

引用本文:郭芬,王晓雪.柚皮苷调控PI3K/Akt/eNOS通路控制2型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的作用探讨[J].安徽医药,2021,25(4):645-649.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.003.



◇ 药学研究 ◇

柚皮苷调控PI3K/Akt/eNOS通路控制2型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的作用探讨

郭芬^a, 王晓雪^b

作者单位:河南大学第一附属医院,^a老年科,^b老年神经内科,河南 开封 475000

通信作者:王晓雪,女,副主任医师,研究方向为痴呆、帕金森,Email:wangxx1630@sina.com

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目名称(201702133)

摘要: **目的** 探讨柚皮苷对2型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的治疗效果,以及柚皮苷对3-磷酸肌醇激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/内皮型一氧化氮(eNOS)信号通路的调控作用。**方法** 2019年3月15日至2020年5月20日,将SD大鼠(南京医科大学实验动物中心)按随机字母表法分为4组,对照组大鼠给予标准饲料,其他组给予高糖高脂饲料。通过腹腔注射60 mg/kg的链脲佐菌素(STZ)建立2型糖尿病模型,柚皮苷组大鼠灌胃100 mg/kg的柚皮苷溶液,柚皮苷+LY294002组大鼠在灌胃100 mg/kg的柚皮苷溶液的基础上腹腔注射100 mg/kg的PI3K抑制剂LY294002。治疗8周后,分别检测各组大鼠空腹血糖、一氧化氮(NO)、血脂代谢指标[总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]、脑组织中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平。苏木精-伊红(HE)染色评价脑组织病理改变。蛋白质印迹法(Western blotting)检测脑组织中PI3K/Akt/eNOS通路的活化情况。**结果** 柚皮苷组的空腹血糖(13.46±1.09) mmol/L、TC(1.65±0.13) mmol/L、TG(2.89±0.23) mmol/L、LDL-C(1.59±0.13) mmol/L、MDA(55.17±4.24) U/mgprot水平均低于模型组[空腹血糖(25.32±2.04) mmol/L、TC(2.81±0.23) mmol/L、TG(4.36±0.35) mmol/L、LDL-C(2.97±0.24) mmol/L、MDA(9.37±0.72) nmol/mgprot],而HDL-C(1.08±0.08) mmol/L、血清NO(28.76±2.21) μmol/L、SOD(55.17±4.24) U/mgprot水平均高于模型组[HDL-C(0.65±0.05) mmol/L、血清NO(19.11±1.47) μmol/L、SOD(41.22±3.17) U/mgprot]($P<0.05$)。柚皮苷组的PI3K蛋白表达水平(0.81±0.06)及Akt(0.91±0.07)和eNOS(0.97±0.07)的磷酸化水平均高于模型组[PI3K蛋白表达水平(0.31±0.02)、(0.21±0.02)和eNOS(0.18±0.01)]($P<0.05$)。此外,LY294002处理可显著减弱柚皮苷对上述指标的影响($P<0.05$)。**结论** 柚皮苷对2型糖尿病大鼠的脑保护作用主要由PI3K/AKT/eNOS信号通路介导。

关键词: 葡萄柚; 糖尿病,2型; 柚皮苷; PI3K/Akt/eNOS信号通路; 血管内皮; 氧化损伤; 大鼠, Sprague-Dawley

Naringin regulates PI3K / Akt / eNOS pathway to control cerebral vascular endothelial oxidative damage in type 2 diabetic rats

GUO Fen^a, WANG Xiaoxue^b

Author Affiliation:^aDepartment of Gerontology, ^bDepartment of Geriatric Neurology, The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng, Henan 475000, China

