

虾青素对小鼠蛛网膜下腔出血早期脑损伤的保护机制的研究

钱宇¹, 孙晖², 李巧玉¹, 陈波¹, 王俊¹, 于强¹, 陆新宇¹

1. 江苏大学附属人民医院神经外科, 江苏省镇江市 212001

2. 江苏大学附属医院烧伤整形科, 江苏省镇江市 212001

摘要:目的 研究虾青素对小鼠蛛网膜下腔出血(SAH)早期脑损伤的保护机制。方法 ICR 雄性小鼠采用随机数字表随机分为四组:蛛网膜下腔出血组、假手术组、蛛网膜下腔出血+溶剂组(DMSO)、蛛网膜下腔出血+虾青素组。通过建立小鼠视交叉注血方法建立蛛网膜下腔出血模型,于手术后 24 h 记录神经功能评分,并应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的生物素脱氧尿嘧啶核苷酸缺口末端标记法(TUNEL)、western blot 法检测脑组织中的 NOX2 蛋白含量、ELISA 法检测 TNF- α /IL-1 β 水平,干湿法检测脑组织中含水量。结果 与对照组相比,SAH 后小鼠神经功能损伤评分加重,脑水肿加重,脑组织中的 NOX2 蛋白及脑组织中凋亡阳性细胞数也显著增多,TNF- α /IL-1 β 值明显升高;应用虾青素干预以后,小鼠神经功能改善,脑组织凋亡阳性细胞明显减少。同时,虾青素能够降低 SAH 后小鼠脑组织中 NOX2 蛋白,TNF- α /IL-1 β 水平值也明显降低。结论 虾青素对 SAH 后早期脑损伤(EBI)具有保护作用,其作用机制可能与其抗氧化性有关。

关键词:蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;虾青素;氧化应激损伤

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.04.013

Protective mechanism of astaxanthin against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice

QIAN Yu¹, SUN Hui², LI Qiao-Yu¹, CHEN Bo¹, WANG Jun¹, YU Qiang¹, LU Xin-yu¹. 1. Department of Neurosurgery, People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001; 2. Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China

Abstract: **Objective** To study the protective mechanism of astaxanthin against early brain injury (EBI) after subarachnoid hemorrhage (SAH) in mice. **Methods** Male ICR mice were randomly divided into SAH group, sham operation group, SAH + vehicle (DMSO) group, and SAH + astaxanthin group. A SAH model was established by injecting fresh blood into the prechiasmatic cistern. At 24 hours after surgery, neurological function was scored; the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling method and Western blot were used to measure the content of NOX2 protein in brain tissue; enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the level of TNF- α /IL-1 β ; the water content in brain tissue was evaluated by the wet-dry weight method. **Results** Compared with the control group, the SAH group had a higher score for neurological impairment, more severe cerebral edema, a significantly higher level of NOX2 protein and a significantly larger number of apoptosis-positive cells in brain tissue, and a significantly higher level of TNF- α /IL-1 β . In mice treated with astaxanthin, neurological function was improved, and the apoptosis-positive cells in brain tissue were significantly reduced. At the same time, astaxanthin reduced the level of NOX2 protein in brain tissue and the level of TNF- α /IL-1 β after SAH. **Conclusions** Astaxanthin has a protective effect against EBI after SAH, probably by its antioxidant capacity.

Key words: Subarachnoid hemorrhage; Early brain injury; Astaxanthin; Oxidative stress injury

基金项目:江苏省六大高峰人才项目(WSN-123);镇江市社会发展项目(SH2016042)

收稿日期:2019-05-09;修回日期:2019-06-24

作者简介:钱宇(1988-),男,硕士,主治医师,主要从事脑血管病的诊治及基础研究。

通信作者:陆新宇(1973-),男,博士,主任医师,主要从事脑血管病的外科及介入治疗。E-mail:lxys@163.com。

目前国际卒中学术界已经逐渐接受了早期脑损伤 (Early brain injury, EBI) 是蛛网膜下腔出血 (Subarachnoid hemorrhage, SAH) 致死致残的主要原因^[1, 2]。SAH 后早期脑损伤是一个包含炎症反应、细胞凋亡、血脑屏障破坏、脑缺血和氧自由基损害等众多机制的复杂病理、生理过程, 其中氧化应激 EBI 发展过程中起到关键作用。在基础研究中, 大量证据表明应用抗氧化剂如氢气、褪黑素、人重组红细胞生成素等都能够显著减轻 SAH 后 EBI, 并改善功能预后^[3, 4]。

