

鞣花酸对缺血性脑卒中大鼠的保护作用

陈敏纯， 张婧一， 张雨晨， 叶 丹， 闫抗抗， 刘生元*
(西北大学附属医院/西安市第三医院药剂科，陕西 西安 710018)

摘要：目的 探讨鞣花酸通过激活 PGC-1 α /Nrf2 信号通路、调控氧化应激发挥的抗缺血性脑卒中作用。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常组，缺血性脑卒中模型组，鞣花酸低、中、高剂量组（50、100、150 mg/kg），线栓法制备缺血性脑卒中模型（MCAO），缺血 2 h，每天灌胃给予鞣花酸，连续给药 7 d 后，检测大鼠神经功能、脑梗死体积、组织病理学变化、MDA（丙二醛）水平、SOD（超氧化物歧化酶）活性、细胞凋亡，以及 PGC-1 α （过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子）和 Nrf2（核因子 E2 相关因子）蛋白表达。**结果** 鞣花酸改善缺血性脑卒中大鼠神经功能，缩小脑梗死灶，减轻组织病理损伤，减少细胞凋亡数量，降低 MDA 水平，提高 SOD 酶活性，促进脑组织 PGC-1 α 和 Nrf2 蛋白表达。**结论** 鞣花酸激活 PGC-1 α /Nrf2 信号通路抗氧化应激损伤，从而发挥脑保护作用。
关键词：鞣花酸；缺血性脑卒中；PGC-1 α /Nrf2 通路
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2021)09-2331-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.010

Benifits of ellagic acid for rats with cerebral ischemic stroke

CHEN Min-chun， ZHANG Jing-yi， ZHANG Yu-chen， YE Dan， YAN Kang-kang，
LIU Sheng-yuan*
(Department of Pharmacy, Xi'an No. 3 Hospital/The Hospital Affiliated of Northwest University, Xi'an 710018, China)

ABSTRACT: **AIM** To evaluate the efficacy of ellagic acid in modulating oxidative stress of ischemic brain *via* PGC-1 α /Nrf2 pathway. **METHODS** SD rats were randomly divided into sham group, model group, and ellagic acid groups for low-dose, medium-dose, high-dose ellagic acid uses (50, 100, 150 mg/kg). Rats in model received middle cerebral artery occlusion (MCAO) operation to simulate cerebral ischemia. At the end of modeling, ellagic acid was given by gavage once dialy for seven days. The rats were subjected to the observation of neurological function, cerebral infarction volume, pathological changes of brain tissues, determinations of MDA content and SOD activity, and identification of cell apoptosis and PGC-1 α /Nrf2 protein expressions. **RESULTS** ellagic acid administration improved nerve function impairment, reduced cerebral infarction volume, ameliorated the histopathological damage, reduced the number of apoptotic cells, decreased the level of MDA, and increased SOD activity and expressions of neuron PGC-1 α /Nrf2 protein. **CONCLUSION** ellagic acid can reduce cerebral ischemia injury by suppressing oxidative stress *via* PGC-1 α /Nrf2 pathway.
KEY WORDS: ellagic acid; cerebral ischemic stroke; PGC-1 α /Nrf2 pathway

缺血性脑卒中严重危害人类健康，其致病率、死亡率在全球居首位^[1]。由于其病理机制复杂，迄今尚无理想的治疗药物和措施。寻找安全、疗效显著、作用机制确切的脑卒中防治药物成为治疗该疾病的迫切需求。目前，以抗氧化应激为靶点治疗缺血性脑卒中的药物研究日趋成为医药领域研究热

收稿日期：2020-07-20
基金项目：西安市科技计划项目 [201805103YX11SF37（17）-7]；西安市第三医院科研项目（Y20202008）
作者简介：陈敏纯（1982—），女，硕士，副主任药师，从事药物代谢动力学及临床药学研究。Tel：18049225505，E-mail：minchun.chen@163.com
* 通信作者：刘生元（1988—），男，硕士，主管药师，从事药理学及质量标准建立研究。Tel：15399410863，E-mail：liushengyuan0311@163.com

