

槲皮素对慢性脑缺血认知障碍大鼠神经炎症反应的调节*

李利娟¹, 韩志芬², 李凌鑫¹, 鄢波^{3△}

1. 四川大学华西医院 康复医学中心(成都 610041); 2. 成都中医药大学附属医院 超声医学科(成都 610075);
3. 四川大学华西医院 神经内科(成都 610041)

【摘要】目的 观察槲皮素对慢性脑缺血认知障碍大鼠的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 采用双侧颈总动脉永久性结扎建立慢性脑缺血大鼠模型,假手术组作为正常对照。在手术8周后,采用Morris水迷宫实验筛选符合痴呆标准的大鼠,随机分为生理盐水组、槲皮素低剂量[50 mg/(kg·d)]治疗组及槲皮素高剂量[100 mg/(kg·d)]治疗组。按其分组连续灌胃干预4周后,再行Morris水迷宫实验评估学习记忆能力,HE染色观察皮层海马病理改变;Western blot检测额叶和海马胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)蛋白的表达;ELISA检测额叶和海马炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素(interleukin, IL)-6的水平。**结果** 连续干预4周后,与假手术组相比,生理盐水组大鼠在水迷宫测试中,逃避潜伏期延长以及目标象限活动减少($P<0.05$),且行为学测试成绩差于干预前($P<0.05$);与假手术组相比,槲皮素低剂量治疗组和槲皮素高剂量治疗组逃避潜伏期延长以及目标象限活动也减少($P<0.05$),但是相应成绩优于生理盐水组($P<0.05$),且与干预前成绩相比无明显变化($P>0.05$)。HE染色结果显示,生理盐水组大鼠海马和皮层神经元退化明显,细胞数目明显减少,排列松散,层次减少紊乱,深染细胞多见;与生理盐水组相比,槲皮素低剂量治疗组和槲皮素高剂量治疗组相应病理损害减轻。与假手术组相比,生理盐水组、槲皮素低剂量治疗组及槲皮素高剂量治疗组大鼠海马和额叶GFAP、iNOS、NF- κ B的表达及炎症因子TNF- α 和IL-6的水平均增加($P<0.05$),但与生理盐水组相比,槲皮素低剂量治疗组及槲皮素高剂量治疗组相应值均减少($P<0.05$)。**结论** 槲皮素可能通过抑制星形胶质细胞活化,减少iNOS、NF- κ B的表达及炎症因子TNF- α 和IL-6的释放介导其对慢性脑缺血认知障碍大鼠的保护作用。

【关键词】 慢性脑缺血 血管性认知障碍 槲皮素 星形胶质细胞 神经炎症

Effects of Geniposide on the Neuroinflammation in Chronic Cerebral Hypoperfusion Rat Model LI Li-juan¹, HAN Zhi-fen², LI Ling-xin¹, YAN Bo^{3△}. 1. Rehabilitation Medicine Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. Department of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: yanbo96@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and the mechanism of geniposide on the neuroinflammation occurred in the neurodegeneration course of a chronic cerebral hypoperfusion rat model. **Methods** Permanent bilateral common carotid arteries occlusions was performed to induce gradient cognitive deficit in rats. The sham group was used as control group. Then 18 rats that met the Screening Criteria were randomly selected 8 weeks post surgery, and were randomly divided into three groups, the 2-VO rats with saline solution group (2-VO+saline group), 2-VO rats with 50 mg/kg per day geniposide group (2-VO+G50) and 2-VO rats with 100 mg/kg per day geniposide group (2-VO+G100). All intervention groups were daily administered with geniposide or saline for 4 weeks. The sham-operated rats were administrated with saline. Then the rats were tested for Morris water maze to evaluate the memory and learning ability. Rats were sacrificed to obtain cortex and hippocampus tissues for HE staining and to detect expression level of glial fibrillary acidic protein (GFAP), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nuclear factor- κ B (NF- κ B), and the level of inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6. **Results** The 2-VO+saline group rats showed significant longer escape latency and less percent time in target quadrant, compared with sham-operation group ($P<0.05$). The escape latency of 2-VO+G50 and 2-VO+G100 groups were shorter than the 2-VO+saline group ($P<0.05$), but still longer than the sham group ($P<0.05$), the percent time in target quadrant of which were more than the 2-VO+saline group and less than the sham group. However, there was no significant difference between these two groups. HE staining of sham group showed that neurons in the cortex and hippocampus lined up in order, cellular nucleus were big and globular. HE staining results showed that there were obviously neuronal cells loss, severe cytomorphosis, structural disappearance and nuclear fragmentation in the 2-VO+saline group. The 2-VO+G50 and 2-VO+G100 groups showed less neurodamage than the 2-VO+saline group with less neuronal cells loss, cytomorphosis and ambiguous nucleus. GFAP, iNOS, NF- κ B were all highly expressed in the process of cognitive dysfunction in rats after chronic cerebral ischemia,

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No.2016SZ0039)资助

△ 通信作者, E-mail: yanbo96@163.com

however geniposide intervention (50 and 100 mg/kg per day) significantly decreased the expression of the above proteins. In addition, much more TNF- α and IL-6 were released in brain induced by chronic cerebral ischemia, and the levels were decreased after chronic geniposide oral treatment. No significant differences were detected between 2-VO+G50 and 2-VO+G100 groups. **Conclusion** These findings demonstrated that geniposide significantly prevented cognition deterioration induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. Geniposide inhibited neuroinflammation occurred in the process of chronic cerebral ischemia probably via reducing iNOS and NF- κ B expression and suppressing the release of inflammatory factor TNF- α and IL-6.

