

脑络欣通方通过 p38 MAPK-mTOR 信号通路对缺血性脑卒中模型大鼠神经元自噬及血脑屏障通透性的影响

陈妙云 刘化

【摘要】 目的 探讨脑络欣通方通过 p38 MAPK-mTOR 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元自噬及血脑屏障通透性的影响。**方法** 将 60 只大鼠分为假手术组、模型组、脑络欣通方低、中及高剂量组及尼莫地平组,每组各 10 只;除假手术组外均建立大脑中动脉闭塞动物模型,假手术组仅将栓塞线插入不结扎;建模成功后脑络欣通方低、中及高剂量组分别灌胃 40、80 及 120 mg/mL 的脑络欣通方溶液($1\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}\cdot \text{d}^{-1}$),尼莫地平组灌胃 40 mg/kg 尼莫地平溶液;假手术组及模型组灌胃等体积的生理盐水;神经功能缺损量表(Modified neurological severity score, mNSS)评估神经功能评分;伊文思蓝(Ethedium bromide, EB)检测血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)功能;脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)检测神经元凋亡率;免疫荧光检测微管相关蛋白 1 轻链 3B(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3B)表达水平;免疫印迹检测裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)、磷酸化-丝裂原活化蛋白激酶 p38 抗体(Phosphorylation P38 mitogen activated protein kinase, P-p38 MAPK)、雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)及 p-mTOR 蛋白水平。**结果** 干预第 7 及 14 d 与模型组比较,脑络欣通方低、中及高剂量组 mNSS 评分均降低($P<0.05$);脑络欣通方高剂量组 mNSS 评分低于脑络欣通方中剂量组($P<0.05$),但脑络欣通方低剂量与中剂量组 mNSS 评分,脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组比较均无明显差异($P>0.05$);与假手术组比较,模型组 EB 水平升高($P<0.05$);与脑络欣通方低剂量组比较,脑络欣通方中及高剂量组脑组织 EB 水平均降低,且脑络欣通方各剂量组之间存在差异($P<0.05$),但脑络欣通方低剂量与中剂量组 mNSS 评分,脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组比较均无明显差异($P>0.05$);与假手术组比较,模型组神经元凋亡率、LC3B 表达、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白水平均升高, mTOR 及 p-mTOR 蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组比较,脑络欣通方低、中及高剂量组神经元凋亡率、LC3B 表达、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白水平均降低, mTOR 及 p-mTOR 蛋白水平升高,且脑络欣通方各剂量组之间存在差异($P<0.05$),但脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组比较无明显差异($P>0.05$)。**结论** 脑络欣通方可减少缺血性脑卒中模型大鼠神经元凋亡及自噬,改善血脑屏障通透性,其机制可能与抑制 p38 MAPK、激活 mTOR 有关,且高剂量效果最佳。

【关键词】 缺血性脑卒中 脑络欣通方 神经功能 凋亡 自噬 血脑屏障通透性

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)06-0557-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.06.009

缺血性脑卒中是大脑动脉狭窄或闭塞导致血液供应不足,引起脑组织缺血缺氧的一类脑部疾病^[1]。根据国外团队的数据显示,美国每年近有 80 万人患有缺血性脑卒中,而每 4 min 就有 1 人因该疾病而死亡^[2]。我国相关流行病学数据显示,全国缺血性脑卒中发病率为 110~180/10 万,发病率持续高于全球及英美日等发达国家的同期水平;虽随着医疗技术的发展病死率有所降低,但致残率较高,对患者预后危害较大^[3]。血脑屏障(Blood-brain barrier,

