

牡荆素通过 12/15-LOX 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的研究

王 皓¹, 李素敏², 李 冉¹, 张 凯¹, 孙永琨^{3*}

1. 新乡医学院第一附属医院 超声科, 河南 新乡 453003
2. 河南省荣军医院 超声科, 河南 新乡 453100
3. 新乡医学院 基础医学院, 河南 新乡 453003

摘要: **目的** 探讨牡荆素对大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制。**方法** 60 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及牡荆素 40、80 mg/(kg d)组, 每组 15 只。制作大鼠大脑中动脉缺血(90 min)/再灌注(24 h)损伤模型。术前 1 周及模型制作前 30 min, 各组分别 ip 相应药物, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。观察牡荆素对神经功能缺损评分、脑指数及梗死体积的影响, 采用激光多普勒血流仪监测再灌注后大鼠缺血侧局部脑血流量的动态变化, 测定缺血侧脑组织活性氧(ROS)水平、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量、Caspase-3 活性及 12 羟二十烷四烯酸(12-HETE)、15 羟二十烷四烯酸(15-HETE)含量;实时荧光定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax、ALOX15 mRNA 的表达, Western blotting 检测 ALOX15 蛋白、p38MAPK 及 p-p38MAPK 蛋白表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠神经缺失症状评分、脑指数及梗死体积显著升高 ($P < 0.01$), ALOX15 mRNA 和蛋白的表达及 p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 同时 Caspase-3 活性、Bax mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 而 Bcl-2 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 牡荆素预处理能显著改善模型大鼠神经功能缺损症状, 降低脑指数, 减少梗死体积, 增加缺血侧大脑局部血流量, 明显增加缺血侧脑组织 Bcl-2 mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.01$), 提高 SOD 活性 ($P < 0.05, 0.01$), 降低 ALOX15 mRNA、Bax mRNA 和 ALOX15、p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$), 下调 Caspase-3 活性、15-HETE、12-HETE 的表达和 MDA 水平 ($P < 0.05, 0.01$) 及减少 ROS 的生成 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 牡荆素对局灶性缺血大脑具有神经保护作用, 并可改善缺血侧大脑血流供应。其作用机制可能为通过 12/15-LOX 信号抑制 p38MAPK 介导的细胞凋亡, 同时降低氧化应激和炎症, 从而减轻脑 I/R 损伤。

关键词: 牡荆素; 脑缺血再灌注; 激光多普勒血流仪; 活性氧; ALOX15

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2021)03 - 0428 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.03.002

Protective effect of vitexin on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through 12/15 LOX signaling pathway

WANG Hao¹, LI Su-min², LI Ran¹, ZHANG Kai¹, SUN Yong-kun³

1. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xingxiang 453003, China
2. Department of Ultrasound, Henan Rongjun Hospital, Xinxiang 453100, China
3. Basic Medical College of Xinxiang Medical University, Xingxiang 453003, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of vitexin on middle cerebral artery ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and vitexin [40, 80 mg/(kg d)] treatment groups. The middle cerebral artery ischemia (90 min)/reperfusion (24 h) injury model was established. One week before operation and 30 minutes before model making, rats in each group were administrated the corresponding drugs by intraperitoneally injected. Rats in the sham operation group and the model group were given the same amount of normal saline. The effect of vitexin on neurological deficit score, brain index and infarct volume were observed. The dynamic changes of cerebral blood flow in the ischemic side were monitored by laser Doppler flowmetry. The levels of ROS, SOD, MDA, Caspase-3, 12-HETE and 15-HETE were measured. The expression of Bcl-2, Bax, ALOX15 mRNA was detected by real-time fluorescence

收稿日期: 2020-11-27

基金项目: 新乡医学院海外博士科研启动基金资助项目 (505018); 新乡医学院科研培育基金资助项目 (2014QN120)

作者简介: 王 皓 (1981—), 男, 河南郸城人, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管疾病的诊治研究。