【Key words】 Chronic global ischemia Vascular cognitive impairment Geniposide Astrocyte
Neuroinflammation

血管性认知功能障碍(vascular cognitive impairment, VCI)是由脑血管病的危险因素、明显脑血管病或不明显脑血管病(如慢性脑低灌注、白质疏松和腔隙状态)引起的从轻度认知功能障碍到痴呆的一大类综合征^[1]。随着社会老龄化进程, VCI已经成了影响老年人健康和生活方式的常见病和多发病, 给家庭、社会造成沉重负担, 研究和开发治疗认知功能障碍的药物已成为全世界迫切需要解决的医学问题以及研究热点。

栀子甙是传统中药栀子提取物的主要活性成分, 其化学结构明确(分子式: $C_{17}H_{24}O_{10}$), 近年来越来越多的研究证明栀子甙在神经保护方面具有广泛的作用, 包括促进神经生长和神经营养、抗神经炎症反应、抗凋亡、抗氧化应激和抗血栓形成等^[2-4]。我们前期研究在对永久性双侧颈总动脉结扎大鼠模型缺血急性期予栀子甙灌胃口服治疗4周后, 发现栀子甙50 mg/(kg·d)和75 mg/(kg·d)灌胃可以预防全脑低灌注导致的认知功能障碍, 减轻神经损害^[5]。但慢性脑缺血所致神经功能障碍在临床上是一个慢性持续进展的过程, 其病理生理机制与急性脑缺血有所不同。本研究旨在探讨在大鼠慢性脑缺血慢性期予栀子甙干预改善大鼠认知功能障碍的作用机制, 为栀子甙治疗慢性脑缺血致认知功能障碍提供新思路 and 实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物、主要试剂及仪器

1.1.1 实验动物 健康雄性3月龄SD大鼠70只, 体质量350~400 g, 由四川大学实验动物中心提供, 实验前环境适应性喂养7 d, 室温(22 ± 2)℃左右, 光照周期12 h/12 h, 固体颗粒饲料自由摄取和自由饮水。实验过程中的动物饲养及取材均遵守实验动物管理和保护的有关规定。

1.1.2 主要器械、仪器及试剂 医用手术器械、水合氯醛、75%医用酒精、碘伏、5-0丝线、Morris水迷宫(北京新天地科技有限公司)等。抗胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体、抗核转录因子kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)抗体均购于武

汉博士德生物技术有限公司。白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA检测试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。栀子甙冻干粉(SZY071229, HPLC纯度>98%)购于成都双子叶生物科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制作、动物分组及干预 参照文献报道的方法^[6-7], 采用改良型永久性双侧颈总动脉结扎(2-VO)法建立动物模型。按照文献资料报道2-VO后认知功能损害率约为70%~81%^[8], 估算约需要大鼠70只。随机抽取12只大鼠作为假手术组, 58只大鼠行2-VO手术。术后8周对2-VO模型大鼠和假手术组大鼠进行行为学检测(Morris水迷宫实验), 筛选符合认知功能障碍标准的2-VO大鼠。计算每只2-VO模型大鼠的平均逃避潜伏期, 计为value1, 假手术组大鼠的平均逃避潜伏期计为value2, 筛选标准(screening criteria, SC)=(value1-value2)/value1, SC>0.2被视为认知功能受损^[9]。在符合认知功能障碍标准的模型大鼠中随机抽取36只并随机分为3组($n=12$): 生理盐水组(2-VO+saline); 栀子甙低剂量[50 mg/(kg·d)]治疗组(2-VO+GL50); 栀子甙高剂量[100 mg/(kg·d)]治疗组(2-VO+GL100); 假手术组(Sham)为术前随机抽取的12只大鼠。连续给药干预4周后进行行为学检测, 行为学检测结束后取脑组织标本行进一步检测。

给药方法和剂量: 栀子甙临用前用生理盐水配制成质量浓度为25 mg/mL的液体, 4℃保存。按体表面积进行大鼠剂量和人剂量间的换算^[10], 栀子甙给药前均稀释, 按5 mL/(kg·d)灌胃, 每天一次并在同一时间进行, 假手术组及生理盐水治疗组予生理盐水5 mL/(kg·d)灌胃。

1.2.2 行为学检测 (Morris水迷宫实验) 参考文献^[11]进行Morris水迷宫试验。测试包括隐蔽平台实验、探索实验、可视平台实验。

1.2.2.1 隐蔽平台实验 实验前1 d, 先让大鼠在不含平台的水池中自由游泳2 min, 使其熟悉水迷宫环境。实验时平台位置固定不变, 置于西北区域(northwest, NW)中央, 距池壁24 cm, 隐藏于水面下2 cm。在西南、东南、东

北区域选3个点作为入水点,训练时将大鼠面朝池壁轻轻放入水中,记录大鼠在入水60 s内到达平台的时间(逃避潜伏期)、游程、轨迹及平均速度,然后让大鼠在平台上停留15 s。若60 s内找不到平台,潜伏期记为60 s,试验者用手将其引导至平台让其在平台上停留15 s。大鼠的实验顺序随机,待所有大鼠完成1次实验后,间隔15 min进行下轮实验。每天在3个入水点各训练1次。以3次逃避潜伏期的算术均值作为当天成绩进行统计分析,共训练5 d。在隐蔽平台实验中(学习阶段),以大鼠逃避潜伏期变化曲线代表学习曲线,逃避潜伏期下降越快,表明学习记忆能力越强。

