

本文引用: 熊建, 屈战利, 任瑜, 季一飞. 灵仙新苷对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激和炎症反应的调控及神经细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(4): 551-556.

灵仙新苷对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激和炎症反应的调控及神经细胞凋亡的影响

熊建, 屈战利, 任瑜, 季一飞*

南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院神经内科, 四川南充 637000

[摘要] **目的** 研究灵仙新苷对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激反应、神经细胞凋亡以及炎症因子的作用。**方法** 45只大鼠分成对照组、模型组(脑缺血再灌注损伤大鼠)、灵仙新苷低剂量组(8 mg/kg)、灵仙新苷中剂量组(16 mg/kg)、灵仙新苷高剂量组(32 mg/kg), 每组9只。治疗5 d后, 对大鼠进行神经功能评分, TTC染色法检测脑梗死体积, TUNEL法检测细胞凋亡, Western blot检测脑组织中切割型胱天蛋白酶-3(cleaved-cysteine aspartic acid specific protease-3, C-Caspase-3)、切割型胱天蛋白酶-9(cleaved-cysteine aspartic acid specific protease-9, C-Caspase-9)、核因子 κ B p65(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)蛋白水平, 二硝基苯肼法检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平, 硫代巴比妥酸法检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平, 黄嘌呤氧化法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平, 比色法检测谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)水平, ELISA法检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠神经功能评分升高($P<0.05$), 脑梗死体积增加($P<0.05$), 细胞凋亡指数和 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白水平升高($P<0.05$), LDH、MDA 水平升高($P<0.05$), SOD、GSH-Px 水平降低($P<0.05$), IL-1 β 、TNF- α 含量升高($P<0.05$), NF- κ B p65 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与模型组比较, 灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠神经功能评分依次降低($P<0.05$), 脑梗死体积依次减少($P<0.05$), 细胞凋亡指数和 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白水平依次降低($P<0.05$), LDH、MDA 水平依次降低($P<0.05$), SOD、GSH-Px 水平依次升高($P<0.05$), IL-1 β 、TNF- α 含量依次降低($P<0.05$), NF- κ B p65 蛋白表达水平依次降低($P<0.05$)。**结论** 灵仙新苷能降低脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激反应水平, 减少细胞凋亡因子 C-Caspase-3、C-Caspase-9 的表达, 抑制炎症介质释放, 其机制可能与下调 NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 灵仙新苷; 脑缺血再灌注损伤; 氧化应激; 细胞凋亡; 炎症因子

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.04.004

Effects of Clematichinenoside AR on oxidative stress and inflammatory response regulation and nerve cell apoptosis in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury

XIONG Jian, QU Zhanli, REN Yu, JI Yifei*

Department of Neurology, Nanchong Central Hospital (The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College), Nanchong, Sichuan 637000, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of Clematichinenoside AR on oxidative stress response, nerve cell apoptosis, and inflammatory factors in the brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** Forty-five rats were divided into