*通信作者: 孙永琨 (1981—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为再生医学。E-mail: 5454706@qq.com

quantitative analysis. The expression of ALOX15, p38MAPK and p-p38MAPK protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological deficit symptom score, brain index and infarct volume of rats in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the expression of ALOX15 mRNA and protein and the expression of p38MAPK and phospho-p38mapk protein were significantly increased ($P < 0.01$), the activity of Caspase-3 and the expression of Bax mRNA were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of bcl-2 mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, vitexin pretreatment could significantly improve the symptoms of neurological deficit, reduce brain index and infarct volume, increase regional cerebral blood flow, increase Bcl-2 mRNA expression ($P < 0.05, 0.01$), increase SOD activity ($P < 0.05, 0.01$), and reduce ALOX15 mRNA and Bax MRNA and protein expressions of ALOX15, p38MAPK and phospho-p38mapk ($P < 0.05, 0.01$), caspase-3 activity, 15-HETE, 12-HETE expression and MDA level were down regulated ($P < 0.05, 0.01$), and ROS production was reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Vitexin has neuroprotective effect on focal cerebral ischemia and can improve the blood supply of ischemic side. The mechanism may be that Vitexin may inhibit p38MAPK mediated apoptosis through 12/15-LOX signal, and reduce oxidative stress and inflammation, thereby reducing brain I/R injury.

Key words: vitexin; cerebral ischemia-reperfusion; laser Doppler flowmeter; reactive oxygen species; ALOX15

卒中是一种血管破裂或血管阻塞导致脑血流不畅的医学状况。卒中可分为两大病理类型：缺血性卒中和出血性卒中。缺血性脑卒中又称脑梗死，是最常见的脑卒中形式，其特征是脑动脉阻塞引起的脑组织损伤。缺血性脑卒中被认为是世界上主要的致死性疾病之一，其发病率、死亡率、致残率和复发率均较高^[1]。其中脑缺血再灌注损伤在脑卒中的病理过程中起着重要作用。缺血性卒中涉及不同的病理生理级联，包括能量衰竭、氧化应激、酸中毒、离子稳态破坏、钙超载、神经细胞兴奋毒性、炎症等^[2-3]。目前，缺血性脑卒中的治疗效果并不理想。因此探讨有效治疗缺血性脑卒中的方法已迫在眉睫。

中草药和其他天然产物，基于数千年的临床治疗和预防经验，在减缓或预防疾病进展方面具有许多优势。在过去的几十年里，从天然草药或食物中分离出的数百种化合物被证实可以改善缺血性卒中，如酚类化合物、皂苷、萜类化合物和生物碱^[4-5]。牡荆素是一种黄酮类 C-糖苷（芹菜素-8-C-β-D-吡喃葡萄糖苷），存在于山楂、西番莲、竹叶和越橘等药用植物中^[6-7]。据报道，近年来由于牡荆素具有广泛的药理作用，包括但不限于抗氧化、抗炎、抗痛觉和神经保护作用，而受到越来越多的关注^[8]。因此，研究牡荆素在脑卒中方面的作用具有重要意义。所以，本实验通过建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤（ischemia-reperfusion, I/R）模型，探讨牡荆素在 I/R 诱导的缺血性脑卒中大鼠模型中的神经保护作用。此外，还探讨 12/15-LOX 信号通路在牡荆素减轻脑缺血再灌注损伤中的作用，以期能为牡荆素的临床应用提供实验依据。

1 材料

雄性 SD 大鼠 60 只，体质量 250~300 g，购于河

南省实验动物中心，许可证号 SCXK（豫）2015-0005。饲养于室温为（22±3）℃，湿度为（55±15）%，光/暗周期为 12 h 的动物房中。食物和水自由食用，实验前先适应性喂养 1 周时间。

