

# 白藜芦醇在蛛网膜下腔出血后 缓解氧化应激性损伤

杨 丽, 余 清, 张春兵

(南京中医药大学附属江苏省中医院检验科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 本研究将探寻白藜芦醇(resveratrol, RSV)在蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后的抗氧化作用及相关机制。实验一, 60 只大鼠随机分配到 sham 组和 SAH 各时间点组, 检测 SIRT1、PGC-1 $\alpha$  在各组中蛋白水平的变化。实验二, 100 只大鼠随机分配到 sham 组、SAH 组、SAH+vehicle 组、SAH+RSV 组和 SAH+RSV+EX527 组, 给予 RSV 或同时给予 RSV 和抑制剂 EX527, 检测 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的变化以及对应的氧化应激指标、脑水肿和神经功能评分的变化。结果显示, 实验一, SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  在 SAH 后升高并在 24 h 达到高峰, 较 sham 组明显升高( $p<0.05$ )。实验二, 经 RSV 治疗, SAH 后 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  明显升高, 且对应的氧化应激性损伤和脑水肿较 SAH+vehicle 组明显缓解、神经功能评分明显降低( $p<0.05$ ); 经 EX527 处理后, RSV 在 SAH 后的保护作用明显下调( $p<0.05$ )。结论 RSV 在 SAH 后具有抗氧化作用, 且这种抗氧化效果主要通过激活 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路实现。

[关键词] 蛛网膜下腔出血, 白藜芦醇, 氧化应激, SIRT1, PGC-1 $\alpha$

[中图分类号] R310 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2018)03-0095-07

## Resveratrol Ameliorate Oxidative Stress after Experimental Subarachnoid Hemorrhage

Yang Li, Yu Qing, Zhang Chunbing

(Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** It has been reported that resveratrol(RSV) can ameliorate injury after subarachnoid hemorrhage(SAH). The aim here is to elucidate the antioxidant function of RSV after SAH. In experimental 1, brain SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  protein levels were examined in different groups after SAH induction. In experimental 2, rats were divided into 5 groups: sham group, SAH group, SAH+vehicle group, SAH+RSV group, and SAH+RSV+EX527 group. The SIRT1 activator RSV and specific inhibitor EX527 were respectively administered. Then, Western blot, Immunofluorescence staining, oxidant/antioxidant factors, brain edema, and neurologic scoring were performed. After experimental SAH was induced, the nuclear SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  protein level increased from 6 h to 12 h, with a peak at 24 h, but gradually decreased from 48 h. RSV treatment in SAH rats led to a significant increment of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  protein levels resulting in an enhancement of antioxidant effect when compared with SAH rats without treatment. The antioxidant effect of RSV in SAH rats could be partially abrogated by the SIRT1 inhibitor EX527. These results show that RSV has an antioxidant effect after SAH via the SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway.

**Key words:** subarachnoid hemorrhage, resveratrol, oxidative stress, SIRT1, PGC-1 $\alpha$

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)具有高致死、致残率,是脑卒中的重要原因之一。SAH 损伤早期即可产生氧自由基(oxygen free radicals, ROS)和氧化应激性损伤,并与 SAH 后早期脑损伤(early brain injury, EBI)、血管痉挛、迟发性缺血性神经损伤等病理机制息息相关。SAH 后的抗氧化治疗被认为是有效缓解 SAH 损伤的重要方式<sup>[1]</sup>。

收稿日期:2018-02-28.

通讯联系人:杨丽,主管技师,研究方向:急性脑损伤后药物治疗的相关分子机制研究. E-mail:lovelina\_2008@126.com

白藜芦醇(resveratrol, RSV)被认为是红酒发挥心血管保护功效的主要成分<sup>[2]</sup>, 临床研究证实 RSV 在健康人群中具有较好的耐受性和安全性<sup>[3]</sup>. 在中枢神经系统中 RSV 可发挥多种神经保护作用, 包括抗氧化应激、抗血小板聚集、抗炎症和舒张血管等. RSV 可通过作用于靶点 SIRT1(sirtuin 1, SIRT1)进一步参与下游的生物效应并实现神经保护<sup>[4]</sup>. 有研究报道 SIRT1 可通过去乙酰化作用调控下游抗氧化底物氧化酶体增殖物活化受体协同刺激因子 1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )进一步发挥抗氧化作用; 后者是一种转录协同因子, 可参与调节线粒体功能和脂肪酸氧化反应相关的基因转录<sup>[5]</sup>. 所以, SIRT1/PGC-1 $\alpha$  信号通路被认为是抗氧化的有效调控靶点.

