

## 积雪草苷通过下调 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 减轻大鼠脑动脉瘤壁的炎症反应和瘤体大小

张波, 义艳, 王俊, 王永

(遂宁市第一人民医院神经内科, 四川省遂宁市 629000)

[关键词] 积雪草苷; TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65; 脑动脉瘤; 炎症反应

[摘要] **目的** 研究积雪草苷调控 Toll 样受体 9 (TLR9)/髓样分化因子 88 (MyD88)/核因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) 对脑动脉瘤(CA)大鼠动脉瘤壁炎症反应的影响。**方法** 建立 CA 大鼠模型, 随机分为模型组、积雪草苷 (50 mg/kg) 组、CpG-ODN (TLR9 激活剂, 4 mg/kg) 组、积雪草苷 (50 mg/kg) + CpG-ODN (4 mg/kg) 组, 每组 12 只, 另取 12 只大鼠设为假手术组。分组处理后, 检测大鼠脑血管壁厚度和动脉瘤体积, 苏木精-伊红 (HE) 染色检测脑血管组织形态, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测大鼠脑血管组织和血清中白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, Western blot 检测大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠血管壁明显变厚, 脑动脉血管隆起, 呈瘤样改变等 CA 症状, 脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平、脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 积雪草苷组大鼠 CA 症状减轻, 脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平、脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ); 而 CpG-ODN 组大鼠 CA 症状加重, 脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平、脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ )。使用积雪草苷和 CpG-ODN 联合处理, 较积雪草苷组大鼠 CA 症状加重, 脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平、脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 积雪草苷可通过下调 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 通路蛋白表达减轻 CA 大鼠脑动脉血管组织的炎症, 减小瘤体。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

## Asiaticoside down-regulates TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 to reduce the inflammation response of aneurysm wall and tumor size in rats with cerebral aneurysm

ZHANG Bo, YI Yan, WANG Jun, WANG Yong

(Department of Neurology, Suining First People's Hospital, Suining, Sichuan 629000, China)

[KEY WORDS] asiaticoside; TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65; cerebral aneurysm; inflammatory response

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of asiaticoside on the inflammatory response in the aneurysm wall of rats with cerebral aneurysm by down-regulating TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65. **Methods** The CA rat model was established, they were randomly divided into model group, asiaticoside (50 mg/kg) group, CpG-ODN (TLR9 activator, 4 mg/kg) group, asiaticoside (50 mg/kg) + CpG-ODN (4 mg/kg) group, with 12 rats in each group, another 12 rats were set as sham operation group. After group treatment, the thickness of the cerebral vessel wall and the volume of the aneurysm in the rats were measured, the morphology of cerebrovascular tissue was detected by HE staining, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in rat brain blood vessels and serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the protein levels of TLR9, MyD88, and nuclear NF- $\kappa$ B p65 in rat brain vascular tissues were detected by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the vascular wall became thicker, the cerebral arteries bulged and showed tumor-like changes and other CA symptoms, the brain blood vessel wall thickness, aneurysm volume, cerebrovascular tissue and serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels, cerebrovascular tissue TLR9, MyD88 levels and nuclear NF- $\kappa$ B p65 protein level increased

[收稿日期] 2021-03-23

[修回日期] 2021-06-22

[基金项目] 四川省中医药管理局科学技术研究专项课题任务 (2020JC0122)

[作者简介] 张波, 副主任医师, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 rzm933@163.com。通信作者王永, 副主任医师, 研究方向为癫痫, E-mail 为 10168559@qq.com。

significantly in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the symptoms of CA became lighter, the brain blood vessel wall thickness, aneurysm volume, cerebrovascular tissue and serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels, cerebrovascular tissue TLR9, MyD88 levels and nuclear NF- $\kappa$ B p65 protein level decreased significantly in the asiaticoside group ( $P < 0.05$ ); but the symptoms of CA were aggravated, the brain blood vessel wall thickness, aneurysm volume, cerebrovascular tissue and serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels, cerebrovascular tissue TLR9, MyD88 levels and nuclear NF- $\kappa$ B p65 protein level increased significantly in the CpG-ODN group ( $P < 0.05$ ). Compared with the asiaticoside group, the symptoms of CA were aggravated, the brain blood vessel wall thickness, aneurysm volume, cerebrovascular tissue and serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels, cerebrovascular tissue TLR9, MyD88 levels and nuclear NF- $\kappa$ B p65 protein level increased significantly in the asiaticoside + CpG-ODN group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Asiaticoside can reduce the inflammation of the cerebral artery tissue of CA rats and reduce the tumor size by down-regulating the expression of TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 pathway protein.

