

# 洋葱黄酮类提取物对大鼠脑出血后血肿周围活化小胶质细胞及炎症因子的抑制作用

罗 岗 黄祎诺 王建军 赵志军 王新春 李凤仙  
王晓雪 王 华 许宏侠 苏亚丽

**摘要 目的** 研究洋葱黄酮类提取物对不同时间点脑出血模型大鼠血肿周围活化小胶质细胞数量及脑组织促炎性因子释放的影响,探讨洋葱黄酮类提取物治疗脑出血的可能机制。**方法** 100 只 Wistar 大鼠用于制备脑出血动物模型,造模成功 90 只。其中脑出血组(40 只)、洋葱黄酮类提取物干预组(简称干预组,40 只)和假手术组(10 只)。造模过程中脑出血组和干预组均向大鼠定位部位注射自体血 100  $\mu$ L,同时干预组予洋葱黄酮类提取物(0.2 mL/10 g 体重,每日 2 次)灌胃给药;脑出血组和假手术组未进行药物干预。造模后各组再以 6、24、48、72 h 和 7 d 为时间点分 5 个亚组,干预组和脑出血组每个亚组 8 只,共 10 组,假手术组每个亚组 2 只,共 5 组。采用 Garcia JH 评分法观察大鼠不同时间点的神经功能;采用 HE 染色观察各时间点大鼠脑组织的损伤程度;采用免疫组织化学染色法观察不同时间点大鼠血肿周围活化的小胶质细胞;采用 ELISA 法检测不同时间点大鼠血肿脑组织促炎因子 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  表达。**结果** 脑出血组注入自体血后,血肿周围出现变性坏死区,细胞排列不整齐,核形态不整,部分核皱缩、髓质均片状间质水肿,且随着时间推移,变性坏死区域扩大外,细胞周围出现空白区,细胞分布不均匀,神经元细胞数减少,同时有淋巴细胞及中性粒细胞浸润;洋葱黄酮类提取物干预后,对应时间点的细胞坏死,细胞排列及核形态明显减轻,炎性细胞浸润减少。与假手术组比较,脑出血组 5 个时间点行为学评分均降低,活化的小胶质细胞数目增多,血肿脑组织中 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  表达升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与脑出血组比较,干预组大鼠出血后 48、72 h 和 7 d 时间点行为学评分升高,小胶质细胞的活化数目减少, TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  表达降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 采用乙醇回流法从洋葱中提取的黄酮类物质可能通过抑制脑出血后血肿周围小胶质细胞的活化及促炎因子的释放,而改善脑出血模型大鼠的症状。

**关键词** 脑出血;小胶质细胞;洋葱黄酮类提取物;促炎因子

Flavonoids Extracted from Onion Inhibited Activation of Microglia and Release of Proinflammatory Factors around the Hematoma in ICH Model Rats LUO Gang, HUANG Yi-nuo, WANG Jian-jun, ZHAO Zhi-jun, WANG Xin-chun, LI Feng-xian, WANG Xiao-xue, WANG Hua, XU Hong-xia, and SU Ya-li Faculty of Neurology and Pharmacy, Institute of Digestive Disease, First Hospital Affiliated to Henan University, Henan (475001)

**ABSTRACT Objective** To study flavonoids extracted from onion (FEO) on the number of activated microglia and the release of proinflammatory factors in intracerebral hemorrhage (ICH) model rat at different time points, and to explore its possible mechanism for treating ICH. **Methods** Totally 100 Wistar rats were used for preparing ICH model, and ICH model was successfully established in 90 of them. The 90 rats were randomly divided into the sham-operation group ( $n = 10$ ), the ICH group ( $n = 40$ ), the FEO group ( $n = 40$ ). Totally 100  $\mu$ L autoblood was injected from fixed position to rats in the ICH group and the FEO group during modeling. Meanwhile, FEO at 0.2 mL/10 g was given to rats in the FEO group, twice daily. No drug intervention was given to rats in the ICH group and the sham-operation group. Each group

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(No. 15A32003);河南省医学科技攻关计划项目(No. 201404024)

作者单位:河南大学第一附属医院神经病学与药理学教研室及消化病研究所(河南 475001)

