

• 实验研究 •

基于 TMEM240/ARHGDI B 通路探讨穗花杉双黄酮改善脑缺血再灌注损伤小鼠神经炎症的作用机制

窦海玲, 杨改清, 赵松耀, 李世泽, 张 越

郑州大学附属郑州中心医院 神经内科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 基于神经特异性跨膜蛋白 240 (TMEM240)/Rho GDP 解离抑制因子 β (ARHGDI B) 通路探讨穗花杉双黄酮改善脑缺血再灌注损伤小鼠神经炎症的作用机制。方法 采用线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型, 将造模成功小鼠随机分为模型组、穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-NC 组、穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组, 另设假手术组, 每组 24 只。检测 Zea-longa 评分、平衡木测试评分、脑梗死体积比、脑组织含水量变化; HE 染色检测缺血侧脑组织病理; 免疫荧光染色检测缺血侧脑组织中离子钙接头蛋白 1 (Iba-1)⁺诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)⁺、Iba-1⁺ 精氨酸酶 1 (Arg-1)⁺阳性细胞数; ELISA 检测缺血侧脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、IL-10、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 含量; Western blotting 检测缺血侧脑组织中 TMEM240、ARHGDI B、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达。结果 与模型组比较, 穗花杉双黄酮组缺血侧脑组织病理损伤明显改善, 表现为神经元形态较完整、水肿减轻及炎症浸润减少, Zea-longa 评分、脑梗死体积比、脑组织含水量、缺血侧脑组织 Iba-1⁺iNOS⁺阳性细胞数, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达显著降低, 平衡木测试评分、缺血侧脑组织 Iba-1⁺Arg-1⁺阳性细胞数、IL-10、TGF- β 1 水平、TMEM240、ARHGDI B 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。sh-TMEM240 逆转了穗花杉双黄酮对模型小鼠神经炎症的改善作用。结论 穗花杉双黄酮通过上调 TMEM240/ARHGDI B 信号轴, 抑制 NF- κ B 通路的过度活化进而改善脑缺血再灌注损伤小鼠的神经炎症。

关键词: 穗花杉双黄酮; 脑缺血再灌注损伤; 神经炎症; 神经特异性跨膜蛋白 240; Rho GDP 解离抑制因子 β

中图分类号: R286.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)03-0557-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.03.001

Mechanism of amentoflavone improving neuroinflammation in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury based on the TMEM240/ARHGDI B pathway

DOU Hailing, YANG Gaiqing, ZHAO Songyao, LI Shize, ZHANG Yue

Department of Neurology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of amentoflavone improves neuroinflammation in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury based on TMEM240/ARHGDI B pathway. **Methods** A cerebral ischemia-reperfusion injury model was established using the suture occlusion method. Successfully modeled mice were randomly divided into model group, amentoflavone group, amentoflavone + sh-NC group, amentoflavone + sh-TMEM240 group, and sham-operated group with 24 mice in each group. Assessments included the Zea-longa score, balance beam test score, cerebral infarction volume ratio, and brain water content. Histopathological changes in the ischemic brain tissue were evaluated by HE staining. Immunofluorescence staining was used to detect the numbers of Iba-1⁺iNOS⁺ and Iba-1⁺Arg-1⁺ positive cells. ELISA measured the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and TGF- β 1 in the ischemic brain tissue. Western blotting analyzed the protein expression of TMEM240, ARHGDI B, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65. **Results** Compared with the model group, the pathological damage of the ischemic side brain tissue in the Zea-longa flavone group was significantly improved, manifested as more intact neuronal morphology, reduced edema, and decreased inflammatory infiltration. The scores of Zea-longa, the ratio of cerebral infarction volume, the water content of brain tissue, the number of Iba-1⁺iNOS⁺ positive cells in the ischemic side brain tissue, the levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and the protein expression of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65

收稿日期: 2026-01-23

基金项目: 河南省青年科学基金项目 (242300421515); 河南省高等学校重点科研项目计划 (24A320029)

作者简介: 窦海玲, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为脑血管病与睡眠障碍。E-mail: Dhail1981@163.com

were significantly decreased. The balance beam test score, the number of Iba-1⁺ Arg-1⁺ positive cells in the ischemic side brain tissue, the levels of IL-10 and TGF- β 1, the protein expression of TMEM240 and ARHGDIB were significantly increased ($P < 0.05$). sh-TMEM240 reversed the improvement effect of amentoflavone on the neuroinflammation in the amentoflavone group. **Conclusion** Amentoflavone improves neuroinflammation in cerebral ischemia-reperfusion injury mice by upregulating the TMEM240/ARHGDIB signaling axis and subsequently inhibiting the overactivation of the NF- κ B pathway.