近年来研究发现, 虾青素 (Astaxanthin, ATX) 是一种具有巨大潜力的保护药物, 甚至被认为是迄今为止最强的抗氧化剂, ATX 是一种酮式类胡萝卜素, 其广泛存在于海洋生物、藻类、真菌及少数植物中, 动物与人类自身无法合成。有研究结果显示虾青素能够减轻心脑血管疾病的氧化损伤, 缩小梗死范围, 改善灌注, 且无明显不良反应^[5, 6]。但虾青素在蛛网膜下腔出血后的抗氧化应激作用方面的研究报道较少, 我们通过建立小鼠的蛛网膜下腔出血模型, 早期给予虾青素干预治疗, 探讨其在 SAH 的 EBI 的神经保护作用及其抗氧化应激机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本实验研究包括手术和实验动物的使用均符合江苏大学实验动物管理条件, 并取得江苏大学附属人民医院动物实验伦理委员会批准。健康成年的 SPF 级 ICR 雄性小鼠, 体重在 28 ~ 32 g, 采购于江苏大学动物研究中心。小鼠采用随机数字法随机分为四组: 蛛网膜下腔出血组 (SAH)、假手术组 (Sham)、蛛网膜下腔出血组 + 溶剂组 (SAH + Vehicle)、蛛网膜下腔出血组 + 虾青素组 (SAH + ATX)。其中虾青素 (ATX) 购自 sigma 公司 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), ATX (50 mg/kg, 稀释溶于 DMSO) 于蛛血造模前 30 分钟开始腹腔注射^[7]。

1.2 方法

1.2.1 蛛网膜下腔出血模型制备及获取标本 采用 Sabri 及李桃等的小鼠视交叉注血方法建立蛛网膜下腔出血模型^[8, 9], 术后 1、24 小时, 小鼠经水合氯醛 5 ml/kg 腹腔注射麻醉, 固定于木板上, 开胸并迅速向左心室置入输液针, 剪开右心耳, 用输液

器灌注生理盐水, 待右心房流出液为清亮及肝脏、肺脏颜色发白后停止灌注。后迅速断头取脑, 小心剥离出脑组织, 选取大脑半球为标本并迅速置于液氮中保存备用。

1.2.2 western blot 检测 在盐水灌注后迅速取出大鼠的脑样品, 并在 0.9% 生理盐水 (4℃) 中冲洗以洗去血液和血液凝块。然后将组织在液氮中冷冻用于分子生物学实验。实验时将冷冻样品在 20 mM Tris (pH 7.6) 中匀浆, 提取总蛋白, 蛋白定量, 转膜, 脱脂, 加入兔抗鼠 NOX2 一抗 (abcom 公司, 英国, ab80508, 1:500), 在 4℃ 过夜, 次日 TBST 洗脱, 加入羊抗兔二抗 IgG (abcom, 英国, ab205718, 1:5000), 孵育 1 h 后, TBST 洗脱, 化学发光法显色, 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国) 进行图像分析, 应用 β -肌动蛋白 (β -Actin) 作为内参。

1.2.3 TUNEL 检测 根据制造商的说明, 使用原位细胞凋亡检测试剂盒 (Roche, 瑞士, 11684809910) 通过 TUNEL 染色检测神经细胞的凋亡。将脑组织切片, 脱蜡, 水合并用柠檬酸-柠檬酸钠溶液修复 10 分钟。制备 TUNEL 反应溶液 (酶溶液: 标记溶液 = 1:9) 用于 TUNEL 检测。将每个切片与 50 μ l TUNEL 反应溶液在 37℃ 温育 60 分钟, 并在室温下用山羊血清封闭 30 分钟。将切片在 4℃ 下与针对神经元细胞核抗原 (NeuN) 的一抗孵育过夜。接着, 加入二抗在室温下孵育切片 1 小时, 在加入荧光猝灭剂之前对核复染剂进行 DAPI 染色, 最后在高倍放大光学显微镜下观察细胞凋亡。