通讯作者:黄祎诺, Tel: 0371-25661617, E-mail: Hyn4031289@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0854

was further sub-divided into 5 sub-groups according to different time points such as 6, 24, 48, 72 h, and 7 days. There were 8 rats in each sub-group of the ICH group and the FEO group, 10 groups in total. There were 2 rats in each sub-group of the sham-operation group, 5 groups in total. Neurological functions at different time points were observed by Garcia JH. The injury degree of brain tissue was observed at different time points using HE staining. Activated microglia around hematoma were observed at different time points after ICH by using immunohistochemical staining. Expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  at different time points after ICH was detected using ELISA. Results In the ICH group, degenerated and necrotic zone occurred around hematoma after injecting autoblood, cells were untidily arranged with irregular nucleus, partial nucleus were shrunken with lamellar interstitial edema of the medulla. As time went by, degenerated and necrotic zone was dilated; vacant zone occurred around cells; cells were unevenly distributed with reduced neuron numbers. Meanwhile, infiltration of lymphocytes and neutrophils occurred. In the FEO group after FEO intervention, necrotic cells were lesser, cell arrangement and nucleus morphology were obviously alleviated, and infiltration of inflammatory cells was reduced at corresponding time points. Compared with the sham-operation group, behavioral scores at 5 time points all decreased, the number of activated microglia was added, and expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in hematoma tissue increased in the ICH group ( $P < 0.01$ ). Compared with the ICH group, behavioral scores at 48 and 72 h, as well as day 7 all increased, the number of activated microglia was reduced, and expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in hematoma tissue decreased in the FEO group ( $P < 0.01$ ). Conclusion FEO using the ethanol reflux method could improve symptoms of ICH model rats possibly by inhibiting activation of microglia and the release of proinflammatory factors around the hematoma.

**KEYWORDS** intracerebral hemorrhage; microglia; flavanoids extracted from onion; proinflammatory factor

脑血管病(cerebrovascular disease, CD)是当前的常见病和多发病,是人类三大死亡原因之一,在所有的脑卒中类型中脑出血的病死率和重度致残率最高<sup>[1]</sup>。其引起的脑损伤约 60% 以上是以神经纤维为主的脑深部白质<sup>[2]</sup>,而神经纤维(树突、轴突、胶质细胞)在神经系统中起着传递信息,分泌和支撑神经元等作用<sup>[3]</sup>。脑出血后的脑损伤主要是由最初血肿的扩大导致的机械性压迫所造成的周围组织缺血及在血块形成过程中和形成后,水肿、炎症对脑组织的进一步损伤。而小胶质细胞作为中枢神经系统中白质的重要组成部分,在神经变性和神经炎性反应过程中起关键作用<sup>[4,5]</sup>。因此针对脑出血后小胶质细胞的药物探索及其机制探讨,对脑出血的治疗及预后有着重要的意义。洋葱属百合科葱属植物,除具有丰富的营养成分外,还是一种具备多种药用价值的保健食品,主要包含黄酮类物质、挥发油、硫化物等,近年来逐渐引起广泛重视<sup>[6-8]</sup>。药理研究表明,生物类黄酮具有清除自由基、抗氧化、降压、消炎等作用,同时有实验证实,洋葱黄酮类提取物在体外细胞培养时能够抑制小胶质细胞的生长<sup>[9]</sup>,而且在动物实验中其血脑屏障透过率较高,因此洋葱黄酮类有可能成为减轻脑出血后炎性反应导致继发性脑损伤

的新药<sup>[10]</sup>。本研究采用洋葱黄酮提取物干预大鼠脑出血模型,观察其对血肿周围小胶质细胞及炎性因子的影响,为洋葱黄酮提取物治疗脑出血提供新的理论依据。

## 材料与方法

1 动物 100 只健康雄性成年 Wistar 大鼠,河南大学动物试验中心提供,动物合格证号:SCXK(豫)2015-0001;清洁级,鼠龄 3~4 个月,体重(250±15)g。

2 药物 洋葱中黄酮类化合物提取<sup>[11]</sup>。将 20 g 新鲜洋葱(市售黄皮洋葱)去皮捣碎,选出乙醇浓度、提取时间、提取次数、溶媒量 4 个提取因素,每个因素 3 个水平的正交设计方案实验筛选出最佳工艺组合结果,用 8 倍体积的 50% 的乙醇溶液 100℃ 水浴回流 1.5 h,抽提 3 次,4 800 r/min 转速离心 10 min,取上清液。将该上清液减压蒸馏,冻干保存。使用时以无血清培养基溶解。采用槲皮素作为标准品,三氯化铝(AlCl<sub>3</sub>)法制作含量测定标准曲线。取上清液 2 mL 检测,得到 510 nm 处的 A 值,按照标准曲线计算其中黄酮类物质含量(3.96 mg/100 g),配制成 20 μg/mL。

3 试剂与仪器 TNF- $\alpha$  试剂盒 (Abcam 公司, 批号: ab100747), IL-1 $\beta$  试剂盒 (Abcam 公司, 批号: ab8320), 兔抗鼠 Iba1 (Abcam 公司, 批号: ab15690), 山羊抗兔 IgG (Abcam 公司, 批号: ab64256), 槲皮素标准品 (上海源叶生物科技有限公司, 货号: 90083), 大鼠脑立体定位仪 (上海奥尔科特生物科技有限公司, 型号 ALC-H); 100  $\mu$ L 微量注射器 (伯齐科技有限公司, NANOFIL-100); 多功能酶标仪 (美谷分子仪器有限公司, FlexStation 3)。

