

• 脑梗死 •

茯苓多糖调节 RhoA/ROCK2 信号通路对大鼠 脑缺血再灌注损伤的影响

孔德胜 韩欢欢 张兴 张坤

【摘要】 目的 研究茯苓多糖对大鼠脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)的影响,并基于 Ras 同源基因家族成员 A/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 2(Ras homologous gene family member A/Rho-related coiled-coil protein kinase 2, RhoA/ROCK2)信号通路探讨其作用机制。**方法** 采用阻断大脑中动脉 2 h 的方法构建 CIRI 大鼠模型,设假手术组、模型组、茯苓多糖组、茯苓多糖 + RhoA 抑制剂 Rhosin 组和茯苓多糖 + RhoA 激动剂 LPA 组,每组各 24 只;各组分别 1 次/d 连续给药治疗 4 周后通过 Longa 评分评价大鼠神经功能,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)染色法检测脑梗死体积,失重法检测脑含水量,通过苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE)、原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)观察大脑皮层病理变化和神经细胞凋亡状况,酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测大脑皮层炎症因子[肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(Interleukin, IL)-1 β , IL-6]、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平和抗氧化酶[超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)]活性,反转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法、Western blot 法检测 RhoA/ROCK2 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较,茯苓多糖组和茯苓多糖 + Rhosin 组 Longa 评分、脑梗死体积、脑含水量显著降低($P < 0.05$);大脑皮层病理变化和神经细胞凋亡状况明显改善,凋亡指数(Apoptosis index, AI)显著降低($P < 0.05$);大脑皮层 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MDA 水平显著降低, SOD, GSH-Px 活性显著升高($P < 0.05$);RhoA, ROCK2、核因子- κ B p65(Nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)mRNA 和蛋白表达水平显著降低, B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)/Bcl-2、活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved cysteine aspartic protease-3, Cleaved Caspase-3)/Caspase-3 蛋白表达水平比值显著降低($P < 0.05$)。与茯苓多糖组比较,茯苓多糖 + Rhosin 对 CIRI 大鼠神经功能、脑梗死体积、脑含水量、炎症反应、氧化应激及 RhoA/ROCK2 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达的调控作用显著增强;茯苓多糖 + LPA 对 CIRI 大鼠各指标的调控作用显著减弱。**结论** 茯苓多糖对大鼠 CIRI 具有保护作用,其机制可能与下调 RhoA/ROCK2 信号通路而减轻炎症反应、氧化应激、细胞凋亡有关。

【关键词】 茯苓多糖 脑缺血再灌注 Ras 同源基因家族成员 A/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 2 信号通路 炎症 氧化应激 凋亡

【中图分类号】 R743.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2025)01-0051-09

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2025.01.009

Effect of poria cocos polysaccharides on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by regulating RhoA/ROCK2 signaling pathway Kong Desheng, Han Huanhuan, Zhang Xing, et al. Handan Central Hospital, Handan 056001

【Abstract】 Objective To investigate the effect of poria cocos polysaccharides on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in rats, and to explore its mechanism based on the A of Ras homologous gene family member A/Rho-related coiled-coil protein kinase 2 (RhoA/Rock2) signaling pathway. **Methods** The CIRI rat model was prepared by blocking the middle cerebral artery for 2 h, and the sham operation group, model group, poria cocos polysaccharides group, poria cocos polysaccharides + RhoA inhibitor Rhosin group and po-

ria cocos polysaccharides + RhoA agonist LPA group were set up, with 24 rats in each group. After 4 weeks of continuous administration once a day, the nerve function of the rats was evaluated by Longa scores, the infarct volume was detected by 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) staining, and the brain water content was detected by weight loss method. The pathological changes of cerebral cortex and the apoptosis of nerve cells were observed by hematoxylin eosin (HE) or TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining. The contents of inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6], malondialdehyde (MDA) and the activity of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px)] in cerebral cortex were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The RhoA/ROCK2 signaling pathway related mRNA and protein expression were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) or Western blot method. **Results** Compared with model group, the Longa score, cerebral infarction volume and cerebral water content in poria cocos polysaccharides group and poria cocos polysaccharides + Rhosin group were significantly decreased ($P < 0.05$). The histopathological changes of cerebral cortex and nerve cells apoptosis were significantly improved, and the apoptosis index (AI) was significantly decreased ($P < 0.05$). The content of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA in cerebral cortex were significantly decreased, while the activities of SOD, GSH-Px were significantly increased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of RhoA, ROCK2, nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) were significantly decreased, the protein ratio of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax)/Bcl-2, activated cysteine aspartic protease-3 (Cleaved Caspase-3)/Caspase-3 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with poria cocos polysaccharides group, poria cocos polysaccharides + Rhosin significantly enhanced the regulation effects on nerve function, cerebral infarction volume, cerebral water content, inflammation, oxidative stress, RhoA/ROCK2 signaling pathway related mRNA and protein expression in CIRI rats, while the regulation effect of poria cocos polysaccharides + LPA on CIRI rats was significantly weakened. **Conclusion** Poria cocos polysaccharides has protective effect on CIRI in rats, and its mechanism may be related to reducing inflammation, oxidative stress and apoptosis by down-regulating RhoA/ROCK2 signaling pathway.