脑动脉瘤 (cerebral aneurysm, CA) 是脑血管系统的组织重塑和局部膨胀, 为神经外科常见的一种脑血管疾病, 发病率较高, 当其破裂时, 所引发的蛛网膜下腔出血会对患者生命安全造成极大威胁, 具有高致死率、高致残率, 血管介入和开颅手术是目前常用的两种有效治疗手段, 但作为有创操作, 具有不可避免的危险及局限性, 因此寻找更为安全有效的无创治疗方法至关重要<sup>[1-2]</sup>。研究表明机体炎症是 CA 的患病因素, 在其发生和发展过程中具有重要作用, 炎症可导致血管内皮细胞肿胀、表面粗糙、形状异变等病理改变, 进而致使其结构重组和膨胀, 引发 CA 并导致其破裂<sup>[3-4]</sup>。积雪草苷是积雪草中含有的主要活性成分, 可减少脂多糖诱导的星形胶质细胞炎症因子、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的表达释放, 减轻细胞炎症损伤, 并可降低组织细胞氧化应激水平, 诱导血管新生, 促使神经细胞存活, 从而缓解脑梗死大鼠脑损伤, 保护脑组织<sup>[5-6]</sup>, 提示积雪草苷可通过抑制炎症防治 CA。Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 是 Toll 样受体家族成员, 髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 是其适配器, 两者结合后, 可激活下游核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号, 促使其向核内转移, 促使炎症介质大量表达, 引发严重的炎症反应, 是细菌感染、脓毒症等各种炎症性疾病的主要致病因素, 抑制 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号激活, 可减轻炎症, 改善脓毒症引发的肺损伤<sup>[7-9]</sup>, 因而可把通过调控 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号而控制炎症反应作为 CA 的潜在治疗手段。本文通过构建 CA 大鼠模型, 对积雪草苷是否可调控 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 来减轻 CA 大鼠动脉瘤壁的炎症反应进行初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠购自珠海百试通生物科技有限公司 [许可证号 SCXK (粤) 2020-0051], SPF 级, 体质量 180 ~ 200 g, 约 40 日龄。饲养于本院标准动物房中, 室内温度 25  $^{\circ}$ C 上下, 湿度 50% 左右, 光照保持 12 h/12 h 明暗规律交替, 噪声小于 60 dB, 并维持室内环境通风良好。

### 1.2 主要试剂及仪器

积雪草苷 (纯度  $\geq 98\%$ ) 购自江苏永健医药科技有限公司 (批号: 101448); CpG-ODN 购自美国 InvivoGen 公司 (货号: tlr1-1826); 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒购自上海信帆生物科技有限公司 (货号: G1120-10); 总蛋白提取试剂盒、核蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司 (货号: BB-3101、BB-3102); BCA 蛋白定量分析试剂盒购自赛默飞世尔科技 (货号: 23221-23230); 大鼠 TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、大鼠 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒, 兔源 anti-TLR9、anti-MyD88、anti-PCNA、anti-NF- $\kappa$ B p65 和 anti-GAPDH 一抗, 羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司 (货号: ab100785、ab100768、ab52967、ab219413、ab18197、ab16502、ab181602、ab150077) 等。

MR-96T 酶标仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; DSX510i 显微镜购自日本尼康奥林巴斯公司; RM2125RTS 切片机购自德国 Leica 公司; DY CZ-40K 转印电泳仪、DY CZ-24DH 双板垂直电泳仪、WD-9413D 一体式凝胶成像系统购自北京六一生物科技有限公司等。

### 1.3 CA 大鼠模型制备及分组给药

参照文献<sup>[10]</sup>, 取 52 只 SD 大鼠, 配制 2.5% 戊巴比妥钠溶液, 以 45 mg/kg 的剂量对其进行腹腔注射, 待大鼠麻醉完成后, 俯卧固定在操作台, 背部去

