

基于 AMPK/eNOS/NF- κ B 信号通路探讨虾青素对脑梗死大鼠的影响及作用机制

吴杰¹, 杜彩萍²

(1.江苏省徐州医药高等专科学校药学技术系,江苏省徐州市 221116;2.徐州医科大学基础医学院生物化学与分子生物学研究中心,江苏省徐州市 221004)

[关键词] AMPK/eNOS/NF- κ B 信号通路; 虾青素; 脑梗死; 神经再生

[摘要] 目的 基于 AMPK/eNOS/NF- κ B 信号通路探讨虾青素对脑梗死大鼠的影响及作用机制。方法 采用改良的 Longa 法建立脑梗死大鼠模型,取 50 只造模成功的 SD 雄性大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组,每组 10 只,另外未造模的 10 只作为空白对照组。空白对照组与模型对照组均给予等体积生理盐水,阳性对照组给予 20 mg/(kg·d) 尼莫地平,虾青素低、中、高剂量组分别给予 10、20、30 mg/(kg·d) 虾青素,连续给药 14 天。检测大鼠神经功能变化;氯化三苯基四氮唑染色法检测脑梗死面积;酶联免疫吸附法检测白细胞介素 10(IL-10)、IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平;TUNEL 法检测脑皮质缺血半影区的细胞凋亡情况;反转录-聚合酶链反应检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、核因子 κ B(NF- κ B)mRNA 表达水平;Western blot 检测 p-AMPK、AMPK、p-eNOS、eNOS、NF- κ B 蛋白表达。结果 虾青素可明显改善脑梗死大鼠的神经功能及脑梗死面积($P < 0.01$);抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达,促进抗炎因子 IL-10 表达($P < 0.05$);降低皮质缺血半影区细胞凋亡率($P < 0.01$);下调 NF- κ B mRNA 和蛋白表达,促进 AMPK 和 eNOS 磷酸化($P < 0.05$),但 AMPK、eNOS mRNA 和蛋白表达无显著差异($P > 0.05$)。结论 虾青素能明显改善脑梗死大鼠神经功能、脑梗死面积、皮质缺血半影区细胞凋亡率及血清细胞因子,其作用机制可能与 AMPK/eNOS/NF- κ B 信号通路密切相关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of astaxanthin on cerebral infarction rats and its mechanism based on AMPK/eNOS/NF- κ B signal pathway

WU Jie¹, DU Caiping²

(1. Department of Pharmaceutical Technology, Jiangsu Provincial Xuzhou Pharmaceutical Vocational College, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 2. Research Center for Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

[KEY WORDS] AMPK/eNOS/NF- κ B signal pathway; astaxanthin; cerebral infarction; nerve regeneration

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and mechanism of astaxanthin on cerebral infarction rats based on AMPK/eNOS/NF- κ B signal pathway. **Methods** The rat model of cerebral infarction was established by modified Longa method. 50 successful modeling SD male rats were randomly divided into model control group, positive control group, astaxanthin low, medium and high dose group, with 10 rats in each group, and 10 rats without model as blank control group. The blank control group and the model control group were given the same volume of normal saline, the positive control group was given 20 mg/(kg·d) nimodipine, and the astaxanthin low, medium and high dose groups were given 10, 20, 30 mg/(kg·d) astaxanthin, respectively, for 14 consecutive days. Neurological changes were detected in rats; cerebral infarction area was measured by triphenyl tetrazolium chloride staining; levels of interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; cell apoptosis in ischemic penumbra of cerebral cortex was detected by TUNEL; the expressions of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and nuclear factor κ B (NF- κ B) mRNA were

[收稿日期] 2018-09-18

[修回日期] 2018-11-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81100852)

[作者简介] 吴杰,硕士研究生,研究方向为药学,E-mail 为 wujie13@sina.com。

measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); the protein expressions of p-AMPK, AMPK, p-eNOS, eNOS and NF- κ B were detected by Western blot. **Results** Astaxanthin could significantly improve neurological function and cerebral infarction area in rats with cerebral infarction ($P < 0.01$), inhibit the expression of pro-inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α , promote the expression of anti-inflammatory factor IL-10 ($P < 0.05$), reduce the cell apoptosis rate of cortical ischemic penumbra ($P < 0.01$), down-regulate the expressions of NF- κ B mRNA and protein, and promote phosphorylation of AMPK and eNOS ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the expressions of AMPK, eNOS mRNA and protein ($P > 0.05$). **Conclusion** Astaxanthin can significantly improve neurological function, cerebral infarction area, cell apoptotic rate of cortical ischemic penumbra and serum cytokines in rats with cerebral infarction, and its mechanism may be closely related to AMPK/eNOS/NF- κ B signal pathway.

