

白藜芦醇对蛛网膜下腔出血后神经炎症的作用和机制研究

杨婧, 郭永, 陈恬璐, 党丹*

西安第四医院重症医学科, 陕西省西安市 710004

摘要: **目的** 研究白藜芦醇对蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后血肿区脑组织神经炎症的作用和机制。**方法** 将48只成年雄性SD大鼠随机分为三组:假手术组, SAH组和SAH+白藜芦醇处理组, 每组16只。采用枕大池两次注血法构建SAH模型。SAH组和SAH+白藜芦醇组在构建模型前15 min和构建模型后5 min分别给予生理盐水或白藜芦醇各一次。于构建模型后72小时利用NSS评分评估大鼠的神经功能, 然后处死大鼠并获取保存脑组织。利用ELISA检测脑组织内促炎因子IL-1, IL-6、TNF- α 和抗炎因子IL-4, IL-10、TGF- β 的表达水平, 利用RT-PCR检测小胶质细胞M1型特征性基因IL-1 β 、CD32和M2型特征性基因CD206、Arginase-1的表达水平。**结果** 与假手术组相比, SAH组大鼠神经功能下降($P < 0.05$), 脑组织中促炎因子IL-1, IL-6、TNF- α 和抗炎因子IL-4, IL-10、TGF- β 的表达水平升高($P < 0.05$), 小胶质细胞M1型特征性基因IL-1 β 、CD32和M2型特征性基因CD206、Arginase-1的表达水平也升高($P < 0.05$)。与生理盐水处理组相比, 白藜芦醇处理组神经功能损伤程度下降($P < 0.05$), 脑组织中促炎因子IL-1, IL-6、TNF- α 表达水平降低、抗炎因子IL-4, IL-10、TGF- β 的表达水平升高($P < 0.05$), 小胶质细胞M1型特征性基因IL-1 β 、CD32表达水平降低、M2型特征性基因CD206、Arginase-1的表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 白藜芦醇通过促进SAH后小胶质细胞由M1型向M2型转换, 从而减轻了神经炎症和神经功能损伤。

关键词: 白藜芦醇; 蛛网膜下腔出血; 小胶质细胞; 神经炎症

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.06.011

Effects of resveratrol on neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage and the underlying mechanisms

YANG Jing, GUO Yong, CHEN Tian-Lu, DANG Dan*. Department of Critical Care Medicine, the Fourth Hospital of Xi'an, Shanxi 710004

Corresponding Author: Dan Dang, E-mail: dangdan2005@163.com.

Abstract: Objective To investigate the effects of resveratrol on the neuroinflammation of brain tissue around hematoma after subarachnoid hemorrhage (SAH) and the underlying mechanisms. **Methods** Forty-eight adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: sham group, SAH group, and SAH + resveratrol group, with 16 rats in each group. A SAH model was constructed by double injection of blood into the cisterna magna. At 15 min before and 5 min after the model establishment, the SAH and SAH + resveratrol groups were treated with normal saline and resveratrol, respectively. At 72 h after SAH, we evaluated the neurological function of the rats using the neurological severity score, and then sacrificed them to obtain and preserve the brain tissue. ELISA was performed to determine the expression levels of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and TNF- α) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, and TGF- β). RT-PCR was used to measure the mRNA expression of M1 microglia markers (IL-1 β and CD32) and M2 markers (CD206 and Arginase-1). **Results** Compared with the sham group, the SAH group had decreased neurological function ($P < 0.05$), increased expression of the proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and TNF- α) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, and TGF- β) in the brain tissue ($P < 0.05$), and increased mRNA expression of the M1 markers (IL-1 β and CD32) and M2 markers (CD206 and Arginase-1) ($P < 0.05$). Compared with the SAH group, the SAH + resveratrol group showed significant reductions in neurological damage severity, the expression of the proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and TNF- α), and the mRNA expression of the M1 markers (IL-1 β and CD32) ($P < 0.05$), and exhibited increases in the expression of the anti-inflammatory cyto-

收稿日期: 2019-06-09; 修回日期: 2019-11-03

作者简介: 杨婧(1988-), 女, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 神经重症方向。

通信作者: 党丹, 女, 硕士, 主治医师, 从事与脑血管等神经重症疾病相关的基础研究和临床工作。E-mail: dangdan2005@163.com。

kines (IL-4, IL-10, and TGF- β) and the mRNA expression of the M2 markers (CD206 and Arginase-1) ($P < 0.05$). **Conclusions** Resveratrol promotes a switch from M1 to M2 microglial phenotypes after SAH, and thereby alleviates neuroinflammation and neurological injury.

