

菸花昔长期给药对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的影响

冯一帆, 严啸东, 张文彬, 李炳锋, 郭美丽

Effects of long-term administration of nicotiflorin on neurological function in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

FENG Yifan, YAN Xiaodong, ZHANG Wenbin, LI Bingfeng, GUO Meili

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202407038>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

Study on the pharmacological effects and mechanism of Gegen-Zhimu herb pair in preventing and treating Alzheimer's disease by UHPLC-Q/TOF-MS metabolomics strategy

药学实践与服务. 2025, 43(1): 30-40 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202409035](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202409035)

黄芪甲苷衍生物治疗慢性心力衰竭小鼠的药效评价及作用机制研究

Efficacy and mechanism of astragaloside IV derivatives on chronic heart failure in mice

药学实践与服务. 2024, 42(5): 190-197 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202310004](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202310004)

负载骨髓间充质干细胞/白藜芦醇脂质体的水凝胶支架治疗创伤性脑损伤的研究

Hydrogel scaffolds loaded with bone marrow mesenchymal stem cells/resveratrol liposomes for traumatic brain injury treatment

药学实践与服务. 2025, 43(2): 67-74 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202406034](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202406034)

巴戟天丸组方对A β 损伤成骨细胞的作用及基于网络药理学的机制研究

The roles of Bajitianwan formula on A β -injured osteoblasts and the mechanism based on network pharmacology

药学实践与服务. 2024, 42(7): 285-290, 296 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202305011](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202305011)

肝素钠肌醇烟酸酯乳膏中肌醇烟酸酯皮肤药动学研究

Skin pharmacokinetics of inositol nicotinate in heparin sodium inositol nicotinate cream

药学实践与服务. 2025, 43(1): 6-9, 21 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404006](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404006)

七味脂肝方对非酒精性脂肪性肝炎动物模型的药效学评价

Pharmacodynamic effects of Qiwei Zhigan prescription on non-alcoholic steatohepatitis in animal model

药学实践与服务. 2024, 42(9): 389-398 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404096](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404096)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

菸花昔长期给药对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的影响

冯一帆¹, 严啸东¹, 张文彬^{1,2}, 李炳锋¹, 郭美丽¹ (1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 武警某部机动第九支队, 甘肃 平凉 744000)

[摘要] 目的 探讨菸花昔长期给药对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠神经功能恢复的促进作用。方法 建立 CIRI 模型, 梗阻 1 h 后腹腔注射给药, 持续给药 8 周, 并在第 2、4、8 周进行悬尾偏转实验、平衡木实验及水迷宫实验, 8 周后 TTC 染色观察脑梗死萎缩体积, 用转录组测序筛选差异基因(DEGs)并分析富集通路, 采用 Western-blot 法和 ELISA 法对细胞焦亡相关蛋白及炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 进行了测定。结果 菸花昔长期给药能显著降低 CIRI 大鼠的对侧偏转率和平衡木实验评分, 提高水迷宫实验中的穿台次数($P<0.05$), 减小脑梗死萎缩体积($P<0.01$), 对大鼠神经功能的恢复有明显促进作用。转录组测序发现, 菸花昔组大鼠脑组织中细胞焦亡相关信号通路中的基因表达显著下调($P<0.05$), Western-blot 和 ELISA 实验显示, 菸花昔降低了 caspase-1、GSDMD-N 等焦亡相关蛋白的表达水平, 同时, 炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的释放量明显降低($P<0.05$), 表明菸花昔能够抑制细胞焦亡这一炎性过程。结论 菸花昔对 CIRI 大鼠神经功能恢复具有长期促进作用, 该作用可能与菸花昔能够抑制细胞焦亡有关。

[关键词] 菸花昔; 脑缺血再灌注; 转录组学; 细胞焦亡; 长期功能恢复

[文章编号] 2097-2024(2025)00-0001-07 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202407038

Effects of long-term administration of nicotiflorin on neurological function in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

FENG Yifan¹, YAN Xiaodong¹, ZHANG Wenbin^{1,2}, LI Bingfeng¹, GUO Meili¹ (1. Department of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Mobile Ninth Detachment of a certain Armed Police Force, Pingliang 744000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the promoting effect of long-term administration of nicotiflorin on the recovery of neurological function in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **Methods** The CIRI model was established and nicotiflorin was injected intraperitoneally after 1 hour of obstruction for 8 weeks. Tail suspension deflection experiment, balance beam experiment and water maze test were performed in the 2nd, 4th and 8th weeks. After 8 weeks, TTC staining was used to observe the volume of infarct atrophy, transcriptome sequencing was employed to screen differential expressed genes (DEGs) and highly enriched pathways were analyzed, Western-blotting and ELISA were used to assess proteins expression related to the pyroptosis pathway and inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18. **Results** By long-term administration of nicotiflorin, the contralateral deflection rate were significantly reduced and beam experiment score of CIRI rats was balanced, the number of crossing the platform in water maze test was increased ($P<0.05$), the volume of cerebral infarction atrophy was decreased ($P<0.01$), which significantly promoted the recovery of neurological function in rats. Transcriptome sequencing found that the expression of genes in the pyroptosis-related signaling pathways in the brain tissue of rats in the nicotiflorin group was significantly down-regulated ($P<0.05$). Western-blot and ELISA experiments showed that nicotiflorin reduced the expression levels of caspase-1 and GSDMD-N and other pyroptosis-related proteins, and at the same time, the release of inflammatory factors IL-1 β and IL-18 was significantly reduced ($P<0.05$), indicating that nicotiflorin could inhibit the inflammatory process of pyroptosis. **Conclusion** Nicotiflorin exhibited a significant long-term promotion effect on the recovery of neurological function in CIRI rats, which potentially attributed to its ability to inhibit pyroptosis.

