

# 白芍总苷抑制局灶性脑缺血大鼠海马神经元损伤的机制研究

李红霞 张益明 陈刚 徐立 陈小丽 代小兰

**【摘要】** **目的** 探讨白芍总苷抑制局灶性脑缺血海马神经元损伤的作用机制。 **方法** 通过短暂性(2h)阻断大脑中动脉制备局灶性脑缺血大鼠模型。白芍总苷高、中、低剂量组分别按 200、100、50mg/kg 灌胃白芍总苷,假手术组、模型组给予 0.9%氯化钠溶液,1 次/d,共 28d。采用 HE 染色法观察海马神经元病理学改变,TUNEL 法观察海马神经元凋亡情况并计算凋亡指数(AI),透射电子显微镜下观察海马神经元超微结构变化,Western blot 法检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、NF- $\kappa$ B 表达,黄嘌呤氧化酶法、生化分析法、硫代巴比妥酸法分别检测抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量,ELISA 法检测炎症细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平。 **结果** 高、中剂量白芍总苷能明显改善海马神经元病理性改变及神经元超微结构病变,抑制海马神经元凋亡( $P < 0.05$ );明显上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax、NF- $\kappa$ B 表达,提高 Bcl-2/Bax(均  $P < 0.05$ );提高 SOD、CAT 活性,降低 MDA 含量(均  $P < 0.05$ );降低 IL-6、TNF- $\alpha$  水平(均  $P < 0.05$ )。其中高剂量白芍总苷可降低 IL-1 $\beta$  水平( $P < 0.05$ )。 **结论** 白芍总苷能调控凋亡相关蛋白表达,抑制氧化应激和炎症级联反应,这些作用可能是其抑制局灶性脑缺血后海马神经元损伤的重要机制。

**【关键词】** 白芍总苷 脑缺血 海马神经元 氧化应激 炎症

Mechanism of total glucosides of paeony inhibiting hippocampal neuron injury in rats with focal cerebral ischemia LI Hongxia, ZHANG Yiming, CHEN Gang, et al. No. 906 Hospital of Joint Services Force of PLA, Ningbo 315000, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanism of total glucosides of paeony inhibiting hippocampus neuron injury in focal cerebral ischemia. **Methods** The rat model of focal cerebral ischemic was established by transiently (2h) blocking the middle cerebral artery. Total glucosides of paeony 200, 100, 50mg/kg were given intraperitoneally to rats in high, middle and low doses group, and 0.9% sodium chloride solution was given to rats in sham operation group and model group, qd for 28d. The pathological examination of central hippocampal neuron was performed by HE staining, the apoptosis of hippocampal neuron were observed by TUNEL and calculated as Apoptosis Index(AI), the hippocampal region was observed by transmission electron microscopy. The expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-associated X protein (Bax), nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) was examined by Western blot, the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) was determined by Xanthinoxidase method, the catalase(CAT) activity was determined by biochemical analysis, the malondialdehyde (MDA) content was determined by thiobarbituric acid method, the levels of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  were detected by ELISA. **Results** The total glucosides of paeony high and middle doses group significantly improved the histopathological changes of the hippocampal neuron and the ultrastructural pathological changes of neuronal organelles, inhibited the apoptosis of hippocampal neuron ( $P < 0.05$ ), significantly up-regulated Bcl-2 protein expression, down-regulated Bax and NF- $\kappa$ B expression, and increased Bcl-2/Bax ratio (all  $P < 0.05$ ), increased SOD, CAT activity and reduced MDA content (all  $P < 0.05$ ), decreased the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  (all  $P < 0.05$ ), meanwhile the high dose also decreased the level of IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Total glucosides of paeony can regulate the expression of apoptosis-related proteins, inhibit oxidative stress and inflammatory response, which may be an important mechanism for the inhibition on hippocampus neuron injury after focal cerebral ischemia.