毛消毒,于背肋缘下纵向切开,钝性分离双侧肾动脉并以丝线结扎,缝合伤口后放回饲养笼中;1 周后经同样方法麻醉后,切开颈部,分离左侧颈总动脉并以丝线结扎,然后放回饲养笼中,使用 1% 的盐水代替正常饮水继续饲养;4 周后大鼠体温升高,出现动眼神经麻痹、轻度偏瘫等症状,超声检查发现颅内压升高,表明 CA 模型大鼠建立成功。共造模 52 只,成功 48 只,成功率为 92.3%,随机分为模型组、积雪草苷组、CpG-ODN 组、积雪草苷+CpG-ODN 组,每组 12 只。另取 12 只大鼠只分离双侧肾动脉及左侧颈总动脉,不以丝线结扎,给予普通饮用水喂养,设为假手术组。

造模成功后,将积雪草苷、CpG-ODN 分别溶解在生理盐水中,得到 5 g/L 的积雪草苷<sup>[11]</sup>药液和 0.4 g/L 的 CpG-ODN<sup>[12]</sup>药液,积雪草苷(5 g/L)+CpG-ODN(0.4 g/L)的混合药液,药物处理组大鼠均以 10 mL/kg 的剂量每日腹腔注射给药,假手术组与模型组大鼠以等剂量生理盐水每日腹腔注射给药,每天用药 1 次,持续用药 21 天。

#### 1.4 大鼠脑血管壁厚度、动脉瘤体积检测及标本收集

用药完成后 24 h,通过吸入乙醚的方法麻醉大鼠,以 5 mL 注射器自腹主动脉取血 3 mL,经静置离心后,吸出上清置于干净 Ep 管中,保存在-80 °C 冰箱;大鼠断头取出大脑,分离出脑动脉(Wills)环,于 40 倍显微镜下观察血管形态改变,尤其是右侧的大脑前动脉—嗅动脉段血管,检测其血管壁厚度及动脉瘤体积;分离出脑血管动脉瘤组织及相对应位置的动脉血管组织,其中 6 份材料,分别使用总蛋白提取试剂盒、核蛋白提取试剂盒提取脑血管组织中总蛋白及核蛋白,分装在干净 Ep 管中,保存在液氮中;剩余 6 份脑血管组织材料,经固定后,进行脱水透明,以石蜡包埋后切片(4 μm)。

#### 1.5 大鼠脑血管组织形态检测

选出 1.4 中完整的脑血管组织切片,做常规脱蜡,分别以 80%、70%、60% 的乙醇溶液浸泡后,置于蒸馏水中漂洗,以 HE 染色试剂盒进行染色后,将切片小心转移至载玻片上封片,通过光学显微镜观察脑血管组织形态。

#### 1.6 大鼠脑血管组织和血清中 IL-1β、TNF-α 水平检测

1.4 中的组织总蛋白提取液和血清,提前在 4 °C 冰箱中化冻,各取 200 μL,通过 ELISA 检测其中 IL-1β、TNF-α 水平,具体操作参照说明书指导进行。

#### 1.7 大鼠脑血管组织 TLR9/MyD88/NF-κB p65 通路相关蛋白表达检测

1.4 中剩余的组织总蛋白提取液和核蛋白提取

液,提前在 4 °C 冰箱中化冻,以 BCA 法测定其中蛋白总浓度后,各取含 20 μg 蛋白的样品液加入 SDS-PAGE 浓缩胶的上样孔中,接通电源,在 110 V 电压下分离蛋白约 1.5 h,然后湿转,110 V 电压下进行 1.5 h,采用脱脂奶粉溶液封闭 PVDF 膜上的蛋白,裁下目的蛋白条带,分别以兔源 anti-TLR9、anti-MyD88、anti-PCNA、anti-NF-κB p65 和 anti-GAPDH 一抗溶液(稀释比例均为 1:2 000)4 °C 孵育,12 h 后吸出一抗溶液,洗膜 3 次,加入羊抗兔二抗溶液(稀释比例为 1:1 000)室温孵育,1.5 h 后吸出二抗溶液,洗膜 3 次,通过化学发光试剂显色,以凝胶成像系统对蛋白条带拍照,采用 Image-J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 或 PCNA 为内参蛋白,得到 TLR9、MyD88 及核内 NF-κB p65 蛋白相对表达量。