1.2.4 脑水肿检测 在神经评分试验后, 通过腹腔内注射戊巴比妥钠 (200 mg/kg) 处死各组大鼠取出脑组织, 滤纸吸尽表面血渍, 并置于早已烤干并称量的锡纸上, 电子天平称取重量 (湿重)。然后置标本于 80℃ 烘箱中烘干 72 小时并再次称重 (干重)。脑水含量通过使用下式表示为百分比: $[(\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重}] \times 100\%$ 。

1.2.5 神经功能严重程度评分 参照 Garcia、陈平帆等^[10, 11]评分方法, 总分最高 18 分, 最低 3 分, 包括自发运动、运动对称性、提尾时双前肢对称性、攀爬能力、触须反应、惊吓反应等六方面。每个测试项目依据小鼠能力予以不同的分数 (0 ~ 3 分)。具体标准如下:

表 1 神经功能评分		
项目	表现	评分
自主活动	正常	3
	轻度影响	2
	重度影响	1
捉住鼠尾悬空时四肢活动对称性情况	无活动	0
	对称	3
	不对称	2
捉住鼠尾放置桌面边缘观察前爪伸展	偏瘫	1
	对称	3
	轻度不对称	2
攀爬和抓持铁笼的能力	显著不对称	1
	偏瘫	0
	攀爬容易、抓持有力	3
身体感觉反应	一侧损害表现	2
	不能攀爬或只能转圈	1
	对侧对称	3
	一侧反应迟钝	2
	一侧无反应	1

1.2.6 ELISA 法检测 TNF- α /IL-1 β 水平 采用相应炎症因子 ELISA 检测试剂盒 (南京建成, H052/H002), 按试剂盒说明书检测炎症因子释放量。

1.2.7 统计学分析 实验数据采用均数 \pm 标准差表示, 用 GraphPad Prism 8.0 进行数据统计, 组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验, 检验数据方差不齐则采用近似 F 检验 Welch 法进行比较。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

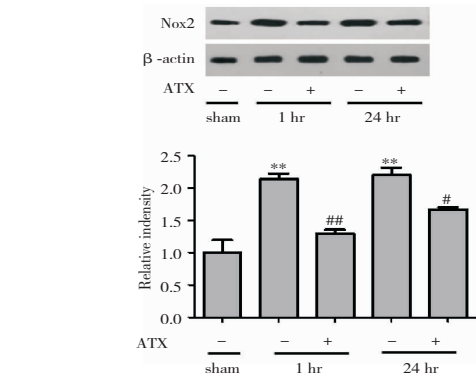
2 结果

2.1 虾青素抑制蛛网膜下腔出血后 NOX2 的表达

既往文献已证实在急性脑损伤后小鼠脑组织中 NOX2 表达呈双峰型^[12], 在 SAH 后 1 小时、24 小时最高。故本实验利用 Western blot 法检测 ATX 对蛛血后 NOX2 高峰期的作用来说明 ATX 对机体伤后氧化应激的影响。小鼠造模前腹腔注射 ATX (50mg/kg), 取 SAH 后 1 小时和 24 小时大脑皮层提取蛋白标本行 Western blot 检查。结果显示 NOX2 在 SAH 后 1 小时及 24 小时后均显著上升 ($P < 0.01$), 注射 ATX 后, 小鼠大脑皮层的 NOX2 明显下降 ($P < 0.05$) (图 1)。

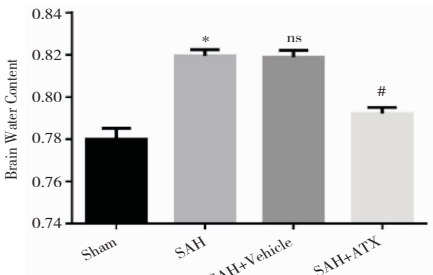
2.2 虾青素改善蛛网膜下腔出血后的脑水肿

在正常状态下, 脑组织中含水量在正常范围内, 提示无明显脑水肿。而各组小鼠处理后 24 h, SAH 组脑组织含水量较假手术组明显增加 ($P < 0.05$), 溶剂组与 SAH 组之间无统计学差异, 但虾青素给药组较 SAH 组脑组织含水量明显下降 ($P < 0.05$) (图 2)。