Key words: Resveratrol; Subarachnoid hemorrhage; Microglia; Neuroinflammation

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是指由于血液流入脑和脊髓的蛛网膜与软膜之间的腔隙即蛛网膜下腔而导致的临床综合征^[1]。以往的观点认为 SAH 后血管痉挛是导致脑损伤的罪魁祸首,但以之为靶点的治疗药物在临床上并未取得很好的效果,提示应该还有其他病理生理机制在其中起作用^[2]。近年来神经炎症在 SAH 后脑损伤中发挥的作用愈发受到重视。新近的研究表明神经炎症在 SAH 中发挥重要作用,比如 SAH 患者体内可检测到炎症因子水平升高,以及多种细胞因子如 IL-6、IL-1 和炎症细胞参与到 SAH 后的早期脑损伤、迟发性脑损伤病理机制中等^[3,4]。小胶质细胞在神经炎症反应中扮演重要角色,其活化后产生的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 可以进一步加重神经细胞损伤和神经功能障碍^[5]。根据释放炎症因子种类的不同,活化的小胶质细胞有 M1 和 M2 两种极化状态,M1 型是促炎类型,其特征性表达分子为 IL-1 β 和 CD32,主要产生促炎因子 IL-1、IL-6 和 TNF- α ; M2 型是抑炎类型,其特征性表达分子为 Arginase-1 和 CD206,主要产生抑炎因子 IL-4、IL-10 和 TGF- β ^[6,7]。小胶质细胞的极化状态由 M1 型向 M2 型转换有利于抑制不良病理过程的发展,这给我们的重要启示是:与单纯抑制小胶质细胞的活化相比,抑制 M1 型极化的同时促进 M2 型极化也许是控制神经炎症的有力措施^[8]。新近的研究表明,白藜芦醇可以通过抑制小胶质细胞的活化来减轻神经炎症,并可以调控 M1 型和 M2 型极化状态的转换^[9]。白藜芦醇是否可以通过抑制小胶质细胞 M1 型极化和促进 M2 型极化的方式来减轻 SAH 后神经炎症和神经功能障碍尚不清楚。综合以上文献报道,本研究将结合动物实验和分子生物学实验探讨白藜芦醇是否可以通过抑制小胶质细胞的 M1 型极化和促进 M2 型极化减轻 SAH 后神经炎症和神经功能障碍。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究中 48 只成年雄性 SD 大鼠购自本单位实验动物中心,这些大鼠的周龄为 8~10 周,体重为 250~300 g。大鼠的饲养环境为:温度 21.0 \pm

2 $^{\circ}$ C,湿度 50%~55%,12 小时一循环的白天和黑夜节律,并提供足够的水和食物。这些大鼠被随机分为三组:假手术组,SAH + 生理盐水处理组和 SAH + 白藜芦醇处理组,每组 16 只。本单位实验伦理委员会批准开展此项研究,所有的实验动物操作流程都是按照中国实验动物操作指南开展的。

1.2 实验试剂

实验中所用试剂和购买公司包括:白藜芦醇 (Sigma, USA); 检测 IL-1 β 、CD32 和 CD206、Arginase-1 表达的逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, USA); 检测 IL-1、IL-6、TNF- α 和 IL-4、IL-10、TGF- β 的 ELISA 检测试剂盒 (上海恒远生物, 中国)。

1.3 构建 SAH 模型和实验动物给药

大鼠给予 50 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,采用 Roux 等建立的枕大池二次注血法制作蛛网膜下腔出血大鼠模型^[10]。生理盐水和白藜芦醇的给药方法:在 SAH 前 15 min 和 SAH 后 5 min 各给药一次,给药剂量为 20 mg/kg,给药方式为经尾静脉注入,给药后观察大鼠 10 min 并做记录。

1.4 神经功能评分 (NSS)

在 SAH 构建 3 天后利用 NSS 对各组大鼠进行神经功能评分,以评估大鼠的神经功能损害程度。NSS 评分系统由 10 个独立项目组成,主要评估大鼠的机敏程度、平衡功能和运动功能。如果大鼠缺失一个测试反射或没能成功完成一项任务,得分将增加 1 分。NSS 总分为 0~10,0 代表正常状态,10 代表神经功能损害最严重。

1.5 脑组织取材

在构建 SAH 模型 72 小时并对各组大鼠进行 NSS 评分后,利用脊椎脱臼法处死大鼠,然后立刻取出大鼠大脑,分离获取损伤区脑组织,匀浆后保存于 -80 $^{\circ}$ C 以备后续实验用。

