

基于氧化应激和炎症介质反应探讨草木樨提取物对急性脑缺血组织保护作用的机制研究

林晓伟 邓明尧 孙冕 林雅明

【摘要】 目的 评估草木樨提取物对急性脑缺血组织的保护作用及保护机制。**方法** 将 50 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、草木樨低、中、高剂量组,每组各 10 只;除假手术组外,其余各组大鼠通过改良 Longa 法建立急性脑缺血模型;对草木樨低、中、高剂量组脑缺血大鼠分别给予 100、250、500 mg/kg 草木樨治疗,假手术组及模型组给予等量生理盐水;采用 2,3,5 氯化三苯基四氮唑染色法(Triphenyltetrazolium chloride, TTC)检测大鼠脑梗死体积;采用 Longa 评分法评估神经功能损伤评分;采用放射免疫测定法检测血浆 6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-prostaglandin F1a, 6-keto-PGF1a)及血栓素 B2(Thromboxane B2, TXB2)水平;采用酶联免疫吸附实验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒检测肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 10(Interleukin-10, IL-10)水平;采用分光光度计评估超氧化物歧化酶(Superoxidedismutase, SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)活性;采用原位末端凋亡法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)检测脑组织神经元凋亡情况;采用蛋白质印迹法(Western blot)检测 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X(Bcl-2-Associated X, Bax)蛋白相对表达水平。**结果** 与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组的脑梗死体积和神经功能缺损评分显著降低($P < 0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠脑梗死体积及神经功能缺损评分逐渐降低($P < 0.05$)。与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组血浆 6-keto-PGF1a 水平显著增高($P < 0.05$),血浆 TXB2 水平显著降低($P < 0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠血浆 6-keto-PGF1a 水平逐渐增高($P < 0.05$)、血浆 TXB2 水平逐渐降低($P < 0.05$)。与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组 TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$),IL-10, SOD, GSH-Px 水平显著升高($P < 0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠 TNF- α 水平逐渐降低($P < 0.05$)、IL-10, SOD, GSH-Px 水平逐渐升高($P < 0.05$)。与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠细胞凋亡率逐渐降低($P < 0.05$)。与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组 Bcl-2 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.05$),Bax 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠 Bcl-2 蛋白相对表达水平逐渐升高、Bax 蛋白相对表达水平逐渐降低($P < 0.05$)。**结论** 草木樨可通过减少脑血栓形成、氧化应激和炎症介质来抑制大鼠脑缺血组织细胞凋亡,对脑缺血组织具有保护作用,且研究发现随着草木樨给药剂量的增加,对脑缺血组织的保护作用更加明显。

【关键词】 草木樨 脑缺血 氧化应激 细胞因子 细胞凋亡

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)04-0317-07

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.04.003

Protective effect and mechanism of Melilotus officinalis extracts on acute cerebral ischemia based on oxidative stress and inflammatory mediator responses Lin Xiaowei, Deng Mingyao, Sun Mian, et al. Department of Emergency, Sanya People's Hospital, Sanya Hainan 572000

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effect and mechanism of Melilotus officinalis extracts on acute cerebral ischemia based on oxidative stress and inflammatory mediator responses. **Methods** Fifty male Wistar rats were randomly divided into sham group, model group, and low-dose, medium-dose, high-dose Melilotus officinalis groups, with 10 rats in each group. Acute cerebral ischemia models were established by modified Longa method. Rats in the low-dose, medium-dose, high-dose groups were treated with 100 mg/kg, 250 mg/kg, or 500 mg/kg Melilotus officinalis extracts respectively. Rats in sham operation group and model

group were treated with the same dose of normal saline. The cerebral infarction volume was measured by TTC method and neurological deficit score was estimated by Longa scoring method. 6-Keto-PGF 1α and TXB 2 concentrations in plasma were estimated by radioimmunoassay. TNF- α and IL-10 concentrations in plasma were estimated by ELISA. The activity of SOD and GSH-Px were estimated by spectrophotometer. The apoptosis of ischemic neurons in cerebral infarction tissues was detected by TUNEL. The expression of Bcl-2 and Bax was detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the infarct volume, neurological deficit score, TXB 2 concentration in plasma, the level of TNF- α , apoptosis rate and Bax expression were significantly decreased in low-dose, medium-dose, high-dose *Melilotus officinalis* treatment groups ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. However, 6-Keto-PGF 1α concentration in plasma, the levels of IL-10, SOD, GSH-Px and Bcl-2 were significantly increased ($P < 0.05$) in *Melilotus officinalis* groups in a dose-dependent way. **Conclusion** *Melilotus officinalis* ameliorates apoptosis of brain tissues in cerebral ischemic rats by decreasing cerebral thrombosis, oxidative stress, and inflammatory mediator responses. *Melilotus officinalis* has a protective effect on ischemic brain tissue in a dose-dependent manner.