点。近年来的研究发现,PGC-1 α /Nrf2 是抗脑缺血损伤和神经退行性疾病的重要生存通路,PGC-1 α /Nrf2 通路参与调控氧化应激功能累及的多种因子、多个环节的复杂反应从而挽救神经元损伤^[2-3]。鞣花酸是一种多酚物质,广泛存在于石榴、赤芍、柯子等食药中,具有抗炎、抗氧化应激、抗凋亡作用^[4-5],课题组前期研究证实它具有抗动脉粥样硬化血管保护作用^[6],但能否调控 PGC-1 α /Nrf2 信号通路,抑制氧化应激,从而发挥脑保护作用尚不清楚。本研究以大鼠中动脉栓塞为缺血性脑卒中模型(MCAO),考察鞣花酸对缺血性脑卒中抗氧化应激的保护作用,并探讨其调控机制,为将其开发成新型安全防治缺血性脑卒中药物提供理论依据,同时揭示相关作用机制。

1 材料

1.1 仪器、药物与试剂 脱水机、组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司, JT-12J、JK-6);病理切片机(德国 Leica 公司, RM2016);显微镜(日本奥林巴斯公司, BX53 型);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, HI650);全自动酶标仪(美国 Thermo scientific 公司, Multiskan MK3);蛋白免疫印迹系统(美国 Bio-Rad 公司)。鞣花酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Roche Applied Science 公司);抗荧光淬灭封片剂(美国 Southernbiotech 公司);DAPI(上海碧云天生物技术有限公司);CD34(英国 Abcam 公司);总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试试剂盒(南京建成生物工程研究所);PGC-1 α 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);Nrf2 抗体(美国 Affinity 公司)。

1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量 180~220 g, 8~10 周龄,购自空军军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK-(陕)-2014-002。大鼠自由取食和饮水,适应性饲养 1 周后进行实验。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 大鼠适应性饲养 7 d 后开始实验,40 只大鼠随机分为 5 组,即正常组、模型组、鞣花酸低剂量组(50 mg/kg)、鞣花酸中剂量组(100 mg/kg)、鞣花酸高剂量组(150 mg/kg),每组 8 只。正常组不插入线栓,其余操作同模型组,缺血性脑卒中模型制作参考 Qiang 等^[7]报道,分离大鼠颈总动脉和颈内外动脉,将线栓插入颈内动脉约 18 mm 处,阻塞颅内中动脉,缺血 2 h 后取出线

栓。应用 Garcia 评分,按照每项反应程度对清醒后大鼠进行 1、2、3 分评定,选取 1~2 分者作为模型。大鼠造模成功后,鞣花酸溶于生理盐水中每天灌胃给药 1 次,连续 7 d,正常组和模型组给予生理盐水灌胃。

2.2 神经功能评分 给药结束后,大鼠进行 Garcia 评分,根据自主运动情况、提起鼠尾悬空时四肢活动的对称情况、前爪伸展情况、攀爬和抓持铁网的能力、身体感觉反应、触碰胡须的反应,按照程度进行 1、2、3 分评定。

2.3 脑梗死体积检测 神经功能评分后,麻醉大鼠,断头取脑,沿冠状面进行切片(厚度约 2 mm),浸泡于 TTC 中,孵育 30 min 后多聚甲醛固定 2 h,计算脑梗死面积。

2.4 脑组织病理学观察 大鼠脑组织块进行脱水、透明、石蜡包埋及切片处理,采用苏木素染色 5 min, 1% 水溶性伊红染液染色 2 min,发现细胞核呈蓝色,细胞浆、肌纤维、胶原纤维和红细胞呈不同程度的红色,照相倍数为 200 倍。

2.5 氧化应激水平测定 脑组织氧化应激水平检测 MDA 水平和 SOD 活性,按照试剂盒说明书操作步骤进行,MDA 于 532 nm 波长处测光密度 OD, MDA 水平 = $\frac{\text{测定 OD 值}-\text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值}-\text{空白 OD 值}} \times \text{对照品浓度}$

