

龙生蛭胶囊保护脑缺血再灌注损伤大鼠的作用及机制研究^Δ

方欢乐^{1*}, 李晓明¹, 周亚明¹, 张鑫², 刘小溪², 陈衍斌^{2,3#} (1. 西安培华学院医学院, 西安 710125; 2. 陕西步长制药有限公司科研部, 西安 710075; 3. 西安交通大学医学部, 西安 710061)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)07-0813-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.07.08



摘要 **目的** 探讨龙生蛭胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及机制。**方法** 通过改良线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。实验分为假手术组(仅分离血管不插线栓, 予同体积生理盐水)、模型组(造模, 予同体积生理盐水)、尼莫地平组(阳性对照, 造模, 给药剂量为20 mg/kg)和龙生蛭胶囊低、中、高剂量组(造模, 给药剂量依次为0.72、1.44、2.88 g/kg), 每组10只。各组大鼠灌胃相应药液/生理盐水, 每天1次, 连续7 d。末次给药1 h后, 采用Zea Longa评分法对各组大鼠的神经功能缺失情况进行评分; ABC-酶联免疫吸附试验法检测大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6 (IL-6) 水平; TTC染色观察大鼠脑梗死体积并计算脑梗死体积比; 苏木精-伊红染色观察大鼠脑组织病理形态的变化; 免疫组化法检测大鼠脑组织NLRP3蛋白阳性表达情况; 实时荧光定量PCR法检测大鼠脑组织Toll样受体4 (TLR4)、核因子 κ B (NF- κ B) mRNA表达; Western blot法检测大鼠脑组织TLR4、NLRP3、磷酸化NF- κ B (p-NF- κ B)及细胞核内NF- κ B蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺失评分, 血清TNF- α 和IL-6水平, 脑梗死体积比, 脑组织NF- κ B和TLR4 mRNA的相对表达水平, 以及脑组织TLR4、NLRP3、p-NF- κ B蛋白的相对表达水平及其细胞核内NF- κ B蛋白的相对表达水平均显著升高($P < 0.01$); 大鼠脑组织皮层神经细胞间隙增大、水肿明显, 可见大量炎性细胞浸润; 大鼠脑组织中NLRP3蛋白阳性表达明显增多。与模型组比较, 龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠以上指标水平均有不同程度逆转, 大部分差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 病理形态观察结果明显好转, 大鼠脑组织中NLRP3蛋白阳性表达均明显减少。**结论** 龙生蛭胶囊可能通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路, 抑制神经炎症反应, 从而达到对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。

关键词 龙生蛭胶囊; 脑缺血再灌注损伤; 炎症因子; TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路

Protective effect and mechanism of Longshengzhi capsules on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

FANG Huanle¹, LI Xiaoming¹, ZHOU Yaming¹, ZHANG Xin², LIU Xiaoxi², CHEN Yanbin^{2,3} (1. Medical College of Xi'an Peihua University, Xi'an 710125, China; 2. Scientific Research Department, Buchang Pharma Co., Ltd., Xi'an 710075, China; 3. Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the protective effect and mechanism of Longshengzhi capsules on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **METHODS** The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by using the improved thread occlusion method. The experiment was divided into six groups: sham surgery group (only separating blood vessels without inserting thread plugs, given the same volume of normal saline), model group (modeling, given the same volume of normal saline), nimodipine group (positive control, modeling, dose of 20 mg/kg), and low-dose, medium-dose, and high-dose groups of Longshengzhi capsules (modeling, doses of 0.72, 1.44 and 2.88 g/kg, respectively), with 10 mice in each group. Each group was given corresponding medication solution/normal saline by gavage, once a day, for 7 consecutive days. One hour after the last administration, the Zea Longa scoring method was used to score the neurological deficits in each group of rats, and the ABC enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in rats; TTC staining was used to observe the volume of cerebral infarction in rats and calculate the cerebral infarction volume ratio. Hematoxylin eosin staining was used to observe the pathological changes in the brain tissue of rats. Immunohistochemical staining was used to detect the positive expression of NLRP3 protein in the brain tissue of rats. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect mRNA relative expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the brain tissue of rats. Western blot assay was adopted to detect the relative expressions of TLR4, NLRP3 and phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B) protein in the brain tissue of rats and its intracellular NF- κ B protein. **RESULTS** Compared with the sham surgery group, the neural dysfunction score, serum levels of TNF- α and IL-6, cerebral infarction volume ratio, relative expression levels of NF- κ B and TLR4 mRNA, as well as protein relative expressions of TLR4, NLRP3 and p-NF- κ B in the brain tissue, and relative protein expression of intracellular NF- κ B were increased significantly in the model group ($P < 0.01$); the enlarged gap and significant edema were observed in cortical nerve cells of

