

## Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用

耿武军<sup>1,2</sup>, 陈成宇<sup>2</sup>, 莫云长<sup>2</sup>, 洪万东<sup>3</sup>, 唐红丽<sup>2</sup>, 戴勤学<sup>2</sup>, 俞卫锋<sup>4</sup>

(1. 苏州大学附属第三医院麻醉科, 江苏省常州市 215006; 温州医科大学附属第一医院

2. 麻醉科, 3. 消化内科, 浙江省温州市 325000; 4. 上海东方肝胆外科医院麻醉科, 上海市 200438)

[关键词] Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 脑缺血再灌注损伤; 参麦注射液; 脑保护

[摘要] **目的** 观察 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是否介导参麦注射液(SM)对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠的脑保护作用。**方法** 84 只 SD 大鼠按随机区组的方法分成 7 组:假手术组(Sham)、模型组(MCAO)、参麦注射液+模型组(SM+MCAO)、生理盐水(NS)+模型组(NS+MCAO)、磷酸盐缓冲液(PBS)+参麦注射液+模型组(PBS+SM+MCAO)、Wnt/ $\beta$ -catenin 拮抗剂 Dickkopf-1(Dkk-1)+参麦注射液+模型组(Dkk-1+SM+MCAO)、Dkk-1+模型组(Dkk-1+MCAO), 每组 12 只。采用线栓大脑中动脉阻塞(MCAO)法建立大鼠 CIRI 模型。在脑缺血即刻, SM+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组、Dkk-1+SM+MCAO 组大鼠腹腔注射参麦注射液(15 mL/kg), NS+MCAO 组大鼠注射等量生理盐水。Dkk-1+SM+MCAO 组、Dkk-1+MCAO 组大鼠分别在建立模型前 30 min 脑室注射 Dkk-1(1 g/L, 1  $\mu$ L), PBS+SM+MCAO 组大鼠脑室注射等量 PBS。再灌注 24 h, 评估各组大鼠神经行为学评分, 检测脑梗死体积以及脑梗死半暗带区 Bcl-2、Bax 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达量, 并计算 Bcl-2/Bax 比率。**结果** 与假手术组相比, MCAO 组大鼠神经行为学评分、脑梗死体积、Bcl-2 和 Bax 以及  $\beta$ -catenin 蛋白表达量均增加( $P < 0.05$ ), 而 Bcl-2/Bax 比率减小( $P < 0.05$ ); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组大鼠神经行为学评分、脑梗死体积以及 Bax 蛋白表达量明显减少( $P < 0.05$ ), Bcl-2 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达量以及 Bcl-2/Bax 比率明显增加( $P < 0.05$ ); 与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组大鼠神经行为学评分、脑梗死体积、Bax 蛋白表达量明显增加( $P < 0.05$ ), 而 Bcl-2 蛋白表达量、Bcl-2/Bax 比率明显减小( $P < 0.05$ )。**结论** 参麦注射液通过上调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路改善 CIRI 大鼠的脑损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway mediates the protective effect of Shenmai injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

GENG Wu-Jun<sup>1,2</sup>, CHEN Cheng-Yu<sup>2</sup>, MO Yun-Chang<sup>2</sup>, HONG Wan-Dong<sup>3</sup>, TANG Hong-Li<sup>2</sup>, DAI Qin-Xue<sup>2</sup>, YU Wei-Feng<sup>4</sup>

(1. Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 215006, Jiangsu, China; 2. Department of Anesthesiology, 3. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 4. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[KEY WORDS] Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Shenmai injection; Cerebral protection

