



## 雷公藤甲素对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制研究

竺东杰, 贺新征, 邹杰, 余史丹, 李红霞

### Effects and mechanism of Triptolide on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

ZHU Dongjie, HE Xinzheng, ZOU Jie, YU Shidan, LI Hongxia

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202311021>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 复元醒脑汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用研究

Protective effects of Fu-Yuan-Xing-Nao decoction for focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats

药学实践与服务. 2018, 36(1): 34-39 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.007

#### 雷公藤甲素硬脂酸酯的合成及其制剂成药性研究

Synthesis and druggability study of triptolide stearate

药学实践与服务. 2017, 35(2): 141-145 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.011

#### 丹参酮 II A对脑缺血后炎症反应影响机制的研究进展

Progress of tanshinone II A on the mechanism of inflammatory response after cerebral ischemia

药学实践与服务. 2018, 36(2): 108-111 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.003

#### 活性多肽GRGDS对氧糖剥夺诱导PC12细胞损伤的保护作用及其机制研究

Protective effect and mechanism of active peptide GRGDS on PC12 cells damage by oxygen-glucose deprivation

药学实践与服务. 2021, 39(4): 317-321, 330 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007053

#### 五味子乙素通过ROS介导内质网应激诱导人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的研究

Schisandrin B induces apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through ROS mediated endoplasmic reticulum stress

药学实践与服务. 2021, 39(6): 499-503, 533 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202106123

#### 敲减MCCC2对前列腺癌细胞系DU145增殖、迁移和凋亡的影响

Effects of MCCC2 knockdown on proliferation, migration and apoptosis of DU145 prostate cancer cells

药学实践与服务. 2021, 39(3): 215-220 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202104020



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

## 雷公藤甲素对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制研究

竺东杰<sup>1</sup>, 贺新征<sup>1</sup>, 邹杰<sup>2</sup>, 余史丹<sup>1</sup>, 李红霞<sup>1</sup> (1. 联勤保障部队第九〇六医院, 浙江宁波 315100; 2. 联勤保障部队第九〇三医院, 浙江杭州 310013)

**[摘要]** 目的 探讨雷公藤甲素对大鼠脑缺血再灌注损伤(CIRI)的影响并初探其分子机制。方法 将144只Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组、雷公藤甲素低、中、高剂量组和丁苯酞组,每组24只。通过阻断大脑中动脉2h构建CIRI大鼠模型,各组均于造模前3天开始1次/天ip给药。再灌注24h后,行神经功能缺失评分, TTC染色法检测脑梗死率; EB渗透实验检测血脑屏障(BBB)通透性; HE、TUNEL染色观察缺血半暗带皮层神经元病理学改变; ELISA法检测缺血侧大脑皮层炎症因子含量, Western blot法检测TLR4/NF- $\kappa$ B通路相关蛋白表达。结果 与模型组比较,雷公藤甲素中、高剂量组和丁苯酞组神经功能缺失评分、脑梗死率、EB含量显著降低( $P<0.05$ ); 缺血半暗带皮层神经元病理学改变明显改善, 凋亡率显著降低( $P<0.05$ ); 炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量和TLR4、p-NF- $\kappa$ B、cleaved Caspase-3、Bax相对表达量显著降低, Bcl-2相对表达量显著升高, p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B和Bax/Bcl-2比值显著降低( $P<0.05$ )。雷公藤甲素高剂量组对各检测指标的调控作用优于丁苯酞组( $P<0.05$ )。结论 雷公藤甲素能够保护BBB通透性,减轻CIRI大鼠神经功能缺失和神经元病变,降低脑梗死率,作用机制可能与抑制TLR4/NF- $\kappa$ B通路及其介导的炎症反应和神经元凋亡有关。