1.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

取适量大鼠损伤脑组织匀浆液,3 000 rpm 离心 10 min 后取上清液。然后利用 ELISA 试剂盒检测促炎因子 IL-1、IL-6、TNF- α 和抗炎因子 IL-4、IL-10、TGF- β 的表达量,具体的操作步骤参照试剂盒说明

进行。为了保证实验结果的准确性,每种炎症因子均检测3次,最后取平均数值作为最终结果。

1.7 实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR)

利用 RT-PCR 检测 M1 型小胶质细胞的特征性表达分子 IL-1 β 、CD32 和 M2 型小胶质细胞的特征性表达分子 Arginase-1、CD206 的表达水平。具体步骤如下:首先利用 TRIzol 试剂并参照说明书提取出损伤脑组织中的总 RNA, RNA 的量是利用 260/280 比值来确定的。每一个标本 1 μ g 的 RNA 被用来逆转录为 cDNA, 每 1 μ l 的 cDNA 被用来做 RT-PCR 检测, 做 RT-PCR 的内参为 β -actin。具体的操作步骤参照各种试剂的说明书进行。每份标本检测3次,最终取平均值作为最终结果。

1.8 统计学分析

研究中所获得数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示,利用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。多组间的总体比较采用单因素方差分析(ANOVA),多组间的两两比较采用 LSD-t 方法。 $P<0.05$ 代表有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇减轻了 SAH 后神经炎症

与假手术组相比,SAH 组促炎因子 IL-1、IL-6、TNF- α 和抗炎因子 IL-4、IL-10、TGF- β 的表达水平均升高;与 SAH 组相比,白藜芦醇处理组的促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低,而抗炎因子 IL-4、IL-10、TGF- β 的表达水平进一步升高。(图1)。

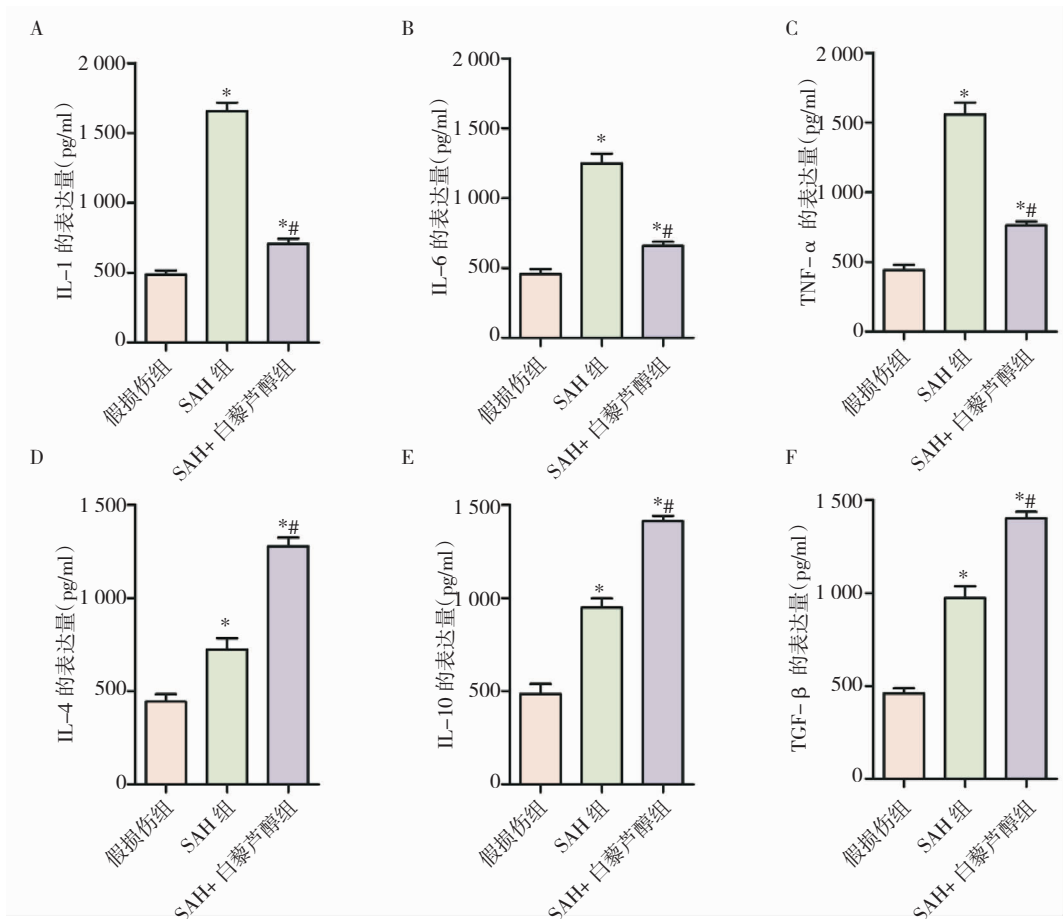


图1 各组促炎因子 IL-1、IL-6、TNF- α 和抗炎因子 IL-4、IL-10、TGF- β 的表达水平。* $P<0.05$ VS 假手术组;# $P<0.05$ VS SAH + 白藜芦醇组。