[ABSTRACT] **Aim** To observe whether the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway mediates the protective effect of Shenmai injection (SM) on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in rats. **Methods** According to the randomized block principle, 84 SD rats were divided into 7 groups: sham operation group (sham), model group (MCAO), SM+model group (SM+MCAO), normal saline (NS)+model group (NS+MCAO), phosphate buffered solution (PBS)+SM+model group (PBS+SM+MCAO), Wnt/ $\beta$ -catenin antagonist dickkopf-1 (Dkk-1)+SM+model group (Dkk-1+SM+MCAO), Dkk-1+model group (Dkk-1+MCAO). Each group had 12 rats. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) method was used to establish the CIRI model in rats. At the onset of cerebral ischemia, SM+MCAO group, PBS+SM+MCAO group, and Dkk-1+SM+MCAO group rats were intraperitoneally injected with Shenmai injection (15 mL/kg), NS+MCAO group rats were injected with an equal volume of physiological saline. Dkk-1+SM+MCAO group and Dkk-1+MCAO group rats were intracerebroventricularly injected with Dkk-1 (1 g/L, 1  $\mu$ L) 30 min before model establishment. PBS+SM+MCAO group rats were intracerebroventricularly injected with an equal volume of PBS. After 24 h of reperfusion, the neurobehavioral scores of each group were evaluated, the volume of cerebral infarction and the volume of the penumbra were measured, and the expression levels of Bcl-2, Bax, and  $\beta$ -catenin protein in the penumbra were measured. The Bcl-2/Bax ratio was also calculated. **Results** Compared with the sham group, the MCAO group rats showed significantly increased neurobehavioral scores, cerebral infarction volume, Bcl-2, Bax, and  $\beta$ -catenin protein expression levels ( $P < 0.05$ ), and significantly decreased Bcl-2/Bax ratio ( $P < 0.05$ ). Compared with the MCAO group, the SM+MCAO group rats showed significantly decreased neurobehavioral scores, cerebral infarction volume, and Bax protein expression levels ( $P < 0.05$ ), and significantly increased Bcl-2 and  $\beta$ -catenin protein expression levels and Bcl-2/Bax ratio ( $P < 0.05$ ). Compared with the SM+MCAO group, the Dkk-1+SM+MCAO group rats showed significantly increased neurobehavioral scores, cerebral infarction volume, and Bax protein expression levels ( $P < 0.05$ ), and significantly decreased Bcl-2 protein expression level and Bcl-2/Bax ratio ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Shenmai injection improves CIRI in rats by upregulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

[收稿日期] 2017-12-15

[修回日期] 2018-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774109、81603685);温州市科技局公益性科技计划项目(Y20170143)

[作者简介] 耿武军, 硕士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为器官保护, E-mail 为 gengwujun@126.com。通讯作者俞卫锋, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为器官保护, E-mail 为 yuweifeng@renji.com。

MCAO), Dkk-1+model group (Dkk-1+MCAO), 12 rats in each group. Rat CIRI model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with line embolus. Immediately after cerebral ischemia, SM+MCAO group, PBS+SM+MCAO group and Dkk-1+SM+MCAO group were intraperitoneally injected with SM (15 mL/kg), whereas NS+MCAO group was injected with equal amount of NS. At 30 min before the model was set up, Dkk-1+SM+MCAO group and Dkk-1+MCAO group were injected with Dkk-1 (1 g/L, 1  $\mu$ L) to the ventricle, whereas PBS+SM+MCAO group was injected with equal amount of PBS. After reperfusion for 24 h, neurobehavioral score was assessed in each group, cerebral infarction volume was measured, expressions of Bcl-2, Bax and  $\beta$ -catenin protein were detected in the semi-dark zone of cerebral infarction, and Bcl-2/Bax ratio was calculated. **Results** Compared with the sham group, neurobehavioral score, cerebral infarction volume, and the expressions of Bcl-2, Bax, and  $\beta$ -catenin proteins were increased in the MCAO group ( $P < 0.05$ ), and Bcl-2/Bax ratio was reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the MCAO group, neurobehavioral score, cerebral infarction volume and Bax protein expression were significantly reduced in the SM+MCAO group ( $P < 0.05$ ), the expressions of Bcl-2 and  $\beta$ catenin proteins and Bcl-2/Bax ratio were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the SM+MCAO group, neurobehavioral score, cerebral infarction volume and Bax protein expression were significantly increased in the Dkk-1+SM+MCAO group ( $P < 0.05$ ), while Bcl-2 protein expression and Bcl-2/Bax ratio were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Shenmai injection improves brain damage of CIRI rat by up-regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

