

葡萄籽原花青素联合亚低温通过 ERK/Nrf2/HO-1 通路对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

苏 凡¹, 申 俊¹, 刘娜娜¹, 宋 菲¹, 马珊珊²

1. 开封市中心医院 手术室, 河南 开封 475000

2. 郑州市中心医院 呼吸科, 河南 郑州 450007

摘要: 目的 基于 ERK/Nrf2/HO-1 通路探讨葡萄籽原花青素 (GSP) 联合亚低温 (MHT) 对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用。方法 大鼠随机分为假手术组、模型组、MHT 组、GSP 组、MHT+GSP 组。采用线栓法建立脑缺血再灌注损伤大鼠模型。评估各组大鼠神经功能缺损评分 (NDS), TTC 法观察并计算脑梗死面积, 尼氏染色观察脑组织病理学变化, TUNEL 法计算细胞凋亡指数, 酶联免疫吸附法检测脑组织丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平, Western blotting 检测 Bax、Bcl-2、p-ERK1/2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠 NDS、脑梗死面积、AI、脑组织 MDA 水平、Bax、p-ERK1/2、胞质和胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活力和 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, MHT 组、GSP 组和 MHT+GSP 组大鼠 NDS、脑梗死面积、AI、脑组织 MDA 水平、Bax 和胞质 Nrf2 蛋白显著降低 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活力、Bcl-2、p-ERK1/2、胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。且 MHT+GSP 组的治疗疗效高于 MHT 组和 GSP 组。结论 MHT 和 GSP 联合作用可能通过激活 ERK/Nrf2/HO-1 通路, 上调 p-ERK1/2、胞核 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达, 抑制氧化应激, 发挥脑保护作用。

关键词: 葡萄籽原花青素; 亚低温; 脑缺血再灌注; ERK/Nrf2/HO-1 通路; 脑保护作用

中图分类号: R966; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)03-0426-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.007

Protective effects of grape seed proanthocyanidins combined with mild hypothermia on cerebral ischemia-reperfusion injury through ERK/Nrf2/HO-1 pathway in mice

SU fan¹, SHEN Jun¹, LIU Na-na¹, SONG Fei¹, MA Shan-shan²

1. Operating Room, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng 475000, China

2. Department of Respiration, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou 450007, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of grape seed proanthocyanidins (GSP) combined with mild hypothermia (MHT) on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats based on ERK/Nrf2/HO-1 pathway. **Methods** Mice were randomly divided into sham operation group, model group, MHT group, GSP group, and MHT + GSP group. Mice with cerebral ischemia-reperfusion injury were established by thread embolization. The neurological deficit score (NDS) of rats in each group were evaluated, and the cerebral infarction area observed and calculated by TTC method. The brain histopathological changes were observed by Nissl staining, and apoptotic index was calculated by TUNEL method. The MDA, SOD, and GSH-Px in brain tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and Bax, Bcl-2, p-ERK1/2, Nrf2, and HO-1 protein expression were measured by Western blotting analysis. **Results** Compared with sham-operated group, NDS, cerebral infarction area, AI, and MDA content in brain tissue, Bax, p-ERK1/2, Nrf2, and HO-1 protein expression in cytoplasm and nucleus were significantly increased ($P < 0.05$), but SOD, GSH-Px activity, Bcl-2 protein expression were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, NDS, cerebral infarction area, AI and MDA content in brain tissue, Bax, and cytoplasmic Nrf2 protein were significantly decreased in MHT group, GSP group and MHT+GSP group ($P < 0.05$), but Bcl-2, p-ERK1/2, Nrf2 and HO-1 protein expression in nucleus were significantly increased ($P < 0.05$). And the therapeutic effect of MHT + GSP group was higher than that of MHT group and GSP group. **Conclusion** The combined effect of

收稿日期: 2020-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81601078)

作者简介: 苏 凡, 从事围术期低体温方面研究。E-mail: sgfang1974@163.com

MHT and GSP may play a protective role in brain by activating ERK/Nrf2/HO-1 pathway, up-regulating the expression of p-ERK1/2, Nrf2 and HO-1 protein in nucleus, inhibiting oxidative stress.