RSV 在 SAH 后是否具有抗氧化作用? RSV 作为 SIRT1 的有效激动剂, 是否可能通过 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  信号通路在 SAH 后发挥抗氧化作用? 本研究将做进一步阐述.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

雄性 SD 大鼠(250 g~300 g)由金陵医院动物中心提供. 无菌饲养在温度、湿度适宜的动物房, 充足的饲料和灭菌水. 每天给予 12 h 光照和 12 h 黑暗环境.

#### 1.1.2 动物模型

10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)深麻醉大鼠, 备皮消毒铺单, 暴露右侧股动脉, 缓慢抽取动脉血 0.3 mL, 结扎股动脉近心端. 俯卧位固定大鼠头部于立体定向仪, 沿中线切开头皮, 以前囟为起始点沿矢状缝向前 7.5 mm 处钻孔, 穿刺针 45°进针(针尖朝向枕部)约 11 mm, 将动脉血缓慢注入后迅速退针并用骨蜡封闭穿刺孔, 缝合腹股沟切口和头皮<sup>[6]</sup>. 假手术组中的大鼠未注入血液, 其余操作步骤和 SAH 组无差异<sup>[7]</sup>.

#### 1.1.3 实验分组和药物处置

实验一: 60 只大鼠随机分配在假手术组、6 h 组、12 h 组、24 h 组、48 h 组和 72 h 组( $n=10$ /组). 实验二: 100 只大鼠随机分配到 sham 组, SAH 组, SAH+vehicle 组, SAH+RSV 组和 SAH+EX527+RSV 组( $n=20$ /组).

SAH 模型建立成功后分别于 30 min、24 h 给予腹腔注射 RSV (60 mg/kg, Sigma, USA)<sup>[8]</sup>; EX527 (10  $\mu$ g, Tocris, UK)溶于溶剂二甲亚砜<sup>[9]</sup>, 深麻醉大鼠, 立体定向仪固定头部, 造模前 30 min 侧脑室注射 5  $\mu$ L EX527(前囟往后 0.8 mm, 左侧 1.5 mm, 深 3.5 mm).

#### 1.1.4 留取标本

实验一大鼠在各自不同的时间点处死; 实验二大鼠在造模后 48 h 处死. 深麻醉大鼠, 逐层暴露心脏, 左心室生理盐水灌注后迅速断颈, 逐层暴露脑组织, 留取颞叶皮层组织待测 Western blot、氧化应激指标, 留取左右半球检测脑水肿指标. 免疫荧光检测的脑组织经生理盐水、多聚甲醛灌注, 完整脑组织浸泡于多聚甲醛, 蔗糖脱水, 冰冻切片切片(7  $\mu$ m)待染色<sup>[7]</sup>.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Western blot 检测

皮层组织加裂解液(碧云天, 南通, 中国), 充分研磨, 12 000 $\times$ g 离心, 留取上清液. 根据蛋白定量的结果, 恒压电泳, 横流转膜, 脱脂牛奶封闭(室温), 一抗过夜(4  $^{\circ}$ C), 抗体稀释比[SIRT1(1:5 000, abcam, USA), PGC-1 $\alpha$ (1:1 000, abcam, USA)和  $\beta$ -actin(1:5000, Bioworld, USA)], 洗膜, 二抗室温孵育, 再次洗膜, 暗室曝光<sup>[7]</sup>.