脑梗死是临床上常见的疾病,给家庭和社会带来沉重的打击与经济压力<sup>[1]</sup>。临床和基础研究都显示参麦注射液具有神经保护作用<sup>[2]</sup>,但是关于其具体机制研究比较少见。研究表明抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路会促进缺血再灌注损伤引起的神经元细胞凋亡,增加脑损伤的氧化应激以及炎症反应<sup>[3]</sup>;而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以缓解脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI),能够减少缺血再灌注引起的神经元凋亡,减轻脑损伤的氧化应激以及炎症反应,具有神经保护作用<sup>[4]</sup>。那么 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是否介导参麦注射液对 CIRI 大鼠的脑保护作用,为此本论文将展开研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

健康雄性成年 SD 大鼠共 87 只,清洁级,体重  $230 \pm 15$  g,由温州医科大学动物房提供,合格证号:2007000512334。在实验前 1 周购买,饲养于标准动物房内。

### 1.2 试剂和仪器

参麦注射液(正大青春宝药业有限公司,批号:国药准字 Z33020021,规格:每支 10 mL);2% 氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC;购置美国 Sigma 公司,批号:17779); $\beta$ -catenin 抗体(购自美国 Santa Cruz 公司,批号:H-102);Bcl-2 抗体(购自美国 Bioworld Technology 公司,批号:SY20134321);Bax 抗体(购自美国 Abcam 公司,批号:ab53154)。生理盐

水(normal saline, NS);10% 水合氯醛。线头直径为  $0.32 \pm 0.02$  mm 的尼龙线栓(北京沙东生物技术有限公司)。酶标仪(DENLEY DRAGON Wellscan MK3, Thermo, 芬兰);Olympus BX4 TF 显微镜等。

### 1.3 动物模型制备

参考文献<sup>[5]</sup>,75 只 SD 大鼠,采用线栓大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法建立 MCAO 模型。将大鼠用 10% 水合氯醛麻醉(400 mg/kg,腹腔注射)后,仰卧位固定,颈部皮肤剃毛、去皮后分离出左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。将颈外动脉结扎后离断,再用动脉夹暂时夹闭颈总动脉,在颈外动脉末端处剪一小口,用眼科镊置入线栓圆头端直至 MCA,置入深度约 1.8~2.0 cm,遇阻力立刻停止,固定线栓,切口缝合。脑缺血 2 h 后,拔出线栓,再灌注 24 h 处死动物,采取相应标本。大鼠苏醒时采用 Longa 等<sup>[6]</sup>的方法进行大鼠神经行为学评分,0 分剔除(3 只大鼠为 0 分,剔除出实验),1 分以上的大鼠为造模成功,视为观察对象。造模全过程监测大鼠直肠温度保持  $37.0 \pm 0.2$   $^{\circ}$ C。另外 12 只假手术组大鼠除不堵塞 MCA,其余操作同造模大鼠。

### 1.4 动物分组

将 84 只造模成功的 SD 大鼠按随机区组法分成 7 组:假手术组(Sham)、模型组(MCAO)、参麦注射液(Shenmai injection, SM)+模型组(SM+MCAO)、生理盐水+模型组(NS+MCAO)、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)+参麦注射液+模型组(PBS+SM+MCAO)、Dickkopf-1(Dkk-1)+参麦注射液+模型组(Dkk-1+SM+MCAO)、Dkk-1+模型组

(Dkk-1+MCAO), 每组 12 只。

### 1.5 给药方法

在脑缺血即刻, SM+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组、Dkk-1+SM+MCAO 组大鼠腹腔注射参麦注射液 (15 mL/kg)<sup>[2]</sup>, NS+MCAO 组大鼠腹腔注射等量生理盐水。Dkk-1+SM+MCAO 组、Dkk-1+MCAO 组大鼠分别在建立模型前 30 min 脑室注射 Wnt/ $\beta$ -catenin 拮抗剂 Dkk-1 (1  $\mu$ L)<sup>[7]</sup>, PBS+SM+MCAO 组大鼠脑室注射等量 PBS。Dkk-1 溶解在无菌 PBS 中, 浓度 1 g/L。脑室内注射: 注射速度 1  $\mu$ L/min。脑室定位参数: 距离囟门后 0.8 mm, 横向 1.5 mm, 深度 3.5 mm。

