**结论:**茶黄素对大鼠缺血性脑损伤有一定的预防作用。

【关键词】 茶黄素; 脑缺血; 氧化应激; 预防作用

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2015)05-0172-03

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050172

Proventive Effects of Theaflavins on Ischemic Brain Injuries in Rats LI Hong-yue^{*}, WANG Qing, LIU Hong-mei, WANG Shu-qin (*School of Medicine, Three Gorges College of Vocational and Technical in Hubei, Yichang 443000, China*)

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of theaflavin against ischemic brain injuries in rats. **Method:** Sixty-four SD rats were randomly divided into 4 groups as following: sham operation group (Sham), model group (Model), theaflavin low and high dose group, which was administrated with theaflavin 20, 40 mg·kg⁻¹ respectively. Rats of Sham and Model group were administrated with equal-volume normal saline. Rats were treated with continued 7 days, and then ischemic brain injuries in rats were reproduced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). After operation 24 h, rats were observed behavior and neurological behavior score by Longa method. Then, water content of brain tissue in rats was calculated in 6 rats selected from each group. Finally, another 10 rats in each group were determined superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) level in ischemic brain tissue by colorimetric methods. **Result:** Compared with Sham group, there were obvious behavioral disorders displayed in Model group, simultaneously water content of brain tissue, MDA and NO content were elevated, however, SOD activity was reduced. Compared with Model group, behavioral score and SOD activity in theaflavins groups were significantly ameliorated, yet water contents of brain tissue and MDA content were attenuated significantly. Besides, NO content was elevated significantly in theaflavins high dose group. **Conclusion:** Theaflavins can provent against ischemic brain injuries in rats.

【Key words】 theaflavin; brain ischemia; oxidative stress; preventive effects

茶黄素(theaflavins,TFs)是红茶发酵过程中产生的一类具有苯并卓酚酮结构的化合物的总称,也是红茶中的主要成分,对红茶的色香味及品质起着决定性的作用^[1]。国内外学者还发现了茶黄素具有多方面的药用价值,如抗肿瘤、抗氧化、降血脂、抗病毒等作用,极具开发潜力。有学者发现,茶黄素可以通过强大的抗氧化作用显著减轻小鼠的脂肪肝缺血再灌注损伤^[2]。因此,笔者设计一系列实验,观察茶黄素能否用同样的机制对大鼠的缺血性脑损伤起到一定的预防作用。

【收稿日期】 20140723(002)

【通讯作者】 ^{*} 李红月,讲师,硕士,从事基础药理学教学和科研,Tel:15272165880,E-mail:lihongyue.lhy@163.com

1 材料

1.1 动物 健康成年 SD 大鼠 64 只,SPF 级,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,购于三峡大学医学院,合格证号 SCXK(鄂)2011-0012。

1.2 药物 TFs 购于成都普菲德生物技术有限公司,纯度:液相色谱(HPLC) ≥ 98%,编号 JOT10733, CAS 号 4670-5-7)。

1.3 试剂 超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)试剂盒(均为南京建成生物工程研究所,批号均为 20131226)。

1.4 仪器 TYPE1500-458 型全波长酶标仪(武汉新生福地贸易公司),ALLEGRA 64R 型高速冷冻离心机(湖北国贸贸易公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将 64 只 SD 大鼠随机分为 4 组:①假手术组、②模型组、③茶黄素低剂量组、④茶黄素高剂量组。其中,茶黄素低、高剂量组分别以 20, 40 mg·kg⁻¹茶黄素 ig,假手术组和模型组分别 ig 给予等体积生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。