牡荆素（成都植标化纯生物技术有限公司，质量分数 98%，批号：20190312，CAS 号：3681-93-4，使用时用生理盐水溶解）；活性氧（ROS）、超氧化物歧化酶（SOD）和丙二醛（MDA）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）；大鼠 Caspase-3 ELISA 试剂盒（厦门慧嘉生物科技有限公司）；大鼠 12 羟二十烷四烯酸（12-HETE）ELISA 免疫组化试剂盒（上海谷研生物科技有限公司）；大鼠 15 羟二十烷四烯酸（15-HETE）ELISA 免疫组化试剂盒（江莱生物科技有限公司）；RNAiso Plus（Total RNA 提取试剂，大连宝生物工程有限公司）；BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（碧云天生物技术有限公司）；TB Green™ Premix Ex Taq™II 实时荧光定量试剂盒（大连宝生物工程有限公司）；花生四烯酸-15-脂加氧酶（ALOX15）抗体（Abcam 公司），p38MAPK 抗体及 phospho-p38MAPK 抗体（Cell Signaling 公司）。PF5000 型激光多普勒仪（瑞典 Perimed 公司）；LightCycler®96 实时荧光定量 PCR 仪（瑞典罗氏公司）；多功能酶标仪 SpectraMax M3（美国 MD 公司）；大鼠 MCAO 线栓（美国 Doccol 公司）。

2 方法

2.1 大鼠分组、给药及 I/R 模型制备

大鼠随机分为 4 组，即假手术组、模型组和牡荆素低、高剂量 [40、80 mg/(kg d)] 组，每组 15 只。术前 12 h，大鼠禁食，不禁水。术前 1 周及模

型制作前 30 min, 各组分别 ip 给予相应药物, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。10%水合氯醛麻醉大鼠后, 参照 Longa 等^[9]线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型。颈部正中切口, 分离颈总动脉及颈外、颈内动脉, 颈总动脉和颈内动脉使用动脉夹夹闭, 暂时阻断血流, 在颈外动脉近分叉处剪一小口, 插入 403756PK5Re 型号线栓, 经分叉处插入颈内动脉, 缓慢推进, 稍遇阻力时停止推送, 深度 18~19 mm, 阻断大脑中动脉血流, 固定拴线, 缺血 90 min 后, 拔出线栓, 再灌注 24 h。假手术组除不插线栓外, 其余操作同模型组。大鼠清醒后爬行时向左旋转、提尾时左前肢内收屈曲者提示造模成功。剔除造模死亡及没有出现神经功能障碍的大鼠, 每组最终保留 12 只^[10-11]。

2.2 大鼠神经功能缺失症状评分、脑指数及梗死体积的检测

对动物在手术清醒后以及损伤 24 h 时进行神经功能评分, 根据 Zea-longa 评分法^[9]进行神经缺损症状评分。0 分: 无神经损伤症状和体征, 1 分: 提尾后左侧肢体出现内收、屈曲; 2 分: 爬行时身体向左侧划圈(追尾现象); 3 分: 站立时身体向左侧倾斜; 4 分: 无法自主行走, 意识丧失。

神经功能缺损症状评分后, 麻醉各组大鼠, 取脑组织, 去除脑干、小脑等, 称量脑湿质量, 计算脑指数。

脑指数 = 脑湿质量/体质量

取出大鼠脑组织, -20 °C 冷冻 30 min, 连续横切产生 2 mm 厚切片, 在 2.0% 的 3,5-三苯基-2H-四唑氯化物(TTC)染液中, 染色 30 min, PBS 缓冲液清洗后, 放 4% 多聚甲醛中固定, 4 °C 过夜。TTC 染色后, 正常脑组织呈粉红色, 梗死区脑组织呈淡白色。用 Image J 图像分析软件测量并计算各脑片梗死体积。

梗死体积 = 梗死面积 × 厚度/2

2.3 大脑中动脉的脑血流监测

麻醉大鼠后, 刮去颅骨顶部的毛发, 沿着矢状缝切开一个 3 cm 的切口, 用缝合线将皮肤拉开。用牙钻将颅骨均匀地薄化, 直到血管清晰可见。选取右侧大脑中动脉缺血周边区为检测区域, 应用激光多普勒仪监测脑血流, 计算缺血区局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)占基线水平(假手术组)的百分比。