4 动物分组及动物模型的建立 参照 Xue M 等<sup>[12]</sup>方法制备大鼠脑出血模型。取 100 只 Wistar 大鼠分为假手术组 (10 只)、脑出血组 (45 只) 和洋葱黄醌提取物干预组 (简称干预组, 45 只)。各组均给予腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 mg/100 mg) 麻醉后, 俯卧固定于立体定位仪上, 据大鼠立体定位仪图谱<sup>[13]</sup>, 调整立体定位仪使门齿沟平面比耳线平面低 2.4 mm, 此时前囟和后囟基本在同一平面上, 先固定耳间线, 听到水平针穿破耳鼓膜的破裂声后, 移头部至正中, 接着固定大鼠门齿于定向仪的门齿钩上; 顶部皮肤被毛、消毒、切开, 用 30% 双氧水腐蚀颅骨外膜, 调整立体定向仪, 使其上的微量注射仪套管尖端定位于前囟后 0.15 mm, 右侧中线旁开 2.5 mm, 钻孔至硬脑膜表面, 不损伤脑组织; 假手术组只用微量注射器插入, 不注射自体血。脑出血组与干预组加温、剥离尾动脉; 用微量注射器自尾动脉分 3 次取自体非肝素不凝血 0.1 mL, 轻轻抽拉数次后插入已钻好的孔内, 向内进针 6.5 mm (相当于内囊部位), 调节注射速度约 0.13~0.15  $\mu$ L/s, 在 10 min 内缓慢分段注入自体血共计 100  $\mu$ L<sup>[14,15]</sup>, 注血结束后, 留针 5 min 后缓慢退针, 骨石蜡封闭钻孔, 缝合皮肤后消毒。最后用 60 W 的白炽灯距离大鼠 50 cm 高度持续照射, 待清醒后再撤除。脑出血组和干预组参照 Longa EZ<sup>[16]</sup>

评分标准筛选, 同时以大鼠脑横断面中有明显的圆形、椭圆形或不规则血肿存在, 血液无针道反流, 无蛛网膜下腔出血, 无血肿破入脑室视为造模成功。90 只大鼠造模成功, 成功率为 90%。10 只未成功的模型中, 3 只造模过程中死亡 (脑出血组 2 只, 干预组 1 只), 7 只经综合评价不符合标准予以排除 (脑出血组 3 只, 干预组 4 只)。

5 干预方法 干预组从脑出血模型制备成功后, 立刻以灌胃方式给药, 每次 0.2 mL/10 g 体重 (人和大鼠按体表面积折算的等效剂量 6.3 倍, 相当于临床上每天 5.04 mg/kg), 每日 2 次, 至处死前停止给药。脑出血组和假手术组未进行任何药物干预。造模后脑出血组 (40 只) 和干预组 (40 只) 大鼠每个组分为 6、24、48、72 h 和 7 d 5 个时相, 每个亚组 8 只, 共 10 组。假手术组 (10 只), 每个时间点取 2 只, 共 5 组。

6 检测指标及方法

6.1 大鼠不同时间点神经功能 参照 Garcia JH 评分法<sup>[17]</sup>。Garcia JH 评分详细评价大鼠的运动和感觉功能, 从大鼠自主运动、体态对称性、前肢伸展功能、网屏实验、身体双侧触觉、双侧胡须反射等 6 个方面评定大鼠神经功能损伤程度, 功能正常时得分最高为 18 分, 功能损伤最严重得分最低为 3 分 (表 1)。

6.2 不同时间点脑组织的病理变化 采用 HE 染色法。石蜡切片于 60℃ 烤箱烘烤 20 min。二甲苯 I、II、III 脱蜡各 10 min, 100%、90%、70% 乙醇依次脱水 2 min, 双蒸水 3 min, PBS 洗涤 2 min  $\times$  3 次。苏木素染色 3 min, 自来水洗 1 min, 1% 盐酸酒精分化 15 s, 自来水洗 1 min, 0.2% 氨水返蓝 15 s, 自来水洗 1 min (显微镜下控制染色时间, 以细胞核染色清晰为准), 伊红染液 10 s。梯度酒精脱水, 95% 乙醇 15 s, 无水乙醇脱水 10 min, 二甲苯 I、II 透明各 10 min, 中性树胶封片干燥。

