

金钗石斛多糖减轻大鼠脑缺血再灌注损伤

李小琼¹, 詹剑^{2*}, 冯赞杰¹, 徐先林¹

(1. 遵义医学院生物化学教研室, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医学院附属医院神经内科, 贵州遵义 563000)

摘要: **目的** 探讨金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 多糖减轻大鼠脑缺血再灌注引起氧化应激和炎症反应的损伤和可能的保护机制。**方法** 105只SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 尼莫地平组(10 mg/kg), 金钗石斛多糖低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg)。采用线栓法栓塞大鼠右侧大脑中动脉建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型。术前7 d开始灌胃, 每天1次。缺血2 h再灌注24 h进行神经功能评分, 测定大鼠脑梗死面积、脑指数以及脑含水量; 用化学比色法分别测定超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、髓过氧化物酶(MPO)活性及丙二醛(MDA)水平; 用免疫荧光染色法检测缺血区中性粒细胞的浸润情况。**结果** 假手术组无神经功能缺损, 模型组大鼠神经功能缺失症状明显, 大脑指数及脑含水量升高, 模型组大鼠脑组织及血清SOD、GSH-Px活性明显降低, MPO活性及MDA含量显著升高; 与模型组比较, 金钗石斛多糖各剂量组大鼠神经功能缺失症状改善, 大脑指数及脑含水量明显下降, 脑组织及血清SOD、GSH-Px活性明显升高, MPO活性及MDA含量显著下降; 与模型组比较, 金钗石斛多糖高剂量组大鼠右侧缺血区中性粒细胞浸润减少。**结论** 金钗石斛多糖对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有一定保护作用, 其作用机制可能与抑制氧化应激和减轻炎症反应有关。

关键词: 金钗石斛多糖; 脑缺血再灌注损伤; 大鼠; 氧化应激; 炎症反应

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)04-0677-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.003

Dendrobium nobile polysaccharides reduce cerebral ischemia reperfusion injury in rats

LI Xiao-qiong¹, ZHAN Jian^{2*}, FENG Zan-jie¹, XU Xian-lin¹

(1. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China; 2. Department of Neurology, Hospital Affiliated to Medical College, Zunyi 563000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the protective effects of polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and its possible mechanism of action. **METHODS** One hundred and five SD rats were divided into sham group, model group, Nimodipine group (10 mg/kg) and treatment groups with low-, medium-, and high dose (50, 100, and 200 mg/kg) of polysaccharides from *D. nobile*. The right middle cerebral artery of rats was occluded by inserting a thread through internal carotid artery for 2 h, and was sampled after reperfusion for 24 h. The rats received gavage once a day for 7 d before operation. Neurological deficits score, brain index, brain water content and infarct size in rats were conducted at the end of reperfusion; the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), myeloperoxidase (MPO) and the content of malondialdehyde (MDA) of brain tissue and blood serum were measured by chemical colorimetry; the infiltration of neutrophil granulocyte in rat ischemic cortex were detected with immune-fluorescence staining. **RESULTS** Sham group had no neurological deficit, but the model group showed severe neurological deficits, meanwhile, the infarct size, brain index

收稿日期: 2016-10-24

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字LKZ[2012]18号); 贵州省科技厅、遵义医学院附属医院联合基金项目(黔科合LH字[2015]7476号); 遵义医学院硕士启动基金项目(F-336)

作者简介: 李小琼(1974—), 女, 硕士, 副教授, 从事中药物分子生物学研究。Tel: 13765996793, E-mail: lxq94@163.com

* 通信作者: 詹剑(1976年—), 男, 副教授, 硕士, 从事脑血管疾病研究。Tel: 13984217727, E-mail: zhanjian95@163.com

and brain water content rose markedly, the content of MDA and the activity of MPO of the brain tissue and the blood serum increased remarkably, while the activity of SOD and GSH-Px apparently decreased; compared with the model group, neurological deficits of rats were improved significantly in polysaccharides from *D. nobile* dose groups, moreover, the infarct size, brain index and brain water content markedly declined, the MDA level and the activity of MPO significantly decreased, but the activity of SOD, GSH-Px increased remarkably; the infiltration of neutrophile granulocyte in the high dose group significantly decreased compared with the model group. **CONCLUSION** Polysaccharides from *D. nobile* has some neuroprotective effects on local cerebral ischemia/reperfusion injury, and that may be related to the remove of oxygen free radicals and the decrease in inflammation reaction.

