

基于 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路探讨益母草碱对缺血性脑卒中大鼠脑组织病理变化的影响

杜帅¹, 刘佳², 刘婷², 李丹², 房江山², 马娜², 孟新玲²

(新疆维吾尔自治区中医医院 1. 神经内科, 2. 脑病一科, 新疆乌鲁木齐市 830099)

[关键词] 益母草碱; 缺血性脑卒中; 脑组织病理变化; PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路

[摘要] 目的 基于 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路探讨益母草碱对缺血性脑卒中大鼠脑组织病理变化的影响。

方法 建立缺血性脑卒中大鼠模型, 给予益母草碱, 连续给药 7 天后, 观察各组大鼠神经功能损害评分; 检测大鼠脑组织中氧化应激指标含量; TTC 染色法检测大鼠脑梗死面积百分比; HE 染色法观察大鼠脑组织皮质区和海马区病理学变化情况; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应测定大鼠脑组织内梗死侧皮层血管内皮生长因子(VEGF)、低氧诱导因子 1 α (Hif-1 α) mRNA 的表达变化; Western blot 检测脑组织中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)、核因子 κ B(NF- κ B) 蛋白表达。结果 与空白对照组相比, 模型对照组大鼠的神经功能损害评分、一氧化氮(NO)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS) 含量、VEGF 和 Hif-1 α mRNA 表达、NF- κ B 蛋白表达明显升高, 氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)、超氧化物歧化酶(SOD) 含量、AKT、PI3K 蛋白表达明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠的神经功能损害评分、NO、eNOS 含量、VEGF 和 Hif-1 α mRNA 表达、NF- κ B 蛋白表达明显降低, ox-LDL、SOD 含量、AKT、PI3K 蛋白表达明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论 益母草碱对实验性脑损伤大鼠具有脑保护作用, 可以改善脑梗死后的神经损伤, 减少脑梗死体积, 降低大鼠的氧化应激反应, 这些效应可能是通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路实现的。

[中图分类号] R96; R743

[文献标识码] A

Effect of leonurine on pathological changes of cerebral tissue in ischemic stroke rats based on PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway

DU Shuai¹, LIU Jia², LIU Ting², LI Dan², FANG Jiangshan², MA Na², MENG Xinling²

(1. Department of Neurology, 2. Department of Encephalopathy, Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi, Xinjiang 830099, China)

[KEY WORDS] leonurine; ischemic stroke; pathological changes of brain tissue; PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of leonurine on the pathological changes of cerebral tissue in rats with ischemic stroke based on PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway. **Methods** The rat model of ischemic stroke was established, and leonurine was administered continuously for 7 days. The neurological impairment score of each group was observed. The content of oxidative stress index was detected in rat brain tissue. The percentage of cerebral infarction area in rats was detected by TTC staining. HE staining was used to observe the pathological changes in cortex and hippocampus of rat brain. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor 1 α (Hif-1 α) in cerebral infarction cortex of rats were measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. Western blot was used to detect the protein expressions of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), serine-threonine protein kinase (AKT) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in brain tissue. **Results** Compared with the blank control group, the neurological impairment score, the contents of nitric oxide (NO) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), mRNA expressions of VEGF and Hif-1 α and protein expression of NF- κ B were increased significantly, the contents of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and superoxide dismutase (SOD), and protein expressions of AKT and PI3K were

[收稿日期] 2019-01-08

[修回日期] 2019-06-17

[作者简介] 杜帅, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管病静脉溶栓及血管内治疗, E-mail 为 tuoxigd751664@163.com。通信作者孟新玲, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为阿尔茨海默病, E-mail 为 altmxl@126.com。

decreased significantly in rats of model control group; The differences had statistical significance ($P < 0.01$). Compared with the model control group, the neurological impairment score, the contents of NO and eNOS, mRNA expressions of VEGF and Hif-1 α and protein expression of NF- κ B were decreased significantly, the contents of ox-LDL and SOD, and protein expressions of AKT and PI3K were increased significantly in rats of positive control group and middle- and high-dose leonurine group; The differences had statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusions** Leonurine has brain protective effect on rats with experimental brain injury. It can improve nerve injury after cerebral infarction, reduce the volume of cerebral infarction and reduce oxidative stress response. These effects may be achieved through PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway.

脑卒中又称为中风,是主要的神经系统疾病之一,其致死率和致残率在全球疾病负担排序中排第二,该病成年人的发病率约为2.7%,约33.3%病人因脑卒中复发而遗留永久残疾,在老年人中更多见^[1]。目前,脑卒中的临床诊断和治疗水平已明显提高,但是大多数患者会留下偏瘫、语言功能丧失、生活自信心缺乏等后遗症,需要后续长期康复治疗,不仅会影响患者的生活质量和生命安全,还会给患者家庭和社会带来沉重的经济负担^[2-3]。脑卒中根据其病因可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中占脑卒中的87%^[4]。缺血性脑卒中的主要病理过程包括兴奋性毒性、脂质代谢紊乱、炎症反应和氧化应激,氧化应激反应的增强会导致脑卒中的神经损伤加重,血脂中氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、氧化应激因子一氧化氮(nitric oxide, NO)含量以及内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是氧化应激和脂质代谢的重要指标,也是缺血性脑卒中病情变化的重要检测指标^[5-6]。

益母草碱(leonurine, LEO)是唇形科植物益母草[*Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F]的主要有效成分之一,其具有抗血小板凝集、降低血液黏稠度、增加血液流量、舒张血管等生理活性作用,对心肌缺血、脑缺血、心肌纤维化等多种缺血性疾病有一定的治疗效果,可以作为一个新型的心脑血管疾病的药物进行开发利用^[7-10]。本研究建立缺血性脑卒中大鼠模型,通过对各组大鼠相关指标的检测,探讨益母草碱对缺血性脑卒中大鼠血管再生及脑组织病理学变化的影响,并研究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用大鼠均从石河子大学实验动物中

