

番茄红素对大鼠脑缺血再灌注后自由基代谢的影响

毛旭娟 张俊峰 梁建芳 郑绘霞

摘要 **目的** 探讨大鼠血清中 SOD 活力和 MDA 含量在脑缺血再灌注 (CIRP) 损伤过程中的变化以及番茄红素干预后的影响。**方法** 采用线栓法制作实验大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型 (MCAO)。将 Wistar 大鼠随机分为:假手术组、缺血再灌注组 (I/R 组) (6h、1 天、2 天、3 天、7 天组) 和番茄红素 (LP 组)。运用比色法检测大鼠血清中 SOD 和 MDA。**结果** 假手术组中 SOD 活力高表达、MDA 低表达;I/R 组的血清中 SOD 活力在各时间点均低于假手术组,并且在 1 天显著降低,2 天 SOD 活力降到最低;MDA 含量在 6h 开始升高,1 天明显升高,2 天达高峰;LP 组从 CIRP 后血清 SOD 活力明显高于 I/R 组,MDA 含量明显低于 I/R 组。**结论** 大鼠血清中的 SOD、MDA 参与了 CIRP 损伤,番茄红素对大鼠 CIRP 后发生的氧化损伤有干预作用。

关键词 脑缺血再灌注 超氧化物歧化酶 丙二醛 番茄红素

Effects of Lycopene on Free Radicals Metabolism in Focal Ischemia Reperfusion Rats. Mao Xujuan, Zhang Junfeng, Liang Jianfang, Zheng Huixia. Shanxi Medical College for Continuing Education, Shanxi 030012, China

Abstract **Objective** To investigate the free radical mechanism in brain of rats involved in the injury induced by cerebral ischemia - reperfusion. **Methods** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) was occluded with thread according to modified Zea longa's method. Wistar rats were randomly divided into: sham - operation group (sham), ischemia - reperfusion group (IR) 6h, 1day, 2days, 3days, 7days. The content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in brain tissues were measured by comparative methods. **Results** The activity of SOD and the content of MDA in brain were determined respectively. The activity of SOD decreased immediately after operation, and came to the lowest point after 24h, then increased in the following time, whereas the levels of MDA came to the highest point after 2 days, then decreased. There was significance difference between sham group and I/R group. **Conclusion** The activity of SOD decreased after operation, then increased in the following time, whereas the levels of MDA came to the highest, then decreased. They have negative correlation. The lycopene can reduce the content of MDA after focal cerebral ischemia - reperfusion injury, can lighten the level of vasogenic brain edema, and improve the neurological deficit scores, so it has a protective effect on impaired neuron in cerebral ischemia - reperfusion injury.

Key words Cerebral ischemia reperfusion; superoxide dismutase; Malondialdehyde; Lycopene

脑缺血再灌注 (cerebral ischemia reperfusion, CIRP) 的相关研究一直是实验与临床治疗探索的热点, CIRP 的发生机制仍然不是十分清楚, 目前大部分研究集中在氧化损伤过程的发生, 特别是在抑制 CIRP 中的氧化应激损伤方面, 更值得深入探讨。氧化损伤过程中机体产生的自由基可以破坏血脑屏障, 促使脑水肿的形成。番茄红素属于类胡萝卜素, 作为天然生物抗氧化剂, 具有最强的淬灭单线态氧能力。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是体内主要的自由基清除酶, 能清除超氧阴离子, 保护细胞免受氧化损伤。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量变化可以间接反应体内氧化损伤发生的程度。本实验通过分析大鼠发生 CIRP 后血清 SOD、MDA、神经功能评分与脑水肿程度的变化特点, 进一步探讨

番茄红素抑制 CIRP 损伤的发生机制。

材料与方法

1. 实验动物、主要试剂与设备: 雄性 Wistar 大鼠 56 只, 体重 250 ~ 350g, 由山西职工医学院提供。随机分为: 假手术组、缺血再灌注组 (I/R) (分为 6h、1 天、2 天、3 天、7 天 5 个亚组), 番茄红素组 (LP)。每小组 8 只。主要试剂和仪器: SOD、MDA 试剂盒 (南京建成生物科技公司); 番茄红素油树脂 (乌鲁木齐生命红科技公司); BI-2000 医学图像分析系统软件 (成都泰盟科技有限公司)。

2. 动物模型制作方法: 本实验动物模型参照前人 Koizumi 和 Nagasawa 的改良线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型 (MCAO)^[1,2]。具体制作方法: 实验大鼠术前 12h 禁食; 称重后, 以 10% 水合氯醛 (300mg/kg) 腹腔麻醉, 备皮、消毒并于大鼠颈部正中行纵行切口 (长约 25mm), 钝性游离右侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA) 及颈外动脉 (ECA); 结扎 ECA 与 CCA; 于 ECA 与 ICA 分叉下方剪一切口, 将预先处理过的栓线插入 CCA; 经 ICA 入颅直至有轻微阻力感为止, 插入深度为