**[关键词]** 雷公藤甲素; 脑缺血再灌注; TLR4/NF- $\kappa$ B通路; 炎症; 凋亡

**[文章编号]** 2097-2024(2024)00-0001-06 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202311021

## Effects and mechanism of Triptolide on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

ZHU Dongjie<sup>1</sup>, HE Xinzheng<sup>1</sup>, ZOU Jie<sup>2</sup>, YU Shidan<sup>1</sup>, LI Hongxia<sup>1</sup> (1. No. 906 Hospital of Joint Logistic Support Force, Ningbo 315100, China; 2. No. 903 Hospital of Joint Logistic Support Force, Hangzhou 310013, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Triptolide on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) and explore its molecular mechanism. **Methods** One hundred and forty-four Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group, low, medium, high dose of triptolide group and butylphthalide group, with 24 rats in each group. The CIRI rat model was established by blocking the middle cerebral artery for 2 hours. 3 days before modeling, the rats in each group were ip administration once a day. 24 hours after reperfusion, the neurological deficit score was detected, the rate of cerebral infarction was measured by TTC staining, the blood brain barrier (BBB) permeability was detected by EB penetration test. The pathological changes neurons in the ischemic penumbra cortex were observed by HE and TUNEL staining. The content of inflammatory factors in ischemic cerebral cortex were detected by ELISA method. The expression of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway related proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the neurological deficit score, cerebral infarction rate and EB content in the Triptolide middle, high dose groups and the Butylphthalide group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). The pathological changes of cortical neurons in the ischemic penumbra were significantly improved, and the apoptosis rate of neurons was significantly decreased ( $P<0.05$ ). The content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and the expression of TLR4, p-NF- $\kappa$ B, cleaved Caspase-3, Bax were significantly decreased, the expression of Bcl-2 was significantly increased, the ratio of p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B and Bax/Bcl-2 were significantly decreased ( $P<0.05$ ). The regulatory effect of the high dose triptolide group on various detection indexes were better than that of the Butylphthalide group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Triptolide could protect the permeability of BBB, improve the neurological deficit and neuropathy in CIRI rats, and reduce the rate of cerebral infarction, its mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and which mediated inflammatory response and neuronal apoptosis.

**[Key words]** triptolide; cerebral ischemia-reperfusion; TLR4/NF- $\kappa$ B pathway; inflammation; apoptosis

**[作者简介]** 竺东杰,男,主管药师,研究方向:医院药学与药理学,Email: 188577724@qq.com

**[通信作者]** 李红霞,女,副主任药师,研究方向:医院药学与药理学,Email: shrmzyh@163.com

在中医,脑卒中属于中风范畴,“气虚血瘀、痰瘀互结、毒损脑络”是中风的核心病机<sup>[1]</sup>。雷公藤系卫矛科雷公藤属藤本植物,又名震龙根、水莽子、断肠草、红紫根,以根茎入药,首载于《神农本草经》,味苦性寒,具有清热解毒、祛风通络、舒筋活血等功效,常用于免疫和炎症性疾病的治疗。现代医学研究发现,炎症反应及缺血半暗带神经元凋亡在脑缺血再灌注损伤(CIRI)进展中发挥着重要作用,可作为防治 CIRI 新药研究的靶点<sup>[2-4]</sup>。雷公藤甲素为雷公藤的主要活性成分之一,化学结构属于二萜内酯类化合物,具有抗炎、抗凋亡等药理学作用<sup>[5-6]</sup>。Toll样受体 4/核转录因子- $\kappa$ B(TLR4/NF- $\kappa$ B)通路是 CIRI 后炎症反应及神经元凋亡的重要调控机制<sup>[7]</sup>。有文献<sup>[8-9]</sup>报道雷公藤甲素能够抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路对大鼠类风湿关节炎、鼻炎具有一定抑制作用。然而,雷公藤甲素是否能够通过调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路抑制 CIRI 仍需深入研究。因此,本实验将探讨雷公藤甲素对大鼠 CIRI 的影响及其机制,以期雷公藤甲素应用于 CIRI 防治提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

清洁级健康雄性 7 周龄 Wistar 大鼠 144 只,体重 210~240 g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(浙)2019-0004。饲养环境维持室温 23~25 °C、相对湿度 45%~65%,自由饮水进食。动物实验遵守实验动物福利伦理审查指南。