心购买(许可证号:SCXK 新 2018-0076),180只实验用大鼠均为SD大鼠,雌雄各半,体质量180~220g。在恒温(24 ± 1)℃下每笼饲养5只,暗/光循环12h,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)药品与试剂:益母草碱(西安通泽生物科技有限公司,生产批号:TZ18590);尼莫地平(山东健康药业有限公司,国药准字:H37022779);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)(美国Sigma公司,生产批号:T8877);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,生产批号:G1120);ox-LDL试剂盒(上海百蕊生物科技有限公司,生产批号:QY-H10046);SOD试剂盒(上海如吉生物科技发展有限公司,生产批号:SHJ1884);NO试剂盒(碧云天生物技术公司,生产批号:S1047);eNOS试剂盒(碧云天生物技术公司,生产批号:S1049);大鼠抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体、低氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , Hif-1 α)抗体、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine protein kinase, AKT)、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司。

(2)仪器:AlphaEaseFC型灰度分析软件(美国Alpha Innotech公司);T100型实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative PCR, Real-time PCR)仪(北京伯辉生物科技有限公司);DYY-1C型凝胶成像系统(北京六一仪器厂);TE77XP型半干转膜仪系统(美国Hoefer公司);显微镜(日本NikonE公司);CUT4062型石蜡切片机、包埋机(德国SLEE公司)。

1.3 实验分组与动物模型制备

参考文献^[11-12],采用改良的Longa线栓法制备大鼠缺血性脑卒中模型。将180只SD大鼠按随机

数字表法分为空白对照组 (Normal)、模型对照组 (Model)、阳性对照组 (尼莫地平; Nimodipine)、益母草碱低、中、高剂量组 (LEO-L、LEO-M、LEO-H), 每组 30 只, 除空白对照组外其他各组大鼠采用改良的 Longa 线栓法制备大鼠缺血性脑卒中模型。空白对照组和模型对照组给予 20 mL/kg 的生理盐水, 阳性对照组给予 0.4 mg/(kg·d) 的尼莫地平, 益母草碱低、中、高剂量组分别给予 4、8、16 mg/(kg·d) 的益母草碱, 均灌胃给予, 连续给药 7 天。从第 6 天晚上 8 点开始, 除空白对照组外, 其余各组大鼠禁食不禁水 12 h。在第 7 天早上 8 点, 各组大鼠进行称重和给药。1 h 后腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.003 mL/g) 麻醉动物。分离大鼠的左颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA), 结扎颈总动脉和颈外动脉, 用动脉夹阻断颈内动脉远心端。在离颈总动脉 1 mm 处切开宽度约 0.2 mm 的切口, 通过分叉将鱼线插入颈内动脉。鱼线在分叉上方 8~10 mm 处向前推进, 直至出现阻力, 即到达并阻塞左侧大脑中动脉开口处, 扎紧动脉残端并剪断鱼线的尾段部分, 对大鼠进行消毒以防大鼠感染。大鼠放回笼内给予食物及水, 采用白炽灯维持大鼠体温在 37℃ 左右。2 h 后拔线, 再灌注 24 h。大鼠麻醉过后出现神经功能缺失症状并且能够存活 24 h 的即为造模成功。造模及后续实验过程中模型对照组和益母草碱低剂量组各损失 4 只大鼠, 阳性对照组、益母草中、高剂量组各损失 2 只大鼠。

各组大鼠在造模成功后参照 Longa 等的方法采用 5 分制进行神经功能缺失评分。0 分: 无神经功能缺损症状, 活动正常; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 爬行时向偏瘫侧旋转; 3 分: 大鼠行走时会向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失; 5 分: 死亡。筛选出 0 分和 5 分的大鼠。

1.4 大鼠神经功能损害评分

大鼠神经功能损害评分 (modified neurological severity score, mNSS) 参照文献^[13-14]方法进行, 各组分别取出 12 只大鼠在给药后 24 h、3 天、7 天和 14 天时通过提尾反射、平衡性测试、行走测试、感觉测试、反射缺失和反常运动来进行评分, 动物的最高得分为 18 分, 缺少一项反射或者动物不能完成一项任务的就给 1 分。

1.5 大鼠氧化应激指标检测

末次给药结束后大鼠禁食不禁水 12 h, 之后每组取出 4 只将其脱臼处死, 快速取出大鼠脑组织, 脑组织左半球呈矢状切, 右侧被丢弃, 将左侧大脑半球的一半盐水冲洗去血, 用滤器吸收组织上残留的

盐水。测量左脑半球的重量, 以确定所加盐水的体积。将盐水和脑组织按盐水与脑组织之比为 9:1 的比例放入装有冰块的烧杯中, 用玻璃匀浆器制成 10% 的脑组织匀浆液, 在 4℃ 下 3 000 r/min 离心 10 min, 在 -80℃ 保存待测。严格按照试剂盒说明书操作, 黄嘌呤氧化法检测 SOD 活性, 酶联免疫吸附测定法检测脑组织中 ox-LDL、NO、eNOS 含量。

1.6 TTC 染色法检测各组大鼠脑梗死面积

末次给药结束后大鼠禁食不禁水 12 h, 每组取出 5 只, 将其脱臼处死, 快速取出大鼠脑组织, 置于 10% 福尔马林溶液中固定 1 周, 脑组织从福尔马林中取出后吸干组织表面的水分, 置于 -20℃ 冰箱中 30 min, 然后将其切制成 2~3 mm 的切片, 将切片置于 TTC 溶液中避光浸染 35 min, 再置于 10% 福尔马林溶液中固定 24 h, 吸干组织表面的水分, 采用 IPP 图像分析系统测量大鼠脑梗死面积 (红色为正常脑组织, 白色为脑梗死区)。

1.7 HE 染色法观察大鼠脑组织皮质区病理学变化和海马脑组织病理学变化

末次给药结束后大鼠禁食不禁水 12 h, 每将其脱臼处死, 快速取出大鼠脑组织, 将左侧大脑半球的一半置于 10% 福尔马林溶液中, 固定 1 周, 进行石蜡包埋, 采用石蜡切片机切制成 5 μm 左右的冠状切片。采用 HE 染色试剂盒进行染色, 置于显微镜下观察大鼠脑组织皮质病理学变化和海马区病理学变化。