20 ± 0.5mm,实现大脑中动脉阻塞。结扎入口处,栓线外留约1cm,消毒,逐层缝合伤口;缺血2h后拔出线头约1cm,实现对缺血脑组织再灌注,即造模完成。

3. 给药方法:LP 组术前1周给予番茄红素油脂灌胃(含番茄红素5mg),每日1次^[3]。假手术组和I/R 组大鼠则同时给予等量生理盐水灌胃处理。7天后造模,造模成功并经评分纳入组后继续给予相同剂量灌胃至各不同时间点处死取材。

4. 神经功能评分:用Zea Longa 神经功能评分法评分:0分:无神经功能缺损症状;1分:轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2分:中度局灶性神经功能缺损,向左侧转圈;3分:重度局灶性神经功能缺损,向左侧倾倒;4分:不能自发行走或意识丧失。选取1~3分大鼠为有效实验模型^[4]。

5. 取材和检测指标:实验大鼠造模后,根据各组既定时间点,以10%水合氯醛麻醉,用一次性注射器于腹主动脉取血4ml,静置于一次性管中30min,4000r/min 的转速离心15min后,将分离出的血清转移至离心管,置于-20℃冰箱冻存待用。用比色法检测血清中的SOD、MDA。

6. 脑水肿程度测定:采用干湿重法测定脑水肿程度。取大鼠脑组织后先在电子天平上称得其湿重,然后取左侧半脑即刻置于烤箱,100℃恒温烘烤24h至恒重,称干重并计算水肿程度。计算公式如下:脑水肿程度=(湿重-干重×2)/湿重×100%。

7. 统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0 统计软件,多组定量资料比较用单因素方差分析,神经功能评分用Kruskal-Wallis 检验,组间比较用LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为显著水平, $P < 0.01$ 为非常显著。

结 果

1. CIRP 后 SOD 活力和 MDA 的表达:如表1所示,超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,I/R 组的SOD 活力在各时间点均低于假手术组($P < 0.01$),从6h 即开始明显下降,24h 显著降低,2 天时 SOD 活力降到最低;与 I/R 组相比,LP 组在实验造模后24h SOD 活力明显高于I/R 组($P < 0.01$),表明番茄红素对大鼠脑缺血再灌注损伤发生后SOD 酶活性降低有干预作用。

表 1 SOD 活力和 MDA 含量的变化 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)		
组别	SOD(U/ml)	MDA (nmol/ml)
假手术组	113.15 ± 0.95 *	5.07 ± 0.15 *
6h	83.54 ± 2.03 *	6.15 ± 0.14 *
1 天	73.67 ± 1.85 *	7.17 ± 0.09 *
2 天	70.65 ± 1.31 *	7.62 ± 0.05 *
3 天	90.48 ± 1.26 *	6.25 ± 0.12 *
7 天	102.67 ± 0.35 *	6.16 ± 0.07 *
LP 1 天	88.96 ± 1.21 *	5.23 ± 0.03 *

* $P < 0.01$

丙二醛(MDA)含量的变化,I/R 组 MDA 含量在6h 即开始升高,随着缺血时间的延长MDA 含量越来越高,48h 达到峰值,I/R 组各时间点与假手术组比较差异显著($P < 0.01$);LP 组CIRP 后24h MDA 含量高于假手术组,低于I/R 组($P < 0.01$)。表明番茄红素干预可以降低脑缺血再灌注损伤后脂质过氧化反应产物MDA 的增加。

2. 再灌注后神经功能评分:实验动物造模后,几乎所有大鼠均出现食欲不振、活动减少、嗜睡、体重明显减轻、反应迟钝等,部分大鼠出现呕吐、抓挠头部等表现。严重者甚至出现抽搐、昏迷甚至死亡;实验组大鼠各种活动表现与假手术组比较为稍正常,神经功能缺损症状轻微。

I/R 组自脑缺血再灌注损伤后6h 即出现神经功能缺损症状,2 天后的神经功能缺损最为严重($P < 0.01$),3 天后症状有所减轻。3 天组与2 天、7 天组比较($P < 0.05$),1 天组与2 天组、3 天组比较,6h 组与3 天组、7 天组比较均无统计学意义。

与缺血再灌注组相比,番茄红素组在脑缺血再灌注后1 天差异有显著性意义($P < 0.01$)(表2)。

表 2 大鼠缺血再灌注不同时间点 longa 评分 ($n = 8$)		
组别	神经功能评分秩次	神经功能评分秩次
假手术组	5.37 ± 3.79 *	
6h	22.51 ± 8.22 *	
1 天	34.53 ± 10.28 *	19.54 ± 1.48 *
2 天	38.23 ± 6.43 * *	
3 天	26.63 ± 11.77 * *	
7 天	18.65 ± 6.84 * *	
LP 1 天		13.21 ± 1.20 *

* $P < 0.01$, * $P < 0.05$

3. 脑水肿程度的变化:从表3 中可以看出,脑缺血再灌注后,I/R 组6h 脑水肿程度升高,2 天最为明显,3~7 天逐渐微弱。I/R 组脑水肿程度高于假手术组,而番茄红素组脑水肿程度较低。

