

金丝桃苷抗小鼠脑缺血再灌注损伤的硫化氢机制

高珊珊¹ 陈 硕² 陈志武¹

摘要 目的 研究硫化氢(H_2S)在金丝桃苷(Hyp)抗小鼠脑缺血再灌注损伤中的作用。方法 建立胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)基因敲除($CSE^{-/-}$)小鼠及其同窝野生对照($CSE^{+/+}$)小鼠脑缺血再灌注模型,CSE为内源性 H_2S 合成酶;用小鼠跳台实验和水迷宫实验检测小鼠学习记忆功能;检测小鼠脑组织乳酸脱氢酶(LDH)活性和丙二醛(MDA)含量。结果 脑缺血再灌注后, $CSE^{-/-}$ 小鼠学习记忆功能的下降、脑组织LDH活性的下降、MDA含量的升高均较 $CSE^{+/+}$ 小鼠更明显,Hyp(50、100 mg/kg)能改善由于脑缺血再灌注导致的 $CSE^{+/+}$ 小鼠以上指标的变化,但对 $CSE^{-/-}$ 小鼠无改善作用。结论 内源性 H_2S 的缺失会加重小鼠脑缺血再灌注损伤;Hyp对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与CSE- H_2S 通路有关。

关键词 金丝桃苷;硫化氢;基因敲除;脑缺血再灌注损伤

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1292-05

缺血性脑血管疾病是临床上的常见病多发病,严重危害人类健康和影响社会发展,其发生发展的病理生理机制尚不十分清楚,临床治疗效果较差,因此,研究脑缺血性损伤的病理机制是目前研究的热点之一。金丝桃苷(hyperin, Hyp)属黄酮醇苷化合物,结构为槲皮素-3-半乳糖苷,广泛存在于杜鹃花科、藤黄科、豆科等多种植物中,研究^[1]显示Hyp对心肌缺血损伤、缺血性脑损伤等具有保护作用,但其保护机制尚不明确。前期研究^[2]显示Hyp具有脑血管舒张作用,且其舒张机制与内源性硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)有关,与此同时,外源性 H_2S 供体NaHS也能够舒张大鼠脑血管,且具有明显的抗脑缺血损伤作用^[3-4]。该实验通过建立内源性 H_2S 合成酶胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine γ -lyase, CSE)基因敲除(CSE knockout, $CSE^{-/-}$)小鼠及同窝野生对照($CSE^{+/+}$)小鼠脑缺血再灌注模型研究

Hyp抗脑缺血再灌注损伤的作用与 H_2S 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Hyp(安徽医学研究所);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 实验仪器 FA1004型电子天平(上海天平仪器厂);液氮罐(四川西亚机械有限公司);全自动酶标仪(美国BIO-RAD公司);超速冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);小鼠跳台仪(成都泰盟科技有限公司);Morris水迷宫系统(上海吉量软件科技有限公司)。

1.1.3 动物 C57BL/6J小鼠; $CSE^{-/-}$ 和 $CSE^{+/+}$ 小鼠,10~16周,(22 ± 3.0)g,基因型鉴定由上海南方模式生物科技发展有限公司完成,饲养于安徽医科大学实验动物中心,饲养温度:(22 ± 3) $^{\circ}C$ 。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 $CSE^{-/-}$ 和 $CSE^{+/+}$ 小鼠雌雄各半,分别随机分为5组:假手术组(Sham组)、脑缺血再灌注模型组(Model组)、Hyp(25、50、100 mg/kg)组。灌胃给药,Model组和Sham组灌胃给以等量生理盐水。连续灌胃3d,第3天灌胃1h后开始造模。

1.2.2 脑缺血再灌注模型 术前12h禁食、4h禁水,3.5%水合氯醛(0.1 ml/10 g)麻醉后,仰卧固定,剔除颈正中毛发,碘酒涂抹消毒,颈部正中切口,钝性分离暴露双侧颈总动脉,小心分离两侧迷走神经并穿线,小鼠清醒后结扎双侧颈总动脉造成脑部缺血,20 min后松开拉线恢复脑血液灌流,Sham组仅分离双侧颈总动脉但不结扎,仔细缝合,术后注意保温,常规饲养,术后12h进行跳台实验。