脑梗死是最常见的脑血管疾病,也是导致患者死亡和残疾的主要原因,其发生率占中风 60% ~ 80%^[1]。患者常因脑组织缺血、缺氧致使大脑局部坏死或软化,进而影响神经功能、认知功能、语言功能及运动功能等^[2]。研究发现,脑梗死发病机制较复杂,造成脑梗死危险因素有糖尿病、高血压、高血脂、心房颤动、休克、动脉粥样硬化、酗酒及吸烟等^[3]。另有报道称 71.8% 缺血性脑血管病患者同时伴有颈动脉粥样硬化斑块和内膜中膜厚度增加的症状^[4]。目前,对于脑梗死常规疗法有溶栓、抗血小板聚集、脑保护剂、防治并发症、控制高血压和高血脂,虽然这些治疗方法可有效改善脑梗死患者缺血程度,减轻神经细胞损伤,但对降低患者致残率收效甚微^[5]。因此,促进脑梗死神经再生是治疗脑血管疾病的研究热点。

虾青素 (astaxanthin, AST) 是一种脂溶性羟基类胡萝卜素,主要存在于各种微生物、浮游植物、海洋动物中^[6],药理研究表明,其具有预防癌症、抗氧化应激、增强免疫、抗炎、改善视力、保护心肌、抗肿瘤及改善动脉粥样硬化等作用^[7];也有报道称虾青素可降低脑缺血患者和神经退行性患者脑部神经损伤,且可透过血脑屏障起到保护神经及治疗疾病的作用^[8-9]。近些年,对于虾青素的神经保护作用研究较多,但鲜见其改善脑梗死方面的有关报道。本研究旨在基于 AMPK/eNOS/NF- κ B 途径探讨虾青素改善脑梗死大鼠神经损伤的作用机制,为虾青素在脑梗死方面的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用大鼠均从北京维通利华实验动物有限公司购买。选择鼠龄均在 6~7 周龄的 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量为 180~220 g,在恒温(24 \pm 1 $^{\circ}$ C)下每笼饲养 5 只,湿度条件为 45%~

55%,暗/光循环 12 h,所有大鼠自由饮食和饮水。适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 主要药品、试剂与仪器

(1) 主要药品与试剂: 虾青素 (美国 Santa Cruz 公司); 尼莫地平 (nimodipine) 片 (亚宝药业集团股份有限公司, 国药准字 H14022821); 生理盐水 (常州兰陵制药有限公司, 生产批号: H52020069); 白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)、IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (美国 eBioscience 公司); TUNEL 试剂盒 (美国 Roche 公司); 腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、磷酸化 eNOS (phosphorylated eNOS, p-eNOS)、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和 β -actin 鼠单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 (美国 Invitrogen 公司)。

(2) 仪器: CS-15R 冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); BS110S 型电子分析天平、BCD-629WDEYU1 型冰箱 (赛多利斯科学仪器有限公司); 5010 全自动染色机 (德国徕卡公司); BX50 生物显微镜 (日本奥林巴斯公司); 脱水机 (型号: JJ-12J)、包埋机 (型号: JB-P5)、病理切片机 (型号: RM-P6)、超声雾化器 (型号: JB-L5) (上海斯科茨曼有限公司); 凝胶电泳和电转仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验分组与动物模型建立

将 60 只 SD 雄性大鼠按体质量均衡的原则分组,其中 50 只大鼠运用改良的 Longa 法建立脑梗死大鼠模型,并将其分为模型对照组 (Model)、阳性对照组 (Nimodipine)、虾青素低 (AST-10)、中 (AST-20)、高 (AST-30) 剂量组。各组大鼠 [空白对照组 (Normal) 10 只大鼠除外] 于术前禁食 12 h 后,采取腹腔注射 10% 水合氯醛溶液进行麻醉,仰卧位固定