表 1 Garcia JH 大鼠神经功能评分标准

| 项目                                           | 0 分      | 1 分     | 2 分           | 3 分         |
|----------------------------------------------|----------|---------|---------------|-------------|
| 自主运动 (将大鼠放入鼠笼中观察 5 min)                      | 无自主运动    | 很少运动    | 运动并触及至少一侧笼壁   | 运动并触及至少三侧笼壁 |
| 体态的对称性 (提起尾部使之悬空, 观察四肢状态)                    | 患侧无运动    | 患侧轻微运动  | 患侧运动较迟缓       | 双侧体态对称      |
| 前肢伸展运动 (悬尾使后肢悬空, 前肢移向桌子, 使之仅靠前肢行走, 观察前肢伸展运动) | 左前肢无伸展运动 | 左前肢轻微伸展 | 左前肢有伸展运动但不及右侧 | 双侧伸展对称      |
| 网屏实验                                         | —        | 不能爬上    | 左侧劣势          | 正常攀爬        |
| 两侧身体触觉反射                                     | —        | 左侧无反应   | 左侧反应弱于右侧      | 反应性相同       |
| 两侧胡须触觉反射                                     | —        | 左侧无反应   | 左侧反应弱于右侧      | 反应性相同       |

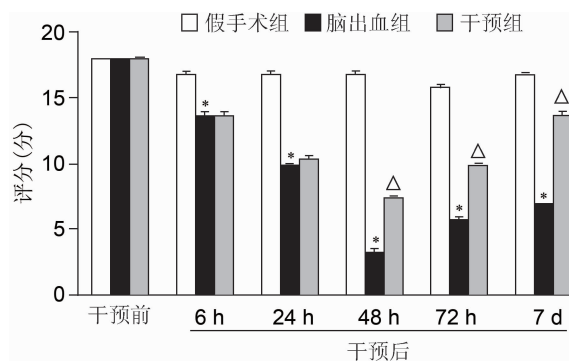
**6.3 不同时间点血肿周围活化的小胶质细胞变化** 采用免疫组织化学法。切片常规脱蜡至水; 0.01 mmol/L PBS 漂洗 6 min; 30%  $H_2O_2$  一份加蒸馏水 10 份混合, 室温 5~10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水漂洗 6 min; 将 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 放入高压锅中烧至 100  $^{\circ}C$ , 将切片置于其中高压修复 10 s; 1  $\times$  PBS 漂洗 6 min; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体, 不洗。加抗 Iba1 抗体, 4 $^{\circ}C$  孵育过夜; 复温 30 min, 1  $\times$  PBS 液洗 5 min, 共 3 次, 加二抗, 37  $^{\circ}C$  孵育 20 min; 0.01 mmol/L PBS 漂洗, 6 min; 滴加过氧化物酶标记的链酶卵白素 (SABC), 37  $^{\circ}C$  孵育 20 min; 0.01 mmol/L PBS 漂洗, 20 min; 使用 DAB 显色试剂盒显色。显色后, 应用图像分析仪, 每一切片取同一高倍阳性视野两个, 每个阳性视野取细胞 3 个, 对其进行灰度值测定。

**6.4 不同时间点血肿脑组织 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  表达水平** 采用 ELISA 检测法。每份切取含血肿脑组织约 100 mg, 放入 EP 管中, 每份加入适量生理盐水, 在超声波粉碎机以 3 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液。标准品的稀释: 标本用标本稀释液 1:1 稀释后加入 50  $\mu$ L 于反应孔内; 加入稀释好后的标准品 50  $\mu$ L 于反应孔, 加入待测样品 50  $\mu$ L 于反应孔内。立即加入 50  $\mu$ L 的生物素标记的抗体。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 37  $^{\circ}C$  温育 1 h; 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次; 每孔加入 60  $\mu$ L 的亲合链霉素-HRP, 轻轻振荡混匀, 37  $^{\circ}C$  温育 30 min; 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次; 每孔加入底物 A、B 各 50  $\mu$ L, 轻轻振荡混匀, 37  $^{\circ}C$  温育 10 min。避免光照; 取出酶标板, 迅速加入 50  $\mu$ L 终止液, 立即测定结果; 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

**7 统计学方法** 运用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用用 Kruskal-Wallis 法分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 各组大鼠干预前后不同时间点行为学比较 (图 1)** 与假手术组比较, 脑出血组 5 个时间点行为学评分均降低, 差异有统计学意义 [ $F(5, 75) = 24.95, P < 0.01$ ]; 与脑出血组比较, 干预组干预后在 48、72 h 和 7 d 时间点行为学评分升高, 差异有统计学意义 [ $F(2, 15) = 24.34, P < 0.01$ ]。



注: 与假手术组比较, \* $P < 0.01$ ; 与脑出血组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 图 4~6 同