1.2.3 跳台实验 按文献^[5]方法将小鼠放入跳台仪中,适应5 min后,给铁栅上通以36 V交流电刺激小鼠,记录小鼠受电刺激后跳上平台的时间作为学习的潜伏期,并记录通电5 min内小鼠受到的电击次数作为学习错误次数,以这两项指标评价小鼠

2016-05-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173596、81374002)

作者单位:安徽医科大学¹药理学教研室、²生理学教研室,合肥230032

作者简介:高珊珊,女,硕士研究生;

陈志武,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

chpharmzw@163.com

学习功能。24 h 后,将小鼠置于平台上,底部铁栅通以 36 V 交流电,记录小鼠跳至铁栅受到电刺激的时间作为记忆潜伏期,若 5 min 内小鼠未跳下平台,潜伏期按 300 s 计算,并以 5 min 内受到电击次数作为记忆错误次数,以这二项指标来评价小鼠记忆功能。小鼠跳台实验结束后,断头取脑,脑组织保存于液氮中用于检测脑组织 LDH 活性和 MDA 含量。

1.2.4 水迷宫实验^[6-7] 圆形恒温水池,水温保持在(22±1)℃,按东南西北 4 个方向将水池平均划分为 4 个象限(NE、SE、SW、NW),因水池内壁均为黑色,而本实验所用 C57BL/6J 小鼠也为黑色,为使水迷宫视频采集系统能准确跟踪小鼠位置,实验前在池中加入适量食用色素二氧化钛粉末,将池水染为乳白色,平台位于水面下 1 cm,使肉眼无法看到平台位置。正式实验时将平台固定在 SW 象限。按 1.2.2 所述方法造模,实验分组同小鼠跳台实验,造模后第 3 天(即正式实验前 1 d)让小鼠自由游泳 1 min(不放置平台)。

1.2.4.1 定位航行实验 历时 4 d,每日每只小鼠测试 4 次,第 1 次和第 4 次从目标象限(SW)和其对侧的象限(NE)入水,第 2 次和第 3 次采用随机法确定入水象限(SE 和 NW 象限),为避免小鼠按向左或向右的方向去定位,同一次测试中所有动物的入水点相同且入水方向均为面朝水池壁。监测时间为 60 s,将小鼠入水至寻台成功的时间记作逃避潜伏期,若小鼠在平台上停留超过 2 s 则判断为寻台成功,实验终止;若小鼠 60 s 内未找到平台则潜伏期记为 60 s,并将小鼠引导至平台停留 15 s。

1.2.4.2 空间搜索实验 定位航行实验结束后开始空间探索实验,即实验第 5 天,撤去 SW 象限的平台,将小鼠由 NE 象限入水,记录小鼠在 60 s 内穿过原平台所在位置的次数、原平台所在象限的游程比率以及时间比率(即动物在原平台所在象限的游程和时间占总游程和总时间的比率),评价空间记忆能力。

1.2.5 脑组织 LDH 活力和 MDA 含量检测 各组小鼠脑组织低温下制成匀浆,离心后取上清液,将上清液分装,一部分用于 LDH 活力检测,另一部分用于 MDA 含量检测。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,严格按照 LDH 及 MDA 测定试剂盒说明书进行操作,用酶标仪测定吸光度,计算各组 LDH 活性及 MDA 含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 *t* 检验,