($n = 5$, ** $P < 0.01$ 蛛血 1 h 与 24 h 未给药组对比假手术组; # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 蛛血 1 h 与 24 h 给药组对比各自时间点未给药组)

图 1 ATX 对小鼠 SAH 后 NOX2 表达的影响

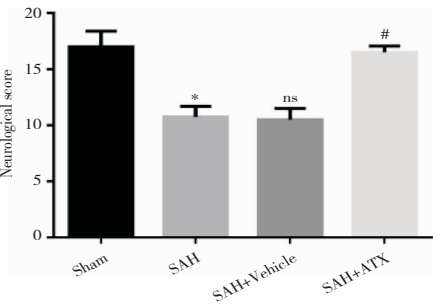


($n = 5$, * $P < 0.05$ 蛛血组对比假手术组; # $P < 0.05$ 蛛血 + 虾青素组对比蛛血 + 溶剂组)

图 2 AXT 对小鼠 SAH 后脑含水量的影响

2.3 虾青素提高小鼠蛛网膜下腔出血后神经功能评分

应用 SAH 后 24 小时的神经功能评分的改变来评估 ATX 对小鼠神经功能的保护。结果示小鼠处理后 24 h, SAH 组小鼠活动评分较假手术组显著降低 ($P < 0.01$), 溶剂组与 SAH 组之间无统计学差异, 而虾青素给药组较 SAH 组的神经功能评分则明显提高 ($P < 0.05$) (图 3)。

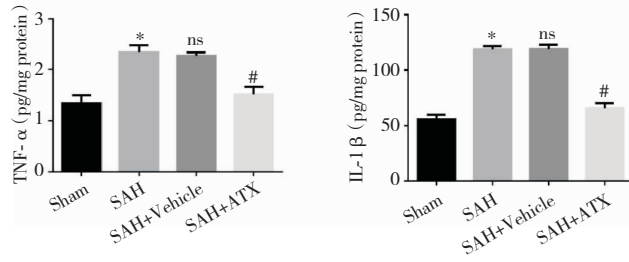


($n = 5$, * $P < 0.01$ 蛛血组对比假手术组; # $P < 0.01$ 蛛血 + 虾青素组对比蛛血 + 溶剂组)

图 3 ATX 对小鼠 SAH 后神经功能评分的影响

2.4 虾青素减少小鼠蛛网膜下腔出血后 TNF- α /IL-1 β 水平

小鼠 SAH 后 24 h, SAH 组 TNF- α 和 IL-1 β 的表达较假手术组均明显增加 ($P < 0.01$), 溶剂组与假手术组之间无统计学差异 ($P > 0.05$), 而虾青素给药组 TNF- α 和 IL-1 β 的表达较 SAH 组明显下降 ($P < 0.01$) (图 4)。



($n = 5$, * $P < 0.01$, 蛛血组对比假手术组; # $P < 0.01$, 蛛血 + 虾青素组对比蛛血 + 溶剂组), A: ATX 对小鼠 SAH 后 TNF- α 表达的影响; B: ATX 对小鼠 SAH 后 IL-1 β 表达的影响

图 4

2.5 虾青素减少小鼠蛛网膜下腔出血后的细胞凋亡

小鼠 SAH 后 24 h, TUNEL 染色示 SAH 组阳性细胞较假手术组明显增加, 溶剂组与 SAH 组差别不大, ATX 给药组则凋亡细胞明显减少, 提示 ATX 能减少蛛血后引起的神经元细胞大量凋亡 (图 5)。

