

所以疾病患病率会相应增大^[10]。航医应更加关注飞行驾驶员的身体健康,采取相应措施对发病率较高的疾病进行干预。

由此得出结论,飞行驾驶员心血管系统、消化系统、视听觉系统、泌尿系统和营养相关系统均有发病,且各种疾病的患病率随年龄增加有增大的趋势。

参考文献

- 1 汪庆,陈大方,黄爱群,等.民航飞行员健康状况调查[J]. 中国公共卫生,2006,22(9):1131-1132
- 2 郭华,周亚军,景百胜,等.某运输机部队飞行人员健康状况调查[J]. 航空军医,2004,32(2):51-53
- 3 Ong KL, Cheung BM, Man YB, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among United States adults 1999-2004[J]. Hypertension, 2007, 49: 69-75
- 4 Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000[J]. JAMA, 2003, 290: 199-206
- 5 刘军莲,高建义,李勇枝,等.飞行驾驶员疾病谱研究进展[J]. 航天医学与医学工程,2011,24(2):151-156
- 6 刘玉玺. BMI 指数应用进展[J]. 科学大众科学教育,2009,5:152-152
- 7 李立明,饶克勤,孔灵芝,等.中国居民2002年营养与健康状况调查[J]. 中国流行病学杂志,2005,26(7):478-484
- 8 Radjen SD, Jovelic AS, Radjen GS, et al. Metabolic syndrome and carotid artery intima-media thickness in military pilots[J]. Aviat Space Environ Med, 2011, 82(6):622
- 9 张建英,高雁旭,周金立,等.歼击机飞行员血脂异常的类型分布与特点[J]. 中华航空航天医学杂志,2005,16(1):45-49
- 10 赵丽. 飞行人员高血压细节管理的探讨[J]. 健康教育,2012,50(32):112-115

(收稿日期:2013-05-03)

(修回日期:2013-05-20)

萝卜硫素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的脑保护作用

曾潍贤 陈大庆 邢超 龚裕强 孙来芳

摘要 **目的** 研究萝卜硫素(sulforaphen, SFN)对大鼠局部脑缺血再灌注的抗氧化作用。**方法** 雄性SD大鼠,随机分为3组:假手术组(Sham组)、缺血再灌注模型组(I/R组)、萝卜硫素干预组(SFN组)(5mg/kg);Sham组:假手术后腹腔注射等量PBS;I/R组:缺血再灌注术后腹腔注射等量PBS;SFN组:缺血再灌注术后腹腔注射萝卜硫素5mg/kg。通过测定脑梗死体积,HE染色观察组织学形态改变,酶联免疫吸附法检测缺血脑组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量,Western blot检测HO-1蛋白水平的变化。**结果** 与I/R组比,SFN干预后可降低脑缺血再灌注后脑梗死体积($P < 0.05$),ELISA法显示,SFN能降低脑缺血再灌注后大鼠的MDA含量($P < 0.05$)。Western blot结果显示,SFN能够明显诱导HO-1蛋白的表达($P < 0.05$)。**结论** SFN可通过诱导HO-1的表达,减少脑局灶性缺血再灌注损伤后脑MDA含量,减少脑梗死体积,具有神经保护作用。

关键词 萝卜硫素 缺血再灌注 神经保护 氧化应激 血红素氧合酶

Neuroprotective Effects of Sulforaphen against Focal Cerebral Ischemia/reperfusion Injury in Rats. Zeng Weixian, Chen Daqing, Xing Chao, Gong Yuqiang, Sun Laifang. Department of Emergency Medicine, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the anti-oxidative effects of sulforaphen against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods** Sprague dawley rats were subjected to transient focal cerebral ischemia/reperfusion model in rats. The rats were randomly divided into Sham group ($n = 8$), ischemic reperfusion group (I/R) ($n = 8$), sulforaphen group ($n = 8$). SFN was injected intraperitoneally 15 minutes after ischemic reperfusion group. Rats in Sham-operated group (Sham) received equal volume PBS. Rats in I/R group received equal volume PBS after ischemic reperfusion. Rats in sulforaphen group received SFN at 5mg/kg after ischemic reperfusion. Infarct volume was measured by TTC staining and morphologic changes were observed by HE. Rats were sacrificed at 24 h after ischemic reperfusion. The contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院、育英儿童医院急诊科(曾潍贤、陈大庆、龚裕强、孙来芳),检验科(邢超)