KEY WORDS: *Dendrobium nobile* polysaccharides (DNP); cerebral ischemia/reperfusion injury; rat; oxidative stress; inflammatory response

缺血性脑血管病是导致人类死亡的重要疾病之一,即使存活,也往往留下瘫痪、失语等严重后遗症,但目前临床上仍无有效的预防和治疗方法。越来越多证据表明,传统中草药对脑梗死有其独特的疗效。金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 为兰科石斛属多年生附生草本植物,是我国传统名贵中药,因其卓越的滋补功效而名列“中华九大仙草”之首^[1]。金钗石斛的药用成分主要是石斛碱及多糖类物质,大量研究表明,金钗石斛多糖具有降血糖、抗肿瘤、调节免疫等作用^[2-6]。我们在前期研究中发现金钗石斛多糖能够降低脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、NO等炎症因子的释放^[7],但金钗石斛多糖对脑缺血再灌注损伤是否有保护作用未见相关报道。本研究以金钗石斛的有效成分多糖为原料,观察其对大鼠脑缺血再灌注损伤是否有保护作用,并初步探讨其可能的机制,为深入开发金钗石斛提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 105 只, SPF 级, 体质量 250 ~ 320 g, 由第三军医大学医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (渝) 2012-0005。

1.2 药品与试剂 金钗石斛购于赤水金钗石斛种植基地, 由贵阳中医学院生药学教研室王世清教授鉴定。金钗石斛多糖由本实验室提取(采用水提醇沉法提取多糖, DEAE Sepharose Fast Flow 色谱柱纯化, 苯酚-硫酸法测出多糖含有量为 98.1%); 栓线购于北京沙东生物公司; 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 为北京索莱宝科技有限公司产品 (批号 415F033); 尼莫地平 (nimodipine) 为亚宝药业集团股份有限公司产品 (批号 20140307); 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒 (批号 20140916)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (批号

20140912)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号 20140917)、髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒 (批号 20140915) 均购于南京建成生物工程研究所; 兔抗大鼠 MPO 抗体 (批号 sc-16128) 为 Santa Cruz 产品; FITC 标记的驴抗兔 IgG (批号 SA00003-3) 为 Proteintech 产品。

1.3 脑缺血再灌注模型的建立 参考 Zea Longa 的方法^[8-9], 采用大脑中动脉阻塞法 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 制备局灶性脑缺血再灌注模型。大鼠称重, 腹腔注射 10% 的水合氯醛 (0.35 mL/100 g) 麻醉后固定。常规消毒手术视野区皮肤, 切开颈部正中皮肤约 4 cm, 分离出右侧颈总动脉、右颈内动脉及右颈外动脉, 结扎颈总动脉及颈外动脉根部。动脉夹夹住颈内动脉远心端, 距颈总动脉分叉处约 4 mm 剪一小口, MCAO 栓线圆头端小口进入, 移开动脉夹栓线进入颈内动脉, 以颈内动脉和颈外动脉分叉处为标记, 插入深度为 18 ~ 20 mm, 感到阻力提示线头到达大脑前动脉内, 实现了大脑中动脉阻塞所导致的大脑局灶性脑缺血。分层缝合肌肉和皮肤 (栓线少许留体外)。经过 2 h 后, 缓慢拔出栓线至略感阻力即可, 实现再灌注 24 h。手术后保温, 常规饲养。假手术组不插入栓线, 其余同模型组。

1.4 动物分组及给药 SD 大鼠随机分为 6 组: 假手术组, 模型组, 尼莫地平组 (10 mg/kg), 金钗石斛多糖低 (50 mg/kg)、中 (100 mg/kg)、高剂量组 (200 mg/kg), 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d, 第 7 天灌胃 1 h 后制备缺血再灌注模型。假手术组和模型组给予等体积的生理盐水。

1.5 评价指标

1.5.1 一般情况观察 实验过程中每天观察并记录饮食情况, 精神状态。

1.5.2 神经功能评分 分组同前, 每组 5 只大鼠。

大鼠再灌注 24 h, 参照 Bederson 等^[10] 的 5 分评分法对大鼠神经功能进行盲评: 0 分, 无明显神经功能缺损症状; 1 分, 提尾悬空时, 左前肢屈曲, 不能完全伸展; 2 分, 大鼠置于光滑地面, 推右侧肩向左侧推动, 阻力较右侧下降; 3 分, 置于光滑地面爬行时向左侧倾倒或不自主向左侧转圈; 4 分, 肢体无自发活动或意识不清。评分在 1~3 分者, 确定大鼠造模成功。