1.8 Real-time PCR 测定大鼠 VEGF 和 Hif-1α 的 mRNA 表达

末次给药结束后大鼠禁食不禁水 12 h, 每组取出 4 只, 将其脱臼处死, 取出大鼠脑组织, 采用 Transzol 试剂盒提取各组脑组织中总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性, 260 nm 处检测 RNA 的纯度。在实时 PCR 检测系统上进行实时定量 PCR。根据引物进行扩增, Real-time PCR 反应条件如下: 95℃ 15 s、66℃ 20 s、72℃ 30 s、95℃ 15 s、64℃ 20 s、72℃ 30 s、95℃ 15 s、62℃ 20 s、72℃ 30 s、95℃ 15 s、60℃ 20 s、72℃ 30 s, 共进行 40 个循环, 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 VEGF 和 Hif-1α mRNA 的含量。引物扩增序列见表 1。

1.9 Western blot 法检测脑组织中 PI3K、AKT、NF-κB 蛋白表达

末次给药结束后大鼠禁食不禁水 12 h, 每组取出 4 只, 将其脱臼处死, 取出大鼠脑组织, 用组织蛋白抽提试剂盒提取相应组织蛋白, 采用 BCA 法检测

蛋白浓度,并将其制成含等量蛋白的蛋白组织样品。加入蛋白上样缓冲液并煮沸后,制作12% SDS-PAGE凝胶进行电泳,半干转膜仪转膜。一抗浓度为:PI3K(1:1 000)、AKT(1:1 000)、NF- κ B(1:500)、 β -actin(1:2 000)。以 β -actin作为内参。化学发光法检测,Quantity One软件进行图像分析。

表 1. Real-time PCR 引物扩增序列
Table 1. Real-time PCR primer amplification sequence

| 基因 | 序列 |
|----------------|--------------------------------|
| β -actin | 正向:5'-GGGGCTCTCTGCTCCTCCCTC-3' |
| | 反向:5'-AGGCGTCCGATACGGCCAAAA-3' |
| VEGF | 正向:5'-TCATAGCGGCAAGACACCT-3' |
| | 反向:5'-GCTGCTCATTACTCTTTGTC-3' |
| Hif-1 α | 正向:5'-GCCACCACGCTCTTCTGC-3' |
| | 反向:5'-GCTACGGGCTTGTCACTCG-3' |

1.10 统计方法
运用 SPSS 21.0 统计软件进行实验数据分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 来表示,多组数据比较采用方差分析,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 益母草碱对大鼠神经功能损害评分的影响
与空白对照组相比,模型对照组大鼠的神经功能损害评分明显增加($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠的神经功能损害评分明显降低($P<0.01$)。随着给药时间的延长,各组大鼠神经功能损害评分明显降低,且神经功能损害评分降低程度与益母草碱的浓度呈一定的依赖性(图 1)。

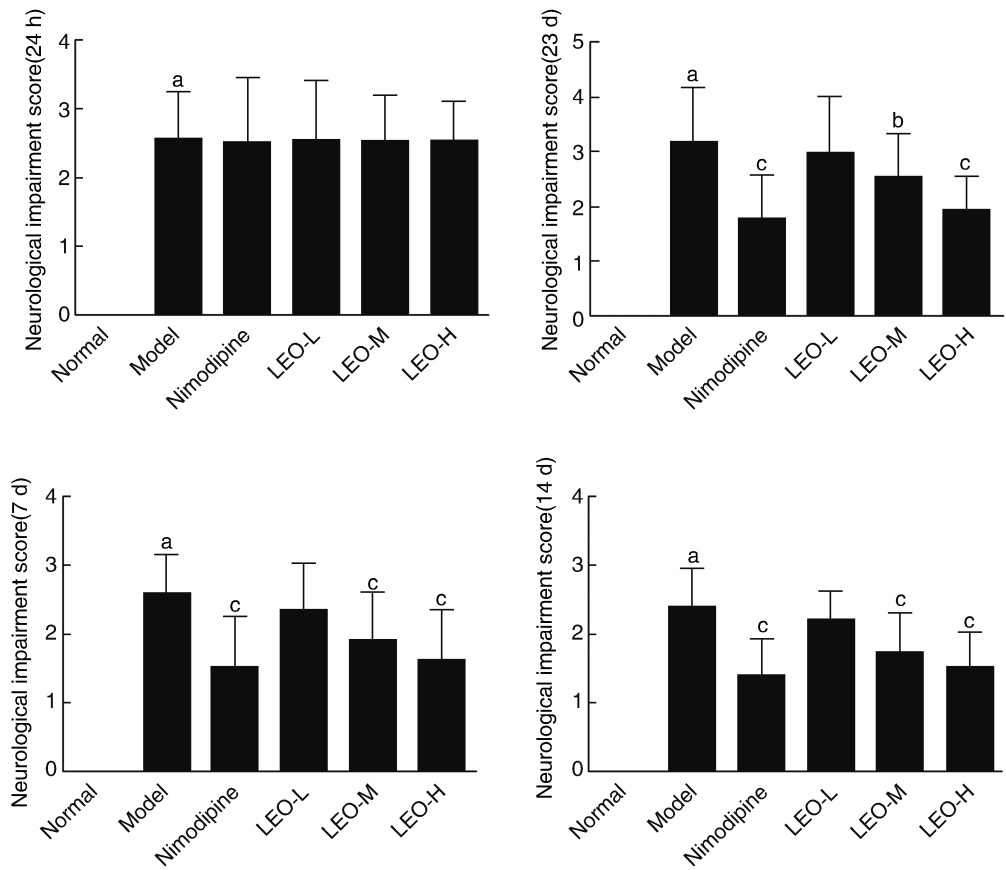


图 1. 益母草碱对大鼠神经功能损害评分的影响($n=12$) a 为 $P<0.01$,与空白对照组相比;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与模型对照组相比。
Figure 1. Effect of leonurine on neurological impairment score in rats ($n=12$)

