

# 金丝桃苷保护大鼠脑缺血再灌注损伤的机制研究

江飞飞<sup>1</sup>, 陈立志<sup>1</sup>, 徐晏雯<sup>1</sup>, 万浩芳<sup>2</sup>, 林海燕<sup>1\*</sup>(1.衢州市人民医院神经内科, 浙江 衢州 324000; 2.浙江中医药大学, 杭州 310006)

**摘要:** 目的 探究金丝桃苷(hyperoside, Hyp)对脑缺血再灌注大鼠脑组织的保护作用及相关机制。方法 采用线栓法建立大鼠中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)大鼠模型, 分成假手术组、模型组、Hyp低、中、高剂量组(30, 60, 120 mg·kg<sup>-1</sup>)。持续给药 14 d后, 采用 Zea Longa 法对大鼠进行神经功能评分, 并测定脑含水量。TTC 染色法测定大鼠脑梗死体积, ELISA 检测炎症相关因子, HE 染色观察大脑海马 CA1 区神经元病理形态, TUNEL 染色观察大鼠脑组织细胞凋亡程度, Western blotting 检测 TLR4 和 COX-2 以及凋亡相关蛋白的表达。结果 Hyp 干预能够显著改善 MCAO/R 大鼠 Zea Longa 评分( $P<0.05$ ), 减少脑含水量和脑梗死体积, 显著降低炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1 以及 VCAM-1)的表达( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 并且有效改善海马 CA1 区神经元的病理学改变和凋亡情况, 显著抑制 TLR4、COX-2、NF- $\kappa$ B、caspase-3、caspase-9 以及 Bax 蛋白的表达( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 上调 Bcl-2 蛋白的表达( $P<0.05$ )。结论 Hyp 对脑缺血再灌注损伤的保护作用与抗炎、抗凋亡以及抑制 TLR4/COX-2 信号通路有关。

**关键词:** 金丝桃苷; 脑缺血再灌注; 抗炎; 抗凋亡; TLR4/COX-2 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)12-1448-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.007

引用本文: 江飞飞, 陈立志, 徐晏雯, 等. 金丝桃苷保护大鼠脑缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1448-1453.

## Study on Mechanism of Hyperoside Protecting Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

JIANG Feifei<sup>1</sup>, CHEN Zhizhi<sup>1</sup>, XU Yanwen<sup>1</sup>, WAN Haofang<sup>2</sup>, LIN Haiyan<sup>1\*</sup>(1.Department of Neurology, Quzhou City People's Hospital, Quzhou 324000, China; 2.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the protective effect and mechanism of hyperoside(Hyp) on brain tissue of cerebral ischemia-reperfusion rats. **METHODS** Rat models of middle cerebral artery occlusion/reperfusion(MCAO/R) were established by bolt-line method and divided into sham operation group, model group and Hyp low, medium and high dose group(30, 60, 120 mg·kg<sup>-1</sup>). The rats were evaluated by Zea Longa for neurological function and the brain water content was measured. The volume of cerebral infarction in rats was determined by TTC staining, inflammatory factors were detected by ELISA, pathological morphology of neurons in the hippocampus CA1 was observed by HE staining, apoptosis of brain cells was observed by TUNEL staining, and the expressions of TLR4, COX-2 and apoptosis-related proteins were detected by Western blotting. **RESULTS** Hyp intervention could significantly improve the Zea Longa score of MCAO/R rats( $P<0.05$ ), reduce brain water content and cerebral infarction volume, significantly reduce the expression of inflammatory factors(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ICAM-1, VCAM-1)( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), effectively improve the pathological blood changes and apoptosis of neurons in the hippocampus CA1 region, significantly inhibit the expression of TLR4, COX-2, NF- $\kappa$ B, caspase-3, caspase-9 and Bax protein ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and upregulated the expression of Bcl-2 protein( $P<0.05$ ). **CONCLUSION** The protective effect of Hyp on cerebral ischemia-reperfusion injury is related to anti-inflammatory, anti-apoptotic and inhibition of TLR4/COX-2 signaling pathway.