[Key words] nicotiflorin; cerebral ischemia-reperfusion; transcriptomics; pyroptosis; long-term functional recovery

[基金项目] 国家科技重大专项(2009ZX09102-131)

[作者简介] 冯一帆, 硕士研究生, Tel: (021)81871302, Email: feng614@smmu.edu.cn

[通信作者] 郭美丽, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药资源及药理机制, Email: mlguo@126.com

脑卒中是当前国内首位致死致残疾病, 其中缺血性脑卒中占有所有卒中的 70%^[1], 严重危害人民身体健康。缺血性脑卒中发生后尽可能快的实现缺血半暗带再灌注是治疗的关键^[2], 但再灌注会使缺血半暗带区域形成强烈的免疫激活和炎症损伤^[3],

可能导致缺血性脑卒中急性损伤期的二次伤害并在远期预后上增加功能恢复难度^[4]。日本学者研究显示,血管内治疗后仅有约 1/7 的患者有较好的 90 天预后^[5],在我国接受再灌注治疗的患者仍有约 1/3 会留有终身残疾^[6],因此对脑卒中后神经保护药物的研究显得越来越重要^[7]。大量研究表明,神经保护药可通过多种途径抑制致病级联反应达到急性期治疗效果,如尼莫地平、依达拉奉等^[8];也可以在长期治疗和功能恢复中发挥重要作用,包括一些“老药”新用,如右美托咪定、半胱氨酰白三烯受体拮抗剂等^[9],特别是一些活血化瘀功效中药组方及成分,如灯盏生脉胶囊、白果内酯等的研究都取得了一定的进展^[10]。课题组前期研究发现:中药红花(Carthami Flos)中的黄酮类化合物茛菪花苷能够通过促进自噬、抗氧化等对 CIRI 动物发挥急性期治疗效果^[11,12],同时茛菪花苷长期给药可改善 CIRI 大鼠生存状态^[13],但到目前为止,茛菪花苷发挥长期保护作用的机制尚不明确。作为延续性工作,本实验重点研究了茛菪花苷长期给药对 CIRI 大鼠神经功能的影响,并运用转录组测序等方法对其作用机制进行了初步探索,旨在为将茛菪花苷应用于促进 CIRI 大鼠神经功能恢复提供更多实验支撑,也为从传统活血化瘀中药中开发神经保护药物提供借鉴。

1 材料

1.1 实验动物

成年雄性 Wistar 大鼠,体重 240±10 g,购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部,许可证号为 SCXK(沪)2018-0006。大鼠购入后于学校药理学系 SPF 级动物房内饲养,自由食水,人工照明模拟昼夜变化。实验操作严格遵守动物福利和伦理原则。

1.2 药品和试剂

茛菪花苷注射液和茛菪花苷空白对照制剂由苏中药业集团股份有限公司生产加工(批号:20200331),茛菪花苷含量 10 mg/ml。Caspase-1 多克隆抗体(22915-1-AP)、GSDMD 多克隆抗体(20770-1-AP)、NLRP3 单克隆抗体(68102-1-Ig)、ASC 多克隆抗体(10500-1-AP)均购于武汉三鹰生物科技有限公司,重组 Anti-Caspase-11 抗体(EPR18628)购于 Abcam 公司,IL-18 多克隆抗体(AF5207)购于碧云天生物科技有限公司。

1.3 仪器设备

直钳、齿镊、线剪等手术器材(上海医疗器械有限公司);MCAO 线栓(250 ~ 280 g,北京西浓科

技有限公司);平衡木装置(江苏赛昂斯生物科技有限公司);Morris 水迷宫泳池及站台(上海玉研科学仪器有限公司);高速冷冻离心机(3H16RI,湖南赫西仪器装备有限公司);扫膜仪(Tanon-5200,上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

大鼠饲养至体重 270±15 g,采用随机数字表法将大鼠随机分为 3 组:其中模型组(M)和茛菪花苷组(Y)大鼠进行 CIRI 模型的建立,而假手术组(S)大鼠则无脑部损伤。造模后 1 h,茛菪花苷组腹腔注射茛菪花苷注射液 1 ml/kg^[14],模型组与假手术组腹腔注射茛菪花苷注射液空白对照制剂 1 ml/kg,造模后常规饲养并在固定时间给药,第 1 周 1 次/日,1 周后 1 次/2 日持续至实验周期结束。