图 1 各组大鼠干预前后不同时间点行为学比较

**2 各组大鼠不同时间点脑组织变化 (图 2)** 假手术组针道周围细胞排列相对整齐, 核形态规整, 髓质有轻微水肿, 各时相间无明显差别。脑出血组 6 h 血肿周围可见变性坏死区域, 细胞排列不整齐, 核形态不整, 部分核皱缩、髓质均可见片状间质水肿, 但未见炎性细胞浸润; 出血 24 h 除可见变性坏死区域扩大外, 细胞周围出现空白区, 细胞分布不均匀, 神经元细胞数减少, 可见散在淋巴细胞浸润; 出血 48 h 损伤程度较 24 h 进一步加重; 出血 72 h 可见组织水肿明显, 神经元细胞数明显减少, 可见细胞崩解小体, 中性粒细胞及淋巴细胞浸润, 有中性粒细胞附壁现象; 出血 7 d 仅见少量中性粒细胞及淋巴细胞浸润, 无中性粒细胞附壁现象, 其余改变与 72 h 无明显变化。干预组对应时间点的细胞坏死, 细胞排列及核形态明显减轻, 炎性细胞浸润减少。

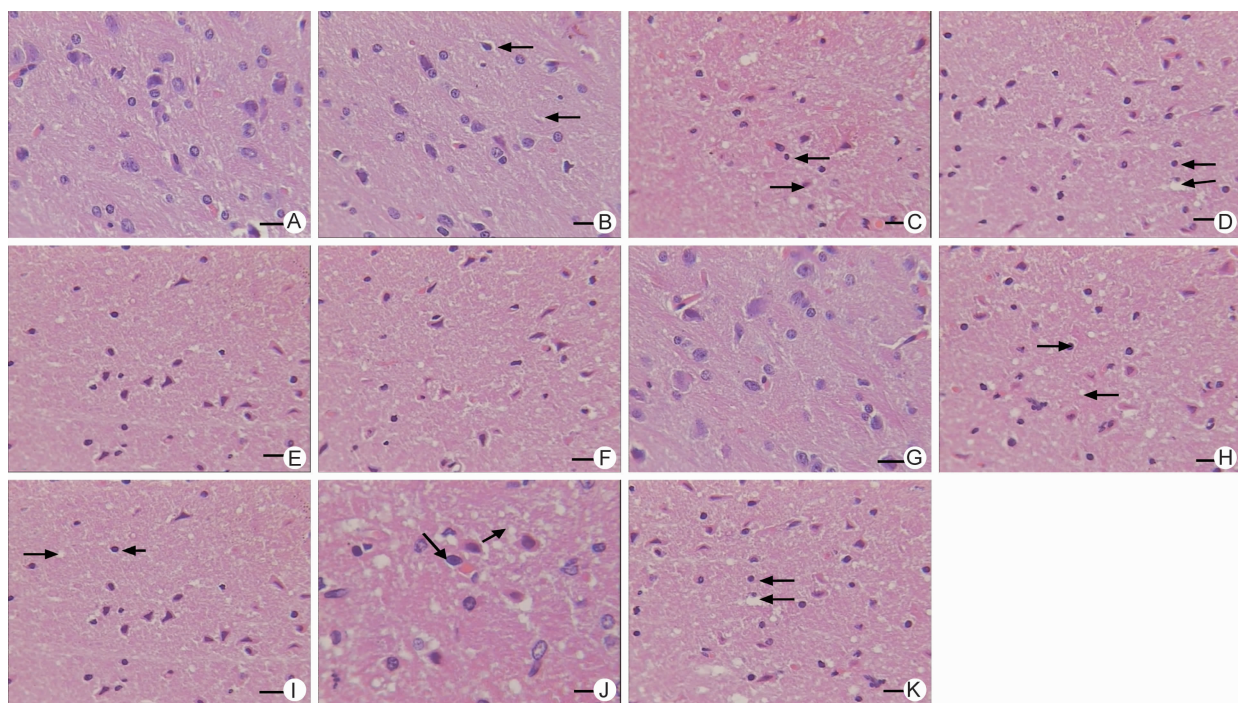
**3 各组大鼠干预前后不同时间点活化小胶质细胞数目比较 (图 3、4)** 与假手术组比较, 脑出血组 5 个时间点活化的小胶质细胞数且增多, 差异有统计学意义 [ $F(5, 75) = 89.19, P < 0.01$ ]。与脑出血组比较, 干预组 48、72 h 和 7 d 3 个时间点活化小胶质细胞数目减少, 差异有统计学意义 [ $F(2, 15) = 33.64, P < 0.01$ ]。