**KEYWORDS:** hypericin; brain tissue of cerebral ischemia-reperfusion; anti-inflammatory; anti-apoptosis; TLR4/COX-2 signaling pathway

近年来, 缺血性脑血管疾病的发病率和死亡率明显增高, 且发病年龄逐渐年轻化<sup>[1]</sup>。在缺血性卒中的发病机制中, 脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)是一种重要机制, 可通过炎症因子、激活凋亡、氧化应激以及线粒

体损伤等途径引起神经细胞死亡<sup>[2]</sup>。从抗炎和抗凋亡的角度, 研发能够有效保护再灌注损伤的药物是治疗脑缺血疾病的有效途径。金丝桃苷(hyperoside, Hyp)属于黄酮醇苷类化合物, 在金丝桃科、蔷薇科、豆科等植物中广泛存在<sup>[3]</sup>, 已有文

基金项目: 浙江省自然科学基金探索项目(LQ20H270017)

作者简介: 江飞飞, 女, 硕士, 副主任医师 Tel: 13059769436  
E-mail: qz.LinHaiYan@163.com

E-mail: feifei512@163.com \*通信作者: 林海燕, 女, 主任医师 Tel:

献报道 Hyp 在抗心/脑缺血损伤方面具有一定的功效<sup>[4]</sup>, 另外有研究证明<sup>[5]</sup>, Hyp 能够通过抗炎、抗凋亡途径保护大鼠的脑缺血再灌注损伤, 然而其具体涉及的分子机制仍未被完全阐明。因此, 本研究通过构建大脑中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)大鼠模型, 从抗炎和抗凋亡的角度研究 Hyp 对 CIRI 的保护作用, 并进一步探究其涉及的分子机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

选取健康清洁级♂ SD 大鼠 60 只, 体质量 200~240 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0018; 饲养于浙江中医药大学动物研究中心, 动物使用许可证编号为 SYXK(浙)2018-0012。饲养环境: 室温(23±2)°C, 相对湿度 60%~70%。

### 1.2 药物和试剂

金丝桃苷(上海吉至生化科技有限公司, 批号: 20180912; 纯度>98%); 水合氯醛(美国 Sigma 公司, 批号: 47335-U); 大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 检测试剂盒(上海晶抗生物工程有限公司, 批号: JLC2062, JLC1704, JLC1236, JLC1238, JLC1243); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: G3005); TLR4、COX-2、caspase-3、caspase-9、Bax、Bcl-2 抗体(美国 CST 公司, 批号: 6, 12, 17, 25, 13, 15)。

### 1.3 仪器

Infinite M200 PRO 型多功能酶标仪(奥地利 TECAN 公司); DM3000 正置荧光显微镜(上海徕卡显微系统贸易有限公司); 转移脱色摇床(姜堰市普康医疗机械厂); PowerPac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); 3300 Mini 化学发光成像系统(中国 CLinX 公司)。

## 2 方法

### 2.1 MCAO/R 大鼠模型的建立及分组

大鼠用水合氯醛麻醉后仰卧固定于鼠板上, 用眼科镊钝性分离出右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA), 挂线备用, 分别结扎 ECA 和 CCA 近心端, 将 ICA 用动脉夹暂时夹闭。用眼科镊挑起 CCA 剪出一个小口, 迅速将备好的栓线沿 CCA 至 ICA 方

向插入, 当栓线顶端稍感阻力则停止, 此时扎紧 CCA 上的备线以防止栓线移动脱出及出血。将备用挂线结扎并记录阻断时间, 缺血 1 h 后拔出栓线, 再灌注 24 h。假手术组手术步骤与上述相同, 但栓线插入深度仅 15 mm, 不阻断大脑中动脉血流。将大鼠尾部提起悬空时, 左前肢屈曲内收, 活动时呈典型追尾征表示造模成功。将大鼠分成 5 组: 假手术组、模型组、Hyp 低剂量组(30 mg·kg<sup>-1</sup>)、Hyp 中剂量组(60 mg·kg<sup>-1</sup>)、Hyp 高剂量组(120 mg·kg<sup>-1</sup>)。每日上午 8 点半灌胃给药, 期间每周根据体质量调整给药量, 持续 14 d。

### 2.2 大鼠神经功能评分

药物干预结束后采用 Zea Longa 评分标准对各组大鼠神经功能进行评分<sup>[6]</sup>。无神经功能缺损症状记 0 分; 瘫痪侧屈曲、内收记 1 分, 不能自主伸展; 行走时向瘫痪侧转圈记 2 分; 行走时向瘫痪侧倾倒记 3 分; 严重神经功能缺损, 如行走障碍等记 4 分。