【Key words】 *Melilotus officinalis* Cerebral ischemia Oxidative stress Cytokines Apoptosis

脑卒中具有较高的发病率、致残率及病死率,其发病急、危险性大,常常给患者及其家属带来巨大的精神压力及经济负担,且存在年轻化趋势,其中87%的脑卒中患者为缺血性脑卒中^[1-2]。脑缺血通常由动脉血栓形成引起,动脉血栓闭塞血管引发脑灌注不足,造成大脑缺血缺氧。脑缺血持续一段时间后会引发一系列复杂的机制致使缺血脑组织损伤甚至梗死,其中包括氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等。脑缺血激活损伤后炎症级联反应,促使脑细胞中活性氧及自由基产生增多,增强的氧化应激可导致细胞不可逆损伤、加速细胞凋亡的进程^[3-4]。抗血小板聚集药物可用于脑缺血治疗,但研究指出长期联合使用抗血小板聚集药物会增加出血风险,引发脑出血,造成严重后果^[5-6]。近年来研制安全有效、机制明确的治疗缺血性脑卒中的药物成为了研究的热点。草木樨属豆科植物,分布于包括中国在内的世界各地,香豆素是其主要的化学成分之一,有研究发现其具较高的药用价值,传统上用于治疗昆虫叮咬、小静脉循环障碍疾病、肝病、高血压病、关节炎、痔疮和支气管炎等^[7-9]。据报道,其还具有降低纤维蛋白原水平及血液黏度、抑制血小板聚集来发挥抗凝血作用^[10]。基于此,本研究拟研究基于氧化应激和炎症介质反应,评估草木樨提取物对急性脑缺血组织的保护作用。

1 资料与方法

1.1 收集和制备草木樨提取物

将草木樨干燥后切成小块并粉碎成粗粉;将植物碎片浸泡在石油醚中72 h进行脱脂,然后干燥粉

末;通过浸渍法获得该脱脂粉末的提取物溶液,其得率为12.5% w/w。

1.2 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 50 只,约 8 周龄,体质量 250~300 g,购自海南省医学实验动物中心。将所有大鼠饲养在具有(25±2)℃温度、12 h光照/黑暗周期和(60±5)%相对湿度的条件下,饲喂标准饮食并保持其自由饮水。

1.3 动物造模、分组

采用改良 Longa 法制备脑缺血大鼠模型^[11-12],向腹腔内注射 5%水合氯醛麻醉大鼠,仰卧固定,于颈部切开,分离右侧颈总动脉(Common carotid artery, CCA)、颈内动脉(Internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(External carotid artery, ECA),用动脉夹夹闭 CCA 及 ICA,将长 6 cm、直径 0.26 mm 尼龙线从右侧 CCA 分叉 3 mm 处插入 ICA,去除 ICA 动脉夹,继续推进,插入深度为 18~20 mm,感觉有轻微阻力时打结固定栓线,去除 CCA 动脉夹,缝合伤口,保持缺血状态 1 h。将 50 大鼠分为 5 组,每组各 10 只,假手术组:除不栓塞血管外,其余操作同上并灌胃给予等量生理盐水;模型组:造模并灌胃给予等量生理盐水;草木樨低、中、高剂量组:造模并分别对 3 组大鼠灌胃给予 100、250 和 500 mg/kg 剂量药物,2 次/d,连续给药 7 d。

1.4 2,3,5 氯化三苯基四氮唑染色法(TTC)检测脑梗死体积

麻醉大鼠、以 2 mm 间距将解剖出的大脑行冠状位切片;将所有脑切片用 37℃ TTC 染液染色 30 min,图像分析仪绘制图像,通过 Image J 软件检

测脑梗死面积、计算脑梗死体积。

1.5 神经功能评估

采用 Longa 评分法^[13]评估每只大鼠神经行为学状况。计分方式：正常活动计 0 分；前肢不能完全伸展计 1 分；行走时大鼠向瘫痪侧转圈计 2 分；行走时身体向瘫痪侧倾倒计 3 分；不能自发行走，有意识丧失计 4 分。