(10 nmol/mL) $\times$ 样本测试前稀释倍数;SOD 于波长 550 nm 处测 OD, SOD 活性 = (对照 OD 值 - 测定 OD 值) / 对照 OD 值 / 0.5 $\times$ (反应液总体积 / 取样量)。

2.6 在体细胞凋亡检测 大鼠脑组织块进行脱水、透明、石蜡包埋、切片处理后,滴加蛋白酶 K 工作液反应 30 min, PBS 洗涤 3 次后加入 50 μ L TUNEL 反应混合液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min,再滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核。荧光显微镜下观察组织切片上调亡的细胞呈红色荧光,蓝色为细胞核,照相倍数为 400 倍。

2.7 脑组织中 PGC-1 α 、Nrf2 蛋白表达检测 提取脑组织蛋白并进行蛋白浓度定量,配制电泳胶,用微量加样器将制备好的蛋白样品和 MAKER 加入上样孔,各样品总蛋白量为 40 μ g,进行电泳分离,切下目的条带进行转膜。将 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再将 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h,显色曝光,用 BandScan 分析胶片灰度值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行处理,

结果以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 进行正态分布和方差齐性检验, 采用 one-way ANOVA 对整体差异性进行检验后, Dunnett 法进行 2 组间比较。 $P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能评分 正常组大鼠神经功能正常, 模型组神经功能影响最严重, 与模型组比较, 鞣花酸组神经功能改善 ($P<0.05$), 高剂量给药组神经功能优于低、中剂量给药组。如表 1 所示。

3.2 脑梗死体积 正常组大鼠脑组织无梗死体积, 模型组大脑梗死体积最大, 高达 (42.28 ± 2.79)%, 与正常组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 而鞣花酸给药组脑梗死灶缩小, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 以高剂量组最小, 说明鞣花酸对缺血性脑卒中大鼠具有神经保护作用, 改善脑神经功能, 缩小脑梗死灶。如表 1 所示。

表 1 大鼠神经功能评分及脑梗死体积 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Tab.1 Neurological scores and cerebral infarction volumes of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	神经功能评分/分	梗死体积/%
正常组	18.00±0.00	0.00±0.00
模型组	6.13±0.64 [#]	42.48±2.79 [#]
鞣花酸低剂量组	8.00±1.85 [*]	33.57±2.99 [*]
鞣花酸中剂量组	10.62±0.91 [*]	24.55±2.04 [*]
鞣花酸高剂量组	12.00±1.40 [*]	20.25±1.70 [*]

注: 与正常组比较, [#] $P<0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

3.3 脑组织病理学变化 正常组神经元细胞形态基本正常, 组织致密, 细胞排列整齐, 胞核位于细胞中央; 模型组脑组织疏松, 肿胀明显, 细胞数量减少, 排列紊乱, 神经元胞核固缩, 颜色深染; 鞣花酸高剂量组病理学变化较模型组改善。如图 1 所示。

3.4 氧化应激水平 如图 2 所示, 与正常组比较, 模型组 MDA 水平增高 (16.28 ± 1.31) nmol/mL ($P<0.05$); 而给予鞣花酸药物处理后, 与模型组比较, MDA 水平降低 ($P<0.05$), 高剂量组效果最优 [(12.79 ± 2.31) nmol/mL], 表明鞣花酸具有降低脂质过氧化作用。与模型组比较, 鞣花酸组增加 SOD 活性 ($P<0.05$), 高剂量组效果最优 [(113.565 ± 19.23 U/mL)], 说明鞣花酸有抗氧化作用。

3.5 在体细胞凋亡 如图 3~4 所示, 正常组无细胞凋亡; 模型组凋亡指数最高 [(45.23 ± 2.12)%], 凋亡细胞密集分布; 给药组 TUNEL 阳性凋亡表达降