#### 1.2.2 免疫荧光检测

冰冻切片用牛血清(碧云天, 南通, 中国)封闭. SIRT1(1:100, abcam, USA)、PGC-1 $\alpha$ (1:100, abcam, USA)和神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN, 1:200, Millipore, USA)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜. 浸洗后避光孵育荧光二抗, 再次浸洗后封片. 阴性对照只给予孵育二抗.

#### 1.2.3 氧化应激损伤指标

实验二, 将脑组织充分裂解、匀浆、离心, 提取蛋白上清液. 蛋白定量后分别检测丙二醛(malondialdehyde, MDA), 谷胱甘肽(glutathione, GSH)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(建成生物, 南京, 中国). MDA 检测采用硫代巴比妥酸法, 分光光度仪检测波长 532 nm; GSH 检测采用化学比色法, 分光光

度仪检测波长 412 nm;SOD 检测采用黄嘌呤氧化酶法,分光光度仪检测波长 550 nm<sup>[10-11]</sup>.

1.2.4 脑水肿检测

实验二,将留取的脑组织左右半球即刻称取湿重,置入 100 ℃ 恒温烘箱,48 h 后取出称取干重. 按照[(湿重-干重)/湿重]×100%的公式计算干湿重比,即为脑水肿检测<sup>[7]</sup>.

1.2.5 神经功能评分

实验二,每只大鼠在处死前 1 h 都执行神经功能评分检测,评分标准采用 Yamaguchi 等提出的量表<sup>[7,12]</sup>.

1.2.6 统计分析

本研究中统计结果采用(平均数±标准误)分析,所有数据采用单因素方差分析,组间比较使用 Tukey 分析,软件使用 SPASS 17.0.  $P<0.05$  被认为有统计学意义<sup>[7]</sup>.

表 1 神经功能评分量表

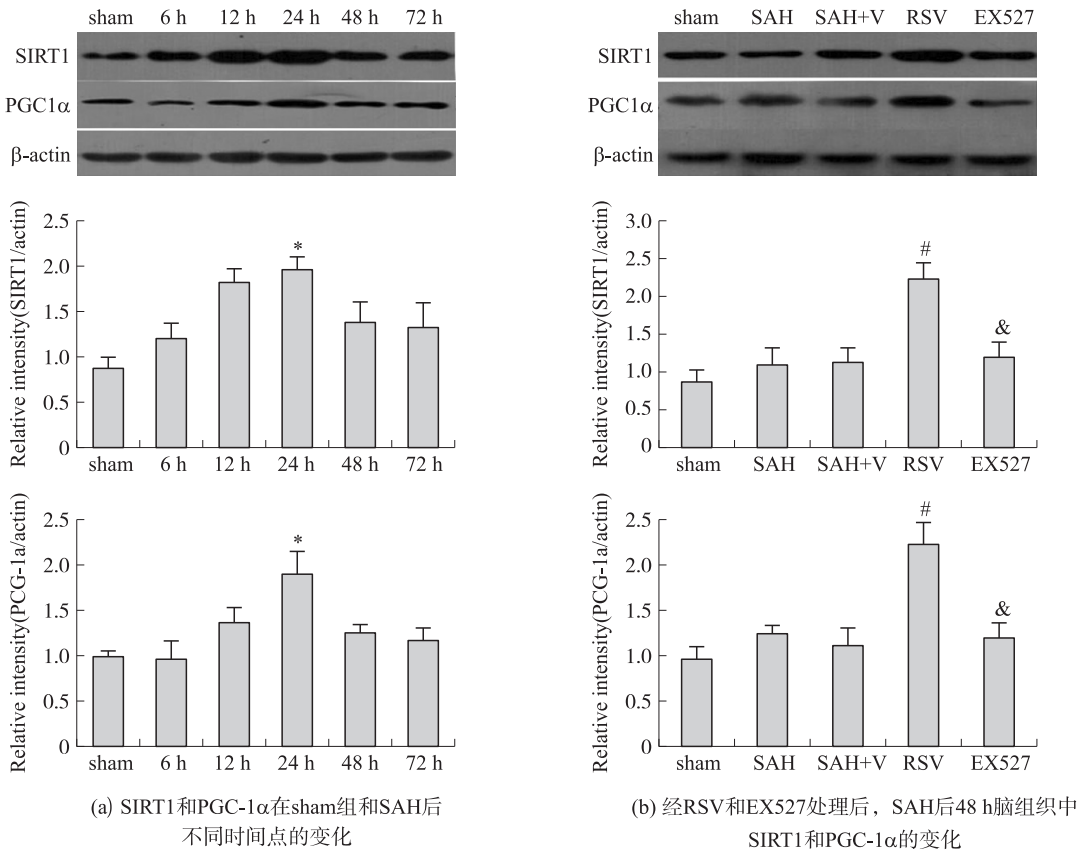
Table 1 Neurological function rating scale		
项目	评分标准	分值
饮食	完成定量的饮食	0
	部分剩余	1
	剩余很多	2
活动	步行且能到达箱子的至少三个角	0
	可以步行但需要一定的刺激	1
	几乎趴着不动	2
步态	无错误	0
	不能站稳	1
	不能步行	2