1.6 放射免疫测定法检测血浆 6-keto-PGF1a 及 TXB2 水平

取出血液，以 2 000 r/min 离心 10 min 分离血浆；用放射免疫测定法检测血浆 6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-PGF1a)及血栓素 B2(TXB2)水平，操作严格参照试剂盒说明书。

1.7 制备脑组织匀浆

解剖出大鼠大脑，用生理盐水彻底冲洗，并分成两半；立即将每只大鼠的一半大脑在三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (TRIS hydrochloride, Tris-Hcl) (50 mM, pH 7.4)和蔗糖(300 mM)溶液中匀浆；组织匀浆在 4℃下以 10 000 r/min 离心 10 min，并分离出上清液用于以下生化评估。每只大鼠的另一半大脑用于组织病理学研究。

1.8 生化分析

参照酶联免疫吸附实验 (ELISA) 试剂盒说明书，使用 ELISA 试剂盒 (R&D Systems, MN) 在脑组织匀浆上清液中测定细胞因子水平；用分光光度计 (Shimadzu, 日本) 测定所有大鼠脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。

1.9 原位末端凋亡法 (TUNEL) 检测脑组织神经元凋亡情况

将脑切片石蜡包埋，经二甲苯脱蜡及 70、95、100%乙醇水化，用蛋白酶 K 工作液室温孵育 15 min，滴入 TUNEL 反应液，37℃下在湿盒中孵育 1 h，加入二氨基联苯胺显色液孵育 10 min，脱水、透明、封片。每个切片随机选择的 3 个或 4 个非重叠视野，用光学显微镜检查缺血脑组织细胞凋亡情况。

1.10 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白相对表达水平

参考文献方法使用 Western blot 检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白相对表达水平^[14]。提取缺血脑组织，放射免疫沉淀 (Radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解提取蛋白，使用二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白水平测定试剂盒 (上海碧云天生物

技术有限公司)测量蛋白质水平，蛋白电泳，转膜至聚偏氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜，5%脱脂牛奶封闭，4℃过夜，二抗孵育，增强化学发光法 (Enhanced chemiluminescence, ECL) 显色液显色，Image J 软件分析各条带灰度值。

1.11 统计学处理

使用 SPSS 26.0 软件。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，2 组比较采用 LSD-*t* 检验，多组间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 草木樨对大鼠脑梗死体积的影响

与假手术组比较，其余各组大鼠脑组织梗死体积均升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，草木樨低、中、高剂量组大鼠脑组织梗死体积显著降低 ($P < 0.05$)，且随着草木樨给药剂量的增加，各组大鼠脑组织梗死体积逐渐降低 ($P < 0.05$) (表 1、图 1)。

表 1 各组脑梗死体积比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	脑梗死体积
假手术组	0.00 ± 0.00
模型组	48.25 ± 4.22△
草木樨低剂量组	39.21 ± 3.78△*
草木樨中剂量组	28.36 ± 4.02△*▲
草木樨高剂量组	23.84 ± 3.88△*▲#

注：与假手术组比较，△ $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与草木樨低剂量组比较，▲ $P < 0.05$ ；与草木樨中剂量组比较，# $P < 0.05$

2.2 草木樨对脑缺血大鼠神经功能缺损评分的影响

与假手术组比较，其余各组大鼠神经功能缺损评分均升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，草木樨低、中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P < 0.05$)，且随着草木樨给药剂量的增加，各组大鼠神经功能缺损评分逐渐降低 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	神经功能缺损评分
假手术组	0.00 ± 0.00
模型组	3.30 ± 0.48△
草木樨低剂量组	2.80 ± 0.42△*
草木樨中剂量组	2.40 ± 0.52△*▲
草木樨高剂量组	1.40 ± 0.52△*▲#

注：与假手术组比较，△ $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与草木樨低剂量组比较，▲ $P < 0.05$ ；与草木樨中剂量组比较，# $P < 0.05$