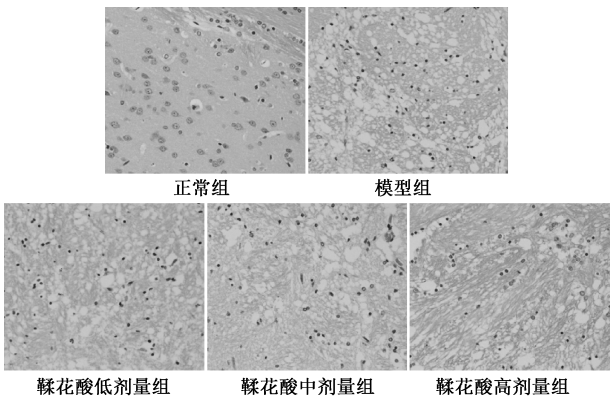
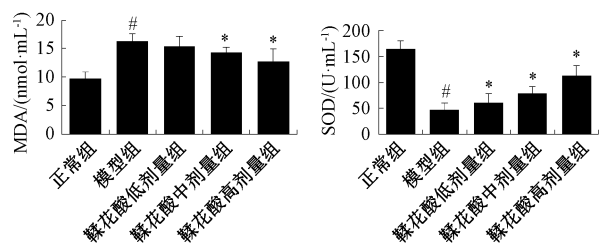


图 1 大鼠脑组织 HE 染色 ($\times 200$, $n=8$)
Fig.1 Brain tissues of rats by HE staining ($\times 200$, $n=8$)



注: 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$; 与正常组比较, [#] $P<0.05$ 。
图 2 大鼠脑组织氧化应激水平 ($n=8$)
Fig.2 Levels of oxidative stress in brain tissues of rats ($n=8$)

低 ($P<0.05$), 高剂量组下降至 25.31%。

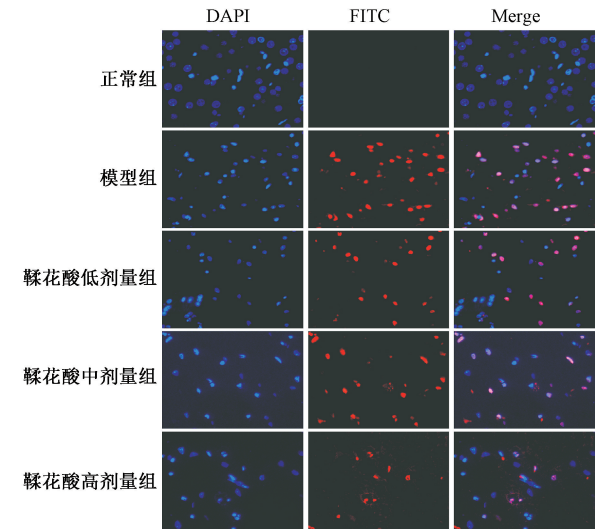
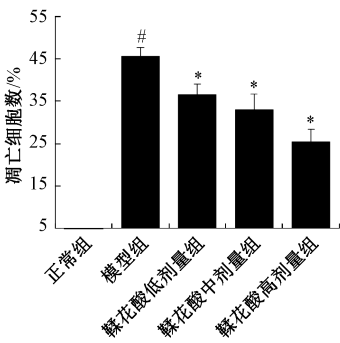


图 3 鞣花酸对 MCAO 模型大鼠 TUNEL 阳性细胞数的影响 ($\times 400$, $n=8$)
Fig.3 Effect of ellagic acid on the number of TUNEL positive cells of MCAO rat models ($\times 400$, $n=8$)

3.6 脑组织 PGC-1 α 、Nrf2 蛋白表达 如图 5 所示, 与正常组比较, 模型组 PGC-1 α 、Nrf2 蛋白表达增加 ($P<0.05$), 而给药组 PGC-1 α 、Nrf2 高于模型组 ($P<0.05$)。