**【Key words】** Total glucosides of paeony Cerebral ischemic Hippocampal neuron Oxidative stress Inflammatory

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.18.2019-843

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2018A610415)

作者单位:315000 宁波,中国人民解放军联勤保障部队第九〇六医院药械科(李红霞、陈刚、徐立、陈小丽、代小兰),医院办公室(张益明)

通信作者:徐立, E-mail: twgdh131415@163.com

海马神经元与机体多种神经系统功能密切相关,尤其是空间学习记忆能力<sup>[1-2]</sup>。因此,抑制海马神经元损伤对改善缺血性脑损伤患者的临床症状具有至关重要的作用。白芍总苷为毛茛科白芍属植物白芍的活性成分,既往研究发现芍药苷能够改善大鼠认知功能障碍并调节海马神经因子<sup>[3]</sup>。本研究就白芍总苷对局灶性脑缺血损伤大鼠海马神经元的保护作用及其机制作一探讨,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 无特定病原体(SPF)级 8 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 230~260g,购自宁波大学实验动物中心[SYXK(浙)2014-0005],动物批次号:20181030006。实验前清洁环境饲养 1 周,每天光照 12h+黑暗 12h,恒温 25℃,相对湿度 50%~70%,自由饮水、进食。

1.2 主要试剂 白芍总苷胶囊(国药准字 H20055058, 0.3g/粒,批号 201712005,宁波立华制药有限公司);NF- $\kappa$ B、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)多克隆抗体和二喹琳甲酸法(BCA)测定试剂盒(批号 201710013、201801007、201712011、201803002,上海碧云天生物技术有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒及 TUNEL 试剂盒(批号 20180116、20180305、20180324、20171109,南京建成生物工程研究所);IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的 ELISA 试剂盒(批号 180117、171230、171125,北京华英生物技术研究所)。

1.3 主要仪器 Multiskan MK-3 型酶标仪(芬兰 Thermo 公司);SZ-1 型组织匀浆器(江苏金坛市晶玻实验仪器厂);DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);DU700 型紫外可见分光光度计(美国 Beckman Coulter 公司);H-7650 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);RM2125 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);BH-2 型倒置光学显微镜及摄像(日本 Olympus 公司)。

## 1.4 实验方法

1.4.1 模型建立 参照王新风等<sup>[4]</sup>报道的实验方法,建立局灶性脑缺血大鼠模型。(1)线栓制作:取直径 0.235mm 钓鱼线并剪制 3.5cm 长度分段,轻轻灼烧一侧呈钉子帽状,在距离“钉子帽”一侧 18~20mm 处作标记,备用。(2)模型制备:大鼠腹腔注射 10%水合氯醛溶液麻醉,颈部正中作切口,剥离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉(充分暴露 3 者分叉处),结扎颈外动脉,于颈总动脉分叉处近心端作一切口,插入线栓至颈内动脉,遇阻力停止,深度距分叉处约 18mm,固定线栓后逐层缝合,消

毒。假手术组大鼠除不插入线栓外,其余操作同模型组。1.4.2 分组与给药 将造模成功的 100 只大鼠按随机数字表法分为模型组、白芍总苷高剂量组(200mg/kg)、中剂量组(100mg/kg)、低剂量组(50mg/kg),每组 25 只;假手术组大鼠 25 只。术后第 2 天开始灌胃给药,白芍总苷高、中、低剂量组分别将相应剂量的白芍总苷溶于 3ml 的 0.9%氯化钠溶液中,假手术组和模型组给予等量的 0.9%氯化钠溶液;1 次/d,共 28d。

1.4.3 海马神经元病理学观察 每组大鼠随机取 10 只,腹腔注射 10%水合氯醛溶液麻醉后开胸、暴露心脏,于左心室植入一灌注针头、右心耳作一切口,快速灌注 0.9%氯化钠溶液,直至右心耳切口处流出的液体清澈停止;再用 4%多聚甲醛溶液继续灌注固定,灌注速度由快变慢,待大鼠完全僵硬后,断头取脑分离出海马组织,置 4%多聚甲醛溶液固定 24h,石蜡包埋、切片(厚 2 $\mu$ m),二甲苯透明、梯度乙醇脱蜡、水化处理,再行 HE 染色。在倒置光学显微镜下观察并照相保存。