2.3 草木樨对脑缺血大鼠血浆 6-keto-PGF1a 和

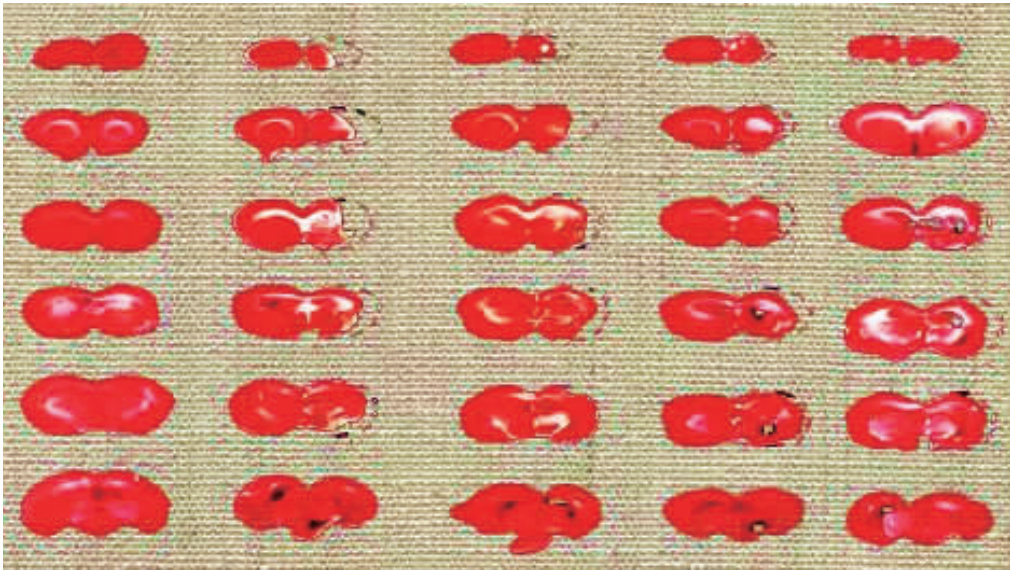


图 1 各组大鼠脑梗死情况(TCC 染色)

TXB2 水平的影响

与假手术组比较,其余各组大鼠血浆 6-keto-PGF1a 水平均降低($P<0.05$)、血浆 TXB2 水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠血浆 6-keto-PGF1a 水平显著增高($P<0.05$)且血浆 TXB2 水平降低($P<0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠血浆 6-keto-PGF1a 水平逐渐增高($P<0.05$)且血浆 TXB2 水平逐渐降低($P<0.05$)(表 3)。

表 3 各组血浆 6-keto-PGF1a 及 TXB2 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	keto-PGF1a	TXB2
假手术组	572.4 \pm 42.4	217.3 \pm 38.3
模型组	237.1 \pm 20.8 Δ	683.8 \pm 55.9 Δ
草木樨低剂量组	378.2 \pm 19.2 Δ^*	530.6 \pm 47.2 Δ^*
草木樨中剂量组	439.3 \pm 23.2 $\Delta^*\blacktriangle$	375.2 \pm 42.1 $\Delta^*\blacktriangle$
草木樨高剂量组	483.9 \pm 33.2 $\Delta^*\blacktriangle\#$	264.3 \pm 38.8 $\Delta^*\blacktriangle\#$

注:与假手术组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与草木樨低剂量组比较, $\blacktriangle P<0.05$;与草木樨中剂量组比较, $\# P<0.05$

2.4 草木樨对脑缺血大鼠脑组织中细胞因子水平的影响

与假手术组比较,其余各组大鼠 TNF-a 水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠 TNF-a 水平均显著降低($P<0.05$)且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠 TNF-a 水平逐渐降低($P<0.05$)。此外,与假手术组比较,其余各组大鼠 IL-10 水平均降低($P<0.05$);与模型组

比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠 IL-10 水平显著增高($P<0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各草木樨组 IL-10 水平逐渐增高($P<0.05$)(表 4)。

表 4 各组 TNF-a 及 IL-10 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/100 mg 脑组织)

组别	TNF-a	IL-10
假手术组	48.76 \pm 8.23	138.78 \pm 12.35
模型组	171.24 \pm 9.23 Δ	73.28 \pm 6.37 Δ
草木樨低剂量组	101.22 \pm 11.35 Δ^*	97.89 \pm 8.24 Δ^*
草木樨中剂量组	78.56 \pm 5.24 $\Delta^*\blacktriangle$	119.12 \pm 9.34 $\Delta^*\blacktriangle$
草木樨高剂量组	58.45 \pm 5.72 $\Delta^*\blacktriangle\#$	137.89 \pm 13.27 $\Delta^*\blacktriangle\#$