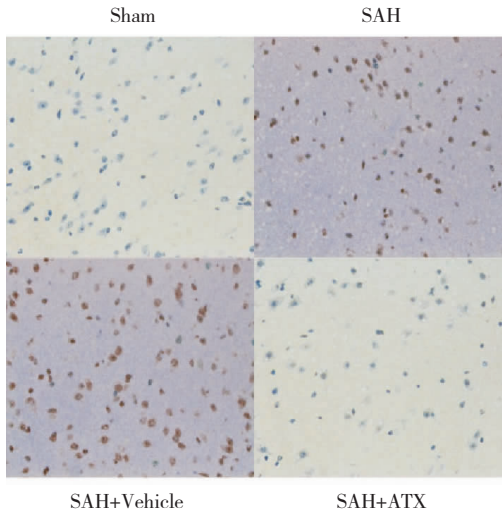


图 5 ATX 对小鼠 SAH 后神经细胞凋亡的影响

3 讨论

本实验结果显示, 蛛网膜下腔出血后 NOX2 表达明显增加, 出血后小鼠的脑水肿加剧, 神经功能

缺失、炎症因子 TNF/IL-1 水平升高, 同时半球的细胞凋亡细胞明显增多。而伤前 30 分钟腹腔注射虾青素后能够明显抑制机体的氧化应激、表现为 NOX2 蛋白表达量明显下降, 同时改善机体的脑水肿和神经功能, 结果提示 NOX2 是伤后氧化应激的主要调节因素, 虾青素能够抑制氧化应激来发挥神经保护作用。

动脉瘤性蛛网膜下腔出血是一个严重的脑血管疾病, 其死亡率高达 50%, 同时在幸存者中约 30% 患者遗有不同程度的残疾。大量的研究表明, 氧化应激在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中起着极其重要的作用, 蛛网膜下腔出血后的自由基来源于线粒体的呼吸障碍及外源性的血红蛋白, 还存在自由基产生酶的上调, 例如诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 黄嘌呤氧化酶, NADPH 氧化酶 (NOX), 以及参与花生四烯酸代谢的酶等。越来越多的证据表明 NADPH 氧化酶 (NOX) 是中枢神经系统活性氧簇 (ROS) 的主要来源^[13, 14]。有实验证实蛛网膜下腔出血后 NOX2 mRNA 和 NOX2 蛋白含量明显增加, 而当 NOX2 表达受抑制时, 可明显减少大鼠的死亡率及提高大鼠的神经功能^[15]。Zhang 团队在大鼠的蛛血标本中发现出血后 12 小时 NOX2 蛋白即达到高峰, 同时发现在发生蛛网膜下腔出血患者的脑组织标本中神经元细胞及星形细胞中同样有大量的 NOX2 染色, 而运用 NOX2 蛋白的抑制剂则能明显减少细胞的凋亡及提高大鼠的功能评分^[16]。我们的研究进一步证实了 NOX2 的活化是蛛网膜下腔出血早期脑损伤的关键因素, 而抑制 NOX2 的活化可以抑制蛛网膜下腔出血的神经功能缺失。

本实验中我们发现蛛网膜下腔出血后, NOX2 蛋白明显升高, 神经功能受损, 同时伴有神经细胞凋亡数明显增加。而应用虾青素能明显减轻 NOX2 蛋白表达, 减轻脑水肿及改善神经功能, 这也与国外的类似的研究相一致。Wang 等在大鼠的蛛网下腔出血模型中, 在出血后 3 小时鼻饲虾青素 (75 mg/kg), 出血 24 小时后观察至虾青素可减轻 SAH 诱导的脑血管痉挛并减少神经细胞凋亡, 同时虾青素能抑制前额叶皮质中线粒体相关的神经元凋亡, 增加线粒体的跨膜电位, Bax / Bcl-2 比率降低, 细胞质中细胞色素 C 释放受抑制, caspase-3 酶活性受到抑制^[17]。而在另一项在对大鼠的蛛网膜下腔出血的研究时, 发现伤口大鼠皮层神经元细胞中 Nrf2 及 HO-1 增加, 而伤后 30 分钟后侧脑室注

射虾青素后大鼠皮层神经元细胞中 Nrf2 及 HO-1 进一步明显增加,同时伴有脑水肿的改善及神经功能评分的增加^[18]。在 MPP⁺ 损伤 P12 细胞的帕金森病的模型中,有关研究观察到 MPP⁺ 损伤后细胞后,细胞内 NOX2 及 HO-1 mRNA 及蛋白明显增加,而虾青素 + MPP⁺ 组与对照组及 MPP⁺ 组相比,HO-1 明显升高,而 NOX2 值降低,研究者推测虾青素可能通过 HO-1/NOX2 轴发挥其抗氧化应激作用^[19]。