BBB)最早出自 20 世纪初期,可维持大脑的稳态,但在缺血性脑卒中发生时 BBB 破坏严重,大脑血源性液体进入脑实质,导致脑组织中含水量较高,进而损伤神经功能^[4]。自噬作为细胞死亡的一种形式,正常状态下自噬可通过溶酶体降解途径来发挥清除受损细胞器及回收营养物质再利用的作用,而在缺血性脑卒中时自噬被过度激活而加重神经细胞凋亡^[5]。机体自噬过程中有多个信号通路的参与,雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,过表达可抑制自噬。裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated

protein kinase, MAPK)是由 p38、细胞外信号调节激酶等组成的信号通路,在缺血性脑卒中早期具有维持神经元再生的作用,而晚期时 p38 MAPK 过度激活可促进自噬而加快神经元凋亡^[6]。因此,了解相关信号通路在缺血性脑卒中中的作用机制对于疾病控制具有重要意义。脑络欣通方具有益气活血的作用,是著名新安医家王乐陶先生的临床验方,主要由黄芪、红花、三七、蜈蚣等药物组成,针对缺血性脑卒中临床治疗效果较好^[7]。但脑络欣通在缺血性脑卒中中的作用还有待考量。因此,本研究分析脑络欣通方通过 p38 MAPK-mTOR 信号通路对缺血性脑卒中模型大鼠神经元自噬及血脑屏障通透性的影响,期为临床相关研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 动物

无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)等级 SD(Sprague-Dawley)成年 60 只雄性大鼠,体重(230±20)g,鼠龄 3~4 周,购自济南金丰实验动物有限公司,动物许可证号为 SYXK(鲁)2022-0033;饲养于本院动物实验室,温度 23~25°,湿度 50%~60%,自由进食及饮水,所有大鼠适应 7 d 后进行实验。

1.2 药物

脑络欣通由黄芪(30 g)、红花(10 g)、三七(4 g)、川芎(6 g)、蜈蚣(2 g)、当归(10 g)、天麻(10 g)组成,按照比例加入蒸馏水 1600 mL 煎煮,过滤冷冻,离心去渣,用<45℃的蒸发仪浓缩至 197 mL,制成冻干粉 51.3 g,配成 120、80、40 mg/mL 的溶液;尼莫地平片购自广东隆信制药有限公司,国药准字 H19999062。

1.3 试剂与仪器

戊巴比妥钠购自上海新亚药业有限公司,国药准字 H31021725;0.25%胰酶购自 HyClone 公司,货号为 SH30042.01;伊文思蓝(EB)购自美国 Sigma 公司,货号为 E2129;p38MAPK 抗体购自上海钰博生物科技有限公司,货号为 yb-5477R;p-p38MAPK 抗体购自上海臻科生物科技有限公司,货号为 ZK-7062;微管相关蛋白 1 轻链 3B(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3B),mTOR, p-mTOR 抗体购自 Abcam 公司,批号为 20190124001、20190403002、20190208004;GAPDH 兔多克隆抗体购自赛默飞世尔科技有限公司,货号为 PA1-16777;

EG 1150H 型组织包埋机购自德国 LEICA 公司;Qilinbeier TS-1000 型摇床购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司;IX71 型倒置拍照显微镜购自上海赖氏电子科技有限公司;DYCP-31E 电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;多功能酶标仪购自美国 BioTek 公司。

1.4 分组、动物建模及药物干预

将 60 只大鼠分为假手术组、模型组、脑络欣通方低、中、高剂量组及尼莫地平组,每组各 10 只;按照采用 Zea-Longa 改良法^[8]建立大脑中动脉闭塞动物模型,注射 1%戊巴比妥钠(50 mL/kg)腹腔麻醉,剔除颈部毛发,消毒并纵向切开皮肤;钝性分离左侧颈总动脉,结扎游离端,闭合颈部总动脉,采用手术剪刀剪开颈外动脉游离端 2 mm,下端系松结;将线栓沿着切口经动脉插入,拉扯与颈动脉保持水平,出现阻力后停止,线栓插入深度约 2 cm,并在分叉处结扎。假手术组仅将栓塞线插入 1 cm,不结扎动脉。根据 Zea-Longa^[8]评分 1~3 分为建模成功标准。建模后次日脑络欣通方低、中及高剂量组分别灌胃 40、80 及 120 mg/mL 的脑络欣通方溶液,按照 1 mL·100 g⁻¹·d⁻¹灌胃;尼莫地平组灌胃 40 mg/kg 尼莫地平溶液;假手术组及模型组灌胃等体积的生理盐水;各组连续灌胃 14 d。