1.2.2.2 探索实验 隐蔽平台实验结束后,次日撤除平台。然后任选一相同入水点将大鼠放入水中,记录观察大鼠在60 s内在水池内的活动,包括各象限逗留时间、在各象限内的游程占总游程的百分比、平均速度、轨迹等。

1.2.2.3 可视平台实验 探索实验完成后当天进行可视平台实验。让平台位置露出水面2 cm,其余操作同隐蔽平台实验。

1.2.3 脑组织取材及HE染色 行为学检测结束后,每组随机取6只大鼠用3.5%水合氯醛麻醉,经心脏灌注0.9%生理盐水100~300 mL,继之以体积分数4%多聚甲醛灌注固定后断头取脑组织,放入4℃的体积分数4%多聚甲醛缓冲固定液固定24 h,之后行石蜡包埋、切片及HE染色。每组的另外6只大鼠去颈断头处死,在冰面上分离出双侧海马及额叶,液氮及-80℃冰箱冷冻保存。

1.2.4 Western blot检测 脑组织研碎、洗涤、快速匀浆、离心,应用Bio-rad测定蛋白浓度。所有蛋白样品调

至等浓度后上样,以恒定电压为160 V时的电流强度进行电泳、转膜、封闭。加入一抗孵育:抗GFAP抗体(1:2 000)、抗iNOS抗体(1:2 000)和抗NF-κB抗体(1:2 000)或抗β-actin抗体(1:2 000),4℃孵育过夜。根据一抗来源选择合适的二抗(抗鼠或抗兔)(1:2 000)室温孵育、再洗涤,采用HRP-ECL发光法显色,用Image J图像分析软件对显色结果分析处理,记录电泳条带的平均光密度,以目的条带与内参条带平均光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。以假手术组的相对表达量为1。

1.2.5 ELISA检测 部分脑组织标本被制作成匀浆,取上清液利用试剂盒测定TNF-α、IL-6的水平。

1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐性资料用单因素方差分析(ANOVA),两两比较用最小差异法检验;非齐性资料用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学测试结果

在2-VO手术后8周对53只存活的2-VO组大鼠进行Morris水迷宫测试,并计算SC,共有40只(76%)大鼠符合筛选标准($SC > 0.2$),13只(24%)大鼠不符合标准。在符合筛选标准的大鼠中随机抽取36只大鼠继续实验,结果如表1所示,2-VO模型组和假手术组大鼠逃避潜伏期随着训练时间增加都有逐渐缩短的趋势,但假手术组更明显;2-VO模型组与假手术组比较,逃避潜伏期在第2、3、4、5天延长($P < 0.05$)。

在干预结束后,各组大鼠隐蔽平台实验结果显示(表2),

表 1 治疗前各组大鼠隐蔽平台实验的逃避潜伏期

Table 1 Escape latency of each group in hidden platform trials of Morris water maze test before treatment

Group	n	Escape latency/s				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Sham	12	45.26±6.73	35.06±7.45	20.73±9.37	21.00±7.28	16.00±4.84
2-VO+saline	12	49.25±13.28 [#]	47.81±10.69 [#]	38.91±9.39 [#]	36.92±6.99 [#]	36.53±7.55 [#]
2-VO+G50	12	48.41±11.26 [#]	46.75±12.01 [#]	43.22±9.76 [#]	34.90±9.11 [#]	34.15±8.89 [#]
2-VO+G100	12	52.35±8.22 [#]	49.23±8.63 [#]	41.47±8.55 [#]	38.56±10.78 [#]	36.72±7.89 [#]

[#] $P < 0.05$, vs. sham group

表 2 治疗后各组大鼠隐蔽平台实验的逃避潜伏期

Table 2 Escape latency of each group in hidden platform trials of Morris water maze test post treatment

Group	n	Escape latency/s				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Sham	12	45.26±5.72	30.87±4.71	20.93±6.18	18.63±5.70	16.20±4.74
2-VO+saline	12	53.60±6.82 [#]	52.53±5.90 [#]	46.20±6.40 [#]	45.59±3.66 [#]	45.00±4.60 [#]
2-VO+G50	12	50.33±6.84	41.90±7.66 ^{*,#}	38.85±5.88 ^{*,#}	35.08±4.97 ^{*,#}	32.66±5.13 ^{*,#}
2-VO+G100	12	48.50±6.47	43.04±6.15 ^{*,#}	35.25±5.87 ^{*,#}	34.29±4.72 ^{*,#}	34.70±3.52 ^{*,#}

^{*} $P < 0.05$, vs. 2-VO+saline group; [#] $P < 0.05$, vs. sham group

生理盐水组在第1~5天逃避潜伏期较假手术组延长($P<0.05$),且第2~5天亦较自身干预前延长($P<0.05$)。栀子甙低剂量治疗组和栀子甙高剂量治疗组第2~5天逃避潜伏期长于假手术组($P<0.05$),但均短于生理盐水组($P<0.05$),且与自身干预前的成绩相比,差异无统计学意义。栀子甙低剂量治疗组和栀子甙高剂量治疗组之间逃避潜伏期差异无统计学意义。

在探索实验中(表3),干预结束后,与假手术组相比,生理盐水组在原平台区域的活动时间减少($P<0.05$),且与干预前相比,也表现出下降($P<0.05$);栀子甙低剂量治疗组和栀子甙高剂量治疗组在平台象限的活动时间均高于生理盐水组($P<0.05$),但较假手术组减少($P<0.05$),与干预前成绩相比差异无统计学意义。各组大鼠平均速度间的差异无统计学意义。