### 2.3 脑含水量测定

麻醉后断头取脑, 去除小脑和低位脑干后称重大脑组织质量, 即为脑湿重; 110 °C 恒温烘烤 48 h 后称重为脑干重: 脑含水量(%)=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%。

### 2.4 TTC 染色测定大鼠脑梗死体积百分比

取脑后-20 °C 放置 30 min, 除去小脑和嗅球, 冠状切片, 从大脑的额页至枕页连续切 5 片, 每片厚约 2 mm。将脑片放入 1% TTC 磷酸缓冲液中, 37 °C 避光孵育 5 min, 待颜色分明后取出(梗死区呈白色), 用 10% 甲醛溶液固定, 数码相机拍照。利用 Image Pro-Plus 测量梗死面积和整个大脑面积, 体积=面积×厚度。脑梗死体积百分比=(梗死体积/整个大脑体积)×100%。

### 2.5 酶联免疫检测炎症因子

分离大鼠缺血侧脑组织, 采用 ELISA 试剂盒测定大鼠缺血侧脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 的含量, 具体操作按照试剂盒说明进行。

### 2.6 制备石蜡切片进行病理学形态观察以及细胞凋亡检测

取脑后于冰上取部分组织用于石蜡切片, 常规 HE 染色观察脑组织海马 CA1 区神经元病变; TUNEL 染色法检测各标本的细胞凋亡情况, 将切片严格按照 TUNEL 试剂盒说明书步骤染色, 显微

镜下观察,胞浆中呈现有棕黄色底物的细胞视作阳性凋亡细胞,利用 Image-Pro plus 图像分析软件统计其中 TUNEL 阳性细胞个数,取其平均值作为该样本的阳性细胞数。凋亡细胞百分率(%)=阳性凋亡细胞数/(阳性凋亡细胞数+阴性凋亡细胞数)×100%。

### 2.7 Western blotting 检测相关蛋白

取大鼠患侧脑皮质组织,加入适量液氮,用研钵研磨后加入 Lysis Buffer,采用组织匀浆机进行充分碾碎,于冰上静置 30 min 后将匀浆液放入离心管中离心,取上清液转移至新预冷的离心管,提取蛋白后上样进行 SDS-PAGE 电泳,分离总蛋白,随后一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h 后显影,用 Image J 软件进行灰度值分析,检测脑组织 TLR4、COX-2、caspase-3、caspase-9、Bax 以及 Bcl-2 的蛋白表达水平,以 GAPDH 为内参。

### 2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组间两两比较采用单因素方差分析;组间两两比较,采用两独立样本 *t* 检验,当  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠神经功能评分和脑组织含水量情况

采用 Zea Longa 评分标准对各组大鼠进行神经功能评分,并采用称重法检测大鼠脑含水量变化,与假手术组相比,模型组的神经功能评分及脑含水量均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组相比,Hyp 中、高剂量组能够显著降低大鼠的神经功能评分及脑含水量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分、脑组织含水量( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Tab. 1 Nerve function score and brain tissue moisture content of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	Zea Longa 评分	脑含水量/%
假手术组	0.0±0.0	10.8±2.0
模型组	3.4±0.5 <sup>1)</sup>	48.0±7.2 <sup>1)</sup>
Hyp 低剂量组	2.6±0.5	33.8±3.8
Hyp 中剂量组	1.8±0.7 <sup>2)</sup>	29.9±4.2 <sup>2)</sup>
Hyp 高剂量组	1.4±0.5 <sup>3)</sup>	24.9±2.7 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with sham operation group,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ .

### 3.2 各组大鼠脑梗死体积百分比情况

采用 TTC 染色法检测各组大鼠脑梗死情况,发生脑梗死部分的脑组织呈现白色的梗死灶,假

手术组大鼠无明显白色梗死灶,模型组大鼠出现明显的白色梗死灶,Hyp 各个剂量组较模型组白色梗死灶有不同程度上的减少,结果见图 1。计算各大鼠脑梗死体积百分比,与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死体积百分比显著升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,Hyp 中、高剂量组脑梗死体积百分比显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),结果见表 2。