1.5 神经功能评估

建模后、干预第 7 及 14 d 分别采用神经功能缺损量表(Modified neurological severity score, mNSS)评分对各组大鼠的神经功能进行评估,从运动功能、地上行走、感觉功能、平衡木及各类反射与异常运动方面进行评估,分数越高表明神经功能缺损越严重。

1.6 EB 渗漏法检测 BBB 通透性

每组大鼠随机选取 5 只大鼠,尾部静脉注射 2%的 EB(4 mL/kg),瞬间大鼠眼巩膜、全身皮肤变蓝,表示 EB 体内循环成功;2 h 后麻醉大鼠,4℃的 0.9%氯化钠溶液约 50 mL 经心脏灌注,流出液呈清亮时取出右脑皮质组织,称重后置入 15 mL 离心管,加入 5 mL 的甲酰胺溶液制成脑组织匀浆,将匀浆液置入 37℃避光下水浴 48 h,按照 3500 r/min,25℃离心 10~15 min,半径为 15 cm,取上清液,酶标仪在波长 630 nm 下检测吸光度,分析 EB 水平。EB 含量(μg/g)=EB 含量(μg/mL)×甲酰胺量(mL)/脑湿重(g)。

1.7 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端

标记法(Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)检测神经元凋亡率

取各组剩余 5 只大鼠进行以下实验;提取脑组织进行5 μm石蜡切片,100、95、85%酒精脱水,磷酸缓冲液(Phosphate balanced solution, PBS)冲洗 3 次,5 min/次,加入 50 μL 的 TUNEL 反应液, PBS 冲洗,0.2%氨水返蓝,凋亡细胞成棕黄色,选择 5 个 200 倍非重叠视野,计算凋亡率= 凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.8 免疫荧光检测 LC3B 表达水平

脑组织采用 20%的质量分数的蔗糖溶液脱水,组织切片机切片厚度为10 μm, PBS 冲洗,透化液透化15 min,加入 LC3B 抗体,4 ℃孵育过夜,加入二抗60 min,进行 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色 5 min,荧光显微镜阳性表达,并采用 Imagej 软件计算面积。

1.9 免疫印迹检测 p38 MAPK, p-p38 MAPK, mTOR 及 p- mTOR 蛋白表达水平

取 0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm 的脑组织,加入 1 mL 的裂解液充分研磨;按照 15000 r/min 离心提取上清液,采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶,计算初含 50 μg 的蛋白所需的液体进行上样,开始电泳。当 Marker 蛋白置于玻璃板底部时则停止跑胶;转膜,加入 1 抗,加入 2 抗(1:2000);避光下将显影液加入聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, Image-lab 图像分析计算蛋白相对表达含量。

1.10 统计学处理

采用SPSS. 26统计学软件,计量资料符合正态分布,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较进行单因素分析,组间比较运用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组神经功能 mNSS 评分比较

建模后各组大鼠 mNSS 评分比较无明显差异($P > 0.05$);干预第 7 及 14 d 与模型组比较,脑络欣通方低、中及高剂量组大鼠 mNSS 评分均降低($P < 0.05$);脑络欣通方低及中剂量组大鼠 mNSS 评分比较无明显差异($P > 0.05$);脑络欣通方高剂量组 mNSS 评分低于脑络欣通方中剂量组($P < 0.05$),

但脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组比较无明显差异($P > 0.05$)。各组组内随着时间的延长 mNSS 评分逐渐降低($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组神经功能 mNSS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	<i>n</i>	mNSS 评分		
		建模后	干预第 7 d	干预第 14 d
假手术组	10	/	/	/
模型组	10	11.56 ± 1.58	9.20 ± 0.90	6.25 ± 0.47
脑络欣通方低剂量组	10	11.71 ± 1.42 [#]	8.21 ± 0.85 [#]	5.13 ± 0.50 [#]
脑络欣通方中剂量组	10	11.30 ± 1.52 [#]	8.01 ± 0.76 [#]	5.05 ± 0.54 [#]
脑络欣通方高剂量组	10	11.45 ± 1.61 [#] ▲□	7.00 ± 0.68 [#] ▲□	3.86 ± 0.37 [#] ▲□
尼莫地平组	10	11.38 ± 1.47 [#] ▲□	6.93 ± 0.72 [#] ▲□	3.77 ± 0.35 [#] ▲□

注:与模型组比较, [#] $P < 0.05$;与脑络欣通方低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$;与脑络欣通方中剂量组比较, □ $P < 0.05$

2.2 各组脑组织 EB 水平比较

与假手术组比较,模型组脑组织 EB 水平升高($P < 0.05$);模型组与脑络欣通方低剂量组脑组织 EB 水平比较无明显差异($P > 0.05$);与脑络欣通方低剂量组比较,脑络欣通方中及高剂量组脑组织 EB 水平均降低,且各剂量组之间存在差异($P < 0.05$),但脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组脑组织 EB 水平比较无明显差异($P > 0.05$)(表 2、图 1)。

表 2 各组脑组织 EB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mg/g)

组别	<i>n</i>	EB 水平
假手术组	5	3.28 ± 0.36
模型组	5	14.20 ± 2.05 [*]
脑络欣通方低剂量组	5	13.90 ± 2.11 [*]
脑络欣通方中剂量组	5	10.16 ± 1.23 ^{*#} ▲
脑络欣通方高剂量组	5	8.54 ± 0.93 ^{*#} ▲□
尼莫地平组	5	8.18 ± 1.22 ^{*#} ▲□

注:与假手术组比较, ^{*} $P < 0.05$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$;与脑络欣通方低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$;与脑络欣通方中剂量组比较, □ $P < 0.05$

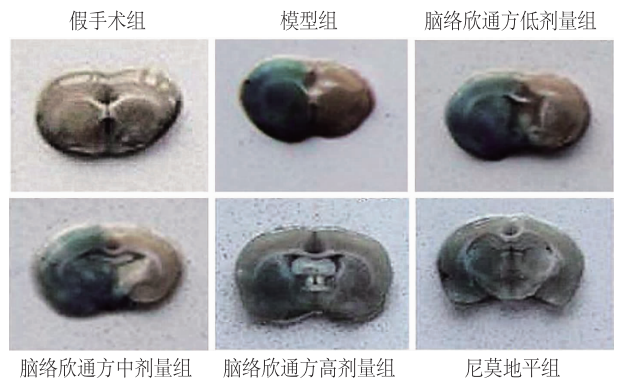


图 1 各组脑组织 EB 水平

2.3 各组神经元凋亡率比较

与假手术组比较,模型组神经元凋亡率升高($P<0.05$);与模型组比较,脑络欣通方低剂量组神经元凋亡率降低($P<0.05$);与脑络欣通方低剂量组比较,脑络欣通方中及高剂量组神经元凋亡率均降低,且各剂量组之间存在差异($P<0.05$),但脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组比较无明显差异($P>0.05$)(表 3、图 2)。

表 3 各组神经元凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	凋亡率
假手术组	5	2.38±0.23
模型组	5	24.18±3.26*
脑络欣通方低剂量组	5	20.77±3.50*#
脑络欣通方中剂量组	5	17.55±2.93*#▲
脑络欣通方高剂量组	5	12.36±1.80*#▲□
尼莫地平组	5	11.96±1.77*#▲□

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与脑络欣通方低剂量组比较,▲ $P<0.05$;与脑络欣通方中剂量组比较,□ $P<0.05$