Key words: grape seed proanthocyanidins; mild hypothermia; cerebral ischemia-reperfusion; ERK/Nrf2/HO-1 pathway; brain protection

脑梗死具有较高的发病率和死亡率,严重危害中老年患者健康,寻找有明确疗效且作用机制清晰的预防和治疗脑梗死的药物是当前研究的前沿课题和热点领域。ERK/Nrf2/HO-1 信号通路在脑缺血再灌注损伤中发挥重要作用,通过上调 p-ERK/2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达可保护局灶性脑缺血再灌注大鼠脑损伤^[1]。亚低温(MHT)是目前已被证实对脑组织神经有保护作用的治疗措施之一^[2]。研究发现 MHT 可能通过低氧诱导因子-1 α 介导内皮生长因子上调,促进缺血组织区新生血管的生成,对缺血性脑卒中发挥保护作用^[3]。MHT 干预可能通过激活 Nrf2-ARE 信号通路,促进 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达,提高心肺复苏的成功率,减轻窒息脑损伤^[4]。葡萄籽原花青素(GSP)是从葡萄籽中提取的生物类黄酮,具有较强的清除自由基、抗氧化活性。GSP 可以减轻缺血再灌注大鼠脑缺血区病理改变,减轻脂质过氧化,改善大鼠学习和记忆功能,发挥脑保护作用^[5]。有报道称 GSP 可改善糖尿病视网膜病变大鼠视网膜结构,降低视网膜细胞凋亡,促进 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达,保护糖尿病视网膜功能^[6]。本研究通过线栓法建立脑缺血再灌注损伤大鼠模型,基于 ERK/Nrf2/HO-1 信号通路,研究 GSP 和 MHT 联合作用对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及可能的作用机制,为 MHT 和 GSP 的临床合理使用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,清洁级,8 周龄,体质量 170~220 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号 SCXK(沪)2017-0009。大鼠自由饮水和饮食,饲养温度 20~25 °C,湿度 50%~56%,每天给予大鼠 12 h 光照。

1.2 试剂和仪器

GSP,质量分数为 99.83%,天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,批号 20180126;脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒,艾美捷科技有限公司,批号 20180121;丙二醛(MDA,批号 20171225)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 20180121)和谷胱甘肽过氧化物酶

(GSH-Px,批号 20170912)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Bax(货号 SC-7480)和 Bcl-2(货号 SC-7382)抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;ERK(批号 SC-18263)和 p-ERK(批号 SC-18264)单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗 Nrf2 多克隆抗体(批号 SC-18315),美国 Santa Cruz;兔抗 HO-1 多克隆抗体(批号 174234),美国 Enzo Life Sciences。垂直电泳仪,美国 Bio-Rad;E-Gel Imager 凝胶成像仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;CX40 显微镜观察,苏州工业园区汇光科技有限公司;FRD-4C 荧光显微镜,北京世纪科信科学仪器有限公司。

1.3 动物分组和模型建立

大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为假手术组、模型组、MHT 组、GSP 组和 GSP+MHT 组,每组 12 只。采用改良线栓法建立脑缺血再灌注损伤大鼠模型^[7]。假手术组只分离颈部血管,不插线处理。脑缺血再灌注后,MHT 组大鼠 ip 等量生理盐水的同时,将电子体温计探头插入大鼠肛门检测大鼠体温,并采用酒精喷洒大鼠腹部进行物理降温,10 min 内诱导到目标温度,控制大鼠体温在(33±1)°C,维持 3 h 后室温条件下进行复温处理^[4];GSP 组立即 ip 100 mg/kg GSP^[5];GSP+MHT 组大鼠 ip 100 mg/kg GSP 的同时进行 MHT 处理,维持体温在(33±1)°C;假手术组和模型组 ip 等量生理盐水。