2.4 脑组织 Caspase-3 活性及 12-HETE、15-HETE 水平测定

各组大鼠在缺血再灌注 24 h 后, 断头取脑, 取

大鼠缺血侧皮层脑组织 100 mg, 按 1:9 (质量体积比) 加入冰冷 PBS (pH 7.4), 在冰上使用组织匀浆器制成 10% 的脑组织匀浆, 4 °C、2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液。Caspase-3 活性检测使用 Caspase-3 活性检测试剂盒(比色法), 12-HETE、15-HETE 水平测定分别使用相应的 ELISA 免疫组化试剂盒。严格按照检测说明书操作。

2.5 氧化应激相关指标的检测

取大鼠缺血侧皮层脑组织, 加入冰冷的 PBS (pH 7.4), 组织匀浆器冰上匀浆, 4 °C、3 000 × g 离心 10 min, 取上清液。严格按 ROS 测定试剂盒说明书操作, 最后加入探针孵育后, 酶标仪检测相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)。SOD 活力及 MDA 含量使用相应的检测试剂盒进行检测, 同样严格按照说明书的步骤进行操作测定。

2.6 实时荧光定量 PCR 法检测 Bax、Bcl-2、ALOX15 mRNA 的表达

使用 RNAiso Plus 提取脑缺血侧总 RNA, 然后紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。合成的 cDNA 在 -20 °C 保存。使用 SYBR qPCR 试剂盒在 LightCycler®96 实时荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 反应。引物序列为 Bcl-2 上游: 5'-GACTGAGTACCTGAACCGGCATC-3', 下游: 5'-CTGAGCAGCGTCTTCAGAGACA-3'; Bax 上游: 5'-CAGTTGAAGTTGCCATCAGC-3', 下游: 5'-CAGTTGAAGTTACCATCAGC-3'; ALOX15 上游: 5'-CACCGGAGACTCCAAGTACG-3', 下游为 5'-AGTGGCCCAAGGTATCCTGA-3'; GAPDH 上游: 5'-ACAACCTTGTATCGTGGAAGG-3', 下游: 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。各个基因的相对表达量按照 $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 法计算。

2.7 Western blotting 检测 ALOX15、p38MAPK 及 p-p38MAPK 蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取脑缺血侧组织总蛋白。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质量浓度。将 20 μg 蛋白质样品添加到制备好的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)的每个孔道中, 在 100 V 下进行大约 30 min 的电泳。当溴酚蓝到达浓缩凝胶和分离凝胶的交界处时, 将电压设置为 150 V, 持续约 60 min。电泳完成后, 将电泳蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。之后, 将膜放入 5% 脱脂牛奶中, 在室温下封闭 2 h。然后, 将

膜分别与 ALOX15 抗体 (1:1 000)、p38MAPK 抗体 (1:1 000) 及 p-p38MAPK 抗体 (1:1 000) 在 4 °C 下孵育过夜。第 2 天, 洗涤液洗膜, 洗 3 次, 每次 5 min。然后与相应辣根过氧化物酶标记二抗孵育 1 h。再次使用洗涤液洗膜, 洗 3 次, 每次 5 min。加 ECL 发光液, 显色。曝光后扫描。用目的蛋白和内参蛋白 (β -tubulin) 的光密度值的比值来表示目的蛋白的相对表达值。

2.8 统计分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。两组间的比较使用 t 检验, 多组间比

较使用单因素方差分析 (ANOVA)。以 $P < 0.05$ 时表示结果具有显著的统计学差异。

3 结果

3.1 牡荆素对 I/R 大鼠神经缺损症状评分的影响

结果如表 1 所示, 缺血再灌注损伤 24 h 后, 模型组大鼠神经缺损症状评分明显高于假手术组, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 而牡荆素高、低剂量组均能降低受损大鼠的行为学评分, 与模型组相比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中高剂量组作用更强 ($P < 0.01$)。