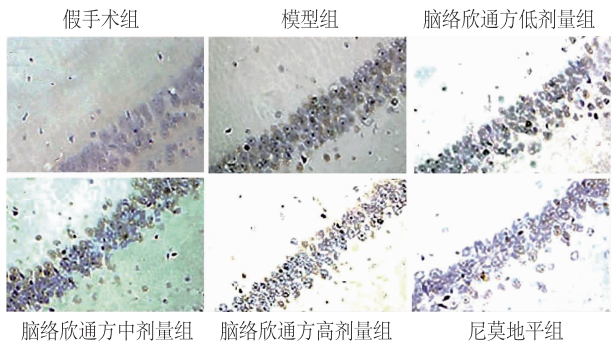


图 2 各组神经元凋亡率($\times 200$ 倍)

2.4 免疫荧光检测各组脑组织 LC3B 表达水平

与假手术组比较,模型组脑组织 LC3B 表达水平升高($P<0.05$);与模型组比较,脑络欣通方低剂量组脑组织 LC3B 表达水平降低($P<0.05$);与脑络欣通方低剂量组比较,脑络欣通方中及高剂量组脑组织 LC3B 表达水平降低,且各剂量组之间存在差异($P<0.05$),但脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组脑组织 LC3B 表达水平比较无明显差异($P>0.05$)(表 4、图 3)。

2.5 免疫印迹检测各组脑组织 p38 MAPK, p-p38 MAPK, mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组脑组织 p38 MAPK, p-p38 MAPK 相对表达水平升高, mTOR 及 p-mTOR 相对表达水平降低($P<0.05$);与模型组比较,脑络欣通方低剂量组 p38 MAPK, p-p38 MAPK 相对表

表 4 各组脑组织 LC3B 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, \text{mm}^2$)

组别	<i>n</i>	LC3B 荧光面积
假手术组	5	1.02±0.16
模型组	5	2.18±0.40*
脑络欣通方低剂量组	5	1.82±0.35*#
脑络欣通方中剂量组	5	1.56±0.28*#▲
脑络欣通方高剂量组	5	1.07±0.20*#▲□
尼莫地平组	5	1.04±0.19*#▲□

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与脑络欣通方低剂量组比较,▲ $P<0.05$;与脑络欣通方中剂量组比较,□ $P<0.05$

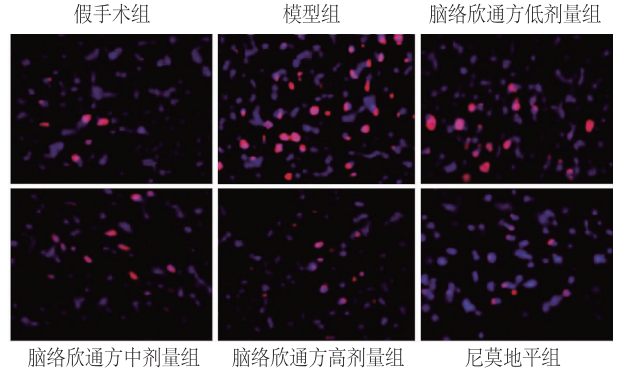


图 3 免疫荧光检测各组脑组织 LC3B 表达水平($\times 200$ 倍)

达水平降低, mTOR 及 p-mTOR 相对表达水平升高($P<0.05$);与脑络欣通方低剂量组比较,脑络欣通方中及高剂量组 p38 MAPK, p-p38 MAPK 相对表达水平降低, mTOR 及 p-mTOR 相对表达水平升高,且各剂量组之间存在差异($P<0.05$),但脑络欣通方高剂量组与尼莫地平组比较无明显差异($P>0.05$)(表 5、图 4)。