多组之间比较时采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CSE 基因敲除对 Hyp 促进小鼠学习记忆功能的影响(跳台实验) 在 CSE^{+/+}小鼠中,与 CSE^{+/+} Sham 组比较,CSE^{+/+} Model 组学习潜伏期延长,记忆潜伏期缩短,学习与记忆错误次数均增多,差异均有统计学意义($F = 5.7, 3.4, 5.1, 3.4, P < 0.01$);与 CSE^{+/+} Model 组比较,Hyp 50 mg/kg 能缩短脑缺血再灌注后 CSE^{+/+}小鼠学习潜伏期,减少学习错误次数($F = 5.7, 5.1, P < 0.05$),Hyp 100 mg/kg 能缩短 CSE^{+/+}小鼠学习潜伏期,延长记忆潜伏期,减少学习和记忆错误次数($F = 5.7, 3.4, 5.1, 3.4, P < 0.05, P < 0.01$)。在 CSE^{-/-}小鼠中,与 CSE^{-/-} Sham 组比较,CSE^{-/-} Model 组学习潜伏期延长,记忆潜伏期缩短,学习与记忆错误次数均增多,差异均有统计学意义($F = 4.1, 23.5, 7.5, 9.1, P < 0.01$);与 CSE^{+/+} Model 组比较,CSE^{-/-} Model 组小鼠以上指标改变更为显著($t = -3.0, 2.4, -2.3, -4.7, P < 0.01$);Hyp 对脑缺血再灌注后的 CSE^{-/-}小鼠的以上指标无明显改善作用,与 CSE^{-/-} Model 组比较差异无统计学意义。见表 1。

2.2 CSE 基因敲除对 Hyp 促进小鼠学习记忆功能的影响(水迷宫实验) 在水迷宫定位航行实验的第 3、4 天:在 CSE^{+/+}小鼠中,CSE^{+/+} Model 组的逃避潜伏期与 CSE^{+/+} Sham 组比较均延长,差异有统计学意义($F = 4.7, 19.7, P < 0.01$);在 CSE^{-/-}小鼠中,CSE^{-/-} Model 组的逃避潜伏期与 CSE^{-/-} Sham 组相比也均延长($F = 8.6, 6.0, P < 0.01$),且 CSE^{-/-} Model 组第 3、4 天逃避潜伏期延长较 CSE^{+/+} Model 组更显著,差异有统计学意义($t = -2.6, -3.2, P < 0.05, P < 0.01$),见图 1C;Hyp 50、100 mg/kg 能够缩短 CSE^{+/+}脑缺血再灌注小鼠第 3、4 天的逃避潜伏期,与 CSE^{+/+} Model 组比较差异有统计学意义($F = 4.7, 19.7, P < 0.05, P < 0.01$),见图 1A;Hyp 对脑缺血再灌注后的 CSE^{-/-}小鼠逃避潜伏期无缩短作用,与 CSE^{-/-} Model 组比较差异无统计学意义,见图 1B。

水迷宫空间探索实验结果见表 2,CSE^{+/+}小鼠中,与 CSE^{+/+} Sham 组比较 CSE^{+/+} Model 小鼠的穿过原平台次数、原平台象限时间比率及原平台象限游程比率均显著减少,差异有统计学意义($F = 6.0, 10.0, 11.78, P < 0.01$);在 CSE^{-/-}小鼠中,CSE^{-/-} Model 组与 CSE^{-/-} Sham 组比较,以上三项指标也

表1 CSE 基因敲除对 Hyp 促进脑缺血再灌注小鼠跳台实验的影响 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠基因型	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (s)		错误次数 (次)	
			学习	记忆	学习	记忆
Sham	CSE ^{+/+}	-	24.4 ± 7.0	182.4 ± 38.2	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.5
	CSE ^{-/-}	-	29.1 ± 8.9	175.2 ± 36.9	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.4
Model	CSE ^{+/+}	-	40.8 ± 9.5**	107.6 ± 47.4**	2.9 ± 0.8**	2.1 ± 0.6**
	CSE ^{-/-}	-	56.6 ± 11.8**##	61.4 ± 28.7**##	4.0 ± 1.1**##	3.5 ± 0.5**##
Hyp	CSE ^{+/+}	25	40.2 ± 9.9	114.9 ± 57.6	2.8 ± 1.6	1.8 ± 0.9
	CSE ^{-/-}	25	50.6 ± 20.5	64.9 ± 28.4	3.5 ± 1.2	3.2 ± 1.0
Hyp	CSE ^{+/+}	50	31.1 ± 7.1 [#]	126.1 ± 63.7	1.9 ± 0.9 [#]	1.6 ± 0.8
	CSE ^{-/-}	50	46.6 ± 16.5	68.5 ± 28.7	3.2 ± 1.3	3.0 ± 0.8
Hyp	CSE ^{+/+}	100	26.2 ± 12.4 ^{##}	165.8 ± 51.5 [#]	1.4 ± 0.8 ^{##}	1.2 ± 0.5 [#]
	CSE ^{-/-}	100	45.5 ± 14.9	72.6 ± 24.0	3.0 ± 1.2	2.9 ± 0.9