Δ 基金项目 陕西省重点研发计划项目(No.2021SF-362); 陕西省教育厅重点科学研究计划协同创新项目(No.21JY001); 西安培华学院校级科研项目(No.PHKT2220)

* **第一作者** 副教授, 硕士。研究方向: 心血管药理学。E-mail: 43599079@qq.com

通信作者 副主任药师, 博士。研究方向: 中药新药研究与开发。E-mail: 50713751@qq.com

brain tissue in rats, with a large amount of inflammatory cell infiltration; the positive expression of NLRP3 protein in brain tissue of rats obviously increased. Compared with the model group, the levels of the above indicators in the medium-dose and high-dose groups of Longshengzhi capsules, as well as the Nimodipine group, were reversed to varying degrees, and most differences were statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$); the pathological morphology observation showed a significant improvement, and the positive expression of NLRP3 protein in the brain tissue of rats was obviously reduced. **CONCLUSIONS** Longshengzhi capsules may inhibit TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway and neuroinflammatory response, thereby achieving a protective effect against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.

KEYWORDS Longshengzhi capsule; cerebral ischemia-reperfusion injury; inflammatory factor; TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway

脑卒中又称“中风”,是以突然发病、迅速出现局限性或弥散性脑功能缺损为共同临床特征的脑血管疾病,分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中较常见,是我国成年人残疾的首要原因,严重威胁着人类的健康和生命安全^[1]。缺血性脑卒中可引发兴奋性氨基酸毒性作用、离子失衡、自由基反应和炎症反应等一系列复杂病理过程。目前,相关证据表明,炎症反应是影响缺血性脑卒中发生发展的重要因素^[2]。脑缺血过程中,Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)可通过介导核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的激活来促进其下游炎症因子白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)释放,从而放大炎症信号,引发炎症反应,最终造成缺血后脑组织损伤^[3]。

中医认为,脑卒中由风、痰、瘀血阻滞经络所致。龙生蛭胶囊由黄芪、水蛭、桃仁等12味中药材组成,具有补气活血、逐瘀通络的功效,临床用于动脉硬化性脑梗死恢复期,症见半身不遂、偏身麻木、口角歪斜、语言不利等^[4]。本研究团队前期围绕龙生蛭胶囊抗动脉粥样硬化及抗脑缺血再灌注损伤进行了研究,结果表明,该药具有降脂、抑制系统炎症反应、抗动脉粥样硬化的作用,同时其可通过抗氧化作用来保护脑缺血再灌注损伤大鼠的脑组织^[4-5]。本研究拟构建大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察龙生蛭胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用,并基于TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路探讨其潜在的作用机制,以期龙生蛭胶囊治疗缺血性脑卒中提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

68907型大鼠脑模具购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;JA10003B型电子精密天平购自上海精密仪器仪表有限公司;CFX型荧光定量PCR仪、Universal Hood III型化学发光成像仪、PowerPac Basic型电泳仪均购自美国Bio-Rad公司;Fresco 17型冷冻高速离心机、1510型全自动酶标仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;ECLIPSE Ci-L型显微镜购自日本Nikon公司。

1.2 主要药品与试剂

龙生蛭胶囊(批号150914,规格0.4 g)购自陕西步长制药有限公司;尼莫地平片(批号180402,规格20 mg)购自山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司;TTC试剂(批号298-96-4)购自美国Sigma公司;苏木素-伊红(HE)染液(货号BL700A)购自兰杰柯科技有限公司;通用型组织固定液、RNA提取液、兔源NLRP3多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗(批号分别为G1101、G3013、GB114320-100、GB23301)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;IL-6和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(批号分别为20220609、20220514、20220815)均购自南京建成生物科技有限公司;RIPA裂解液、特超敏ECL化学发光试剂盒、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒(批号分别为P0013B、P0018S、P0027B)均购自南京碧云天生物技术有限公司;鼠源TLR4单克隆抗体、兔源NF- κ B单克隆抗体、兔源磷酸化NF- κ B(phosphorylated NF- κ B, p-NF- κ B)单克隆抗体(批号分别为ab22048、ab32536、ab76302)均购自英国Abcam公司;鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 内参)单克隆抗体、兔源组蛋白H3(histone H3, 核内参)多克隆抗体、HRP标记的山羊抗鼠IgG二抗(批号分别为YM3029、YK0006、RS0002)均购自美国ImmunoWay公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠80只,体重250~280 g,购自西安交通大学动物中心,动物生产许可证号为SCXK(陕)2018-001,合格证号为2879。实验动物饲养条件符合《实验动物管理条例》,控制室温在18~20℃,相对湿度在55%~60%,大鼠自由进食、进水。本研究经西安交通大学医学部生物医学伦理委员会审查批准(批件号2021-1297)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