2.2 益母草碱对大鼠 ox-LDL、SOD、NO、eNOS 含量的影响

与空白对照组相比,模型对照组大鼠脑组织中 NO、eNOS 含量明显升高,ox-LDL、SOD 含量明显下

降($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠脑组织中 NO、eNOS 含量明显下降,SOD 含量明显升高($P<0.01$;图 2)。

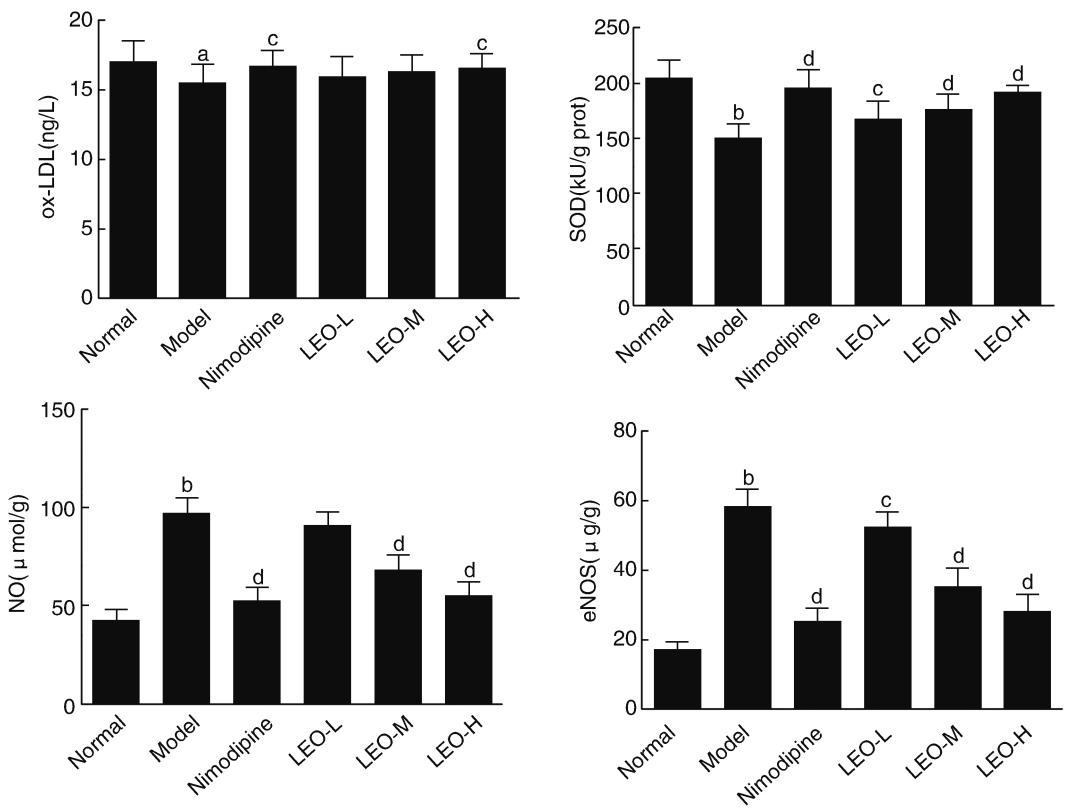


图 2. 益母草碱对大鼠 ox-LDL、SOD、NO、eNOS 含量的影响($n=4$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与模型对照组相比。

Figure 2. Effect of leonurine on the contents of ox-LDL, SOD, NO and eNOS in rats ($n=4$)

2.3 益母草碱对大鼠脑梗死面积的影响

与空白对照组相比,模型对照组大鼠的脑梗死面积百分比明显增加($P<0.01$),表明模型成功。与模型对照组相比,阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠的脑梗死面积百分比明显下降($P<0.01$;图 3)。结果表明,各组给药均能保护大鼠缺血性脑卒中模型的脑细胞和神经系统,降低脑梗死面积。益母草低剂量组大鼠的脑梗死面积百分比虽有所下降,但与模型对照组无显著性差异。

2.4 益母草碱对大鼠脑组织皮质病理学的影响

空白对照组大鼠脑组织的皮质区偶尔出现不规则或者已凋亡的神经细胞。与空白对照组相比,模型对照组大鼠的脑组织皮质区凋亡细胞数显著增加($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠的脑组织皮质区神经细胞凋亡数明显减少($P<0.01$),益母草碱对神经细胞

凋亡的影响与其剂量呈量效关系(图 4、表 2)。

表 2. 益母草碱对大鼠脑组织皮质病理学的影响
Table 2. Effect of leonurine on the pathological changes of cerebral cortex in rats

| 分组 | 大鼠数量 | - | + | ++ | +++ |
|---------|------|----|---|----|-----|
| 空白对照组 | 13 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| 模型对照组 | 9 | 0 | 0 | 4 | 5 |
| 阳性对照组 | 11 | 3 | 6 | 1 | 1 |
| LEO-L 组 | 9 | 3 | 4 | 2 | 0 |
| LEO-M 组 | 11 | 3 | 5 | 2 | 1 |
| LEO-H 组 | 11 | 1 | 4 | 4 | 2 |

“-”代表没有皮质水肿,神经元正常;“+”代表皮质水肿,少数神经元坏死,梗死面积小于左侧皮质总面积的 1/3;“++”代表皮质水肿,少量神经元坏死,梗死面积占左侧皮质总面积的 1/3 至 2/3;“+++”代表皮质水肿,大量神经元坏死,梗死面积超过左侧皮质总面积的 2/3。