### 1.2 实验药物与试剂

雷公藤甲素(上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq$ 98%);丁苯酞氯化钠注射液(恩必普药业有限公司,规格 100 ml:25 mg,国药准字 H20100041);生理盐水(石家庄四药有限公司,规格 500 ml,国药准字 H13023200);注射用异戊巴比妥钠(上海上药新亚药业有限公司,规格 0.1 g,国药准字 H21021725);红四氮唑(TTC)、伊文思蓝(EB)(北京博奥森生物技术有限公司);4%多聚甲醛溶液(北京索莱宝生物技术公司);末端标记法(TUNEL)染色试剂盒和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);甲酰胺(天津科密欧化学试剂有限公司);TLR4、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B、激活型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、 $\beta$ -actin 抗体和 IgG 二抗(北京博奥森生物

技术有限公司);二喹啉甲酸法(BCA)蛋白浓度检测试剂盒、增强化学发光液(ECL)(武汉三鹰生物技术有限公司)。

### 1.3 主要仪器

TKY-BMB 型石蜡包埋机(湖北康泰医疗设备有限公司);S7220 型石蜡切片机(沈阳恒松科技有限公司);JY300C 型电泳仪(美国 Wealtec 公司);Semi-Day 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);FluorChem HD2 型凝胶成像仪(美国 Protein Simple 公司);BioTek Epoch 型全波长酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);BX53 型显微镜(日本 Olympus 日立公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组、给药与 CIRI 大鼠模型制备

将 144 只 Wistar 大鼠按照随机数字表法平均分为假手术组、模型组、雷公藤甲素低、中、高剂量组(0.2、0.4、0.8 mg/kg)<sup>[10]</sup>和丁苯酞组(6 mg/kg)<sup>[11]</sup>,每组 24 只。造模前 3 d 开始 1 次/d 腹腔注射(ip)给药,假手术组和模型组 ip 给予生理盐水,注射体积均为 5 ml/kg。除假手术组外,其余 5 组均参照杨丽等<sup>[12]</sup>报道方法构建 CIRI 大鼠模型。

### 2.2 神经功能缺失评分和脑梗死率检测

再灌注 24 h 后,分别随机取各组 6 只大鼠,参照文献<sup>[13]</sup>报道的方法进行神经功能缺失评分,无症状为 0 分、前肢不能伸展为 1 分、行走时转圈为 2 分、行走时跌倒为 3 分、不能行走或意识丧失为 4 分。ip 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉后,颈椎脱臼处死,取大脑组织,-20 °C 冻存 15 min 后均匀厚度切为 5 片,2% TTC 溶液恒温 37 °C 避光染色 30 min,每 5 min 翻转一次,正常组织呈红色、梗死组织呈苍白色,通过图像分析软件计算脑梗死率。

### 2.3 血脑屏障(BBB)通透性检测<sup>[14]</sup>

分别随机取各组 6 只大鼠,经尾静脉注射 2% EB 溶液 4 ml/kg,30 min 后实施麻醉,开胸后经“左心室-右心耳”灌注生理盐水至流出液清亮,取脑称重,1 ml/100 mg 加入甲酰胺后 60 °C 水浴 24 h,4 °C 匀浆后 15000 rpm 离心 20 min 取上清液,通过酶标仪检测 620 nm 处吸光度值,对照标准曲线测定 EB 含量。

### 2.4 缺血半暗带皮层神经元病理学改变的观察

分别随机取各组 6 只大鼠,ip 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉后,颈椎脱臼处死,取缺血侧大脑皮层组织,经 4%多聚甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋、切片、烤片等处理后,按照 HE 试剂盒和 TUNEL 试剂盒操作说进行染色处理后,通过光