1.4.4 海马神经元凋亡情况观察 取上述制备的海马组织石蜡切片,经脱蜡、水化处理后,进行 TUNEL 法染色。在倒置光学显微镜下观察并照相,细胞核棕黄色为阳性着色。每只大鼠随机取 5 张染色切片,每张切片取 5 个互不重叠的视野,计数每个视野细胞总数及凋亡细胞数。凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数/细胞总数) $\times$ 100%。

1.4.5 超微结构观察 取各组 5 只大鼠,按上述方法心脏灌注固定至肝脏颜色明显变淡时,立即断头取脑并分离出海马组织,切割成约 1mm<sup>3</sup> 小块后置 4℃预冷的 3%戊二醛溶液中,于 4℃冰箱内固定 2h;PBS 浸洗 30min,置 1%四氧化锇溶液中,于 4℃冰箱内再固定 2h;依次经梯度乙醇脱水、还原丙烷置换、环氧树脂 Epon812 浸透、包埋、聚合、光学显微镜下定位,超薄切片(60nm)经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,在 10 000 倍透射电子显微镜下观察海马神经元超微结构并拍照。

1.4.6 凋亡相关蛋白(NF- $\kappa$ B、Bcl-2、Bax)表达检测 采用 Western blot 法。(1)蛋白提取:取各组剩余 10 只大鼠,腹腔注射 10%水合氯醛溶液麻醉后,迅速置 PBS 冻结的冰块上取脑并分离出海马组织,置离心管中加入 9 倍量放射免疫沉淀法蛋白裂解液,将离心管置于盛有冰水混合物的烧杯中,研磨匀浆,低温高速离心(4℃,12 000rpm)15min 后取上清液,-70℃冰箱保存,备检。(2)总蛋白含量测定:严格按照 BCA 测定试剂盒说明进行操作,使用酶标仪测定 562nm 处吸光度值,根据测定的标准曲线计算总蛋白浓度。(3)Western blot 检测:蛋白样本经沸水 10min 高温变性处理后,上样、十二

烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(电压 130V,待溴酚蓝电泳至凝胶底部时停止)、转 PVDF 膜(电压 100V、2h),丽春红溶液染膜、洗膜,5%脱脂奶粉封闭 1h,滴加一抗[NF- $\kappa$ B、Bcl-2、Bax、 $\beta$ -actin(1:500)],4 $^{\circ}$ C摇床过夜;洗膜后滴加二抗(1:100),室温摇床孵育 1h;洗膜后滴加电化学发光底物,室温孵育 1min。利用凝胶成像系统对胶片上相应条带进行扫描,通过条带灰度值计算蛋白含量。

1.4.7 抗氧化酶(SOD、CAT)活性及 MDA 含量检测 取上述海马组织匀浆液,严格按照各试剂盒说明进行操作。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,生化分析法测定 CAT 活性,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。

1.4.8 炎症细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )水平检测 取上述海马组织匀浆液,严格按照 ELISA 检测试剂盒说明进行操作,使用酶标仪测定 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计软件。计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较采用两独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马神经元病理学改变的影响 假手术组大鼠海马神经元结构完整清晰、排列整齐、层次清晰(呈 3~5 层),未见异常;模型组海马神经元数量减少、间隙增大、层次不清,细胞边界不清、胞体肿胀变大、核固缩偏移等,呈明显病理性形态结构改变;白芍总苷低、中、高剂量组海马神经元上述病理性改变较模型组不同程度减轻,高剂量组最明显:神经元排列较为整齐、细胞分界清晰,可见少量神经元形态结构异常,见图 1(插页)。

2.2 白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马神经元凋亡的影响 模型组大鼠海马神经元凋亡数量明显多于假手术组,白芍总苷低、中、高剂量组海马神经元凋亡数量较模型组不同程度减少,见图 2(插页)。模型组 AI 为(58.76 $\pm$ 9.48)%,明显高于假手术组的(2.37 $\pm$ 0.98)%,差异有统计学意义( $P<0.05$ );白芍总苷中、高剂量组 AI 分别为(31.84 $\pm$ 7.09)%、(25.47 $\pm$ 6.28)%,均低于模型组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );白芍总苷低剂量组 AI 为(49.93 $\pm$ 10.27)%,与模型组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.3 白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马神经元超微结构的影响 假手术组大鼠海马神经元超微结构未见异常。模型组海马神经元出现明显的病理性超微结构改变,包括胞