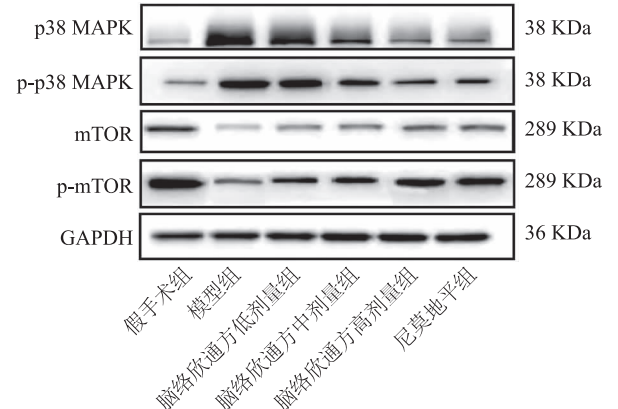


图 4 各组 p38 MAPK, p-p38 MAPK, mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达水平比较

3 讨论

缺血性脑卒中是一种常见且严重的神经系统疾

表 5 各组脑组织 p38 MAPK,p-p38 MAPK,mTOR 及 p-mTOR 蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p38 MAPK	p-p38 MAPK	mTOR	p- mTOR
假手术组	5	0.25 ± 0.04	0.71 ± 0.11	0.98 ± 0.13	1.88 ± 0.23
模型组	5	0.74 ± 0.09*	1.33 ± 0.20*	0.50 ± 0.10*	1.02 ± 0.19*
脑络欣通方低剂量组	5	0.56 ± 0.08*#	1.17 ± 0.15*#	0.60 ± 0.06*#	1.36 ± 0.15*#
脑络欣通方中剂量组	5	0.48 ± 0.07*#▲	1.02 ± 0.14*#▲	0.71 ± 0.08*#▲	1.50 ± 0.17*#▲
脑络欣通方高剂量组	5	0.37 ± 0.06*#▲□	0.96 ± 0.12*#▲□	0.79 ± 0.07*#▲□	1.64 ± 0.19*#▲□
尼莫地平组	5	0.36 ± 0.08*#▲□	0.92 ± 0.16*#▲□	0.80 ± 0.09*#▲□	1.65 ± 0.13*#▲□

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与脑络欣通方低剂量组比较,▲ $P<0.05$;与脑络欣通方中剂量组比较,□ $P<0.05$

病,其发病机制涉及许多生物学过程和信号通路的调控。近年来,越来越多的研究表明自噬和血脑屏障通透性在缺血性脑卒中的发展和转归中起着重要的作用;同时,p38 MAPK-mTOR 信号通路异常表达与神经元的凋亡和自噬过程密切相关,因此探究几者关系对于了解发病机制具有重要意义。脑络欣通方作为一种传统中药复方,已被广泛应用于临床治疗缺血性脑卒中。脑络欣通方具有显著的神经保护作用,然而其作用机制尚不完全清楚。基于此,本研究通过对缺血性脑卒中模型大鼠给予不同剂量的脑络欣通方进行干预,通过评估神经功能、检测神经元凋亡率和自噬指标水平以及血脑屏障通透性的变化来为脑络欣通方的应用提供了理论基础,并为进一步研究其分子机制提供了新的方向。

BBB 可选择性隔绝脑与外周环境,维持脑内代谢平衡;缺血性脑卒中能够引起 BBB 损伤,造成脑水肿、脑出血和外周免疫细胞侵入,这是脑损伤加重的重要原因之一^[9];同时, BBB 损伤时外周系统中有害物质、炎症介质、细胞外基质蛋白等可以更容易地穿过屏障进入脑组织,引起炎症反应、氧化应激和细胞死亡等,进而损害神经细胞和神经功能^[10]。本研究结果显示,与模型组比较,各剂量脑络欣通方组 mNSS 评分及 EB 水平均降低,这说明采用脑络欣通方治疗后通过改善 BBB 通透性而提高神经功能,且高剂量组效果最佳。缺血性脑卒中属于中医学“中风”范畴,本病为本虚标实之证,气血不足、肝肾亏虚是致病之本,风、火(热)、痰、瘀是发病之标。因此,可选择益气活血、熄风通络方法治疗^[11]。脑络欣通方中黄芪为君药,具有健脾补中、升阳举陷、活血通脉、益卫固表等功效,祛瘀而不伤正;川芎为血中之气药,辛散温通,活血化瘀,气行则血行,配合三七促进血液运行,散瘀止血,消肿定痛;蜈蚣息风止痉、通络止痛、攻毒散结;红花活血化瘀;当归补血活血;天麻祛风通络;全方共奏益气补正、活血化瘀、通络、通利血脉功效。脑络欣通方具有益气、活血及