表 3 治疗前后各组大鼠的空间探索实验结果

Table 3 Percent time in target quadrant and average speed of each group in Probe trial before and post treatments

Group	n	Before treatment		Post treatment	
		Percent time in target quadrant/%	Average speed/(cm/s)	Percent time in target quadrant/%	Average speed/(cm/s)
Sham	12	49.19±7.77	19.15±6.87	48.08±6.98	17.85±6.37
2-VO+saline	12	36.59±6.15 [#]	20.83±7.58	27.55±6.51 [#]	19.89±8.10
2-VO+G50	12	35.82±7.20 [#]	21.75±7.92	34.39±9.37 ^{*,#}	20.11±6.88
2-VO+G100	12	38.50±9.05 [#]	22.56±6.12	37.06±8.13 ^{*,#}	18.75±5.42

* $P<0.05$, vs. 2-VO+saline group; # $P<0.05$, vs. sham group

在可视平台实验中(表4),各组大鼠逃避潜伏期比较差异无统计学意义。

表 4 治疗前后各组大鼠可视平台实验的逃避潜伏期

Table 4 Escape latency in visibal platform trail of Morris water maze test before and post treatments

Group	n	Escape latency/s	
		Before treatment	Post treatment
Sham	12	19.52±6.44	20.08±7.54
2-VO+saline	12	23.76±6.78	22.84±6.52
2-VO+G50	12	20.99±7.75	20.49±7.23
2-VO+G100	12	19.05±7.91	19.59±8.01

2.2 各组大鼠脑组织病理改变

HE染色显示(图1),假手术组未发现明显病理变化,大鼠额叶皮层及海马CA1区锥体细胞排列整齐、紧密,海马锥体细胞3~4层,细胞结构完整,轮廓清晰,细胞核大而圆、核仁清晰,染色均匀。与假手术组相比,生理盐水组大鼠皮层神经元退化明显,细胞数目明显减少,可见嗜神经细胞现象,海马锥体细胞密度明显减低,排列松散,层次减少紊乱,细胞变形,胞浆消失,结构不清,核固缩,深染细胞多见,胶质增生。栀子甙低剂量治疗组和栀子甙高剂量治疗组大鼠表现相似,皮层可见神经细胞缺失,海马细胞层次清楚,排列较整齐,出现变形的神经细胞,呈三角形,核固缩,核仁显示不清,核膜境界不清,深染,与正常神经细胞交替存在,但与生理盐水组相比,病理损害减轻,深染的三角形神经细胞及嗜神经细胞现象

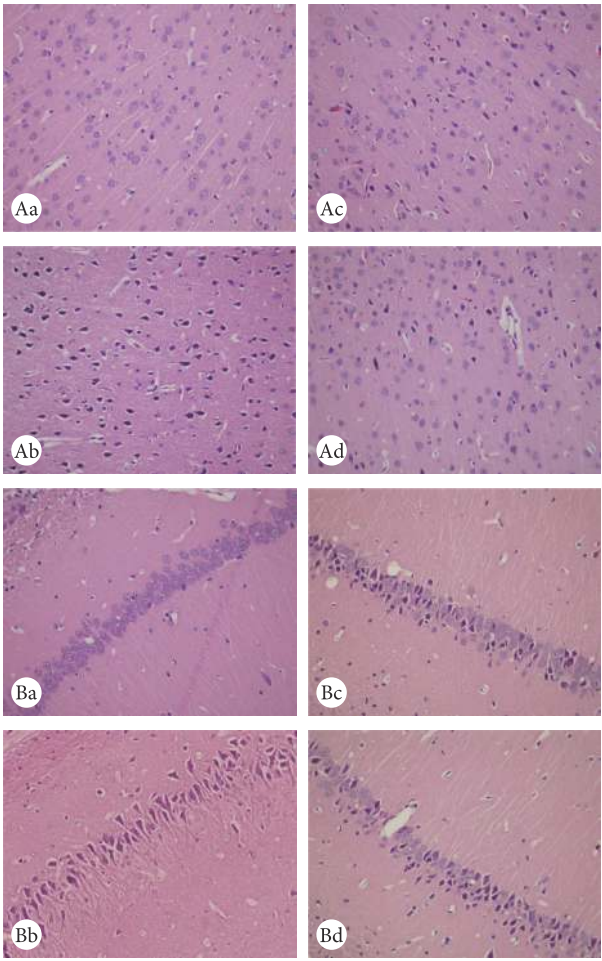


图 1 各组大鼠额叶皮层(A)和海马(B)的病理改变。HE×400

Fig 1 Repreنتive pathological photograph of each group in frontal cortex (A) and hippocampus (B). HE ×400

a: Sham group; b: 2-VO+saline group; c: 2-VO+G50 group; d: 2-VO+G100 group

减少。

2.3 各组大鼠额叶及海马GFAP的表达

GFAP的表达水平反映了星形胶质细胞的活化水平。在假手术组,大鼠额叶及海马GFAP表达相对较低,在生理盐水组GFAP表达明显增加($P < 0.05$),与假手术组相比,栀子甙低剂量治疗组、栀子甙高剂量治疗组中海马和额叶GFAP的表达也增加($P < 0.05$);但与生理盐水组相比,GFAP的表达下降($P < 0.05$);而不同剂量栀子甙组间比较差异无统计学意义。见图2。