膜破裂、碎片;胞浆溶解呈空泡状;核膜破裂、核仁边界不清、周围间隙增大;线粒体数量减少、体积增大、嵴断裂溶解、嵴内间隙增大;内质网颗粒脱落;高尔基体肿胀变大等。白芍总苷低、中、高剂量组上述病理性超微结构改变较模型组呈不同程度减轻,其中高剂量组最显著,见图 3(插页)。

2.4 白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马 Bcl-2、Bax、NF- $\kappa$ B 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 的影响 模型组大鼠海马 Bcl-2、Bax、NF- $\kappa$ B 蛋白较假手术组均明显上调,Bcl-2/Bax 降低,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );白芍总苷中、高剂量组大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达上调,Bax、NF- $\kappa$ B 蛋白表达明显下调,与模型组比较差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),见表 1 和图 4。

表 1 各组大鼠海马 Bcl-2、Bax、NF- $\kappa$ B 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比较

组别	n	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin	Bcl-2/Bax
假手术组	10	0.36 $\pm$ 0.11	0.14 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.10	2.56 $\pm$ 1.03
模型组	10	0.50 $\pm$ 0.14*	0.79 $\pm$ 0.21*	1.08 $\pm$ 0.27*	0.64 $\pm$ 0.27*
低剂量组	10	0.63 $\pm$ 0.24	0.64 $\pm$ 0.19	0.79 $\pm$ 0.25 $\Delta$	0.98 $\pm$ 0.38 $\Delta$
中剂量组	10	1.09 $\pm$ 0.35 $\Delta$	0.37 $\pm$ 0.11 $\Delta$	0.57 $\pm$ 0.19 $\Delta$	2.92 $\pm$ 1.07 $\Delta$
高剂量组	10	1.36 $\pm$ 0.52 $\Delta$	0.22 $\pm$ 0.07 $\Delta$	0.47 $\pm$ 0.14 $\Delta$	6.17 $\pm$ 2.35 $\Delta$
F 值		19.39	38.65	16.44	30.36
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

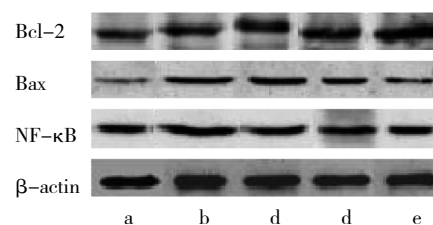


图 4 各组大鼠海马 Bcl-2、Bax、NF- $\kappa$ B 蛋白表达的电泳图(a:假手术组;b:模型组;c:低剂量组;d:中剂量组;e:高剂量组)

2.5 白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马 SOD、CAT 活性均明显降低,MDA 含量明显升高,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );与模型组比较,白芍总苷中、高剂量组大鼠海马 SOD、CAT 活性均明显升高,MDA 含量明显降低,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),见表 2。

2.6 白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均明显升高,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );与模型组比较,白芍总苷中、高剂量组大鼠海马 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均明显降低,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),见表 3。

表 2 各组大鼠海马 SOD、CAT 活性及 MDA 含量比较

组别	n	SOD(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	MDA( $\mu$ mol/g prot)
假手术组	10	168.45 ± 15.28	5.23 ± 1.30	17.40 ± 3.19
模型组	10	141.73 ± 13.27*	2.69 ± 0.87*	29.57 ± 5.26*
低剂量组	10	143.25 ± 15.06	3.09 ± 1.17	26.24 ± 4.39
中剂量组	10	154.82 ± 11.42 <sup>△</sup>	3.88 ± 1.36 <sup>△</sup>	19.76 ± 3.80 <sup>△</sup>
高剂量组	10	160.33 ± 12.15 <sup>△</sup>	4.16 ± 1.52 <sup>△</sup>	17.32 ± 3.41 <sup>△</sup>
F 值		7.04	6.14	18.54
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,\* $P$ <0.05;与模型组比较,<sup>△</sup> $P$ <0.05