**4 各组不同时间点含血肿脑组织 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  表达比较 (图 5、6)** 与假手术组比较, 脑出血组 5 个时间点 TNF- $\alpha$  表达升高, 72 h 达到最高峰, 差异有统计学意义 [ $F(5, 75) = 77.70, P < 0.01$ ]。与脑出血组比较, 洋葱黄酮类提取物干预后在 48、72 h 和 7 d 3 个时间点 TNF- $\alpha$  表达水平降低, 差异有统计学意义 [ $F(2, 15) = 48.26, P < 0.01$ ]。

与假手术组比较, 脑出血组 5 个时间点 IL-1 $\beta$  表达升高, 72 h 达到最高峰, 差异有统计学意义 [ $F(5,$

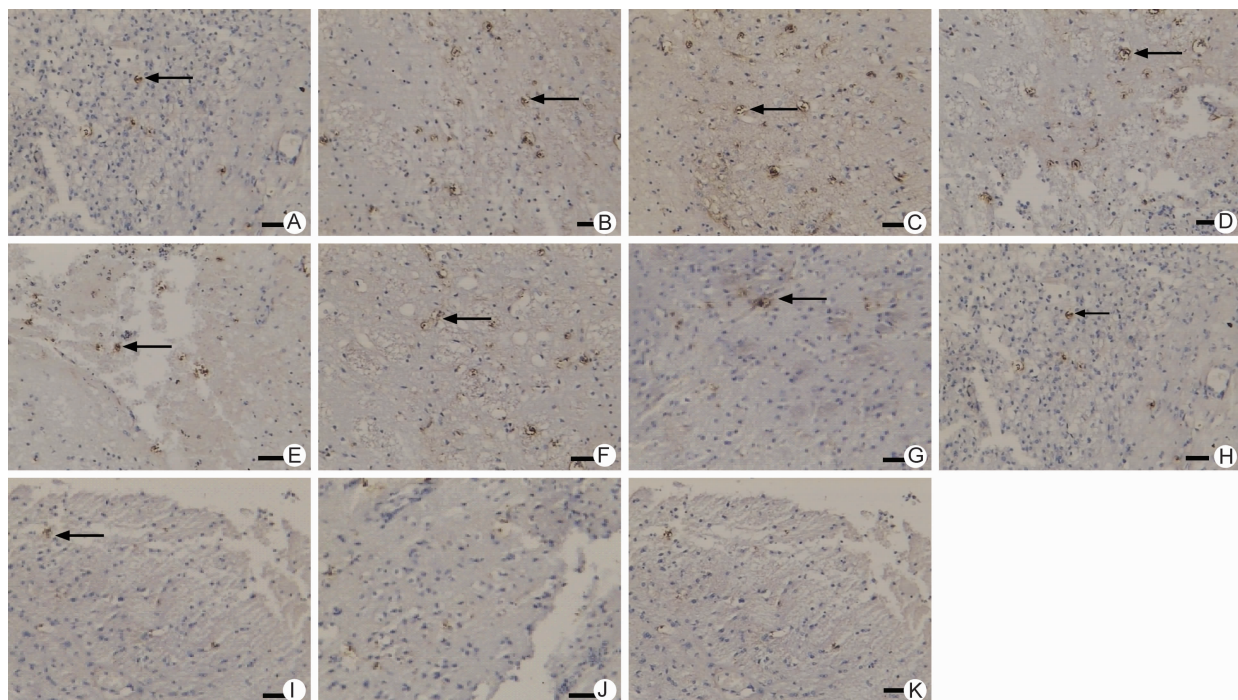
7) = 97.06,  $P < 0.01$ 。与脑出血组比较,洋葱黄酮类提取物干预后 48、72 h 和 7 d 时间点 IL-1 $\beta$  表达降

低,差异有统计学意义 [ $F(2, 15) = 40.96, P < 0.01$ ]。



注: A 为假手术组, B ~ F 为脑出血 6、24、48、72 h 和 7 d 组, G ~ K 分别为干预组干预后 6、24、48、72 h 和 7 d 组; 图中箭头所指为病变处

图 2 各组大鼠不同时间点脑组织病理结果比较 (HE 染色,  $\times 400$ )



注: A 为假手术组, B ~ F 为脑出血 6、24、48、72 h 和 7 d 组, G ~ K 分别为干预组治疗后 6、24、48、72 h 和 7 d 组; 图中箭头所指为染色阳性细胞

图 3 各组大鼠不同时间点脑出血组织活化小胶质细胞的变化 (免疫组化,  $\times 100$ )