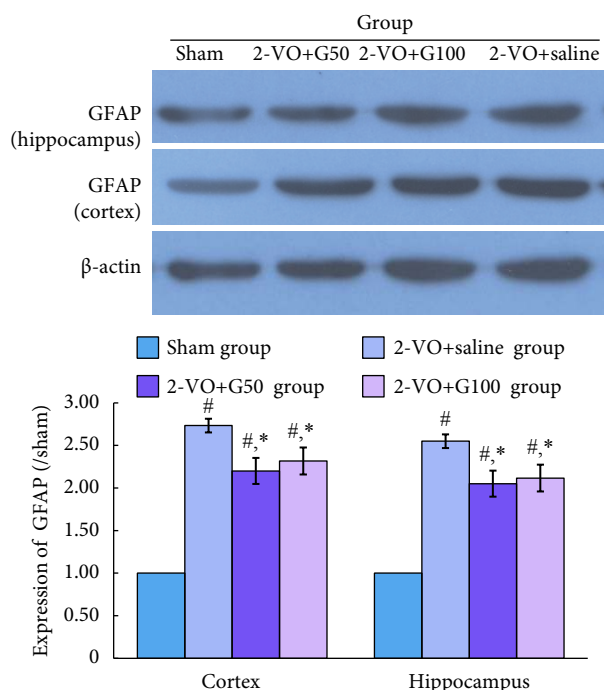


图2 各组大鼠额叶及海马GFAP的表达 (n=12)

Fig 2 Expression of GFAP in cortex and hippocampus of each group (n=12)

* $P < 0.05$, vs. 2-VO+saline group; # $P < 0.05$, vs. sham group

2.4 各组大鼠额叶及海马iNOS和NF-κB的表达

与假手术组相比,在生理盐水组大鼠中额叶和海马iNOS和NF-κB表达增加($P < 0.05$);栀子甙低剂量治疗组、栀子甙高剂量治疗组中海马和额叶iNOS和NF-κB的表达高于假手术组($P < 0.05$),但低于生理盐水组($P < 0.05$);而不同剂量栀子甙组间比较差异无统计学意义。见图3、图4。

2.5 各组大鼠额叶及海马TNF-α、IL-6的水平

如表5所示,与假手术组相比,生理盐水组大鼠额叶及海马TNF-α、IL-6水平升高($P < 0.05$);栀子甙低剂量治疗组、栀子甙高剂量治疗组中额叶和海马TNF-α、IL-6水平也增加($P < 0.05$),但是低于生理盐水组($P < 0.05$)。

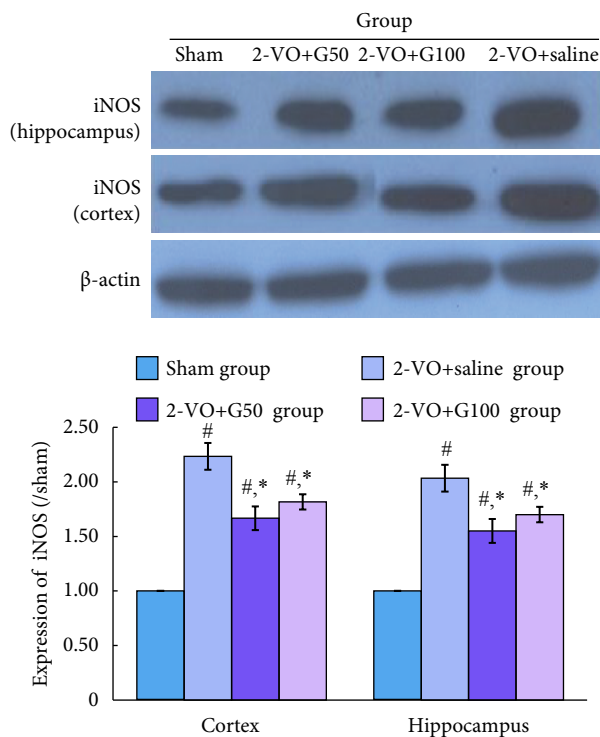


图3 各组大鼠额叶和海马iNOS的表达 (n=12)

Fig 3 Expression of iNOS in cortex and hippocampus of each group (n=12)

* $P < 0.05$, vs. 2-VO+saline group; # $P < 0.05$, vs. sham group

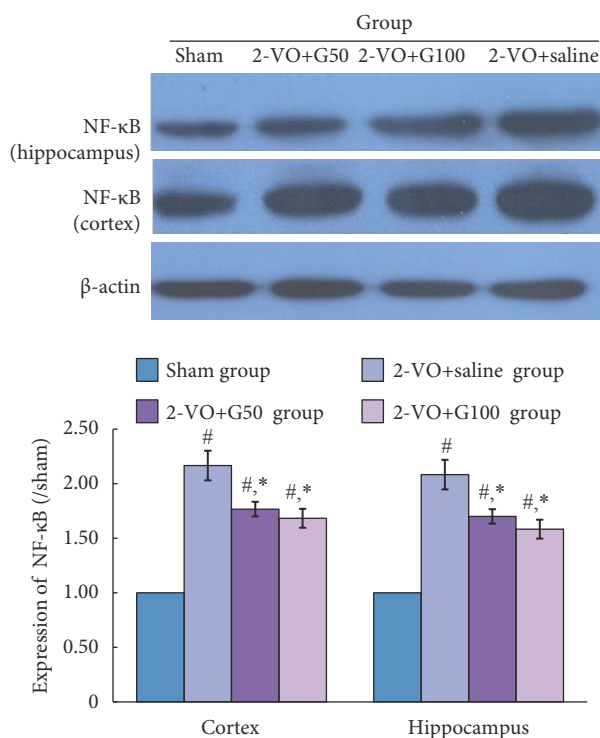


图4 各组大鼠额叶和海马NF-κB的表达 (n=12)