表 1 牡荆素对 I/R 大鼠神经缺损症状评分、脑指数及脑梗死体积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of vitexin on neurological deficit symptom score, brain index and cerebral infarction volume in I/R rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经缺损症状评分 (n=12)	脑指数 (n=7)	梗死体积/mm ³ (n=5)
假手术	—	0.00 ± 0.00	0.532 ± 0.014	0.00 ± 0.00
模型	—	3.43 ± 0.41 ^{##}	0.636 ± 0.029 ^{##}	254.42 ± 27.41 ^{##}
牡荆素	40	2.94 ± 0.33 [*]	0.597 ± 0.026 [*]	227.35 ± 21.34 [*]
	80	2.32 ± 0.45 ^{**}	0.575 ± 0.037 ^{**}	194.58 ± 18.62 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.2 脑指数及梗死体积的变化

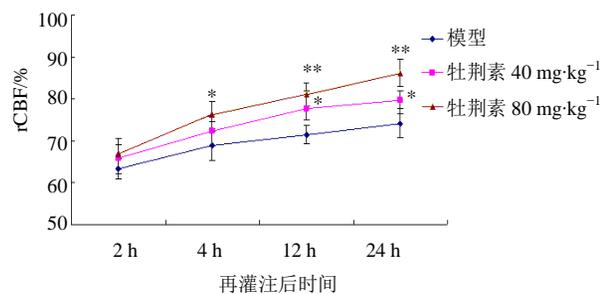
脑指数计算结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 牡荆素高、低剂量组大鼠脑指数显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。梗死体积计算结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死体积显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 牡荆素高、低剂量组大鼠脑梗死体积显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见表 1。

3.3 牡荆素对脑血流量的影响

从再灌注开始监测缺血区局部脑血流的变化, 选择 2、4、12、24 h 这 4 个时间点的数据进行统计 (图 1)。再灌注 2 h 时, 牡荆素给药组局部脑血流量与模型组相比有所增加, 但差异无显著性。再灌注 4 h 时, 牡荆素高剂量组脑血流量较模型组明显增加 ($P < 0.05$), 低剂量组差异不明显; 再灌注 12、24 h 时, 牡荆素高、低剂量组局部脑血流量较模型组均明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中高剂量组作用更强 ($P < 0.01$)。

3.4 牡荆素对 ROS 水平, SOD 活力、MDA 含量的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织内 ROS 水平、MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活力明显下降。与模型组比较, 牡荆素高、低剂量组能明显降低 ROS 水平、MDA 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高 SOD 活力。结果见表 2。



与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 1 再灌后不同时间点模型组和牡荆素组大鼠中动脉脑血流量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Changes of middle cerebral artery blood flow in model group and vitexin group at different time points after reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.5 牡荆素对 Caspase-3 活性及 12-HETE、15-HETE 含量的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织匀浆中 Caspase-3 活性及 12-HETE、15-HETE 含量明显增高 ($P < 0.01$)。而牡荆素高、低剂量组大鼠脑组织匀浆中 Caspase-3 活性和 12-HETE、15-HETE 含量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 3。

3.6 牡荆素对 Bcl-2、Bax、ALOX15 mRNA 的表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织中 Bax

mRNA、ALOX15 mRNA 表达及 Bax/Bcl-2 值显著升高 ($P < 0.01$), 而 Bcl-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 牡荆素高、低剂量组大鼠脑组织中 Bcl-2 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), Bax mRNA、ALOX15 mRNA 表达及 Bax/Bcl-2 值明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 4。

3.7 牡荆素对 ALOX15、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织 ALOX15、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 牡荆素高、低剂量组大鼠脑组织 ALOX15、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 2。