Key words: amentoflavone; cerebral ischemia-reperfusion injury; neuroinflammation; TMEM240; ARHGDIB

脑缺血再灌注损伤是脑梗死治疗中的关键病理环节,虽然恢复血流对于挽救缺血半暗带神经元至关重要,但该过程本身可能引发一系列级联反应,导致比单纯缺血更为复杂的继发性损伤^[1]。作为中枢神经系统固有的免疫细胞,小胶质细胞持续监测并维持脑内稳态^[2]。脑缺血再灌注损伤发生后,静息态的小胶质细胞被迅速激活,并聚集至缺血区域及其半暗带,其活化后的功能具有双重性,既可发挥神经保护作用,也可能启动并加剧神经炎症反应^[3-4]。因此,靶向调控活化后小胶质细胞的炎症反应,是一种极具潜力的治疗策略。穗花杉双黄酮作为一种具有抗氧化、抗炎及神经保护活性的天然双黄酮化合物^[5],已有研究报道其可减轻脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经炎症^[6]。研究提示,神经特异性跨膜蛋白 240 (TMEM240)可作为上游调控因子,显著上调其下游分子 Rho GDP 解离抑制因子 β (ARHGDIB) 的表达,而后者能通过负向调控核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路来抑制机体炎症反应^[7-8]。为此,本研究通过建立小鼠脑缺血再灌注损伤模型,并结合 RNA 干扰技术,旨在多维度验证穗花杉双黄酮的神经保护作用,并深入探究其潜在的分子机制,以期为脑缺血再灌注损伤的临床治疗提供新的理论依据和潜在干预靶点。

1 材料与方法

1.1 动物

125 只 8~10 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 23~27 g,购自维通达(苏州)生物技术有限公司,生产许可证号 SCXK(苏)2024-0010。小鼠饲养于标准光暗周期环境中,自由摄食饮水。本实验已获得郑州市中心医院医学伦理委员会批准(编号 202508002)。

1.2 试剂

穗花杉双黄酮(质量分数 \geq 98%,批号 DS0046,成都德思特生物技术有限公司);靶向 TMEM240 的短发夹 RNA (sh-TMEM240)慢病毒及阴性对照短发夹 RNA (sh-NC)慢病毒(批号 A50272,赛默飞

世尔科技有限公司); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色液(批号 BP-DL512,南京森贝伽生物科技有限公司);小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号 GOY-E0293)、白细胞介素 (IL)-1 β (批号 GOY-E1087)、IL-6 (批号 GOY-E3026)、IL-10 (批号 GOY-E1098)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1,批号 GOY-E0336) ELISA 试剂盒(上海谷研生物科技有限公司);兔源一抗离子钙接头蛋白 1 (Iba-1,批号 ab178846)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS,批号 ab178945)、精氨酸酶 1 (Arg-1,批号 ab96183)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH,批号 ab181603) (英国 Abcam 公司);兔源一抗 TMEM240 (批号 PA5-80139)、ARHGDIB (批号 H00000397-D01P)、核因子 κ B p65 亚基 (NF- κ B p65) (批号 51-0500)、p-NF- κ B p65 (批号 MA5-15160) (赛默飞世尔科技公司)。

1.3 脑缺血再灌注损伤模型的构建

采用线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型^[9]。小鼠 ip 1%戊巴比妥钠溶液 (40 mg/kg) 麻醉后,于颈部正中切口,分离并暴露右侧颈总动脉;在结扎颈外动脉后,将线栓从颈总动脉插入,经颈内动脉向前推送至大脑中动脉起始部,以阻断大脑中动脉供血区的血流;缺血 45 min 后,缓慢拔出线栓以恢复再灌注。术后以神经功能缺损评分达到 1~3 分作为模型构建成功的判定标准^[10]。其中 96 只被成功建模,造模成功率为 95.05%。

1.4 分组与处理

将造模成功的 96 只小鼠随机分为模型组、穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-NC 组、穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组,每组 24 只。另设假手术组 24 只,该组小鼠仅接受麻醉、颈部手术暴露,不进行线栓血管阻塞。所有分组在造模成功后开始给药干预,持续 7 d,1 次/d。穗花杉双黄酮组 ig 60 mg/kg 穗花杉双黄酮^[6]并侧脑室注射等量生理盐水;穗花杉双黄酮+sh-NC 组 ig 60 mg/kg 穗花杉双黄酮并侧脑室注射 2 μ L (滴度为 1×10^9 TU/mL)

sh-NC 慢病毒；穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组 ig 60 mg/kg 穗花杉双黄酮并侧脑室注射 2 μ L (滴度为 1×10^9 TU/mL) sh-TMEM240 慢病毒；模型组与假手术组则 ig 并侧脑室注射等量的生理盐水。

1.5 Zea-longa 评分检测

对各组小鼠进行 Zea-longa 评分。Zea-longa 神经功能缺损评分标准^[11]：0 分代表无任何神经功能缺损症状；1 分代表术侧对侧前肢不能完全伸展，伴身体向该侧轻度偏斜；2 分代表行走时向术侧对侧持续转圈；3 分代表行走时身体向术侧对侧倾倒；4 分代表意识丧失或无自主行走能力。

1.6 平衡木实验评估运动协调功能

对各组小鼠进行平衡木测试，评分标准^[12]：0 分代表小鼠完全无法在横杆上行走；1 分代表小鼠能抓住横杆但无法移动；2 分代表小鼠试图通过横杆但中途掉落；3 分代表小鼠在通过时脚滑次数超过 50%；4 分代表小鼠在通过时脚滑次数少于 50%；5 分代表小鼠仅依靠单脚通过横杆；6 分代表小鼠能无脚滑地顺利通过横杆。