1.5.3 大鼠脑指数及脑组织中含水量测定 评分后, 颈椎脱臼处死, 生理盐水冲洗, 去除嗅球、小脑及低位脑干, 滤纸吸干水分, 称重。置于 110 °C 烘箱中烘烤 24 h, 再称干重。脑指数 = 脑湿重 (g) / 体质量 (100 g); 脑组织含水量 = (脑湿重 - 脑干重) / 脑湿重 × 100%。两者均是反映血脑屏障结构损伤的指标。

1.5.4 脑梗死体积的测定 分组同前, 每组 5 只大鼠。10% 的水合氯醛 (0.35 mL/100 g) 麻醉, 断头, 在冰袋上迅速取出大脑, 预冷的生理盐水冲洗, 去除嗅球、小脑及低位脑干, 滤纸吸干水分。将脑组织立即置于 -20 °C 冰箱中 20 min, 用手术刀片由前向后行冠状切片, 共 5 片, 每片约 2 mm 厚, 然后将切片置于 2% TTC 溶液中, 37 °C, 避光, 孵育 30 min, 15 min 后翻面。经染色后正常脑组织呈玫瑰红色, 而梗塞组织呈苍白色, 界限非常明显。染色后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 拍照, 用图像处理软件计算脑梗灶体积的百分比。

1.5.5 T-SOD、MDA、GSH-Px 和 MPO 的测定 分组同前, 每组 5 只大鼠。于再灌注 24 h 后腹主动脉采血 3 mL, 立即断头取脑。血液室温静置 20 min, 4 °C 下 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清 -80 °C 保存。取右侧大脑半球, 用冰冷的生理盐水漂洗, 滤纸吸干, 称重, 按 1:9 (质量体积比) 比例加入生理盐水, 在 4 °C 冰浴下用玻璃匀浆器研磨, 制备成 10% 组织匀浆, 然后在 4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清。按试剂盒说明书测定 T-SOD、MPO、GSH-Px 的活性和 MDA 含量。其中 T-SOD、MDA 和 GSH-Px 反映氧化应激程度, MPO 是反映炎症损伤的指标。

1.5.6 缺血区中性粒细胞浸润程度的检测 大鼠分为模型组、金钗石斛多糖高剂量组及尼莫地平组, 每组 5 只。再灌注 24 h 后麻醉, 4% 多聚甲醛经左心室灌注, 断头取脑后放入 4% 的多聚甲醛 4 °C 固定 24 h, 蔗糖溶液梯度脱水, 冰冻切片, 贴片后 PBS 冲洗 15 min, 血清封闭 30 min, 加抗髓过

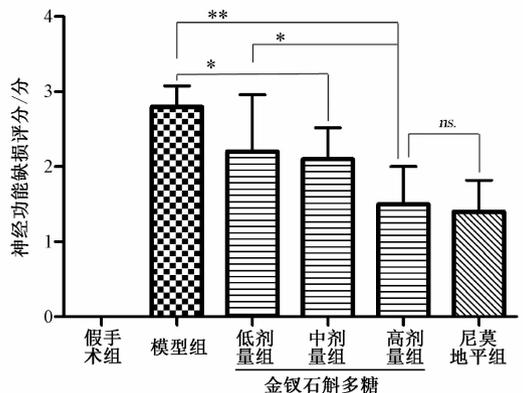
氧化物酶 (MPO) 一抗 (1:50), 4 °C 湿盒过夜, FITC 标记的二抗 (1:200) 37 °C 1 h, 避光 PBS 漂洗, 暗室滴加 DAPI 染核, 放置 5 min, PBS 再次漂洗, 封片后荧光显微镜观察、照相。用 Image-Pro Plus 6.0 软件对采集的图像中的中性粒细胞浸润进行定量统计。方法为: 在每张图像 (IF × 200) 上分别于缺血皮层区选取 5 个视野 (大小 25 μm × 25 μm) 计数 MPO 阳性细胞数, 取平均值并换算成细胞密度 (cells/mm²)。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 版统计软件进行数据处理。结果用均数 ± 标准差表示。采用单因素方差分析, 方差齐性时, 用 LSD 法进行多组间两两比较; 方差不齐时, 用 Games-Howell 法进行比较。用 Pearson 法进行相关性分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 金钗石斛多糖各剂量组灌胃期间, 大鼠精神状态良好, 饮食睡眠正常, 体质量与其余组大鼠无明显差异性。