表 2 牡荆素对 I/R 大鼠脑组织 ROS、SOD、MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effects of vitexin on ROS, SOD and MDA in brain tissue of I/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ROS	MDA/(mmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	89.23 ± 19.21	1.92 ± 0.39	196.33 ± 21.45
模型	—	192.15 ± 27.12 ^{##}	6.48 ± 0.64 ^{##}	121.65 ± 19.87 ^{##}
牡荆素	40	162.70 ± 19.92 [*]	4.84 ± 0.27 ^{**}	146.51 ± 21.51 [*]
	80	143.23 ± 21.53 ^{**}	3.92 ± 0.52 ^{**}	158.65 ± 28.64 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 3 牡荆素对 I/R 大鼠脑组织 Caspase-3 活性及 12-HETE、15-HETE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effects of vitexin on Caspase-3 activity and 12-HETE, 15-HETE content in brain tissue of rats with I/R ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Caspase-3/(μmol·mL ⁻¹)	12-HETE (pg·mL ⁻¹)	15-HETE(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	16.95 ± 4.48	256.82 ± 38.73	29.82 ± 5.39
模型	—	29.74 ± 7.09 ^{##}	438.41 ± 48.52 ^{##}	62.83 ± 7.31 ^{##}
牡荆素	40	21.12 ± 5.61 [*]	376.42 ± 38.97 [*]	54.51 ± 4.08 [*]
	80	19.99 ± 3.62 ^{**}	312.23 ± 41.56 ^{**}	38.42 ± 8.42 ^{**}

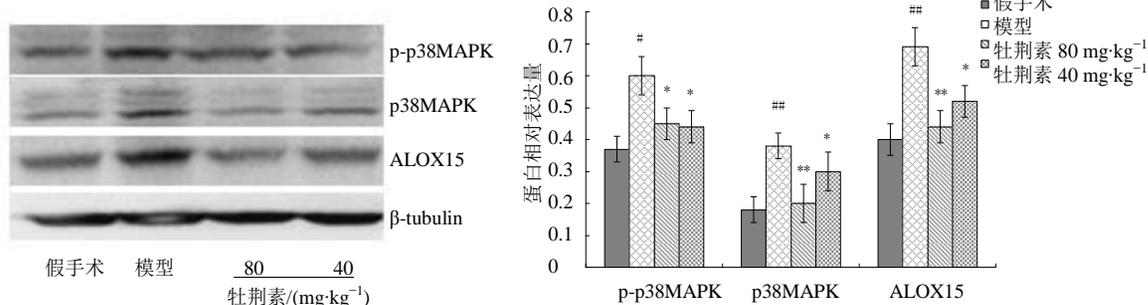
与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 4 牡荆素对 I/R 大鼠脑组织 Bcl-2、Bax、ALOX15 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of vitexin on expression of Bcl-2, Bax and ALOX15 mRNA in brain tissue of rats with I/R ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bax/Bcl-2	ALOX15/GAPDH
假手术	—	1.00	1.00	1.00	1.00
模型	—	0.52 ± 0.04 ^{##}	1.71 ± 0.07 ^{##}	3.33 ± 0.38 ^{##}	1.87 ± 0.08 ^{##}
牡荆素	40	0.63 ± 0.03 [*]	1.48 ± 0.07 [*]	2.36 ± 0.21 [*]	1.60 ± 0.03 ^{**}
	80	0.78 ± 0.02 ^{**}	1.37 ± 0.03 ^{**}	1.75 ± 0.02 ^{**}	1.51 ± 0.05 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group



与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 2 牡荆素对 I/R 大鼠脑组织 ALOX15、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of vitexin on expression of ALOX15, p38MAPK and p-p38MAPK protein in brain tissue of rats with I/R ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