2 结果

2.1 Western blot 分析 SIRT1/PGC-1α 通路在 SAH 后的变化

实验一,SIRT1 和 PGC-1α 的蛋白水平在 sham 组均较低,SAH 后随着时间推移逐渐升高,并在 SAH 后 24 h 达到高峰,较 sham 组明显升高( $P<0.05$ , Fig. 1a);随后二者蛋白水平逐渐下降. 由此可见内源性 SIRT1/PGC-1α 通路在 SAH 后激活.

实验二,较 SAH+vehicle 组,经 RSV 治疗后 SIRT1 在 SAH 后 48 h 可明显提高;同时,SIRT1 下游的 PGC-1α 显著升高( $P<0.05$ , Fig. 1b);SAH 造模前 30 min 侧脑室给予 SIRT1 特异性抑制剂 EX527,可明显



A: SIRT1 和 PGC-1α 在 sham 组和 SAH 后不同时间点的变化, B: 经 RSV 和 EX527 处理后, SAH 后 48 h 脑组织中 SIRT1 和 PGC-1α 的变化; SAH+V: SAH+vehicle 组, RSV: SAH+RSV 组, EX527: SAH+RSV+EX527 组. \* $p<0.05$  vs sham 组, # $p<0.05$  vs SAH+vehicle 组, & $p<0.05$  vs SAH+RSV 组, SAH 和 SAH+vehicle 组之间没有统计学差异. ( $n=5$ /组)

图 1 Western blot 分析大鼠皮层中 SIRT1 和 PGC-1α 蛋白水平在不同组中的变化

Fig. 1 SIRT1 and PGC-1α protein changes in different groups by western blot analysis

缓解 RSV 在 SAH 后对 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的上调作用( $P<0.05$ , Fig. 1b).

2.2 免疫荧光染色检测 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的变化

实验一,经与 NeuN 共染可见 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  主要定位在神经元的核;较 sham 组, SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  在 SAH 后 24 h 组荧光强度明显增强( Fig. 2a、2b );在 48 h 组, 荧光强度开始下降( Fig. 2c ).

实验二,在 SAH 后经 RSV 治疗, SAH+RSV 组的 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  荧光强度较 SAH+vehicle 组明显升高( Fig. 2c );同时侧脑室给予 SIRT1 抑制剂 EX527 处理后, RSV 对 SAH 后 SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  荧光的影响较 SAH+vehicle 组无明显差异( Fig. 2c ).