1.7 TTC 染色检测脑梗死体积比

每组随机取 6 只小鼠完整脑组织，制备脑组织冠状切片，将脑组织冠状切片浸入 2% TTC 染液中，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。采用 Image J 软件对脑组织总体积及梗死体积进行定量分析。

梗死体积比 = 梗死体积 / 脑组织总体积

1.8 干湿质量法检测脑组织含水量

从每组剩余的 18 只小鼠中随机取 6 只小鼠的完整脑组织标本，使用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗以去除残留血液；随后用吸水纸吸去表面多余液体，立即置于培养皿中称质量，记录脑组织湿质量。将脑组织放入干燥箱，于 100 $^{\circ}$ C 下干燥 36 h 后再次称质量，记录脑组织干质量。

脑组织含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量

1.9 HE 染色检测缺血侧脑组织病理

从每组剩余的 12 只小鼠中随机取 6 只小鼠的缺血侧脑组织标本，脑组织标本经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋后，制备厚度为 4 μ m 的病理切片。切片经 HE 染色后，采用光学显微镜采集图像。

1.10 免疫荧光染色检测缺血侧脑组织中 Iba-1⁺ iNOS⁺、Iba-1⁺ Arg-1⁺ 阳性细胞数

取缺血侧脑组织切片，切片经 PBS 洗涤后，置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱干燥 1 h；随后使用含 10% 山羊血清及 0.5% Triton X-100 的封闭液室温封闭 1 h。封闭结束

后，将切片与一抗 Iba-1、iNOS (或 Arg-1) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；经 PBS 洗涤 3 次后，加入二抗避光室温孵育 1 h。最后使用 DAPI 对切片进行复染 5 min，滴加封片剂后封片保存。使用荧光显微镜观察缺血侧脑组织中 Iba-1⁺ iNOS⁺、Iba-1⁺ Arg-1⁺ 阳性表达情况，并统计 Iba-1⁺ iNOS⁺、Iba-1⁺ Arg-1⁺ 阳性细胞数变化。

1.11 ELISA 检测脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TGF- β 1 含量

取每组剩余的 6 只小鼠的缺血侧脑组织，严格按照 ELISA 试剂盒说明检测缺血侧脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TGF- β 1 含量。

1.12 Western blotting 检测脑组织中 TMEM240、ARHGDI B、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达

使用 RIPA 裂解液裂解组织样本以提取总蛋白。随后，取等量蛋白提取物上样至 SDS-PAGE 凝胶中进行分离，电泳结束后将蛋白转印至聚偏氟乙烯膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭膜上非特异性结合位点，之后将转印后的膜与一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，一抗如下：TMEM240、ARHGDI B、p-NF- κ B p65、GAPDH、NF- κ B p65。孵育结束后，将膜与二抗于室温孵育 2 h，采用增强化学发光显色液在化学发光成像系统上进行条带显影。最后使用 Image J 软件对蛋白条带的灰度值进行定量分析。

1.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均值比较采用单因素方差分析结合事后 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 穗花杉双黄酮对小鼠 Zea-longa 评分、平衡木测试评分的影响

与模型组比较，穗花杉双黄酮组 Zea-longa 评分显著降低，平衡木测试评分升高 ($P < 0.05$)；与穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较，穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组 Zea-longa 评分升高，平衡木测试评分降低 ($P < 0.05$)，见表 1。

2.2 穗花杉双黄酮对小鼠脑梗死体积比、脑组织含水量的影响

与模型组比较，穗花杉双黄酮组脑梗死体积比、脑组织含水量显著降低 ($P < 0.05$)；与穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较，穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组脑梗死体积比、脑组织含水量显著升高 ($P < 0.05$)，见图 1、表 2。

表 1 各组小鼠 Zea-longa 评分、平衡木测试评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

Table 1 Comparison of Zea-longa scores and balance beam test scores among different groups of mice ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

组别	剂量	Zea-longa 评分	平衡木测试评分
假手术组	—	0.00±0.00	6.00±0.00
模型	—	2.89±0.16*	3.46±0.13*
穗花杉双黄酮	60 mg·kg ⁻¹	1.46±0.11#	4.67±0.14#
穗花杉双黄酮+60mg·kg ⁻¹ +sh-NC	2μL	1.50±0.12	4.63±0.13
穗花杉双黄酮+60mg·kg ⁻¹ +sh-TMEM240	2μL	2.09±0.13&@	3.94±0.11&@

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与穗花杉双黄酮组比较: & $P < 0.05$; 与穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较: @ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs amentoflavone group; @ $P < 0.05$ vs amentoflavone + sh-NC group.