#### 1.8 统计学分析

通过 SPSS 22.0 软件分析实验数据,采用  $\bar{x} \pm s$  表示计量数据,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑血管壁厚度及动脉瘤体积

与假手术组相比,模型组大鼠脑血管壁厚度及动脉瘤体积明显增加( $P < 0.05$ )。与模型组相比,积雪草苷组大鼠脑血管壁厚度及动脉瘤体积减小( $P < 0.05$ ),CpG-ODN 组大鼠脑血管壁厚度及动脉瘤体积增加( $P < 0.05$ ;表 1)。与积雪草苷组相比,积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠脑血管壁厚度及动脉瘤体积增加( $P < 0.05$ ;表 1)。积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠脑血管壁厚度及动脉瘤体积较 CpG-ODN 组减小( $P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. 各组大鼠脑血管壁厚度和动脉瘤体积( $n = 12$ )

Table 1. Cerebral vascular wall thickness and aneurysm volume of rats in each group ( $n = 12$ )

分组	血管壁厚度/μm	肿瘤体积/mm <sup>3</sup>
假手术组	15.07±1.78	0.00±0.00
模型组	26.35±3.04 <sup>a</sup>	13.83±2.02 <sup>a</sup>
积雪草苷组	17.08±2.36 <sup>b</sup>	1.81±0.26 <sup>b</sup>
CpG-ODN 组	32.67±3.18 <sup>b</sup>	18.98±2.43 <sup>b</sup>
积雪草苷+CpG-ODN 组	25.49±2.97 <sup>ac</sup>	12.65±1.94 <sup>ac</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组相比;c 为  $P < 0.05$ ,与积雪草苷组和 CpG-ODN 组相比。

## 2.2 脑血管组织形态学变化

假手术组脑血管组织形态正常;模型组大鼠血管壁明显变厚,脑动脉血管隆起,呈瘤样改变等CA症状;积雪草苷组大鼠血管壁变薄,瘤体变小,CA症状变轻;CpG-ODN组大鼠血管壁进一步变厚,瘤

体变大,甚至动脉瘤破裂,血管弹性纤维断裂,CA症状加重;与积雪草苷组相比,积雪草苷+CpG-ODN组大鼠上述CA症状加重;与CpG-ODN组相比,积雪草苷+CpG-ODN组大鼠上述CA症状变轻(图1)。

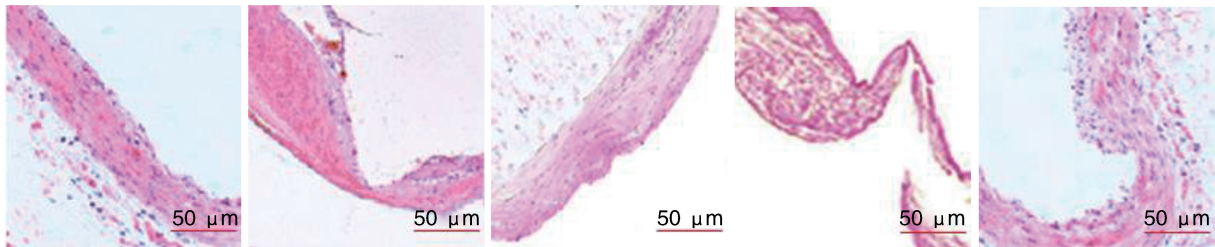


图1. 各组大鼠脑血管组织形态学变化

从左到右依次为假手术组、模型组、积雪草苷组、CpG-ODN组和积雪草苷+CpG-ODN组。

Figure 1. Histomorphological changes of cerebral vessels in each group

## 2.3 脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平

与假手术组相比,模型组大鼠脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平明显升高( $P<0.05$ )。与模型组相比,积雪草苷组大鼠脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ ),而 CpG-ODN 组大鼠脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ ;表2)。与积雪草苷组相比,积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ ;表2);与 CpG-ODN 组相比,积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ ;表2)。

表2. 各组大鼠脑血管组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平( $n=6$ )