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic effect of naringin on cerebral vascular endothelial oxidative damage in type 2 diabetic rats, and the regulating effect of naringin on 3-phosphoinositide kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT) / endothelial nitric oxide (eNOS) signaling pathway. **Methods** From March 15, 2019 to May 20, 2020, SD rats (Experimental Animal Center of Nanjing Medical University) were assigned into 4 groups according to the random alphabet method. Normal control rats were fed with standard feed, and other groups were fed with high-sugar and high-fat feed. A model of type 2 diabetes was established by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ). Rats in the naringin group were administrated with a 100 mg/kg naringin solution. Rats in the naringin + LY294002 group were intraperitoneally injected with a 100 mg/kg PI3K inhibitor LY294002 on the basis of a 100 mg/kg naringin solution. After 8 weeks of treatment, fasting blood glucose, nitric oxide (NO), lipid metabolism indicators [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)], malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) levels in brain tissues were measured in each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes of brain tissues. Western blotting was used to detect the activation of PI3K/Akt/eNOS pathway in brain tissues. **Results** Fasting blood glucose (13.46±1.09) mmol/L, TC (1.65±0.13) mmol/L, TG (2.89±0.23) mmol/L, LDL-C (1.59±0.13) mmol/L, MDA (55.17±4.24) U/mgprot levels in naringin group were lower than those in the model group [fasting blood glucose, (25.32±2.04) mmol/L; TC, (2.81±0.23) mmol/L; TG, (4.36±0.35) mmol/L; LDL-C, (2.97±0.24) mmol/L; MDA, (9.37±0.72) nmol/mgprot], while HDL-C (1.08±0.08) mmol/L, serum NO (28.76±2.21) μmol/L, SOD (55.17±4.24) U/mgprot levels were higher in the naringin group than in

the model group [HDL-C, (0.65±0.05) mmol/L; serum NO, (19.11±1.47) μ mol/L; SOD, (41.22±3.17) U/mgprot] ($P<0.05$). The PI3K protein expression level (0.81±0.06) and the phosphorylation levels of Akt (0.91±0.07) and eNOS (0.97±0.07) in the naringin group were higher than those in the model group [PI3K, (0.31±0.02); Akt, (0.21±0.02); eNOS, (0.18±0.01)] ($P<0.05$). Additionally, LY294002 treatment significantly reduced the effect of naringin on the above indicators ($P<0.05$). **Conclusion** The brain protective effect of naringin on type 2 diabetic rats is mainly mediated by the PI3K / AKT / eNOS signaling pathway.

Key words: Citrus paradisi; Diabetes mellitus, type 2; Naringin; PI3K / Akt / eNOS signaling pathway; Vascular endothelium; Oxidative damage; Rats, Sprague-Dawley

活性氧(ROS)过量生成可增加糖尿病相关血管并发症的发生风险^[1-3]。柚皮苷(Naringin)具有抗氧化、清除自由基的特性。此外,柚皮苷具有抗炎、抗凋亡、抗癌和心脏保护作用^[4-5]。最近,有研究报道,柚皮苷(Naringin)对糖尿病及其潜在并发症具有一定的治疗作用^[6]。柚皮苷的作用机制涉及抑制炎症、氧化应激损伤、糖代谢酶异常等方面,并且可在一定程度上延缓糖尿病并发症的发生发展。然而,柚皮苷在治疗2型糖尿病方面的分子机制仍有待阐明。

3-磷酸肌醇激酶(PI3K)是肌醇与磷脂酰肌醇的重要激酶,PI3K家族成员属于原癌基因。在PI3K家族中,PI3K可通过与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用导致二聚体构象改变而被激活。PI3K激活后可以磷酸化蛋白激酶B(AKT)并导致Akt信号通路激活^[7]。Akt信号通路激活后可磷酸化内皮型一氧化氮(eNOS)并调节eNOS活性^[8-9]。eNOS的活化可进一步促进一氧化氮(NO)的释放并发挥血管保护作用。因此,PI3K/Akt/eNOS信号通路在2型糖尿病发病过程中,尤其是在血管内皮氧化损伤方面,具有重要作用。因此,2019年3月15日至2020年5月20日,本研究旨在探讨柚皮苷对2型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的影响。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1 材料与方法

1.1 实验材料 将80只6周龄清洁级雄性SD大鼠,体质量范围120~150 g,购自南京医科大学实验动物中心,许可证号SYXK(豫)2019-0002,饲养在25℃、55%湿度、照明条件为12 h光暗循环的环境中。