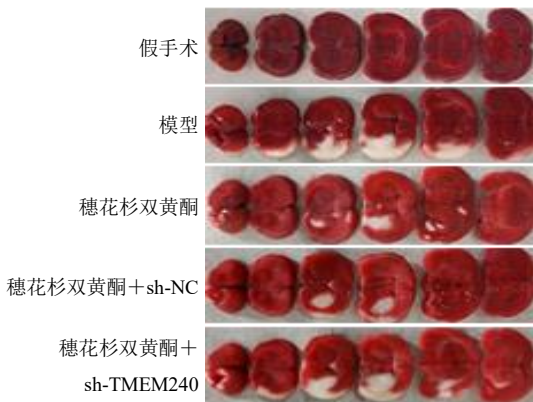


图 1 TTC 染色检测脑梗死

Fig. 1 TTC staining for detecting cerebral infarction

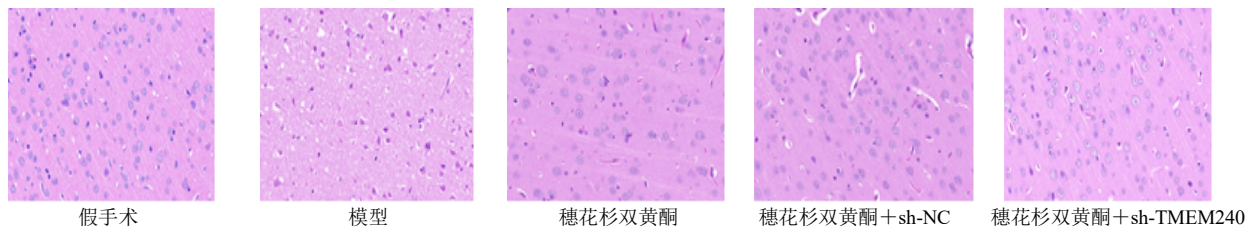


图 2 大鼠缺血侧脑组织病理的 HE 染色检测 (×400)

Fig. 2 HE staining of the pathological changes of the ischemic side brain tissue in rats (×400)

细胞数升高 ($P < 0.05$); 与穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较, 穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组缺血侧脑组织中 Iba-1⁺ iNOS⁺阳性细胞数升高, Iba-1⁺ Arg-1⁺阳性细胞数降低 ($P < 0.05$), 见图 3、4 和表 3。

表 2 各组小鼠脑梗死体积比、脑组织含水量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of cerebral infarction volume ratios and brain tissue water content among different groups of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	脑梗死体积比/%	脑组织含水量/%
假手术组	—	0.00±0.00	77.63±1.23
模型	—	32.89±1.95*	85.16±1.45*
穗花杉双黄酮	60 mg·kg ⁻¹	14.65±0.88#	79.83±1.03#
穗花杉双黄酮+60mg·kg ⁻¹ +sh-NC	2μL	14.93±0.91	80.01±1.05
穗花杉双黄酮+60mg·kg ⁻¹ +sh-TMEM240	2μL	25.96±1.57&@	83.22±0.76&@

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与穗花杉双黄酮组比较: & $P < 0.05$; 与穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较: @ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs amentoflavone group; @ $P < 0.05$ vs amentoflavone + sh-NC group.

2.3 穗花杉双黄酮对 CIRI 小鼠缺血侧脑组织病理的影响

假手术组脑组织神经元形态正常, 结构清晰; 模型组缺血侧脑组织神经元固缩深染、细胞周围空泡增多、组织水肿及炎性细胞浸润; 穗花杉双黄酮组缺血侧脑组织病理损伤明显改善, 表现为神经元形态较完整、水肿减轻及炎性浸润减少; 穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组缺血侧脑组织出现明显的神经元损伤和炎症加剧现象, 见图 2。

2.4 穗花杉双黄酮对小鼠缺血侧脑组织中小胶质细胞极化的影响

与模型组比较, 穗花杉双黄酮组缺血侧脑组织中 Iba-1⁺ iNOS⁺阳性细胞数降低, Iba-1⁺ Arg-1⁺阳性

2.5 穗花杉双黄酮对小鼠缺血侧脑组织中炎症反应的影响

与模型组比较, 穗花杉双黄酮组脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低, IL-10、TGF- β 1 水平升高 ($P < 0.05$); 与穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-