[收稿日期] 2023-11-14

[基金项目] 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC0756)。

[通信作者] *季一飞, 男, 博士, 主任医师, E-mail: jiyifei-2003@163.com。

control group, model group (rats with cerebral ischemia reperfusion injury), and Clematichinenoside AR low-(8 mg/kg), medium-(16 mg/kg), and high-(32 mg/kg) dose groups, with nine rats in each group. After 5 d of treatment, the rats were scored for neurological function. TTC staining was used to check cerebral infarction volume, TUNEL method to measure the degree of apoptosis, Western blot to determine the protein levels of cleaved-cysteine aspartic acid specific protease-3 (C-Caspase-3), cleaved-cysteine aspartic acid specific protease-9 (C-Caspase-9), and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) in the brain tissue, dinitrophenylhydrazine method to examine the lactate dehydrogenase (LDH) level, thiobarbituric acid method to measure the malondialdehyde (MDA) level, xanthine oxidation method to check the superoxide dismutase (SOD) level, colorimetry to examine the glutathione peroxidase (GSH-Px) level, and ELISA to determine the content of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** Compared with the control group, the neurological function score in the model group increased ($P<0.05$), the cerebral infarction volume increased ($P<0.05$), the apoptosis index and the protein levels of C-Caspase-3 and C-Caspase-9 increased ($P<0.05$), the levels of LDH and MDA increased ($P<0.05$), SOD and GSH-Px levels decreased ($P<0.05$), the content of IL-1 β and TNF- α increased ($P<0.05$), and the protein expression level of NF- κ B p65 increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the neurological function score in Clematichinenoside AR low-, medium-, and high-dose groups decreased successively ($P<0.05$), the cerebral infarction volume decreased successively ($P<0.05$), the apoptosis index and the protein levels of C-Caspase-3 and C-Caspase-9 decreased successively ($P<0.05$), the levels of LDH and MDA decreased successively ($P<0.05$), the levels of SOD and GSH-Px increased successively ($P<0.05$), the content of IL-1 β and TNF- α decreased successively ($P<0.05$), and the protein expression level of NF- κ B p65 decreased successively ($P<0.05$). **Conclusion** Clematichinenoside AR can reduce the level of oxidative stress response in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury, decrease the expressions of apoptosis factors of C-Caspase-3 and C-Caspase-9, and inhibit the release of inflammatory mediators, which may be related to downregulation of the NF- κ B signaling pathway.

[**Keywords**] Clematichinenoside AR; cerebral ischemia reperfusion injury; oxidative stress; apoptosis; inflammatory factor

缺血性脑血管疾病有高致残率、高复发率、高死亡率等特点,是一种极为常见的疑难性疾病,据统计,约有75%的脑血管疾病为脑梗死,发生在大脑中动脉者占据60%^[1]。溶栓治疗恢复血液流通是脑缺血疾病的治疗方法,但治疗过程往往伴随脑缺血再灌注损伤的发生,其可诱导脑功能异常^[2]。研究显示,脑缺血再灌注损伤是一系列级联反应,其中包括氧化应激、细胞凋亡、炎症反应等^[3]。灵仙新苷是从威灵仙中提取的皂苷类物质,具有抗炎、调节血脂等功效^[4]。有研究显示,灵仙新苷对缺血再灌注损伤有治疗作用,其可以减少心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织中炎症因子水平,减少细胞凋亡^[5]。既往研究显示,灵仙新苷对缺血性脑中风有治疗作用^[6]。目前尚未见关于灵仙新苷在脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和炎症因子表达中的作用研究。p65是核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的关键组成部分,其在脑缺血再灌注损伤中过度激活,下调NF- κ B,改善脑组织炎症、氧化应激和细胞凋亡^[7]。本实验构建脑缺血再灌注损伤大鼠模型,探讨灵仙新苷对大鼠脑组织炎症、氧化应激、细胞凋亡和NF- κ B p65蛋白表达的影响,为灵仙新苷治疗脑缺血再灌注损伤提供理论数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 45只SPF级大鼠,雄性,体质量280~300g,3~4月龄,购自成都达硕实验动物有限公司。大鼠饲养于川北医学院实验动物中心,温度(26 \pm 2)℃,湿度55% \pm 10%,12h光暗循环,许可证号为SYXK(川)2023-0076。本实验方案经本院动物伦理委员会审批(审批号:202302006)。

1.1.2 主要试剂 灵仙新苷(纯度98.5%,成都普思生物科技有限公司,批号:PU0009-0010);NF- κ B p65抗体(美国Abcam公司,批号:ab16502);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号:E1020);切割型胱天蛋白酶-9(cleaved-cysteine aspartic acid specific protease-9, C-Caspase-9)抗体(美国GeneTex公司,批号:GTX132331);切割型胱天蛋白酶-3(cleaved-cysteine aspartic acid specific protease-3, C-Caspase-3)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号:9661);谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号:S0056);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)检测试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒(上海酶联生物

科技有限公司,批号:ml003057、ml002859);丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:BC0025);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒(上海尚宝生物科技有限公司,批号:BA1696);TUENL细胞凋亡检测试剂盒(美国BD公司,批号:556547)。

1.1.3 主要仪器 DR-200BS型全自动多功能酶标分析仪[南北科仪(北京)科技有限公司];RX50型荧光显微镜(上海普丹光学仪器有限公司);NanoDrop One/OneC型超微量核酸蛋白浓度测定仪、iBright™ CL1500型成像系统、Sorvall LYNX 4000型高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 脑缺血再灌注损伤大鼠模型构建