表 3 各组大鼠海马 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较(nmol/L)

组别	n	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
假手术组	10	508.42 ± 36.13	101.62 ± 14.37	24.95 ± 4.71
模型组	10	917.86 ± 87.04*	214.18 ± 25.04*	54.27 ± 6.83*
低剂量组	10	870.05 ± 91.52	192.43 ± 27.15	50.01 ± 5.72
中剂量组	10	714.39 ± 69.28 <sup>△</sup>	180.52 ± 23.60 <sup>△</sup>	42.94 ± 6.15 <sup>△</sup>
高剂量组	10	675.07 ± 71.43 <sup>△</sup>	134.16 ± 17.95 <sup>△</sup>	36.98 ± 5.74 <sup>△</sup>
F 值		49.25	42.76	38.54
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,\* $P$ <0.05;与模型组比较,<sup>△</sup> $P$ <0.05

### 3 讨论

脑血管病是临床常见病、多发病,其中缺血性脑血管病占 70%以上,具有高致残率和高致死率,严重危害着人类生命与健康<sup>[5-6]</sup>。海马是与认知、学习记忆功能密切相关的脑区,而海马神经元对缺血、缺氧最为敏感<sup>[7-8]</sup>,因此保护海马神经元对减少认知障碍等并发症具有重要作用。

白芍总苷是我国传统中药白芍的主要活性成分,具有多种药理学活性。本研究发现白芍总苷能明显改善局灶性脑缺血大鼠海马神经元层次不清、排列紊乱、神经元数量减少、间隙增大、胞体肿胀变大、核固缩偏移等病理性改变;抑制神经元凋亡;抑制神经元细胞膜、细胞质、细胞核、细胞器等出现的超微结构病变。病理生理学研究发现,多种机制参与脑缺血所致海马神经元损伤病理过程,其中氧化应激<sup>[9-10]</sup>、炎症级联反应<sup>[11-12]</sup>、细胞凋亡<sup>[11]</sup>具有重要的作用。脑缺血后氧自由基大量生成、抗氧化酶(SOD、CAT)失活及过度消耗是导致氧化应激的根本原因,氧自由基能氧化不饱和脂肪酸并破坏细胞膜,还能损伤核酸、引发 DNA 断裂等;脂质过氧化最终产物为 MDA,其含量与氧自由基数量呈正相关,是评价氧化应激损伤程度的敏感指标<sup>[13]</sup>。白芍总苷是一种天然抗氧化剂,具有良好的抗氧化作用<sup>[14]</sup>,本研究发现白芍总苷能明显提高局灶性脑缺血大鼠缺血侧海马 SOD、CAT 活

性并降低 MDA 含量;提示白芍总苷能恢复缺血侧海马已耗尽的抗氧化能力,从而抑制其氧化应激反应。

脑缺血能病理性刺激小胶质细胞和星形胶质细胞,从而过度释放炎症因子(如细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶等),进一步促进内皮细胞黏附分子的表达,使缺血区脑组织炎症细胞、中性粒细胞聚集<sup>[15]</sup>;中性粒细胞可分泌细胞因子而进一步活化胶质细胞<sup>[16]</sup>,从而形成炎症级联反应。活化的小胶质细胞、星形胶质细胞和神经细胞内炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  表达上调,而 IL-1 $\beta$  水平升高可刺激另一种炎症细胞因子 IL-6 表达上调<sup>[17]</sup>,IL-6 水平与脑梗死体积密切相关。因此,IL-6 可作为脑组织损伤的评价指标<sup>[18]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种促炎细胞因子,脑缺血早期即可检测到 TNF- $\alpha$  表达上调。有研究证实,通过阻断 TNF- $\alpha$  表达能降低 DNA 碎片、减轻缺血侧脑损伤<sup>[19]</sup>。李振彬等<sup>[20]</sup>研究证实,白芍总苷具有炎症抑制作用。本研究结果发现,白芍总苷能明显降低局灶性脑缺血大鼠缺血侧海马 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,提示白芍总苷具有抑制缺血侧海马炎症反应的作用。