2.2 金钗石斛多糖改善大鼠神经功能缺损症状 假手术组没有神经功能缺损; 模型组神经功能缺损明显; 金钗石斛多糖中、高剂量组神经功能缺损评分均较模型组显著降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01); 金钗石斛多糖高剂量组神经功能缺损评分较低剂量组明显降低 (P < 0.05); 金钗石斛多糖高剂量组和尼莫地平组神经功能缺损评分无显著性差异 (P > 0.05)。见图 1。



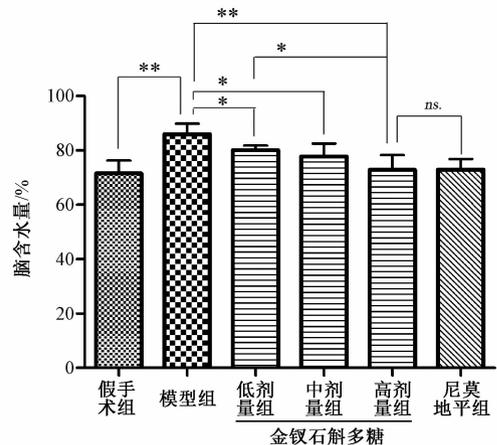
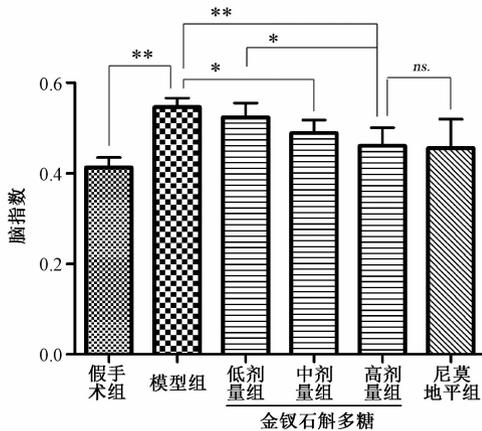
注: 再灌注 24 h, 进行神经功能缺损症状评分, *P < 0.05, **P < 0.01, ns. P > 0.05

图 1 金钗石斛多糖对大鼠神经功能缺损症状评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of DNP on neurological deficit score of MCAO rat ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.3 金钗石斛多糖降低大鼠脑指数及脑组织中含水量 模型组大鼠脑指数及脑组织含水量均明显升高,与假手术组比较有显著性差异 ($P < 0.01$);金钗石斛多糖低、中、高剂量组大鼠较模型组大鼠

大脑指数及大脑含水量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组较低剂量组更明显 ($P < 0.05$);高剂量组与尼莫地平组无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图2。



注:再灌注24 h,分别进行脑指数和脑含水量检测,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*ns.* $P > 0.05$

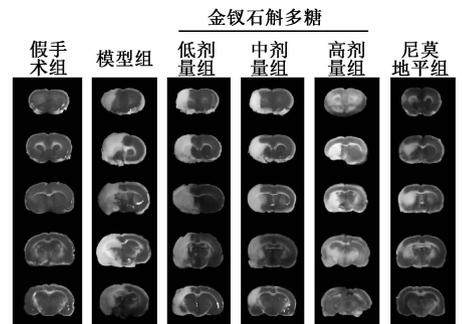
图2 金钗石斛多糖对大鼠脑指数和脑含水量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effects of DNP on brain index and brain water content of MCAO rat ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

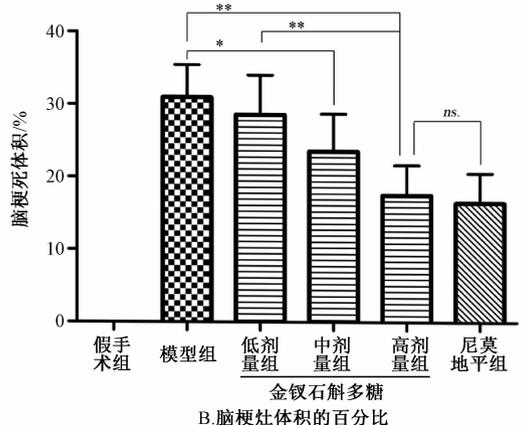
2.4 金钗石斛多糖减少大鼠脑梗死体积 TTC染色结果显示(正常脑组织呈玫瑰红色,而梗塞组织呈苍白色,界限非常明显),假手术组未见梗死灶,模型组出现明显梗死灶。金钗石斛多糖中、高剂量组较模型组梗死灶体积缩小,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组较低剂量组梗死灶体积减小更明显 ($P < 0.01$);金钗石斛多糖高剂量组和尼莫地平组梗死灶体积无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图3。