2.2 动物模型制备 各组大鼠于末次给药后 1 h,用 10% 水合氯醛(0.3 g·kg⁻¹,ip)进行麻醉,仰卧位固定。采用改良的线栓法制备大鼠脑缺血模型^[3]:将麻醉后的大鼠仰卧于实验台上,从颈部右侧旁正中切口切开皮肤,分离皮下组织,暴露右侧颈部血管,颈总动脉与颈外动脉近心端处穿线结扎,于颈内动脉远心端置动脉夹夹闭。在颈总动脉结扎处远心端 0.5 cm 处剪口,插入备好的尼龙线栓,去除动脉夹,沿颈内动脉轻轻向前推进至大脑前动脉(深度为 18 mm 左右),用丝线固定颈内动脉及线栓,缝合皮下组织和皮肤。假手术组大鼠术中不插入线栓,其余过程与上述相同。

2.3 指标检测

2.3.1 神经功能损伤评分 于术后 24 h 时参照 Longa E Z 等^[4]的神经缺陷 5 级 4 分法对大鼠行为学进行评分,0 分(正常)无功能障碍;1 分(轻度神经行为学缺陷)不能完全伸展左前肢;2 分(中度神经行为学缺陷)向左侧旋转;3 分(重度神经行为学缺陷)向左侧倾倒;4 分(极重度神经行为学缺陷)无自主活动伴意识抑制。评分 1 分及以上作为实验对象。

2.3.2 脑组织含水量的测定 评分结束后,各组随机抽取 6 只大鼠,用 10% 水合氯酸深度麻醉后,仰卧位固定,打开胸腔和腹腔,暴露心脏及肝脏。将钝性注射器针头经心尖插入左心室至主动脉口固定,

快速剪开右心耳,用 250 mL 生理盐水经心脏快速灌注。当肝脏完全变白后迅速将动物断头处死取脑。于冰上在右侧距额叶前端 3 mm 和 9 mm 处进行冠状分离取中间 6 mm 厚的脑组织块,然后沿此脑块矢状缝两侧约 2 mm 处,从上至下切去两侧半球的正中结构,将右侧脑块作为缺血脑组织^[5]。用滤纸擦去表面残血,称量湿重,然后用 100 ℃ 烘箱烤干,称量干重。

脑含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 × 100% ^[6]

2.3.3 脑组织中 SOD,MDA,NO 测定 另取 10 只大鼠,用上述方法取缺血区脑组织,加入 0.9% NaCl,置组织匀浆器中充分研磨,4 ℃ 环境下 3 000 r·min⁻¹离心 15 min。取上清液,参照试剂盒说明书以硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量、黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性、硝酸还原酶法测定 NO 含量。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件,所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析统计实验结果, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能损伤评分比较 造模 24 h 后,假手术组大鼠未见明显神经功能缺损,其他组均出现神经行为学异常。模型组与假手术组相比,评分明显升高;茶黄素低、高剂量组的评分明显低于模型组,结果具有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 脑组织含水量比较 假手术组无明显脑水肿,与假手术组相比,模型组脑组织含水量升高($P < 0.01$)。与模型组相比,茶黄素低、高剂量组的脑组织含水量显著降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 茶黄素对大鼠神经行为学评分和脑组织含水量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

Table 1 Neurobehavioral scores and brain water content of rats compared in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	行为学评分/分	脑组织含水量/%
假手术	-	0 ²⁾	71.26 ± 6.54 ²⁾
模型	-	3.23 ± 0.60	82.57 ± 7.22
茶黄素	20	2.16 ± 0.45 ¹⁾	76.11 ± 5.84 ¹⁾
	40	2.10 ± 0.51 ¹⁾	74.38 ± 5.09 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 脑组织中 SOD,MDA,NO 比较 模型组与假手术组相比,脑组织中 SOD 活性显著下降,MDA 和 NO 含量明显提高($P < 0.01$);而茶黄素低、高剂量组与模型组相比,脑组织中 SOD 活性显著提高,MDA 的含量显著下降($P < 0.05$)。茶黄素高剂量组脑组织 NO 水平显著低于模型组($P < 0.05$)。见