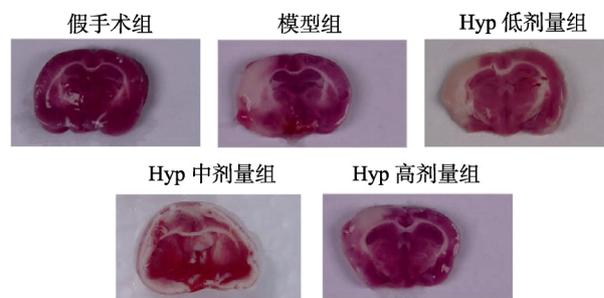


图 1 各组大鼠脑梗死情况  
Fig. 1 Cerebral infarction of rats in each group

表 2 各组大鼠脑梗死体积百分比( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Tab. 2 Percentage of cerebral infarction volume of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	脑梗死体积百分比/%
假手术组	0.0±0.0
模型组	24.3±2.4 <sup>1)</sup>
Hyp 低剂量组	23.6±3.2
Hyp 中剂量组	18.4±1.8 <sup>2)</sup>
Hyp 高剂量组	16.8±2.1 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with sham operation group,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ .

### 3.3 各组大鼠脑组织中炎症因子表达情况

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 的含量均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,Hyp 给药组各个炎症因子表达量均有所下降,其中 Hyp 中、高剂量组大鼠脑组织中各个炎症因子表达量显著下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见表 3。

### 3.4 各组大鼠脑组织海马 CA1 区神经元病理学形态变化

假手术组神经元结构排列整齐,层次清晰,结构完整,胞质染色均匀,无异常现象。而模型组神经元结构明显异常,排列紊乱,结构发生变化,神经元数量减少,间隙增大、参差不齐,胞体肿胀变形,核仁变浅或消失。相比于模型组,Hyp 给药组能够有效改善海马 CA1 区神经元的病理学改变。结果见图 2。

表 3 各组大鼠脑组织炎症因子表达情况( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Tab. 3 Inflammatory cytokines expression in brain tissues of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

分组	TNF- $\alpha$ /nmol·L <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /nmol·L <sup>-1</sup>	IL-6/nmol·L <sup>-1</sup>	ICAM-1/pg·mL <sup>-1</sup>	VCAM-1/pg·mL <sup>-1</sup>
假手术组	30.2±9.1	465.0±38.5	108.2±12.5	135.9±12.7	24.7±4.1
模型组	79.8±12.3 <sup>1)</sup>	976.3±127.8 <sup>1)</sup>	350.1±42.4 <sup>1)</sup>	332.3±40.7 <sup>1)</sup>	60.9±12.7 <sup>1)</sup>
Hyp 低剂量组	66.9±10.0	830.0±72.9	307.3±27.9	250.9±32.0	48.0±7.0
Hyp 中剂量组	58.8±8.9 <sup>2)</sup>	662.6±96.9 <sup>2)</sup>	192.2±17.8 <sup>3)</sup>	247.9±13.5 <sup>2)</sup>	39.3±4.1 <sup>2)</sup>
Hyp 高剂量组	53.0±11.8 <sup>2)</sup>	557.7±97.3 <sup>3)</sup>	152.2±13.0 <sup>3)</sup>	188.9±13.8 <sup>3)</sup>	31.6±3.7 <sup>2)</sup>

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

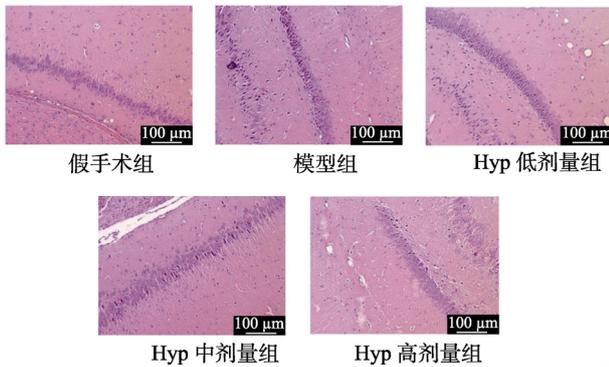


图 2 各组大鼠海马 CA1 区神经元病理学形态变化(HE, 200 $\times$ )

Fig. 2 Pathological changes of neurons in hippocampal CA1 region of rats in each group(HE, 200 $\times$ )