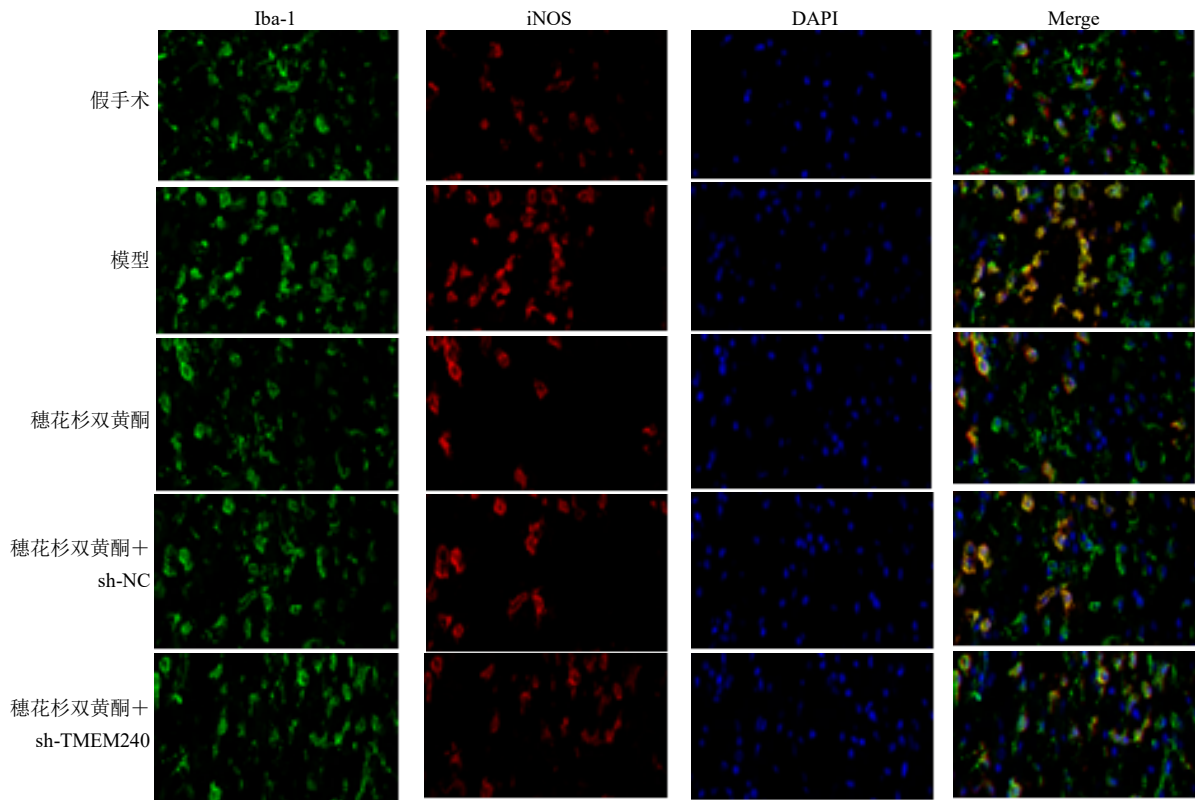


图 3 免疫荧光染色检测 Iba-1 与 iNOS 共表达 (×400)

Fig. 3 Immunofluorescence staining for detecting the co-expression of Iba-1 and iNOS (×400)

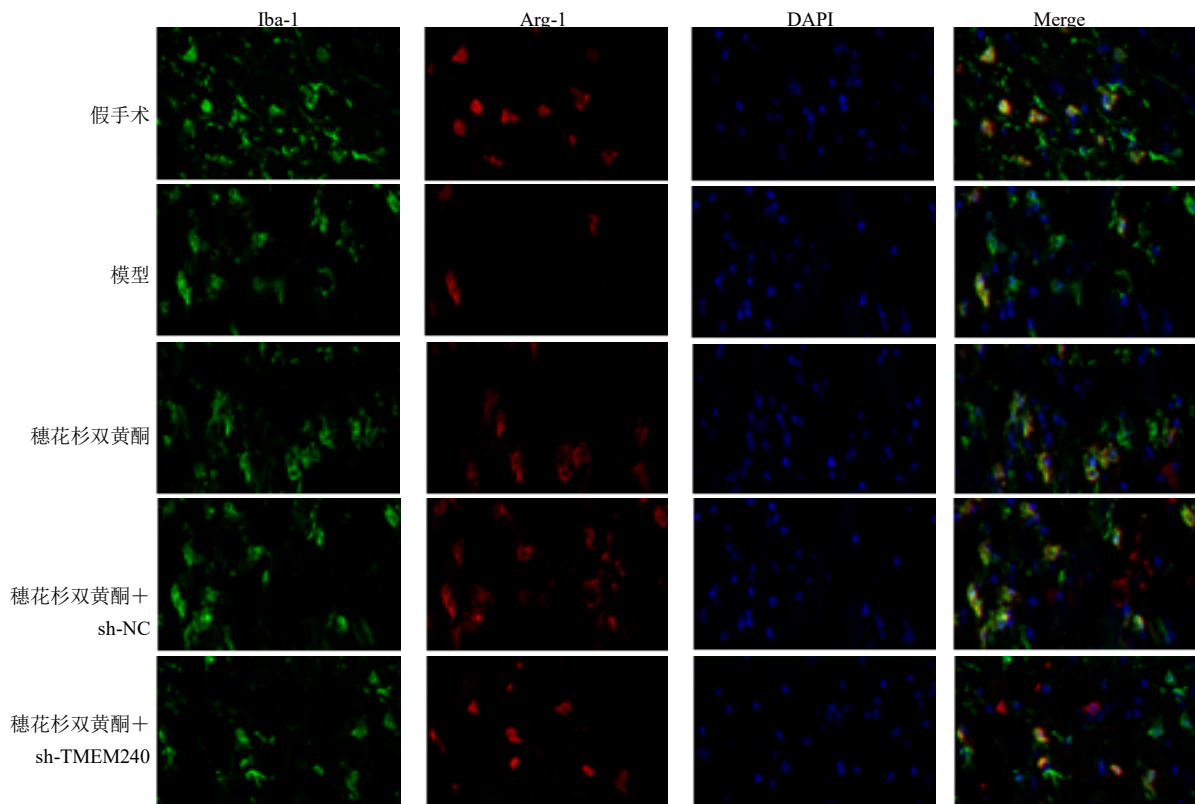


图 4 免疫荧光染色检测 Iba-1 与 Arg-1 共表达 (×400)