【Key words】 Poria cocos polysaccharides Cerebral ischemia-reperfusion RhoA/Rock2 signaling pathway Inflammation Oxidative stress Apoptosis

脑卒中是导致我国成年人残疾和死亡的主要疾病之一,其中超过 70% 为缺血性脑卒中。在治疗时间窗(<6 h)内通过药物溶栓、介入手术等手段使血管再通是缺血性脑卒中首选治疗方案,但脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)却是影响患者预后的关键因素,其病理机制复杂,其中缺血半暗带神经细胞继发性凋亡是 CIRI 发生发展的主要原因^[1],而炎症、氧化应激则发挥着重要的推动作用^[2-3]。由 Ras 同源基因家族成员 A (Ras homologous gene family member A, RhoA) 及其下游蛋白 Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (Rho-related coiled-coil protein kinase, ROCK) 组成的信号通路对机体炎症、氧化应激和细胞凋亡均具有一定的调控作用^[4-5]。ROCK 分为 ROCK1, ROCK2 两种亚型,脑组织中主要为 ROCK2 表达^[6]。有研究发现下调 RhoA/ROCK2 信号通路可抑制炎症、神经细胞凋亡而减轻大鼠 CIRI^[7-8]。因此, RhoA/ROCK2 信号通路可作为 CIRI 新药研究的切入点。

茯苓多糖是提取茯苓的一种多糖类化合物,目前主要作为肿瘤患者放化疗的辅助药物应用于临床。随着药学研究的深入,发现茯苓多糖具有较好的抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种药理学作用^[9-10]。有研究发现,茯苓多糖通过调节 RhoA/ROCK 信号通路可有效减轻心肌缺血再灌注大鼠炎症、氧化应激和心肌细胞凋亡^[11]。茯苓多糖能够减轻帕金森病模型小鼠脑组织氧化应激损伤^[12]。但是茯苓多糖对脑缺血再灌注损伤是否具有治疗作用尚不清楚,本研究通过制备 CIRI 大鼠模型,探讨茯苓多糖对 CIRI 的影响,并基于 RhoA/ROCK2 信号通路探讨其机制,以期对 CIRI 临床治疗提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 145 只无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF) 级 7 周龄雄性斯泼累格·多雷 (Sprague Dawley, SD) 大鼠,体质量 210~240 g,购

自河北省实验动物中心[SCXK(冀)2020-001],在光暗各12 h模拟昼夜节律、温度 23~25 ℃、湿度 50%~70%、通风良好的动物房饲养。动物实验遵守实验动物福利伦理审查指南,本实验获得本院伦理委员会批准。

1.1.2 药物与试剂 茯苓多糖口服液(批号 2210A26004)购自湖南补天药业公司;RhoA 抑制剂 Rhosin(货号 555460-M)、RhoA 激动剂 LPA(货号 L7260)购自美国 Sigma 公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC, 水平 2%, 货号 G3005)、苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE, 货号 G1120)、原位末端标记法(TUNEL, 货号 T2191)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α , 货号 SEKR-0009)、白细胞介素(Interleukin, IL)-1 β (货号 SEKR-0002)、IL-6(货号 SEKR-0005)和一步法反转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(货号 T2210)购自北京索莱宝公司;丙二醛(Malondialdehyde, MDA, 货号 JM-10323R1)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, 货号 JM-01793R2)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px, 货号 JM-02154R2)购自江苏晶美生物公司;放射免疫沉淀试验(Radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(货号 P0013B)、二奎磷甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量试剂盒(货号 P0010)、增强化学发光液(Enhanced chemiluminescence, ECL, 货号 P0018M)、总 RNA 抽提试剂 Trizol(货号 R0016)购自上海碧云天生物公司;RhoA(货号 bsm-54572R)、ROCK2(货号 bs-1205R)、核因子- κ B p65(Nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65, 货号 bs-20159R)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 货号 bs-0032R)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax, 货号 bs-0127R)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cysteine aspartic protease-3, Caspase-3, 货号 bs-0081R)、活化型 Caspase-3(Cleaved Caspase-3, 货号 bs-20364R)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(货号 bs-41373R)抗体和 IgG 二抗(货号 bs-0295G)购自北京博奥森公司。

1.1.3 主要仪器 BMJ-A 型石蜡包埋机(常州中威仪器厂),RM2016 型切片机(德国 Leica 公司),Ci-L 型显微镜(日本 Nikon 公司),5424R 离心机

(德国 Eppendorf 公司),ReadMax 1500 型酶标仪(上海闪谱生物科技公司),7500 型 RT-PCR 仪(美国 ABI 公司),PowerPac Basic 型电泳仪、1658033 型蛋白转印系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模、分组与给药 随机取 145 只大鼠中的 24 只设为假手术组,剩余 121 只参照文献^[13]报道的方法制备 CIRI 大鼠模型:禁食不禁水 12 h 后腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,通过线栓阻断右侧大脑中动脉 2 h 构建 CIRI 大鼠模型;再灌注 24 h 后行 Longa 评分^[14]:无神经功能缺损记 0 分,左侧前肢不能伸直记 1 分,向左侧转圈爬行记 2 分,向左侧倾倒记 3 分,无法行走或意识丧失记 4 分。Longa 评分 1~3 分表示造模成功^[14]。共造模成功 98 只,随机去除 2 只后将剩余的 96 只成模大鼠随机分为模型组、茯苓多糖组、茯苓多糖 + Rhosin 组和茯苓多糖 + LPA 组,每组各 24 只;茯苓多糖组灌胃 3 mL/kg 茯苓多糖口服液(根据人与大鼠剂量换算所得)和腹腔注射 5 mL/kg 生理盐水;茯苓多糖 + Rhosin 组灌胃 3 mL/kg 茯苓多糖口服液和腹腔注射 40 mg/kg Rhosin(注射体积 5 mL/kg)^[15];茯苓多糖 + LPA 组灌胃 3 mL/kg 茯苓多糖口服液和腹腔注射 10 mg/kg LPA(注射体积 5 mL/kg)^[16];假手术组和模型组灌胃 3 mL/kg 生理盐水和腹腔注射 5 mL/kg 生理盐水,各组均 1 次/d,连续给药 4 周。

1.2.2 神经功能评价 随机取 8 只大鼠,按照 1.2.1 项下 Longa 评分标准,由 2 名实验人员独立进行 Longa 评分,Longa 评分越高则说明神经功能缺损越严重。