### 3.5 TUNEL 染色观察各组大鼠脑组织凋亡情况

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织细胞凋亡率显著上升( $P<0.01$ ); 与模型组相比, Hyp 低、中、高剂量组大鼠脑组织细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ ), 并表现出剂量依赖性。结果见图 3、表 4。

### 3.6 各组大鼠脑组织相关蛋白表达情况

与假手术组相比, 模型组大鼠 TLR4、COX-2、NF- $\kappa$ B、Bax、caspase-3 以及 caspase-9 蛋白含量显著上升( $P<0.01$ ), Bcl-2 蛋白含量显著降低( $P<0.01$ )。与模型组相比, Hyp 各个给药组能够显著下调 TLR4、COX-2、NF- $\kappa$ B、Bax、caspase-3 以及 caspase-9 蛋白含量( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 同时显著上调 Bcl-2 蛋白含量( $P<0.05$ ), 均表现出剂量依赖性。结果见图 4。

## 4 讨论

CIRI 所涉及的机制及信号通路非常复杂, 包括氧化应激、钙离子超载、炎症反应、细胞凋亡等<sup>[7-8]</sup>。其中炎症反应和细胞凋亡是与 CIRI 密切相关的病理途径<sup>[9]</sup>, CIRI 发生时, 释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 等炎症因子, 增加血脑屏障的通透性, 使炎症因子更容易穿过血脑屏障,

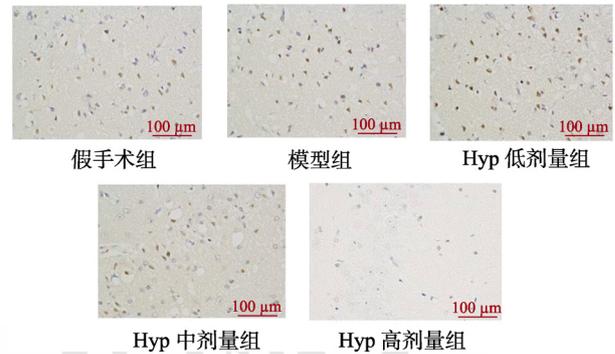


图 3 TUNEL 染色检测大鼠脑组织凋亡情况(400 $\times$ )

Fig. 3 Observation on apoptosis of brain tissue in rats by TUNEL staining(400 $\times$ )

表 4 各组大鼠凋亡率情况( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Tab. 4 Apoptosis rate of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

分组	凋亡率/%
假手术组	8.6±0.5
模型组	53.2±2.8 <sup>1)</sup>
Hyp 低剂量组	38.2±1.8 <sup>2)</sup>
Hyp 中剂量组	35.6±1.6 <sup>2)</sup>
Hyp 高剂量组	34.3±1.4 <sup>2)</sup>

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

从而加重炎症反应和细胞凋亡<sup>[10]</sup>。Hyp 是一种黄酮醇苷类化合物, 对缺血引起的心肌、肝、肾、脑等损伤具有一定的保护作用, 但其保护机制未被完全阐明<sup>[11-12]</sup>。本研究通过构建 MCAO/R 大鼠模型, 从抗炎及抗凋亡的角度探讨 Hyp 对脑缺血再灌注大鼠脑组织损伤的保护作用, 并初步阐明其相关的分子机制。

神经功能评分常被用作药物研究中的一项重要指标, 目前已成为评价药效的重要依据<sup>[13]</sup>。本研究采用 Zea Longa 评分标准评价 Hyp 对脑缺血再灌注大鼠神经功能的改善效果。结果显示, Hyp 干预后, 大鼠神经功能评分显著降低, 表明 Hyp