通讯作者:陈大庆,电子信箱:cdq1965@126.com

(ELISA) and the expression of HO-1 in the brain tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with the ischemic reperfusion group, the contents of MDA in brain tissue were decreased in the SFN group in rats ($P < 0.05$). SFN reduced neuronal loss, injury, and infarct volume (0.30 ± 0.02 vs 0.48 ± 0.04) ($P < 0.05$). And also, SFN upregulated SOD and HO-1 in I/R-affected brain tissue compared with those of the ischemic reperfusion group (0.67 ± 0.042 vs 0.56 ± 0.032) ($P < 0.05$). **Conclusion** SFN reduced focal cerebral infarct volume caused by ischemia/reperfusion. This neuroprotection is mediated by up-regulating HO-1 expression and decreasing the level of MDA.

Key words Sulforaphane; Ischemia/reperfusion; Neuroprotection; Oxidative stress; Heme oxygenase

短暂性的局灶性脑缺血经过积极治疗后恢复血液供应,然而脑缺血再灌注导致继发性或更为严重的脑损伤,因此,防治迟发的脑缺血再灌注损伤是目前神经学领域的研究热点。其中氧化应激在损伤机制中发挥着重要的作用,寻找一个有效抗氧化剂预防和延缓脑缺血再灌注损伤这些致命的并发症的发生和发展具有重要意义。近年来,发现萝卜硫素(sulforaphen, SFN)是一种由葡萄糖莱服子苷经黑芥子硫酸苷酶酶解(u-myrosinase)或酸水解后产生的异硫代氰酸盐衍生物,研究表明 SFN 作为一种间接的抗氧化剂,能够诱导抗氧化酶的产生,从而发挥去毒性、抗氧化和抗炎的作用^[1]。但有关 SFN 与缺血性卒中疾病的研究,少有报道。SFN 是否能预防局灶性脑缺血再灌注损伤的发展,有待于进一步探索和研究。

材料与方法

1. 材料:萝卜硫素(LKT Laboratorie S 公司)。兔抗鼠 HO-1,羊抗鼠 β -actin(Santa Cruz 公司),TTC 染色剂(Sigma 公司)。Imagepro-plus 6 软件(Imaging 公司)。大鼠丙二醛(MDA)Elisa 试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)Elisa 试剂盒(上海凯博生物提供)。Trizol(Gibco-BRL 公司)。

2. 方法:(1)实验动物:SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重 200~250g,6~8 周龄。由温州医学院动物实验中心提供,温度 25℃ 左右饲养。(2)模型复制:①缺血再灌注组(ischemic-reperfusion group, I/R 组):参照 Zacharek 等^[2]制作缺血再灌注模型;②假手术组(Sham 组):其余操作同 I/R 组,不插入线栓线;③萝卜硫素组(SFN 组):参考国外文献^[3]萝卜硫素佳用药剂(5mg/kg)干预。为避免低温对脑组织缺血再灌注产生的影响,各组大鼠术后用烤灯照射,保持直肠温度(37℃)左右,至大鼠清醒。

3. 脑标本制备:(1)模型组:SD 大鼠麻醉后,于颈部正中切开皮肤,游离出左侧颈总、颈内、颈外动脉,于近心端结扎颈外、颈总动脉后,夹闭颈内动脉。将线栓插入颈总动脉,2h 后拉出栓线实现再灌注,再灌注 24h 后,每组随机抽取 4 只大鼠,麻醉后开胸,将导管经左心室插入主动脉,生理盐水快速冲洗、灌注,并固定 2h,断头取脑,视交叉前后行冠状切片,置于 4% 甲醛固定,以及石蜡固定,HE 染色观察脑组织学变化。另随机抽取 4 只大鼠,再灌注干预 24h 后断头取脑,分成 5 等份冠状脑片置于 2% TTC 溶液中(37℃ 水浴 20min),观察脑

组织颜色。取左侧半球脑组织,并保存于 -70℃ 冰箱中备用(左侧缺血组织),以便检测各项指标。Imagepro-plus 6.0 软件图像进行分析处理,计算脑梗死体积百分比。患脑水肿的影响,矫正梗死体积百分比(%) = 矫正梗死体积/左侧脑体积 $\times$ 100%^[4]。(2)动物模型标准:①疼痛刺激后右侧肢体反应迟钝或甚至消失;②提尾悬拉后右上肢蜷缩屈曲;③向右侧转圈或跌倒;④出现右侧霍纳(Horner)综合征:右侧眼裂变小。