Table 2. The levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  in cerebral vascular tissue of rats in each group ( $n=6$ )

分组	IL-1 $\beta$ /( $\mu\text{g/g}$ )	TNF- $\alpha$ /( $\mu\text{g/g}$ )
假手术组	1.72 $\pm$ 0.31	1.22 $\pm$ 0.13
模型组	4.38 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	3.35 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
积雪草苷组	1.81 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	1.30 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
CpG-ODN 组	6.27 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	4.49 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
积雪草苷+CpG-ODN 组	4.32 $\pm$ 0.57 <sup>ac</sup>	3.27 $\pm$ 0.25 <sup>ac</sup>

注:a为 $P<0.05$ ,与假手术组相比;b为 $P<0.05$ ,与模型组相比;c为 $P<0.05$ ,与积雪草苷组和 CpG-ODN 组相比。

## 2.4 血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平

与假手术组相比,模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平明显升高( $P<0.05$ )。与模型组相比,积雪草苷组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ ),CpG-ODN 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ ;表3)。与积雪草苷组相比,积雪草苷+CpG-

ODN 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ ;表3)。而与 CpG-ODN 组相比,积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ ;表3)。

表3. 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平( $n=12$ )

Table 3. The levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  in serum of rats in each group ( $n=12$ )

分组	IL-1 $\beta$ /( $\mu\text{g/L}$ )	TNF- $\alpha$ /( $\mu\text{g/L}$ )
假手术组	1.12 $\pm$ 0.14	0.91 $\pm$ 0.09
模型组	3.89 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	2.72 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
积雪草苷组	1.21 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
CpG-ODN 组	5.16 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	3.99 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
积雪草苷+CpG-ODN 组	3.76 $\pm$ 0.47 <sup>ac</sup>	2.65 $\pm$ 0.29 <sup>ac</sup>

注:a为 $P<0.05$ ,与假手术组相比;b为 $P<0.05$ ,与模型组相比;c为 $P<0.05$ ,与积雪草苷组和 CpG-ODN 组相比。

## 2.5 脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平

与假手术组相比,模型组大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显升高( $P<0.05$ )。与模型组相比,积雪草苷组大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低( $P<0.05$ ),CpG-ODN 组大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平升高( $P<0.05$ ;图2)。与积雪草苷组相比,积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平升高( $P<0.05$ ;图2)。而与 CpG-ODN 组相比,积雪草苷+CpG-ODN 组大鼠脑血管组织 TLR9、

MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

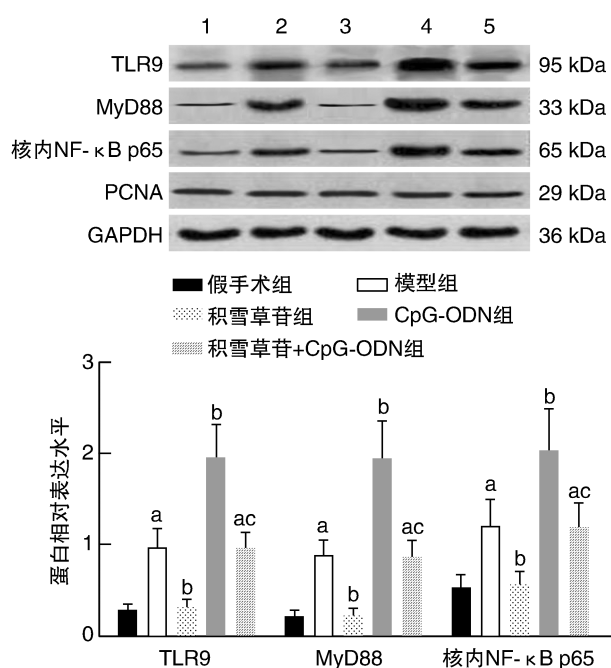


图 2. 各组大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达

1 为假手术组, 2 为模型组, 3 为积雪草苷组, 4 为 CpG-ODN 组, 5 为积雪草苷+CpG-ODN 组。a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组相比; c 为  $P < 0.05$ , 与积雪草苷组和 CpG-ODN 组相比。

Figure 2. The TLR9, MyD88, nuclear NF- $\kappa$ B p65 protein expression in cerebral vascular tissue of rats in each group