1.2 动物分组及建模 将大鼠按随机字母表法分为对照组、模型组、柚皮苷组、柚皮苷+LY294002组($n=20$)。对照组大鼠给予标准饲料,其他组大鼠给予高糖高脂饲料(20%蔗糖、10%猪油和2.5%蛋黄),共喂养4周。禁食12 h后,对模型组、柚皮苷组和柚皮苷+LY294002组大鼠腹腔注射60 mg/kg的链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司)建立2型糖尿病模型;对照组大鼠注射等体积的生理盐水。1周后收集大鼠尾静脉血并测空腹血糖值(FBG),FBG>16.7 mmol/L且伴有多饮、多食、多尿、胰岛素水平升高则表示造模成功^[10-12]。各组大鼠继续喂养8周,柚皮苷组大鼠灌胃100 mg/kg的柚皮苷溶液,柚皮苷+

LY294002组大鼠在灌胃100 mg/kg的柚皮苷溶液的基础上,加用腹腔注射给予100 mg/kg的PI3K抑制剂LY294002[凯梅根(上海)生物科技有限公司],其他组大鼠灌胃等体积的生理盐水。

1.3 标本收集 收集大鼠血清用于检测血糖、血脂水平。麻醉大鼠(10%水合氯醛)并取出脑组织,一部分脑组织以液氮固定4 h,并在-80℃冷藏,用于氧化损伤相关指标检测及Western blotting,另一部分常规制作切片,用于HE染色。

1.4 生化指标检测 强生稳步倍加型血糖仪检测大鼠血糖水平。日立7600全自动生化分析仪检测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。采用硝酸还原酶法检测各组大鼠血清NO水平,检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.5 苏木精-伊红(HE)染色 使用切片机对大鼠脑组织进行切片,按照试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明对脑组织进行HE染色。

1.6 氧化应激指标的检测 将各组大鼠脑组织进行匀浆,按照南京建成生物工程研究所的试剂盒测定丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平。

1.7 蛋白质印迹法(Western blotting) 将大鼠脑组织裂解,通过BCA法测定蛋白质浓度。SDS-PAGE上分离蛋白,并转移至PVDF膜[伯乐生命医学产品(上海)有限公司],5%脱脂牛奶(完达山乳业股份有限公司)封闭1 h。将膜在4℃下与以下一抗过夜孵育:3-磷酸肌醇激酶(PI3K)、磷酸化-PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、磷酸化-AKT(p-AKT)内皮型一氧化氮(eNOS)、磷酸化-eNOS(p-eNOS)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:1 000)。抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。将膜在室温下与山羊抗兔二抗(美国Bio-world公司,1:3 000)孵育1 h。通过超敏ECL化学发光试剂盒显影。GAPDH作为内部对照。

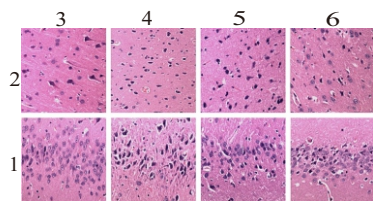
1.8 统计学方法 SPSS 21.0软件用于统计分析。符合正态分布数据表示为 $\bar{x} \pm s$,通过单因素方差分析和LSD法进行组间比较。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 柚皮苷对2型糖尿病大鼠血糖和血脂代谢指标的影响 与模型组比较,柚皮苷组的空腹血糖、TC、TG和LDL-C水平均显著降低,而HDL-C水平显

著升高。与柚皮苷组比较,柚皮苷+LY294002组的空腹血糖、TC、TG和LDL-C水平均显著升高,而HDL-C水平显著降低。见表1。

2.2 柚皮苷对2型糖尿病大鼠脑组织病理变化的影响 对照组大鼠脑皮层区神经元细胞形态完整,海马齿状回细胞排列整齐。模型组大鼠大脑皮层区发生明显的神经元变性、坏死,海马齿状回神经细胞核固缩、深染、变形、细胞排列紊乱。柚皮苷组的上述组织病理改变均明显减轻。而柚皮苷+LY294002组的神经元细胞变性、核固缩、细胞排列紊乱等病变较柚皮苷组加重。见图1。



注:1—海马;2—皮层;3—对照组;4—模型组;5—柚皮苷组;6—柚皮苷+LY294002组。

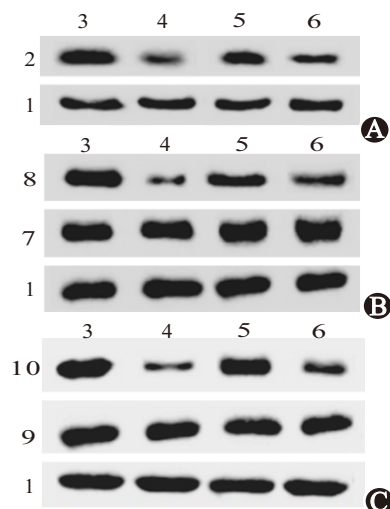
图1 2型糖尿病大鼠脑组织病理变化比较(HE染色×200)