1.4 神经功能缺损(NDS)评分

于处死前参照文献^[8]5 分制评分方法评估各组大鼠神经功能变化,其中 0 分:活动基本正常,无明显神经病学症状;1 分:左侧前爪无法完全伸展;2 分:爬行时向左侧转圈;3 分:行走时向偏瘫侧倾倒;4 分:不能自动行走,有意识障碍。

1.5 脑梗死面积测定

大鼠 NDS 评估后,ip 10%水合氯醛麻醉,断头处理,取脑组织后切片(厚度 2 mm),连续切 5 片,放入 2%氯化三苯四氮唑(TTC)染液中,于 37 °C 恒温箱中避光染色 30 min,4%多聚甲醛固定 24 h,采用 HPIAS-100 软件分析后计算脑梗死面积。

1.6 脑组织尼氏染色结果

取大鼠海马组织,4%多聚甲醛固定 24 h 后,

常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制作切片,常规脱蜡复水,甲苯胺蓝尼氏染色液染色3~10 min,中性树胶封片后于光学显微镜下观察海马区尼氏体分布和数量,并拍照。

1.7 脑组织细胞凋亡情况

将各组大鼠脑组织石蜡切片(5 μm),4%多聚甲醛固定,严格按照TUNEL试剂盒说明书进行后续操作。每组随机选取5个视野,统计TUNEL阳性细胞数与细胞总数,计算脑组织细胞凋亡指数(AI)。

AI=TUNEL 阳性细胞数/细胞总数

1.8 脑组织MDA、SOD和GSH-Px水平检测

取适量脑组织,制成10%匀浆,严格参照试剂盒说明书进行操作,检测MDA、SOD和GSH-Px水平。

1.9 Western blotting 检测蛋白表达

取大鼠脑组织,按说明书提取全细胞蛋白、胞核蛋白和胞质蛋白,BCA法定量蛋白含量。取一定量蛋白质,加入上样缓冲液,95℃煮沸5 min,进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后,将蛋白条带转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶37℃封闭1 h。TBST洗膜后,分别加入一抗,4℃孵育12 h。TBST洗膜,加入二抗,37℃孵育2 h。TBST洗膜,加入ECL发光液,避光显影,凝胶成像系统自动显影,测定各蛋白条带灰度值。以β-actin为内参,目的蛋白与β-actin条带灰度值的比值表示各目的蛋白的相对表达水平。

1.10 统计学分析

采用SPSS 21.0软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 GSP联合MHT对大鼠NDS评分的影响

与假手术组比,模型组大鼠NDS评分显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,MHT组、GSP组和GSP+MHT组NDS评分均显著降低($P < 0.05$)。与MHT组和GSP组比,GSP+MHT组NDS评分显著降低($P < 0.05$),见表1。

2.2 GSP联合MHT对大鼠脑梗死面积的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死面积显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,MHT组、GSP组和GSP+MHT组大鼠脑梗死面积均显著降低($P < 0.05$)。与MHT组和GSP组比,GSP+MHT组大

鼠脑梗死面积显著降低($P < 0.05$)。见图1、表2。

表1 GSP联合MHT对大鼠NDS评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of GSP combined with MHT on NDS score in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	温度/剂量	NDS 评分
假手术	—	0
模型	—	$2.59 \pm 0.34^{\#}$
MHT	$(33 \pm 1)^{\circ}\text{C}$	$1.78 \pm 0.29^{*}$
GSP	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1.71 \pm 0.30^{*}$
GSP+MHT	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ $(33 \pm 1)^{\circ}\text{C}$	$0.92 \pm 0.21^{* \Delta \Delta}$

与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$; 与MHT组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与GSP组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs MHT group; $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ vs GSP group