采用改良线栓法制作大鼠MCAO模型^[6]。大鼠腹腔注射麻醉,固定于手术台上,于颈部正中纵向切口,逐层钝性分离出右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉;结扎颈总动脉和颈外动脉近心端,动脉夹夹闭颈总动脉远心端,在动脉夹近心端打结剪一小口,将线栓送入颈总动

脉过丝线后,松开动脉夹;将线栓沿颈总动脉、颈内动脉前行,进入深度18~19 mm,缝合皮肤,90 min后拔线。若大鼠存活苏醒后行为和功能异常,同时Zea Longa评分为2~3分表示造模成功^[6-7]。

实验分为假手术组(仅分离血管不插线栓)、模型组(造模不给药)、尼莫地平组(阳性对照,造模并给药)和龙生蛭胶囊低、中、高剂量组(造模并给药),每组10只(若造模过程中有大鼠死亡,则补足)。龙生蛭胶囊各组剂量根据临床常用剂量,按照成人等效剂量折算系数,以成人剂量的6.25倍为龙生蛭胶囊中剂量,分别得到龙生蛭胶囊低、中、高给药剂量分别为0.72、1.44、2.88 g/kg;尼莫地平组根据临床常用剂量同法换算,得尼莫地平给药剂量为20 mg/kg。于MACO术后第2天,各给药组大鼠灌胃相应药液(以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂,临用前配制),体积均为10 mL/kg;假手术组和模型组大鼠灌胃同体积生理盐水;每天1次,持续7 d。

2.2 大鼠神经功能缺失情况评分

于末次给药1 h后,采用Zea Longa评分法对各组大鼠的神经功能缺失情况进行评分^[7],具体评分标准:无神经损伤症状,记0分;悬尾实验不能完全伸展对侧前爪,记1分;向对侧转圈,记2分;向对侧倾倒,记3分;无自主活动或陷入深度昏迷中,记4分;死亡,记5分。

2.3 大鼠血清TNF-α、IL-6水平检测

采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测。神经功能缺失评分结束后,各组大鼠腹腔注射麻醉,于腹主动脉取血,以3 500 r/min离心20 min,收集上清液,按试剂盒说明书方法检测血清TNF-α、IL-6水平。

2.4 大鼠脑梗死体积检测

采用TTC染色观察。取“2.3”项下各组麻醉大鼠5只,行颈部脱臼处死后快速取脑,用预冷生理盐水冲洗,并于-20℃下放置10 min,再将其置于专用脑槽内作厚约2 mm的连续切片。将各切片放入TTC染液中,于避光、37℃条件下孵育20 min,再于4%多聚甲醛中固定后拍照。应用Image J软件扫描图片,观察大鼠脑梗死体积并计算脑梗死体积比[脑梗死体积比(%)=(白色脑梗死体积/全脑总体积)×100%]。

2.5 大鼠脑组织病理形态观察

采用HE染色观察。取“2.3”项下各组剩余麻醉大鼠5只,行颈部脱臼处死后快速取脑,将脑组织置入4%多聚甲醛中固定24 h,行常规石蜡包埋、切片(厚度4 μm),备用。取切片,行常规HE染色,置于显微镜下观察大鼠脑皮层的病理改变情况。

2.6 大鼠脑组织NLRP3蛋白阳性表达的检测

采用免疫组化法检测。取“2.5”项下各组大鼠的脑组织切片,经脱蜡及抗原修复后,滴加NLRP3一抗(稀释度为1:200),于37℃下孵育1 h;滴加相应二抗(稀释度为1:2 000),于37℃下孵育20 min,以DAB显色,再以苏木精复染,经分化、返蓝后封片,使用显微镜观察NLRP3蛋白阳性表达(呈棕黄色)情况。