本研究发现牡荆素能明显改善 I/R 大鼠的神经功能缺损,降低脑指数,减少梗死体积,增加缺血侧大脑局部血流量。这些均表明牡荆素对 I/R 大鼠具有神经保护作用。

氧化应激是 I/R 损伤中神经元凋亡的关键因素。脂质氧化基因 LOX 作为一种炎症介质,在氧化应激调节中发挥重要作用,参与缺血和神经元死亡的病理过程。尤其是大脑中占主导地位的 ALOX15 基因编码的 12/15-LOX 能氧化花生四烯酸生成 12-HETE 和 15-HETE^[12-13]。12/15-LOX 可直接氧化结合多烯脂肪酸形成不稳定的 12-氢过氧化二十碳四烯酸(12-HPETE),通过谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)转化为稳定的 12(S)-HETE,它进一步参与体内各种炎症疾病的发生和发展^[14-16]。12/15-LOX 主要由脑内的小胶质细胞、神经元和内皮细胞表达^[17]。研究发现,在暂时性大脑中动脉阻塞小鼠模型中,12/15-LOX 在脑梗死周围区域上调^[18]。另有研究表明,12/15-LOX 参与了局部脑缺血后的脑损伤和氧葡萄糖剥夺处理神经元的氧化损伤^[19]。坏死核心病变区的巨噬细胞和活化的胶质细胞中 12/15-LOX 的表达增加^[20]。此外,12/15-LOX 通过花生四烯酸的代谢参与 ROS 的产生,花生四烯酸是氧化应激的潜在来源。抑制 LOX 对人脑内皮细胞氧化损伤具有保护作用^[21]。敲除 12/15-LOX 则可减少局灶性缺血小鼠模型的梗死体积和水肿^[21-22]。在本研究中,I/R 诱导缺血/梗死区 ALOX15 mRNA 和蛋白的表达增加,同时伴随氧化应激水平的升高,如 ROS 生成增多、MDA 含量增加以及 SOD 活性的降低。12/15-LOX 介导的氧化应激可促进 I/R 后的脑损伤。而牡荆素可抑制 I/R 所致 12/15-LOX 表达增加及氧化应激水平升高,此作用有利于脑 I/R 损伤的保护。

另有研究发现,12/15-LOX 及其衍生物可直接激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)并刺激其磷酸化^[23]。抑制 12/15-LOX 可通过下调 p38MAPK 的表达来减轻周围神经病变引起的细胞损伤^[24]。p38MAPK 信号转导通路在细胞的凋亡中发挥着重要作用。p38MAPK 的激活是脑 I/R 损伤引起神经元凋亡的重要信号转导通路之一。p38MAPK 被磷酸化激活后,通过调节 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 基因的表达进而影响细胞凋亡。Bax 促进细胞死亡,而

Bcl-2 抑制细胞凋亡。Bax/Bcl-2 值是加速衰老小鼠脑缺血后细胞凋亡的重要决定因素。凋亡执行者 Caspase-3 可被 Bax 同型二聚体激活^[25]。当 Caspase-3 被激活时,proCaspase-3 被切割成一个活性片段,切割后的 Caspase-3 起到蛋白水解酶促进细胞凋亡的作用。在本研究中,与假手术组相比,模型组 ALOX15 mRNA 和蛋白的表达及 p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达显著增加,同时 Caspase-3 活性, Bax mRNA 表达明显升高,而 Bcl-2 mRNA 表达显著下降。然而,牡荆素可显著逆转这些变化。与模型组比较,牡荆素预处理能明显增加 Bcl-2 mRNA 表达,降低 ALOX15 mRNA 和蛋白表达及下调 Caspase-3 活性及 Bax mRNA、p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达。这些结果表明,牡荆素通过抑制 12/15-LOX 活性,降低 12/15-LOX 的表达,减少 12(S)-HETE 的形成,影响 p38MAPK 及其磷酸化,从而抑制 p38MAPK 介导的细胞凋亡,进而对 I/R 诱导的细胞凋亡发挥神经保护作用。