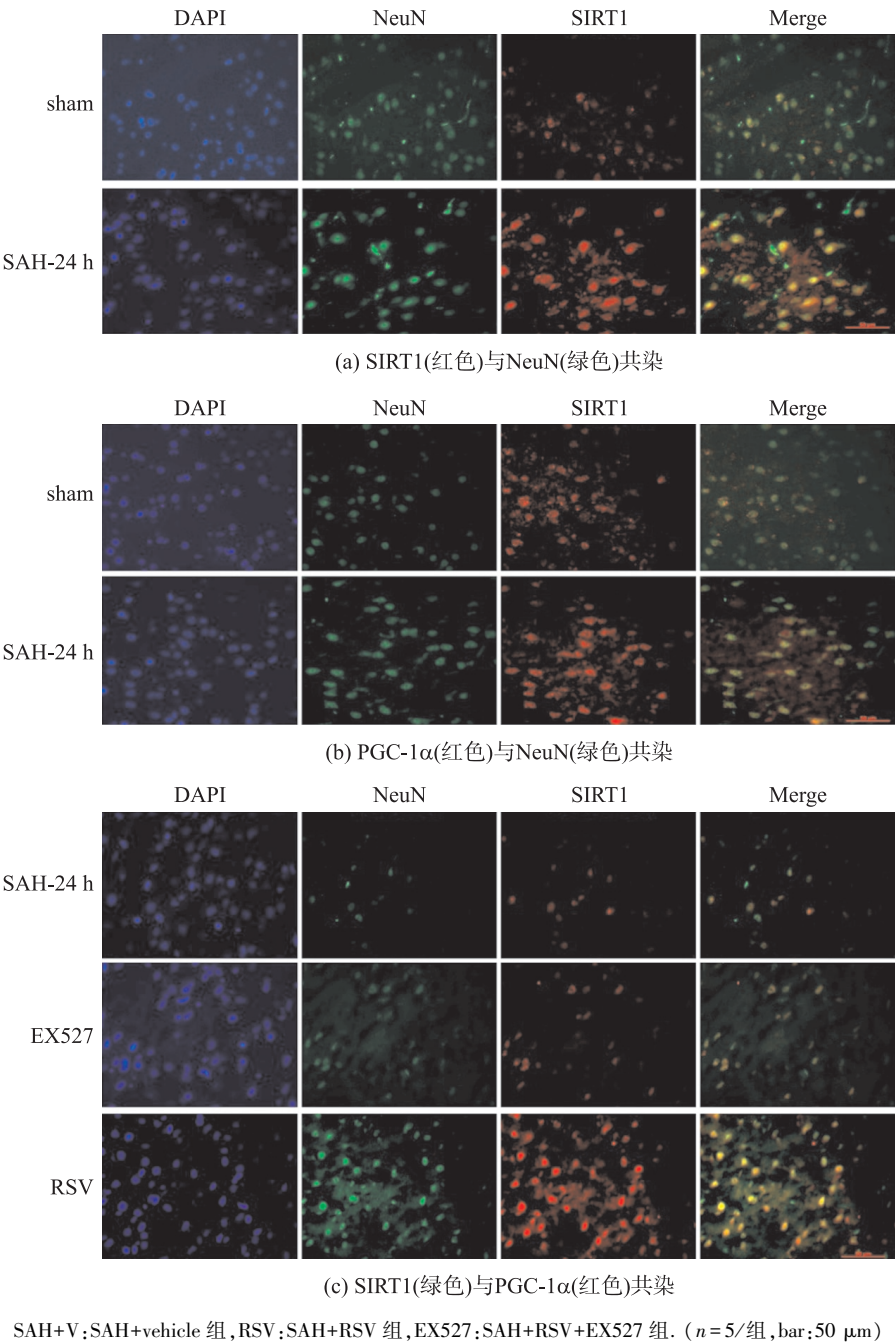


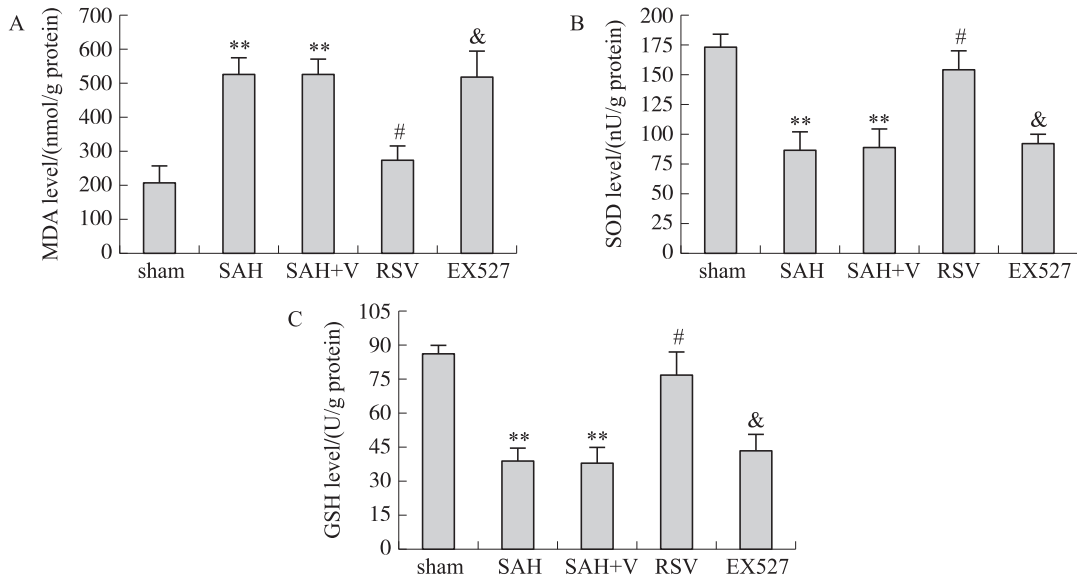
图 2 大鼠脑组织免疫荧光染色

Fig. 2 Immunofluorescence staining in rat brains

2.3 氧化应激损伤检测

实验二,较 sham 组, SAH 组和 SAH+vehicle 组的 MDA 明显升高, SOD 和 GSH 水平显著下降( $P<0.01$ , Fig. 3). 经 RSV 治疗后 MDA 水平较 SAH+vehicle 组明显下降, 同时 SOD 和 GSH 水平显著升高( $P<0.05$ ,

Fig. 3). 然而,经侧脑室给予 SIRT1 抑制剂后发现 RSV 对 SAH 引起的氧化应激性损伤的治疗作用较 SAH +vehicle 组无明显差异( $P<0.05$ , Fig. 3).



A:MDA,B:SOD;C:GSH. SAH+V:SAH+vehicle 组,RSV:SAH+RSV 组,EX527:SAH+RSV+EX527 组. \*\* $p<0.01$  vs sham 组, # $p<0.05$  vs SAH+vehicle 组, & $p<0.05$  vs SAH+RSV 组,SAH 和 SAH+vehicle 组之间没有统计学差异. ( $n=5$ /组)