2.7 大鼠脑组织TLR4、NF-κB mRNA 表达的检测

采用实时荧光定量PCR法检测。取“2.5”项下各组大鼠脑组织100 mg,研磨后,加入RNA提取液1 mL,充分研磨提取总RNA。检测RNA浓度及纯度后,根据逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,再根据扩增试剂盒说明书以cDNA为模板进行扩增。反应体系包括2×Ultra SYBR Mixture 10 μL,上、下游引物各0.8 μL,cDNA模板1.6 μL,ddH₂O 6.8 μL。反应条件为95℃预变性30 s;95℃变性15 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环。使用Excel软件,以GAPDH为内参,以2^{-ΔΔC_t}法计算TLR4、NF-κB mRNA的相对表达水平。结果以假手术组为参照进行归一化处理。上述实验重复3次。引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	上游:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	
TLR4	上游:CCAGGTGTGAAATTGAGACAATTG	191
	下游:AAGCTGTCCAATATGGAACCC	
NF-κB	上游:AACGCAAAAGGACCTACGAGA	156
	下游:TTGAAAAGGCATAGGGCTGG	

2.8 大鼠脑组织TLR4、NLRP3、p-NF-κB蛋白表达及细胞核内NF-κB蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取“2.5”项下各组大鼠脑组织100 mg,提取总蛋白,在4℃以12 000 r/min离心10 min进行组织裂解,取上清液于100℃下变性后保存,备用;另取上述大鼠脑组织50 mg,按照核蛋白提取试剂盒说明书提取核蛋白,于100℃下变性,测定蛋白浓度,进行8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移蛋白至聚偏二氟乙烯膜上,室温封闭1 h;分别加入特异性一抗(TLR4、NLRP3、p-NF-κB、NF-κB的稀释度均为1:500;GAPDH、histone H3的稀释度均为1:2 000),4℃孵育过夜;用TBST洗膜5次后,加入相应二抗(稀释度为1:2 000),室温孵育1 h;用TBST洗膜5次后,用ECL化学发光试剂显色,再于化学发光成像仪下成像。使用Gel-Pro Analyzer 4.0软件分析,以TLR4、NLRP3蛋白灰度值与内参GAPDH蛋白灰度值的比值表示大鼠脑组织中TLR4、NLRP3蛋白的相对表达水平;以p-NF-κB蛋白灰度值与NF-κB蛋白灰度值的比值表示大鼠脑组织中NF-κB蛋白的磷酸化水平;以NF-κB蛋白灰度值与核内参histone H3蛋白灰度值的比值表示大鼠脑组织细胞核内NF-κB蛋白的相对表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 16.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 龙生蛭胶囊对大鼠神经功能缺失的影响

假手术组大鼠无神经功能损伤,神经功能缺失评分为0分。模型组、尼莫地平组和龙生蛭胶囊低、中、高剂

量组大鼠神经功能缺失评分分别为(3.13±0.35)、(0.75±0.71)、(3.00±0.53)、(2.38±0.52)、(1.00±0.76)分。与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺失评分明显升高;与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠神经功能缺失评分显著降低($P<0.01$)。

3.2 龙生蛭胶囊对大鼠血清TNF-α、IL-6水平的影响

与假手术比较,模型组大鼠血清TNF-α、IL-6水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠血清TNF-α、IL-6水平,以及龙生蛭胶囊低剂量组大鼠血清TNF-α水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表2。

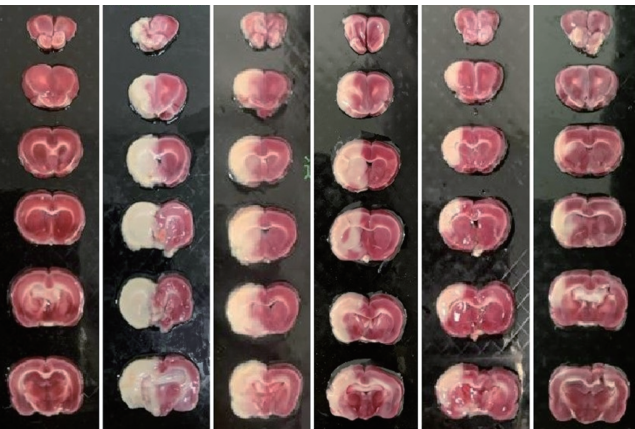
表2 各组大鼠血清TNF-α、IL-6水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	IL-6	TNF-α
假手术组	24.74±3.54	34.60±2.52
模型组	36.34±3.83 ^a	52.60±3.56 ^a
龙生蛭胶囊低剂量组	35.77±1.85	50.46±3.61 ^b
龙生蛭胶囊中剂量组	29.10±4.74 ^c	40.75±2.44 ^c
龙生蛭胶囊高剂量组	22.51±4.74 ^c	31.71±3.77 ^c
尼莫地平组	24.40±5.02 ^c	30.72±3.06 ^c