Fig 4 Expression of NF-κB in cortex and hippocampus of each group (n=12)

* $P < 0.05$, vs. 2-VO+saline group; # $P < 0.05$, vs. sham group

表 5 各组大鼠额叶和海马TNF-α、IL-6水平
Table 5 The contents of TNF-α and IL-6 in the cortex and hippocampus of each group

Group	n	TNF-α/(pg/mg)		IL-6/(pg/mg)	
		Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex
Sham	6	18.33±3.55	19.50±4.51	20.33±1.76	18.83±3.82
2-VO+saline	6	32.50±5.24 [#]	36.66±5.89 [#]	34.16±1.29 [#]	32.33±5.89 [#]
2-VO+G50	6	27.00±3.28 ^{*,#}	30.83±4.22 ^{*,#}	29.00±1.21 ^{*,#}	26.83±3.92 ^{*,#}
2-VO+G100	6	26.50±5.24 ^{*,#}	29.83±4.26 ^{*,#}	28.33±1.33 ^{*,#}	24.50±3.27 ^{*,#}

* P<0.05, vs. 2-VO+saline group; # P<0.05, vs. sham group

3 讨论

随着老龄化社会的到来, 认知功能障碍疾病的发病率逐渐增加, VCI是65 ~ 84岁年龄组最常见的认知障碍, 我国研究者对北京、西安、上海和成都的34 807例居民调查显示, > 65岁人群中, VCI的发病率约为1.1%^[12]。慢性脑缺血是血管性认知障碍的重要致病因素, 慢性低灌注是老年痴呆和年龄相关的神经系统疾病的主要原因^[13], 而其发生发展过程中的脑血流量持续下降的程度与记忆损害的严重程度相关^[14]。因此, 建立慢性脑缺血认知功能障碍动物模型对研究VCI的病理生理机制, 评价防治措施及药物疗效等方面有重要的作用。

栀子始载于《神农本草经》, 是一味被广泛应用的传统中药, 具有护肝、利胆、降压、镇静、止血、消肿、醒脑开窍等作用, 在中医临床常用于治疗痴呆、高血压、糖尿病等症。栀子甙是栀子提取物的主要活性成分^[15]。近年来, 栀子甙的临床及实验研究中显示栀子甙及其衍生物京尼平在神经保护方面具有广泛的作用, 包括促进神经生长、神经营养、抗神经炎症反应、抗凋亡、抗氧化应激和抗血栓形成等。研究发现栀子甙能抑制脑出血大鼠48 h后血肿周围脑组织TNF-α和IL-1的表达^[16], 进一步研究^[10]发现栀子甙能够抑制糖氧剥夺诱导的NF-κB通路激活, 减少小胶质细胞炎症因子TNF-α、IL-6、IL-8及IL-10的释放。我们前期研究在对2-VO大鼠缺血急性期予栀子甙灌胃口服治疗4周后, 发现栀子甙50 mg/(kg·d)和75 mg/(kg·d)灌胃可以预防认知功能下降, 减轻神经损害^[5]。但是慢性脑缺血所致认知功能障碍在临床上是一个慢性持续进展过程, 涉及的病理生理改变更为复杂。基于既往文献报道和前期研究结果, 我们推测: 栀子甙能够减缓慢性脑缺血大鼠认知功能障碍的进展, 可能通过抗凋亡、以及抑制星形胶质细胞介导的神经炎性来发挥对慢性脑缺血大鼠的神经保护作用。

大量临床观察和实验研究均提示慢性脑缺血是血管性认知障碍的一个重要触发因素^[17-18], 可以引起严重持续

的神经损害, 导致持久或进展性认知功能障碍。本研究建立了大鼠慢性脑缺血致认知功能障碍模型, 并经大鼠行为学和病理学进行了评价。慢性脑缺血导致的神经元死亡包括坏死和凋亡, 其引起的海马和皮层神经元退行性变随着缺血时间延长逐渐进展^[19-20]。本研究发现, 高、低剂量栀子甙干预组慢性脑缺血导致的神经病理损害减轻, 表明栀子甙灌胃治疗减轻了慢性脑缺血大鼠皮层和海马的进行性病理损害程度, 抑制了进行性的神经退行性变。行为学检测结果显示, 2-VO模型大鼠学习、记忆能力下降, 缺血12周时较缺血8周时改变更为显著; 高、低剂量栀子甙干预能够减轻模型大鼠学习、记忆能力的下降程度。以上结果提示, 双侧颈总动脉结扎术后大鼠学习记忆能力进行性下降, 造成了慢性脑缺血性认知功能损害, 长期口服栀子甙可以明显改善大鼠学习记忆能力进行性下降, 即抑制认知功能的进行性恶化。

慢性脑缺血可分为3个病理生理过程: 急性期(缺血第2 ~ 3天), 慢性期(缺血第4天 ~ 3个月)和终末期(缺血3个月后)^[21]。研究发现小胶质细胞的活化主要集中在缺血的初始阶段, 而星形胶质细胞的活化是慢性脑缺血的迟发事件, 持续到慢性和终末阶段^[22]。慢性脑缺血后, 星形胶质细胞出现活化, 而中枢神经胶质的活化水平与炎症反应严重程度直接相关^[23], GFAP表达增加被认为是脑损伤相关的星形胶质细胞增生活化的标志^[24]。有研究者在2-VO大鼠脑缺血发生的第1周观察到在额叶GFAP有弥漫性和短暂的增加, 而在海马没有观察到明显增加, 但是在缺血30 d后, GFAP在海马和额叶均明显增加, 在缺血3个月仍持续^[25-26]。而反应性星形胶质细胞在慢性脑缺血所致认知障碍大鼠模型的神经退行性变和海马病理改变中起着重要作用^[27]。在本研究中, 我们观察到在大鼠脑缺血发生12周后, 海马和额叶GFAP表达明显增加, 栀子甙灌胃治疗4周可下调海马和额叶GFAP表达, 这表明栀子甙对大鼠慢性脑缺血导致的星形胶质细胞活化具有抑制作用, 星形胶质细胞活化水平的下降, 可能源于栀子甙对慢性脑缺血诱发的大脑炎症和过氧化应激的抑制。