1.2.3 脑梗死体积测定 腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后取脑组织, -20 ℃ 冷冻 20 min 后沿冠状位均匀切成 5 片,浸泡于 2% TTC 溶液 37 ℃ 避光染色 30 min,4% 多聚甲醛溶液避光固定 24 h,拍照后通过 Image J 软件计算梗死面积,脑梗死体积 = [(切片梗死面积 × 切片厚度)/(切片面积 × 切片厚度)] × 100%。

1.2.4 脑含水量测定 随机另取 8 只大鼠,腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后取脑组织,称重为湿重;置于 90 ℃ 烘箱至恒重,为干重。脑含水量 = [(湿重 - 干重)/湿重] × 100%。

1.2.5 大脑皮层病理变化和神经细胞凋亡状况观察 取各组剩余的 8 只大鼠,腹腔注射 40 mg/kg

戊巴比妥钠麻醉后取脑组织,取部分大脑皮层置于4%多聚甲醛溶液固定72 h,脱水和石蜡包埋后4 μ m切片,脱蜡水化后(1)部分切片用于常规 HE 染色(苏木素染色 5 min,流水冲洗 1 min,伊红染色 1 min), $\times 400$ 倍显微镜下观察大脑皮层病理变化;(2)部分切片按照试剂盒说明书行 TUNEL 染色, $\times 400$ 倍显微镜下观察大脑皮层神经元凋亡状况,随机取 5 个不重叠的视野,计数细胞总数和凋亡细胞数,凋亡指数=(凋亡细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.2.6 大脑皮层炎症因子和氧化应激指标水平检测 取部分大脑皮层组织,剪碎后加入 5 倍量 4 $^{\circ}$ C 生理盐水后研磨匀浆,3500 r/min 离心 10 min 取上清液,然后按照 ELISA 试剂盒,通过酶标仪检测大脑皮层中炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6)水平和氧化应激指标(MDA 水平和 SOD, GSH-Px 活性)。

1.2.7 大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关 mRNA 表达水平检测 取大脑皮层 50 mg,加 Trizol 试剂抽提总 RNA,按照一步法 RT-PCR 试剂盒操作说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA 后行 PCR 扩增反应,引物序列见表 1,扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 60 s,共循环 40 次。RhoA 引物上游 5'-TGAAGAAGCAGT TGTGCTCC-3',下游 5'-CAGAACTACTGCGG GCGGC-3',扩增长度 138 bp;ROCK2 引物上游 5'-TCAAGTGCCAGCCTCAAG-3',下游 5'-AGCTC AATCCGTCTCCTAT-3',扩增长度 151 bp;NF- κ B p65 引物上游 5'-TCCAGTGTGTGAAGAAGCGA-3',下游 5'-GCTGCTCCTCTATGGGAAC-3',扩增长度 111 bp;GAPDH 引物上游 5'-ATGGGTGTG AACCACGAGAA-3',下游 5'-ACGGATACATT GGGGGTAGG-3',扩增长度 240 bp。以 GAPDH 作为内参,通过 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 mRNA 相对表达水平。

1.2.8 大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关蛋白表达水平检测 取大脑皮层组织 100 mg,加 RIPA 裂解液研磨匀浆后 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min,12000 r/min 离心 25 min 取上清液,BCA 法测定蛋白水平并沸水浴变性后通过 10% 十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfonate, SDS)凝胶电泳分离蛋白、转印至聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5 h 后,加 RhoA(1:1000 稀释)、ROCK2(1:1000 稀释)、NF- κ B p65(1:1000 稀释)、Bcl-2(1:1000 稀释)、Bax(1:1000 稀释)、

Caspase-3(1:1500 稀释)、Cleaved Caspase-3(1:1000 稀释)、GAPDH(1:2000 稀释)抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h,磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffer solution, PBS)洗膜后加 IgG 二抗(1:4000 稀释)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗膜后加 ECL 显色,用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,然后以 GAPDH 为内参半定量目标蛋白相对表达水平。

1.2.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较行 one-way ANOVA 检验,2 组比较行 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠神经功能的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 Longa 评分显著升高($P<0.05$);与模型组比较,茯苓多糖组、茯苓多糖+Rhosin 组和茯苓多糖+LPA 组 Longa 评分显著降低($P<0.05$);与茯苓多糖组比较,茯苓多糖+Rhosin 组 Longa 评分显著降低,茯苓多糖+LPA 组 Longa 评分显著升高($P<0.05$)(表 1)。

表 1 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	Longa 评分 (分)	脑梗死体积 (%)	脑含水量 (%)
假手术组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	71.36 \pm 3.39
模型组	2.98 \pm 0.34*	43.75 \pm 6.08*	82.04 \pm 4.01*
茯苓多糖组	1.86 \pm 0.25 Δ	26.90 \pm 3.34 Δ	77.31 \pm 3.73 Δ
茯苓多糖+Rhosin 组	1.15 \pm 0.13 Δ $\#$	12.18 \pm 1.75 Δ $\#$	73.24 \pm 3.61 Δ $\#$
茯苓多糖+LPA 组	2.30 \pm 0.27 Δ $\#$	37.42 \pm 4.91 $\#$	81.52 \pm 3.95 $\#$

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$;与茯苓多糖组比较, $\#$ $P<0.05$

2.2 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠脑梗死体积和脑含水量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积、脑含水量显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,茯苓多糖组和茯苓多糖+Rhosin 组脑梗死体积、脑含水量显著降低($P<0.05$);茯苓多糖+LPA 组脑梗死体积、脑含水量无明显变化($P>0.05$)。与茯苓多糖组比较,茯苓多糖+Rhosin 组脑梗死体积、脑含水量显著降低;茯苓多糖+LPA 组脑梗死体积、脑含水量显著升高($P<0.05$)(图 1、表 1)。