表 2。

表 2 茶黄素对大鼠脑组织中 SOD,MDA,NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 SOD, MDA and NO levels in brain tissue of rats compared in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	SOD	MDA	NO
	/mg·kg ⁻¹	/U·mg ⁻¹	/μmol·g ⁻¹	/μmol·g ⁻¹
假手术	—	254. 31 ± 36. 74 ²⁾	6. 09 ± 1. 38 ²⁾	0. 57 ± 0. 12 ²⁾
模型	—	187. 12 ± 35. 12	11. 25 ± 3. 03	0. 92 ± 0. 20
茶黄素	20	229. 56 ± 20. 38 ¹⁾	9. 13 ± 2. 21 ¹⁾	0. 78 ± 0. 16
	40	238. 33 ± 36. 42 ¹⁾	7. 65 ± 1. 84 ²⁾	0. 67 ± 0. 18 ¹⁾

4 讨论

局灶性脑缺血可引起一部分脑细胞缺氧、软化甚至坏死,进而出现肢体偏瘫、失语等神经功能损伤的症状。研究表明,在血管闭塞后引起这些变化的机制可能涉及到脑组织能量耗竭、酸中毒、氧自由基损伤、细胞内钙离子超载、神经细胞凋亡等复杂的病理生理过程^[7]。其中,氧自由基损伤是造成脑神经元损伤的重要原因之一。因此本课题组设计实验探讨预防性应用茶黄素能否减轻缺血性脑损伤,其作用是否和减轻氧化应激有关。

由于大脑中动脉主干分布区梗死发病率在首发脑梗死中居首位,占 82. 2% ,所以本研究采用大脑中动脉线栓法制备局灶性脑缺血模型。经过造模后,大鼠的行为学与脑组织含水量均出现了损伤性变化。实验结果表明,茶黄素可以有效改善缺血性脑损伤大鼠的神经行为学评分,减轻脑水肿,提示茶黄素对缺血性脑损伤可以产生一定的预防作用。

SOD 是体内主要的自由基清除剂,可清除生物体内产生的 H₂O₂ 等物质,测定 SOD 活力可反映机体或组织内源性抗氧化能力。MDA 是脂质过氧化反应的主要降解产物,可间接反映组织受自由基损伤程度。脑缺血状态下体内 NO 含量显著增加,

进而与超氧自由基或 O₂ 反应,可生成毒性更大的超氧亚硝酸根(OONO⁻),导致神经元死亡及脑组织损伤^[8],测定 NO 含量也可反映组织受自由基损伤的程度。本研究发现,茶黄素可以通过降低体内 MDA 及 NO 水平,提高体内 SOD 活性,通过减轻氧化应激来预防缺血性脑损伤。

综上所述,茶黄素对大鼠缺血性脑损伤可起到预防作用,其作用机制和减轻氧化应激有关,但详细的分子机制还需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 李博. 茶花的安全性评价及茶黄素和茶籽黄酮苷对呼吸链酶作用机理的研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.

[2] 罗小雨. 茶黄素减轻小鼠脂肪肝缺血再灌注损伤的研究[D]. 上海:复旦大学,2012.

[3] 王荣森,王舒,沈燕. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型及其影响因素[J]. 医学研究生学报,2013,26(5): 520-523.

[4] 刘俊伟,任冶龙,刘旭玲,等. 人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积及脑组织和血清 IL-1β 的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(12):1696-1700.

[5] 余智. 吡格列酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及其机制研究[D]. 桂林:桂林医学院,2013.

[6] 白雪. 柚皮素对大鼠局灶性那缺血损伤的保护作用及对 NOD2, RIP2, NF-κB, MMP-9 和 claudin-5 表达影响的研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2012.

[7] 周天梅,佟丽妍,张卫华. 续命汤对局灶性脑缺血中风大鼠血清白介素-1β 和肿瘤坏死因子-α 含量的影响[J]. 中国中医急症,2014,23(2):246-253.

[8] 薛卫星,魏礼洲,韩福新,等. 香芹酚通过降低一氧化氮水平防治大鼠脑缺血/再灌注损伤的研究[J]. 中南药学, 2014,12(2):109-112.

[责任编辑 聂淑琴]