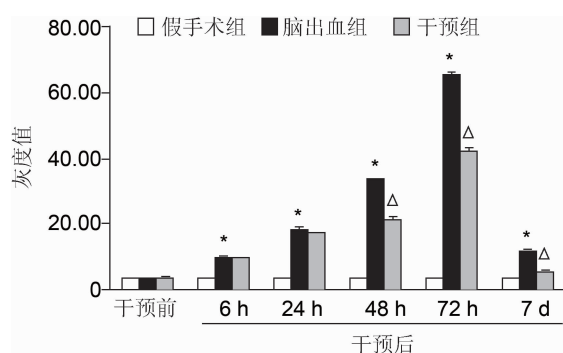


图4 各组大鼠不同时间点脑组织活化小胶质细胞灰度值比较

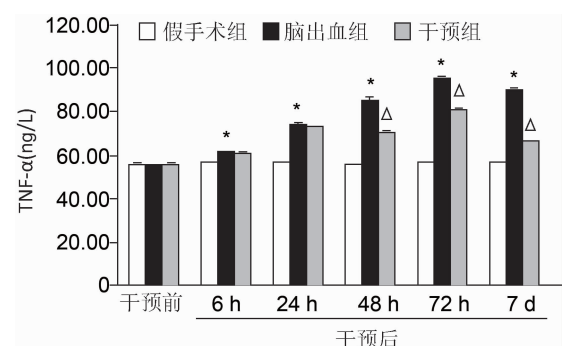


图5 各组大鼠干预前后不同时间点脑出血组织TNF-α光度值比较

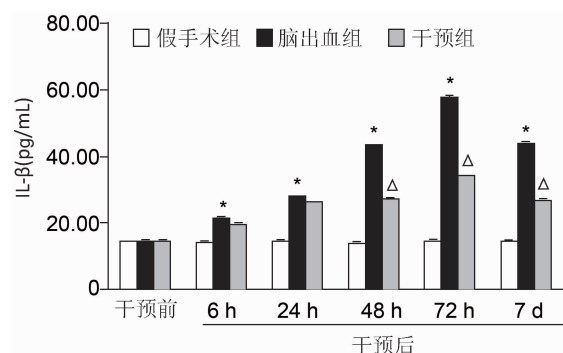


图6 各组大鼠干预前后不同时间点脑出血组织IL-1β光度值比较

## 讨论

脑出血是卒中的一种特别严重的类型, 占有卒中中的10%~15%<sup>[18]</sup>, 至今尚无有效的治疗措施, 因此积极探索脑出血的发病机制, 寻找合理有效的药物显得尤为重要, 目前有研究提示, 炎症反应被认为是脑出血后急性期和继发性脑损伤的主要病理生理机制, 而炎症反应的主要标志为炎性细胞浸润和炎性因子的表达, 脑部的炎性细胞主要为小胶质细胞及外周血迁移的白细胞, 同时由其分泌一系列潜在的

促炎因子例如肿瘤坏死因子(TNF-α)和IL-1β等<sup>[19,20]</sup>。黄酮类化合物是广泛存在于自然界中的多酚类化合物, 它在植物的生长、发育、开花、结果以及抗菌防病等方面起着重要的作用<sup>[21,22]</sup>。洋葱属于百合科草本植物, 含有黄酮类、挥发油、硫化物、前列腺素类等化学成分。黄酮类作为其主要的生物活性成分, 其生理作用一直受到人们的关注, 经研究发现, 洋葱中的黄酮类化合物生物活性主要表现在消炎、抗癌、降压、降血脂、抗菌、抗氧化、抗衰老等多方面<sup>[23]</sup>。因此推断, 洋葱黄酮类提取物可能通过减轻炎症反应而减轻脑出血后脑损伤。

小胶质细胞为中枢神经系统中胶质细胞的一种类型, 约占所有脑细胞的10%~15%<sup>[24]</sup>, 其在神经系统炎症发生过程中起神经保护和神经损伤双重作用, 在神经系统炎性初期, 它可以迁移到炎性部位吞噬坏死的细胞核碎片, 起到保护神经细胞的作用, 而此期往往较短, 后期活化的小胶质细胞可分泌很多物质, 导致神经细胞坏死凋亡, 扩大损伤面积<sup>[25]</sup>, IL-1β与TNF-α就是比较重要的促炎因子, 他们表达增多可直接导致局部炎症反应增强和神经细胞退变<sup>[26]</sup>。本实验中, 大鼠脑出血模型制备成功后, 大鼠的行为学损伤程度与脑组织病理学变化相一致, 时间相吻合, 并且在对应时间点血肿周围小胶质细胞的活化及炎性因子的释放程度相互重叠, 在6h出现差异, 可能已经过了初期小胶质细胞对神经细胞的保护作用时间, 保护作用相对变弱, 而小胶质细胞分泌的促炎因子作用则相对较强所致, 提示脑出血后炎性因子的表达对于脑损伤起着重要的作用; 同时用洋葱黄酮类提取物干预后, 在观察时间点, 脑出血模型鼠行为学、病理组织有所改善, 小胶质细胞的活化及炎性因子的释放有所下降, 在初期无差异, 48h出现差异, 可能与初期活化的小胶质细胞释放促炎因子的时间、洋葱黄酮类提取物稳定的血药浓度以有关。进一步提示洋葱黄酮类提取物对于脑出血模型鼠的神经功能行为学及脑组织病理学的改善与抑制脑出血后血肿周围小胶质细胞的活化及促炎性因子的释放有关。