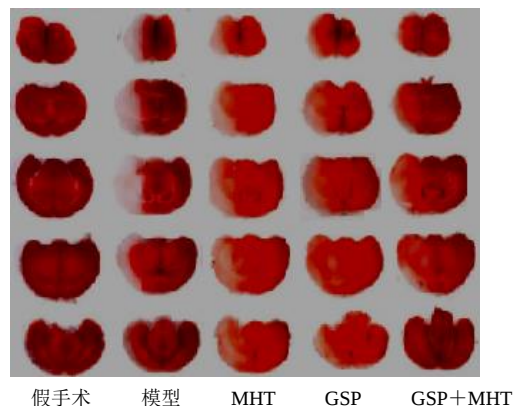


图1 大鼠脑组织TTC染色结果

Fig. 1 TTC staining results of rats brain tissue

表2 GSP联合MHT对大鼠脑梗死面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of GSP combined with MHT on cerebral infarction area in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	温度/剂量	脑梗死面积/%
假手术	—	0
模型	—	$26.29 \pm 0.67^{\#}$
MHT	$(33 \pm 1)^{\circ}\text{C}$	$13.68 \pm 0.49^{*}$
GSP	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$8.97 \pm 0.42^{*}$
GSP+MHT	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ $(33 \pm 1)^{\circ}\text{C}$	$5.91 \pm 0.40^{* \Delta \Delta}$

与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$; 与MHT组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与GSP组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs MHT group; $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ vs GSP group

2.3 GSP联合MHT对大鼠脑组织尼氏染色结果的影响

假手术组脑组织神经胞浆中有大量深蓝色尼氏体,颜色较深;模型组尼氏体数量减少,且颜色变浅;MHT组、GSP组和GSP+MHT组尼氏体数量不同程度增多,GSP+MHT组变化最为明显,见图2。

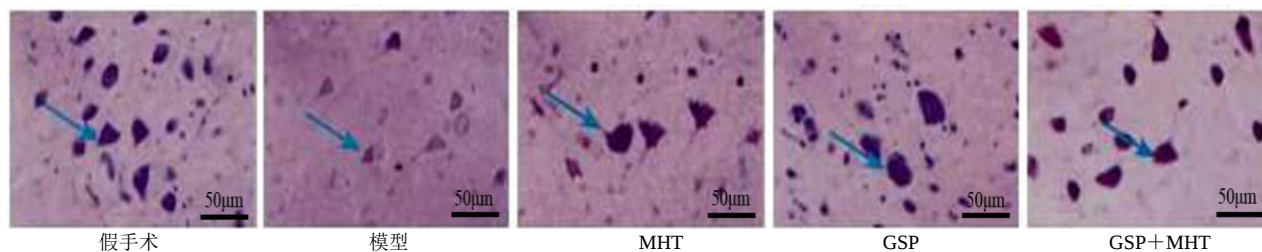


图2 大鼠脑组织尼氏染色结果(×400)

Fig. 2 TTC staining results of brain tissue in mice (×400)