2.3 柚皮苷对2型糖尿病大鼠血清一氧化氮(NO)水平的影响 与对照组比较(34.54 ± 2.65) $\mu\text{mol/L}$,模型组大鼠的血清NO水平(19.11 ± 1.47) $\mu\text{mol/L}$ 显著降低($t=21.743, P=0.001$)。与模型组比较,柚皮苷组的血清NO水平(28.76 ± 2.21) $\mu\text{mol/L}$ 显著升高($t=17.332, P=0.003$)。然而,与柚皮苷组比较,柚皮苷+LY294002组的血清NO水平(24.19 ± 1.86) $\mu\text{mol/L}$ 显著降低($t=11.421, P=0.012$)。

2.4 柚皮苷对2型糖尿病大鼠脑组织氧化应激指标的影响 与对照组比较,模型组大鼠的SOD水平显著降低[(63.54 ± 4.88) U/mgprot比(41.22 ± 3.17) U/mgprot, $t=14.378, P=0.004$],而MDA水平显著升高;对照组MDA低于模型组[(4.13 ± 0.31) nmol/mgprot比(9.37 ± 0.72) nmol/mgprot, $t=27.322, P=0.001$]。与模型组比较,柚皮苷组的SOD水平为(55.17 ± 4.24) U/mgprot显著升高($t=12.489, P=0.008$),而MDA水平为(6.28 ± 0.48) nmol/mgprot显著降低($t=18.997, P=0.001$)。然而,与柚皮苷组比较,柚皮苷+LY294002

组的SOD水平(46.89 ± 3.60) U/mgprot显著降低($t=21.545, P=0.011$),而MDA水平(7.15 ± 0.55) nmol/mgprot显著升高($t=15.224, P=0.017$)。

2.5 柚皮苷对2型糖尿病大鼠脑组织PI3K/Akt/eNOS信号通路的影响 与模型组比较,柚皮苷组的PI3K、p-Akt和p-eNOS水平显著升高,与柚皮苷组比较,柚皮苷+LY294002组的PI3K、p-Akt和p-eNOS水平显著降低。见表2,图2。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—3-磷酸肌醇激酶;3—对照组;4—模型组;5—柚皮苷组;6—柚皮苷+LY294002组;7—总蛋白激酶B;8—磷酸化-蛋白激酶B;9—总内皮型一氧化氮;10—磷酸化-内皮型一氧化氮。

图2 Western blotting检测各组大鼠脑组织相关表达:A为PI3K,B为Akt,C为eNOS的

3 讨论

据报道,高葡萄糖导致血管内皮细胞中过量生成活性氧(ROS)^[13]。过量的ROS形成影响缺氧信号通路并进一步加重血管内皮障碍^[14]。柚皮苷具有抗癌、抗炎、抗氧化及其他多种生物活性^[4-6]。应用不同剂量的柚皮苷(20、40和80 mg/kg)治疗糖尿病大鼠,发现柚皮苷以剂量依赖性方式显著减少糖基化血红蛋白并改善胰岛素分泌,表明柚皮苷具有剂量依赖性降血糖作用^[15]。在柚皮苷和维生素C联合治疗STZ诱导的Wistar大鼠过程中,有研究者发现该治疗有效地改善了血糖和糖基化血红蛋白,增加

表1 SD大鼠80例的血糖和血脂代谢指标水平/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	空腹血糖	TC	TG	LDL-C	HDL-C
对照组	20	4.56±0.37	0.80±0.06	1.49±0.12	1.22±0.10	1.25±0.10
模型组	20	25.32±2.04 ^①	2.81±0.23 ^①	4.36±0.35 ^①	2.97±0.24 ^①	0.65±0.05 ^①
柚皮苷组	20	13.46±1.09 ^{①②}	1.65±0.13 ^{①②}	2.89±0.23 ^{①②}	1.59±0.13 ^{①②}	1.08±0.08 ^{①②}
柚皮苷+LY294002组	20	18.13±1.46 ^{①②③}	2.17±0.18 ^{①②③}	3.19±0.26 ^{①②③}	2.19±0.18 ^{①②③}	0.79±0.06 ^{①②③}
整体F,P值		24.543,0.000	32.235,0.000	18.643,0.000	19.753,0.000	26.837,0.000