脑缺血发生后,缺血核心区神经元在数小时甚至几分钟内即发生不可逆坏死,而缺血核心区与正常脑组织之间的“半暗带”神经元死亡以凋亡为主要表现。细胞凋亡机制非常复杂,多种蛋白或活化蛋白酶参与凋亡过程的调控。Bcl-2 蛋白家族通过影响线粒体膜通透性而在细胞凋亡信号传导中发挥重要作用<sup>[21]</sup>,其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 能将凋亡激活因子(Apaf-1)固定在线粒体膜上,从而抑制其发挥凋亡诱导作用。Bcl-2 能通过抑制谷胱甘肽外泄而调控细胞内氧化还原电位,从而控制膜电位、抑制细胞凋亡;此外,促凋亡蛋白 Bax 为小分子细胞色素 C 提供通道,由线粒体进入胞质而促进细胞凋亡,而 Bcl-2 蛋白能与 Bax 蛋白形成同源二聚体,抑制 Bax 活性,关闭 Bax 通道而阻止小分子通过,从而拮抗 Bax 促凋亡作用。因此 Bcl-2/Bax 可反映两者在细胞凋亡调控中的作用<sup>[22]</sup>。氧自由基是 NF- $\kappa$ B 蛋白的重要激活剂<sup>[23]</sup>,活化 NF- $\kappa$ B 蛋白能进入细胞核,并与凋亡相关基因 c-myc 结合,从而促进其转录表达,在细胞凋亡过程中发挥重要作用。齐晖等<sup>[24]</sup>研究发现,活化 NF- $\kappa$ B 蛋白在炎症反应与细胞凋亡之间具有重要的桥梁作用。本研究结果发现,白芍总苷能明显上调局灶性脑缺血大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax、NF- $\kappa$ B 蛋白表达,提高 Bcl-2/Bax,这可能是白芍总苷抑制缺血侧海马神经元凋亡的重要分子机制。