与 CSE^{+/+} Sham 组或 CSE^{-/-} Sham 组比较: **P < 0.01; 与 CSE^{+/+} Model 组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

表2 CSE 基因敲除对 Hyp 促进脑缺血再灌注小鼠水迷宫空间搜索实验的影响 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠基因型	剂量 (mg/kg)	穿台次数 (次)	原平台象限时间比率 (%)	原平台象限游程比率 (%)
Sham	CSE ^{+/+}	—	2.88 ± 0.64	38.74 ± 5.62	37.60 ± 4.13
	CSE ^{-/-}	—	2.62 ± 0.52	38.53 ± 5.29	37.26 ± 5.09
Model	CSE ^{+/+}	—	1.75 ± 0.46**	25.32 ± 5.14**	26.50 ± 3.81**
	CSE ^{-/-}	—	1.00 ± 0.53**##	15.31 ± 4.16**##	16.12 ± 5.26**##
Hyp	CSE ^{+/+}	25	1.88 ± 0.64	26.19 ± 4.78	26.48 ± 4.48
	CSE ^{-/-}	25	1.12 ± 0.35	16.06 ± 3.89	17.73 ± 4.79
Hyp	CSE ^{+/+}	50	2.50 ± 0.53 [#]	32.27 ± 5.33 [#]	33.02 ± 4.97 ^{##}
	CSE ^{-/-}	50	1.25 ± 0.46	17.65 ± 5.46	17.64 ± 4.96
Hyp	CSE ^{+/+}	100	2.62 ± 0.52 ^{##}	35.22 ± 5.65 ^{##}	36.48 ± 4.43 ^{##}
	CSE ^{-/-}	100	1.38 ± 0.52	19.22 ± 5.09	18.06 ± 4.33

与 CSE^{+/+} Sham 组或 CSE^{-/-} Sham 组比较: **P < 0.01; 与 CSE^{+/+} Model 组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

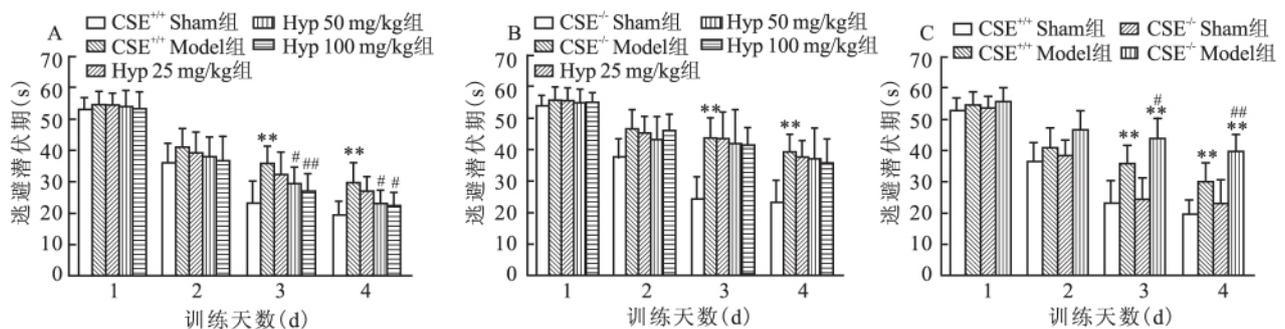


图1 CSE 基因敲除对 Hyp 促进脑缺血再灌注小鼠水迷宫定位航行实验的影响 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

与 CSE^{+/+} Sham 组或 CSE^{-/-} Sham 组比较: **P < 0.01; 与 CSE^{+/+} Model 组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