Fig. 4 Immunofluorescence staining for detecting the co-expression of Iba-1 and Arg-1 (×400)

表 3 各组小鼠缺血侧脑组织中 Iba-1⁺ iNOS⁺阳性细胞数、Iba-1⁺ Arg-1⁺阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of the number of Iba-1⁺ iNOS⁺ positive cells and Iba-1⁺ Arg-1⁺ positive cells in the ischemic side brain tissue of each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	Iba-1 ⁺ iNOS ⁺ 阳性细胞数/个	Iba-1 ⁺ Arg-1 ⁺ 阳性细胞数/个
假手术	—	7.23 ± 0.41	12.68 ± 0.71
模型	—	29.84 ± 1.65*	3.01 ± 0.14*
穗花杉双黄酮	60 mg·kg ⁻¹	12.68 ± 0.81#	9.73 ± 0.52#
穗花杉双黄酮+sh-NC	60 mg·kg ⁻¹ +2 μL	12.81 ± 0.90	9.96 ± 0.61
穗花杉双黄酮+sh-TMEM240	60 mg·kg ⁻¹ +2 μL	20.44 ± 1.36&@	5.21 ± 0.34&@

与假手术组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与穗花杉双黄酮组比较: &P<0.05; 与穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较: @P<0.05。
*P < 0.05 vs sham operation group; #P < 0.05 vs model group; &P < 0.05 vs amentoflavone group; @P < 0.05 vs amentoflavone + sh-NC group.

NC 组比较, 穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组脑组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平升高, IL-10、TGF-β1 水平降低 (P<0.05), 见表 4。

2.6 穗花杉双黄酮对小鼠脑组织中 TMEM240/ARHGDI B 通路关键蛋白的影响

与模型组比较, 穗花杉双黄酮组缺血侧脑组织

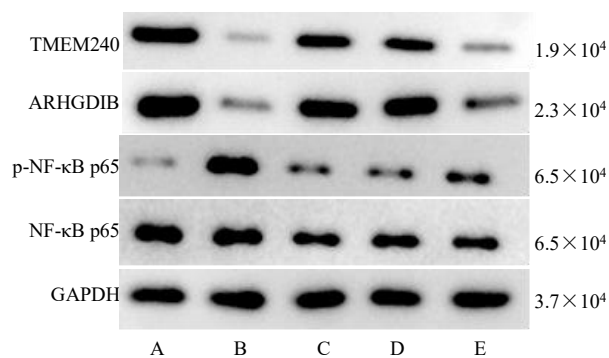
中 TMEM240、ARHGDI B 蛋白表达升高, p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达降低 (P<0.05); 与穗花杉双黄酮组、穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较, 穗花杉双黄酮+sh-TMEM240 组脑组织中 TMEM240、ARHGDI B 蛋白表达降低, p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达升高 (P<0.05), 见图 5、表 5。

表 4 各组小鼠缺血侧脑组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10、TGF-β1 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, and TGF-β1 in the ischemic brain tissue of each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	TNF-α/(pg·mg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mg ⁻¹)	IL-6/(pg·mg ⁻¹)	IL-10/(pg·mg ⁻¹)	TGF-β1/(pg·mg ⁻¹)
假手术	—	27.25 ± 1.56	41.61 ± 2.78	91.15 ± 7.73	96.67 ± 5.19	156.68 ± 10.14
模型	—	69.88 ± 4.54*	95.03 ± 5.12*	168.85 ± 10.18*	34.56 ± 2.36*	58.57 ± 3.35*
穗花杉双黄酮	60 mg·kg ⁻¹	36.67 ± 1.96#	58.73 ± 3.56#	119.64 ± 7.05#	75.68 ± 4.03#	123.45 ± 7.06#
穗花杉双黄酮+sh-NC	60 mg·kg ⁻¹ +2 μL	37.05 ± 2.03	59.27 ± 3.78	121.33 ± 8.43	76.82 ± 4.16	125.64 ± 7.12
穗花杉双黄酮+sh-TMEM240	60 mg·kg ⁻¹ +2 μL	54.45 ± 2.98&@	80.44 ± 6.73&@	143.56 ± 8.96&@	50.57 ± 2.83&@	78.79 ± 4.84&@

与假手术组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与穗花杉双黄酮组比较: &P<0.05; 与穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较: @P<0.05。
*P < 0.05 vs sham operation group; #P < 0.05 vs model group; &P < 0.05 vs amentoflavone group; @P < 0.05 vs amentoflavone + sh-NC group.



A-假手术, B-模型, C-穗花杉双黄酮, D-穗花杉双黄酮+sh-NC, E-穗花杉双黄酮+sh-TMEM240。
A-sham operation, B-model, C-amentoflavone, D-amentoflavone+ sh-NC, E-amentoflavone+ sh-TMEM240.