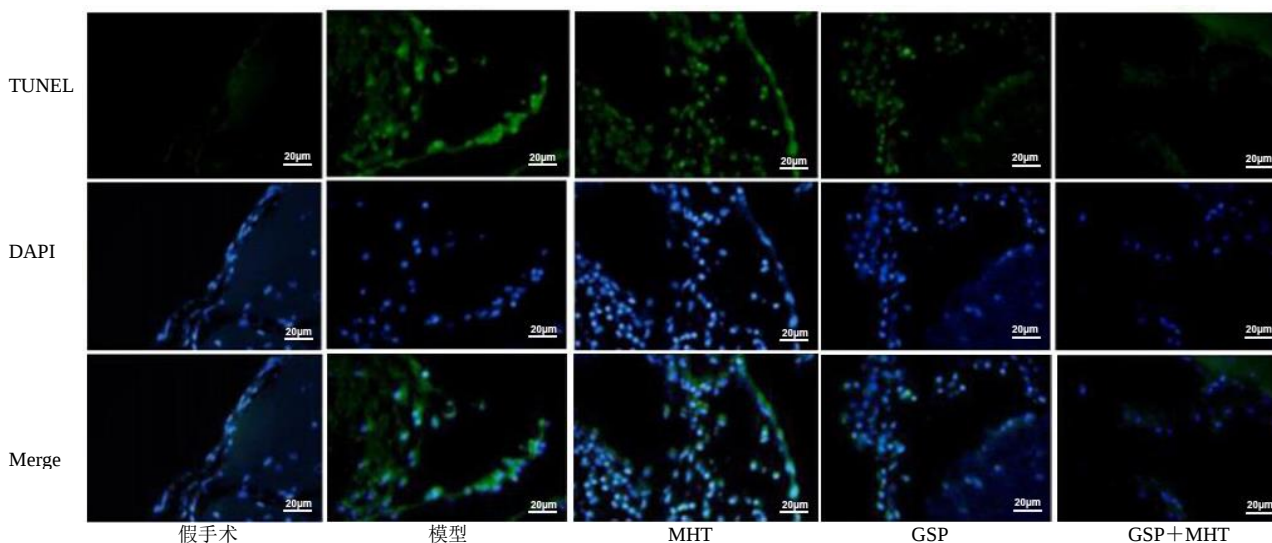


图3 大鼠脑组织 TUNEL 染色结果(×400)

Fig. 3 TUNEL staining results of brain tissue in mice (×400)

表3 GSP联合MHT对大鼠脑组织AI的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Effect of GSP combined with MHT on AI of brain tissues in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	温度/剂量	AI/%
假手术	—	2.57 ± 0.12
模型	—	$34.06 \pm 0.74^{\#}$
MHT	$(33 \pm 1)^{\circ}\text{C}$	$21.89 \pm 0.56^{*}$
GSP	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$17.12 \pm 0.45^{*}$
GSP+MHT	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ $(33 \pm 1)^{\circ}\text{C}$	$7.54 \pm 0.38^{*\Delta\Delta}$

与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$; 与 MHT 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与 GSP 组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs MHT group; $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ vs GSP group

2.4 GSP联合MHT对大鼠脑组织AI的影响

与假手术组比较,模型组大鼠AI显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,MHT组、GSP组和GSP+MHT组大鼠AI均显著降低($P < 0.05$)。与MHT组和GSP组比,GSP+MHT组大鼠AI显著降低($P < 0.05$),见图3、表3。

2.5 GSP联合MHT对大鼠脑组织MDA、SOD和GSH-Px水平的影响

与假手术组比,模型组大鼠脑组织MDA水平显著升高($P < 0.05$),SOD和GSH-Px活力显著降低($P < 0.05$)。与模型组比,MHT组、GSP组和GSP+MHT组大鼠脑组织MDA水平均显著降低($P < 0.05$),SOD和GSH-Px活力均显著升高($P < 0.05$)。与MHT组和GSP组比,GSP+MHT组大鼠脑组织MDA水平显著降低($P < 0.05$),SOD和GSH-Px活力显著升高($P < 0.05$)。GSP联合MHT对大鼠脑组织MDA、SOD和GSH-Px水平的影响见表4。

表4 GSP联合MHT对大鼠脑组织MDA、SOD和GSH-Px水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)Table 4 Effect of GSP combined with MHT on MDA, SOD, and GSH-Px levels of brain tissues in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	温度/剂量	MDA/(nmol g ⁻¹)	SOD/(U mg ⁻¹)	GSH-Px/(U mg ⁻¹)
假手术	—	2.54±0.49	215.84±6.43	184.21±5.16
模型	—	6.89±0.73 [#]	134.24±2.51 [#]	93.46±2.11 [#]
MHT	(33±1) °C	5.14±0.68 [*]	158.37±3.14 [*]	123.51±2.39 [*]
GSP	100 mg·kg ⁻¹	4.86±0.62 [*]	164.59±3.25 [*]	135.46±2.46 [*]
GSP+MHT	100 mg·kg ⁻¹ + (33±1) °C	3.34±0.53 ^{*△}	192.48±5.73 ^{*△}	167.59±4.17 ^{*△}