化瘀的作用,可加快血管新生,重建缺血区域循环,并可逆转缺血损伤的神经细胞,改善神经功能。麝香黄芪复方滴丸中以黄芪为君,体外细胞实验中具有较好的抗氧化应激及加快脑循环的作用,并可改善 BBB 通透性,抑制脑水肿而提高治疗效果^[12]。有研究表明,三七总皂苷可显著提高缺血性脑卒中模型大鼠 BBB 保护作用,并可改善神经行为学,其机制可能与抑制磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)和其下游分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B(protein kinase,AKT)有关^[13]。

本研究结果显示,与模型组比较,各剂量脑络欣通方组脑组织 LC3B 表达水平降低,且神经元凋亡率降低,认为脑络欣通方可通过抑制神经元自噬而降低神经元凋亡。自噬是细胞自我保护的重要机制,可在维持细胞活性及内部环境稳定等方面具有重要作用^[14]。在缺血缺氧损伤时细胞内线粒体受损并开始瓦解,蛋白会转移至细胞质中并被累积,而加快神经元凋亡。LC3B 是自噬体特异性标志物,在缺血性脑卒中中 LC3B 表达水平升高表示该时期的神经元自噬水平较高,并认为降低自噬活性可减少神经元凋亡^[15]。有研究表明,脑缺血再灌注损伤可导致 LC3 表达水平升高,表示自噬处于高水平状态,而黄芪甲苷可以抑制 LC3 表达水平,降低自噬活性,改善神经功能丢失来发挥脑保护作用^[16]。红花黄色素为中药红花主要活性成分,其可对神经元凋亡具有抑制作用,机制可能与降低细胞中炎症反应,并降低半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Cysteinylnyl aspartate specific proteinase,Caspase)3/8 表达水平相关^[17]。当归挥发油是当归主要化学成分,在缺血再灌注损伤 PC12 细胞中可抑制自噬及凋亡,机制可能与通过调控细胞外调节蛋白激酶(Extracellular regulated protein kinases,ERK)信号通路及 PI3K/Akt/mTOR 通路的活性有关,共同调控细胞凋亡及自噬等生命活动^[18]。脑络欣通方可对神经细胞具有保护作用,加快脑卒中后中枢神经功

能的恢复。本研究认为脑络欣通方中多种中药成分可通过抑自噬而减少对神经元的损害,进而发挥抗神经元凋亡的作用。本研究结果表明,与模型组比较,各剂量脑络欣通方组脑组织中 p38 MAPK, p-p38 MAPK 相对表达水平降低, mTOR 及 p-mTOR 相对表达水平升高,且高剂量治疗效果最佳,故认为脑络欣通方可能通过调控该信号通路而发挥作用。p38MAPK 在脑缺血后被激活可传到细胞应激;在缺血性脑卒中时 p38MAPK 磷酸化加剧,并可加快自噬及神经元凋亡,同时还可加剧炎症反应。mTOR 作为细胞自噬及存活信号通路的重要靶点,认为当其表达水平上调时可降低自噬,而缓解神经损伤。有研究表明,在脑缺血再灌注损伤时黄芪甲苷可减少细胞坏死及凋亡,并可上调 AKT-mTOR 信号通路而调节自噬,进而改善脑损伤^[19]。p-p38 MAPK 抑制剂 SB203580 可改善缺血再灌注损伤模型大鼠海马神经元自噬,并降低自噬相关蛋白 LC3-II 表达水平,并可进一步增加神经细胞数量^[20]。本研究认为脑络欣通方可通过抑制 p-p38 MAPK 及上调 mTOR 而改善 BBB 通透性,且降低自噬而发挥神经保护作用。