以改良 Zea-Longa 线栓法^[6]构建脑缺血再灌注损伤大鼠模型。构建模型前 8 h 禁食,不限制饮水,按照 50 mg/kg 的剂量用 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠,将大鼠仰卧固定,消毒。在颈部正中位置切口,将左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉暴露,然后在颈内和颈外动脉的分叉位置将颈外动脉结扎,在左侧颈总动脉处剪开一个小口,将直径 0.26 mm 的尼龙鱼线插入,再用尼龙鱼线将颈总动脉结扎。缝合皮肤,将线头留在体外。手术后 2 h,进行再灌注操作,再灌注只抽提控线到达颈总动脉。大鼠清醒后,对大鼠进行神经功能评分,1~3 分表示造模成功^[9]。

1.3 分组与给药

剔除造模失败的大鼠,将造模成功的 36 只大鼠随机分为灵仙新苷低、中、高剂量组和模型组,每组 9 只。另取 9 只大鼠只分离动脉,不插入尼龙鱼线,设为对照组。灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠在再灌注 12 h 以后,按照 1 次/d 继续灌胃 8、16、32 mg/kg 灵仙新苷^[6],持续灌胃 5 d;对照组和模型组使用等体积生理盐水灌胃。在最后一次灌胃结束后 30 min,对大鼠进行神经功能评分,然后用戊巴比妥钠麻醉大鼠,取脑组织,用于后续检测。

1.4 神经功能评分

按照 Longa 评分标准^[9]对大鼠进行神经功能评分。大鼠表现为无神经功能缺损记为 0 分;大鼠右侧前爪不能完全伸展记为 1 分;大鼠在爬行时出现向右侧转圈的现象记为 2 分;大鼠在爬行时出现向右侧倾倒的现象记为 3 分;大鼠无法行走,丧失意识记为 4 分。

1.5 脑梗死体积检测

沿前脑从额极至枕极的方向将脑组织切成冠状切片,然后将切片放于 2%的 TTC 溶液内,37 °C 避光反应 30 min,至梗死区域呈现白色。利用 Image J

软件分析脑梗死的体积。

1.6 LDH、MDA、SOD、GSH-Px 水平检测

取脑组织,制作组织匀浆液,然后分别利用试剂盒检测 LDH(二硝基苯肼法)、MDA(硫代巴比妥酸法)、SOD(黄嘌呤氧化法)、GSH-Px(比色法)水平,步骤按照试剂盒标准流程操作。

1.7 IL-1 β 、TNF- α 含量检测

取脑组织,制作组织匀浆液,使用 ELISA 法分别检测 IL-1 β 、TNF- α 含量,步骤按照试剂盒说明书进行。

1.8 细胞凋亡检测

取脑组织,用 4%多聚甲醛固定,用 PBS 洗涤 3 次,然后放在流水中将组织洗涤过夜,用 PBS 再次洗涤 3 次,放在 20%、25%、30%的蔗糖溶液中沉底,冰冻切片,切片的厚度约为 5 μ m。用蛋白酶 K 通透细胞,4%多聚甲醛固定,滴加 TUNEL 染液,37 °C 孵育 1 h,用过氧化氢封闭,DAB 显色。在显微镜下观察阳性细胞数,随机选择 5 个视野,计算细胞凋亡指数。