均减少, 差异有统计学意义 (F = 14.9、32.5、26.5, P < 0.01), 且与 CSE^{+/+} Model 组比较, CSE^{-/-} Model 组以上三项指标减少更为显著, 差异有统计学意义 (t = 3.0、4.3、20.5, P < 0.01); Hyp 50、100 mg/kg 能够抑制 CSE^{+/+} 小鼠由于脑缺血再灌注导致的以上三项指标的减少, 与 CSE^{+/+} Model 组比较差异有统计学意义 (F = 14.9、32.5、26.5, P < 0.05, P < 0.01); Hyp 对脑缺血再灌注后的 CSE^{-/-} 小鼠以上指标无改善作用, 与 CSE^{-/-} Model 组比较差异无统计学意义。

2.3 CSE 基因敲除对 Hyp 抑制脑缺血再灌注小鼠脑组织 LDH 活性下降的影响 分别与 CSE^{+/+} Sham 和 CSE^{-/-} Sham 组比较, CSE^{+/+} Model 和 CSE^{-/-} Model 组小鼠脑组织 LDH 活性均显著下降, 差异有统计学意义 (F = 23.7、22.2, P < 0.01); 且与 CSE^{+/+} Model 组小鼠比较, CSE^{-/-} Model 组小鼠脑组织中 LDH 活性下降更为显著, 差异有统计学意义 (t = 2.5, P < 0.05); 50、100 mg/kg Hyp 对脑缺血再灌注引起的 CSE^{+/+} 小鼠脑组织 LDH 活性下降有明显的抑制作用, 与 CSE^{+/+} Model 组比较差异有统计

学意义($F = 23.7$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); 在 $CSE^{-/-}$ 小鼠中 Hyp 抑制 LDH 活性下降的作用消失, 与 $CSE^{-/-}$ Model 组比较差异无统计学意义。见图 2。

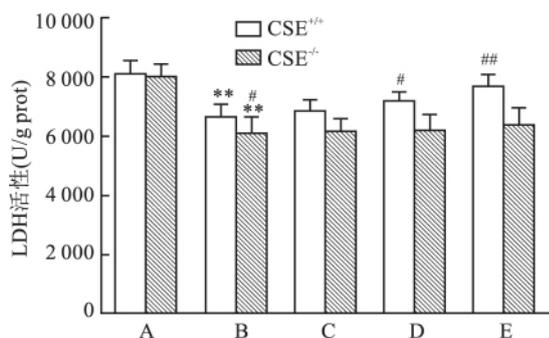


图 2 CSE 基因敲除对 Hyp 抑制脑缺血再灌注小鼠脑组织 LDH 活性下降的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

A: Sham 组; B: Model 组; C: Hyp 25 mg/kg 组; D: Hyp 50 mg/kg 组; E: Hyp 100 mg/kg 组; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 $CSE^{+/+}$ Model 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 CSE 基因敲除对 Hyp 抑制脑缺血再灌注小鼠脑组织 MDA 含量升高的影响 分别与 $CSE^{+/+}$ Sham 和 $CSE^{-/-}$ Sham 组比较, $CSE^{+/+}$ Model 和 $CSE^{-/-}$ Model 组小鼠脑组织 MDA 含量均显著升高, 差异有统计学意义 ($F = 7.6, 8.4$, $P < 0.01$); 且与 $CSE^{+/+}$ Model 组小鼠比较, $CSE^{-/-}$ Model 组小鼠脑组织中 MDA 含量升高更为显著, 差异有统计学意义 ($t = -2.3$, $P < 0.05$); Hyp 50、100 mg/kg 对脑缺血再灌注引起的 $CSE^{+/+}$ 小鼠脑组织 MDA 含量升高有明显的抑制作用, 与 $CSE^{+/+}$ Model 组比较差异有统计学意义 ($F = 7.6$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); 在 $CSE^{-/-}$ 小鼠中, Hyp 抑制 MDA 含量升高的作用消失, 与 $CSE^{-/-}$ Model 组比较差异无统计学意义。见图 3。