学显微镜观察缺血半暗带皮层神经元病理学改变。显微镜下计数 TUNEL 染色切片 5 个视野内细胞数和凋亡细胞数,计数缺血半暗带皮层神经元凋亡率。

### 2.5 缺血侧大脑皮层组织生化指标检测

取各组剩余的 6 只大鼠, ip 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 进行麻醉后, 颈椎脱臼处死, 剥取缺血侧大脑皮层组织。①取部分缺血侧大脑皮层组织, 加入 5 倍量 4 °C 生理盐水研磨匀浆, 3 500 r/min 离心 5 min 分离上清液, 按照试剂盒操作说明通过 ELISA 法检测缺血侧大脑皮层组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量。②取剩余部分缺血侧大脑皮层组织, 加入适量蛋白裂解液后研磨匀浆, 冰上静置 30 min 使其充分裂解, 4 °C、12 000 r/min 离心 25 min 分离上清液, 检测总蛋白浓度并配平后, 30  $\mu$ g 等量上样, 经 10 % SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白、转膜和 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后, 加入一抗稀释液 TLR4 (1 : 800)、NF- $\kappa$ B (1 : 1000)、p-NF- $\kappa$ B (1 : 1000)、cleaved Caspase-3 (1 : 800)、Bcl-2 (1 : 500)、Bax (1 : 500) 和内参  $\beta$ -actin (1 : 1 500) 4 °C 避光孵育过夜, 洗膜后二抗稀释液 (1 : 3 000) 室温孵育 1.5 h, 洗膜后 ECL 显影, 通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

### 2.6 统计学分析

运用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析, 计量资料符合正态分布以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐时两两比较采用 Dunnett's T3 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠神经功能缺失评分和脑梗死率的比较

与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺失评分和脑梗死率显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 雷公藤甲素中、高剂量组和丁苯酞组神经功能缺失评分和脑梗死率显著降低 ( $P < 0.05$ )。与丁苯酞组比较, 雷公藤甲素高剂量组神经功能缺失评分和脑梗死率显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1、表 1。

### 3.2 各组大鼠 BBB 通透性的比较

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 EB 含量显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 雷公藤甲素中、高剂量组和丁苯酞组脑组织 EB 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。与丁苯酞组比较, 雷公藤甲素高剂量组脑组织 EB 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

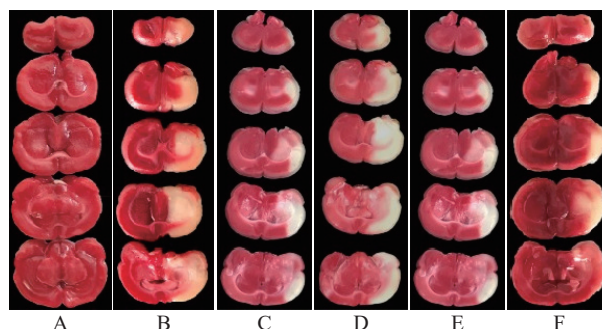


图 1 各组大鼠脑梗死状况的比较

A. 假手术组; B. 模型组; C. 丁苯酞组; D. 雷公藤甲素低剂量组; E. 雷公藤甲素中剂量组; F. 雷公藤甲素高剂量组

表 1 各组大鼠神经功能缺失评分、脑梗死率、BBB 通透性的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	神经功能缺失评分(分)	脑梗死率 (%)	EB含量 ( $\mu$ g/g)
假手术组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.49 $\pm$ 0.06
模型组	2.84 $\pm$ 0.39*	48.17 $\pm$ 7.39*	1.54 $\pm$ 0.27*
丁苯酞组	1.31 $\pm$ 0.17 $\Delta$	16.28 $\pm$ 2.15 $\Delta$	0.79 $\pm$ 0.09 $\Delta$
雷公藤甲素低剂量组	2.50 $\pm$ 0.34	42.93 $\pm$ 5.74	1.42 $\pm$ 0.23
雷公藤甲素中剂量组	1.85 $\pm$ 0.26 $\Delta$	27.54 $\pm$ 3.48 $\Delta$	1.10 $\pm$ 0.16 $\Delta$
雷公藤甲素高剂量组	1.09 $\pm$ 0.15 $\Delta$ <sup>#</sup>	11.38 $\pm$ 1.65 $\Delta$ <sup>#</sup>	0.70 $\pm$ 0.08 $\Delta$ <sup>#</sup>