2.3 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层病理变化的影响

假手术组大鼠大脑皮层神经细胞形态正常、结

构完整、排列整齐;模型组大脑皮层表现出明显的病理变化包括神经细胞数量减少、间隙增大、排列紊乱、胞浆固缩、胞体空泡样变、核膜核仁边界不清、炎性细胞浸润等;与模型组比较,茯苓多糖组和茯苓多糖 + Rhosin 组大脑皮层病理变化明显改善,且茯苓多糖 + Rhosin 组改善效果优于茯苓多糖组,而茯苓多糖 + LPA 组改善效果不明显(图 2)。

2.4 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层神经元凋亡的影响

与假手术组比较,模型组大脑皮层凋亡指数显著升高 $[(57.45 \pm 6.08)\% \text{ 比 } (3.91 \pm 0.52)\%, P < 0.05]$;与模型组比较,茯苓多糖组、茯苓多糖 + Rhosin 组和茯苓多糖 + LPA 组凋亡指数显著降低 $[(36.72 \pm 5.14)\%、(18.54 \pm 3.01)\%、(46.63 \pm 5.70)\% \text{ 比 } (57.45 \pm 6.08)\%, P < 0.05]$;与茯苓多糖组比较,茯苓多糖 + Rhosin 组凋亡指数显著降低,茯苓多糖 + LPA 组凋亡指数显著升高 $(P < 0.05)$ (图 3)。

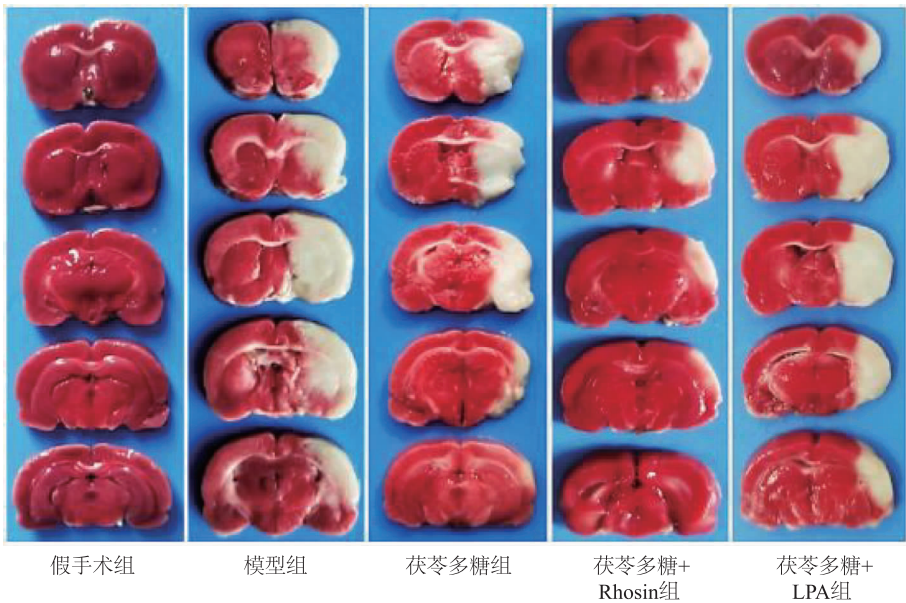


图 1 各组大鼠脑组织梗死状况(TTC 染色)

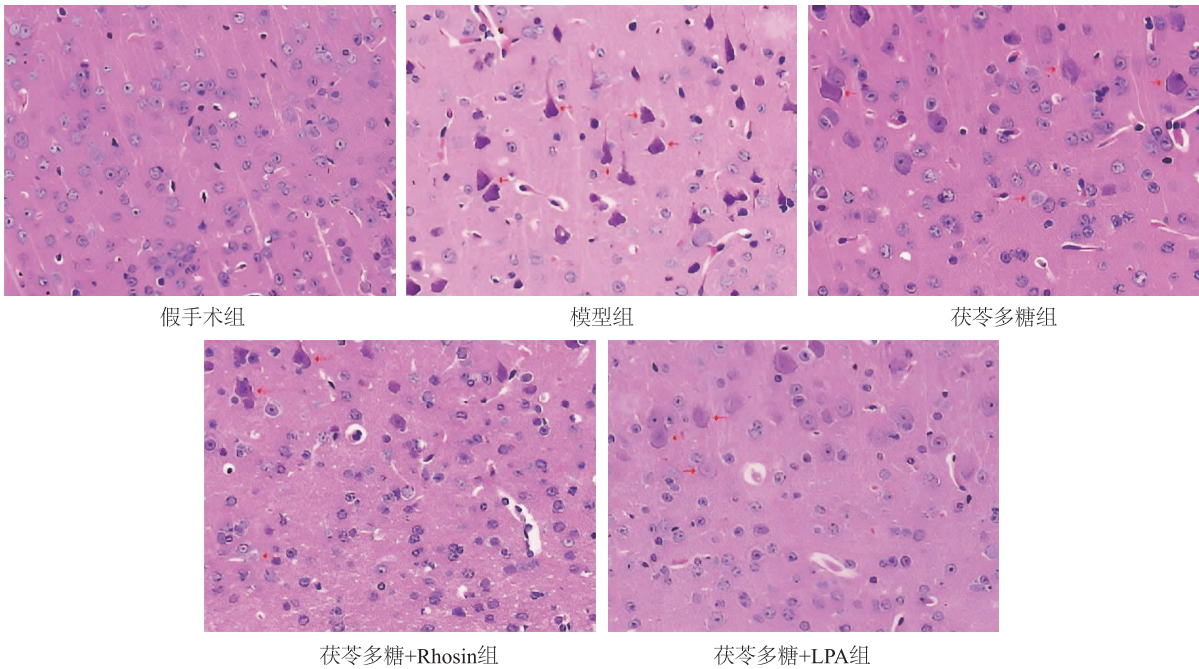


图 2 各组大鼠大脑皮层病理变化(HE 染色×400 倍)