图 3 大鼠脑组织中氧化应激指标检测

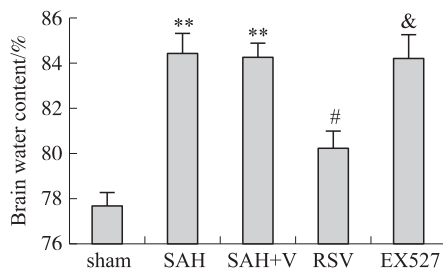
Fig. 3 Oxidant/antioxidant factors analysis in rat brains

## 2.4 脑水肿检测

实验二,SAH 组和 SAH+vehicle 组双侧半球的水肿情况较 sham 组明显加重,经 RSV 治疗后脑水肿较 SAH+vehicle 组明显缓解;经侧脑室给予 SIRT1 特异性抑制剂后发现,EX527 可下调 RSV 对 SAH 后脑水肿的缓解作用( $P<0.05$ , Fig. 4).

## 2.5 神经功能检测

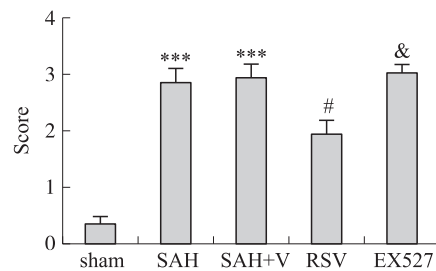
实验二,和 sham 组相比,SAH 和 SAH+vehicle 组的神经功能评分明显提高,说明神经损伤加重( $P<0.05$ , Fig. 5),SAH 组和 SAH+vehicle 组间的评分没有明显差异( $P>0.05$ , Fig. 5);经 RSV 治疗后,评分较 SAH+vehicle 组明显降低( $P<0.05$ , Fig. 5),EX527 处理后可明显下调 RSV 在 SAH 后的神经功能保护作用( $P<0.05$ , Fig. 5).