2.5 金钗石斛多糖升高大鼠脑组织及血清 T-SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MPO 活性及 MDA 含有量与假手术组相比,模型组 T-SOD、GSH-Px 活性显著下降 ($P < 0.05$),而 MPO 活性、MDA 含有量显著增加 ($P < 0.05$);金钗石斛多糖各组 T-SOD、GSH-Px 活性明显高于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);MPO 活性、MDA 含有量明显低于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);其中高剂量组与低剂量组比,各检测指标均有显著性差异 ($P < 0.05$);金钗石斛多糖高剂量组与尼莫地平组相比,各检测指标均无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表1~2。

2.6 金钗石斛多糖降低中性粒细胞的浸润 采用免疫荧光法检测缺血皮层区中性粒细胞的浸润,用 MPO 抗体标记中性粒细胞(荧光显示绿色),DAPI 染料标记细胞核(荧光显示蓝色),模型组缺血区可见大量中性粒细胞浸润(见图4A),金钗石



A.再灌注24 h, TTC法显示的脑梗死图片



注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*ns.* $P > 0.05$

图3 金钗石斛多糖对大鼠脑梗死体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 3 Effect of DNP on brain infarct size of MCAO rat ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

表1 金钗石斛多糖对大鼠脑组织 T-SOD、GSH-Px、MPO 的活性及 MDA 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.1 Effects of DNP on activity of T-SOD, GSH-Px, MPO and content of MDA of rat brain tissue ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	T-SOD/ (U·mg prot ⁻¹)	GSH-Px/ U	MPO/ (U·g 组织湿重 ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg prot ⁻¹)
假手术组	162.68 ± 21.21	124.86 ± 13.27	0.11 ± 0.02	2.87 ± 0.35
模型组	106.82 ± 17.04*	68.58 ± 7.13*	0.30 ± 0.03*	7.46 ± 0.77*
金钗石斛多糖低剂量组	119.91 ± 13.54 [△]	83.64 ± 7.04 [△]	0.24 ± 0.02 ^{△△}	5.13 ± 0.28 [△]
金钗石斛多糖中剂量组	137.90 ± 14.53 ^{△△}	99.82 ± 8.08 ^{△△}	0.16 ± 0.02 ^{△△}	4.39 ± 0.33 ^{△△}
金钗石斛多糖高剂量组	155.09 ± 13.72 ^{△△¥}	118.35 ± 13.86 ^{△△¥}	0.12 ± 0.01 ^{△△¥}	3.22 ± 0.28 ^{△△¥}
尼莫地平组	159.08 ± 20.81	122.52 ± 15.93	0.10 ± 0.02	3.06 ± 0.26

注:与假手术组比较,*P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.05,^{△△}P<0.01;与金钗石斛多糖低剂量组比较,[¥]P<0.05

表2 金钗石斛多糖对大鼠血清 T-SOD、GSH-Px、MPO 的活性及 MDA 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Effect of DNP on activity of T-SOD, GSH-Px, MPO and content of MDA of rat serum ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	T-SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/U	MPO/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
假手术组	276.93 ± 25.17	1 106.67 ± 79.69	55.26 ± 10.25	7.95 ± 1.44
模型组	216.28 ± 18.49*	603.56 ± 47.29*	80.23 ± 9.85*	25.40 ± 4.48*
金钗石斛多糖低剂量组	229.70 ± 17.50	702.22 ± 50.97 [△]	69.81 ± 12.20 ^{△△}	16.05 ± 2.34 [△]
金钗石斛多糖中剂量组	248.80 ± 20.39 [△]	852.44 ± 51.39 ^{△△}	63.23 ± 9.34 ^{△△}	11.36 ± 1.13 ^{△△}
金钗石斛多糖高剂量组	275.12 ± 19.85 ^{△△¥}	1 020.44 ± 67.67 ^{△△¥}	58.80 ± 11.54 ^{△△¥}	8.98 ± 0.99 ^{△△¥}
尼莫地平组	270.73 ± 14.87	1 037.33 ± 77.53	57.23 ± 9.16	8.91 ± 1.17

注:与假手术组比较,*P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.05,^{△△}P<0.01;与金钗石斛多糖低剂量组比较,[¥]P<0.05