本研究在成功制备了大鼠脑出血模型及提取了洋葱黄酮类物质, 首次用洋葱黄酮类提取物在动物模型上治疗脑出血, 取得了一定的疗效, 并进一步探索了洋葱黄酮类提取物对脑出血的治疗作用可能与其抑制小胶质细胞的活化及炎性因子的表达有关, 为洋葱黄酮类提取物的在临床脑出血的应用提供实验依据, 但脑出血本身是一个复杂的病理过程, 洋葱黄酮类提取物对于脑出血的治疗可能还有有潜在的药理作用, 因此

需要更深的研究进步揭示洋葱黄酮类提取物治疗脑出血的作用机制。

### 参 考 文 献

- [1] Lee JC, Cho GS, Choi BO, et al. Intracerebral hemorrhage-induced brain injury is aggravated in senescence-accelerated prone mice[J]. *Stroke*, 2006, 37(1): 216–222.
- [2] 蒋小群, 郝子龙, 王秋筱, 等. 脑出血患者出血部位与病因构成的相关性研究[J]. *中国脑血管病杂志*, 2013, 10(5): 259–263.
- [3] Annunziato L, Boscia F, Pignataro G. Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia[J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2013, 33(7): 969–982.
- [4] Zhou G, He YL, He L, et al. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia [C]. The Fifth National Congress of the Chinese Immune Society and the Academic Conference, 2006.
- [5] Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain[J]. *Brain Res Rev*, 1995, 20(3): 269–287.
- [6] 祁英, 丁江涛, 苏景秀, 等. 洋葱中黄酮类化合物的分布及其抗氧化活性的研究[J]. *中国食物与营养*, 2010, 16(5): 67–71.
- [7] 张强, 孙玉军, 褚骏, 等. 洋葱中黄酮类化合物的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2009, 27(3): 74–79.
- [8] 张强, 王松华, 孙玉军, 等. 洋葱中黄酮类化合物体外抗氧化活性研究[J]. *农业机械学报*, 2009, 40(8): 139–142.
- [9] 何丹, 杜文婷, 范雪娇, 等. 洋葱中黄酮类提取物对血脑屏障的透过及神经保护作用研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(12): 1674–1679.
- [10] Lambert JD, Hong J, Yang C, et al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations [J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81(Suppl): S284–S291.
- [11] 尉艳霞, 何宣霖, 王若茜, 等. 不同方法提取的洋葱中类黄酮物质对肝癌细胞株 HepG2 的作用研究[J]. *华西药理学杂志*, 2008, 23(3): 307–309.
- [12] Xue M, del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fraction and brain cell death[J]. *Stroke*, 2000, 31(7): 1721–1727.
- [13] 包新民, 舒斯云主编. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 39–40.
- [14] Xi G, Keep RF, Hoff JT. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats[J]. *J Neurosurg*, 1998, 89(6): 991–996.
- [15] 周中和, 曲方, 何祥, 等. 一种改良大鼠自体血脑出血模型: 二次注血/退针[J]. *中国临床神经科学*, 2004, 12(4): 406–408.
- [16] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [17] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistic validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627–634.
- [18] Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral hemorrhage[J]. *Lancet*, 2009, 373(9675): 1632–1644.
- [19] Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2007, 27(5): 894–908.
- [20] Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage [J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 91(4): 463–477.
- [21] 李一卓. 仙人掌中黄酮类物质的研究进展[J]. *饮料工业*, 2011, 14(2): 15–18.
- [22] 黎乃维, 赵玉平, 杨建荣, 等. 水浸提法提取洋葱黄酮类化合物的工艺条件研究[J]. *食品科技*, 2007, 32(3): 110–113.
- [23] 耿敬章, 冯君琪. 黄酮类化合物的生理功能与应用研究[J]. *中国食物与营养*, 2007, 13(7): 62–64.
- [24] Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain [J]. *Neuroscience*, 1992, 48(2): 405–415.
- [25] Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date[J]. *Trends Neurosci*, 2006, 29(9): 506–510.
- [26] Paul W. Neuroinflammation: mechanisms and management. *Immunology and cell biology* [M]. New York: Humana Press, 1999: 190–193.

(收稿: 2015-04-05 修回: 2015-11-20)