1.9 C-Caspase-3、C-Caspase-9、NF- κ B p65 蛋白表达检测

取脑组织,剪碎后,在组织中添加 RIPA 裂解液,放于冰上充分裂解 20 min,转移至离心机中,以 4 °C、10 000 \times g 离心 10 min,吸取上清液,按照 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。将上样缓冲液添加到蛋白样品中充分混合,置于 100 °C 条件下煮沸 5 min。利用常规方法分别制备 10%的分离胶和 5%的浓缩胶,在每个孔中分别添加蛋白样品量 40 μ g。打开电源,首先设置初始电压为 60 V,观察到染料移动至分离胶时,将电压调整为 100 V,染料进入玻璃板底部位置后,停止电泳,将电源关闭。取出凝胶,裁剪 NC 膜,浸泡在转移缓冲液中。4 °C 转膜,转膜电流设置为 200 mA。再继续将 NC 膜置于 5%脱脂奶粉内,37 °C 继续反应 1 h。取出 NC 膜,置于一抗稀释液内(C-Caspase-3、C-Caspase-9、NF- κ B p65 抗体按照 1:600、1:600、1:800 比例稀释),然后置于 4 °C 条件下反应过夜。将孵育过夜后的 NC 膜置于二抗稀释液内(按 1:4 000 比例稀释),继续在 37 °C 条件下结合 1 h。用 ECL 试剂显影,采用 Quantity one 4.6.2 软件分析各条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,分析蛋白的相对表达量。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件分析实验数据,数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组差异比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灵仙新苷对大鼠神经功能评分和脑梗死体积的影响

模型组大鼠神经功能评分及脑梗死体积比例明显高于对照组 ($P<0.05$);与模型组比较,灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠神经功能评分和脑梗死体积比例均降低 ($P<0.05$);灵仙新苷各剂量组神经功能评分和脑梗死体积比例均降低呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。详见图1、表1。

表1 各组大鼠神经功能评分和脑梗死体积比例比较 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	神经功能评分/分	脑梗死体积比例/%
对照组	0.12±0.02	0
模型组	5.35±0.45*	32.04±2.51*
灵仙新苷低剂量组	4.23±0.24* [§]	26.34±2.15* [§]
灵仙新苷中剂量组	3.62±0.13* ^{§#}	16.35±1.24* ^{§#}
灵仙新苷高剂量组	2.27±0.20* ^{§#△}	8.85±0.89* ^{§#△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,§ $P<0.05$;与灵仙新苷低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵仙新苷中剂量组比较,△ $P<0.05$ 。

2.2 灵仙新苷对大鼠脑组织中 LDH、MDA、SOD、GSH-Px 的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织中 LDH、MDA

水平升高 ($P<0.05$),SOD、GSH-Px 水平降低 ($P<0.05$);与模型组比较,灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠脑组织中 LDH、MDA 水平降低 ($P<0.05$),SOD、GSH-Px 水平升高 ($P<0.05$);灵仙新苷各剂量组脑组织中 LDH、MDA 水平降低,SOD、GSH-Px 水平升高呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。详见表2。

2.3 灵仙新苷对大鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量升高 ($P<0.05$);与模型组比较,灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量降低 ($P<0.05$);灵仙新苷各剂量组脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量降低呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。详见表3。

2.4 灵仙新苷对大鼠脑组织中神经细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织中神经细胞凋亡指数和 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白表达水平平均升高 ($P<0.05$);与模型组比较,灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠脑组织中神经细胞凋亡指数和 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白表达水平平均降低 ($P<0.05$);灵仙新苷各剂量组脑组织中神经细胞凋亡指数和 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白表达水平平均降低呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。详见图2、表4。