NF- κ B是参与炎症反应的一个重要转录因子,缺血性脑损伤后,激活的星形胶质细胞在小胶质细胞协同下通过NF- κ B通路释放多种神经炎症反应介质,包括促炎症细胞因子IL-6、TNF- α 、趋化因子,促进炎症相关酶iNOS和COX^[28-29]等。慢性脑缺血时星形胶质细胞活化,iNOS被诱导表达^[30]。本研究中,缺血12周后,通过Western blot方法检测到NF- κ B和iNOS表达明显增加,而栀子甙干预可以减少NF- κ B和iNOS的表达。由此可见,NF- κ B和iNOS参与了慢性脑缺血的炎症过程,栀子甙对慢性脑缺血导致的NF- κ B和iNOS表达增加具有抑制作用。临床病理学研究显示,iNOS的过表达以及过量NO产生与炎性介质在各病理器官中的释放呈明显相关性^[31],提示iNOS及其合成的NO和次级产物活性氮等引发炎症反应,对炎症相关疾病发生发展起促进作用,因此抑制iNOS的表达和NO的释放可能是治疗脑缺血后神经退行性变的靶点。

TNF- α 、IL-6是由神经胶质细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞等产生的具有广泛生物学功能的细胞因子,参与机体免疫应答及炎症反应。脑部IL-6的增加参与了认知功能障碍的炎性病理机制,慢性中枢神经系统疾病包括脑缺血可以检测到IL-6增加^[32]。临床研究发现高血清IL-6水平和认知障碍相关^[33-34]。在本研究中,缺血12周后,在大鼠额叶和海马检测到TNF- α 、IL-6水平明显高于假手术组,而栀子甙治疗对慢性脑缺血导致的TNF- α 、IL-6水平增加有抑制作用。

综上,慢性脑缺血可以导致大鼠认知功能进行性下降,长期给予栀子甙能抑制大鼠额叶及海马中星形胶质细胞的活化及炎性因子水平,减轻慢性脑缺血导致的神经炎性损伤。表明栀子甙对慢性脑缺血导致的认知功能障碍有潜在的治疗作用,提示其可能成为一种有效治疗血管性认知障碍的药物。但本研究中50 mg/(kg·d)和100 mg/(kg·d)栀子甙在神经保护方面无明显差异,我们推测对栀子甙来说,一定程度的剂量增加不一定能增加药效。此外,栀子甙除了具有抑制星形胶质细胞活化及抗炎作用外,多种机制可能也参与了栀子甙的治疗作用,如栀子甙能促进神经生长、清除自由基^[35]、抗A β 毒性损伤^[36]、抑制血小板凝聚等。栀子甙的这些共同作用有助于慢性脑缺血大鼠认知功能的改善。因此对于栀子甙发挥抑制星形胶质细胞活化及抗炎作用所涉及的分子机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] DICHGANS M, LEYS D. Vascular cognitive impairment. *Circ Res*, 2017, 120(3): 573-591.
- [2] CHEN L, HUANG X F, LI X C, *et al*. Geniposide promotes the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 and ATDC5 cells by regulation of microRNA-214. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106121[2020-03-13]. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106121>.
- [3] CHEN Y, SHOU K Q, GONG C L, *et al*. Anti-inflammatory effect of geniposide on osteoarthritis by suppressing the activation of p38 MAPK signaling pathway. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 8384576[2019-06-20]. <https://doi.org/10.1155/2018/8384576>.
- [4] LI Z Q, HUANG X Y, HU C Y, *et al*. Geniposide protects against ox-LDL-induced foam cell formation through inhibition of mapks and NF- κ B signaling pathways. *Pharmazie*, 2019, 74(10): 601-605.
- [5] 李利娟, 李红霞, 吴欣桐, 等. 栀子甙对血管性痴呆大鼠行为学和脑组织病理改变的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2009, 40(4): 604-607.
- [6] CECHETTI F, WORM P V, PEREIRA L O, *et al*. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43(12): 1178-1183.
- [7] FARKAS E, LUITEN P G M, BARI F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 162-180.
- [8] HE X L, WANG Y H, GAO M, *et al*. Baicalein protects rat brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage. *Brain Res*, 2009, 1249: 212-221.
- [9] JI H J, HU J F, WANG Y H, *et al*. Osthole improves chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 2010, 636(1/2/3): 96-101.
- [10] WANG J, HOU J C, ZHANG P, *et al*. Geniposide reduces inflammatory responses of oxygen-glucose deprived rat microglial cells via inhibition of the TLR4 signaling pathway. *Neurochem Res*, 2012, 37(10): 2235-2248.
- [11] GUPTA S, SINGH P, SHARMA B. Neuroprotective effects of nicorandil in chronic cerebral hypoperfusion-induced vascular dementia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(11): 2717-2728.
- [12] 胡以松. 我国痴呆流行病学调查现状. *内科理论与实践*, 2015, 10(2): 80-86.
- [13] CAI Z Y, WANG C K L, HE W B, *et al*. Cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 2015, 10: 1695-1704.
- [14] YANG J, D'ESTERRE C, CERUTI S, *et al*. Temporal changes in blood-brain barrier permeability and cerebral perfusion in lacunar/subcortical ischemic stroke. *BMC Neurol*, 2015, 15:214[2019-06-20]. <https://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12883-015-0468-0>. doi: 10.1186/s12883-015-0468-0.
- [15] LV S C, DING Y, ZHAO H P, *et al*. Therapeutic potential and effective components of the Chinese herb Gardeniae Fructus in the treatment of senile disease. *Aging Dis*, 2018, 9(6): 1153-1164.
- [16] 卢金凤, 向靓, 黄薇, 等. 栀子总环烯醚萜苷对脑出血大鼠内皮屏障的影响. *中药药理与临床*, 2012, 28(3): 48-51.
- [17] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, *et al*. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(25): 3326-3344.