综上所述,白芍总苷对局灶性脑缺血大鼠海马神经元病理性改变及超微结构病变具有保护作用,作用机制

可能与其调控凋亡相关蛋白表达、抑制氧化应激和炎症级联反应有关。

#### 4 参考文献

- [1] 詹向红, 吕茹, 王慧霞, 等. 长期负性情绪应激对大鼠学习记忆及海马  $Ca^{2+}/CaM$ -CaMKII-CREB 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(4):886-889. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2019.04.039.
- [2] 冯安琪, 刘楠, 朴美花, 等. 异氰酸酯对缺氧 APP/PS1 转基因阿尔茨海默病模型小鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(1):24-29. DOI:10.13481/j.1671-587x.20180105.
- [3] 李健, 刘春娜, 刘新宇, 等. 芍药苷对认知功能障碍小鼠学习记忆功能和海马神经因子的影响[J]. 江苏医药, 2014, 40(12): 1365-1367. DOI:10.19460/j.cnki.0253-3685.2014.12.001.
- [4] 王新风, 张腾飞, 程谦谦, 等. 线栓法制作大鼠局灶性缺血性脑梗死模型方法研究[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(5):33-36.
- [5] 朱慧颖, 余萍, 梅俊华, 等. 急性脑梗死患者脑微出血的危险因素及其对心脑血管事件发生率影响的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(3):88-92. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.017.
- [6] 刘杰, 黄鹏, 张慧敏, 等. 血浆同型半胱氨酸水平与老年高血压患者冠心病和/或缺血性脑血管病的关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26(9):20-24. DOI:10.3969/j.issn.1008-5971.2018.09.y02.
- [7] 巩红岩, 郑芳, 左志超, 等. TRPM7 在七氟烷预处理抑制大鼠氧糖剥夺海马神经元凋亡和炎症反应中的作用[J]. 重庆医学, 2018, 47(14): 1857-1861. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.14.005.
- [8] 王伟, 李富强, 刘荣志, 等. 丁苯酞预处理对缺血再灌注大鼠海马神经元超微结构的影响[J]. 解剖学杂志, 2017, 40(4): 421-424. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2017.04.013.
- [9] Li W, Qinghai S, Kai L, et al. Oral administration of Ginkgolide B alleviates hypoxia-induced neuronal damage in rat hippocampus by inhibiting oxidative stress and apoptosis[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(2): 140-145. DOI:10.22038/ijbms.2018.26228.6569.
- [10] Chen HC, Lee JK, Yip T, et al. Sub-acute restraint stress progressively increases oxidative/nitrosative stress and inflammatory markers while transiently upregulating antioxidant gene expression in the rat hippocampus[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130:446-457. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.007.
- [11] Shafahi M, Vaezi G, Shajiee H, et al. Crocin inhibits apoptosis and astrogliosis of hippocampus neurons against methamphetamine neurotoxicity via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms[J]. Neurochem Res, 2018, 43(12):2252-2259. DOI:10.1007/s11064-018-2644-2.
- [12] Bayani GFE, Marpaung NLE, Simorangkir DAS, et al. Anti-inflammatory effects of hibiscus sabdariffa linn on the IL-1 $\beta$ /IL-1ra ratio in plasma and hippocampus of overtrained rats and correlation with spatial memory[J]. Kobe J Med Sci, 2018, 64(2): 73-83.
- [13] Bagheri S, Sarabi MM, Khosravi P, et al. Effects of pistacia atlantica on oxidative stress markers and antioxidant enzymes expression in diabetic rats[J]. J Am Coll Nutr, 2019, 38(3):267-274. DOI:10.1080/07315724.2018.1482577.
- [14] 刘芬, 詹文红. 白芍总苷体外抗氧化活性研究[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(2):132-135. DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.02.004.
- [15] Okuyama S, Katoh M, Kanzaki T, et al. Auraptene/Naringin-Rich Fruit Juice of Citrus kawachiensis (Kawachi Bankan) Prevents Ischemia-Induced Neuronal Cell Death in Mouse Brain through Anti-Inflammatory Responses[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2019,65(1):66-71. DOI:10.3177/jnsv.65.66.
- [16] Fontana J, Vogt A, Hohenstein A, et al. Impact of Steroids on the inflammatory response after ischemic acute kidney injury in rats [J]. Indian J Nephrol, 2017, 27(5):365-371. DOI:10.4103 /ijn. IJN4017.
- [17] Hirano S, Zhou Q, Furuyama A, et al. Differential Regulation of IL-1 $\beta$  and IL-6 Release in Murine Macrophages[J]. Inflammation, 2017, 40(6):1933-1943. DOI:10.1007/s10753-017-0634-1.
- [18] Akinyemi R, Arnett DK, Tiwari HK, et al. Interleukin-6 (IL-6) rs1800796 and cyclin dependent kinase inhibitor (CDKN2A/CDKN2B) rs2383207 are associated with ischemic stroke in indigenous West African Men[J]. Stroke, 2017, 379:229-235. DOI:10.1016/j.jns.2017.05.046.
- [19] Wang Y, Ren Q, Zhang X, et al. Neuroprotective Mechanisms of Calycosin Against Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(2):537-546. DOI:10.1159/000487031.
- [20] 李振彬, 马旭, 杨静, 等. 白芍总苷治疗大鼠急性痛性关节炎的作用及对血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的影响[J]. 新医学, 2017, 48(6): 380-384. DOI:10.3969/j.issn.0253-9802.2017.06.004.
- [21] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6805):802-809. DOI:10.1038/35037739.
- [22] Saeedi Borujeni MJ, Hami J, Haghiri H, et al. Evaluation of Bax and Bcl-2 Proteins Expression in the Rat Hippocampus due to Childhood Febrile Seizure[J]. Iran J Child Neurol, 2016, 10(1): 53-60.
- [23] Zhang Q, Huang WD, Lv XY, et al. Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF- $\kappa$ B and mitochondria-mediated signaling[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 654(2):142-149. DOI:10.1016/j.ejphar.2010.12.011.
- [24] 齐晷, 田玉, 孙超, 等. NF- $\kappa$ B 信号通路的阻断对类风湿关节炎滑膜细胞凋亡与炎症的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(24):7022-7024. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.24.025.

(收稿日期:2019-03-20)

(本文编辑:陈丹)