注:TC为总胆固醇,TG三酰甘油,HDL-C高密度脂蛋白胆固醇,LDL-C低密度脂蛋白胆固醇。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与柚皮苷组比较, $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠脑组织中PI3K、p-AKT / total-AKT 和 p-eNOS / total-eNOS 的蛋白相对表达量

组别	鼠数	PI3K	p-AKT / total-AKT	p-eNOS / total-eNOS
对照组	20	1.2±0.09	1.14±0.08	1.03±0.08
模型组	20	0.31±0.02 ^①	0.21±0.02 ^①	0.18±0.01 ^①
柚皮苷组	20	0.81±0.06 ^{①②}	0.91±0.07 ^{①②}	0.97±0.07 ^{①②}
柚皮苷+LY294002组	20	0.65±0.05 ^{①②③}	0.54±0.04 ^{①②③}	0.41±0.03 ^{①②③}
整体F,P值		32.563,0.000	17.432,0.000	23.424,0.000

注:PI3K为磷酸化-PI3K,p-AKT为磷酸化-蛋白激酶B,total-AKT为总蛋白激酶B,p-eNOS为磷酸化-内皮型一氧化氮,total-eNOS为总内皮型一氧化氮。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与柚皮苷组比较, $P<0.05$ 。

了肝脏和肾脏己糖激酶活性,减少了葡萄糖6磷酸酶和果糖16-二磷酸活性,减少脂质过氧化物的堆积,并增加了谷胱甘肽的合成^[16]。Ali等^[17]报道柚皮苷治疗STZ诱导大鼠可显著降低血糖、过氧化氢和硫代巴比妥酸水平,同时增加胰岛素水平和抗氧化酶活性,从而导致抗氧化能力的总体提高。因此,柚皮苷的抗高血糖作用和抗氧化应激作用可能在治疗糖尿病及相关并发症方面具有较高价值。本研究证实了柚皮苷的良好的抗氧化作用。

研究表明,血管内皮细胞可分泌多种血管活性物质,其中包括血管舒张因子NO^[18-19]。研究显示,糖尿病患者因发生血管内皮功能受损可导致NO合成被抑制^[20]。此外,高血糖条件可导致内皮细胞功能显著降低,并降低NO生物利用度^[21]。此外,高血糖培养条件会加速血管内皮细胞衰老,导致增殖活性受损。本研究发现,模型组大鼠的血清NO水平显著降低,而柚皮苷治疗显著升高了大鼠血清NO水平。提示,柚皮苷的治疗作用可能与调节NO的合成和分泌有关。

其他研究者发现,PI3K/AKT/eNOS信号通路受到抑制可引起血管内皮细胞功能紊乱,当eNOS活性下降时,导致NO合成减少^[22-23]。eNOS活性的增强主要由PI3K/AKT信号通路介导^[24]。本研究发现,柚皮苷治疗显著上调了PI3K的表达并激活了PI3K/AKT/eNOS信号通路,因此柚皮苷发挥了PI3K激动剂的作用。为了确定PI3K/AKT/eNOS信号通路在柚皮苷治疗过程中的作用,本研究设置了柚皮苷+LY294002组,该组大鼠在柚皮苷基础上应用PI3K抑制剂LY294002处理大鼠,发现LY294002处理抑制了PI3K/AKT/eNOS信号通路,并且可明显减弱柚皮苷对2型糖尿病大鼠的治疗作用。