4. 丙二醛(MDA)的测定:每组取 4 只小鼠取脑组织进行匀浆上样。严格按照上海凯博生物公司提示的 Elisa 试剂盒说明进行操作,测定吸光度 A(OD 值),计算方法:MDA (nmol/ml) = (测定管 A - 标准空白管 A)/(标准管 A - 标准空白管 A) $\times$ 10nmol/ml。

5. SOD 活性测定:每组取 4 只小鼠取脑组织进行匀浆上样。严格按照上海凯博生物公司提示的 Elisa 试剂盒说明进行操作。测定吸光度 A(OD 值),计算方法:SOD 活力 (mmol/mg) = [(对照管 A - 测定管 A)/对照管 A] $\times$ (总体积/上样体积)/样本蛋白浓度 (mmol/mg)。

6. 组织蛋白质提取以及 Western blot 法检测蛋白表达:将脑组织剪碎匀浆,加入裂解液提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,匀浆液与等体积 5 $\times$ 上样缓冲液混合以 4:1 的比例混合与预染的蛋白 Marker 均于加热 5min 变性,冰上骤冷,于聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂牛奶封闭 60min, TBST 洗膜,加入 5% 牛血清白蛋白稀释的 HO-1 兔抗大鼠多克隆抗体(1:500) 4℃ 摇床过夜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗(1:1000),室温摇床 2h,同时加入 β -actin(1:2000),室温摇床 2h,洗膜,予增强发光检测试剂(试剂 A:试剂 B = 1:1)反应发光,曝光,显影,定影。Gel pro 凝胶软件分析系统分析 HO-1 蛋白和内参 β -actin 累积光密度值。

7. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件行统计学分析,结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析(ANOVA)进行方差齐性检验,方差齐时,用 t 检验作两两比较,当方差不齐时,采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

结 果

1. 脑组织 TTC 染色:正常组织经染色后呈红色,缺血组织呈白色。利用图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 软件测定脑梗死面积和脑梗死体积,结果显示:SFN 组(图 1C)梗死区范围较 I/R 组(图 1B)变小。以脑梗死区体积/全部脑体积的百分表示, I/R

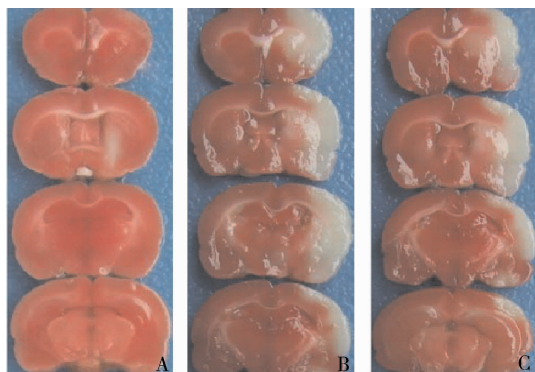
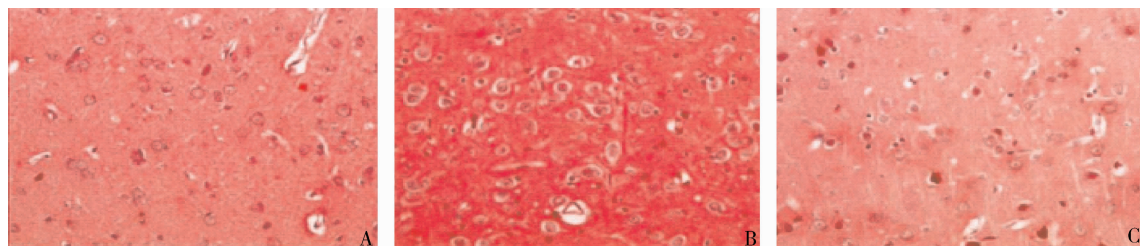


图1 脑组织 TTC 染色

A. Sham 组; B. I/R 组; C. SFN 组

图2 脑组织 HE 染色 (HE, $\times 200$)