4 讨论

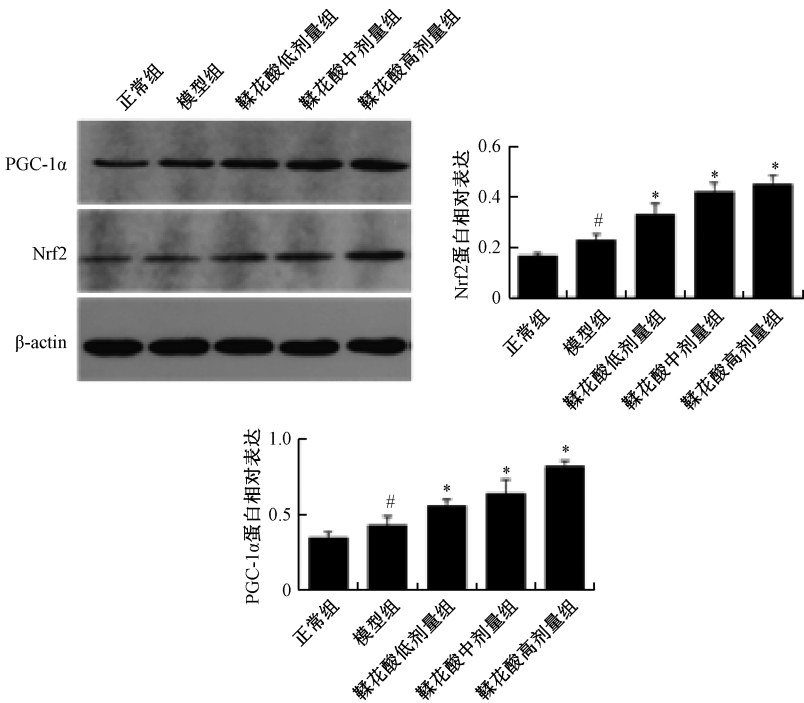
中医药在治疗缺血性疾病方面显示出了独特的优势，临床疗效确切^[8]，认为瘀血阻滞、热毒壅盛是缺血性脑卒中的主要病机，故以行气营血、清热解毒为主要治法^[9]。赤芍性微寒，味苦，有破血行气、清热解毒、引血下行的功效。课题组前期从赤芍中分离鉴定出一种有效成分鞣花酸具有抗动脉粥样硬化血管保护作用，本研究显示鞣花酸对缺血性脑卒中大鼠有保护作用，可显著改善 MCAO 模型大鼠的缺血梗死灶，恢复神经功能，缓解缺血灶组织病理学变化。



注：与模型组比较，* $P<0.05$ ；与正常组比较，[#] $P<0.05$ 。

图 4 鞣花酸对 MCAO 模型大鼠抗细胞凋亡的影响 (n=8)

Fig. 4 Effects of ellagic acid on the number of TUNEL positive cells of MCAO rat models (n=8)



注：与模型组比较，* $P<0.05$ ；与正常组比较，[#] $P<0.05$ 。

图 5 鞣花酸对 MCAO 模型大鼠 PGC-1α、Nrf2 蛋白表达影响 (n=8)

Fig. 5 Effects of ellagic acid on the expressions of PGC-1α and Nrf2 proteins in MCAO rat models (n=8)

脑缺血损伤机制众多，至今尚未完全清楚，以往研究发现，氧化应激损伤在神经细胞凋亡中发挥重要作用。脑缺血缺氧后，细胞内产生大量的活性氧 (ROS)，爆发的 ROS 激活了线粒体凋亡通路，同时使线粒体 DNA 致突变，转录有缺陷的电子传递链组分，导致 ROS 瀑布式的增长，加重细胞凋亡。MDA 反映的是 ROS 与不饱和脂肪酸发生过氧化反应的程度，其有细胞毒性作用，本研究显示鞣花酸降低 MDA 水平。SOD 是体内清除 ROS 重要的抗过氧化物酶，缓解细胞氧化应激损伤，减少神经细胞凋亡，鞣花酸增加 SOD 活性。TUNEL 结果也

显示鞣花酸降低在体细胞凋亡，且抗凋亡作用呈剂量依赖，表明鞣花酸可调节机体抗氧化应激损伤作用。

以往研究证明脑缺血损伤可增加脑组织的 PGC-1α 表达，若 PGC-1α 被抑制则加重脑损伤，表明 PGC-1α 具有神经保护作用^[10]。PGC-1α 靶向激活雌激素受体相关受体 (ERR) 家族蛋白，ERRα 促 Nrf2 高表达，激活下游一系列信号转录，修复受损神经元细胞^[11]。PGC-1α 是线粒体生物合成的重要调控因子，也是线粒体保护的重要靶蛋白。神经元细胞中 PGC-1α 高表达可增加神经元细