### 1.6 脑梗死半暗带区取样方法

参照 Ashwal 等<sup>[8]</sup>的方法取出脑梗死半暗带区, 大鼠常规麻醉后断头, 取出大脑组织放在冰面上, 用刀片将大脑均分成 3 片, 取中间一片脑组织。在脑梗死侧离脑中线 2 mm 的位置切开, 将整个脑片比喻成 1 个时钟, 在 2 点和 8 点连线处再切一刀, 中间的小片脑组织就是脑梗死半暗带区, 黑色区域为脑梗死半暗带区 (图 1)。

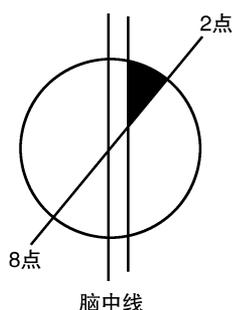


图 1. 脑梗死半暗带区取样方法示意图

Figure 1. Schematic diagram of sampling method in the semi-dark zone of cerebral infarction

### 1.7 检测指标及方法

1.7.1 神经行为学评分 CIRI 24 h, 参照文献<sup>[6]</sup>, 采用单盲法对所有大鼠进行神经行为学评分。0 分: 无功能障碍; 1 分: 不能完全伸展左侧前肢; 2 分: 向左旋转; 3 分: 躯体向左侧倾倒; 4 分: 无自主活动, 伴意识障碍。

1.7.2 脑梗死体积测量 各组随机取 6 只大鼠, 在 CIRI 24 h 时处理, 取出脑组织, 放置脑磨具中切成脑片 (5 片, 厚度为 2 mm), 浸泡在 2% TTC 溶液中染色 30 min, 染成红色部分为正常脑组织, 染成白色部分为脑梗死组织, 并采用相机拍照存储。梗死体积百分比等于梗死侧的梗死体积除以正常侧体积。

1.7.3 Bcl-2、Bax、 $\beta$ -catenin 蛋白表达 各组剩余的 6 只大鼠, 在 CIRI 24 h 时处死, 取出脑梗死半暗带区, 采用 Western blot 法检测梗死半暗带区的 Bcl-2、Bax、 $\beta$ -catenin 蛋白表达量。总蛋白的提取采用细胞蛋白提取试剂盒, 按照说明书步骤操作。等量样品经聚偏二氟乙烯膜分离蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 转移后的硝酸纤维素膜经牛血清白蛋白孵育 1 h, 再封闭后, 分别加入一抗 ( $\beta$ -catenin、Bcl-2、Bax 抗体) 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育并过夜。室温下摇床 TBST 冲洗, 二抗 (山羊抗兔) 孵育 1 h, 化学发光, 显影、成像。 $\beta$ -actin 作为内参对照。应用 Alphaimager 2200 凝胶图像处理系统分析目的蛋白。蛋白表达水平用目的蛋白条带光密度值与  $\beta$ -actin 条带光密度值的比值来表示。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐采用 LSD 法检验进行两两比较, 若方差不齐则采用 Tamhane 检验进行两两比较。神经行为学评分采用非参数秩和检验 Kruskal-Wallis 方法检验, 若组间比较存在差异则用 Nemenyi 方法继续进行两两比较。P<0.05 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠神经行为学评分比较

造模的大鼠有 3 只神经行为学评分为零分, 剔除实验, 其余大鼠均纳入实验中。与假手术组相比, MCAO 组大鼠神经行为学评分增加 (P<0.05); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组评分减少 (P<0.05); 与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组评分明显增加 (P<0.05; 表 1)。MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组、MCAO 组与 Dkk-1+MCAO 组之间比较, 神经行为学评分差异均无统计学意义 (P>0.05)。