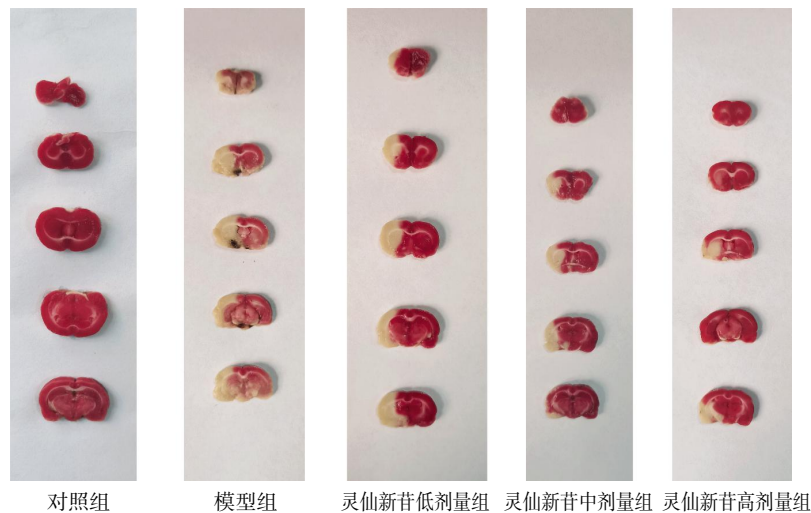


图1 TTC染色观察大鼠脑梗死体积

表2 各组大鼠脑组织中 LDH、MDA、SOD、GSH-Px 含量比较 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	LDH/(U/L)	MDA/(mmol/mL)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)
对照组	1 142.51±105.36	2.05±0.13	12.36±1.25	50.23±4.45
模型组	3 214.54±269.47*	5.96±0.42*	4.22±0.30*	26.69±2.14*
灵仙新苷低剂量组	2 631.14±142.02* [§]	4.53±0.44* [§]	6.84±0.56* [§]	36.92±3.20* [§]
灵仙新苷中剂量组	1 632.01±152.11* ^{§#}	3.26±0.30* ^{§#}	8.46±0.77* ^{§#}	42.10±2.94* ^{§#}
灵仙新苷高剂量组	1 204.15±100.89* ^{§#△}	2.57±0.22* ^{§#△}	11.51±1.03* ^{§#△}	49.20±2.31* ^{§#△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,§ $P<0.05$;与灵仙新苷低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵仙新苷中剂量组比较,△ $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量比较($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(mmol/mL)
对照组	121.58 \pm 11.47	1.30 \pm 0.11
模型组	256.94 \pm 21.86*	2.25 \pm 0.16*
灵仙新苷低剂量组	200.10 \pm 13.69* Δ	1.75 \pm 0.13* Δ
灵仙新苷中剂量组	160.78 \pm 13.06* Δ #	1.45 \pm 0.12* Δ #
灵仙新苷高剂量组	136.25 \pm 12.58* Δ # Δ	1.28 \pm 0.10* Δ # Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$;与灵仙新苷低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵仙新苷中剂量组比较, Δ $P<0.05$ 。

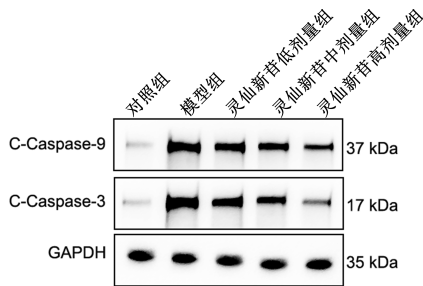


图2 各组大鼠脑组织中 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白条带图

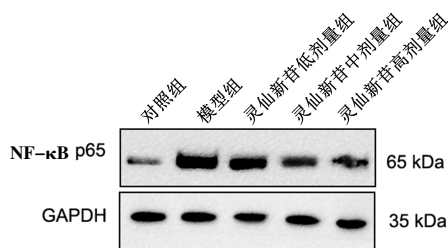
表4 各组大鼠脑组织中细胞凋亡指数及 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白表达水平比较($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡指数	C-Caspase-3	C-Caspase-9
对照组	5.62 \pm 0.42	0.26 \pm 0.03	0.33 \pm 0.04
模型组	26.32 \pm 2.24*	0.86 \pm 0.08*	0.82 \pm 0.06*
灵仙新苷低剂量组	16.84 \pm 1.35* Δ	0.65 \pm 0.06* Δ	0.67 \pm 0.07* Δ
灵仙新苷中剂量组	12.01 \pm 1.14* Δ #	0.40 \pm 0.04* Δ #	0.43 \pm 0.05* Δ #
灵仙新苷高剂量组	8.30 \pm 0.72* Δ # Δ	0.22 \pm 0.03* Δ # Δ	0.30 \pm 0.02* Δ # Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$;与灵仙新苷低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵仙新苷中剂量组比较, Δ $P<0.05$ 。

2.5 灵仙新苷对大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白表达水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组比较,灵仙新苷低、中、高剂量组大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白表达水平降低($P<0.05$);灵仙新苷各剂量组脑组织中 NF- κ B p65 蛋白表达水平降低呈剂量依赖性($P<0.05$)。详见图3、表5。

图3 各组大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白条带图

3 讨论

灵仙新苷是从威灵仙中提取的单体成分,有很

表5 各组大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白表达水平比较($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	NF- κ B p65
对照组	0.25 \pm 0.02
模型组	0.68 \pm 0.07*
灵仙新苷低剂量组	0.45 \pm 0.04* Δ
灵仙新苷中剂量组	0.30 \pm 0.02* Δ #
灵仙新苷高剂量组	0.24 \pm 0.03* Δ # Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$;与灵仙新苷低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵仙新苷中剂量组比较, Δ $P<0.05$ 。