注:与假手术组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与草木樨低剂量组比较, $\blacktriangle P<0.05$;与草木樨中剂量组比较, $\# P<0.05$

2.5 草木樨对脑缺血大鼠氧化应激反应的影响

与假手术组比较,其余各组缺氧性脑损伤大鼠脑组织中的氧化应激指标 SOD 和 GSH 水平均降低($P<0.05$)。与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠脑组织 SOD 水平和 GSH-PX 水平显著增高($P<0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠 SOD 水平和 GSH-PX 水平逐渐增高($P<0.05$)(表 5)。

2.6 草木樨对脑缺血大鼠神经元凋亡的影响

与假手术组比较,其余各组脑缺血大鼠神经元凋亡率升高($P<0.05$);与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠神经元凋亡率明显降低($P<0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠神经元凋亡率逐渐降低($P<0.05$)(表 6、图 2)。

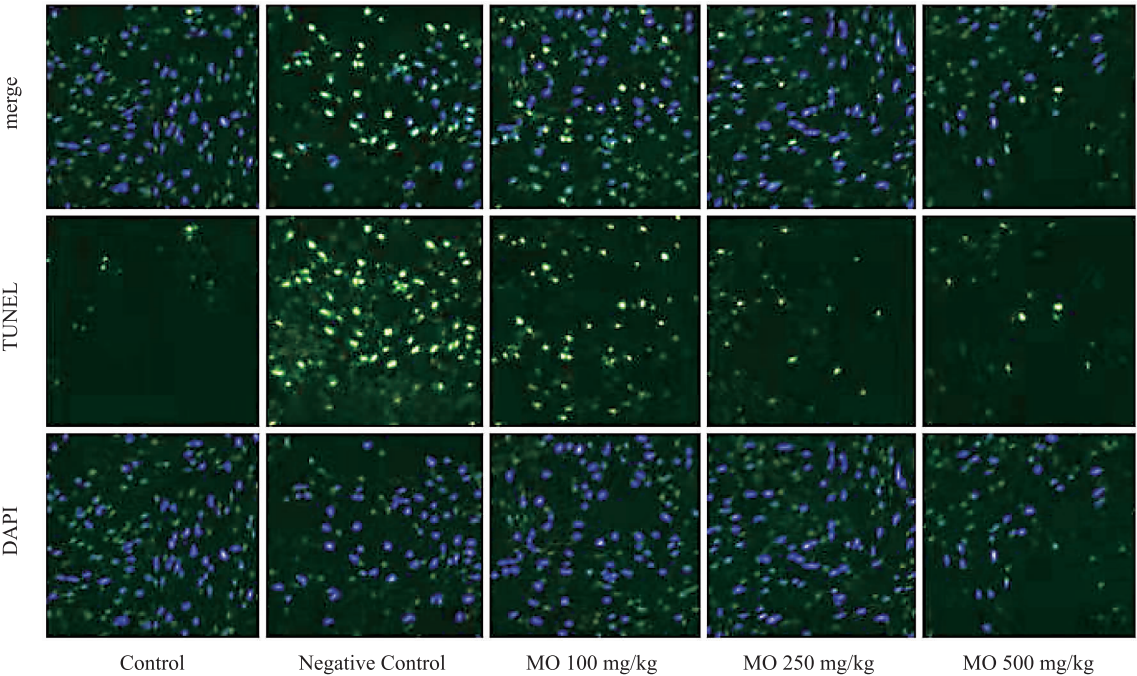


图 2 各组大鼠脑梗塞组织荧光 TUNEL 染色

表 5 各组 SOD 及 GSH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, U/100 mg 脑组织)

组别	SOD	GSH-PX
假手术组	2.67 ± 0.23	192.7 ± 8.3
模型组	0.79 ± 0.12 Δ	96.8 ± 5.9 Δ
草木樨低剂量组	1.73 ± 0.19 Δ^*	130.6 ± 7.2 Δ^*
草木樨中剂量组	2.18 ± 0.20 $\Delta^* \blacktriangle$	169.2 ± 8.1 $\Delta^* \blacktriangle$
草木樨高剂量组	2.53 ± 0.28 $\Delta^* \blacktriangle \#$	188.6 ± 8.3 $\Delta^* \blacktriangle \#$

注:与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $* P < 0.05$;与草木樨低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与草木樨中剂量组比较, $\# P < 0.05$