### 2.2 各组大鼠脑梗死体积比较

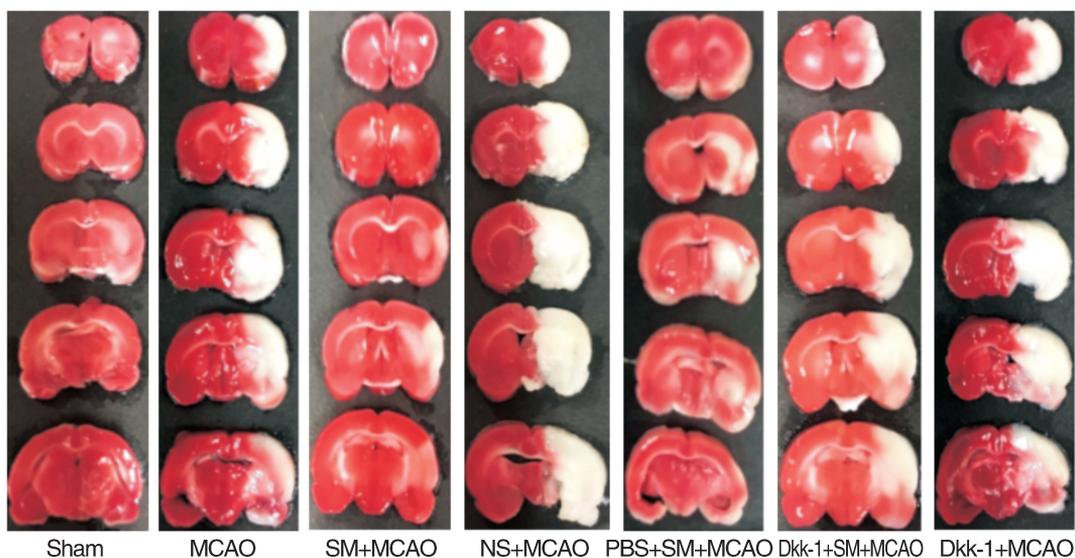
与假手术组相比, MCAO 组大鼠脑梗死体积增加 (P<0.05); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组脑梗死体积明显减少 (P<0.05); 与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组脑梗死体积明显增加 (P<0.05; 图 2、表 2)。MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组、MCAO 组与 Dkk-1+MCAO 组之间比较, 梗死体积差异均无统计学意义 (P>0.05)。

表 1. 各组大鼠 CIRI 24 h 神经行为学评分比较(只)

Table 1. Comparison of neurobehavioral score after CIRI 24 h in rats of each group (case)

分 组	<i>n</i>	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	中位数(范围)
假手术组	12	12	0	0	0	0	0(0~0)
MCAO 组	12	0	0	1	8	3	3(2~4) <sup>a</sup>
SM+MCAO 组	12	6	3	3	0	0	1(0~2) <sup>b</sup>
NS+MCAO 组	12	0	0	2	8	2	3(2~4)
PBS+SM+MCAO 组	12	6	2	4	0	0	1(0~2)
Dkk-1+SM+MCAO 组	12	0	2	4	4	2	2.5(2~4) <sup>c</sup>
Dkk-1+MCAO 组	12	0	0	2	7	3	3(2~4)

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 MCAO 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 SM+MCAO 组比较。

图 2. 各组大鼠 CIRI 24 h 脑梗死体积比较( $n=6$ )Figure 2. Comparison of cerebral infarct volume after CIRI 24 h in rats of each group( $n=6$ )

### 2.3 各组大鼠脑梗死半暗带区 Bcl-2、Bax 蛋白表达量及 Bcl-2/Bax 比率比较

与假手术组相比, MCAO 组大鼠 Bcl-2 表达量增加( $P < 0.05$ ); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组 Bcl-2 表达量明显增加( $P < 0.05$ ); 与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组 Bcl-2 表达量明显减少( $P < 0.05$ ; 图 3、表 2)。MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组、MCAO 组与 Dkk-1+MCAO 组之间比较, Bcl-2 表达量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