- [18] PARFENOV V A, OSTROUMOVA O D, OSTROUMOVA T M, *et al.* Vascular cognitive impairment: pathophysiological mechanisms, insights into structural basis, and perspectives in specific treatments. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1381–1402.
- [19] ZHOU Y X, ZHANG R Q, RAHMAN K, *et al.* Diverse pharmacological activities and potential medicinal benefits of geniposide. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 4925682[2019-06-20]. <https://doi.org/10.1155/2019/4925682>.
- [20] JING Z, SHI C Z, ZHU L H, *et al.* Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(8): 1249–1259.
- [21] BACK D B, KWON K J, CHOI D H, *et al.* Chronic cerebral hypoperfusion induces post-stroke dementia following acute ischemic stroke in rats. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 216[2019-06-20]. <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-017-0992-5>. doi: 10.1186/s12974-017-0992-5.
- [22] GAO F L, JING Y H, ZANG P X, *et al.* Vascular cognitive impairment caused by cerebral small vessel disease is associated with the TLR4 in the hippocampus. *J Alzheimers Dis*, 2019, 70(2): 563–572.
- [23] TJALKENS R B, POPICHAK K A, KIRKLEY K A, *et al.* Inflammatory activation of microglia and astrocytes in anganese neurotoxicity. *Adv Neurobiol*, 2017, 18: 159–181.
- [24] AKINMOLADUN A C, SALIU I O, OLOWOOKERE B D, *et al.* Improvement of 2-vessel occlusion cerebral ischaemia/reperfusion-induced corticostriatal electrolyte and redox imbalance, lactic acidosis and modified acetylcholinesterase activity by kolaviron correlates with reduction in neurobehavioural deficits. *Ann Neurosci*, 2018, 25(1): 53–62.
- [25] MATIN N, FISHER C, JACKSON W F, *et al.* Bilateral common carotid artery stenosis in normotensive rats impairs endothelium-dependent dilation of parenchymal arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(10): H1321–H1329.
- [26] KHOSHNAME S E, SARKAKI A, RASHNO M, *et al.* Memory deficits and hippocampal inflammation in cerebral hypoperfusion and reperfusion in male rats: neuroprotective role of vanillic acid. *Life Sci*, 2018, 211: 126–132.
- [27] AHMADALIPOUR A, SADEGHZADEH J, SAMAEI S A, *et al.* Protective effects of enriched environment against transient cerebral ischemia-induced impairment of passive avoidance memory and long-term potentiation in rats. *Basic Clin Neurosci*, 2017, 8(6): 443–452.
- [28] BELLAVER B, SOUZA D G, SOUZA D O, *et al.* Hippocampal astrocyte cultures from adult and aged rats reproduce changes in glial functionality observed in the aging brain. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2969–2985.
- [29] LIU B, SUN L, LIU Q, *et al.* A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks IkappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2015, 27(3): 370–381.
- [30] SCOTT T M, BHADLIA R A, QIU W Q, *et al.* Small vessel cerebrovascular pathology identified by magnetic resonance imaging is prevalent in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a potential target for intervention. *J Alzheimers Dis*, 2018, 65(1): 293–302.
- [31] FAROOQ M U, GORELICK P B. Vascular cognitive impairment. *Curr Atheroscler Rep*, 2013, 15(6): 330[2019-06-20]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11883-013-0330-z>. doi: 10.1007/s11883-013-0330-z.
- [32] KIM J Y, PARK J, CHANG J Y, *et al.* Inflammation after ischemic stroke: the role of leukocytes and glial cells. *Exp Neurobiol*, 2016, 25(5): 241–251.
- [33] DAULATZAI M A. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 2017, 95(4): 943–972.
- [34] DU S Q, WANG X R, XIAO L Y, *et al.* Molecular mechanisms of vascular dementia: what can be learned from animal models of chronic cerebral hypoperfusion? *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3670–3682.
- [35] SARAVANAKUMAR K, CHELLIAH R, SHANMUGAM S, *et al.* Green synthesis and characterization of biologically active nanosilver from seed extract of *Gardenia jasminoides* Ellis. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 185: 126–135.
- [36] SHI Z, LU C, SUN X P, *et al.* Tong Luo Jiu Nao ameliorates Aβ1-40-induced cognitive impairment on adaptive behavior learning by modulating ERK/CaMK II /CREB signaling in the hippocampus. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 55[2019-06-20]. <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-015-0584-9>. doi: 10.1186/s12906-015-0584-9.

(2019 – 12 – 05收稿, 2020 – 05 – 11修回)

编辑 余琳