2.2 白藜芦醇抑制了 SAH 后小胶质细胞 M1 型极化和促进了 M2 型极化

与假手术组相比,SAH 组 M1 型分子 IL-1 β 、

CD32 和 M2 型分子 Arginase-1、CD206 的表达水平均升高;与 SAH 组相比,白藜芦醇处理组的 M1 型分子 IL-1 β 、CD32 表达水平降低,而 M2 型分子 Ar-

ginase-1、CD206 的表达水平进一步升高。(图 2)。

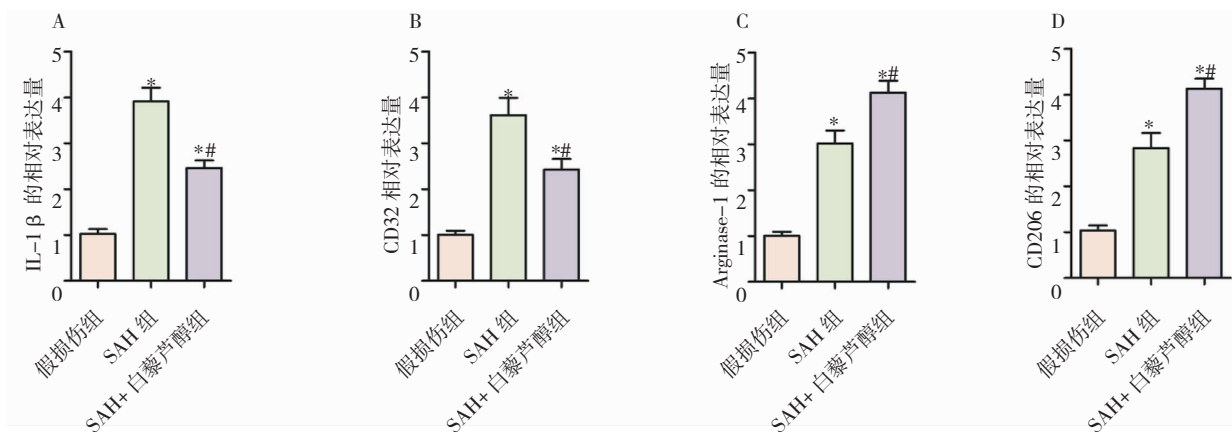


图 2 各组 M1 型分子 IL-1 β 、CD32 和 M2 型分子 Arginase-1、CD206 的表达水平。* $P < 0.05$ VS 假手术组; # $P < 0.05$ VS SAH + 白藜芦醇组。

2.3 白藜芦醇减轻了 SAH 后神经功能障碍

与假手术组相比,SAH 组 NSS 评分升高,提示神经功能有损害;与 SAH 组相比,白藜芦醇处理组 NSS 评分降低,提示神经功能损害程度减轻。(图 3)。

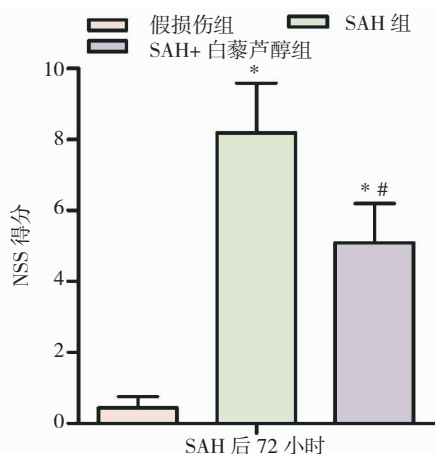


图 3 各组 NSS 得分。* $P < 0.05$ VS 假手术组; # $P < 0.05$ VS SAH + 白藜芦醇组。

3 讨论

本研究通过动物实验和分子生物学实验探讨了白藜芦醇是否可以抑制小胶质细胞的 M1 型极化和促进 M2 型极化,从而进一步减轻 SAH 后神经炎症和神经功能障碍。结果发现:SAH 后大鼠脑组织内小胶质细胞被活化,从而产生了神经炎症反应。利用白藜芦醇处理后,脑组织炎症反应减轻

了,M1 型小胶质细胞向 M2 型转换。这些结果提示:白藜芦醇通过促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转化减轻了 SAH 后神经炎症和神经功能损害。