大鼠,沿颈部正中央剪开大鼠的皮肤与筋膜,将右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉分开,结扎右侧颈总动脉与颈外动脉,分离颈内动脉,并用手术剪在右侧颈总动脉的近心端处剪一小口,将预先处理的线栓从右侧颈总动脉的小口处穿入颈内动脉,穿至有明显阻力感时停止,插入深度约为 18 mm,结扎并剪去线栓尾端,缝合切口后消毒。

1.4 给药剂量及途径

各组大鼠于造模成功后 3 h 给予相应的药物,虾青素低、中、高剂量组分别给予 10、20、30 mg/(kg·d) 虾青素灌胃给药,阳性对照组给予 20 mg/(kg·d) 尼莫地平灌胃给药,模型对照组和空白对照组用 5 mL/kg 的生理盐水灌胃,连续灌胃 14 天后进行后续试验。

1.5 大鼠神经功能检测

于灌胃第 7、14 天,将各组大鼠放于地面,观察大鼠的行走状况及活动情况,根据 Bederson 等^[10]的 5 级分类法评价各组大鼠神经功能变化,0 分表示大鼠可正常活动,没有相关症状;1 分表示大鼠左前肢无法完全展开,提尾;2 分表示大鼠置于地面向左侧推动,爬行阻力较右侧下降;3 分表示大鼠爬行时不自主向左侧转圈;4 分表示大鼠丧失意识,不能行走。

1.6 氯化三苯基四氮唑染色检测大鼠脑梗死面积

各组大鼠连续灌胃 14 天后,麻醉,断头处死,取脑,将大脑从额极开始纵切 5 个冠状脑片,放于氯化三苯基四氮唑染液中,于 37 °C 恒温避光孵育 20 min,用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后拍摄照片,并用 HPIAS-1000 软件分析后计算大鼠脑梗死面积。

1.7 酶联免疫吸附法检测大鼠血清 IL-10、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平

各组大鼠连续灌胃 14 天后,麻醉,断头处死,收集外周血 10 mL,3000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,置于 -20 °C 冰箱内低温保存。严格按试剂盒说明书采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中 IL-10、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

1.8 TUNEL 法检测大鼠脑皮质缺血半影区的细胞凋亡情况

将各组大鼠的石蜡标本切成 5 μ m 薄片后,附着于玻片上,并用 4% 多聚甲醛固定,严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行后续操作。借助实验细胞计数器对创伤侧皮质周围半影区内神经细胞计数,每组随机选取 5 个视野,放大 400 倍后统计凋亡细胞与总细胞的数目,依据下列公式计算脑组织细胞的凋亡率:凋亡率=(凋亡细胞数/总细胞数) \times 100%。

1.9 反转录-聚合酶链反应检测大鼠脑组织中 AMPK、eNOS、NF- κ B mRNA 表达水平

各组大鼠连续灌胃 14 天后,麻醉,断头处死,取脑,并放入去酶 EP 管中。反转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)操作如下:提取大鼠脑组织的总 RNA,反转录合成 cDNA,根据引物进行扩增(表 1),反应条件如下:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,退火 30 s,72 °C 反应 60 s,共进行 40 个循环,72 °C 延伸 5 min,4 °C 反应 5 min;每组进行 3 次独立测定,图像分析仪扫描凝胶密度,分析得到 mRNA 的相对含量。

表 1. RT-PCR 引物序列

Table 1. RT-PCR primer sequence

基因	引物序列
β -actin	正向:5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTG-3' 反向:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'
AMPK	正向:5'AGCACACCTCACTGATGAACCC3' 反向:5'AGACAGCCTGACACCTATGGAAA-3'
eNOS	正向:5'-TGCACCCTTCCGGGGATTCTGGCA-3' 反向:5'-GGATCCCTGGAAAAGGCGGTGAGG-3'
NF- κ B	正向:5'-TGCAAGGGATAAGGATGTTAGGAG-3' 反向:5'-CCAACGAGGGAGACGGTGAT-3'

1.10 Western blot 检测大鼠脑组织 p-AMPK、AMPK、p-eNOS、eNOS、NF- κ B 蛋白表达

各组大鼠连续灌胃 14 天后,麻醉,断头处死,取脑组织,于液氮中保存,将脑组织在研钵中充分研磨,加入裂解液置冰上充分裂解,4 °C、14000 r/min 离心 10 min,吸取上清液即为蛋白质提取物。采用 BCA 试剂盒测量蛋白质含量,取适量蛋白质用上样缓冲液进行处理,通过电泳、转膜、封闭、孵育抗体等步骤后,用 ECL 化学发光试剂显色后,化学发光仪成像。分别依次使用 AMPK、p-AMPK、eNOS、p-eNOS、NF- κ B 和 β -actin 鼠单克隆抗体作为一抗,HRP 标记羊抗鼠作为二抗。