a:与假手术组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$ 。

3.3 龙生蛭胶囊对大鼠脑梗死的影响

假手术组大鼠脑部未见梗死区,脑梗死体积比为0。模型组、尼莫地平组和龙生蛭胶囊低、中、高剂量组大鼠脑梗死体积比分别为(35.00±3.46)%、(5.67±1.53)%、(29.00±3.61)%、(18.00±2.00)%、(9.67±1.53)%。与假手术组大鼠比较,模型组大鼠左侧大脑缺血明显,可见白色梗死区,脑梗死体积比明显升高;与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑梗死缺血明显减轻,白色梗死区减少,区域体积下降,脑梗死体积比均显著降低($P<0.01$)。结果见图1。



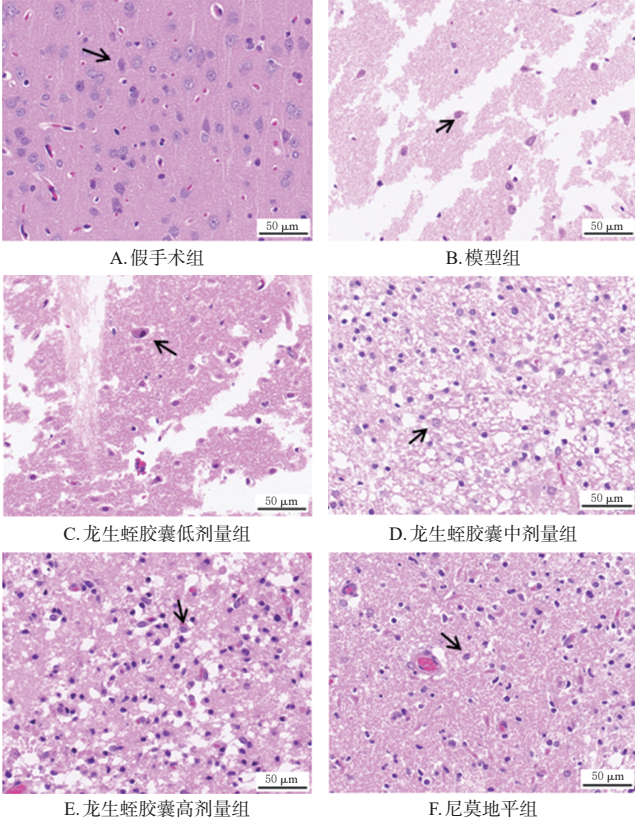
I:假手术组;II:模型组;III:龙生蛭胶囊低剂量组;IV:龙生蛭胶囊中剂量组;V:龙生蛭胶囊高剂量组;VI:尼莫地平组。

图1 各组大鼠脑组织TTC染色图

3.4 龙生蛭胶囊对大鼠脑组织病理形态的影响

假手术组大鼠脑组织皮层神经细胞形态正常,结构完整,排列紧密。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织

皮层神经细胞排列紊乱,且可见变性、坏死,细胞数目明显减少,细胞间隙增大,间质水肿明显,可见大量炎症细胞浸润。与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑组织皮层神经细胞形态得到改善,细胞间隙变小。结果见图2。



注:箭头所指为神经细胞。
图2 各组大鼠脑组织病理形态观察显微图(HE染色, ×400)

3.5 龙生蛭胶囊对大鼠脑组织NLRP3蛋白阳性表达的影响

NLRP3在假手术组脑组织中阳性表达较低。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中NLRP3蛋白阳性表达明显增多。与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑组织中NLRP3蛋白阳性表达均明显减少,以龙生蛭胶囊高剂量组变化最明显。结果见图3。

3.6 龙生蛭胶囊对大鼠脑组织TLR4、NF-κB mRNA表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织TLR4、NF-κB mRNA的相对表达水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑组织TLR4、NF-κB mRNA的相对表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表3。

3.7 龙生蛭胶囊对大鼠脑组织TLR4、NLRP3、p-NF-κB及细胞核内NF-κB蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织TLR4及NLRP3蛋白的相对表达水平、NF-κB磷酸化水平和细胞核内NF-κB蛋白的相对表达水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,龙生蛭胶囊中剂量组大鼠脑组织