SAH+V:SAH+vehicle 组,RSV:SAH+RSV 组,EX527:SAH+RSV+EX527 组. \*\* $p<0.01$  vs sham 组, # $p<0.05$  vs SAH+vehicle 组, & $p<0.05$  vs SAH+RSV 组,SAH 和 SAH+vehicle 组之间没有统计学差异. ( $n=5$ /组)

图 4 双侧大脑半球的脑水肿检测

Fig. 4 Brain water content analysis in brain cortex



SAH+V:SAH+vehicle 组,RSV:SAH+RSV 组,EX527:SAH+RSV+EX527 组. \*\*\* $P<0.0001$  vs sham 组, # $p<0.05$  vs SAH+vehicle 组, & $p<0.05$  vs SAH+RSV 组,SAH 和 SAH+vehicle 组之间没有统计学差异. ( $n=5$ /组)

图 5 神经功能评分检测

Fig. 5 Behavioral scores in each group

### 3 讨论

本研究中通过对 SAH 后 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  抗氧化通路的研究发现:(1)SAH 后内源性 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路可被激活;(2)RSV 在 SAH 后的抗氧化作用主要通过上调 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路水平来实现.进一步丰富了 RSV 在 SAH 后抗氧化的机制研究.

氧化应激性损伤被认为是 SAH 引起的一种重要的损伤形式,参与 SAH 后脑水肿、神经功能障碍和血脑屏障破坏等多种损伤机制<sup>[13]</sup>. SAH 后释放大量的氧自由基导致细胞膜的脂质过氧化加剧,导致神经功能损伤. SOD 和 MDA 水平可反映 SAH 后细胞水平的氧化应激损伤和细胞清除氧自由基的能力<sup>[14]</sup>. 本研究中发现 SAH 后 48 h MDA 水平明显升高、SOD 水平明显降低,说明神经性细胞的氧化应激性损伤明显加重.

SIRT1 是一种 NAD<sup>+</sup> 依赖性去乙酰化酶,它的作用底物包含多种组蛋白和非组蛋白:p53、FOXO 家族、NF- $\kappa$ B、p300 和 PGC-1 $\alpha$  等<sup>[15]</sup>. 神经系统研究中可见 SIRT1 主要表达在神经元的核,说明 SIRT1 可能通过去乙酰化作用参与神经元的多种生理病理机制<sup>[16]</sup>. 在本研究中发现 SAH 后 SIRT1 与其抗氧化底物 PGC-1 $\alpha$  在脑组织中均表达在神经元,推断在 SAH 后 SIRT1 在神经元中通过去乙酰化作用调控 PGC-1 $\alpha$  进一步发挥抗氧化作用. 作为 SIRT1 的去乙酰化靶点之一,PGC-1 $\alpha$  主要参与调控与线粒体功能和脂肪酸氧化作用有关的基因转录<sup>[17]</sup>. 本研究中,SIRT1 和 PGC-1 $\alpha$  的蛋白水平在 SAH 后随着时间推移明显升高,提示 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路的内源性保护作用在 SAH 后被激活;但这种脑保护作用在 24 h 后呈逐渐下降趋势,提示 SAH 后的氧化应激性损伤可能与 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路的内源性保护作用下调有关. 为验证假设,经腹腔注射 SIRT1 激动剂 RSV 后发现 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路在 SAH 后 48 h 明显被上调,伴随着 SAH 后氧化应激损伤指标 MDA 明显降低、SOD 和 GSH 明显升高,同时脑水肿缓解、神经功能评分提升;当 SIRT1 特异性抑制剂 EX527 下调 SIRT1 的水平后发现 RSV 在 SAH 后的抗氧化作用较 SAH 组无明显变化,伴随着相应的氧化应激指标的变化,说明 RSV 在 SAH 后的抗氧化作用主要通过激活 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路来实现.