2.2 造模方法

采用 MCAO/R 法进行模型制备,参考文献并进行一定改进^[15],具体方法如下:术前 4 h 禁食水,用 1% 戊巴比妥钠(4 ml/kg,生理盐水配制)腹腔注射麻醉。手术部位常规备皮消毒,仰卧位,将大鼠四肢与前牙用皮筋固定于手术台板。沿颈部正中中线作 2 cm 纵行切口,从气管偏右侧(大鼠的左侧)沿肌纤维走行向下分离,至颜色深红且明显搏动的左颈总动脉,沿该血管向上至颈总动脉分叉,近气管侧为颈外动脉,另一侧即为线栓需要进入的颈内动脉。在距分叉 1.5 cm 处结扎左颈总动脉近心端,用动脉夹锁闭颈内动脉及颈外动脉近心端。用眼科剪在颈总动脉近心端距分叉口 1 cm 处剪一斜行小口,将线栓插入左颈总动脉,用缝合线略微固定于颈总动脉,撤掉颈内动脉近心端动脉夹,将线栓缓慢深入颈内动脉直至明显阻力时停止深入(18 ~ 20 mm),撤掉颈外动脉近心端动脉夹并将固定线栓的缝合线牢固打结,逐层缝合结缔组织和皮肤。术后将大鼠放于保温垫上保持其体温至苏醒放入笼中,术后 1 h 根据分组腹腔注射给药,待大鼠完全苏醒后观察大鼠右前肢无法完全伸展,且大鼠行走时向右侧倾倒或前进时向右侧转圈,此即标志造模成功。术后 2 h 使用初次剂量 1/3 的 1% 戊巴比妥钠进行二次麻醉,将线栓向外抽出 1.5 cm 形成大脑缺血再灌注损伤。假手术组仅分离血管,不插入线栓。

2.3 悬尾偏转实验

在第 2、4、8 周进行 3 轮悬尾偏转实验^[16]。将大鼠尾中段处固定在距地面垂直高度 30 cm 的实

验架上,分别记录大鼠头部及躯干向左、右两侧偏转的次数,偏离中轴线 10° 以上计为偏转1次,每轮实验记录10次。正常大鼠会随机向左侧或者右侧进行偏转并试图攀爬,而CIRI大鼠由于一侧肢体的偏瘫及肌力减弱,向另一侧进行偏转的几率会大大提高。

2.4 平衡木实验

在第2、4、8周进行3轮平衡木实验^[17]。取长2 m、宽2.5 cm、距地面高度50 cm的木条为平衡木,一端为大鼠躲避处放置黑色方盒,另一端为大鼠起步处。每轮实验测试前每只大鼠训练3次,每次间隔2小时;训练完毕后观察大鼠从起步处经过平衡木进入躲避处的过程,记录大鼠通过平衡木的情况并按以下标准进行打分。

平衡木评分标准	得分
通过平衡木,无踩空、跌倒	0分
通过平衡木,踩空、跌倒机会小于50%	1分
通过平衡木,踩空、跌倒机会大于50%	2分
通过平衡木,对侧下肢出现拖行	3分
不能通过平衡木,但能保持平衡不摔落	4分
不能在平衡木上保持平衡,伴有摔落	5分

2.5 水迷宫实验

由同一名操作人员在第2、4、8周进行3轮水迷宫实验^[18]。本实验使用直径1.8 m的圆形水池,水温 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,站台为高0.4 m、直径12 cm的圆形板,水深约0.43 m,即水位高度超过站台平面约3 cm,并在池壁四个方位上方1 m高处悬挂显著的远距离视觉参照物。每轮前5天站台放于池中固定位置,大鼠入水后找寻并记忆站台位置,第6天撤掉站台进行空间探索实验测试大鼠的空间记忆能力,记录大鼠在90 s内穿过之前站台位置的次数。

2.6 脑形态及TTC染色

8周后脱颈处死大鼠,断头取脑,吸除表面水分后将脑组织冷冻硬化,切除嗅球、脑干、小脑等部位,将大脑切成厚度均等的6片,放入2% TTC染液 37°C 水浴染色10 min,4%多聚甲醛溶液固定5 min后拍照,白色或缺如则计为梗死萎缩区,正常组织显示为红色部分。利用ImageJ软件进行图像处理,按公式计算梗死萎缩区体积百分比= $[(\text{患侧梗死体积}+\text{萎缩体积})/(\text{健侧半脑体积})]\times 100\%$,其中萎缩体积=健侧半脑体积-患侧半脑体积。

2.7 转录组测序

造模8周后,提取总RNA,在RNA总量超过 $1\mu\text{g}$ 的基础上,以浓度超过 $35\text{ ng}/\mu\text{l}$ 的标准,进行库的