### 3 讨论

CA 作为一种常见的脑血管疾病, 因其早期未破裂时没有明显的症状而难以诊断出, 因此大多数 CA 患者就医时都会发生血管破裂出血, 进而引发严重的脑损伤, 对患者家庭和社会都会造成巨大负担<sup>[13-15]</sup>。近年来研究发现, 吸烟、感染等均是引发 CA 的危险因素, 其中各种危险因子诱导的炎症介质过量表达和炎性细胞浸润, 可引发血管内皮损伤, 导致动脉管壁弹力纤维破裂, 进而致使血管组织重塑, 引起 CA 发生<sup>[4,16]</sup>。诱导大鼠肾性高血压, 可造成局部脑血管壁遭受血流冲击力增大, 破坏动脉壁结构, 引发炎症及血管内皮损伤, 最终导致 CA, 是基础研究中常用的建立 CA 动物模型法<sup>[10]</sup>, 本研究以此方法构建 CA 模型大鼠, 经 HE 染色发现, 建模大鼠血管壁明显变厚, 脑动脉血管隆起, 呈瘤样

改变, 且脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平明显升高, 表明建模大鼠产生脑部炎症, 引发 CA, 提示模型建立成功。

积雪草苷是提取自积雪草的活性成分, 具有神经保护、抗菌、抗炎等药理作用, 可通过抑制炎症减轻高氧导致的新生大鼠肺损伤, 保证支气管和肺正常发育, 并减轻低氧性肺动脉高压<sup>[17-18]</sup>; 另外李磊等<sup>[11]</sup>研究表明积雪草苷能促进血管新生, 减轻脑梗死大鼠脑损伤, 提示积雪草苷可能对 CA 具有一定的疗效。本研究结果显示, 以积雪草苷处理 CA 大鼠, 可使其血管壁变薄, 瘤体变小, CA 症状减轻, 并降低脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平, 表明积雪草苷可减少炎症因子合成, 抑制炎症反应, 减轻动脉血管组织损伤, 改善 CA 症状。

TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B 是调控炎症反应的主要信号通路之一, 在各种心血管疾病的发生及疾病进展中起着至关重要的作用, 上调该通路蛋白表达, 可显著上调炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平, 促使脂多糖激活的巨噬细胞中炎症反应; 抑制 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号激活, 可改善土荆皮酸诱导的大鼠右心室功能障碍<sup>[19-20]</sup>。由此推测, 通过介导 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号传导来调控炎症反应, 可能是防治 CA 的一个有效手段。本研究结果显示, CA 模型大鼠脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显升高, 以 TLR9 激活剂 CpG-ODN 处理 CA 大鼠, 可导致其血管壁进一步变厚, 瘤体变大, 甚至动脉瘤破裂, 血管弹性纤维断裂, CA 症状加重, 并增加大鼠脑血管壁厚度、动脉瘤体积, 升高脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平以及脑血管组织 TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平, 表明 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 介导 CA 的发生发展过程, 激活该通路, 可促使 CA 病情进展, 加重其临床症状; 以积雪草苷处理 CA 大鼠后, TLR9、MyD88 及核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平均下调, 表明积雪草苷可抑制 TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 信号激活; 使用积雪草苷和 CpG-ODN 联合处理 CA 大鼠, 可减弱积雪草苷降低 CA 大鼠脑血管壁厚度、动脉瘤体积、脑血管组织和血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平的作用, 进而几乎逆转积雪草苷改善 CA 症状的效果。

综上所述, 积雪草苷可下调 TLR9、MyD88 蛋白表达, 减少 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的核转移, 减弱大鼠炎症反应, 降低脑动脉血管损伤, 减小瘤体并阻止其破裂出血, 改善 CA 症状, 提示积雪草苷可以作为治疗 CA 的一种新药物, 具有重要的临床意义, 下调

TLR9/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 通路蛋白表达是积雪草苷的作用机制之一,关于其更为详细明确的机制后续会进行深入研究。