\* $P < 0.05$ , 与假手术组比较; # $P < 0.05$ , 与丁苯酞组比较;  $\Delta P < 0.05$ , 与模型组比较。

### 3.3 各组大鼠缺血半暗带皮层神经元病理学改变的比较

假手术组大鼠皮层神经元呈圆形或椭圆形, 形态饱满, 着色均匀, 胞核居中。模型组大鼠缺血半暗带皮层神经元呈现形态不规则, 胞体萎缩呈空泡样变, 着色较深, 核膜边界不清, 炎性细胞浸润等病理学改变。与模型组比较, 雷公藤甲素各剂量组和丁苯酞组缺血半暗带皮层神经元明显改善, 其中雷公藤甲素高剂量组效果优于雷公藤甲素低、中剂量组和丁苯酞组, 见图 2。

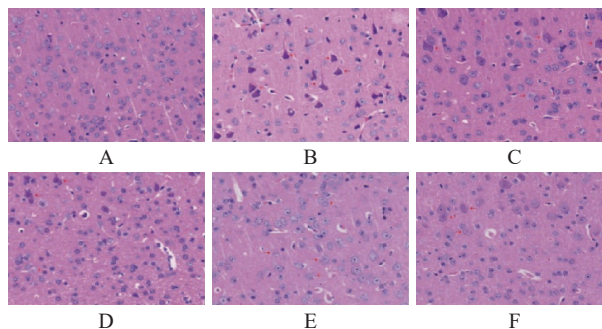


图 2 各组大鼠缺血半暗带皮层神经元病理学改变的比较 (HE,  $\times 400$ )

A. 假手术组; B. 模型组; C. 丁苯酞组; D. 雷公藤甲素低剂量组; E. 雷公藤甲素中剂量组; F. 雷公藤甲素高剂量组

3.4 各组大鼠缺血半暗带皮层神经元凋亡率的比较  
与假手术组比较,模型组大鼠缺血半暗带皮层神经元凋亡率显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,雷公藤甲素中、高剂量组和丁苯酞组凋亡率显著降低( $P<0.05$ )。与丁苯酞组比较,雷公藤甲素高剂量组凋亡率显著降低( $P<0.05$ ),见表2。

表2 各组大鼠缺血半暗带皮层神经元凋亡率的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	凋亡率(%)
假手术组	2.68±0.35
模型组	53.07±8.42*
丁苯酞组	17.69±2.90 <sup>△</sup>
雷公藤甲素低剂量组	45.93±7.67
雷公藤甲素中剂量组	31.52±5.08 <sup>△</sup>
雷公藤甲素高剂量组	12.88±1.74 <sup>△#</sup>

\* $P<0.05$ ,与假手术组比较;# $P<0.05$ ,与丁苯酞组比较;<sup>△</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较。

3.5 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量的比较

与假手术组比较,模型组缺血侧大脑皮层组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,雷公藤甲素中、高剂量组和丁苯酞组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著降低( $P<0.05$ )。与丁苯酞组比较,雷公藤甲素高剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著降低( $P<0.05$ )。见表3。

3.6 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 TLR4、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达的比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧大脑皮层

表4 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 TLR4、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达及 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 比值的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	TLR4/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin	p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin	p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B
假手术组	0.08±0.02	0.83±0.15	0.10±0.02	0.12±0.03
模型组	1.03±0.21*	0.78±0.14	0.81±0.15*	1.04±0.22*
丁苯酞组	0.20±0.04 <sup>△</sup>	0.84±0.15	0.29±0.06 <sup>△</sup>	0.35±0.08 <sup>△</sup>
雷公藤甲素低剂量组	0.87±0.16	0.79±0.16	0.68±0.13	0.86±0.18
雷公藤甲素中剂量组	0.65±0.13 <sup>△</sup>	0.78±0.15	0.35±0.07 <sup>△</sup>	0.45±0.10 <sup>△</sup>
雷公藤甲素高剂量组	0.16±0.03 <sup>△#</sup>	0.74±0.14	0.14±0.03 <sup>△#</sup>	0.19±0.04 <sup>△#</sup>