建立,并确保 $\text{OD } 260/280\geq 1.8$, $\text{OD } 260/230\geq 1.0$ 。分离所需的mRNA后加入碎片缓冲液,使mRNA随机分裂为300bp的小片段。反转录合成cDNA,利用PCR技术扩增15 cycles,2%琼脂糖胶回收目的条带并进行精确定量,借助cBot系统通过大规模分子簇的方式达到荧光信号检测强度,IlluminaNovaseq6000平台测序,读长控制在 $2\times 150\text{ bp}$ 。对所得数据库数据进行筛选过滤,基因差异表达分析。

2.8 蛋白印迹法测定

采用Western-blot法检测各组大鼠脑组织缺血半暗带中Caspase-1、Caspase-11、GSDMD-N、NLRP3、ASC、IL-18蛋白表达。参考相关文献取缺血半暗带区域作为样品^[19],取适量样品加入RIPA裂解液进行研磨裂解, $12\ 000\text{ r}/\text{min}$ 、 4°C 离心取上清液,BCA法定量蛋白浓度,浓度均一化后进行蛋白变性作为待测样品。经电泳、转膜、漂洗、封闭、漂洗,一抗(Caspase-1,1:10 000、Caspase-11,1:4 000、GSDMD,1:800、NLRP3,1:800、ASC,1:10 000、IL-18,1:1 000、GAPDH,1:15 000) 4°C 孵育16 h,漂洗后二抗(1:15 000) 25°C 孵育1 h,再次漂洗后加入ECL发光液,在凝胶成像分析系统中成像。

2.9 炎症因子测定

取大鼠脑组织10 mg加入适量PBS溶液,研磨后低温离心取上清液,按照ELISA试剂盒说明书配置梯度浓度标准品溶液,按顺序滴加样品及各反应液,显色反应终止后,使用酶标仪测定450 nm处OD值,根据标准曲线计算各样品IL-1 β 、IL-18浓度。

2.10 统计学处理

应用ImageJ软件对脑组织TTC切片的照片、Western-blot图片进行图像处理,统计学分析及数据处理使用GraphPad Prism 8.0.1进行。实验数据采用 $(\bar{x}\pm\text{SE})$ 表示,大鼠神经行为学数据使用双因素方差分析,TTC切片及Western-blot数据应用单因素方差分析方法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 菸花昔对CIRI大鼠神经功能的影响

在第2、4、8周对大鼠的神经功能进行多角度评价,其中悬尾偏转实验中模型组大鼠的对侧偏转率明显高于菸花昔组($P<0.000\ 1$)(图1A);平衡木实验中模型组大鼠的评分始终高于菸花昔组($P<0.05$)(图1B);水迷宫实验中模型组大鼠90 s时间

内穿台次数明显少于菸花昔组($P<0.05$)(图 1C)。以上实验显示菸花昔长期给药能够一定程度上改

善 CIRI 大鼠的偏瘫及肌力减弱情况,提高肢体平衡性、空间学习和记忆能力。

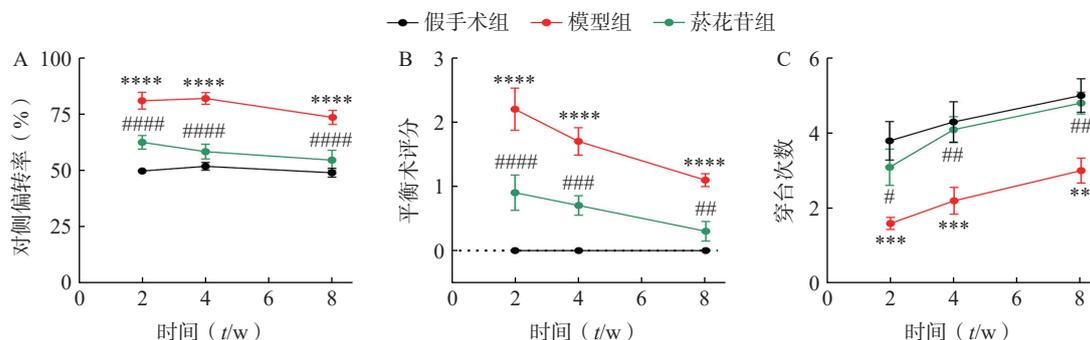


图 1 造模后第 2、4、8 周大鼠神经功能评价

A.大鼠悬尾垂吊实验中大鼠对侧偏转率;B.大鼠在平衡木实验中评分;C.大鼠水迷宫实验中 90 s 内通过原站台位置的次数 n=10; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$,与假手术组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$,与模型组比较。