综上所述,柚皮苷对2型糖尿病大鼠的脑保护作用主要由PI3K/AKT/eNOS信号通路介导。

参考文献

- [1] 闫志峰,刘姗姗,闫鸿. NLRP3炎症小体在糖尿病肾病中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(46):107-109.
- [2] CZECH MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. Nat Med, 2017, 23(7):804-814.
- [3] EVANS JF, LEE JH, RAGOLIA L. Ang- II-induced Ca(2+) influx is mediated by the 1/4/5 subgroup of the transient receptor potential proteins in cultured aortic smooth muscle cells from diabetic Goto-Kakizaki rats[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009,302(1):49-57.
- [4] ALAM MA, SUBHAN N, RAHMAN MM, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action[J]. Adv Nutr, 2014,5(4):404-417.
- [5] 陈芬琴,王秋月. 柚皮苷对糖尿病肾脏疾病的作用机制[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2017, 37(4):239-241,253.
- [6] DHANYA R, ARUN KB, NISHA VM, et al. Preconditioning L6 muscle cells with naringin ameliorates oxidative stress and increases glucose uptake [J/OL]. PLoS One, 2015, 10 (7) : e0132429. DOI: 10.1371/journal.pone.0132429.
- [7] VANHAESEBROECK B, LEEVERS SJ, AHMADI K, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids [J]. Annu Rev Biochem, 2001,70:535-602.
- [8] KUO H M, LIN C Y, LAM H C, et al. PTEN overexpression attenuates angiogenic processes of endothelial cells by blockade of endothelin-1/endothelin B receptor signaling[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(2):341-349.
- [9] COSTA RMDA, NEVES KB, MESTRINER FL, et al. TNF- α induces vascular insulin resistance via positive modulation of PTEN and decreased Akt/eNOS/NO signaling in high fat diet-fed mice [J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1):119.
- [10] 王景尚,孙明月,黄烨,等. α -硫辛酸对血糖波动状态下2型糖尿病大鼠血管内皮细胞功能及PI3K/Akt/GSK-3 β 通路的影响#br[J]. 中国全科医学, 2017, 20(24): 2965-2971.
- [11] 裴文丽. 黄芪多糖对2型糖尿病大鼠血清IL-1 β 、IL-6、IL-18的影响作用[J]. 中医临床研究, 2016, 8(2):10-13.
- [12] 贾敏,周玲玲,方泰惠,等. 恒顺降糖胶囊对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(2): 64.
- [13] LICHTNEKERT J, KULKARNI OP, MULAY SR, et al. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1[J/OL]. PLoS One, 2011, 6 (10) : e26778. DOI: 10.1371/journal.pone.0026778.
- [14] SAMRA YA, SAID HS, ELSHERBINY NM, et al. Cepharanthine and piperine ameliorate diabetic nephropathy in rats: role of NF- κ B and NLRP3 inflammasome [J]. Life Sci, 2016, 157: 187-199.
- [15] KANDHARE AD, GHOSH P, BODHANKAR SL. Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats [J]. Chem Biol Interact, 2014,219:101-112.
- [16] PUNITHAVATHI VR, ANUTHAMA R, PRINCE PS. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male wistar rats[J]. J Appl Toxicol, 2008,28 (6):806-813.
- [17] ALI MM, KADER MAEL. The influence of naringin on the oxidative state of rats with streptozotocin-induced acute hyperglycaemia

- [J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2004,59(9/10):726-733.
- [18] CELINSKI K, DWORZANSKI T, FORNAL R, et al. Comparison of the anti-inflammatory and therapeutic actions of PPAR- γ agonists rosiglitazone and troglitazone in experimental colitis[J]. J Physiol Pharmacol, 2012,63(6):631-640.
- [19] 边宁, 龚博君, 郭军, 等. 一氧化氮/诱导型一氧化氮合酶在动脉粥样硬化过程中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(3):414-418.
- [20] SHAHZAD K, BOCK F, AL-DABET MM, et al. Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammatory induced diabetic nephropathy[J]. Sci Rep, 2016,6:34228.
- [21] HAMED S, BRENNER B, AHARON A, et al. Nitric oxide and superoxide dismutase modulate endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus [J]. Cardiovasc Diabetol, 2009,8:56.
- [22] MALEK M, KIELKOWSKA A, CHESSA T, et al. PTEN regulates PI (3, 4) P2 signaling downstream of class I PI3K[J]. Mol Cell, 2017, 68(3): 566-580.
- [23] THUM T, HOEBER S, FROESE S, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1 [J]. Circ Res, 2007,100(3):434-443.
- [24] 吴静, 雷闽湘, 谢小云, 等. 罗格列酮对人脐静脉内皮细胞 NO 和 PI3K/PKB/eNOS 信号通路的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2007, 32(5):824-830.