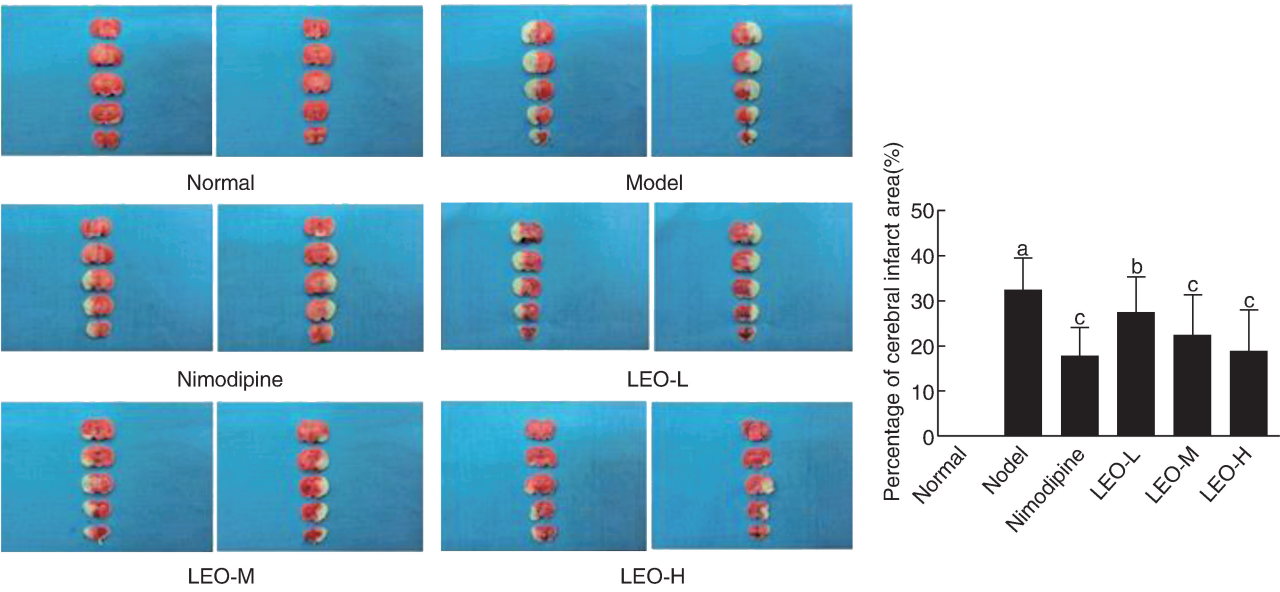


图 3. 益母草碱对大鼠脑梗死面积的影响($n=4$) a 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与模型对照组相比。
Figure 3. Effect of leonurine on cerebral infarction area in rats ($n=4$)

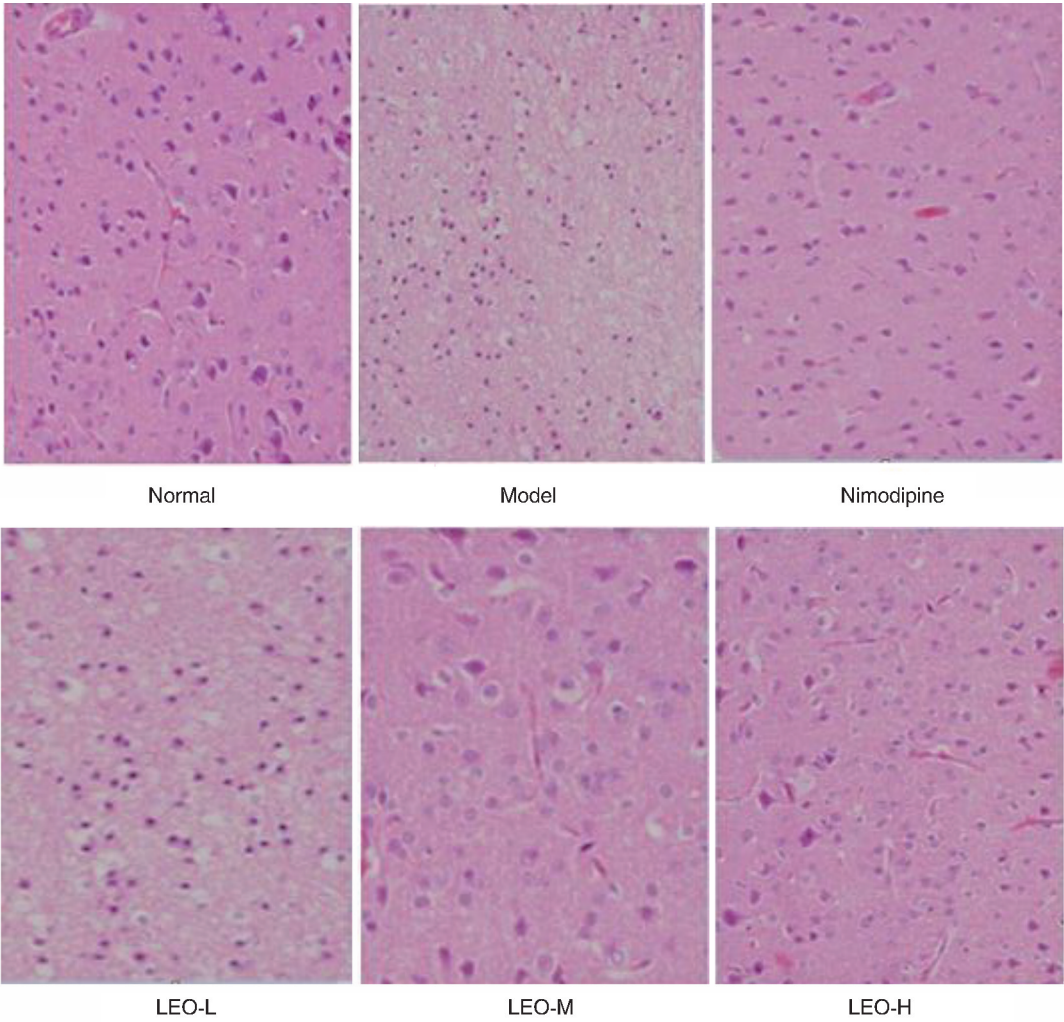


图 4. 益母草碱对大鼠脑组织皮质病理学的影响(HE 染色, 400 \times)
Figure 4. Effect of leonurine on the pathological changes of cerebral cortex in rats (HE staining, 400 \times)