表 6 各组细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞凋亡率
假手术组	3.89 ± 0.87
模型组	24.16 ± 3.21 Δ
草木樨低剂量组	13.89 ± 4.12 Δ^*
草木樨中剂量组	9.23 ± 1.54 $\Delta^* \blacktriangle$
草木樨高剂量组	5.14 ± 0.72 $\Delta^* \blacktriangle \#$

注:与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $* P < 0.05$;与草木樨低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与草木樨中剂量组比较, $\# P < 0.05$

2.7 草木樨对脑缺血大鼠 Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达水平的影响

与假手术组比较,其余各组大鼠 Bcl-2 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$)及 Bax 蛋白相对表达水平显著增高($P < 0.05$);与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠 Bcl-2 蛋白相对表达水平显著增高($P < 0.05$),Bax 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$),且随着草木樨给药剂量的增加,各组大鼠

Bcl-2 蛋白相对表达水平逐渐增高($P < 0.05$)、Bax 蛋白相对表达水平逐渐降低($P < 0.05$)(表 7、图 3)。

表 7 各组 Bcl-2 及 Bax 蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白相对表达水平	Bax 蛋白相对表达水平
假手术组	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.32
模型组	0.38 ± 0.15 Δ	2.57 ± 0.39 Δ
草木樨低剂量组	0.48 ± 0.29 Δ^*	2.31 ± 0.36 Δ^*
草木樨中剂量组	0.64 ± 0.12 $\Delta^* \blacktriangle$	1.71 ± 0.15 $\Delta^* \blacktriangle$
草木樨高剂量组	0.88 ± 0.22 $\Delta^* \blacktriangle \#$	1.48 ± 0.22 $\Delta^* \blacktriangle \#$

注:与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $* P < 0.05$;与草木樨低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与草木樨中剂量组比较, $\# P < 0.05$

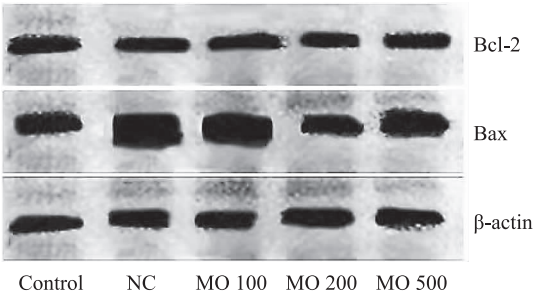


图 3 各组大鼠 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平

3 讨论

脑卒中好发于中老年人,随着社会人口老龄化的加重,该病的病死率持续上升,在我国每年大约有

110 万人死于脑卒中,不及时治疗将会对神经系统造成不可逆性损伤,极大危害着人类健康^[2,15]。脑缺血诱发神经细胞损伤,其病理过程复杂,多种机制参杂其中,如能量衰竭、酸中毒、自由基损伤、兴奋性毒性损害、免疫失衡和炎症反应等^[16-17]。溶栓是治疗缺血性血管疾病的重要手段,组织型纤溶酶原激活剂(Tissue plasminogen activator, t-PA)是唯一被美国食品药品监督管理局批准的用于急性缺血性脑卒中溶栓治疗的药物,然而,由于其严格的时间窗限制(<4.5 h)和因该药物治疗诱发的再灌注损伤,故目前只有 5% 的患者能从中受益^[18]。因此,寻找安全有效、副作用小的治疗缺血性脑卒中的药物引发了研究热潮。有研究发现草木樨具有清热解毒、消炎、抗凝血等作用,因此本研究探讨了草木樨提取物对急性脑缺血组织的保护作用。

本研究结果发现模型组大鼠脑缺血组织梗死明显,而与模型组较,草木樨低、中、高剂量组大鼠梗死体积显著减小。脑缺血的病因常为血管栓塞,血管栓塞引发脑血流量减少、促使脑组织缺血缺氧。有研究表明 6-酮-前列腺素 F1a (6-keto-prostaglandin F1a, 6-keto-PGF1a) 和血栓素 B2 (Thromboxane B2, TXB2) 是血栓形成的重要因素,血液中血栓素 A2 (Thromboxane A2, TXA2) 增加可促进血小板黏附、聚集、血管收缩,促进血栓形成,而前列环素 (Prostaglandin I₂, PGI₂) 可通过舒张血管、抑制血小板聚集而抑制血栓形成,两者血液中水平平衡是维持心血管系统稳定的重要因素,当机体中 TXA₂/PGI₂ 比例增高可导致血管收缩、血小板聚集,最终形成血栓,血清中 TXA₂ 及 PGI₂ 半衰期较短,不稳定,易分别水解成 TXB₂ 及 6-keto-PGF1a^[19]。本研究结果显示,与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组脑缺血大鼠血浆 6-keto-PGF1a 水平显著增高,且血浆 TXB₂ 水平降低,且随着给药剂量的增加,两者水平分别呈现逐渐上升和逐渐降低的变化趋势,表明草木樨可通过降低血液中 TXB₂/6-keto-PGF1a 比例来抑制血栓形成,对缺血脑组织形成一定的保护作用。