斛多糖高剂量组与尼莫地平组中性粒细胞浸润均明显减少(见图4A),中性粒细胞计数与模型组相比差异均有统计学意义(P<0.01,见图4B)。金钗石斛多糖高剂量组中性粒细胞计数与尼莫地平组相比无显著差异(P>0.05,见图4B)。

2.7 金钗石斛多糖抗氧化应激和抗炎作用的剂量相关性 将金钗石斛多糖低、中、高3种剂量分别和其对应的脑组织 T-SOD、GSH-Px、MPO 的活性和 MDA 含有量相配对,分别有15对,应用 Pearson 法进行相关性分析。发现金钗石斛多糖低、中、高3种剂量除了与脑组织中 MDA 含有量呈负相关性外($r = -0.998 2, P < 0.05$);与脑组织中的 T-SOD、GSH-Px 和 MPO 的活性均没有相关性(分别为 $r = 0.979 4, P > 0.05$; $r = 0.988 6, P > 0.05$; $r = -0.936 3, P > 0.05$)。见图5。

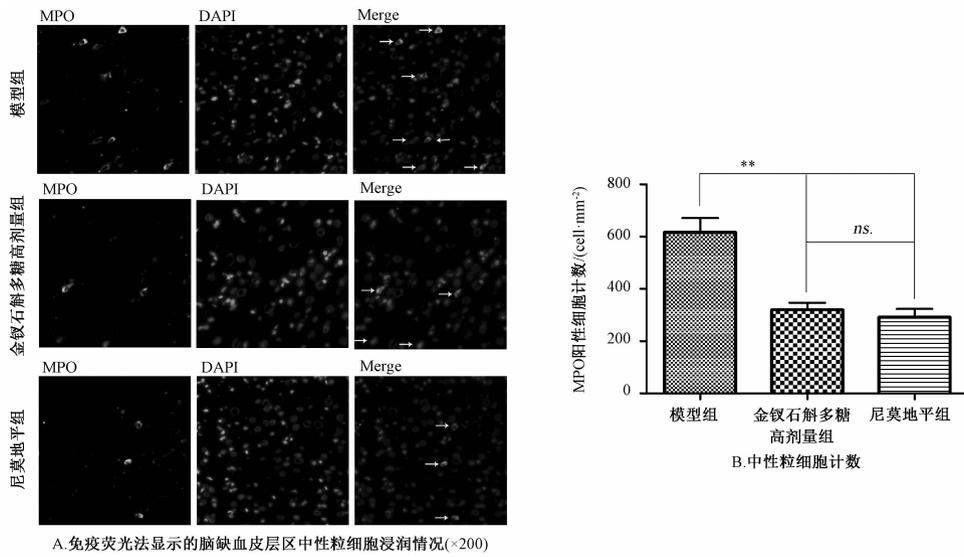
3 讨论

金钗石斛是中国药典记载的名贵中草药,主要产于贵州等地^[11]。然而,针对金钗石斛的化学成分和药理作用进行的研究尚显不足,阻碍了它的开发应用。近年来的一些研究也主要集中在小分子成分,如酚类、萜类、倍半萜类和生物碱等,而大分子多糖在金钗石斛中含有量较高,是生物碱的14.1倍,研究却相对很少,尤其是对疾病干预的相关研究仅局限于降血糖、抗肿瘤、调节免疫、抗痴呆等领域^[12-18],更显不足。

急性缺血性脑血管病的治疗原则是尽早恢复血

流供应,然而在有些情况下,缺血再灌注后细胞功能障碍和结构破坏反而加重,这种现象称为缺血再灌注损伤^[19]。神经功能缺损评分、脑指数、脑含水量和脑梗死体积的测定均是反应脑损伤的重要指标。本研究建立脑缺血再灌注大鼠模型,结果显示,模型组大鼠神经功能缺损评分增加,脑指数及脑含水量增加,脑梗死体积加大,说明缺血2h再灌注24h形成的脑缺血再灌注损伤模型是成功的。而经过金钗石斛多糖预处理后,大鼠的神经功能评分、脑指数、脑组织含水量和脑梗死体积均不同程度地低于模型组,表明金钗石斛多糖对缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