多生物学活性,如抗炎、镇痛等,灵仙新苷对动脉粥样硬化小鼠血脂有调节作用,还能改善淋巴细胞功能^[4]。以往研究发现,灵仙新苷对缺血再灌注损伤有治疗作用,灵仙新苷治疗后的心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织中细胞凋亡减少,心肌损伤程度减轻^[5]。在缺血诱导的脑中风动物模型中,灵仙新苷具有改善大鼠神经功能的作用^[6]。本实验结果显示,灵仙新苷治疗后,脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能明显改善,脑梗死体积比例减少,说明灵仙新苷对脑缺血再灌注损伤有保护功能。

以往研究发现,缺血再灌注损伤发生机制复杂,涉及很多病理过程,例如氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等^[10]。机体正常组织受到缺血再灌注刺激后,组织内会积累大量的氧自由基,而这些氧自由基的积累与抗氧化酶如 SOD、GSH-Px 等的活性降低有关^[11]。组织中高水平的氧自由基可以诱导细胞内的脂质发生过氧化反应,最终生成 MDA^[12]。脂质是细胞膜的关键组成部分,因此,大量的氧自由基可以破坏细胞膜完整结构,促进 LDH 释放^[13]。氧自由基除可以诱导氧化损伤外,还能激活 Caspase 级联反应。Caspase 是一个含有多个蛋白成员的蛋白家族,在细胞凋亡激活中有极为重要的作用。Caspase-3 和 Caspase-9 分别是 Caspase 级联反应的下游及上游因子,二者活化以后可以诱导细胞凋亡发生^[14]。炎症介质对细胞凋亡有促进作用,其可以通过与氧自由基相互作用,进而调控细胞凋亡途径^[10]。IL-1 β 、TNF- α 是存在组织内的炎症介质,可激活炎症反应,促进组织损伤^[15]。本研究结果表明,灵仙新苷处理后,脑缺血再灌注损伤大鼠模型脑组织中细胞凋亡水平降低,细胞中 SOD、GSH-Px 活性升高,LDH 和 MDA 水平降低,IL-1 β 、TNF- α 含量减少,提示灵仙新苷能改善脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激、炎症因子释放和细胞过度凋亡。

脑缺血再灌注损伤发生机制复杂,受到多种信号通路的调控作用^[16-17]。研究发现,NF- κ B 是一个与炎症密切相关的中心枢纽,其激活可诱导下游多个炎症因子的表达^[18-19]。后续又在氧化损伤、细胞凋

亡、细胞衰老等生理过程中发现了NF- κ B的调控功能^[20]。在脑缺血再灌注损伤中发现NF- κ B过度激活可诱导组织损伤^[21]。NF- κ B信号通路由多个成员组成,p65为其关键激活因子,p65表达水平升高后NF- κ B信号激活水平也升高^[22]。本研究结果显示,NF- κ B p65在脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中表达水平升高,与LONG等^[23]的研究结果一致,而灵仙新苷可降低NF- κ B p65蛋白的表达水平,提示灵仙新苷可能抑制脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织NF- κ B信号激活。

综上所述,灵仙新苷对脑缺血再灌注损伤有改善作用,能抑制脑组织氧化损伤、细胞凋亡和炎症因子释放,降低NF- κ B信号通路活化水平。本研究为灵仙新苷治疗脑缺血再灌注损伤提供了数据支持,为研究灵仙新苷在脑缺血再灌注损伤中的作用机制提供了基础。