A. Sham 组; B. I/R 组; C. SFN 组

3. SFN 干预后可上调超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和血红素氧合酶 (HO-1), 减少丙二醛 (MDA) 的含量: (1) MDA 的含量/水平在 Sham 组为 $1.2 \pm 0.4 \text{ nmol/mg 蛋白}$, 在 I/R 组增加至 $4.65 \pm 0.56 \text{ nmol/mg 蛋白}$, 与 I/R 组比较, 经过 SFN 干预后 MDA 下调至 $2.34 \pm 0.97 \text{ nmol/mg 蛋白}$ ($P = 0.023$)。 (2) Sham 组 SOD 为 $121.04 \pm 9.11 \text{ mmol/mg}$, 在 I/R 组降低至 $50.33 \pm 7.64 \text{ mmol/mg}$, 与 I/R 组比较, 而经过 SFN 干预后 SOD 上调至 $88.65 \pm 11.50 \text{ mmol/mg}$ ($P = 0.012$)。 (3) Sham 组 HO-1 的含量为 0.340 ± 0.047 , I/R 组进一步升高为 0.560 ± 0.032 , 与 I/R 组比较, SFN 干预后上调至 0.670 ± 0.042 ($P = 0.023$) (图 3)。

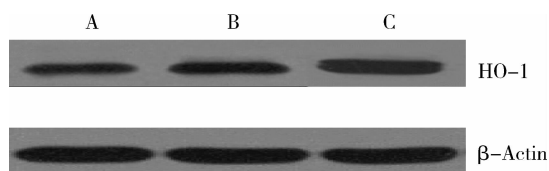


图3 各组血红素氧合酶-1 蛋白含量

A. Sham 组; B. I/R 组; C. SFN 组

讨 论

缺血性脑血管病是世界上仅次于心脏病和癌症

组为 $43.0\% \pm 3.1\%$, SFN 处理组为 $26.0\% \pm 1.83\%$, SFN 组较 I/R 组显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2. 脑组织 HE 染色: Sham 组 (图 2A) 大鼠脑组织结构完整, 神经细胞密集。神经元胞质丰富, 淡粉染, 细胞核居中, 核染色清楚, 形态正常; 血管内皮细胞完整, 未见出血和红细胞嵌塞, 管周组织致密。I/R 组 (图 2B) 大鼠脑病灶部位间质疏松呈筛状, 着色明显变浅, 可见神经元排列散乱, 大量细胞变性坏死, 细胞核染色不清, 核固缩深染, 部分胞体皱缩, 神经元脱失明显, 胶质细胞增生明显; 血管管周间隙增大。SFN 组 (图 2C) 与 I/R 组相比, 完整可辨的神经细胞数量明显增多。

的第 3 位致死原因和首位的致残因素。目前可通过溶栓恢复缺血性卒中脑组织血液供应, 挽救缺血半暗带、维持神经元存活及活性实现, 但脑缺血再灌注导致继发性或更为严重脑损伤, 寻找一个有效抗氧化剂预防和延缓脑缺血再灌注损伤这些致命的并发症的发生和发展具有重要意义。

萝卜硫素是一种有机硫复合物, 从十字花科植物中获得, 在实验模型中显示出具有抗氧化、抗肿瘤等生物学特性。体外实验已证实该化合物是 Nrf2 重要的激活剂, 能够诱发 Nrf2 活化转位入核, 与 ARE 结合, 正向调控 II 相解毒酶的表达, 清除自由基, 但是对于局灶性脑缺血再灌注损伤的研究少有报道^[5]。实验发现大鼠左侧中动脉缺血/再灌注后, 导致右侧肢体肌无力, 运动时向右侧打圈, 甚至昏迷等, 说明模型复制成功。实验中采用腹腔注射 SFN 处理后局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积下降, 提示脑损伤减轻, 据此推测 SFN 具有脑保护作用。

氧化应激学说是脑缺血再灌注损伤重要的病理损伤机制之一, 在氧化应激状态下, 脑组织中过量的自由基会引发脂质过氧化瀑布效应, 导致脑损伤及神经功能缺损^[6]。已公认 MDA 可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接反应细胞损伤的程度, SOD 是体内

唯一的氧自由基清除剂^[7]。研究表明,MDA 含量和 SOD 活性在脑缺血再灌注损伤过程中可以反映组织氧化损伤和应激反应的程度^[8]。血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)是一种蛋白酶,有 3 种同工酶,分别为 HO-1、HO-2 和 HO-3。其中 HO-1(heme oxygenase-1, HO-1)是较强的自由基清除剂,分子质量为 32kDa,经各种应激因素包括氧化应激等可以诱导其生成。已证实 HO-1 通过加速 Hb 代谢,增强内皮细胞抗氧化损伤的能力,其高表达具有神经保护作用^[9,10]。因此,通过测定 SOD、MDA 的含量和 HO-1 酶活性可反映脑缺血再灌注损伤时氧化和抗氧化的程度。