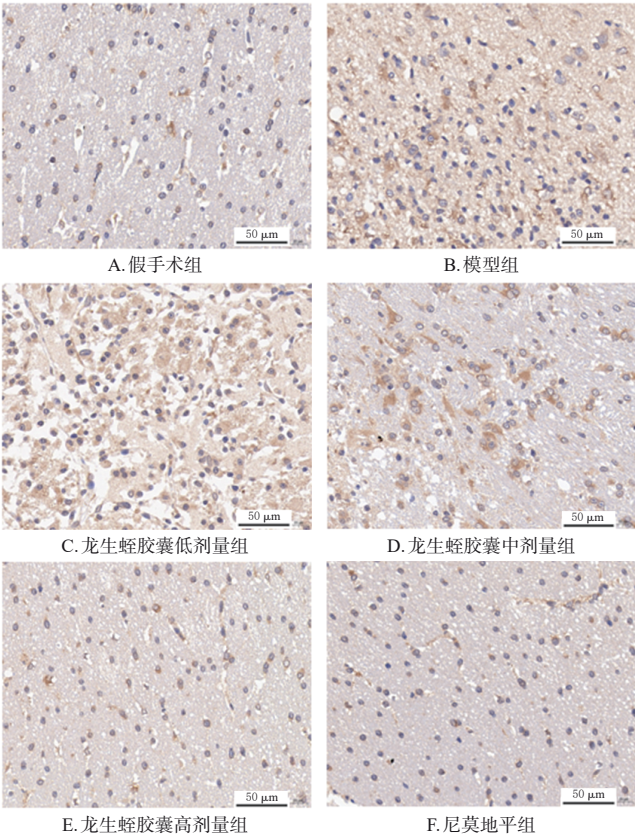


图3 各组大鼠脑组织NLRP3蛋白阳性表达显微镜(免疫组化染色,×400)

表3 各组大鼠脑组织TLR4、NF-κB mRNA相对表达水平比较(̄x±s,n=5)

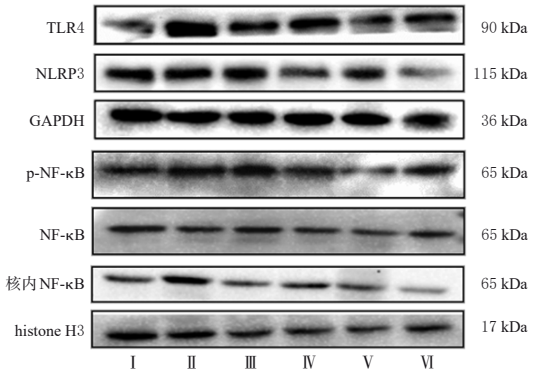
组别	TLR4 mRNA	NF-κB mRNA
假手术组	0.98±0.08	1.00±0.04
模型组	2.64±0.36 ^a	2.35±0.17 ^a
龙生蛭胶囊低剂量组	2.47±0.26	2.25±0.13
龙生蛭胶囊中剂量组	1.72±0.19 ^b	1.53±0.31 ^b
龙生蛭胶囊高剂量组	1.32±0.23 ^c	1.18±0.14 ^c
尼莫地平组	1.29±0.15 ^c	1.09±0.11 ^c

a: 与假手术组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与模型组比较, $P<0.01$ 。

NLRP3蛋白的相对表达水平、细胞核内NF-κB蛋白的相对表达水平,龙生蛭胶囊高剂量组及尼莫地平组大鼠脑组织TLR4及NLRP3蛋白的相对表达水平、NF-κB磷酸化水平和细胞核内NF-κB蛋白的相对表达水平均显著降低($P<0.01$)。结果见图4、表4。

4 讨论

龙生蛭胶囊源自清代王清任名方“补阳还五汤”。临床研究表明,单独或联合应用龙生蛭胶囊在治疗各类急性脑梗死、缺血性脑卒中、动脉粥样硬化、中风后偏瘫等方面均有显著疗效^[8]。本研究采用改良线栓法制作大鼠MCAO模型,考察龙生蛭胶囊的干预效果,结果显示,与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组大鼠神经功能缺失评分、脑梗死体积比均显著降低,且大鼠脑组织损伤得到明显改善,表明龙生蛭胶囊具有一定的脑缺血再灌注损伤保护作用。



I: 假手术组; II: 模型组; III: 龙生蛭胶囊低剂量组; IV: 龙生蛭胶囊中剂量组; V: 龙生蛭胶囊高剂量组; VI: 尼莫地平组。

图4 各组大鼠脑组织TLR4、NLRP3、p-NF-κB及细胞核内NF-κB蛋白表达电泳图

表4 各组大鼠脑组织TLR4、NLRP3、p-NF-κB及细胞核内NF-κB蛋白表达结果比较(̄x±s,n=5)