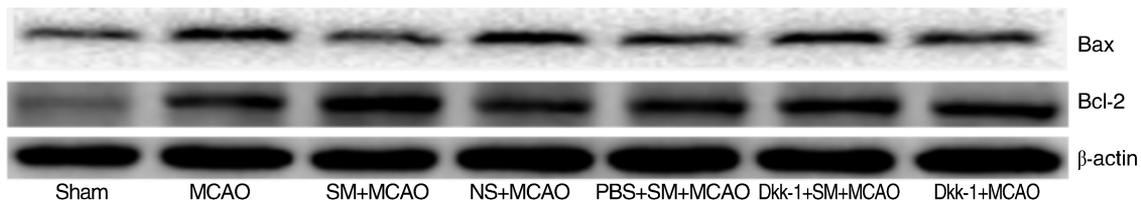
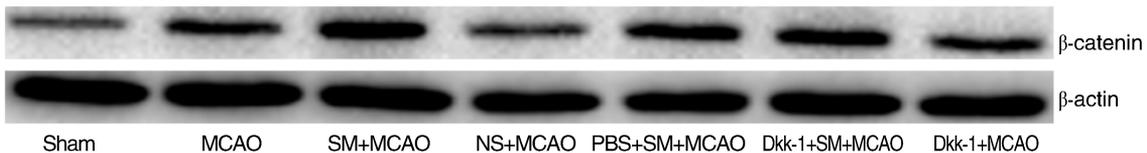
与假手术组相比, MCAO 组大鼠 Bax 表达量增加( $P < 0.05$ ); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组 Bax 表达量明显减少( $P < 0.05$ ); 与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组 Bax 表达量明显增加( $P < 0.05$ ; 图 3、表 2)。MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组、MCAO 组与 Dkk-1+MCAO 组之间比较, Bax 表达量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

义( $P > 0.05$ )。

与假手术组相比, MCAO 组大鼠 Bcl-2/Bax 比率减小( $P < 0.05$ ); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组 Bcl-2/Bax 比率明显增加( $P < 0.05$ ); 与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组 Bcl-2/Bax 比率明显减小( $P < 0.05$ ; 表 2)。MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组、MCAO 组与 Dkk-1+MCAO 组之间比较, Bcl-2/Bax 比率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.4 各组大鼠脑梗死半暗带区 $\beta$ -catenin 蛋白表达量比较

与假手术组相比, MCAO 组大鼠  $\beta$ -catenin 蛋白表达量增加( $P < 0.05$ ); 与 MCAO 组相比, SM+MCAO 组  $\beta$ -catenin 蛋白表达量也明显增加( $P < 0.05$ ; 图 4、表 2)。MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组之间比较,  $\beta$ -catenin 蛋白表达量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

图 3. 各组大鼠 CIRI 24 h Bcl-2、Bax 蛋白表达量比较 ( $n=6$ )Figure 3. Comparison of Bcl-2 and Bax protein expressions after CIRI 24 h in rats of each group ( $n=6$ )图 4. 各组大鼠 CIRI 24 h  $\beta$ -catenin 蛋白表达量比较 ( $n=6$ )Figure 4. Comparison of  $\beta$ -catenin protein expression after CIRI 24 h in rats of each group ( $n=6$ )表 2. 各组大鼠 CIRI 24 h 脑梗死体积、Bcl-2、Bax、 $\beta$ -catenin 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比率比较 ( $n=6$ )Table 2. Comparison of cerebral infarct volume, Bcl-2, Bax and  $\beta$ -catenin protein expressions and Bcl-2/Bax ratio after CIRI 24 h in rats of each group ( $n=6$ )

分 组	$n$	脑梗死体积 (%)	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	$\beta$ -catenin
假手术组	6	0.0 $\pm$ 0.0	0.18 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	1.63 $\pm$ 0.25	0.21 $\pm$ 0.08
MCAO 组	6	61.1 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.62 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
SM+MCAO 组	6	25.9 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>	0.97 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	0.41 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
NS+MCAO 组	6	65.2 $\pm$ 8.6	0.49 $\pm$ 0.17	1.46 $\pm$ 0.61	0.72 $\pm$ 0.27	0.38 $\pm$ 0.13
PBS+SM+MCAO 组	6	28.4 $\pm$ 6.9	0.91 $\pm$ 0.31	0.42 $\pm$ 0.27	2.12 $\pm$ 0.98	0.65 $\pm$ 0.23
Dkk-1+SM+MCAO 组	6	45.6 $\pm$ 8.9 <sup>c</sup>	0.68 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	0.84 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	1.54 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	0.79 $\pm$ 0.29
Dkk-1+MCAO 组	6	61.2 $\pm$ 9.2	0.57 $\pm$ 0.17	1.26 $\pm$ 0.35	0.72 $\pm$ 0.32	0.56 $\pm$ 0.19

a 为  $P<0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 MCAO 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 SM+MCAO 组比较。