与假手术组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与MHT组比较: [△] $P<0.05$; 与GSP组比较: [△] $P<0.05$ [#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs MHT group; [△] $P<0.05$ vs GSP group

2.6 GSP联合MHT对大鼠脑组织Bax和Bcl-2蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织Bax蛋白表达显著升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与模型组比,MHT组、GSP组和GSP+MHT组大鼠脑组织Bax蛋白表达显著降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与MHT组和GSP组比,GSP+MHT组大鼠脑组织Bax蛋白表达显著降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达显著升高($P<0.05$)。见图4、表5。

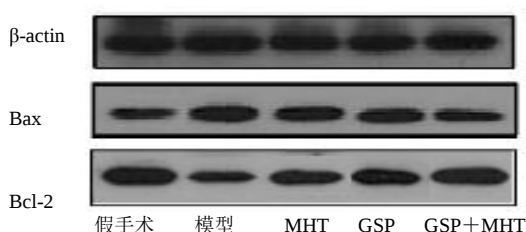


图4 大鼠脑组织Bax和Bcl-2蛋白表达

Fig. 4 Bax and Bcl-2 protein expression of brain tissue in mice

表5 GSP联合MHT对大鼠脑组织Bax和Bcl-2蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)Table 5 Effect of GSP combined with MHT on Bax and Bcl-2 protein expression of brain tissue in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	温度/剂量	Bax	Bcl-2
假手术	—	0.24±0.07	1.03±0.18
模型	—	0.65±0.14 [#]	0.49±0.10 [#]
MHT	(33±1) °C	0.52±0.10 [*]	0.71±0.13 [*]
GSP	100 mg·kg ⁻¹	0.50±0.11 [*]	0.71±0.15 [*]
GSP+MHT	100 mg·kg ⁻¹ + (33±1) °C	0.31±0.08 ^{*△}	0.93±0.17 ^{*△}

与假手术组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与MHT组比较: [△] $P<0.05$; 与GSP组比较: [△] $P<0.05$ [#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs MHT group; [△] $P<0.05$ vs GSP group

2.7 GSP联合MHT对大鼠脑组织p-ERK1/2、Nrf2h和HO-1蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织p-ERK1/2、胞质和胞核Nrf2、HO-1蛋白表达均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,MHT组、GSP组和GSP+MHT组大鼠脑组织p-ERK1/2、胞核Nrf2、HO-1蛋白表达均显著升高($P<0.05$),胞质Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与MHT组和GSP组比,GSP+MHT组大鼠脑组织p-ERK1/2、胞核Nrf2、HO-1蛋白表达均显著升高($P<0.05$),胞质Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.05$)。见图5、表6。

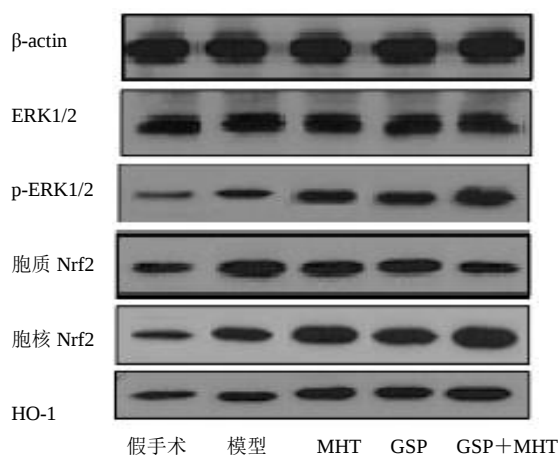


图5 大鼠脑组织p-ERK1/2、Nrf2h和HO-1蛋白表达

Fig. 5 p-ERK1/2, Nrf2h, and HO-1 protein expression of brain tissue in mice

3 讨论

脑卒中是临床常见的多发病,致残率和致死率较高。脑卒中分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中,其中缺血性脑卒中约占脑卒中患者的80%^[9]。缺血性脑卒中患者在治疗时恢复血流的同时,会引发再灌注损伤。抑制缺血再灌注损伤是治疗缺血性脑卒