1.11 统计方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能的变化

神经功能评分模型对照组明显高于空白对照

组 ($P < 0.01$), 阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组明显低于模型对照组 ($P < 0.01$), 虾青素中、高剂量组明显低于阳性对照组 ($P < 0.01$), 阳性对照组与虾青素低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 虾青素可显著改善大鼠的神经功能(图 1)。

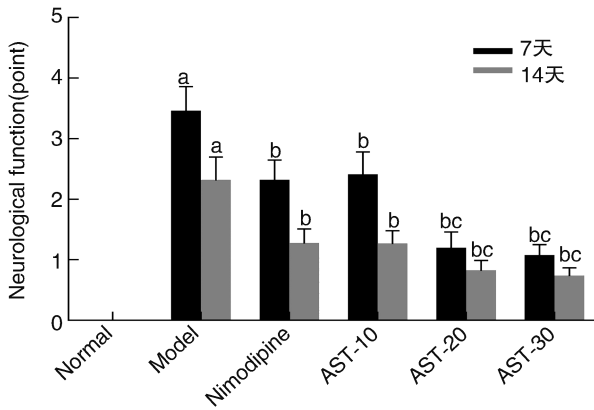


图 1. 各组大鼠神经功能评分比较 ($n = 10$) a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与阳性对照组比较。

Figure 1. Comparison of neurological function score of rats in each group ($n = 10$)

2.2 各组大鼠脑梗死面积比较

脑梗死面积模型对照组明显大于空白对照组 ($P < 0.01$), 阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组明显小于模型对照组 ($P < 0.01$), 虾青素中、高剂量组明显小于阳性对照组 ($P < 0.01$), 阳性对照组与虾青素低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 虾青素可显著减少脑梗死面积(图 2)。

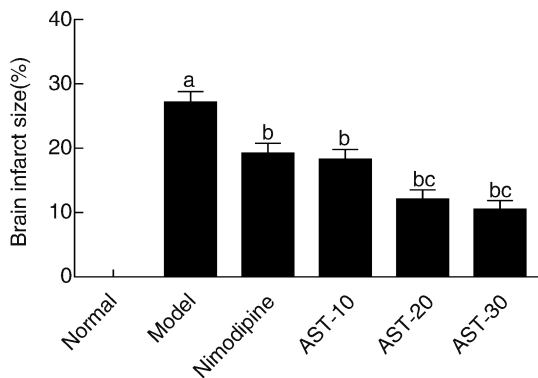


图 2. 各组大鼠脑梗死面积比较 ($n = 10$) a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与阳性对照组比较。

Figure 2. Comparison of cerebral infarction area of rats in each group ($n = 10$)

2.3 各组大鼠血清 IL-10、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平与空白对照组相比, 模型对照组大鼠血清 IL-1 β 、

IL-6、TNF- α 含量明显升高, IL-10 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与模型对照组相比, 阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显降低, IL-10 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组相比, 虾青素中、高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显降低, IL-10 含量明显升高 ($P < 0.05$)。结果表明, 虾青素可抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达, 促进抗炎因子 IL-10 的表达(图 3)。

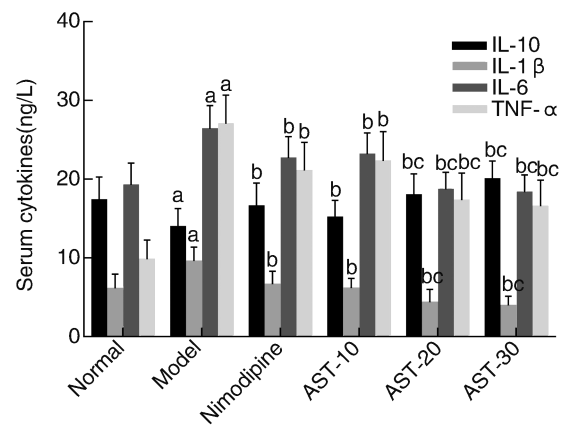


图 3. 各组大鼠血清 IL-10、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 ($n = 10$) a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与阳性对照组比较。