本组的研究尚有些不足之处,有待于后期的实验加以改进。首先,我们的研究中每组的实验动物数目偏少($n=5$),这个可能会影响统计学结果,尤其在蛛网膜下腔出血模型的异质性明显时。其次我们的研究比较粗糙,只是仅仅反映了一个虾青素与 NOX2 两个指标现象的联系,而不是真正揭示了两者的因果关系,未来可能使用 NOX2 敲基因小鼠或 NOX2 蛋白直接的抑制剂来揭示这种因果关系,如虾青素在野生型小鼠有神经保护作用,而在 NOX2 敲基因小鼠丧失了这种保护作用。这些缺陷也指引了我们未来进一步的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Serrone JC, Maekawa H, Tjahjadi M, et al. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: pathobiology, current treatment and future directions [J]. Expert Rev Neurother, 2015, 15 (4):367-380.
- [2] 李雪莹. 内皮型一氧化氮合酶与蛛网膜下腔出血的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018, 45 (4):418-422.
- [3] Nishizawa S. The roles of early brain injury in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: from clinical and scientific aspects [J]. Acta Neurochir Suppl, 2013, 115: 207-211.
- [4] Wang Z, Ma C, Meng CJ, et al. Melatonin activates the Nrf2-ARE pathway when it protects against early brain injury in a subarachnoid hemorrhage model [J]. J Pineal Res, 2012, 53 (2):129-137.
- [5] Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease [J]. Molecules, 2012, 17 (2): 2030-2048.
- [6] Farruggia C, Kim MB, Bae M, et al. Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners [J]. J Nutr Biochem, 2018, 62:202-209.
- [7] Zhang XS, Zhang X, Zhang QR, et al. Astaxanthin reduces

matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Brain Res, 2015, 1624:113-124.

- [8] Sabri M, Jeon H, Ai J, et al. Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage [J]. Brain Res, 2009, 1295:179-185.
- [9] 李桃,王汉东,丁宇,等. Nrf2 基因敲除对小鼠蛛网膜下腔出血后脑损伤的作用 [J]. 医学研究生学报, 2014, 27 (11):1128-1132.
- [10] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation [J]. Stroke, 1995, 26 (4):627-634, 635.
- [11] 陈凡帆,全伟,吕建平. 小鼠蛛网膜下腔出血模型中出血量评分与神经功能评分的量化关系分析 [J]. 中华神经医学杂志, 2012, 11 (1):27-30.
- [12] Lu XY, Wang HD, Xu JG, et al. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcome in experimental traumatic brain injury [J]. Neurochemistry International, 2014, 69: 14-19.
- [13] Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, et al. Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2010, 7:41-52.
- [14] Kandasamy R, Pal HK, Swamy M. Cerebrospinal Fluid Nitric Oxide Metabolite Levels as a Biomarker in Severe Traumatic Brain Injury [J]. Int J Neurosci, 2013, 123 (6):385-391.
- [15] Ostrowski RP, Tang J, Zhang JH. Hyperbaric oxygen suppresses NADPH oxidase in a rat subarachnoid hemorrhage model [J]. Stroke, 2006, 37 (5):1314-1318.
- [16] Zhang L, Li Z, Feng D, et al. Involvement of Nox2 and Nox4 NADPH oxidases in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Free Radic Res, 2017, 51 (3):316-328.
- [17] Wang Y, Liu Y, Li Y, et al. Protective effects of astaxanthin on subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury: Reduction of cerebral vasospasm and improvement of neuron survival and mitochondrial function [J]. Acta Histochem, 2019, 121 (1):56-63.
- [18] Wu Q, Zhang XS, Wang HD, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury [J]. Mar Drugs, 2014, 12 (12):6125-6141.
- [19] Ye Q, Huang B, Zhang X, et al. Astaxanthin protects against MPP(+) -induced oxidative stress in PC12 cells via the HO-1/NOX2 axis [J]. BMC Neurosci, 2012, 13 (1): 156.