胞树突棘的数量并促进突触分化^[12]。在氧化应激条件下，刺激血管内皮细胞 PGC-1 α 表达能减少线粒体内 ROS 积累，稳定线粒体膜电位，减少细胞凋亡^[13]。Han 等^[14]研究发现 PGC-1 α 促进了线粒体抗氧化剂（SOD、Prx3、GPx1）和解偶联蛋白（UCP2、UCP4 和 UCP5）的表达，进而降低 ROS 的产生。Nrf2 是结合抗氧化反应元件（ARE）的主要转录因子，激活下游信号因子 ARE，启动抗氧化基因表达，激活许多维持氧化还原稳态的关键基因，如 GSH-Px 和 SOD 抗氧化系统的相关基因^[15]。这些信号因子参与调控 ROS 代谢，蛋白酶体功能等。当 Nrf2 耗竭完，或表达异常下降，致 AER 介导抗氧化酶基因表达失败^[16]。PGC-1 α /Nrf2 信号通路是双向环路相互作用，ROS 解毒系统可诱导 PGC-1 α 高表达。本实验显示，与模型组比较，鞣花酸给药组增加脑组织 PGC-1 α 、Nrf2 表达，提示它可能为 PGC-1 α 激活剂，其抗氧化应激作用通过调控 PGC-1 α /Nrf2 信号通路表达发挥。

综上所述，鞣花酸通过激活 PGC-1 α /Nrf2 信号通路，调控氧化应激，修复受损神经元细胞，发挥抗缺血性脑卒中作用。

参考文献：

[1] Knauss S, Stelzle D, Emmrich J V, *et al.* An emphasis on neurology in low and middle-income countries [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(12): 1078-1079.

[2] Cheng A, Wan R, Yang J L, *et al.* Involvement of PGC-1alpha in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1250.

[3] Goodfellow M J, Borcar A, Proctor J L, *et al.* Transcriptional activation of antioxidant gene expression by Nrf2 protects against mitochondrial dysfunction and neuronal death associated with acute and chronic neurodegeneration [J]. *Exp Neurol*, 2020: 113247.

[4] Pang X, Li T, Feng L, *et al.* Ellagic acid-induced thrombotic focal cerebral ischemic model in rats [J]. *J Pharmacol Toxicol*

Methods, 2014, 69(3): 217-222.

[5] Liu Q S, Deng R, Li S, *et al.* Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017, 42(8): 855-860.

[6] Ding Y, Zhang B, Zhou K, *et al.* Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis; role of Nrf2 activation [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 175(3): 508-514.

[7] Wang Q, Peng Y, Chen S, *et al.* Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system [J]. *Stroke*, 2009, 40(6): 2157-2164.

[8] 赵亚伟, 傅 天, 张彦利. 中医药治疗脑卒中的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(24): 2733-2736.

[9] 刘振权. 脑心通胶囊治疗缺血性中风作用机制的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.

[10] Li L, Xiao L, Hou Y, *et al.* Sestrin2 silencing exacerbates cerebral ischemia/reperfusion injury by decreasing mitochondrial biogenesis through the AMPK/PGC-1alpha pathway in rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30272.

[11] Choi H I, Kim H J, Park J S, *et al.* PGC-1alpha attenuates hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death by upregulating Nrf-2 *via* GSK3beta inactivation mediated by activated p38 in HK-2 Cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4319.

[12] Cheng A, Wan R, Yang J L, *et al.* Involvement of PGC-1alpha in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1250.

[13] Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, *et al.* PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3): 562-573.

[14] Han B, Jiang W, Liu H, *et al.* Upregulation of neuronal PGC-1 α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2832-2848.

[15] Zhang M, An C, Gao Y, *et al.* Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 100: 30-47.

[16] Zhou S, Sun W, Zhang Z, *et al.* The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 260429.