图 5 缺血侧脑组织中 TMEM240、ARHGDI B、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达检测

Fig. 5 Detection of protein expressions of TMEM240, ARHGDI B, and p-NF-κB p65/NF-κB p65 in the ischemic side brain tissue

3 讨论

脑缺血再灌注损伤是缺血性脑损伤中的一种关键病理机制, 涉及神经炎症、氧化应激及脑血管受损等多种复杂的进程^[13-15]。天然产物中的活性成分在减轻此类损伤方面展现出独特优势^[16]。本研究通过线栓法构建了小鼠脑缺血再灌注损伤模型, 结果显示, 与假手术组相比, 模型组小鼠 Zea-longa 评分升高, 平衡木测试评分降低, 提示模型构建成功且小鼠出现了明显的神经功能缺损。TTC 染色与脑组织含水量检测进一步证实, 脑缺血再灌注损伤小鼠脑梗死体积与脑组织含水量均显著升高。HE 染色结果则显示, 缺血侧脑组织出现神经元排列紊乱、核固缩明显以及显著的炎性细胞浸润, 这反映了该损伤引发了严重的脑组织梗死、水肿及病理损伤。此外, 神经炎症的核心特征在于小胶质细胞极化失衡与炎症因子分泌紊乱^[17]。活化的小胶质细胞

表 5 各组小鼠缺血侧脑组织中 TMEM240、ARHGDI B、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Comparison of protein expression of TMEM240, ARHGDI B, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 in the ischemic brain tissue of each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	TMEM240/GAPDH	ARHGDI B/GAPDH	p-NF- κ B p65/NF- κ B p65
假手术	—	2.18 \pm 0.16	1.43 \pm 0.15	0.14 \pm 0.02
模型	—	0.83 \pm 0.10*	0.61 \pm 0.08*	0.73 \pm 0.08*
穗花杉双黄酮	60 mg·kg ⁻¹	1.46 \pm 0.13 [#]	1.05 \pm 0.12 [#]	0.32 \pm 0.04 [#]
穗花杉双黄酮+sh-NC	60 mg·kg ⁻¹ +2 μ L	1.51 \pm 0.15	1.08 \pm 0.14	0.36 \pm 0.03
穗花杉双黄酮+sh-TMEM240	60 mg·kg ⁻¹ +2 μ L	1.17 \pm 0.12 ^{&@}	0.83 \pm 0.09 ^{&@}	0.51 \pm 0.06 ^{&@}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与穗花杉双黄酮组比较: [&] $P < 0.05$; 与穗花杉双黄酮+sh-NC 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs amentoflavone group; [@] $P < 0.05$ vs amentoflavone + sh-NC group.

能够响应微环境变化,极化为两种功能截然不同的表型:即经典的促炎 M1 型和替代活化的抗炎 M2 型。M1 型小胶质细胞可产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等多种促炎介质;而 M2 型则主要分泌 IL-10、TGF- β 1 等具有抗炎特性的细胞因子^[18]。越来越多的证据表明,在脑缺血再灌注损伤中,活化的小胶质细胞扮演着双刃剑的角色,其最终作用取决于其向 M1 型还是 M2 型极化——M1 型极化会加重神经炎症与脑损伤,而 M2 型极化则可促进神经元存活与组织修复^[19-20]。本研究结果显示,模型组缺血侧脑组织中 Iba-1⁺iNOS⁺阳性细胞数显著增多,Iba-1⁺Arg-1⁺阳性细胞数减少;同时促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高,抗炎因子 IL-10、TGF- β 1 水平降低。这些数据一致表明,脑缺血再灌注损伤诱导小胶质细胞向促炎 M1 型极化,从而引发了炎症反应的失衡。这也提示,促进小胶质细胞由促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转换,或可成为治疗脑缺血再灌注损伤的一种极具潜力的策略。

穗花杉双黄酮在多种缺血再灌注损伤模型中均被证实具有明确的保护效应,如已有研究报道其可改善大鼠的心肌缺血再灌注损伤^[21]。在本研究中,经过穗花杉双黄酮干预后,模型小鼠的神经功能得到显著改善,具体表现为脑梗死体积缩小、脑水肿减轻以及神经元形态的恢复。进一步研究发现,穗花杉双黄酮能够促进小胶质细胞向具有抗炎作用的 M2 表型极化,并重新平衡促炎与抗炎因子的分泌,从而发挥关键的抗炎作用。这一系列效应是穗花杉双黄酮改善脑缺血再灌注损伤的重要途径,研究结果为将穗花杉双黄酮应用于脑缺血再灌注损伤的临床治疗提供了更为坚实的理论依据。

已有文献表明, TMEM240 能够上调 ARHGDI B 的表达,后者通过负向调控核心促炎转录因子 NF-

κ B 的活性,最终实现对炎症反应的抑制^[8]。本研究中,模型组小鼠缺血侧脑组织中 TMEM240 与 ARHGDI B 的蛋白表达水平显著降低,同时 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达升高,提示脑缺血再灌注损伤能够抑制 TMEM240/ARHGDI B 通路的激活,并同时激活 NF- κ B 炎症通路。而经穗花杉双黄酮干预后, TMEM240 和 ARHGDI B 的蛋白表达均得到上调, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达降低。关键的是, sh-TMEM240 组中,穗花杉双黄酮对 ARHGDI B 的上调作用,对 NF- κ B 活化的抑制、对小胶质细胞 M1/M2 表型的调控、以及对神经炎症和神经功能的保护效应被显著逆转,这直接证实了穗花杉双黄酮对 NF- κ B 通路的抑制作用及其神经炎症改善功效,是依赖于 TMEM240 的介导。