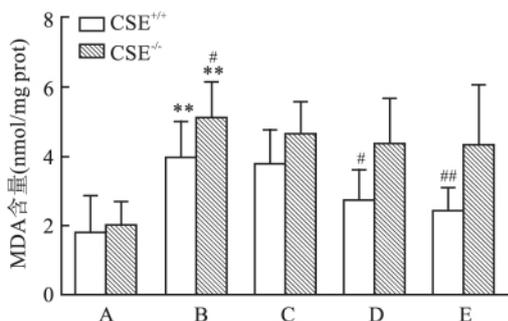


图 3 CSE 基因敲除对 Hyp 抑制脑缺血再灌注小鼠脑组织 MDA 含量升高的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

A: Sham 组; B: Model 组; C: Hyp 25 mg/kg 组; D: Hyp 50 mg/kg 组; E: Hyp 100 mg/kg 组; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 $CSE^{+/+}$ Model 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

本课题组前期研究^[8]显示 H_2S 、Hyp 和映山红花总黄酮 (TFR) 均具有抗脑缺血损伤作用, 且 TFR 抗脑缺血损伤作用与 $CSE-H_2S$ 通路有关, 而且 Hyp 对脑血管的舒张作用与 $CSE-H_2S$ 通路有关。CSE 为内源性 H_2S 合成酶, 且 CSE 在脑血管内皮细胞和平滑肌细胞中均有表达。因此本实验将研究作为 TFR 主要成分之一的 Hyp 对脑缺血再灌注损伤的保护作用与 $CSE-H_2S$ 通路的关系。学习和记忆是至关重要的脑功能^[9], 脑缺血损伤大多会造成学习记忆能力的下降, 跳台实验和水迷宫实验是经典的评价学习记忆能力的两种行为学实验。Morris 水迷宫实验是英国心理学家 Morris 设计的用于研究空间学习记忆的经典实验, 近年来广泛用于学习记忆方面的研究^[10]。跳台实验结果显示, Hyp 能够缩短脑缺血再灌注后 $CSE^{+/+}$ 小鼠的学习潜伏期, 延长记忆潜伏期, 并减少学习和记忆的错误次数, 即 Hyp 对脑缺血再灌注所致的学习记忆障碍有一定改善作用, 但 Hyp 对脑缺血再灌注所致的 $CSE^{-/-}$ 小鼠学习记忆障碍无改善作用, 且与 $CSE^{+/+}$ Model 组小鼠比较, $CSE^{-/-}$ Model 组由于脑缺血再灌注所致的学习记忆障碍更为严重, 提示内源性 H_2S 的缺失会加重脑缺血再灌注损伤, 且 Hyp 抗小鼠脑缺血再灌注损伤作用与 $CSE-H_2S$ 通路有关。

在水迷宫实验中, Hyp 能够缩短脑缺血再灌注后 $CSE^{+/+}$ 小鼠的逃避潜伏期, 提高穿过原平台次数、原平台象限游程比率及原平台象限时间比率, 即 Hyp 对脑缺血再灌注所致的学习记忆障碍有改善作用。与小鼠跳台实验一致, Hyp 对脑缺血再灌注所致的 $CSE^{-/-}$ 小鼠学习记忆障碍无改善作用, 且与 $CSE^{+/+}$ Model 组小鼠比较, $CSE^{-/-}$ Model 组由于脑缺血再灌注所致的学习记忆障碍更为严重, 水迷宫实验同样提示内源性 H_2S 的缺失会加重脑缺血再灌注损伤, 且 Hyp 抗小鼠脑缺血再灌注损伤作用与 $CSE-H_2S$ 通路有关。

脑缺血再灌注损伤由多种复杂因素相互作用导致, 其中氧自由基脂质过氧化是脑缺血再灌注损伤的重要原因^[11]。脑缺血后, 由于脑细胞通透性增加, LDH 向外释放, 使得脑组织 LDH 活性下降, 同时脑缺血后会激活一系列酶促反应, 促进自由基生成, 发生脂质过氧化反应, 导致脑组织中脂质过氧化产物 MDA 含量升高^[11], 因此, 脑组织 LDH 活性和 MDA 含量可以作为评价脑组织损伤的指标^[12]。本