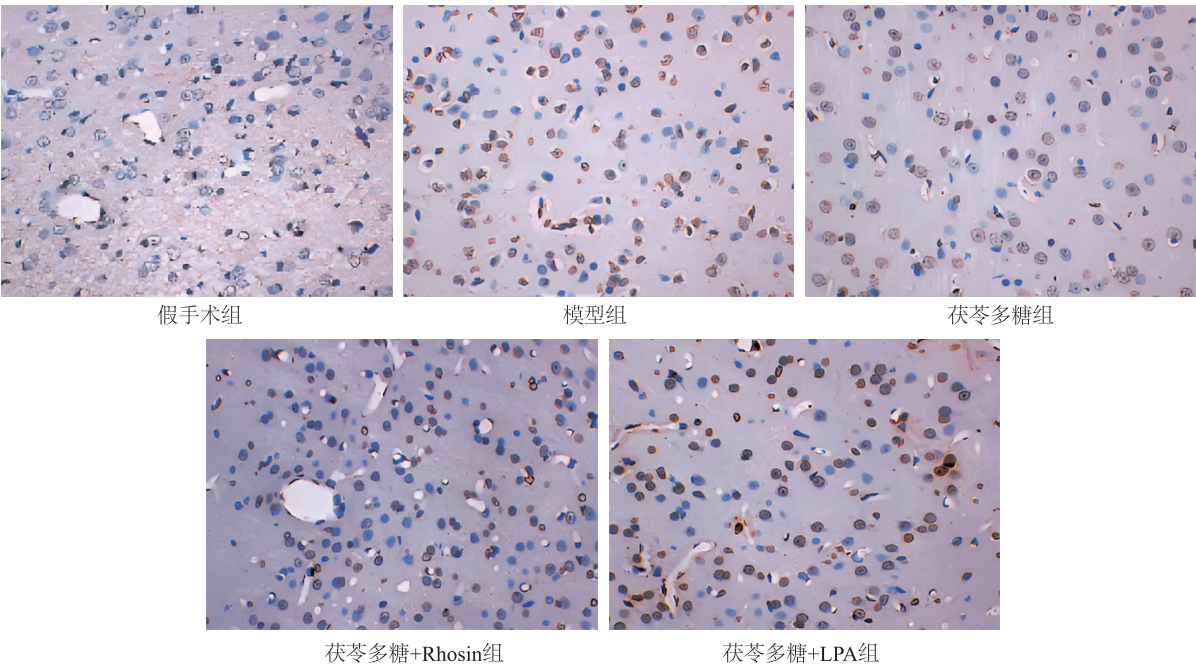


图3 各组大鼠大脑皮层神经细胞凋亡状况(TUNEL 染色×400 倍)

2.5 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层炎症因子水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,茯苓多糖组、茯苓多糖 + Rhosin 组和茯苓多糖 + LPA 组 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$);与茯苓多糖组比较,茯苓多糖 + Rhosin 组 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平显著降低,而茯苓多糖 + LPA 组 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平显著升高 ($P<0.05$) (表 2)。

表2 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{pg/mg}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术组	69.25 \pm 8.13	7.84 \pm 0.72	26.17 \pm 2.80
模型组	208.44 \pm 26.72 *	31.69 \pm 4.04 *	74.26 \pm 9.35 *
茯苓多糖组	126.50 \pm 15.33 \triangle	18.27 \pm 2.35 \triangle	55.38 \pm 7.14 \triangle
茯苓多糖 + Rhosin 组	83.17 \pm 10.42 $\triangle\#$	12.63 \pm 1.54 $\triangle\#$	42.51 \pm 5.83 $\triangle\#$
茯苓多糖 + LPA 组	167.49 \pm 21.08 $\triangle\#$	24.70 \pm 3.11 $\triangle\#$	63.97 \pm 8.02 $\triangle\#$

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\triangle P<0.05$;与茯苓多糖组比较, $\# P<0.05$

2.6 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层氧化应激指标水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层 MDA 水平显著升高,而 SOD, GSH-Px 活性显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,茯苓多糖组、茯苓多糖 + Rhosin 组和茯苓多糖 + LPA 组 MDA 水平显著

降低,而 SOD, GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.05$)。与茯苓多糖组比较,茯苓多糖 + Rhosin 组 MDA 水平显著降低,而 SOD, GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.05$);茯苓多糖 + LPA 组 MDA 水平显著升高,而 SOD, GSH-Px 活性显著降低 ($P<0.05$) (表 3)。

表3 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层氧化应激指标水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	GSH-Px (U/mg)
假手术组	1.65 \pm 0.18	34.92 \pm 4.25	24.17 \pm 2.70
模型组	4.02 \pm 0.57 *	13.68 \pm 1.90 *	10.25 \pm 1.31 *
茯苓多糖组	2.76 \pm 0.40 \triangle	21.55 \pm 3.17 \triangle	18.62 \pm 2.28 \triangle
茯苓多糖 + Rhosin 组	2.14 \pm 0.28 $\triangle\#$	30.47 \pm 4.81 $\triangle\#$	23.09 \pm 3.14 $\triangle\#$
茯苓多糖 + LPA 组	3.35 \pm 0.47 $\triangle\#$	16.89 \pm 2.64 $\triangle\#$	14.77 \pm 2.01 $\triangle\#$

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\triangle P<0.05$;与茯苓多糖组比较, $\# P<0.05$

2.7 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关 mRNA 相对表达水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 mRNA 相对表达水平显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,茯苓多糖组和茯苓多糖 + Rhosin 组 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 mRNA 相对表达水平显著降低 ($P<0.05$);茯苓多糖 + LPA 组 NF- κ B p65 mRNA 相对表达水平显著降低 ($P<0.05$),而 RhoA, ROCK2 mRNA 相对表达水