组别	TLR4/GAPDH	NLRP3/GAPDH	p-NF-κB/NF-κB	核内NF-κB/histone H3
假手术组	0.404±0.020	0.789±0.075	1.004±0.02	0.689±0.049
模型组	0.693±0.026 ^a	1.164±0.061 ^a	1.293±0.026 ^a	0.873±0.025 ^a
龙生蛭胶囊低剂量组	0.705±0.058	1.062±0.058	1.305±0.058	0.745±0.091
龙生蛭胶囊中剂量组	0.667±0.053	0.667±0.053 ^b	1.300±0.900	0.683±0.063 ^b
龙生蛭胶囊高剂量组	0.520±0.058 ^b	0.520±0.058 ^b	0.920±0.058 ^b	0.487±0.058 ^b
尼莫地平组	0.530±0.060 ^b	0.530±0.060 ^b	1.031±0.057 ^b	0.392±0.035 ^b

a: 与假手术组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$ 。

目前研究表明,炎症反应在缺血性脑卒中的发生与发展中起重要作用,TNF-α、IL-6和IL-1β是脑缺血再灌注损伤的关键炎症因子^[9]。龙生蛭胶囊中,君药黄芪的主要成分黄芪甲苷能抑制炎症反应,对大鼠脑缺血损伤有保护作用^[10];君药水蛭也具有一定抗炎、抗纤维化作用,其治疗脑卒中的地位不断提高^[11]。本研究观察了龙生蛭胶囊对炎症因子TNF-α、IL-6的影响,结果显示,与模型组比较,龙生蛭胶囊中、高剂量组大鼠血清TNF-α、IL-6水平均显著降低,表明其具有较好的抗炎作用,可能与方中黄芪、水蛭的抗炎作用有关。

TLR4作为启动炎症反应的一种跨膜蛋白,研究发现其在大鼠的大脑皮质中高表达,与缺血性脑损伤有一定的相关性^[12]。NF-κB是由p65(RelA)与p50(NF-κB1)2个亚基组成的核转录因子,一般情况下,NF-κB以非活性形式存在于细胞质中;病理条件下,TLR4与配体结合后形成TLR4/髓样分化蛋白2复合物并二聚化,与髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88,MyD88)的TLR结构域结合后激活MyD88,形成有活性的TLR/MyD88复合物,再通过其氨基端结构域招募IL-1受体相关激酶家族成员,使其磷酸化后与肿瘤坏死因子受体相关因子6结合,促使NF-κB及其抑制因子解聚,其核定位序列暴露,从而被转运到细胞核内促进NF-κB依赖的基因转录,活化后的NF-κB可加速TNF-α、IL-1β、IL-6等多种炎症因子的表达,进而加重缺血后的脑损伤^[13]。TLR4/NF-κB信号通路激活是NLRP3炎症小体形成的基本步骤,并与活化密切相关。NLRP3炎症小体广泛参

与中枢神经系统疾病,其参与炎症过程通常为TLR或别的识别受体遇到炎症刺激之后,开启NF- κ B通路,引起NLRP3、IL-1 β 前体的表达和转录,实现致炎因子的成熟分泌^[14]。本研究发现,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中TLR4、NF- κ B mRNA,TLR4、NLRP3蛋白的表达,NF- κ B磷酸化均显著上调,细胞核内NF- κ B蛋白表达也显著上调,中、高剂量龙生蛭胶囊可下调TLR4 mRNA及蛋白表达、抑制NF- κ B蛋白磷酸化,减少NF- κ B入核,从而抑制NF- κ B信号通路的激活,下调NLRP3蛋白表达,减少炎症因子的释放。

综上所述,龙生蛭胶囊可能通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路,抑制神经炎症反应,从而达到对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。