(收稿日期:2019-12-16,修回日期:2020-02-26)

引用本文:刘少静,腾军放,许玉明,等. 桑黄酮 G 对缺血性中风大鼠血脑屏障的保护作用[J]. 安徽医药, 2021, 25(4):649-653.DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.004.

◇ 药学研究 ◇



桑黄酮 G 对缺血性中风大鼠血脑屏障的保护作用

刘少静¹, 腾军放², 许玉明², 李玉生², 张杰文³, 马建军³

作者单位:¹安钢集团公司职工总医院神经内科, 河南 安阳 455000; ²郑州大学第一附属医院神经内科, 河南 郑州 450000; ³河南省人民医院神经内科, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 探讨桑黄酮 G(kuwanon G, KG)对缺血性中风大鼠脑水肿和血脑屏障(BBB)的影响。**方法** 2018年10月至2019年9月选取45只250~300 g SPF级雄性SD大鼠,采用随机数字表法分为假手术组、缺血性中风模型组(模型组)和治疗组,利用单侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAo)模型,术前3 d假手术组、模型组给予无菌水灌服,治疗组给予KG灌服,术后连续灌服7 d,通过神经功能评分检测各组大鼠的脑损伤程度,利用检测大脑含水量评估各组大鼠脑水肿程度,利用蛋白质印迹法(western blotting)检测各组大鼠脑组织中胞质紧密粘连蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白(occludin)、紧密连接蛋白(claudin-5)和基质金属蛋白-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)蛋白的表达。**结果** 与假手术组相比[6 h(0.30±0.48)、1 d(0.30±0.48)、3 d(0.30±0.48)、7 d(0.30±0.48),模型组(6 h(15.20±1.14)、1 d(14.60±1.17)、3 d(15.50±0.85)、7 d(15.60±1.08)]神经功能明显受损;治疗组[6 h(14.80±1.03)、1 d(13.20±1.03)、3 d(12.10±1.2)、7 d(9.40±1.27)]神经功能虽受损,但经桑黄酮 G 治疗后神经功能显著恢复,在第7天尤为显著($P<0.001$)。与假手术组[1 d(73.83±0.91)%、2 d(73.89±0.82)%、3 d(73.89±0.82)%、7 d(74.97±0.38)%]相比,模型组[1 d(81.71±1.12)%、2 d(84.98±0.39)%、3 d(83.54±0.84)%、7 d(80.84±1.22)%]脑水肿明显,在术后2天脑水肿最严重;治疗组[1 d(76.85±2.41)%、2 d(77.81±1.69)%、3 d(76.87±1.97)%、7 d(76.55±1.27)%]脑水肿亦明显,但经治疗后脑水肿明显减轻($P<0.001$)。相比假手术组 ZO-1(0.52±0.15)、Occludin(0.52±0.15)、Claudin-5(0.89±0.06)、MMP-9(0.42±0.02),模型组 ZO-1(0.21±0.05)、Occludin(0.38±0.07)、Claudin-5(0.41±0.07)蛋白的表达明显下降, MMP-9(0.86±0.14)显著上升;经桑黄酮 G 治疗后 ZO-1(0.51±0.10)、Occludin(0.89±0.04)、Claudin-5(0.75±0.04)的表达明显上升,而 MMP-9(0.28±0.06)的表达显著减少($P<0.001$)。**结论** KG通过调节 MCAo 大鼠紧密连接蛋白和基质金属蛋白的表达,保护 BBB 完整性,从而发挥神经保护作用。

关键词: 黄酮类; 卒中; 脑缺血; 桑黄酮 G; 血脑屏障; 大鼠, Sprague-Dawley

Protective effect of Kuwanon G on the blood-brain barrier in ischemic stroke rats

LIU Shaojing¹, TENG Junfang², XU Yuming², LI Yusheng², ZHANG Jiewen³, MA Jianjun³

Author Affiliations: ¹Department of Neurology, Angang General Hospital, Anyang, Henan 455000, China; ²Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China; ³Department of Neurology, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of kuwanon G (KG) on brain edema and Blood Brain Barrier (BBB) in ischemic stroke rats. **Methods** Forty-five adult male SD rats (250-300g) were enrolled from October 2018 and September 2019, and were as-