神经炎症主要包括了胶质细胞的活化和炎症因子的释放,是导致原发性损伤加重和引发二次脑损伤的重要因素^[11]。小胶质细胞在脑缺血后神经炎症的发生、发展中发挥重要作用,其相当于中枢神经系统中的内源性巨噬细胞,它能够感知脑损伤相关事件并做出反应^[12]。小胶质细胞在神经炎症的病理机制中发挥双刃剑的作用,一方面可以极化为 M1 型并产生促炎因子,另一方面可以极化为 M2 型并产生抑炎因子^[13]。M1 型和 M2 型的平衡有利于控制过度的神经炎症和减轻损伤。现有的研究提示,过度的 M1 型极化将会加重神经损伤,并有可能导致脑损伤后神经退行性疾病如阿尔兹海默病或帕金森的发生、发展^[14]。然而,单纯的抑制 M1 型极化似乎并不能够取得预期的减轻神经炎症和神经保护作用。新近的研究发现,抑制 M1 型极化的同时促进 M2 型极化能取得较理想的控制炎症和减轻损伤的理想效果。因此,寻找有效的药物在 SAH 后抑制 M1 型极化和促进 M2 型极化可能是减轻神经炎症和神经损伤的有力策略。近年来,白藜芦醇因为能够发挥抗炎和神经保护作用,并能够通过血脑屏障而逐渐受到研究者的关注^[15]。有研究发现,白藜芦醇能够通过清除自由基、抑制胶质细胞活化和促炎因子的释放而发挥神经保护作用^[9]。还有研究发现白藜芦醇能够促进

抗炎因子 IL-10 的释放,从而发挥抑制炎症反应的作用^[16]。本研究也发现,白藜芦醇能够抑制 SAH 后小胶质细胞 M1 型极化和促进其向 M2 型极化,抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的释放和促进抗炎因子 IL-4、IL-10、TGF- β 的释放,从而发挥减轻神经炎症和神经功能损害的作用。

总之,本研究初步探讨了白藜芦醇通过促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转化减轻 SAH 后神经炎症的作用和机制。这一研究结果为探索减轻 SAH 后神经炎症和神经功能损害新策略提供了理论参考和新思路,具有一定科学研究和临床实践意义。

参 考 文 献

- [1] Rass V, Helbok R. Early brain injury after poor-grade subarachnoid hemorrhage [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(10): 78.
- [2] Naraoka M, Matsuda N, Shimamura N, et al. The role of arterioles and the microcirculation in the development of vasospasm after aneurysmal SAH [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(23): 1-9.
- [3] Schiefecker AJ, Dietmann A, Beer R, et al. Neuroinflammation is associated with brain extracellular tau-protein release after spontaneous subarachnoid hemorrhage [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(12): 1408-1416.
- [4] 钱宇,孙晖,李巧玉,等. 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[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(4): 411-415.
- [5] Doll DN, Barr TL, Simpkins JW, et al. Cytokines: Their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets [J]. *Aging Dis*, 2014, 5(5): 294-306.
- [6] Savage JC, Carrier M, Tremblay Mè. Morphology of microglia across contexts of health and disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2034(335): 13-26.
- [7] 樊丽超,周立春,安春华. 银杏总黄酮对脂多糖诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(5): 477-480.
- [8] Xu Y, Xu Y, Wang Y, et al. Telmisartan prevention of LPS-induced microglia activation involves M2 microglia polarization via CaMKKb-dependent AMPK activation [J]. *Brain Behav. Immun*, 2015, 50(17): 298-313.
- [9] Yang XD, XU SQ, Qian YW. Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization via PGC-1 α in conditions of neuroinflammatory injury [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 64(18): 162-172.
- [10] Roux S, Löffler BM, Gray GA, et al. The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm [J]. *Neurosurgery*, 1995, 37(1): 78-85.
- [11] Xiang Y, Zhao H, Wang J. et al. Inflammatory mechanisms involved in brain injury following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation [J]. *Biomed. Rep*, 2016, 5(1): 11-17.
- [12] Niraula A, Sheridan JF, Godbout JP. et al. Microglia priming with aging and stress [J]. *Neuropsychopharmacology*. 2017, 42(1): 318 -333.
- [13] Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, et al. Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12(488): 1-17.
- [14] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [J]. *F1000 Prime Rep*, 2014, 6(13): 1-13.
- [15] Fu W, Zhuang W, Zhou S, et al. Plant-derived neuroprotective agents in Parkinson's disease [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(7): 1189-1202.
- [16] Cianciulli A, Dragone T, Calvillo R, et al. IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of resveratrol in activated microglia cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 369-376.