#### [参考文献]

- [1] WAJIMA D, HOURANI S, DODD W, et al. Interleukin-6 promotes murine estrogen deficiency-associated cerebral aneurysm rupture[J]. *Neurosurgery*, 2020, 86(4): 583-592.
- [2] 湛镇伊, 杨建安, 邓阳欢. 传统及改良全胸腹主动脉替换术的临床疗效及术后并发症分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(6): 518-521.
- [3] QUAN K, SONG J, YANG Z, et al. Validation of wall enhancement as a new imaging biomarker of unruptured cerebral aneurysm[J]. *Stroke*, 2019, 50(6): 1570-1573.
- [4] ZHAO M G, PENG C, LI L M, et al. Circulating Treg cells from patients with cerebral aneurysms displayed deficiency in ICOS expression and function [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(12): 1923-1931.
- [5] 令狐浪, 贾有敬, 陈静, 等. 积雪草苷对脂多糖诱导星形胶质细胞炎症损伤的作用[J]. *遵义医学院学报*, 2018, 41(2): 160-164.
- [6] 冯珊珊, 阎宇, 王磊. 积雪草苷对大鼠缺血再灌注脑组织损伤的保护作用研究[J]. *解放军医药杂志*, 2021, 33(2): 1-4.
- [7] ZYSAK J, MITKIEWICZ M, LESZCZYŃSKA E, et al. HSV-1/TLR9-mediated IFN $\beta$  and TNF $\alpha$  induction is Mal-dependent in macrophages[J]. *J Innate Immun*, 2020, 12(5): 387-398.
- [8] ZENG Z, LI D, LIU F, et al. Mitochondrial DNA plays an important role in lung injury induced by sepsis[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 120(5): 8547-8560.
- [9] JAVMEN A, SZMACINSKI H, LAKOWICZ J R, et al. Blocking TIR domain interactions in TLR9 signaling[J]. *J Immunol*, 2018, 201(3): 995-1006.
- [10] 李伟峰, 郭勇, 杨茜, 等. 白藜芦醇对脑动脉瘤大鼠外周血内皮祖细胞及 VEGF 和 TGF- $\beta$  表达水平的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2020, 27(5): 618-621.
- [11] 李磊, 高绚照, 马连萍, 等. 积雪草苷通过激活 PI3K/Akt 信号通路缓解局灶性脑梗死大鼠脑组织损伤和诱导血管新生[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(17): 2068-2072, 2078.
- [12] 郑波, 陈涛, 毛华. CpG-ODN 对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2018, 23(3): 176-181.
- [13] FUKUDA S, SHIMOGONYA Y, YONEMOTO N, et al. Differences in cerebral aneurysm rupture rate according to arterial anatomies depend on the hemodynamic environment [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2019, 40(5): 834-839.
- [14] SHEINBERG D L, MCCARTHY D J, ELWARDANY O, et al. Endothelial dysfunction in cerebral aneurysms [J]. *Neurosurg Focus*, 2019, 47(1): E3.
- [15] ZAIKA O, BOULTON M, EAGLESON R, et al. Surgical workflow analysis in cerebral aneurysm coiling[J]. *FASEB J*, 2020, 34(S1): 1-1.
- [16] MÜNSTERBERG J, ECKERT B, RÖTHER J. Cerebral aneurysm: De novo Genesis and rupture within 15 days [J]. *Eur J Neurol*, 2021, 28(3): 1084-1085.
- [17] 麦朗君, 符学兴, 何昱, 等. 积雪草苷对高氧致新生大鼠支气管肺发育不良的保护作用及其机制研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(1): 71-76.
- [18] 张婷, 蔡海鉴, 杨林, 等. 积雪草苷通过抑制 NF- $\kappa$ B/p38 通路减轻小鼠低氧性肺动脉高压[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(9): 1600-1607.
- [19] MA H Q, JANTAN I, HARIKRISHNAN H, et al. Magnoflorine enhances LPS-activated pro-inflammatory responses via MyD88-dependent pathways in U937 macrophages[J]. *Planta Med*, 2018, 84(17): 1255-1264.
- [20] YOSHIDA K, ABE K, ISHIKAWA M, et al. Inhibition of TLR9-NF- $\kappa$ B-mediated sterile inflammation improves pressure overload-induced right ventricular dysfunction in rats [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(3): 658-668.

(此文编辑 许雪梅)