2.5 益母草碱对大鼠海马区脑组织病理学的影响

空白对照组大鼠脑组织未见海马区水肿,神经元正常;模型对照组大鼠的大脑海马区神经元水肿,神经元大量坏死,梗死面积占左侧皮质面积的2/3以上;阳性对照组大鼠的大脑海马区神经元部分水肿,神经元坏死较少,梗死面积占左侧皮质面

积的1/3以上;益母草碱高剂量组、中剂量组大鼠的大脑海马区神经元水肿,神经元坏死较少,梗死面积占左侧皮质面积的1/3以下;益母草碱低剂量组大鼠的大脑海马区神经元水肿,神经元坏死灶和梗死面积占左侧皮质面积的1/3至2/3(图5)。

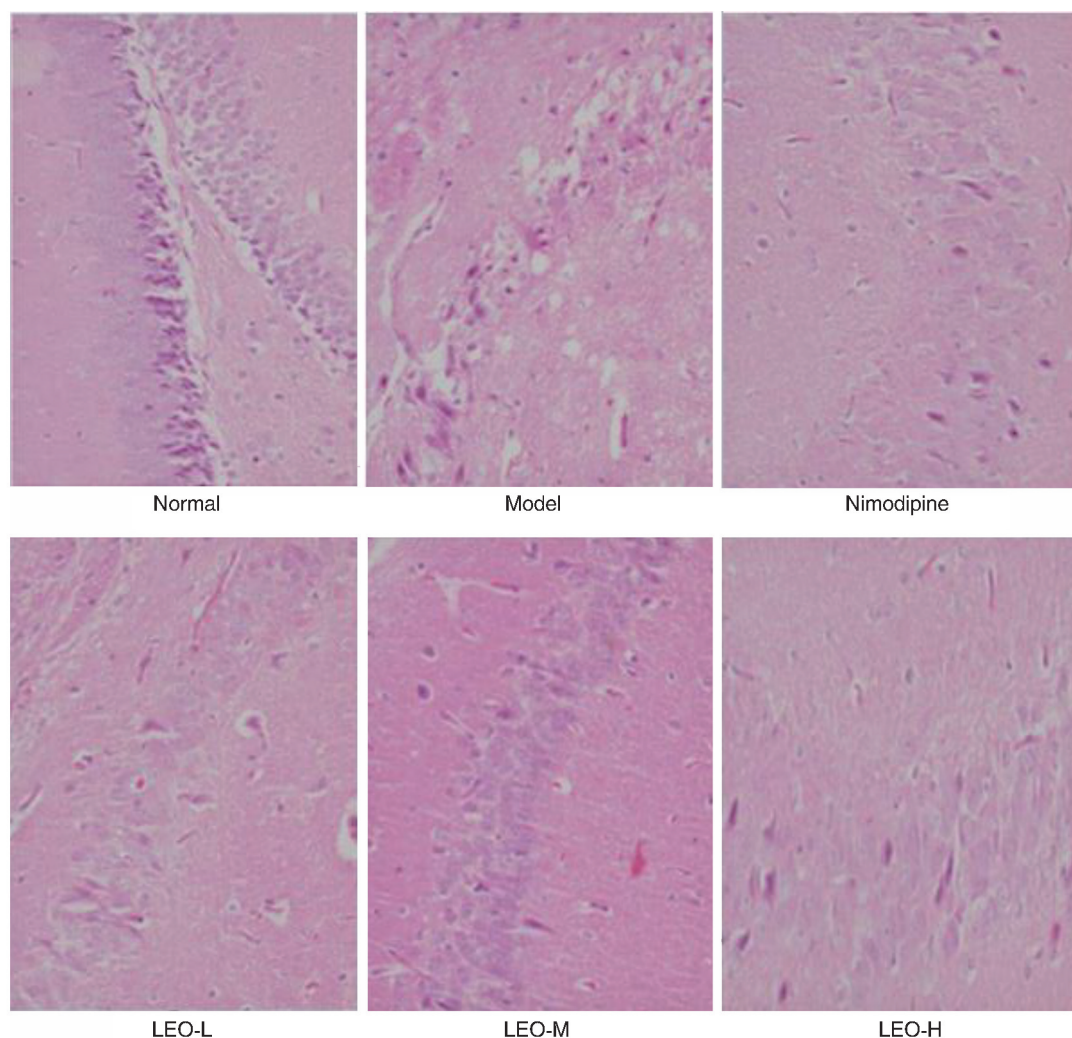


图5. 益母草碱对大鼠海马区脑组织神经细胞的影响(HE染色,400×)

Figure 5. Effect of leonurine on neural cells in rat hippocampal brain (HE staining, 400×)

2.6 益母草碱对大鼠 VEGF 和 Hif-1 α mRNA 表达的影响

与空白对照组相比,模型对照组大鼠脑组织内 VEGF 和 Hif-1 α mRNA 的表达明显升高($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠脑组织内 VEGF 和 Hif-1 α mRNA 的表达明显降低($P<0.01$;图6)。

2.7 益母草碱对大鼠脑组织中 PI3K、AKT、NF- κ B 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,模型对照组大鼠脑组织中

PI3K、AKT 蛋白表达明显减低,NF- κ B 蛋白表达明显升高($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和益母草碱中、高剂量组大鼠脑组织中 PI3K、AKT 蛋白表达明显升高,NF- κ B 蛋白表达明显降低($P<0.01$;图7)。