Figure 3. Serum levels of IL-10, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in rats of each group ($n = 10$)

2.4 各组大鼠皮质缺血半影区的细胞凋亡情况

TUNEL 结果显示, 大鼠皮质缺血半影区的细胞凋亡率, 模型对照组明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组明显低于模型对照组 ($P < 0.01$), 虾青素中、高剂量组明显低于阳性对照组 ($P < 0.01$), 阳性对照组与虾青素低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 虾青素可降低皮质缺血半影区的细胞凋亡(图 4)。

2.5 各组大鼠脑组织 AMPK、eNOS、NF- κ B mRNA 表达水平

RT-PCR 结果显示, 各组间 AMPK、eNOS mRNA 表达水平无显著差异 ($P > 0.05$)。与空白对照组相比, 模型对照组大鼠脑组织 NF- κ B mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型对照组相比, 阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组大鼠脑组织 NF- κ B mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与阳性对照组相比, 虾青素中、高剂量组大鼠脑组织 NF- κ B mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。结果表明, 虾青素可明显降低大鼠脑组织 NF- κ B mRNA 水平(图 5)。

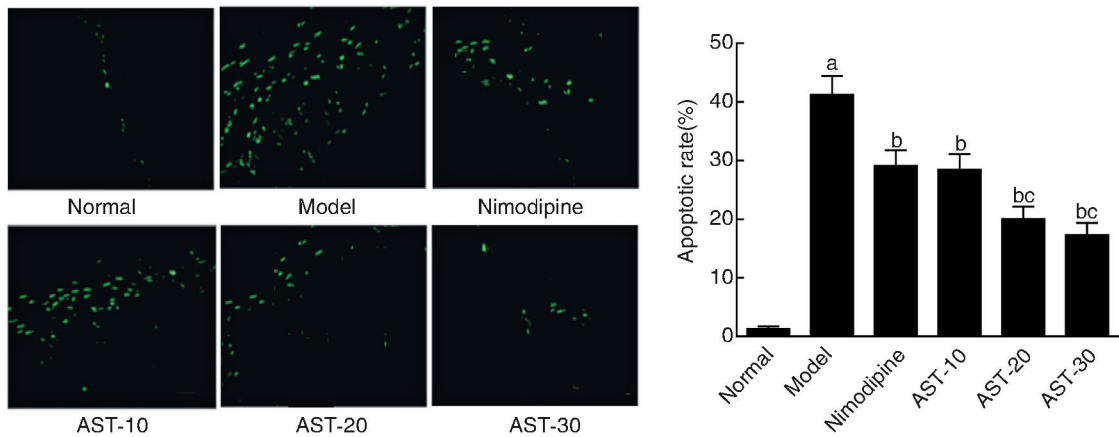


图 4. 各组大鼠皮质缺血半影区的细胞凋亡率(400×) a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与阳性对照组比较。

Figure 4. Apoptotic rate of cortical ischemic penumbra in rats of each group (400×)

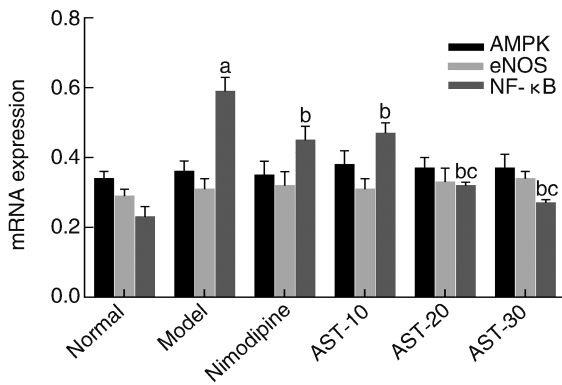


图 5. 各组大鼠脑组织 AMPK、eNOS 和 NF-κB mRNA 表达水平($n=10$) a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与阳性对照组比较。

Figure 5. Expressions of AMPK, eNOS and NF-κB mRNAs in brain tissue of rats in each group ($n=10$)