\* $P<0.05$ ,与假手术组比较;# $P<0.05$ ,与丁苯酞组比较;<sup>△</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较。

3.7 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧大脑皮层组织 cleaved Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量显著升高,Bcl-2 相对表达量显著降低,Bax/Bcl-2 比值显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,雷公藤甲素

表3 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	TNF- $\alpha$ (ng/g)	IL-1 $\beta$ (pg/g)
假手术组	1.41±0.22	37.06±4.81
模型组	2.76±0.35*	68.42±7.79*
丁苯酞组	1.85±0.23 <sup>△</sup>	46.93±5.62 <sup>△</sup>
雷公藤甲素低剂量组	2.54±0.32	63.81±6.54
雷公藤甲素中剂量组	2.07±0.25 <sup>△</sup>	55.74±5.91 <sup>△</sup>
雷公藤甲素高剂量组	1.62±0.21 <sup>△#</sup>	40.27±5.39 <sup>△#</sup>

\* $P<0.05$ ,与假手术组比较;# $P<0.05$ ,与丁苯酞组比较;<sup>△</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较。

组织 TLR4、p-NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 比值显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,雷公藤甲素中、高剂量组和丁苯酞组 TLR4、p-NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 比值显著降低( $P<0.05$ )。与丁苯酞组比较,雷公藤甲素高剂量组 TLR4、p-NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 比值显著降低( $P<0.05$ ),见图3、表4。

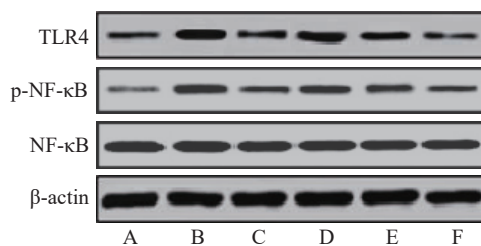


图3 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 TLR4、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达的比较

A. 假手术组; B. 模型组; C. 丁苯酞组; D. 雷公藤甲素低剂量组; E. 雷公藤甲素中剂量组; F. 雷公藤甲素高剂量组

中、高剂量组和丁苯酞组 cleaved Caspase-3、Bax 相对表达量显著降低,Bcl-2 相对表达量显著升高,Bax/Bcl-2 比值显著降低( $P<0.05$ )。与丁苯酞组比较,雷公藤甲素高剂量组 cleaved Caspase-3、Bax 相对表达量显著降低,Bcl-2 相对表达量显著升高,Bax/Bcl-2 比值显著降低( $P<0.05$ )。见图4、表5。

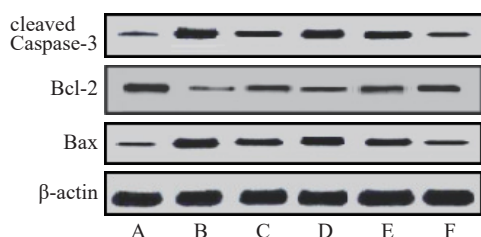


图4 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的比较

A. 假手术组; B. 模型组; C. 丁苯酞组; D. 雷公藤甲素低剂量组; E. 雷公藤甲素中剂量组; F. 雷公藤甲素高剂量组

表5 各组大鼠缺血侧大脑皮层组织 cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	cleaved Caspase-3/ β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bax/Bcl-2
假手术组	0.09±0.02	0.92±0.19	0.15±0.03	0.16±0.03
模型组	0.61±0.11*	0.18±0.04*	0.97±0.18*	5.39±1.07*
丁苯酞组	0.16±0.03 <sup>△</sup>	0.29±0.06 <sup>△</sup>	0.20±0.04 <sup>△</sup>	0.69±0.10 <sup>△</sup>
雷公藤甲素低剂量组	0.55±0.09	0.21±0.04	0.88±0.16	4.19±0.75 <sup>△</sup>
雷公藤甲素中剂量组	0.42±0.08 <sup>△</sup>	0.32±0.06 <sup>△</sup>	0.47±0.09 <sup>△</sup>	1.47±0.20 <sup>△</sup>
雷公藤甲素高剂量组	0.12±0.02 <sup>△#</sup>	0.56±0.11 <sup>△#</sup>	0.26±0.5 <sup>△#</sup>	0.46±0.07 <sup>△#</sup>