表 3 各组大鼠再灌注后脑水肿程度 ($n = 8$) ($\bar{x} \pm s$)	
组别	脑水肿程度
假手术组	75.53 ± 1.21 * *
6h	78.21 ± 1.24 *
1 天	80.73 ± 1.19 * *
2 天	82.49 ± 1.16 *
3 天	79.24 ± 1.34 * *
7 天	77.06 ± 1.18 * *
LP 1 天	77.46 ± 1.17 *

* $P < 0.01$, * $P < 0.05$

I/R 组中 6h 组与 3 天组和 7 天组比较无统计学意义;假手术组与 7 天组、1 天组与 72h 组比较,有显著差异($P < 0.05$),其余各组组间两两比较,差异非常显著($P < 0.01$)。LP 组与 I/R 组,比较差异非常显著($P < 0.01$)。

讨 论

本实验选择天然生物提取抗氧化剂——番茄红素作为脑缺血再灌注损伤的干预手段,是因为其具有良好的氧自由基清除能力。番茄红素属于烃类胡萝卜素,是由 11 个共轭及两个非共轭碳-碳双键构成的直链型碳氢化合物,是维生素 A 的前体类胡萝卜素^[5]。

番茄红素可作为生物抗氧化剂,主要体现在其较强的淬灭单线态氧的能力,捕集氧自由基等反应^[6]。此外番茄红素富含于日常所见的番茄、石榴等多种食物中,来源方便;生物利用度高,可在人和动物血液及各种组织中通过积累达到较高浓度,无毒性不良反应,为其广泛的应用提供了有利条件。

本实验证明番茄红素可提高血清中超氧化物歧化酶的活力、降低丙二醛的含量,说明番茄红素可以通过抗脂质过氧化反应对脑缺血再灌注损伤起到保护作用。可明显减轻缺血所致的脑组织总抗氧化能力的降低,减少机体抗氧化酶的消耗,有助于改善缺血后脑组织的抗氧化能力。

本实验结果提示脑组织中超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量存在负性相关。丙二醛是氧自由基发

生脂质过氧化的产物,测定其含量的多少可反映出氧自由基的含量;超氧化物歧化酶是体内主要的自由基清除剂,超氧化物歧化酶活力与丙二醛含量在理论上是互相牵制,为此消彼长的关系。

番茄红素对大鼠脑缺血再灌注损伤有明显保护作用,其作为天然抗氧化剂可以清除自由基,抑制丙二醛含量,干预超氧化物歧化酶活性的降低;减轻脑水肿的形成,改善神经功能的缺失。

参考文献

- 1 Koizu mi J, Yoshida Y, Nakazawa T, *et al.* Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rat in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *stroke*, 1986, 8: 1-8
- 2 Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2008, 20: 84-91
- 3 王会娟, 李馨儒, 黄燕清, 等. 番茄红素微囊的体内外药理学行为 [J]. *药理学学报*, 2005, 40(9): 787-791
- 4 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- 5 Pan H, Shi G, Chen W, Wang D. Effect of lycopene on the function of antioxidative enzyme system in rats [J]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2003, (32): 441-442
- 6 Becker KJ, Kindrick DL, Lester MP, *et al.* Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25 (12): 1634-1644

(收稿: 2011-01-01)

(修回: 2011-06-22)

百里醌对大肠癌生长和转移的抑制作用

吴志豪 胡丽萍 沈 跃 韩邵伟 黄莉莉 柯品好 蒋 平

摘 要 **目的** 探讨百里醌对大肠癌生长及转移的影响及其机制。**方法** 百里醌作用大肠癌细胞株 SW480 后, cell counting kit-8 (CCK-8) 法检测细胞增殖; 荧光显微镜下观察细胞形态; 划痕试验和 Transwell 小室实验分别测定大肠癌细胞体外迁移和侵袭能力; 用 Western blotting 检测大肠癌细胞中 Mucin-4、HER-2 和 FAK 蛋白表达; 建立起裸鼠大肠癌皮下移植模型, 观察百里醌对裸鼠大肠癌移植瘤生长的影响; 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 Ki-67 和 Mucin-4 阳性表达。**结果** 与对照组相比较, 百里醌可显著抑制体外大肠癌 SW480 细胞生长、迁移和侵袭, 并明显诱导细胞凋亡; 百里醌可呈显著下调大肠癌细胞中 Mucin-4 和 HER-2 的表达, 并抑制 FAK 磷酸化; 百里醌可显著抑制裸鼠大肠癌皮下移植瘤生长; 百里醌可明显降低大肠癌肿瘤组织中 Ki-67 和 Mucin-4 的阳性表达。**结论** 百里醌可显著抑制大肠癌生长和转移, 该作用可能通过抑制 Mucin-4 蛋白表达而实现。

基金项目: 温州市科技局资助项目 (Y20090121)

作者单位: 325027 温州医学院附属第二医院外科 (吴志豪、沈跃、韩邵伟、蒋平); 325000 温州医学院 (胡丽萍、黄莉莉、柯品好)

通讯作者: 蒋平, 硕士研究生导师, 电子信箱: hosrml@126.com