目前,RSV 已被证实在多种神经系统疾病中通过上调 SIRT1 蛋白水平发挥神经保护的作用,原因是 RSV 通过变构作用增加了 SIRT1 与 NAD<sup>+</sup>、SIRT1 与底物之间的亲和力. 此外,临床试验证实诸多剂量 RSV 在健康人群中使用后未发现毒副作用,可增加测试者在执行任务训练时前额叶皮层的脑血流<sup>[3,18,19]</sup>. 因此,结合本研究结果,作为 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路的有效激动剂,RSV 具有在急性脑损伤后抗氧化的潜力.

#### [参考文献]

- [1] MACDONALD R L, SCHWEIZER T A. Spontaneous subarachnoid haemorrhage[J]. Lancet, 2017, 389(10069): 655-666.
- [2] MCCUBREY J A, LERTPIRIYAPONG K, STEELMAN L S, et al. Regulation of GSK-3 activity by curcumin, berberine and resveratrol: potential effects on multiple diseases[J]. Advances in biological regulation, 2017, 65: 77-88.
- [3] MARKUS M A, MORRIS B J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging[J]. Clin Intervaging, 2008, 3(2): 331-339.
- [4] KORONOWSKI K B, KHOURY N, SAUL I, et al. Neuronal SIRT1 (Silent Information Regulator 2 Homologue 1) regulates glycolysis and mediates resveratrol-induced ischemic tolerance[J]. Stroke, 2017, 48(11): 3117-3125.
- [5] HAM P R, RAJU R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging[J]. Prog Neurobiol, 2017, 157: 92-116.
- [6] WANG Z, MA C, MENG C, 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.
- [7] 周晓明. SIRT1/P53 通路在蛛网膜下腔出血后脑水肿机制中作用的初步探讨[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [8] ZHOU X M, ZHOU M L, ZHANG X S, et al. Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model[J]. J Surg Res, 2014, 189(1): 159-165.
- [9] YAN W, FANG Z, YANG Q, et al. SirT1 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(3): 396-406.



- [ 10] 张翔圣,范杰梅,张鑫,等. 虾青素对兔蛛网膜下腔出血后的保护作用研究[J]. 中华神经外科疾病研究,2015(1):18-21.
- [ 11] 肖继东,李晓峰,韦俊杰,等. 褪黑素对脑出血大鼠的脑保护作用及机制[J]. 临床神经病学,2014(6):450-454.
- [ 12] YAMAGUCHI M,ZHOU C,NANDA A,et al. Ras protein contributes to cerebral vasospasm in a canine double-hemorrhage model[J]. Stroke,2004,35(7):1750-1755.
- [ 13] SEHBA F A,HOU J,PLUTA R M,et al. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Prog Neurobiol,2012,97(1):14-37.
- [ 14] PIGNATARO G,ESPOSITO E,SIRABELLA R,et al. nNOS and p-ERK involvement in the neuroprotection exerted by remote postconditioning in rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion[J]. Neurobiol Dis,2013,54:105-114.
- [ 15] ZAKHARY S M,AYUBCHA D,DILEO J N,et al. Distribution analysis of deacetylase SIRT1 in rodent and human nervous systems[J]. The anatomical record:advances in integrative anatomy and evolutionary biology,2010,293(6):1024-1032.
- [ 16] ZHANG X,WU Q,WU L,et al. Sirtuin 1 activation protects against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Cell Death Dis,2016,7(10):e2416.
- [ 17] LIU C,LIN J D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism[J]. ACTA Bioch Bioph Sin,2011,43(4):248-257.
- [ 18] ZHANG F,WU Y. Resveratrol may be an effective prophylactic agent for ischemic stroke[J]. J formos Med Assoc,2011,110(8):485-486.
- [ 19] MARX W,KELLY J T,MARSHALL S,et al. Effect of resveratrol supplementation on cognitive performance and mood in adults:a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Nutr Rev,2018,76(6):432-443.

[ 责任编辑:黄 敏]