本研究发现 I/R 损伤显著诱导 12/15-LOX 活化,激活 p38MAPK 并刺激其磷酸化,升高 Caspase-3 活性和 Bax/Bcl-2 值,导致脑细胞凋亡,同时氧化应激增强,ROS 的生成增多,MDA 水平升高,SOD 活性降低。牡荆素能抑制 I/R 诱导的大鼠中 ALOX15 mRNA 和蛋白表达,影响 p38MAPK 及其磷酸化,从而抑制 p38MAPK 介导的细胞凋亡,降低 Caspase-3 活性、Bax/Bcl-2 值,同时抑制氧化应激,降低 ROS 的生成,提高 SOD 活性,降低 MDA 水平。牡荆素可能通过 12/15-LOX 信号抑制 p38MAPK 介导的细胞凋亡,同时抑制氧化应激和炎症反应,从而减轻 I/R 诱导的损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bernhardt J, Zorowitz R D, Becker K J, et al. Advances in stroke 2017 [J]. *Stroke*, 2018, 49(5): e174-e199.
- [2] Cassella C R, Jagoda A. Ischemic stroke: Advances in diagnosis and management [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2017, 35(4): 911-930.
- [3] Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 674-681.
- [4] Gu Y, Chen J, Shen J. Herbal medicines for ischemic stroke: combating inflammation as therapeutic targets [J]. *J Neuroim Pharmacol*, 2014, 9(3): 313-339.

- [5] 蔡静, 黄文静, 刘时喜, 等. 基于 TGF- β 1/Smad3 信号探讨红景天苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用机制 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6294-6301.
- [6] Borghi S M, Carvalho T T, Staurengo-Ferrari L, et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(6): 1141-1149.
- [7] 王腾宇, 李德利, 方明月, 等. HPLC 法测定金莲花汤中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 1053-1056.
- [8] He M, Min J W, Kong W L, et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin [J]. *Fitoterapia*, 2016, 115: 74-85.
- [9] 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.
- [10] 段建, 康慨, 黄昌仁, 等. 贝母甲素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2020, 39(4): 240-246.
- [11] 李晶晶, 雷涛, 林俊, 等. 当归多糖通过促血管再生保护大鼠脑缺血再灌注损伤机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2272-22763.
- [12] Kuhn H, Walther M, Kuban R J. Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications [J]. *Prostagl Other Lipid Mediat*, 2002, 68-69: 263-290.
- [13] van Leyen K. Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12(2): 191-199.
- [14] Antonipillai I, Nadler J, Vu E J, et al. A 12-lipoxygenase product, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, is increased in diabetics with incipient and early renal disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(5): 1940-1945.
- [15] Kang S W, Adler S G, Nast C C, et al. 12-lipoxygenase is increased in glucose-stimulated mesangial cells and in experimental diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(4): 1354-1362.
- [16] Kühn H, O'Donnell V B. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases [J]. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(4): 334-356.
- [17] Kanzler M A, Van Dyke A M, He Y, et al. Mice lacking L-12/15-lipoxygenase show increased mortality during kindling despite demonstrating resistance to epileptogenesis [J]. *Epilepsia Open*, 2018, 3(2): 255-263.
- [18] Yigitkanli K, Zheng Y, Pekcec A, et al. Increased 12/15-Lipoxygenase leads to widespread brain injury following global cerebral ischemia [J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8(2): 194-202.
- [19] Han J, Sun L, Xu Y, et al. Activation of PPAR γ by 12/15-Lipoxygenase during cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 195-201.
- [20] Haynes R L, van Leyen K. 12/15-lipoxygenase expression is increased in oligodendrocytes and microglia of periventricular leukomalacia [J]. *Dev Neurosci*, 2013, 35(2/3): 140-154.
- [21] Jin G, Arai K, Murata Y, et al. Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia [J]. *Stroke*, 2008, 39(9): 2538-2543.
- [22] van Leyen K, Kim H Y, Lee S R, et al. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain [J]. *Stroke*, 2006, 37(12):3014-3018.
- [23] Heyer E J, Mergeche J L, Bruce S S, et al. . Connolly, inflammation and cognitive dysfunction in type 2 diabetic carotid endarterectomy patients [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36: 3283-3286.
- [24] Reddy M A, Thimmalapura P R, Lanting L, et al. The oxidized lipid and lipoxygenase product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces hypertrophy and fibronectin transcription in vascular smooth muscle cells via p38 MAPK and cAMP response element-binding protein activation. Mediation of angiotensin II effects [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 9920-9928.
- [25] Cregan S P, MacLaurin J G, Craig C G, et al. Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(18): 7860-7869.

[责任编辑 刘东博]