表6 GSP联合MHT对大鼠脑组织p-ERK1/2、Nrf2h和HO-1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 6 Effect of GSP combined with MHT on p-ERK1/2, Nrf2h, and HO-1 proteins of brain tissues in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	温度/剂量	p-ERK1/2	胞质 Nrf2h	胞核 Nrf2h	HO-1
假手术	—	0.11 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.04
模型	—	0.22 ± 0.06 [#]	0.57 ± 0.11 [#]	0.52 ± 0.07 [#]	0.31 ± 0.06 [#]
MHT	(33 ± 1) °C	0.49 ± 0.09 [*]	0.43 ± 0.10 [*]	0.92 ± 0.16 [*]	0.42 ± 0.09 [*]
GSP	100 mg·kg ⁻¹	0.49 ± 0.10 [*]	0.43 ± 0.09 [*]	0.91 ± 0.18 [*]	0.43 ± 0.09 [*]
GSP+MHT	100 mg·kg ⁻¹ + (33 ± 1) °C	0.80 ± 0.17 ^{*▲△}	0.26 ± 0.07 ^{*▲△}	1.12 ± 0.19 ^{*▲△}	0.56 ± 0.10 ^{*▲△}

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与MHT组比较: [▲] $P < 0.05$; 与GSP组比较: [△] $P < 0.05$ [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs MHT group; [△] $P < 0.05$ vs GSP group

中的重要环节^[10]。本研究通过线栓法建立缺血再灌注损伤大鼠模型,探讨了MHT、GSP以及两者联合作用对缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用。结果显示,脑缺血再灌注损伤大鼠NDS、脑梗死面积、脑组织细胞凋亡指数升高,尼氏体数量减少,促凋亡蛋白Bax表达升高,抗凋亡蛋白Bcl-2表达降低。MHT、GSP单独干预均可降低脑缺血再灌注损伤大鼠NDS、脑梗死面积和脑组织细胞凋亡指数,降低Bax表达,促进Bcl-2表达,且MHT和GSP联合作用治疗效果更佳,提示MHT和GSP联合作用可明显保护脑缺血再灌注损伤大鼠脑损伤,是潜在治疗缺血性脑卒中的方法。研究还显示,MHT和GSP可降低脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织MDA水平,提高SOD和GSH-Px活力,提示MHT和GSP可能通过降低氧化应激作用发挥脑保护作用。

ERK/Nrf2/HO-1信号通路在心、肾、脑等组织器官中都具有抗氧化应激损伤的作用^[11-13],是机体内重要的抗氧化应激机制之一。核转录因子NF-E2相关因子(Nrf2)是核转录因子家族成员,在提高细胞抗氧化能力方面发挥重要作用。HO-1是抗氧化酶,可将血红蛋白分解为胆绿素、CO和游离铁,发挥抗氧化和清除氧自由基作用^[14]。正常机体内,Nrf2主要存在于细胞质内,与蛋白Keep1结合,处于无活性状态。机体受到活性氧刺激发生氧化应激时,Nrf2激活,与Keep1发生解离。Nrf2激活后进入细胞核,与核内的抗氧化应激原件结合,促进HO-1蛋白表达,发挥抗氧化作用^[15]。ERK1/2是重要的信号转导蛋白,在真核细胞中广泛存在,参与细胞生长、分裂、分化、凋亡等过程。磷酸化的p-ERK1/2可以促进Nrf2激活,促使其发生核转位^[16]。本研究结果显示,脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织p-ERK1/2、胞质和胞核Nrf2、HO-1蛋白表达均升

高。MHT、GSP干预后,胞质Nrf2蛋白降低,p-ERK1/2、胞核Nrf2和HO-1蛋白表达均升高($P < 0.05$),且MHT和GSP联合作用的治疗疗效明显高于MHT和GSP单独作用,提示MHT和GSP可能通过激活ERK/Nrf2/HO-1信号通路,上调p-ERK1/2蛋白表达,促进Nrf2核转位,并上调HO-1表达,进而促进脑缺血再灌注损伤大鼠脑内抗氧化应激反应,保护氧化应激损伤。