引起脑缺血再灌注损伤的机制错综复杂,且相互影响。其中氧化应激反应是导致缺血-再灌注损伤的重要机制之一,可通过连锁反应引起脂质过氧化、抑制蛋白质的功能、破坏核酸及染色体,导致脑细胞水肿,增大脑梗死体积,造成神经功能障碍^[20]。MDA是脂质过氧化反应的终产物之一,因此MDA的含有量可反映脂质过氧化的程度及自由基的水平,间接反映细胞损伤的程度。SOD、GSH-Px是体内超氧阴离子自由基及过氧化物的清除剂,其活性能间接反映机体清除自由基及抗氧化的能力。我们在前期研究中发现金钗石斛多糖能够提升高糖诱导的大鼠肾系膜细胞抗氧化能力、减少活性氧簇(ROS)生成^[21],具有一定的抗氧化应激作用。而本研究显示,模型组大鼠脑组织和血清



注：与模型组比较，** $P < 0.01$ ，与金钗石斛多糖高剂量组比较，ns. $P > 0.05$

图4 金钗石斛多糖对大鼠缺血区中性粒细胞浸润的影响

Fig. 4 Effect of DNP on infiltration of neutrophil granulocyte in rat ischemic penumbra cortex detected by immunofluorescence

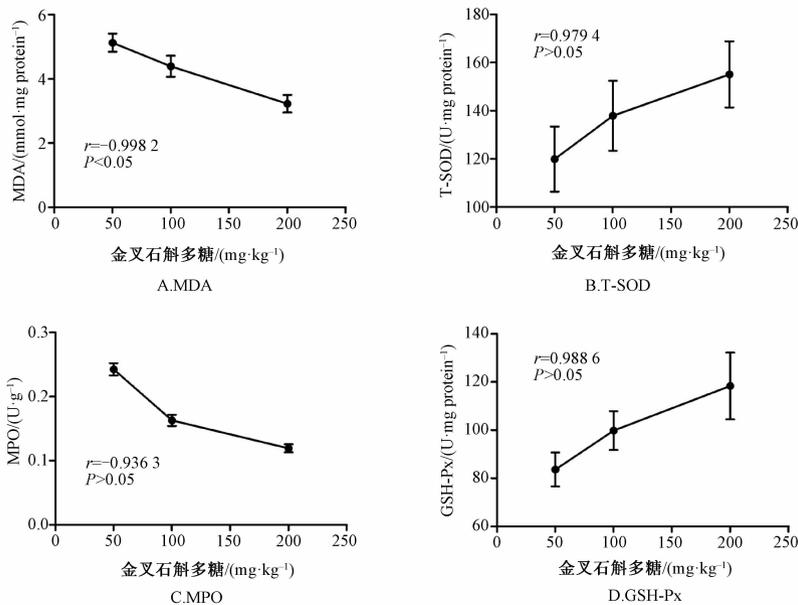


图5 金钗石斛多糖剂量与脑组织中SOD、GSH-Px、MPO活性和MDA含有量的相关性分析

Fig. 5 Correlations of DNP with activity of SOD, GSH-Px and MPO and content of MDA in brain tissue by Pearson analysis

MDA 含有量显著增加，SOD 及 GSH-Px 的活性明显下降，金钗石斛多糖预处理大鼠，脑组织及血清 MDA 含有量下降，SOD 及 GSH-Px 的活性增加，说明氧化应激是导致脑缺血再灌注损伤重要因素，发生了明显的脂质过氧化反应，大鼠抗氧化能力下降，金钗石斛多糖可以减轻脂质过氧化反应，提升抗氧化能力，对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

研究表明^[22]，过度炎症反应在缺血性脑损伤的发生、发展中同样起着重要作用，因此减轻炎症

反应也是抗缺血性脑损伤的重要途径。脑组织缺血受损诱导中性粒细胞浸润、聚集，促进炎症因子释放，血管通透性增加，导致血管源性脑水肿，增大脑梗死体积。MPO 是中性粒细胞的嗜苯胺蓝颗粒产生的一种过氧化物酶，该酶活性高低既可反映中性粒细胞在组织中浸润的程度，又可定量反映炎症损伤的程度。本研究显示模型组大鼠脑组织和血清 MPO 活性明显增加，而金钗石斛多糖各组大鼠脑组织及血清中 MPO 活性明显减弱，免疫荧光检测缺血区中性粒细胞的浸润，结果提示模型组缺血区

存在大量中性粒细胞,金钗石斛多糖高剂量组缺血区中性粒细胞均明显减少,说明缺血再灌注后缺血侧脑组织有大量中性粒细胞的浸润,金钗石斛多糖能够抑制中性粒细胞的浸润,因此减少中性粒细胞的浸润,抑制炎症的因子的释放也可能是金钗石斛多糖抗缺血性脑损伤的重要机制之一。