### 3 讨 论

参麦注射液是一种复合制剂,其有效成分主要是麦冬皂苷、人参皂苷、麦冬黄酮、麦冬多糖和人参多糖<sup>[9]</sup>。中医学理论认为脑缺血是以风火痰瘀为标,以气阴两虚为本的一种病机,参麦注射液具有益气养阴功效,正好与脑缺血的病机相吻合。本课题组的前期研究也表明参麦注射液对 CIRI 大鼠具有脑保护作用<sup>[9]</sup>。

在细胞凋亡过程中,Bcl-2 家族在凋亡调控基因中位于非常重要的地位,Bcl-2 通过阻止凋亡信号的传递来抑制细胞凋亡,进而延长细胞寿命;而 Bax 蛋白是 Bcl-2 的同源性蛋白,能促进细胞凋亡的作用,并具有抑制 Bcl-2 的效应<sup>[10]</sup>。正常细胞中,Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白处于一种平衡状态,当细胞受到损害时,这种平衡会破坏,发动一系列损害效应<sup>[11]</sup>,因此 Bcl-2/Bax 比率可用来衡量神经细胞的损伤程度。

在经典 Wnt 信号通路中, $\beta$ -catenin 是一个关键

作用位点,广泛存在于各种类型细胞中,在细胞的增殖、分化和凋亡过程中起着重要的作用<sup>[12]</sup>。本研究在中医药理论的指导下,以大鼠 MCAO 模型为研究对象,观察大鼠的神经行为学、脑梗死体积和脑梗死半暗带区 Bcl-2、Bax 蛋白表达量以及 Bcl-2/Bax 比率,评价 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在参麦注射液神经保护中的作用。

本实验研究发现 SM+MCAO 组大鼠与 MCAO 组大鼠相比,CIRI 24 h 时神经行为学评分明显改善,脑梗死体积明显减小,脑梗死半暗带区 Bax 蛋白表达明显减低,而 Bcl-2 蛋白表达、Bcl-2/Bax 比率和  $\beta$ -catenin 蛋白表达明显增加,说明参麦注射液对 CIRI 大鼠具有脑保护作用,并且参麦注射液能增加脑梗死半暗带区  $\beta$ -catenin 蛋白表达量。与 SM+MCAO 组相比,Dkk-1+SM+MCAO 组 CIRI 24 h 时神经行为学评分明显增加,脑梗死体积明显增大,脑梗死半暗带区 Bax 蛋白表达明显增加,Bcl-2 表达以及 Bcl-2/Bax 比率明显减小,说明 Dkk-1 能够部分

逆转参麦注射液对 CIRI 大鼠的脑保护作用。与 SM+MCAO 组相比, Dkk-1+SM+MCAO 组虽然采用了 Wnt/ $\beta$ -catenin 拮抗剂 Dkk-1, 但  $\beta$ -catenin 蛋白表达量在两组之间差异无显著性, 说明 Dkk-1 并未影响  $\beta$ -catenin 蛋白表达。神经行为学评分、脑梗死体积和 Bcl-2/Bax 比率在 MCAO 组与 NS+MCAO 组、PBS+SM+MCAO 组与 SM+MCAO 组、MCAO 组与 Dkk-1+MCAO 组之间比较均无统计学差异, 说明生理盐水、PBS 和 Dkk-1 本身均不会对实验结果造成影响。