\* $P<0.05$ , 与假手术组比较; # $P<0.05$ , 与丁苯酞组比较; <sup>△</sup> $P<0.05$ , 与模型组比较。

#### 4 讨论

线栓法是 CIRI 动物模型制备的经典方法, 具有操作简便、重复率高、与人类临床病理接近等优点。本实验结果显示, CIRI 模型大鼠呈现明显的神经功能障碍, BBB 通透性异常升高, 缺血半暗带大脑皮层神经元呈现形态不规则、胞体萎缩呈空泡样变、着色较深、核膜边界不清、炎性细胞浸润等病理学改变, 与杨欢欢等<sup>[15]</sup> 研究结果一致。本研究发现, 经雷公藤甲素中、高剂量或丁苯酞预处理能够明显改善 CIRI 大鼠神经功能, 降低脑梗死率和 BBB 通透性, 改善缺血半暗带大脑皮层神经元病变并降低其凋亡率, 并且雷公藤甲素高剂量组效果优于丁苯酞组; 而雷公藤甲素低剂量组上述作用并不显著。说明雷公藤甲素具有抑制大鼠 CIRI 的作用, 该作用具有一定的剂量依赖性。

CIRI 病理机制非常复杂, 其中炎症损伤和神经元凋亡发挥着关键作用。熊莉等<sup>[16]</sup> 报道 CIRI 可诱导小胶质细胞活化而释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等促炎因子, 引发脑组织炎症反应发生。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  具备炎性趋化属性, 其中 TNF- $\alpha$  可刺激促炎因子大量释放, IL-1 $\beta$  可诱导炎性细胞浸润, 加重炎症

反应<sup>[17]</sup>。Bcl-2 和 Bax 是定位于线粒体膜的两种蛋白, 二者均属于 bcl 蛋白家族, 在细胞线粒体凋亡途径中发挥着重要作用。Bax 可诱导细胞色素 C 由线粒体通过膜孔道进入细胞质, 活化位于细胞质的 Caspase-3, cleaved Caspase-3 能够切割破坏膜蛋白、结构蛋白等引发细胞凋亡<sup>[18]</sup>。Bcl-2 能够抑制 Cyt C 释放而表现为抑凋亡作用, 并且 Bcl-2 与 Bax 能够结合形成无活性的二聚体。TLR4 是定位于小胶质细胞的一种跨膜识别受体, TLR4 能够诱导 NF- $\kappa$ B 磷酸化, p-NF- $\kappa$ B 核转位后与 DNA 特定位点结合而诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子转录与表达, 进而加重炎症损伤<sup>[19]</sup>。此外, p-NF- $\kappa$ B 可通过调控 Bcl-2、Bax 表达而诱导细胞凋亡<sup>[20]</sup>。Zhai Y 等<sup>[21]</sup> 发现抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路介导的炎症反应和凋亡可减轻大鼠 CIRI。本实验结果显示, 经雷公藤甲素中、高剂量或丁苯酞预处理能够明显降低 CIRI 大鼠缺血侧大脑皮层组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量和 TLR4、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量, 降低 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B、Bax/Bcl-2 比值, 并且雷公藤甲素高剂量组效果优于丁苯酞组, 而雷公藤甲素低剂量组上述作用并不显著。说明雷公藤甲素对 CIRI 大鼠炎症反应缺血半暗带大脑皮层神经元凋亡具有抑制作用, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路活化有关, 本结果与李晓蕾等<sup>[22]</sup> 报道的药物抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经具有保护作用的结果相似。

综上所述, 雷公藤甲素能够保护 BBB 通透性, 减轻 CIRI 大鼠神经功能缺失和神经元病变, 降低脑梗死率, 作用机制可能与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路及其介导的炎症反应和神经元凋亡有关。本研究结果为雷公藤甲素用于防治 CIRI 提供了理论依据。