3.2 菸花昔对 CIRI 大鼠脑梗死萎缩体积的影响

TTC 染色显示模型组大鼠脑组织明显变小且左侧萎缩缺如体积超 60%($P<0.01$);菸花昔组大鼠脑梗死萎缩体积同模型组相比减少约 25%($P<$

0.01)(图 2A、2B、2C)。提示 CIRI 长期发展会导致大鼠脑组织梗死萎缩,菸花昔长期给药能减轻大鼠脑组织梗死萎缩状况。

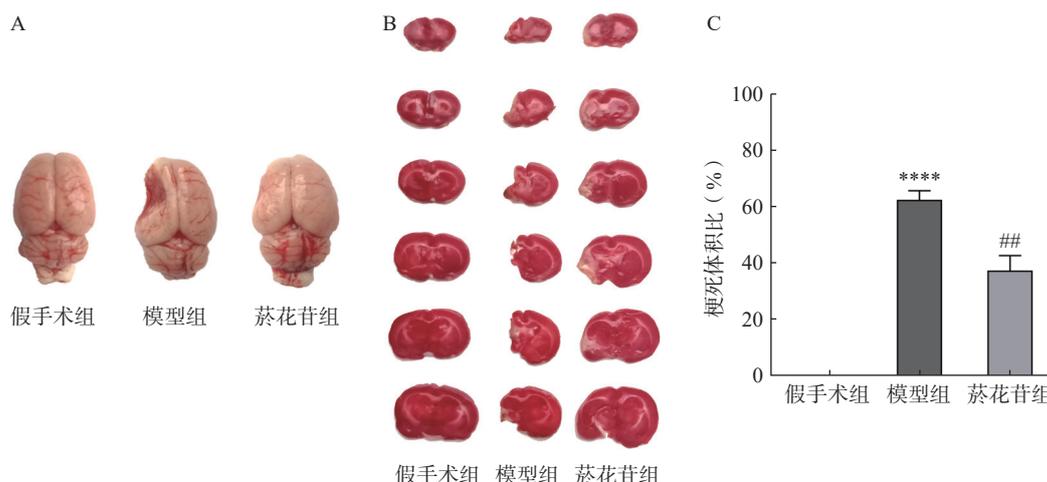


图 2 造模 8 周后大鼠脑组织外观

A.大鼠完整脑组织外观形态图;B.大鼠大脑切片 TTC 染色图;C.大鼠脑组织梗死体积 n=6; **** $P<0.0001$,与假手术组比较; ## $P<0.01$,与模型组比较。

3.3 转录组测序结果

以总表达量为基础,利用 TPM 进行数据分析,以 $|\log_2fc|>1$, $p_{adjust}<0.05$ 为显著差异标准,统计分析组间的差异基因(DEGs)。模型组对假手术组 DEGs 2816 个,其中上调 1900 个,下调 916 个;菸花昔组对模型组 DEGs 1546 个,其中上调 343 个,下调 1203 个;具有反转效应的 DEGs 1416 个,其中上调 290 个,下调 1126 个(图 3A、3B)。

分析 1416 个反转效应 DEGs,基因数在前 20 位的 GO 功能注释条目与生物学过程(BP)和细胞组成(CC)相关的基因较多,主要参与生物调节、细胞过程、细胞组分(图 3C)。通过 KEGG 功能富

集分析,发现 1416 个 DEGs 主要富集在 NOD 样受体信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、Toll 样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等通路中(图 3D),其中 NOD 样受体信号通路是显著性最高的信号通路,参与细胞炎症、细胞死亡过程的重要通路之一。

如表 1 所示, NOD 样受体信号通路中 GSDMD、IL-18、NLRP3 等基因富集度较高,而这些基因在细胞焦亡过程均有参与,结合图 3A 中所标注的焦亡相关基因表达情况,推测脑缺血再灌注损伤可能与细胞焦亡有关,且菸花昔可能对细胞焦亡过程产生一定的抑制作用。