Wnt 蛋白广泛分布在全脑组织中, 并且在中枢神经系统的发育与成熟中起了重要作用<sup>[13]</sup>。有研究表明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调节细胞生长过程, 包括细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡。当发生脑缺血损伤时, Wnt/ $\beta$ -catenin 被激活后, 调节细胞核的转录过程, 则能促进神经再生与神经保护<sup>[14]</sup>。有研究认为 Wnt/ $\beta$ -catenin 的激动剂氯化锂能诱发 CIRI 大鼠的脑保护作用, 并增加了大鼠的学习与记忆能力<sup>[15]</sup>。因此, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可能是参麦注射液对 CIRI 大鼠脑保护研究的一个潜在靶点。从以上结果可以得出参麦注射液可以增加 CIRI 大鼠脑内  $\beta$ -catenin 蛋白的表达量, 并且采用脑室注射 Wnt/ $\beta$ -catenin 拮抗剂 Dkk-1 能够部分逆转参麦注射液对 CIRI 大鼠的脑保护作用, 说明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路介导了参麦注射液对 CIRI 大鼠的脑保护作用。本研究观察到, 与假手术组相比, MCAO 组大鼠  $\beta$ -catenin 蛋白表达量增加, 可能原因是 MCAO 激活了内源性保护机制。与 MCAO 组相比, 参麦注射液组明显增加 MCAO 处理的大鼠  $\beta$ -catenin 蛋白表达, 进一步论证了参麦注射液对 CIRI 大鼠具有脑保护作用。与 MCAO 组相比, Dkk-1+MCAO 组  $\beta$ -catenin 蛋白表达无显著性差异, 说明这个剂量的 Dkk-1 不会影响实验结果; 而 Dkk-1+SM+MCAO 组大鼠  $\beta$ -catenin 蛋白表达仍然比 MCAO 组高, 说明 MCAO 引起  $\beta$ -catenin 上调在 Dkk-1+SM+MCAO 组中仍然存在效应, Dkk-1 拮抗了参麦注射液所引起  $\beta$ -catenin 上调产生的脑保护效应。如果该研究能够采用遗传学技术干扰脑组织中  $\beta$ -catenin 蛋白的表达, 再观察参麦注射液对 CIRI 大鼠的脑保护作用, 就能够进一步论证该结果; 这也是本研究的不足之处。

综上所述, 参麦注射液对 CIRI 大鼠具有脑保护作用, 而 Wnt/ $\beta$ -catenin 的拮抗剂 Dkk-1 能够部分逆转参麦注射液的脑保护作用。因此, Wnt/ $\beta$ -catenin

信号通路介导了参麦注射液对 CIRI 大鼠的脑保护作用。

#### [参考文献]

- [1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics--2014 update: A report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399-410.
- [2] 白玉, 张圣焱, 王良荣, 等. 参麦注射液对外伤性脑损伤大鼠神经元细胞的保护作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17(1): 28-30.
- [3] Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: A personal perspective on how a scientific field developed[J]. *EMBO J*, 2012, 31(12): 2670-684.
- [4] Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, et al. Treatment with the glycogen synthase kinase-3 beta inhibitor, tldz-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus[J]. *Shock*, 2008, 30(3): 299-307.
- [5] 梁冬冬, 王宏法, 张明晓, 等. 百会穴局部腺苷 A1 受体对电针诱导脑缺血耐受的作用[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(7): 537-540.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] He X, Mo Y, Geng W, et al. Role of Wnt/ $\beta$ -catenin in the tolerance to focal cerebral ischemia induced by electroacupuncture pretreatment[J]. *Neurochem Int*, 2016, 97: 124-132.
- [8] Ashwal S, Tone B, Tian HR, et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Stroke*, 1998, 29(5): 1037-046.
- [9] 鲁华荣, 宋胜文, 韩琨元, 等. 腺苷 A1 受体介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(9): 1109-112.
- [10] Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: Mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1378-386.
- [11] Liu QS, Deng R, Li S, et al. Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017, 42(8): 855-860.
- [12] Niehrs C. The complex world of Wnt receptor signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2012, 13(12): 767-779.
- [13] Lambert C, Cisternas P, Inestrosa NC. Role of Wnt signaling in central nervous system injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(4): 2297-311.
- [14] Huang C, Fu XH, Zhou D, et al. The role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in disrupted hippocampal neurogenesis of temporal lobe epilepsy: A potential therapeutic target[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(7): 1319-332.
- [15] Fan M, Song C, Wang T, et al. Protective effects of lithium chloride treatment on repeated cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Neurol Sci*, 2015, 36(2): 315-321.

(此文编辑 曾学清)