综上所述,穗花杉双黄酮通过上调 TMEM240/ARHGDI B 信号轴抑制 NF- κ B 通路过度活化,从而驱动小胶质细胞由促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转化,改善脑缺血再灌注损伤小鼠的神经炎症。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu X Y, Duan Z Y, Zhou X, *et al.* SFXN1 reduction alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by promoting neuronal survival and reducing neuroinflammation [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2025, 31(5): e70457.
- [2] Zheng Y X, Ren Z L, Liu Y, *et al.* T cell interactions with microglia in immune-inflammatory processes of ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(5): 1277-1292.
- [3] Li Y W, Xu X X, Wu X, *et al.* Cell polarization in ischemic stroke: Molecular mechanisms and advances [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(3): 632-645.
- [4] Sun Y L, Liu D, Liu Y C, *et al.* VISTA alleviates microglia-mediated neuroinflammation after cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating ACOD1/Itaconic acid

- metabolism [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(10): 13430-13448.
- [5] Wang Z Y, Wang B, Jin X. Amentoflavone attenuates homocysteine-induced neuronal ferroptosis-mediated inflammatory response: Involvement of the SLC7A11/GPX4 axis activation [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 215: 111005.
- [6] Saeedan A S, Abdel-Rahman R F, Soliman G A, et al. Amentoflavone attenuates oxidative stress and neuroinflammation induced by cerebral ischemia/reperfusion in rats by targeting HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Saudi Pharm J*, 2023, 31(11): 101798.
- [7] 胡琼琼, 李文沛, 胥丽霞, 等. 神经特异性跨膜蛋白 240 与过氧化物酶体共定位并激活 RhoGDP 解离抑制因子 β [J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(6): 1260-1269.
- [8] Yan C G, Wang X M, Liu Y L, et al. Protective role of Rho guanosine diphosphate dissociation inhibitor, Ly-GDI, in pulmonary alveolitis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140804.
- [9] Liu J B, Zhang X T, Guo J P, et al. Ursolic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated microglia pyroptosis and neuroinflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1622131.
- [10] 胡广泽, 袁珊, 何哲, 等. miR-129-5p 靶向 HMGB1 减轻大鼠脑缺血再灌注损伤诱导的炎症和脑组织损伤 [J]. *石河子大学学报: 自然科学版*, 2025, 43(4): 405-413.
- [11] Xie J L, Li X, Zhang L M, et al. Genistein-3'-sodium sulfonate ameliorates cerebral ischemia injuries by blocking neuroinflammation through the α 7nAChR-JAK2/STAT3 signaling pathway in rats [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153745.
- [12] 刘若静, 赵雪, 朱毅祯, 等. 人参皂苷 Rb₁ 调控小胶质细胞极化减轻小鼠脑缺血损伤 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(29): 6219-6227.
- [13] Akhtar W, Muazzam Khan M, Kumar S, et al. Pathophysiology of cerebral ischemia-reperfusion injury: An overview of oxidative stress and plant-based therapeutic approaches [J]. *Brain Res*, 2025, 1847: 149308.
- [14] Chen R D, Qian L, Zhang Q, et al. SMP30 alleviates cerebral ischemia/reperfusion-induced neuronal injury by inhibiting HDAC4/PSD-95 to preserve mitochondrial function [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2025, 84(1): 59-73.
- [15] Ye Z, Liu R Q, Wang H X, et al. Neuroprotective potential for mitigating ischemia-reperfusion-induced damage [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(8): 2199-2217.
- [16] Guo Y P, Dong X W, Liu M, et al. Jolkinolide B mitigates cerebral ischemia-reperfusion injury by promoting microglial M1/M2 polarization through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2025, 31(11): e70653.
- [17] Xu W T, Zhou M J, Li L L, et al. Mbn1l1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via NF- κ B pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(11): 13899-13916.
- [18] Liu Y, Wang W, Di B H, et al. Curcumol ameliorates neuroinflammation after cerebral ischemia-reperfusion injury via affecting microglial polarization and Treg/Th17 balance through Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 300.
- [19] Liu R J, Zhao X, Zhu Y Z, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates neuroinflammation via activating Wnt/ β -catenin signaling pathway to exert neuroprotective effect on cerebral ischemic-reperfusion injury [J]. *Front Aging Neurosci*, 2025, 17: 1555067.
- [20] Wang X Z, Zhang S Y, Lv B C, et al. Circular RNA PTP4A2 regulates microglial polarization through STAT3 to promote neuroinflammation in ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14512.
- [21] 黎丹. 穗花杉双黄酮对心肌缺血再灌注损伤的保护效应研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.

[责任编辑 高源]