平无明显变化($P>0.05$)。与茯苓多糖组比较,茯苓多糖 + Rhosin 组 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 mRNA 相对表达水平显著降低,而茯苓多糖 + LPA 组 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 mRNA 相对表达水平显著升高($P<0.05$)(表 4)。

表 4 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关 mRNA 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	RhoA	ROCK2	NF- κ B p65
假手术组	0.97 \pm 0.16	1.14 \pm 0.18	1.30 \pm 0.20
模型组	3.25 \pm 0.52 *	4.03 \pm 0.67 *	4.26 \pm 0.73 *
茯苓多糖组	2.03 \pm 0.26 Δ	2.61 \pm 0.45 Δ	2.59 \pm 0.43 Δ
茯苓多糖 + Rhosin 组	1.36 \pm 0.19 Δ #	1.74 \pm 0.28 Δ #	1.80 \pm 0.25 Δ #
茯苓多糖 + LPA 组	2.79 \pm 0.43 #	3.53 \pm 0.60 #	3.24 \pm 0.59 Δ #

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$;与茯苓多糖组比较, # $P<0.05$

2.8 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关蛋白相对表达水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 蛋白相对表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,茯苓多糖组和茯苓多糖 + Rhosin 组 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 蛋白相对表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低($P<0.05$);茯苓多糖 + LPA 组 ROCK2, NF- κ B p65 蛋白相对表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低($P<0.05$),而 RhoA 蛋白相对表达水平无明显变化($P>0.05$)。与茯苓多糖组比较,茯苓多糖 + Rhosin 组 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 蛋白相对表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低;茯苓多糖 + LPA 组 RhoA, ROCK2, NF- κ B p65 蛋白相对表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著升高($P<0.05$)(图 4、表 5)。

3 讨论

CIRI 是影响缺血性脑卒中患者预后的关键因

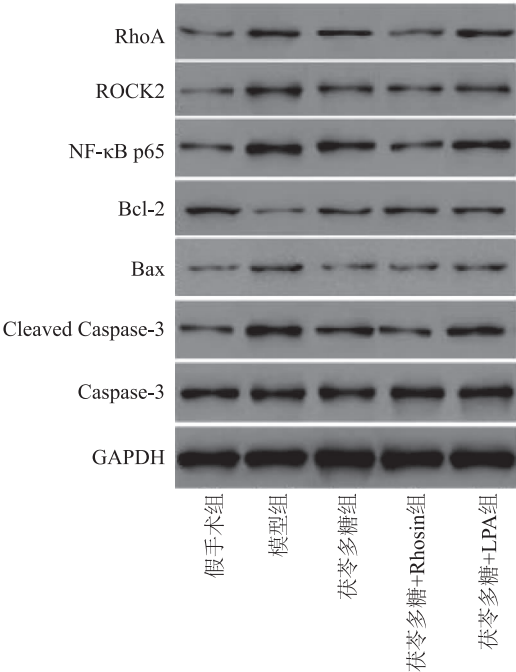


图 4 各组大鼠大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关蛋白表达水平(Western blot 实验)

素,目前尚缺乏特定有效的防治方法,是急需解决的医学难题。本实验采用线栓阻断大脑中动脉2 h的方法制备 CIRI 大鼠模型,该方法具有易操作、损伤小、成功率高、一致性好、与人类临床病理特点接近的优点,是 CIRI 病理及防治药物探索研究的常用造模方法^[17]。本研究结果显示,CIRI 模型大鼠神经功能缺损症状显著,脑含水量升高,大脑皮层呈现神经细胞数量减少、排列紊乱、胞浆固缩、胞体空泡样变、炎性细胞浸润等病理变化,与薛丽等^[18]研究结果一致。茯苓多糖治疗 4 周后可明显改善 CIRI 模型大鼠神经功能缺损症状(显著降低 Longa 评分),降低脑梗死体积和脑含水量,明显改善大脑皮质神经细胞病理变化,说明茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型具有保护作用。

脑缺血及再灌注过程使活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)过量产生,促进炎症因子释放,加剧神经细胞凋亡^[19]。茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型

表 5 茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠大脑皮层 RhoA/ROCK2 信号通路相关蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	RhoA	ROCK2	NF- κ B p65	Bax/Bcl-2	Cleaved Caspase-3/Caspase-3
假手术组	0.10 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.16 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03
模型组	0.37 \pm 0.07 *	0.62 \pm 0.11 *	0.81 \pm 0.16 *	14.29 \pm 2.05 *	1.08 \pm 0.22 *
茯苓多糖组	0.18 \pm 0.03 Δ	0.20 \pm 0.04 Δ	0.57 \pm 0.12 Δ	0.19 \pm 0.04 Δ	0.43 \pm 0.08 Δ
茯苓多糖 + Rhosin 组	0.12 \pm 0.02 Δ #	0.15 \pm 0.03 Δ #	0.19 \pm 0.04 Δ #	0.11 \pm 0.02 Δ #	0.15 \pm 0.03 Δ #
茯苓多糖 + LPA 组	0.32 \pm 0.06 #	0.26 \pm 0.05 Δ #	0.60 \pm 0.13 Δ #	1.03 \pm 0.21 Δ #	0.82 \pm 0.17 Δ #