实验 HE 染色结果显示,大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后组,脑病灶部位间质疏松呈筛状,着色明显变浅,可见神经元排列散乱,大量细胞变性坏死,细胞核染色不清,核固缩深染,部分胞体皱缩,神经元脱失明显,胶质细胞增生明显,且缺血再灌注组 MDA 显著升高($P < 0.05$),SOD 活性显著降低($P < 0.05$),证实大鼠缺血再灌注损伤模型中氧化应激反应增强。经过 SFN 干预后,完整可辨的神经细胞数量明显增加,细胞坏死情况显著减轻,且 MDA 下调($P < 0.05$),说明萝卜硫素可能减少 MDA 的含量起到脑保护的作用。

研究还发现超氧化物歧化酶(SOD)在缺血/再灌注组降低,而经过 SFN 干预后 SOD 上调(与缺血组比较, $P < 0.05$)。这一结果提示萝卜硫素处理后有助于恢复 SOD 活性。蛋白印迹术提示缺血再灌注组 HO-1 较假手术组显著升高($P < 0.05$),表明经再灌注损伤后 HO-1 表达升高;提示 HO-1 在脑细胞对抗氧化应激反应中起着重要作用^[11]。SFN 干预后 HO-1 较缺血再灌注组显著升高($P < 0.05$),表明萝卜硫素处理可以诱导 HO-1 表达进一步升高,同时光镜下完整可辨的神经细胞数量明显增加,MDA 含量降低,超氧化物歧化酶(SOD)活性增强。因此,推测 SFN 可能通过部分上调大鼠脑 HO-1、SOD 的表达,抑制 MDA 生成,从而抑制脑缺血再灌注后导致氧化应激反应。

综上所述,因此作者推测 SFN 可能是一种抗氧化剂,能够有效的应用到临床预防局灶性脑缺血再灌注损伤的发展,实现对大鼠脑缺血再灌注损伤产生神经

保护作用。在临床上以及动物实验中有大量的实验研究已经证实 SFN 在对心脏等重要脏器的缺血再灌注损伤过程中均有保护作用。然而有关 SFN 与缺血性卒中疾病的研究,少有报道。所以,随着对 SFN 对神经保护机制的进一步的深入研究,SFN 将会有更加广阔的临床应用前景。

参考文献

- Masutani H, Otsuki R, Yamaguchi Y, *et al.* Fragrant unsaturated aldehydes elicit activation of the Keap1/Nrf2 system leading to the up-regulation of thioredoxin expression and protection against oxidative stress[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(5): 949 - 962
- Zacharek A, Shehadah A, Chen J, *et al.* Comparison of bone marrow stromal cells derived from stroke and normal rats for stroke treatment[J]. *Stroke*, 2010, 41(3): 524 - 530
- Zanichelli F, Capasso S, Cipollaro M, *et al.* Dose - dependent effects of R - sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anticancer drug doses, it has a cytotoxic effect[J]. *Age (Dordr)*, 2012, 34(2): 281 - 293
- Belayev L, Khoutorova L, Deisher TA, *et al.* Neuroprotective effect of SolCD39 a novel platelet aggregation inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 2003, 34(3): 758 - 763
- Oh CJ, Kim JY, Min AK. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF - E2 - related factor 2 - mediated inhibition of transforming growth factor - β /Smad signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(3): 671 - 682
- Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain[J]. *ARS*, 2011, 14(8): 1535 - 1550
- Pato ková J, Marhol P, Tmová E, *et al.* Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol [J]*. *Res*, 2003, 52(1): 131 - 135
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2006, 443(1): 787 - 795
- Erdmann K, Cheung BW, Immenschuh S, *et al.* Heme oxygenase - 1 is a novel target and antioxidantmediator of S - adenosylmethionine[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(4): 937 - 941
- Kusaka N, Sugiu K, Tokunaga K, *et al.* Enhanced brain angiogenesis in chronic cerebral hypoperfusion after administration of plasmid human vascular endothelial growth factor in combination with indirect vasoreconstructive surgery[J]. *J Neurosurg*, 2005, 103(5): 882 - 890
- Tsuchihashi S, Zhai Y, Bo Q, *et al.* Heme oxygenase - 1 mediated cytoprotection against liver ischemia andreperfusion injury: inhibition of type - 1 interferon signaling[J]. *Transplantation*, 2007, 83(12): 1628 - 1634.

(收稿日期:2013 - 04 - 30)

(修回日期:2013 - 05 - 07)