参考文献

- [1] 洪振宇. 磁共振弥散加权成像在超急性期脑梗死诊断中的应用价值[J]. 实用医学影像杂志, 2021, 22(3): 274-275.
- [2] CHI O Z, LIU X, MAGSINO J, et al. Leucine reduced blood-brain barrier disruption and infarct size in early cerebral ischemia-reperfusion[J]. Brain Sciences, 2023, 13(10): 1372.
- [3] KANG T, QIN X, LEI Q, et al. BRAP silencing protects against neuronal inflammation, oxidative stress and apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury by promoting PON1 expression[J]. Environmental Toxicology, 2023, 38(11): 2645-2655.
- [4] DIAO Y J. Clematichinenside AR alleviates foam cell formation and the inflammatory response in Ox-LDL-induced RAW264.7 cells by activating autophagy[J]. Inflammation, 2021, 44(2): 758-768.
- [5] 丁海燕, 李运曼, 方伟蓉. 灵仙新苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 547-551.
- [6] XU D, XIA N, HOU K, et al. Clematichinenside facilitates recovery of neurological and motor function in rats after cerebral ischemic injury through inhibiting notch/NF- κ B pathway[J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2019, 28(11): 104288.
- [7] JI H, JIN H F, LI G W, et al. Artemisinin protects against cerebral ischemia and reperfusion injury via inhibiting the NF- κ B pathway[J]. Open Medicine, 2022, 17(1): 871-881.
- [8] BU J, SHI S, WANG H Q, et al. Acacetin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via the NLRP3 signaling pathway[J]. Neural Regeneration Research, 2019, 14(4): 605-612.
- [9] WANG H L, LIU F L, LI R Q, et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation[J]. Neural Regeneration Research, 2021, 16(6): 1011-1016.
- [10] ZHAO P, LU Y, WANG Z Y. Naringenin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/FOXO1 signaling pathway in vitro[J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2023, 38: e380823.
- [11] 林兰明, 宋征宇, 胡瑾. 金合欢素调节TLR4/NLRP3信号通路对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(22): 6107-6114.
- [12] ZHU F, XIONG J Z, YI F, et al. Albiflorin relieves cerebral ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2/HO-1 pathway[J]. Histology and Histopathology, 2023, 38(2): 233-245.
- [13] SHI M, WANG J Q, BI F F, et al. Diosmetin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through Keap1-mediated Nrf2/ARE signaling pathway activation and NLRP3 inflammasome inhibition[J]. Environmental Toxicology, 2022, 37(6): 1529-1542.
- [14] PAN B, SUN J, LIU Z Y, et al. Longxuetongluo Capsule protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress and MAPK-mediated mechanisms[J]. Journal of Advanced Research, 2021, 33: 215-225.
- [15] ZHANG L, SUI R B, ZHANG L. Fingolimod protects against cerebral ischemia reperfusion injury in rats by reducing inflammatory cytokines and inhibiting the activation of p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. Neuroscience Letters, 2022, 771: 136413.
- [16] LIU Y S, MI Y, WANG Y P, et al. Loureirin C inhibits ferroptosis after cerebral ischemia reperfusion through regulation of the Nrf2 pathway in mice[J]. International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine, 2023, 113: 154729.
- [17] LI B Y, WANG W, LI Y N, et al. cGAS-STING pathway aggravates early cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by activating NCOA4-mediated ferritinophagy[J]. Experimental Neurology, 2023, 359: 114269.
- [18] WU H M, XU F, HUANG X L, et al. Lupenone improves type 2 diabetic nephropathy by regulating NF- κ B pathway-mediated inflammation and TGF- β 1/Smad/CTGF-associated fibrosis[J]. Phytomedicine, 2023, 118: 154959.
- [19] GUO Q, JIN Y Z, CHEN X Y, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 53.
- [20] LI F D, SUN X F, ZHENG B, et al. Arginase II promotes intervertebral disc degeneration through exacerbating senescence and apoptosis caused by oxidative stress and inflammation via the NF- κ B pathway[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 737809.
- [21] ZHANG J, XIAO F, ZHANG L L, et al. Alpha-lipoic acid preconditioning and ischaemic postconditioning synergistically protect rats from cerebral injury induced by ischemia and reperfusion partly via inhibition TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 51(3): 1448-1460.
- [22] MULERO M C, WANG V Y, HUXFORD T, et al. Genome reading by the NF- κ B transcription factors[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(19): 9967-9989.
- [23] LONG M, WANG Z G, SHAO L Y, et al. Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through transient receptor potential vanilloid 1-mediated anti-apoptosis via inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. Neuroscience, 2022, 482: 100-115.