2.6 各组大鼠脑组织 p-AMPK、AMPK、p-eNOS、eNOS 和 NF-κB 蛋白表达

Western blot 结果显示, 各组间 AMPK、eNOS 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$)。与空白对照组相比, 模型对照组大鼠脑组织 p-AMPK、p-eNOS 和 NF-κB 表达明显升高($P < 0.05$); 与模型对照组相比, 阳性对照组、虾青素低、中、高剂量组大鼠脑组织 p-AMPK、p-eNOS 表达明显升高, NF-κB 蛋白表达明显降低($P < 0.05$); 与阳性对照组相比, 虾青素中、高剂量组大鼠脑组织 p-AMPK、p-eNOS 表达明显升高, NF-κB 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。结果表明, 虾青素可促进 AMPK 和 eNOS 的磷酸化, 抑制 NF-κB 蛋白表达, 进而促进神经再生(图 6)。

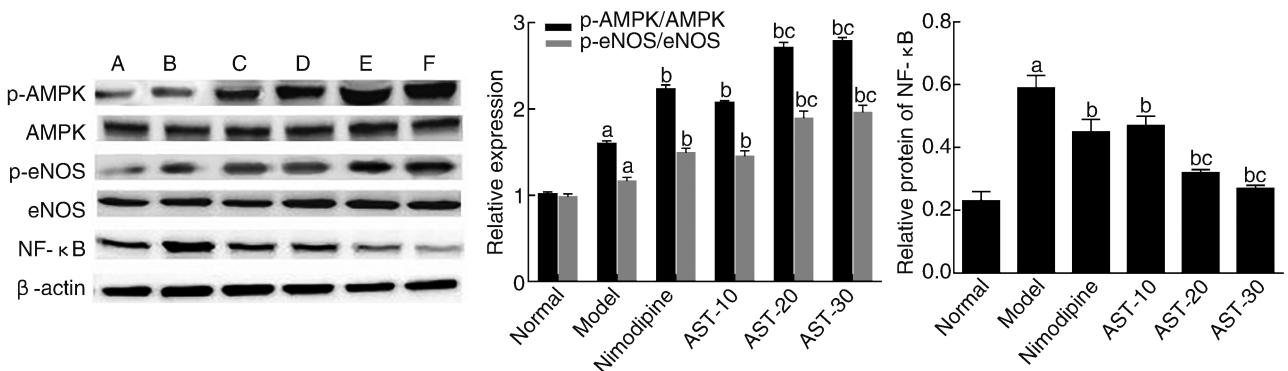


图 6. 各组大鼠脑组织 p-AMPK、AMPK、p-eNOS、eNOS 和 NF-κB 蛋白表达($n=10$) A 为 Normal, B 为 Model, C 为 Nimodipine, D 为 AST-10, E 为 AST-20, F 为 AST-30. a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与阳性对照组比较。

Figure 6. Expressions of p-AMPK, AMPK, p-eNOS, eNOS and NF-κB proteins in brain tissue of rats in each group ($n=10$)

3 讨论

脑梗死是临床上常见的缺血性脑血管疾病,也是

一种因能量代谢障碍导致的疾病,因其有较高的发生率、死亡率及致残率,给人类健康与生命造成了严重的影响^[11]。目前,有关脑梗死的发病机制学说有脑

组织细胞内钙离子超载、炎症因子过量表达、兴奋性氨基酸毒性作用、体内能量代谢失衡、酸性物质中毒、脑组织细胞凋亡及体内自由基损伤等^[12]。大量研究表明,长期脑缺血会导致脑部神经元损伤和凋亡^[13]。AMPK 作为重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要负责外围能量平衡,当细胞能量供应降低时,AMPK 可被激活,进而增强能量产生^[14]。在外周组织,AMPK 通过减少能量来维持细胞代谢稳态,并提高能量利用率。有报道称,AMPK 的激活是促进脑卒中修复的重要因素^[15]。此外,AMPK 和 NO 增加可导致 eNOS 磷酸化的增加,进而促使神经再生^[16]。也有研究表明,AMPK 具有明显抗炎作用,AMPK 激活可抑制转录因子 NF- κ B 信号传导,从而抑制炎症因子的表达^[17]。因此,AMPK/eNOS/NF- κ B 信号通路可能参与脑梗死后脑血管、脑细胞及神经的再生,对缺血性脑血管具有一定的保护作用。