参考文献

- [1] 徐开宇,刘玲,尹恕,等.脑-肠轴在缺血性脑卒中及其并发症中的机制探索与应用展望[J].中国科学:生命科学,2023,53(5):594-604.
XU K Y, LIU L, YIN J, et al. The mechanism and application prospects of the brain-gut axis in ischemic stroke and its complications[J]. *Sci Sin Vitae*, 2023, 53(5): 594-604.
- [2] 陈孝男,杨爱琳,赵亚楠,等.缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(3):422-432.
CHEN X N, YANG A L, ZHAO Y N, et al. Research progress on pathogenesis of ischemic stroke and traditional Chinese medicine commonly used for treatment of ischemic stroke[J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(3): 422-432.
- [3] YANG J W, SU J H, WAN F, et al. Tissue kallikrein protects against ischemic stroke by suppressing TLR4/NF- κ B and activating Nrf2 signaling pathway in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 1163-1170.
- [4] 方欢乐,陈衍斌,张飒乐,等.龙生蛭胶囊抑制大鼠动脉粥样硬化形成保护血管内皮功能的分子机制研究[J].中药新药与临床药理,2017,28(1):6-13.
FANG H L, CHEN Y B, ZHANG S L, et al. Protective effects and mechanism of longshengzhi capsules on inhibiting atherosclerosis formation and improving vascular dysfunction in rats[J]. *China Ind Econ*, 2017, 28(1): 6-13.
- [5] 方欢乐,韩宁娟,牛睿.龙生蛭胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用[J].生物化工,2018,4(2):100-102.
FANG H L, HAN N J, NIU R. Protective effects of on brain longshengzhi capsule of cerebral ischemic/reperfusion rats[J]. *Biol Chem Eng*, 2018, 4(2): 100-102.
- [6] 潘宋斌,万琳,邵卫,等.黄角颗粒通过刺激PI3K/AKT/mTOR信号通路减轻脑缺血再灌注大鼠的脑损伤[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(12):1635-1639.
PAN S B, WAN L, SHAO W, et al. Huangjiao granules ameliorate brain injury in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury by stimulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2017, 33(12): 1635-1639.
- [7] 余爱明,闫向丽,郑昊圳,等.补阳还五汤对大鼠缺血性脑中风损伤后轴突再生的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(21):15-20.
YU A M, YAN X L, ZHENG H Z, et al. Effect of Buyang Huanwu Tang on axonal regeneration of rats after ischemic stroke injury[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(21): 15-20.
- [8] 方欢乐,陈衍斌.龙生蛭胶囊治疗缺血性脑中风的临床应用进展[J].世界中医药,2020,15(13):2011-2014.
FANG H L, CHEN Y B. Clinical application progress of longshengzhi capsule in the treatment of ischemic stroke[J]. *World Chin Med*, 2020, 15(13): 2011-2014.
- [9] LIU J, MA W, ZANG C H, et al. Salidroside inhibits NLRP3 inflammasome activation and apoptosis in microglia induced by cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(22): 1694.
- [10] 郑心甜,甘海燕,李琳,等.黄芩甲苷通过促进小胶质细胞/巨噬细胞M2型极化抑制大鼠脑缺血后炎症反应[J].浙江大学学报(医学版),2020,49(6):679-686.
ZHENG X T, GAN H Y, LI L, et al. Astragaloside IV inhibits inflammation after cerebral ischemia in rats through promoting microglia/macrophage M2 polarization[J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2020, 49(6): 679-686.
- [11] 樊佳新,刘金瑛,高莹,等.水蛭制剂治疗脑卒中的作用机制研究进展[J].药学研究,2023,42(1):44-47,62.
FAN J X, LIU J Y, GAO Y, et al. Research on the mechanism of leech preparation in the treatment of stroke[J]. *J Pharm Res*, 2023, 42(1): 44-47, 62.
- [12] 邱燕英,赵勃,方伟蓉,等.Toll样受体与脑缺血的关系及相关药物研究进展[J].医学研究与教育,2019,36(1):6-12.
QIU Y Y, ZHAO B, FANG W R, et al. Advances on the protective effect of medication acting on Toll-like receptors in cerebral ischemia[J]. *Med Res Educ*, 2019, 36(1): 6-12.
- [13] 程建超,张星星,童佳兵,等.芪玉三龙汤对肺癌小鼠肿瘤组织TLR4/MyD88/NF- κ B通路分子表达的影响[J].中药药理与临床,2019,35(5):101-106.
CHENG J C, ZHANG X X, TONG J B, et al. Effect of qiyu sanlong decoction on the molecules expression of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in the tumor tissue of lung cancer mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2019, 35(5): 101-106.
- [14] 张朋,韩荣荣.NLRP3炎症小体:缺血性脑卒中的潜在治疗靶点[J].中风与神经疾病杂志,2023,40(1):89-93.
ZHANG P, HAN R R. NLRP3 inflammatory corpuscles: a potential therapeutic target for ischemic stroke[J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2023, 40(1): 89-93.

(收稿日期:2023-11-14 修回日期:2023-12-14)

(编辑:舒安琴)