本研究发现低、中、高剂量金钗石斛多糖在治疗大鼠脑缺血再灌注损伤中,均表现出不同程度的抗氧化和抗炎作用,其中高剂量组同尼莫地平组相比,没有显著性差异。尼莫地平是临床治疗脑梗死的常用药物,能够明显抑制氧化应激和炎症反应^[23-24],而本研究结果则提示金钗石斛多糖在抑制氧化应激和炎症反应方面可能具有和尼莫地平相当的药理作用。当然,本研究通过金钗石斛多糖量效相关性分析发现两者并不呈线性相关,提示在今后的工作中应进一步寻找金钗石斛多糖的最大效能剂量。

金钗石斛多糖是一种具有新结构特征的多糖化合物^[25-26],本研究结果为金钗石斛多糖的应用研究提供了新思路 and 实验依据。总而言之,金钗石斛多糖对大鼠脑缺血性再灌注损伤的保护作用可能与抑制氧化应激和减轻炎症反应有关,但具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 王琳,叶庆生,刘伟. 金钗石斛研究概况[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(2): 73-76.

[2] 朱华,黄学萃,杨海广,等. 石斛属多糖的研究进展[J]. 医学导报, 2007, 26(12): 1476-1478.

[3] 李小琼,葛晓军,郑斯卓,等. 金钗石斛多糖的提取及部分理化性质分析[J]. 江苏大学学报:医学版, 2008, 18(5): 446-447.

[4] 蒋玉兰,罗建平. 药用石斛多糖药理活性及化学结构研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2986-2988.

[5] 郑晓珂,曹新伟,冯卫生,等. 金钗石斛的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 826-829.

[6] 陈超琴,蒋丽华,赵黎明,等. 石斛多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 441-444.

[7] 李小琼,金徽,葛晓军,等. 金钗石斛多糖对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 和 NO 的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13634-13635, 13672.

[8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[9] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社. 2002: 1066-1067.

[10] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a

neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.

[11] 钱桂敏,章华波. 金钗石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(4): 194-196.

[12] 凌志扬,房玉良. 石斛的化学成分及药理作用[J]. 中国当代医药, 2012, 19(5): 13-14.

[13] 郁美娟,孟庆华,黄德音,等. 石斛属植物有效成分及药理作用研究[J]. 中成药, 2003, 25(11): 918-921.

[14] Yang S, Gang Q H, Wu Q, et al. Alkaloids enriched extract from *Dendrobium nobile* Lindl. attenuates tau protein hyperphosphorylation and apoptosis induced by lipopolysaccharide in rat brain[J]. *Phytomedicine*, 2013, 21(5): 712-716.

[15] Hwang J S, Lee S A, Hong S S, et al. Phenanthrenes from *Dendrobium nobile* and their inhibition of the LPS-induced production of nitric oxide in macrophage RAW264.7 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(12): 3785-3787.

[16] Xu J, Guan J, Chen X J, et al. Comparison of polysaccharides from different *Dendrobium* using saccharide mapping [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 977-983.

[17] Ye Q H, Qin G W, Zhao W M. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(8): 885-890.

[18] 王丽娜,张明辉,李菲,等. 金钗石斛多糖对脂多糖诱导的大鼠海马 APP 和 GSK-3 β 基因的影响[J]. 中国处方药, 2014(11): 114-115.

[19] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 87(1): 179-197.

[20] Niatetskaya Z V, Sosunov S A, Matsiukevich D, et al. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(9): 3235-3244.

[21] 张艳磊,何晓然,刘园园,等. 金钗石斛多糖对高糖诱导的大鼠肾系膜细胞氧化应激的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 7-9.

[22] Lakhan S, Annette K, Magdalena H. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches[J]. *J Transl Med*, 2009, 97(7): 773-777.

[23] 野向春,孟昭杰,魏胜男,等. 尼莫地平对大鼠急性脑缺血再灌注损伤早期保护作用的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(6): 543-545.

[24] 李光勤,董为伟. 尼莫地平对大鼠脑出血周围缺血面积及 MPO 活性影响的初步报告[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1999, 25(1): 58-59.

[25] Xing X H, Cui S W, Nie S P, et al. A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water soluble polysaccharides from *Dendrobium* plants[J]. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 2013, 1(2): 131-147.

[26] 姚晓东,刘章泉,汪巍,等. 金钗石斛水溶性多糖分子量分布及单糖组份分析[J]. 遵义医学院学报, 2015, 38(3): 239-243.