研究显示 Hyp 能够抑制 CSE^{+/+} 小鼠由于脑缺血再灌注导致的脑组织 LDH 活性的降低,同时抑制 MDA 含量的升高,但对脑缺血再灌注后的 CSE^{-/-} 小鼠无此作用,且与 CSE^{+/+} Model 组小鼠比较, CSE^{-/-} Model 组由于脑缺血再灌注所致的脑组织 LDH 活性的降低、MDA 含量的升高更为明显,提示内源性 H₂S 的缺失会加重脑缺血再灌注损伤,且 Hyp 抗小鼠脑缺血再灌注损伤作用与 CSE-H₂S 通路有关。

综上所述,本实验表明内源性 H₂S 的缺失会加重小鼠脑缺血再灌注损伤,且 Hyp 抗小鼠脑缺血再灌注损伤作用与 CSE-H₂S 通路有关。

参考文献

- [1] 陈志武,马传庚,赵维忠. 金丝桃甙对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 药学学报, 1998, 33(1): 14-7.
- [2] Fan Y F, Chen Z W, Guo Y, et al. Cellular mechanisms underlying hyperin-induced relaxation of rat basilar artery [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(4): 626-31.
- [3] Han J, Chen Z W, He G W. Acetylcholine-and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat [J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 121(4): 318-26.
- [4] Yu Q, Lu Z, Tao L, et al. ROS-dependent neuroprotective effects of NaHS in ischemia brain injury involves the PARP/AIF pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1539-51.
- [5] 何丹丹,张磊,刘力等. 骆驼蓬子总生物碱改善小鼠学习记忆能力[J]. 中成药, 2015, 37(3): 478-82.
- [6] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 848-58.
- [7] 程娟,王涛涛,唐伟等. 慢性复合应激致老年小鼠学习记忆损伤及机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(12): 1466-9.
- [8] Han J, He G W, Chen Z W. Protective effect and mechanism of total flavones from rhododendron simsii planch on endothelium-dependent dilatation and hyperpolarization in cerebral ischemia-reperfusion and correlation to hydrogen sulphide release in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 904019.
- [9] 程明,朱熊兆. 学习记忆的行为学研究方法[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1): 65-6.
- [10] 罗小泉,骆利平,陈海芳等. Morris 水迷宫检测大鼠记忆力方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2667-9.
- [11] Homi H M, Freitas J J, Curi R, et al. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 333(1): 37-40.
- [12] Aras M, Urfall B, Serarslan Y, et al. Protective effects of minocycline against short-term ischemia-reperfusion injury in rat brain [J]. *Pediatr Neurosurg*, 2014, 49(3): 172-8.

The H₂S mechanism of Hyp against cerebral ischemia reperfusion injury in mice

Gao Shanshan¹, Chen Shuo², Chen Zhiwu¹

(¹Dept of Pharmacology, ²Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the effect of hydrogen sulfide(H₂S) in the protective action of hyperin(Hyp) on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Methods** Cerebral ischemia/reperfusion models were established in cystathionine γ -lyase(CSE, a generating enzyme of H₂S) -knockout(CSE^{-/-}) and wide-type(CSE^{+/+}) mice. The abilities of learning and memory in mice were detected by the step down test and Morris water maze test. The activities of lactate dehydrogenase(LDH) and the contents of malondialdehyde(MDA) in brain tissue were measured. **Results** After cerebral ischemia/reperfusion, the impairments of learning and memory abilities in mice, reductions of LDH activities and elevations of MDA contents in brain tissue were more obvious in CSE^{-/-} mice than that in CSE^{+/+} mice. Impairments of learning and memory abilities, reductions of LDH activities and elevations of MDA contents were markedly inhibited by Hyp(50, 100 mg/kg) in CSE^{+/+} mice rather than that in CSE^{-/-} mice. **Conclusion** Cerebral ischemia/reperfusion injury is aggravated in the absence of endogenous H₂S. CSE-H₂S pathway is involved in the protective effect of Hyp on cerebral ischemia/reperfusion injuries in mice.

Key words hyperin; hydrogen sulfide; knockout; cerebral ischemia/reperfusion injuries