综上所述,脑络欣通方可减少缺血性脑卒中模型大鼠神经元凋亡及自噬,改善血脑屏障通透性,其机制可能与抑制 p38 MAPK,激活 mTOR 有关,且高剂量治疗效果最佳。

参 考 文 献

- [1] Zheng K, Lin LM, Jiang W, et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape in ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2022, 42(1):56-73.
- [2] Pluta R, Januszewski S, Czuczwar SJ. The role of gut microbiota in an ischemic stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):915.
- [3] Zhu H, Hu SP, Li YT, et al. Interleukins and ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:828447.
- [4] Candelario-Jalil E, Dijkhuizen RM, Magnus T. Neuroinflammation, stroke, blood-brain barrier dysfunction, and imaging modalities[J]. *Stroke*, 2022, 53(5):1473-1486.
- [5] Zhang Y, Chen QB, Chen DS, et al. SerpinA3N attenuates ischemic stroke injury by reducing apoptosis and neuroinflammation[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(4):566-579.
- [6] 罗莉,韩尊,冯瑞雪,等. 小胶质细胞在缺血性脑卒中活化的常见信号通路[J]. *赣南医学院学报*, 2021, 41(8):844-850.
- [7] 邓华. 脑络欣通颗粒治疗缺血性中风急性期气虚血瘀证临床研究[J]. *中外医学研究*, 2017, 15(7):133-135.
- [8] Li Y, Tan L, Yang CX, et al. Distinctions between the Koizumi and Zea Longa methods for middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: a systematic review and meta-analysis of rodent data[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):10247.
- [9] Qiu YM, Zhang CL, Chen AQ, et al. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: targets for immune therapy? [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:678744.
- [10] Song S, Huang H, Guan X, et al. Activation of endothelial Wnt/ β -catenin signaling by protective astrocytes repairs BBB damage in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol* (1956), 2021:33249091.
- [11] 蔡志玲,梁明坤,陈家冠,等. 补阳还五汤联合灸刺督脉疗法治疗急性缺血性脑卒中的疗效观察[J]. *中国中医急症*, 2023, 32(5):845-850.
- [12] 李梦岷,李一兴,张运克. 麝香黄芪复方滴丸对体外缺血缺氧血脑屏障通透性及相关调节蛋白的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(1):80-84.
- [13] 刘禹,邵海宇,王琦. 三七总皂苷结合针灸干预对急性缺血性脑卒中大鼠血脑屏障的保护作用及对 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(4):649-652, 661.
- [14] Li C, Li JY, Xu GD, et al. Influence of chronic ethanol consumption on apoptosis and autophagy following transient focal cerebral ischemia in male mice[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):6164.
- [15] Huang LY, Song JX, Cai H, et al. Healthy Serum-derived exosomes improve neurological outcomes and protect blood-brain barrier by inhibiting endothelial cell apoptosis and reversing autophagy-mediated tight junction protein reduction in rat stroke model[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16:841544.
- [16] 张怡. 黄芪甲苷基于 AMPK/DDIT4/mTOR 信号通路调控自噬抗脑缺血再灌注损伤的研究[D]. 石家庄:河北中医学院, 2019.
- [17] 李娜. 红花黄色素对控制性低血压诱导的缺血缺氧性脑损伤的影响及机制研究[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
- [18] 石皓. 当归挥发油对神经细胞缺血再灌注损伤后凋亡及自噬的影响[D]. 甘肃中医药大学, 2020.
- [19] 史楠,张燕,李晋峰,等. 黄芪甲苷通过 AKT-mTOR 信号通路促进脑缺血的自噬改善脑缺血再灌注损伤[J]. *中国临床神经科学*, 2017, 25(6):601-612.
- [20] 赵晓云,韩影,赵雅宁,等. 抑制丝裂原活化蛋白激酶磷酸化对脑缺血后处理大鼠学习记忆及海马区神经细胞自噬的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2018, 27(6):487-491.

(2024-02-11 收稿)