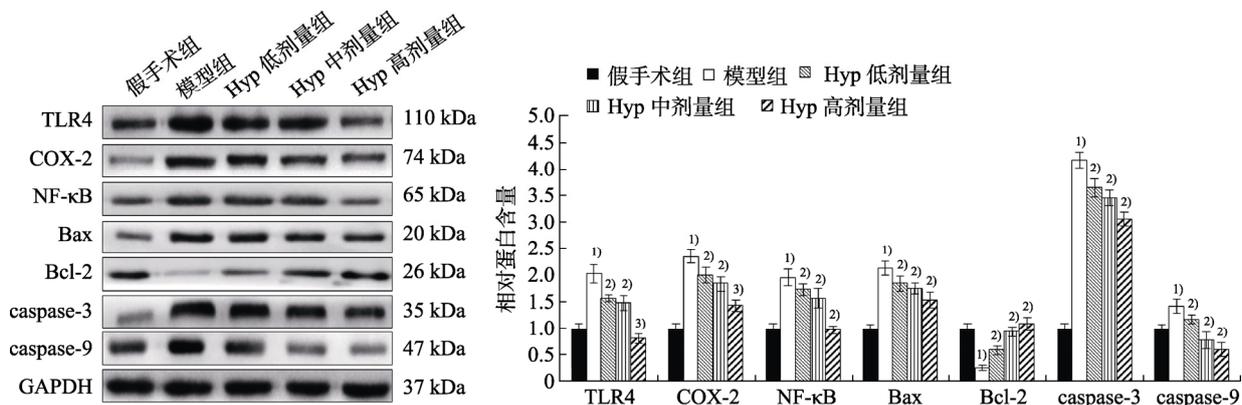


图4 各组大鼠脑组织中相关蛋白表达情况  
与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Expression of related proteins in brain tissues of rats in each group  
Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

能够改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能损伤。脑水肿是CIRI的主要并发症之一,能够引起颅内压增高,加重机械性压迫,损害脑微循环和细胞能量代谢,从而加重脑损伤<sup>[14]</sup>。另外,脑缺血初期常导致脑部供血不足或者血流中断,进而引起脑梗死,最终导致神经细胞损伤<sup>[15]</sup>。因此检测脑含水量和脑梗死体积能够有效反映脑缺血再灌注的损伤程度。本研究结果表明,模型组大鼠较假手术组大鼠脑含水量及脑梗死体积百分比明显升高。经不同浓度的Hyp干预后,大鼠的脑含水量和脑梗死体积得到不同程度上的降低。另一方面,本研究通过HE染色检测各组大鼠海马CA1区神经元病理学形态变化,结果表明Hyp能够有效改善脑缺血再灌注大鼠的海马CA1区神经元病理学改变。

目前已证实,在CIRI发生发展过程中,炎症反应及细胞凋亡均发挥着关键的作用<sup>[16-17]</sup>。炎症因子的释放会加剧血脑屏障的通透性,导致脑组织的水肿更加严重,进而导致炎症因子更容易透过血脑屏障,最终加重炎症反应和细胞凋亡。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6都是重要的炎症因子,在脑缺血中发挥着重要的作用<sup>[18]</sup>。有研究表明,VCAM-1和ICAM-1在炎症和肿瘤等病理过程中扮演着重要的角色<sup>[19]</sup>。因此,本研究选用TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、VCAM-1和ICAM-1作为炎症因子的指标,探究炎症反应变化,并采用TUNEL染色法和Western blotting检测凋亡情况。结果显示,Hyp能够显著降低大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1及VCAM-1的含量,TUNEL染色以及Western blotting结果中凋亡相关蛋白的变化表明

Hyp能够显著抑制大鼠脑组织细胞凋亡。因此,Hyp对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用,其机制与抗炎和抗凋亡有关。

TLR4是Toll样受体的一种,TLR4能够通过炎症反应及细胞凋亡参与脑缺血损伤,促使NF- $\kappa$ B的转录,进而促进大量炎症因子的释放,加重脑缺血损伤<sup>[20]</sup>,对细胞的凋亡、炎症反应、免疫反应等相关基因的表达进行调控<sup>[21]</sup>。COX-2是花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶,作为NF- $\kappa$ B的下游基因,同时也是炎症反应链中的关键因子,在脑缺血后继发的炎症反应中扮演着关键的角色<sup>[22]</sup>。因此,TLR4/COX-2信号通路可能在Hyp对脑缺血再灌注损伤保护中发挥着重要的作用。本研究结果表明,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织TLR4/COX-2信号通路异常活化,而经过Hyp干预后,TLR4和COX-2蛋白表达量随着药物剂量的增加逐渐下调,表明Hyp能够有效地抑制TLR4/COX-2信号通路。综上所述,Hyp对脑缺血再灌注损伤的保护作用与抗炎、抗凋亡以及抑制TLR4/COX-2信号通路有关。

## REFERENCES

- [1] 李岩,王凯华. 脑缺血再灌注损伤过氧化相关机制及中医药治疗[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(5): 113-116.
- [2] CAO Z W, LI C W, LIU X C, et al. Resveratrol improves the cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the SIRT1/FoxO1 signal pathway[J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2019, 54(5): 719-723.
- [3] YANG S T, WANG X Q, LIAO G H. Advances in pharmacological effects of hyperoside[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 947-951.