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$;与茯苓多糖组比较, # $P<0.05$

起到保护作用可能与以下因素有关:①ROS 过量生成导致 SOD, GSH-Px 等被过度消耗而降低机体抗氧化能力, 破坏“ROS 生成-清除”动态平衡, 蓄积的 ROS 将破坏生物膜脂质双分子层以及核酸、DNA 等生物大分子结构, 即氧化应激损伤; MDA 为氧化应激反应的终产物之一, 其水平也能够反映氧化应激损伤程度^[20]。本实验发现, CIRI 模型大鼠大脑皮层 MDA 水平明显升高, SOD 和 GSH-Px 活性明显降低。茯苓多糖抗氧化作用良好, 可明显降低 CIRI 模型大鼠大脑皮层 MDA 水平并提高 SOD, GSH-Px 活性, 说明茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型的保护作用可能与抑制氧化应激有关。这与胡高峰等^[21]报道的结果相似; ②脑组织受损后中性粒细胞、淋巴细胞等向损伤部位聚集并分泌炎症因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等, 引发炎症反应, 并且 TNF- α , IL-1 β 可促进炎症浸润而加重炎症损伤^[22]。本实验发现, CIRI 模型大鼠大脑皮层 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平明显升高。茯苓多糖具有抗炎作用, 能够明显降低 CIRI 模型大鼠大脑皮层 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平, 说明茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型的保护作用可能与抑制炎症反应有关。这与李艳等^[23]报道相似; ③缺血半暗带神经细胞继发性凋亡是 CIRI 进行性加重的重要原因。Cleaved Caspase-3 可破坏结构蛋白、核蛋白等, 剪切 DNA 并抑制其修复, 进而促进细胞凋亡, 因此 Cleaved Caspase-3 被认为是细胞凋亡的核心调控因子^[24]。本实验发现, CIRI 模型大鼠大脑皮层神经细胞凋亡指数明显升高, Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达水平明显升高。茯苓多糖能够明显减少 CIRI 模型大鼠大脑皮层神经细胞凋亡, 降低 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达水平, 说明茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型的保护作用可能与抑制神经细胞凋亡有关。

RhoA/ROCK 信号通路通过影响下游蛋白表达而参与机体炎症、氧化应激及细胞凋亡的调控。有文献报道下调 RhoA/ROCK2 信号通路可减轻 CIRI 模型大鼠炎症反应和神经细胞凋亡^[7-8]。炎症调控因子 NF- κ B 和参与细胞凋亡调控的 Bcl-2 家族蛋白 (Bcl-2, Bax) 均为 ROCK 下游靶蛋白^[26-27]。NF- κ B 以 p50 和 p65 组成的异二聚体形式存在, 入核后 p65 亚基 C 末端核定位区域与 DNA 结合, 进而促进 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等炎症因子转录表达^[28]。Bax 可形成同源二聚体“Bax-Bax”, 也可与 Bcl-2 形成异二聚体“Bax-Bcl-2”。“Bax-Bax”定位

于线粒体膜而形成高度开放的线粒体膜孔道, 导致细胞色素 C 等线粒体内容物异常释放进入细胞质, 而细胞色素 C 可剪切 Caspase-3 使其活化, 进而诱导细胞凋亡, 而“Bax-Bcl-2”则不具备上述生理作用, 因此 Bax/Bcl-2 可反映二者对细胞凋亡所起到的作用^[29-30]。本实验发现, CIRI 模型大鼠大脑皮质 RhoA, ROCK1, NF- κ B p65 mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高, Bax/Bcl-2 和 Cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达水平比值明显升高; 茯苓多糖能够明显降低 CIRI 模型大鼠大脑皮质 RhoA, ROCK1, NF- κ B p65 mRNA 和蛋白相对表达水平, 明显降低 Bax/Bcl-2 和 Cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达水平比值, 说明下调 RhoA/ROCK2 信号通路可能是茯苓多糖对 CIRI 模型大鼠起到保护作用的重要分子机制。本实验设置了茯苓多糖 + RhoA 抑制剂 Rhosin 组和茯苓多糖 + RhoA 激动剂 LPA 组, 实验结果显示茯苓多糖 + Rhosin 组对 CIRI 模型大鼠神经功能、脑梗死体积、脑含水量、炎症反应、氧化应激及 RhoA/ROCK2 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达的调控作用明显优于茯苓多糖组, 而茯苓多糖 + LPA 组对 CIRI 模型大鼠各指标的调控作用明显弱于茯苓多糖组, 从而佐证了茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型起到保护作用与下调 RhoA/ROCK2 信号通路有关的推论。

综上所述, 茯苓多糖对大鼠 CIRI 模型具有保护作用, 其机制可能与下调 RhoA/ROCK2 信号通路而减轻炎症反应、氧化应激、细胞凋亡有关。本研究结果为茯苓多糖用作 CIRI 治疗备选药物提供了理论依据, 但其作用机制仍需要深入研究。

参 考 文 献

- [1] 李雅楠, 李思博, 白月, 等. 芒果花素磺酸钠调控线粒体凋亡通路改善脑缺血再灌注损伤的研究[J]. 中草药, 2024, 55(11): 3759-3767.
- [2] Zhang HC, Feng Y, Si YF, et al. Shank3 ameliorates neuronal injury after cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting oxidative stress and inflammation[J]. Redox Biol, 2024, 69: 102983.
- [3] 库亚萍, 张丽, 李冰, 等. 川蛭通络胶囊通过抑制神经炎症和氧化应激治疗小鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12): 3386-3391.
- [4] Zhao YL, Xu JF. Sanggenon C ameliorates cerebral Ischemia-Reperfusion injury by inhibiting inflammation and oxidative stress through regulating RhoA-ROCK signaling[J]. Inflammation, 2020, 43(4): 1476-1487.
- [5] Wang T, Li N, Yuan LL, et al. MALAT1/miR-185-5p mediated high glucose-induced oxidative stress, mitochondrial injury and cardiomyocyte apoptosis via the RhoA/ROCK pathway [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(17): 2495-2506.

[6] 曾佩芸,张琦,钱子冰,等. RhoA/ROCK 途径在糖尿病相关疾病中的研究进展[J]. 海南医学院学报,2021,27(5):391-395,400.

[7] 李秋菊,隋航,房金妮,等. 溶血磷脂酸调控 RhoA/ROCK2 信号通路对大鼠脑缺血再灌注后的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2022,21(9):897-901.