先前有报道指出脑缺血可改变细胞线粒体功能、可改变脑组织中细胞因子水平、产生自由基、导致活性氧产生增加^[20]。有研究指出脑缺血早期激活的 M1 型小胶质细胞可释放出 TNF- α 在内的大量促炎细胞因子, TNF- α 可通过诱导内皮细胞黏附分子的表达、增加炎性细胞产生、还可破坏血-脑脊

液屏障、刺激其他炎症介质的产生,进而损伤大脑组织,而脑缺血后期激活的 M2 型小胶质细胞可释放出 IL-10 在内的大量具有抗炎细胞因子,其不仅可抑制单核巨噬细胞释放炎性介质,还可增强溶解性 TNF- α 受体等抗炎性因子的释放,抑制炎症反应对组织的损伤,诱导 IL-10 等抗炎因子的释放、抑制 TNF- α 等促炎因子的释放,对脑缺血组织的保护具有重要意义^[21-22]。大量研究证明,脑缺血后氧化应激反应增强、细胞氧化和抗氧化系统失衡,释放出大量含活性氧(Reactive oxygen species, ROS)在内的自由基及清除减少,ROS 可通过促使脂质过氧化和蛋白质氧化的发生来损伤机体组织^[23-24]。SOD, GSH-Px 等具有清除自由基的作用,增强两者活性可实现对过量自由基的清除,进而保护组织。文献表明,部分具有抗氧化特性的草药对脑缺血具有治疗作用^[25]。本研究得出同样的研究结果,与模型组比较,经草木樨治疗后的脑缺血大鼠脑组织中 TNF- α 水平显著降低,IL-10, SOD, GSH-Px 水平显著升高,且随着给药剂量的增加,各组大鼠 TNF- α 水平逐渐降低,IL-10, SOD, GSH-Px 水平逐渐升高,表明草木樨可通过降低 TNF- α 水平、增高 IL-10 水平等及增加 SOD, GSH-Px 等抗氧化酶的活性来减轻炎症反应和氧化应激对缺血脑组织的损伤,从而对缺血脑组织起到了呈剂量依赖性的保护作用。

大量研究表明,抑制细胞凋亡可减轻缺血性脑损伤。Bcl-2 家族蛋白在调控细胞凋亡过程中发挥着重要作用,分为细胞凋亡抑制蛋白和促进蛋白, Bcl-2 为第 1 个被确认为对细胞凋亡具有抑制作用的因子,其可通过多种途径抑制细胞发生凋亡,而 Bax 为促进细胞凋亡的蛋白;细胞凋亡的调控直接受两种蛋白水平的影响;Bcl-2 高表达则抑制细胞凋亡;反之, Bax 高表达则促进细胞凋亡^[26-28]。俞睿等^[29]研究发现清脑益元汤可通过上调 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达、下调 Bax 蛋白及 mRNA 表达来减少脑缺血组织细胞凋亡。本研究得出同样的研究结果,与模型组比较,草木樨低、中、高剂量组大鼠 Bcl-2 蛋白相对表达水平显著增高,而 Bax 蛋白相对表达水平降低,表明草木樨可通过促进 Bcl-2 表达、抑制 Bax 表达来抑制神经细胞凋亡,保护受损脑组织,且随着给药剂量的增加, Bcl-2 蛋白相对表达水平逐渐升高、Bax 蛋白相对表达水平逐渐降低。