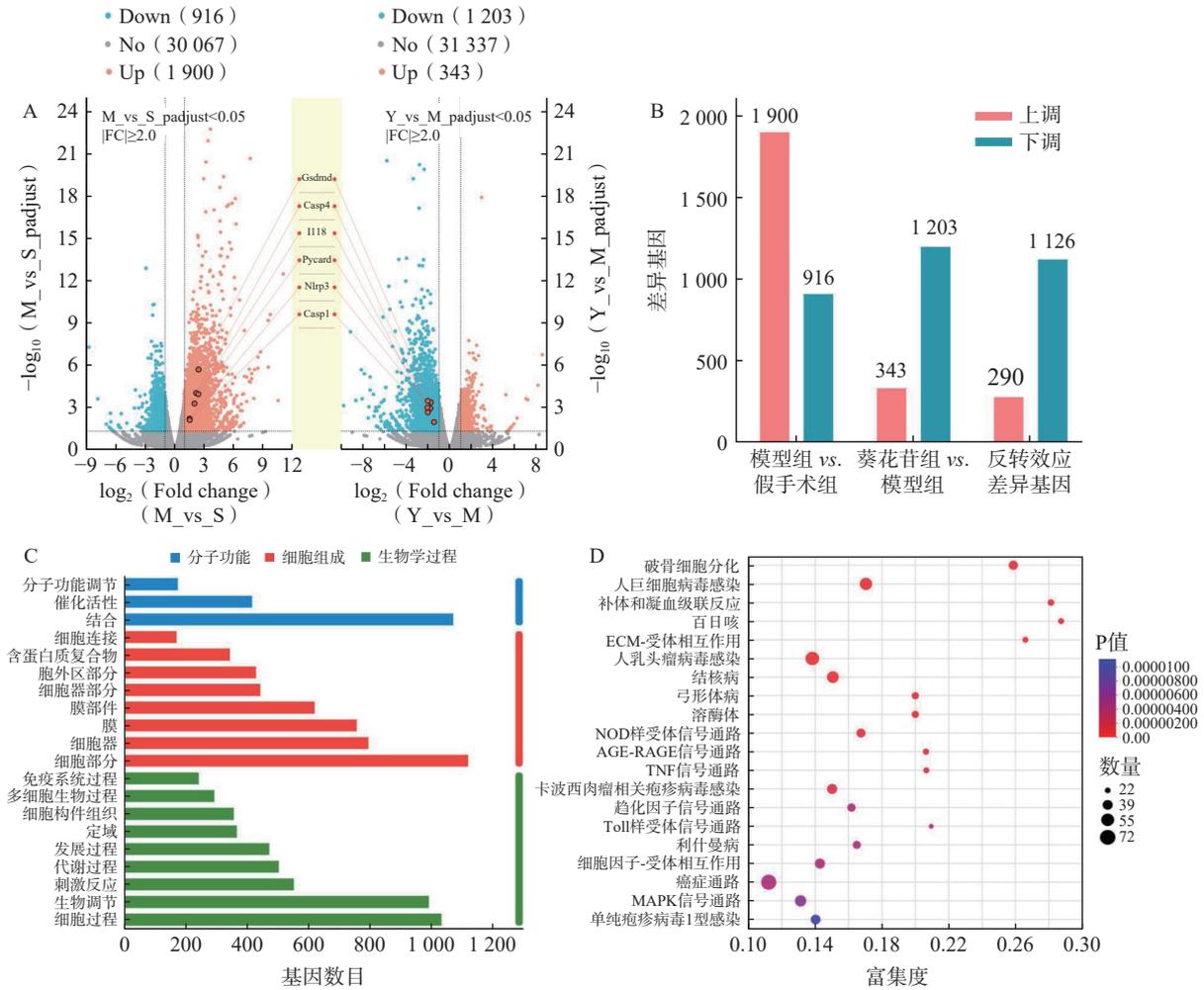


图3 转录组测序组间 DEGs

A. DEGs 火山图; B. 上调和下调 DEGs 数量统计图; C. DEGs GO 功能注释柱状图; D. DEGs KEGG 功能富集气泡图

表1 莼花苷治疗 CIRI 大鼠 KEGG 筛选的通路和富集基因

通路名称	通路显著性(P值)	富集基因
NOD样受体信号通路	6.05×10^{-7}	NF- κ B、IL-18、Caspase8 NLRP3、GSDMD、Caspase4
肿瘤坏死因子受体信号通路	1.12×10^{-6}	NF- κ B、p38、Bcl3、TNFR1、 TNFR2、Ccl2、Caspase8
Toll样受体信号通路	3.66×10^{-6}	NF- κ B、p38、Caspase8 TLR3、TLR4、TLR7
丝裂原活化蛋白激酶信号通路	5.73×10^{-6}	NF- κ B、P38、TNFR、IL-1R

3.4 莼花苷对 CIRI 大鼠焦亡相关蛋白的影响

根据转录组数据结果,采用 Western-blot 方法检测脑缺血半暗带中 Caspase-1、Caspase-11、GSDMD-N、NLRP3、ASC、IL-18 蛋白的表达情况(ASC 的基因型为 PYCARD, Caspase-11 与 Caspase-4 同源)。结果显示模型组表达水平显著高于假手术组 ($P < 0.01$), 莼花苷组显著低于模型组 ($P < 0.05$) (图 4)。提示莼花苷长期给药能够降低 CIRI 大鼠细胞焦亡相关蛋白的表达量。

3.5 莼花苷对 CIRI 大鼠 IL-1 β 、IL-18 的影响

利用 ELISA 法对炎症因子 IL-1 β 、IL-18 进行

了测定,结果显示模型组 IL-1 β 、IL-18 释放量相较于假手术组明显增加 ($P < 0.001$), 莼花苷组 IL-1 β 、IL-18 释放量比模型组明显降低 ($P < 0.05$)。表明莼花苷能够抑制因 CIRI 导致的脑组织炎症因子 IL-1 β 、IL-18 释放量升高。

4 讨论

目前神经保护药物的实验研究更多集中于缺血性脑卒中的急性损伤期治疗,对缺血性脑卒中中长期治疗和慢性恢复的研究相对较少^[20]。本实验以莼花苷对 CIRI 大鼠的长期治疗和恢复研究为