3 讨论

缺血性脑卒中是指由于脑的供血动脉(颈动脉和椎动脉)狭窄或闭塞、脑供血不足导致的脑组织

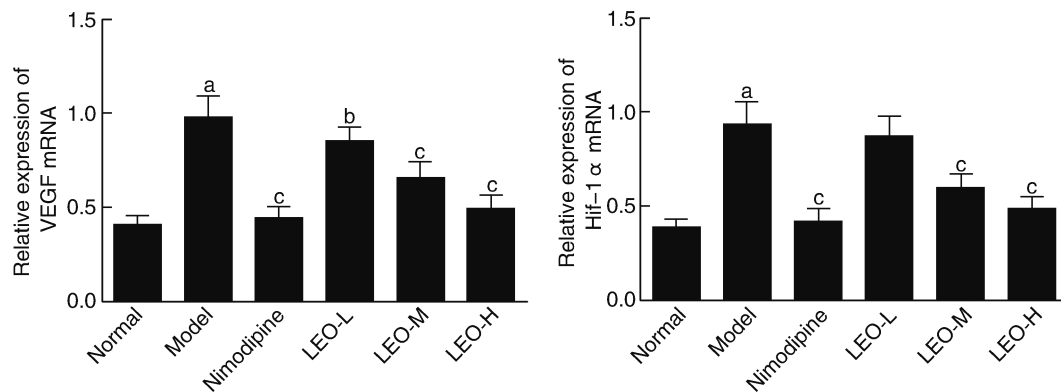


图 6. 益母草碱对大鼠 VEGF 和 Hif-1 α mRNA 表达的影响 ($n=4$) a 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与模型对照组相比。

Figure 6. Effect of leonurine on the expressions of VEGF and Hif-1 α mRNA in rats ($n=4$)

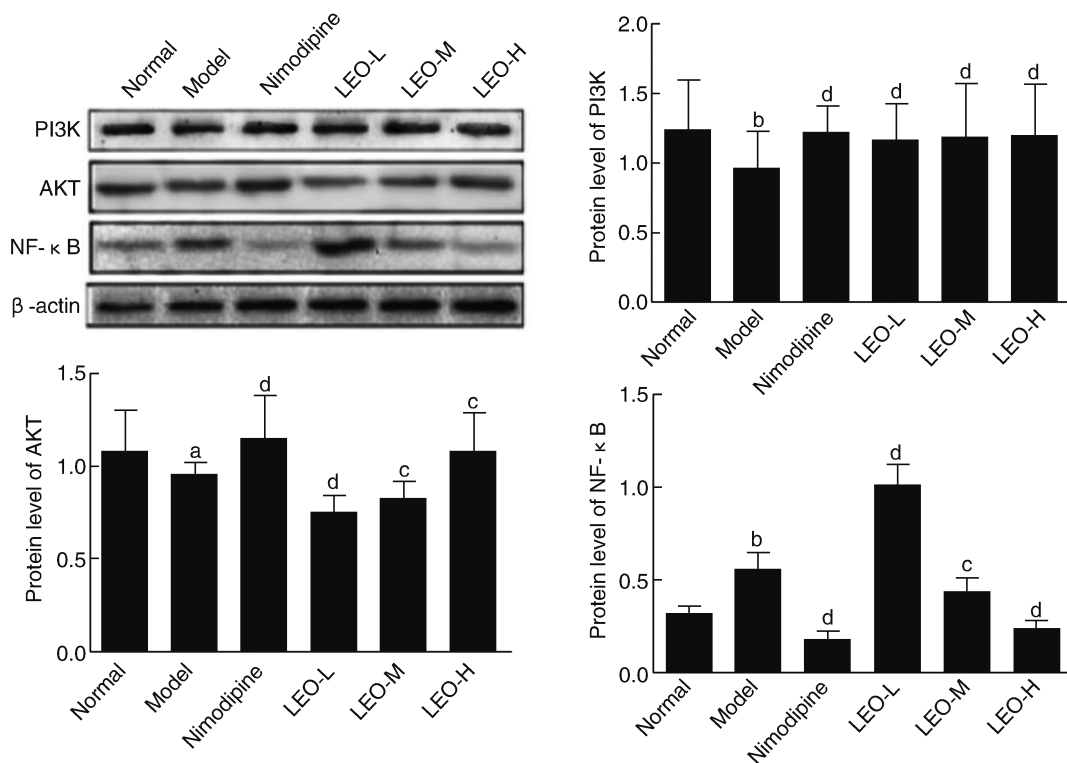


图 7. 益母草碱对大鼠脑组织中 PI3K、AKT、NF- κ B 蛋白表达的影响 ($n=4$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与空白对照组相比; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与模型对照组相比。

Figure 7. Effect of leonurine on PI3K, AKT and NF- κ B protein expressions in rat brain ($n=4$)

坏死的疾病。中药中的有效成分和单一的中草药在减轻缺血性脑卒中损伤方面取得了成功,说明中医药在这一领域具有优势。“活血化瘀法”是临床上防治缺血性脑损伤的常用方法,疗效显著。中医学和现代医学在微循环和临床研究中,对脑缺血损伤有共同的见解和机制^[15]。活血化瘀药主要作用于改善脑循环,保护神经元,清除自由基;清热解毒药则侧重于减轻炎症,激活脑细胞自我保护机制,减少脑缺血继发性反应。研究证明,中药具有活血

解毒作用,如姜黄、冬凌草、毛冬青、喜树、鬼针草、益母草等对脑缺血损伤有积极的治疗作用^[16]。益母草碱是中药益母草的主要有效成分之一,对缺血性脑损伤疾病有一定的治疗效果。本研究结果发现,给予益母草碱后,大鼠神经功能损害评分显著降低,脑梗死面积百分比明显下降,说明其能保护大鼠缺血性脑卒中模型的脑细胞和神经系统,降低脑梗死面积。