综上所述,草木樨可通过减少血栓形成、氧化应激和炎症介质来有效抑制缺血性脑组织细胞凋亡、

减少缺血脑组织梗死体积,对缺血性脑损伤大鼠具有一定的保护作用,且呈剂量依赖性,最有效的剂量为 500 mg/kg,有望为研发安全有效、机制明确的治疗脑缺血的药物提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Benjamin EJ, Muntner P, Alonso AA, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2019, 139(10): E56-E528.
- [2] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(1204): 1145-1158.
- [3] Wu C, Zhao X, Zhang X, et al. Effect of ginkgo biloba extract on apoptosis of brain tissues in rats with acute cerebral infarction and related gene expression[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6387-6394.
- [4] Gonzalez-Rodriguez PJ, Xiong F, Li Y, et al. Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: role of glucocorticoid receptors[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 65: 172-179.
- [5] Savarese G, Savonitto S, Lund LH, et al. Efficacy and safety of prolonged dual antiplatelet therapy: a meta-analysis of 15 randomized trials enrolling 85 265 patients[J]. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2016, 2(4): 218-228.
- [6] Signorelli SS, Platania I, Tomasello SD, et al. Insights from Experiences on Antiplatelet Drugs in Stroke Prevention: A Review[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(16): 5840.
- [7] Menković N, Savikin K, Tasić S, et al. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(1): 97-107.
- [8] Pleșca-Manea L, Părvu AE, Părvu M, et al. Effects of melilotus officinalis on acute inflammation[J]. *Phytother Res*, 2002, 16(4): 316-319.
- [9] Liu YT, Gong PH, Xiao FQ, et al. Chemical constituents and antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Tumor activities of melilotus officinalis (Linn.) pall [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 271.
- [10] Zhang J, Di H, Luo K, et al. Coumarin content, morphological variation, and molecular phylogenetics of melilotus [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 810.
- [11] 许海江, 孙同文, 赵春玲, 等. 丹参酮 II A 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑的保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(16): 1334-1337.
- [12] 郝红, 李方, 王志, 等. 隐丹参酮对脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(3): 250-254.
- [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 阳晓晴, 唐雪梅, 苏溪洪, 等. 绞股蓝总苷对慢性脑缺血大鼠海马神经元的保护作用及其机制研究[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(12): 1487-1491.
- [15] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide Population-Based survey of 480 687 adults [J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [16] 刘磊, 吴一飞. 牡荆苷对急性脑缺血大鼠大脑纹状皮质 nNOS 免疫表达的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(23): 2855-2860.
- [17] Zhao QS, Li W, Li D, et al. Clinical treatment efficiency of mechanical thrombectomy combined with rhPro-UK thrombolysis for acute moderate/severe cerebral infarction [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(17): 5740-5746.
- [18] Zhou Z, Lu J, Liu WW, et al. Advances in stroke pharmacology [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 191: 23-42.
- [19] 王佳, 杨俊卿, 余丽娟, 等. NF- κ B 抑制剂 PDTC 保护全脑缺血/再灌注大鼠海马损伤机制涉及 COX2-PGI2/TXA2 通路的初探[J]. *中国药理学通报*, 2014(6): 782-786.
- [20] Ahmed MA, El ME, Ahmed AA. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats [J]. *Life Sci*, 2014, 110(2): 61-69.
- [21] Ueba Y, Aratake T, Onodera KI, et al. Attenuation of zinc-enhanced inflammatory M1 phenotype of microglia by peridinin protects against short-term spatial-memory impairment following cerebral ischemia in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1/4): 476-483.
- [22] Gaire BP, Bae YJ, Choi JW. S1P(1) regulates M1/M2 polarization toward brain injury after transient focal cerebral ischemia [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2019, 27(6): 522-529.
- [23] 蒋晓玲, 王阳, 郭新玲, 等. LncRNA ANRIL 干扰 miR-153 并介导 NF- κ B P65 的核转位诱导脑缺血再灌注小鼠脑组织损伤和细胞凋亡以及氧化应激 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(2): 139-144.
- [24] 樊文香. 缺血性脑卒中的机制研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2018, 49(6): 751-759.
- [25] 黄优, 陈海云, 何超明, 等. 丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤中氧化应激炎症通路的影响 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2020, 41(2): 201-205.
- [26] Hollville E, Romero SE, Deshmukh M. Apoptotic cell death regulation in neurons [J]. *FEBS J*, 2019, 286(17): 3276-3298.
- [27] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(4): 273-284.
- [28] Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(3): 289-317.
- [29] 俞睿, 祝美珍, 刘倩菁, 等. 清脑益元汤对脑缺血损伤大鼠缺血侧皮质区神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(4): 825-830.

(2022-01-14 收稿)