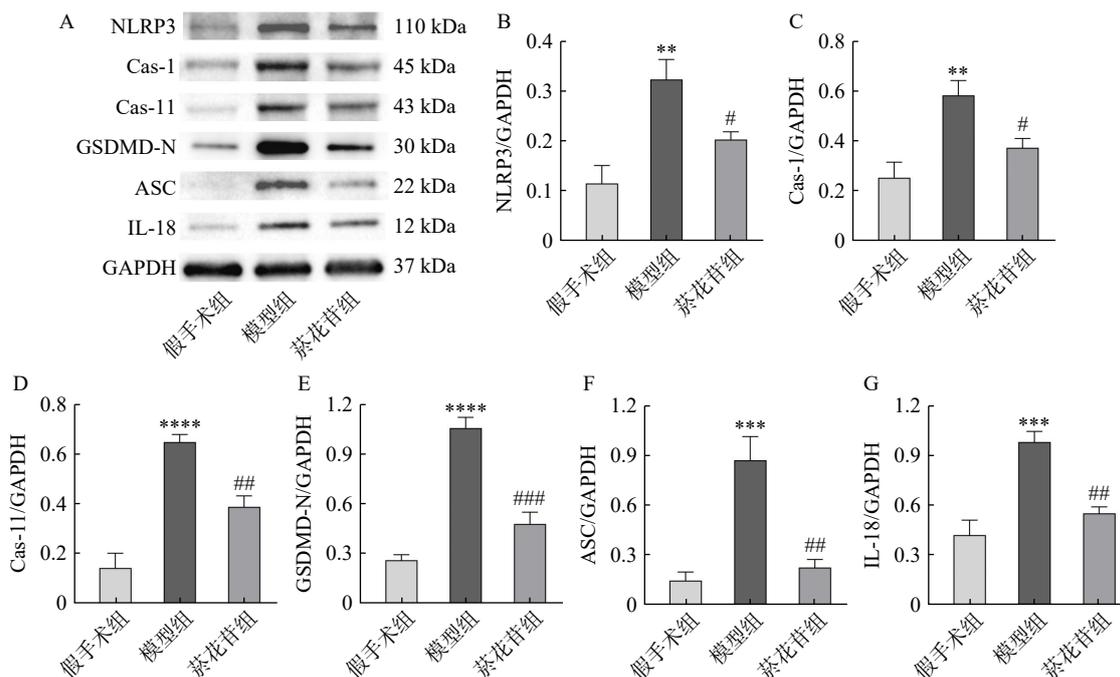


图4 大鼠脑组织焦亡相关蛋白表达情况

A.NLRP3、Caspase-1、Caspase-11、GSDMD-N、ASC、IL-18 蛋白条带; B.NLRP3 蛋白相对表达量; C.Cas-1 蛋白相对表达量; D.Cas-11 蛋白相对表达量; E.GSDMD-N 蛋白相对表达量; F.ASC 蛋白相对表达量; G.IL-18 蛋白相对表达量
n=4; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与假手术组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 与模型组比较。

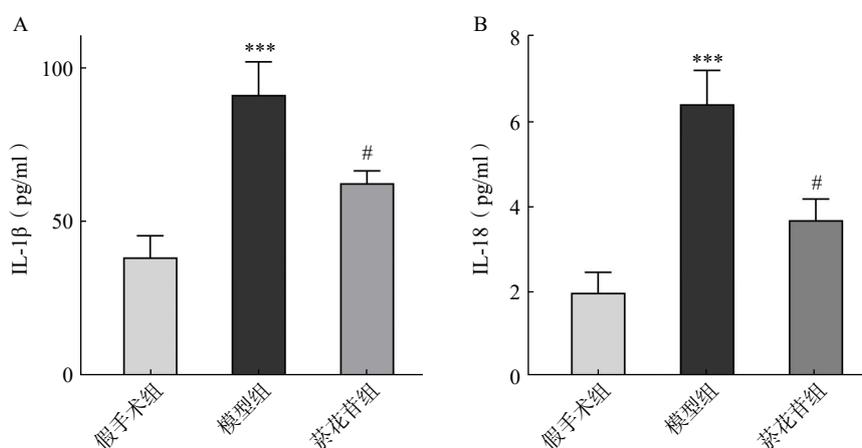


图5 大鼠脑组织炎症因子 IL-1β、IL-18 释放量

A.炎症因子 IL-1β 的释放量; B.炎症因子 IL-18 的释放量
n=5; *** $P<0.001$, 与假手术组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较。

重点,对 CIRI 大鼠神经运动能力及脑组织外观形态进行了观察分析,结果表明,蒸花苷能显著改善 CIRI 大鼠的神经运动功能,提高长期治疗和功能恢复效果,明显减少脑梗死萎缩体积,抑制脑缺血后梗死区域进一步扩大并改善梗死区域坏死萎缩的状况。

缺血性脑卒中涉及到细胞凋亡、铁死亡和细胞焦亡等多种病理机制^[21],其中细胞焦亡是一种依赖半胱天冬酶(caspase)的炎症性细胞死亡形式,在缺血性脑卒中神经损伤中扮演了重要角色^[22]。细胞