神经功能缺损及脑梗死是脑梗死大鼠脑组织受损后的表现,本研究发现虾青素干预后可显著改善大鼠神经功能缺损情况,并减少大鼠脑梗死面积。脑梗死后脑组织中白细胞浸润可导致促炎细胞因子和抗炎细胞因子的活化,进而致使脑组织发生炎症反应,促炎细胞因子(如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等)可促进神经损伤,抗炎细胞因子(如 IL-10、TGF- β 1、IL-3 等)可降低神经损伤^[18],本研究发现虾青素可降低大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量,增加 IL-10 含量,具有保护神经的作用。细胞凋亡是细胞主动“自杀”的过程,脑梗死后,脑组织内外环境发生了一定的变化,凋亡基因受多种因素的影响被激活,促进细胞凋亡^[19];本研究发现虾青素可降低大鼠皮质缺血半影区细胞凋亡率。本研究通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测发现各组大鼠脑组织中 AMPK、eNOS 的 mRNA 和蛋白表达无显著差异,但脑梗死后 NF- κ B mRNA 表达、p-AMPK、p-eNOS 和 NF- κ B 的表达均明显升高,虾青素治疗后 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达降低,p-AMPK、p-eNOS 表达升高,结果表明,脑梗死后 AMPK 被激活,使 AMPK 磷酸化及 eNOS 磷酸化增加,抑制 NF- κ B 表达,进而促使神经再生。

综上所述,虾青素能明显改善脑梗死大鼠神经功能、脑梗死梗死面积、脑皮质缺血半影区细胞凋亡率及血清细胞因子,可有效促进脑梗死大鼠的神经再生,其作用机制可能与 AMPK/eNOS/NF- κ B 信号通路密切相关。

[参考文献]

[1] Basu P, Jenkins H, Tsang K, et al. National survey of neurosurgeons and stroke physicians on decompressive hemicraniectomy for malignant

middle cerebral artery infarction[J]. *World Neurosurg*, 2017, 102: 320-328.

- [2] Friedrich B, Lobsien D, Maegerlein C, et al. Distance to thrombus in acute middle cerebral artery stroke predicts basal ganglia infarction after mechanical thrombectomy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 85813-85818.
- [3] Liu Y, Tang G, Li Y, et al. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11(1): 177.
- [4] Hao Y, Tian S, Sun M, et al. Association between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and development of ischemic stroke[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11647-11652.
- [5] Chen B, Zhang F, Li QY, et al. Protective effect of Ad-VEGF-bone mesenchymal stem cells on cerebral infarction[J]. *Turk Neurosurg*, 2016, 26(1): 8-15.
- [6] Ambati RR, Phang SM, Ravi S, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review[J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(1): 128-152.
- [7] Igielska-Kalwat J, Goscianska J, Nowak I. Carotenoids as natural antioxidants[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015, 69: 418-428.
- [8] Lin YJ, Chang JJ, Lin HY, et al. Metabolic engineering a yeast to produce astaxanthin[J]. *Bioresour Technol*, 2017, 245(Pt A): 899-905.
- [9] Grimmig B, Kim SH, Nash K, et al. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration[J]. *Geroscience*, 2017, 39(1): 19-32.
- [10] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [11] 林惠, 杨万章. 丹参注射液联合 rhG-CSF 对脑梗死大鼠神经功能的影响[J]. *中医药导报*, 2017, 23(17): 28-31.
- [12] 万丹. 白藜芦醇对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016; 1-41.
- [13] 路芳, 蒋芦荻, 陈艳昆, 等. 基于神经保护探讨补阳还五汤抗脑缺血损伤的多靶点作用机制[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(9): 744-749.
- [14] Wang Y, Huang Y, Xu Y, et al. A dual AMPK/Nrf2 activator reduces brain inflammation after stroke by enhancing microglia M2 polarization[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(2): 141-163.
- [15] Qiu J, Wang M, Zhang J, et al. The neuroprotection of sinomenine against ischemic stroke in mice by suppressing NLRP3 inflammasome via AMPK signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 492-500.
- [16] Garcia-Prieto CF, Hernández-Nuño F, Rio DD, et al. High-fat diet induces endothelial dysfunction through a down-regulation of the endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(3): 520-532.
- [17] Zhang C, Liao Y, Li Q, et al. Recombinant adiponectin ameliorates liver ischemia reperfusion injury via activating the AMPK/eNOS pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66382.
- [18] 万嘉洋, 万海同, 何显, 等. 活血康脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2017, 39(11): 2236-2242.
- [19] Liu Q, Sanai N, Jin WN, et al. Neural stem cells sustain natural killer cells that dictate recovery from brain inflammation[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(2): 243-252.

(此文编辑 曾学清)