氧化应激、炎症、细胞凋亡是缺血性脑卒中损

伤过程中最普遍的现象,也是临床治疗过程的主要困难所在^[17]。然而,氧化应激的详细作用机制尚未完全阐明。eNOS 是 NOS 的主要亚型,是血管内产生 NO 的主要来源,其缺失可以导致血管疾病和各种病理生理疾病的发生。高水平的 NO 可能会诱导神经细胞的凋亡,伴随着细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 的下调,并且可以使 Bcl-2 从线粒体释放到胞质^[18]。有研究发现,缺血再灌注后 Bax/Bcl-2 比值的升高可能与活性氧的产生有关,主要表现为丙二醛水平的升高和抗氧化酶 SOD、CAT 活性的降低^[19]。本研究结果发现,缺血性脑卒中模型大鼠脑组织中 NO、eNOS 含量明显升高,SOD 含量明显下降;给予益母草碱后大鼠脑组织中 NO、eNOS 含量明显下降,SOD 含量明显升高。

细胞膜上 PI3K 在生长因子作用下产生磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸,可激活信号级联,从而调节细胞生长、增殖、存活、迁移和代谢等多种功能,在多种人类疾病中存在异常调控^[20]。PI3K 和 AKT 具有促进细胞增殖、抗凋亡的作用,研究发现 PI3K/AKT 信号通路在脑、心、肾缺血性损伤中起重要作用^[21]。另外,PI3K/AKT 在脑缺血缺氧诱导脑卒中损伤过程中对脑组织保护和神经细胞凋亡起着重要的作用。已有研究表明,在乙醇性肝损伤、高血压、脑卒中等疾病中,上调 PI3K/AKT 信号通路可刺激 eNOS 的磷酸化^[22-23]。本研究结果显示,给予益母草碱后,缺血性脑卒中大鼠脑组织中 AKT、PI3K 蛋白表达明显升高。

综上所述,益母草碱可以缓慢地改善大鼠的神经功能缺损,对脑组织有一定的保护作用,减小脑梗死的面积,抑制大鼠脑组织神经细胞凋亡,这一效应可能是通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路实现的。

[参考文献]

- [1] 刘 玥,金香兰,张 寅,等. 脑卒中高危人群临床流行病学特征的中西医研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(8): 1180-1183.
- [2] Pollock A, St George B, Fenton M, et al. Top ten research priorities relating to life after stroke[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(3): 209.
- [3] Dawson J, Pierce D, Dixit A, et al. Safety, feasibility, and efficacy of vagus nerve stimulation paired with upper-limb rehabilitation after ischemic stroke[J]. Stroke, 2015, 47(1): 143-150.
- [4] Ashour W, Al-Anwar AD, Kamel AE, et al. Predictors of early infection in cerebral ischemic stroke[J]. J Med Life, 2016, 9(2): 163-169.
- [5] Marchione P, Vento C, Morreale M, et al. Atorvastatin treatment and carotid plaque morphology in first-ever atherosclerotic transient ischemic attack/stroke: A case-control study[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(1): 138-143.

- [6] 孔 辉. 阿托伐他汀对老年缺血性脑卒中患者氧化应激及脂质过氧化的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(14): 1605-1608.
- [7] 张丽娜,吴星恒,王 平,等. 益母草碱对窒息新生大鼠心肌损伤的保护作用及机制研究[J]. 江西医药, 2018, 53(6): 543-545; 553.
- [8] 解燕昭. 益母草碱对实验性脑梗死小鼠血脑屏障保护作用及相关机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016: 20.
- [9] 杨静静. 益母草碱对实验性脑缺血大鼠神经保护作用及其机制研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(68): 30-32.
- [10] 卢丽娜,梁赵文,袁 露,等. 益母草碱对异丙肾肾上腺素诱导的大鼠心肌纤维化 IGF-1 表达的影响研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(1): 17-20.
- [11] 郭春久,兰新新,刘 科,等. 银杏内酯注射液及其组分对大鼠缺血性脑卒中模型作用比较及对突触后致密物 95 表达的影响[J]. 药物评价研究, 2019, 42(6): 1110-1114, 1145.
- [12] 曾宪晶,周金凤,祝美珍,等. 清脑益元汤对大鼠脑缺血再灌注损伤 TNF- α 、IL-8 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(5): 1124-1127, 1292.
- [13] 赵雪松,陈志刚,高 芳,等. 三七总皂苷对脑出血大鼠凝血酶及神经功能的影响[J]. 世界中医药, 2013, 8(11): 1335-1337.
- [14] 顾文政,余尚贞. 冰黄五苓散直肠灌注对缺血性脑卒中大鼠神经功能的影响[J]. 河南中医, 2018, 38(9): 1352-1356.
- [15] Gohar S, Abbas G, Sajid S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products[J]. Matrix Sci Medica, 2017, 1(1): 10-14.
- [16] Ishaq S, Jafri L. Biomedical importance of cocoa (*Theobroma cacao*): significance and potential for the maintenance of human health[J]. Matrix Sci Pharma, 2017, 1(1): 1-5.
- [17] Li R, Cui K, Liu K, et al. Metabolic syndrome in rats is associated with erectile dysfunction by impairing PI3K/AKT/eNOS activity[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13464.
- [18] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1757(5-6): 639-647.
- [19] Arabian M, Aboutaleb N, Soleimani M, et al. Role of morphine preconditioning and nitric oxide following brain ischemia reperfusion injury in mice[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(1): 14-21.
- [20] Rodgers SJ, Ferguson DT, Mitchell CA, et al. Regulation of PI3K effector signalling in cancer by the phosphoinositide phosphatases[J]. Biosci Rep, 2017, 37(1): 1-18.
- [21] Anwar MA, Samaha AA, Ballan S, et al. Salvia fruticosa induces vasorelaxation in rat isolated thoracic aorta: Role of the PI3K/AKT/eNOS/NO/cGMP signaling pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 686.
- [22] Deng HF, Wang XL, Sun H, et al. Puerarin inhibits expression of tissue factor induced by oxidative low-density lipoprotein through activating the PI3K/AKT/eNOS pathway and inhibiting activation of ERK1/2 and NF- κ B[J]. Life Sci, 2017, 191(1): 115-121.
- [23] Huang Y, Hu Z. UBIAD1 protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced multiple subcellular organelles injury through PI3K/AKT pathway in N2A cells[J]. J Cell Physiol, 2018, 23(9): 7480-7496.

(此文编辑 曾学清)