[8] 鄢圣娟,王兆薇,田亮,等. 异丙酚介导的 RhoA/ROCK2 信号通路对脑缺血再灌注后神经炎症、细胞凋亡和脑梗死的作用[J]. 卒中与神经疾病,2021,28(1):14-19.

[9] Wu Y, Li D, Wang H, et al. Protective effect of *poria cocos* polysaccharides on fecal peritonitis-induced sepsis in mice through inhibition of oxidative stress, inflammation, apoptosis, and reduction of Treg cells[J]. *Front Microbiol*,2022,13:887949.

[10] 梁静,陈汉仁,毛敏芸,等. 茯苓多糖对癫痫大鼠海马神经细胞凋亡及 Nrf2ARE 信号通路的影响[J]. 河北医药,2023,45(2):194-197.

[11] 谢骏,王媛媛,李聚鑫,等. 茯苓多糖调控 Rho-ROCK 信号通路对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响和机制研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(23):6434-6441.

[12] 高贵珍,吴超,单玲玲,等. 硫酸化茯苓多糖对帕金森模型鼠脑组织抗氧化能力的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2016,21(4):384-388.

[13] 曾奇,吴雅晨,胡茂华,等. 淫羊藿苷调控 NLRP3 炎症小体抗脑缺血再灌注损伤机制[J]. 中国实验动物学报,2024,32(1):25-32.

[14] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*,1989,20(1):84-91.

[15] 李艳,刘琼,黄萱,等. 芦丁对慢性脑低灌注大鼠海马组织神经元损伤及 RhoA/ROCK 信号通路的影响[J]. 天津医药,2022,50(12):1270-1276.

[16] 张涛,毛治尉,豆倩云,等. 基于 RhoA/ROCK 通路探讨赤芍总苷对心肌梗死大鼠心肌凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(5):1138-1142.

[17] 杨海永,王渊,李永丰,等. 局灶性脑缺血动物模型制备方法研究进展与评述[J]. 中华中医药杂志,2023,38(12):5933-5936.

[18] 薛丽,韩红,张力. 桑黄素通过抑制 TXNIP/NLRP3/Caspase-1 信号通路对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡的影响[J]. 天津医药,2023,51(5):487-491.

[19] Zhou XY, Wang ZL, Xu BC, et al. Long non-coding RNA NO-RAD protects against cerebral ischemia/reperfusion injury induced brain damage, cell apoptosis, oxidative stress and inflammation by regulating miR-30a-5p/YWHAG [J]. *Bioengineered*,2021,12(2):9174-9188.

[20] Huang D, Awad ACA, Tang C, et al. Demethylnobiletin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*,2024,39(3):1335-1349.

[21] 胡高峰,程魁红,黄贤芬,等. 雷公藤红素通过抑制氧化应激对脑缺血再灌注损伤的保护研究[J]. 赣南医学院学报,2018,38(10):968-971,984.

[22] 王冬敬,于海洋,上官玲艳,等. 芹菜素通过调节肺炎链球菌脑膜炎大鼠模型中 MyD88/NF-KB 信号通路抑制脑组织细胞凋亡和炎症[J]. 免疫学杂志,2023,39(2):142-148.

[23] 李艳,苗明三. 基于炎症反应探讨益母草对脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 时珍国医国药,2023,34(6):1340-1344.

[24] Michaely LM, Rissmann M, Armando F, et al. Rift valley fever virus Non-Structural protein S is associated with nuclear translocation of active caspase-3 and inclusion body formation [J]. *Viruses*,2022,14(11):2487.

[25] Hu Z, Lai Y, Ma C, et al. Cordyceps militaris extract induces apoptosis and pyroptosis via caspase-3/PARP/GSDME pathways in A549 cell line [J]. *Food Sci Nutr*,2021,10(1):21-38.

[26] Liang JQ, Zeng XW, Halifu YLN, et al. Blocking RhoA/ROCK inhibits the pathogenesis of pemphigus vulgaris by suppressing oxidative stress and apoptosis through TAK1/NOD2-mediated NF- κ B pathway [J]. *Mol Cell Biochem*,2017,436(1/2):151-158.

[27] 姜卫星,索成云,王亚博. 白芍总苷调节 RhoA/ROCK1 信号通路对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. 现代药物与临床,2024,39(6):1375-1383.

[28] 刘宗梅,王晓玲,宋发萍,等. 基于 NF- κ B 通路研究平肝活血合剂对脑缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 中南药学,2024,22(4):902-907.

[29] Cheng G, Xue YY, Fang F, et al. Promotion of Ros-mediated Bax/Cyt-c apoptosis by polyphyllin II leads to suppress growth and aggression of glioma cells [J]. *Transl Cancer Res*,2021,10(9):3894-3905.

[30] Wang J, Zhang M, Huang X, et al. Multiproperty polyethylenimine-caged Platinum nanoclusters promote apoptosis of osteosarcoma cells via regulating the Bax-Bcl-2/Caspase-3/PARP axis [J]. *Mol Pharm*,2023,20(11):5607-5615.

(2024-06-22 收稿)

• 消 息 •

2025 年《卒中与神经疾病》征订启事

《卒中与神经疾病》为中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,是全国各地广大医务工作者,特别是从事神经内科临床和科学研究工作人员,切磋技艺、交流学术经验和更新知识的园地。辟有论著与学术交流、短篇与病例报告、综述、述评、专题讲座、专刊评价、临床药物治疗、会议(座谈)纪要、临床病理(病例)讨论、技术信息、新药新仪器、新书介绍以及国内外学术动态报道等多个栏目,欢迎您向当地邮局或本刊编辑部订阅(邮发代号:38-305,订价:20 元/册,年订价:120 元)。地址:430060 武汉市武昌区张之洞路 9 号《卒中与神经疾病》编辑部,业务联系人:吴国祥,联系电话:(027)88138803,帐号:557379073786,开户行:中国银行紫阳路支行,开户名:卒中与神经疾病。