综上所述,MHT、GSP均可降低脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损评分和神经细胞凋亡数,改善脑组织病理结构,发挥脑保护作用,并且MHT和GSP联合治疗的疗效要优于MHT、GSP单独治疗,其发挥脑保护作用可能与激活ERK/Nrf2/HO-1信号通路,上调p-ERK1/2、胞核Nrf2和HO-1蛋白表达,促进机体抗氧化应激有关。本研究仅初步探讨MHT、GSP联合对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响,关于二者对脑缺血再灌注损伤大鼠的具体作用机制以及两者是否存在协同效应目前尚不明确,另外由于本研究仅探讨了MHT、GSP二者联合单个剂量的情况,而关于二者联合的最佳应用剂量还有待进一步开展实验进行深入探讨。

参考文献

- [1] Hu Y, Duan M, Liang S, et al. Senkyunolide I protects rat brain against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by up-regulating p-Erk1/2, Nrf2/HO-1 and inhibiting caspase 3 [J]. *Brain Res*, 2015, 1605(21): 39-48.
- [2] 李明,杨继红,耿维凤,等.鼠神经生长因子联合亚低温对重度创伤性颅脑损伤的神经保护作用及其机制[J].*中国生化药物杂志*,2017,37(1):129-132.
- [3] 程黎,贾功伟.亚低温对脑缺血再灌注大鼠血管内皮生长因子和低氧诱导因子-1 α 表达的影响[J].*中国康复理论与实践*,2017,23(6):667-671.
- [4] 司金春,崔月,杨琰琦.亚低温治疗及选择时机对室

- 息大鼠心肺复苏后的脑保护作用 [J]. 医学临床研究, 2016, 33(1): 7-9, 10.
- [5] 王 珠, 赵雅宁, 李建民. 葡萄籽原花青素对脑缺血再灌注大鼠氧化应激与学习记忆的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2014, 20(9): 827-830.
- [6] Sun Y, Xiu C, Liu W, *et al.* Grape seed proanthocyanidin extract protects the retina against early diabetic injury by activating the Nrf2 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1253-1258.
- [7] 陈晓娟, 肖宗宇, 潘 琪, 等. 改良线栓法大鼠脑缺血再灌注损伤模型的建立 [J]. 中国医学创新, 2015, 12(3): 24-27.
- [8] 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.
- [9] 王 蒙, 周俊山, 吴奥燕. 急性缺血性卒中静脉溶栓及血管内治疗研究进展 [J]. 中华神经科杂志, 2017, 50(5): 391-395.
- [10] 孙艺蕾, 钟 镒, 李国忠. NLRP3 炎性小体在缺血性脑卒中中的作用及研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2018, 41(1): 60-63.
- [11] Zeng X, Li J, Li Z. Ginsenoside Rd mitigates myocardial ischemia-reperfusion injury via Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 14497- 14504.
- [12] Zhang D, Xiao Y, Lv P, *et al.* Edaravone attenuates oxidative stress induced by chronic cerebral hypoperfusion injury: role of ERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Neurol Res*, 2018, 40(1): 1-10.
- [13] Cai Z Y, Sheng Z X, Yao H. Pachymic acid ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by suppressing inflammation and activating the Nrf2/HO-1 pathway in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(8): 1924-1931.
- [14] 张晓华, 杨 慧, 张晓倩. 血红素加氧酶-1 对疾病进展及预后的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(4): 404-407.
- [15] Leung W S, Yang M L, Lee S S, *et al.* Protective effect of zerumbone reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury via antioxidative enzymes and Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46(1): 194-200.
- [16] Hu Y, Duan M, Liang S, *et al.* Senkyunolide I protects rat brain against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by up-regulating p-Erk1/2, Nrf2/HO-1 and inhibiting caspase 3 [J]. *Brain Res*, 2015, 1605(1): 39-48.