焦亡过程中 GSDMD 蛋白被活化 caspase 剪切为具有活性的 GSDMD-N, GSDMD-N 聚合并在细胞膜上形成孔道导致细胞膜破裂伴随细胞内 IL-1β、IL-18 等炎症因子释放增加^[23],进一步促进炎症反应的发生和神经细胞的死亡。有研究表明,通过抑制细胞焦亡可以有效促进 CIRI 后的神经功能恢复^[24,25]。本实验首次将蒸花苷促进缺血性脑卒中的长期恢复与其抑制细胞焦亡联系起来,利用转录组测序及蛋白免疫印记等方法对细胞焦亡相关基因和蛋白的表达水平进行了测定,数据显示蒸花苷能够降

低 NOD 样受体信号通路中细胞焦亡关键基因的表达量并使焦亡相关蛋白的表达水平以及炎症因子的释放量明显下降,表明菸花苷能够抑制细胞焦亡及其引起的炎症反应。

综上,菸花苷能减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,显著促进 CIRI 大鼠的长期功能恢复,该作用可能与抑制大鼠脑组织细胞焦亡有关。随着对菸花苷治疗缺血性脑卒中研究的不断深入,其对缺血性脑卒中缺血再灌注损伤的长期保护作用及机制将被进一步阐释。

【参考文献】

- [1] FAN J, LI X, YU X, et al. Global Burden, Risk Factor Analysis, and Prediction Study of Ischemic Stroke, 1990-2030[J]. *Neurology*, 2023, 101(2): e137-e150.
- [2] DELONG J H, OHASHI S N, O'CONNOR K C, et al. Inflammatory Responses After Ischemic Stroke[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2022, 44(5): 625-648.
- [3] L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies [J]. *Biochemistry & pharmacology* : open access, 2016, 5(4).
- [4] SIMATS A, LIESZ A. Systemic inflammation after stroke: implications for post - stroke comorbidities [J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2022, 14(9).
- [5] YOSHIMURA S, SAKAI N, YAMAGAMI H, et al. Endovascular Therapy for Acute Stroke with a Large Ischemic Region[J]. *The New England journal of medicine*, 2022, 386(14): 1303-1313.
- [6] WU S, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. *The Lancet Neurology*, 2019, 18(4): 394-405.
- [7] CHAMORRO Á, DIRNAGL U, URRÁ X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation[J]. *The Lancet Neurology*, 2016, 15(8): 869-881.
- [8] XU J, WANG A, MENG X, et al. Edaravone Dexborneol Versus Edaravone Alone for the Treatment of Acute Ischemic Stroke[J]. *Stroke*, 2021, 52(3): 772-780.
- [9] 龚辉, 张巧梅, 王强. 右美托咪定对大鼠脑缺血再灌注损伤后长期的神经保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(2): 138-142.
- [10] 华骏. 白果内酯对缺血性脑损伤的神经保护作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
- [11] WANG Y, ZHANG S, NI H, et al. Autophagy is involved in the neuroprotective effect of nicotiflorin [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 278(114279).
- [12] 王业晴, 夏玉叶, 唐颖, 等. 菸花苷对全脑缺血再灌注模型大鼠的脑保护作用 [J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(2): 109-113.
- [13] 严啸东, 王业晴, 李炳锋, 等. 菸花苷对缺血性脑卒中大鼠的长期保护作用 [J]. *药学实践杂志*, 2022, 40(3): 226-230.
- [14] LI R, GUO M, ZHANG G, et al. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(1): 143-150.
- [15] 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.
- [16] PAN Y W, WU D P, LIANG H F, et al. Total Saponins of Panax notoginseng Activate Akt/mTOR Pathway and Exhibit Neuroprotection in vitro and in vivo against Ischemic Damage[J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(5): 410-418.
- [17] LUONG T N, CARLISLE H J, SOUTHWELL A, et al. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011,(49).
- [18] D'HOOGHE R, DE DEYN P P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. *Brain research Brain research reviews*, 2001, 36(1): 60-90.
- [19] HEISS W-D, ZARO WEBER O. Validation of MRI Determination of the Penumbra by PET Measurements in Ischemic Stroke[J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2017, 58(2): 187-193.
- [20] RICHARD GREEN A, ODERGREN T, ASHWOOD T. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents?[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, 24(8): 402-408.
- [21] TUO Q Z, ZHANG S T, LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2022, 42(1): 259-305.
- [22] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [23] ZHENG Y, XU X, CHI F, et al. Pyroptosis: A Newly Discovered Therapeutic Target for Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11).
- [24] LIU D, DONG Z, XIANG F, et al. Dendrobium Alkaloids Promote Neural Function After Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibiting Pyroptosis Induced Neuronal Death in both In Vivo and In Vitro Models[J]. *Neurochemical Research*, 2019, 45(2): 437-454.
- [25] SHE Y, SHAO L, ZHANG Y, et al. Neuroprotective effect of glycosides in Buyang Huanwu Decoction on pyroptosis following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112051.

[收稿日期] 2024-07-18 [修回日期] 2024-11-14
[本文编辑] 费永和