- [4] 舒庆, 郑其萍. 金丝桃苷抗心/脑缺血损伤作用的药理学研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1415-1417.
- [5] SHI Y, QIU X, DAI M, et al. Hyperoside attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats[J]. Transplant Proc, 2019, 51(6): 2051-2059.
- [6] ZHANG B, WU H J, ZHONG Z J, et al. Impact of Danshen ligustrazin for injection on neurological function, cerebral edema and neuronal apoptosis in rats with cerebral hemorrhage[J]. Pract J Cardiac Cereb Pneumal Vasc Dis(实用心脑血管病杂志), 2018, 26(11): 62-66.
- [7] WANG A H, WANG L L, LIU Y M, et al. Effect of ginsenosides from the stem and leaf of *Panax quinquefolius* on the inflammatory reaction after focal cerebral ischemia injury in rats[J]. Central South Pharm(中南药学), 2019, 17(4): 522-526.
- [8] WANG X P, NI J M. Advance in research of therapeutic medicines for cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(6): 659-663, 691.
- [9] WANG B, SUN Y N, WANG J Y, et al. Berberine attenuates inflammation and apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion by activating SIRT1 pathway[J]. Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志), 2019, 27(10): 847-852.
- [10] ZHAO Y, SONG Q, JIN F, et al. Effect of *Panax quinquefolium* 20s-protopanaxatriolsaponins on the inflammatory reaction after cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. China Pharm(中国药师), 2018, 21(1): 28-32.
- [11] HAN J, XUAN J L, HU H R, et al. Mechanism of hyperoside-induced dilatation in middle cerebral arteries of rats subjected to cerebral is-chemia reperfusion[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 50(7): 595-601.
- [12] GAO S S, CHEN S, CHEN Z W. The H<sub>2</sub>S mechanism of Hyp against cerebral ischemia reperfusion injury in mice[J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2016, 51(9): 1292-1296.
- [13] YANG X Y, XU R J, YANG L P, et al. Neuroprotective effect study of Shenxiang Huayu capsule through MAPK/ERK on cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急救), 2018, 27(11): 1906-1911.
- [14] 李燕华, 张国威. 影响缺血性脑水肿产生的相关因素[J]. 中国急救医学, 2006(11): 846-848.
- [15] SUI Y B, SUN Y, WANG R N, et al. Effects of Yangshen Yutang pill on myocardial microvascular disease in diabetic rats[J]. Jilin J Chin Med(吉林中医药), 2020, 40(2): 222-226.
- [16] LI J, ZUO S S, QIU X X, et al. Study on therapeutic effect and its related mechanism of anemoside B4 on ischemia reperfusion injury induced by renal artery and vein ligation in rats[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(3): 617-622.
- [17] DUAN J, KANG K, HUANG C R, et al. Protective effect of peimine on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(4): 240-246.
- [18] YANG R C. The molecular mechanism study of the induction of EGR-1 by meningitic *Escherichia coli* mediates disruption of the blood-brain barrier[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [19] JIN X X. Study on the roles of p38 MAPK/NF-κB signal pathway during the course of 1, 2-dichloroethane-induced toxic brain edema in mice[D]. Shenyang: China Medical University, 2019.
- [20] ANDRESEN L, THEODOROU K, GRÜNEWALD S, et al. Evaluation of the therapeutic potential of anti-TLR4-antibody MTS510 in experimental stroke and significance of different routes of application[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148428. Doi: 10.1371/journal.pone.0148428.
- [21] CHEN H B, ZHAO L, LI C X, et al. Protective effect of picroside II on rat brain tissue after cerebral ischemia/reperfusion and related mechanism[J]. J Precis Med(精准医学杂志), 2019, 34(2): 162-166.
- [22] KANG B K, KIM M K, KIM S Y, et al. Anti-neuroinflammatory effects of *Uncaria sinensis* in LPS-stimulated BV<sub>2</sub> microglia cells and focal cerebral ischemic mice[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(6): 1099-1115.

收稿日期: 2020-08-30

(本文责编: 沈倩)