#### 【参考文献】

- [1] 康利高阁, 孔令博, 高颖. 基于毒邪和玄府理论探析急性缺血性中风早期神经功能恶化的中医病机 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(7): 625-630.
- [2] 任靓明, 田红旗. 炎症因子及其抑制剂对脑缺血再灌注损伤作用的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(12): 61-64.
- [3] 谢明, 钟朕, 欧阳训彦, 等. 川芎嗪防治大鼠脑缺血/再灌注损伤后炎症反应与细胞凋亡的作用 [J]. 解剖学报, 2021, 52(6): 845-854.
- [4] 侯家保, 袁泉, 万杏, 等. 曲古抑菌素 A 预处理对小鼠脑缺血再灌注损伤皮质炎症反应和凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(9): 1-5.
- [5] SHEN J Y, MA H L, WANG C Q. Triptolide improves myocardial fibrosis in rats through inhibition of nuclear factor kappa B and NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome path-



- way[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2021, 25(6): 533-543.
- [6] LI Y Y, JIANG X E, SONG L T, et al. Anti-apoptosis mechanism of triptolide based on network pharmacology in focal segmental glomerulosclerosis rats[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(4): BSR20192920.
- [7] 刘磊, 卫昊, 陈丹丹, 等. 银杏叶提取物调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路减轻急性脑缺血小鼠脑皮质缺血研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5282-5288.
- [8] 陈颖婷, 何柯新, 王云秀, 等. 雷公藤内酯醇对类风湿关节炎大鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的调控作用研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(17): 2053-2057.
- [9] 杨春治. 雷公藤内酯醇对大鼠变应性鼻炎 TLR2-NF- $\kappa$ B 信号通路的干预作用 [J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(7): 636-640.
- [10] 潘发福, 梁明春, 刘卉芳, 等. 雷公藤内酯醇对慢性脑缺血模型大鼠海马突触素和突触后致密物 95 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(14): 2964-2967.
- [11] 唐冰雪, 张源文, 吴雅晨, 等. 淫羊藿苷对脑缺血再灌注大鼠的神经保护及小胶质细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(22): 47-52.
- [12] 杨丽, 陈阳. 线栓法大鼠脑缺血再灌注损伤模型的实验研究 [J]. *皖南医学院学报*, 2017, 36(4): 318-321.
- [13] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 周红军, 王彬, 沈光建, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注血脑屏障通透性变化及对 Occludin、ZO-1 和 PKC $\delta$  蛋白水平的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(22): 5067-5070.
- [15] 杨欢欢, 段毅. 藏红花素通过 Nrf2/HO-1 通路对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用 [J]. *天津中医药*, 2022, 39(8): 1069-1076.
- [16] 熊莉, 彭丽佳, 邵建林. 小胶质细胞在脑缺血再灌注损伤中的治疗作用和进展 [J]. *局解手术学杂志*, 2020, 29(11): 932-936.
- [17] 李萍, 王静, 戴成祥, 等. 移植前输注间充质干细胞对脑死亡供鼠移植肾炎症细胞浸润及 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达的影响 [J]. *成都医学院学报*, 2020, 15(1): 40-45.
- [18] WANG H J, ZHU J, JIANG L P, et al. Mechanism of Heshouwuycin inhibiting the Cyt c/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 pathway in spermatogenic cell apoptosis[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 180-193.
- [19] CHEN X W, YAO Z J, PENG X, et al. Eupafolin alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via blocking the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5135-5144.
- [20] 任娟, 覃宏伟, 周冬亮, 等. 原花青素通过抑制 Toll 样受体 4/核因子- $\kappa$ B 信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *安徽医药*, 2021, 25(3): 431-435, 637.
- [21] ZHAI Y Y, ZHU Y L, LIU J Y, et al. Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein B1 group (HMGB1)/toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e918617-918628. [PubMed].
- [22] 李晓蕾, 朱海生, 麻瑞娟, 等. 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路探讨藏红花素对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用 [J]. *康复学报*, 2022, 32(6): 518-526.

[收稿日期] 2023-11-10 [修回日期] 2023-12-29

[本文编辑] 蔺森