

栀子苷介导 GLP-1R/Akt 信号通路改善大鼠脑缺血再灌注损伤和神经元凋亡的研究

谭慧敏¹, 周亮², 邹慧禅³

1. 广州市增城区中心医院(南方医院增城分院) 神经内科, 广东 广州 511300

2. 南方医科大学南方医院 神经内科, 广东 广州 510515

3. 广州市增城区中心医院(南方医院增城分院) 药剂科, 广东 广州 511300

摘要: 目的 观察栀子苷对脑缺血再灌注损伤(CIRI)模型大鼠的神经保护作用及对胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的影响。方法 50只SD大鼠随机分为假手术组,模型组,栀子苷低、高剂量组及尼莫地平片组,每组10只。采用线栓法制备CIRI大鼠模型,缺血2h再灌注24h后,栀子苷低、高剂量组大鼠分别ig给予10、40 mg·kg⁻¹的栀子苷,尼莫地平片组大鼠ig给予8.1 mg·kg⁻¹尼莫地平,假手术组和模型组大鼠ig等体积生理盐水,每天1次,连续7d。造模后及给药结束后,分别对各组大鼠进行神经功能缺损评分;给药结束后,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及白细胞介素-6(IL-6)水平,苏木素-伊红(HE)染色检测脑组织病理学变化,尼氏染色检测神经元与尼氏小体变化,免疫组化染色检测脑组织B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2关联X蛋白(Bax)表达,蛋白质印迹法(Western blotting)检测脑组织细胞色素C(Cyt-C)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)、胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)及磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)蛋白表达水平。结果 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P<0.05$),血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著升高($P<0.05$);皮质细胞间质疏松、增宽,有大量神经元细胞质萎缩和细胞核损伤;脑神经元皱缩,尼氏小体变小,数目明显减少。大鼠脑组织Bcl-2表达显著降低($P<0.05$),Bax表达显著升高($P<0.05$);脑组织中Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),GLP-1R和p-Akt蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,栀子苷高剂量组和尼莫地平片组大鼠神经功能缺损评分均显著降低($P<0.05$),血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著降低($P<0.05$),皮质细胞较为整齐,神经元细胞和尼氏小体损伤减小,Bcl-2表达显著升高($P<0.05$),Bax表达显著降低($P<0.05$),同时,Cyt-C、Caspase-3及Caspase-9蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),GLP-1R和p-Akt蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。结论 栀子苷能够改善大鼠CIRI,减少神经元凋亡,其作用机制可能与激活GLP-1R/Akt信号通路有关。

关键词: 栀子苷;脑缺血再灌注损伤;神经元凋亡;胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R);蛋白激酶B(Akt)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)09-1822-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.017

Geniposide-mediated GLP-1R/Akt signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury and neuronal apoptosis in rats

TAN Huimin¹, ZHOU Liang², ZOU Huichan³

1. Department of Neurology, City Center Hospital of Zengcheng District in Guangzhou (Zengcheng Branch of Nanfang Hospital), Guangzhou 511300, China

2. Department of Neurology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

3. Department of Pharmacy, City Center Hospital of Zengcheng District in Guangzhou (Zengcheng Branch of Nanfang Hospital), Guangzhou 511300, China

Abstract: Objective To investigate effect of geniposide on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) and its effects on glucagon like peptide-1 receptor (GLP-1R)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, low-dose geniposide group, high-dose geniposide group, and nimodipine tablet group, with 10

收稿日期: 2022-01-13

基金项目: 2021年广东省医学科研基金(B2022009)

第一作者: 谭慧敏,女,硕士,副主任医师,研究方向为脑血管病的基础与临床。E-mail: 25249537@qq.com

rats in each group. The thread embolism method was used to establish the CIRC model. After 2 h of ischemia and 24 h of reperfusion, the rats in low-dose and high-dose geniposide groups were given 10 mg·kg⁻¹ and 40 mg·kg⁻¹ geniposide by ig, respectively, rats in the nimodipine tablet group were given 8.1 mg·kg⁻¹ nimodipine ig, rats in the sham operation group and model group were given an equal volume of normal saline, once a day for seven consecutive days. After modeling and administration, the neurological deficits of rats in each group were scored. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in serum. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect brain histopathological changes. Nissl staining was used to detect changes in neurons and Nissl bodies. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of B lymphocyte tumor-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in brain tissue. Western blotting was used to detect cytochrome C (Cyt-C), Caspase-3, and Caspase-9, glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) protein expression levels. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological deficit score of the model group was significantly higher ($P < 0.05$), the level of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 increased significantly ($P < 0.05$), cortical intercellular matrix was loose and widened, and there were a large number of neuronal cytoplasmic atrophy and nuclear damage, the brain neurons shrink, the Nissl body became smaller, and the number decreased significantly, the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.05$) and the expression of Bax was significantly increased ($P < 0.05$), the expression levels of Cyt-C, Caspase-3 and Caspase-9 protein in brain tissue were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of GLP-1R and p-Akt protein were significantly decreased ($P < 0.05$). After treatment, compared with model group, the neurobehavioral injury score of the high-dose geniposide group and nimodipine group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were significantly reduced ($P < 0.05$), the cortical cells are relatively neat, the damage of neuronal cells and Nissl bodies were reduced, Bcl-2 expression was significantly increased, Bax expression was significantly reduced ($P < 0.05$). At the same time, the expression levels of Cyt-C, Caspase-3 and Caspase-9 protein decreased significantly, the expression levels of GLP-1R and p-Akt protein increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Geniposide can improve cerebral ischemia-reperfusion injury and reduce neuronal apoptosis in rats, and its mechanism may be related to the activation of GLP-1R/Akt signaling pathway.

Key words: geniposide; cerebral ischemia-reperfusion injury; neuronal apoptosis; GLP-1R/Akt signaling pathway; protein kinase B

近年来,缺血性脑卒中已成为全球常见的急性脑血管疾病之一,也是主要的致死性疾病,且其发生出现年轻化趋势^[1]。临床上治疗缺血性脑卒中的原则是尽早恢复血液再灌注,但通过静脉溶栓和机械取栓手术等治疗方法使血管再通后往往引起脑水肿、脑出血及神经元死亡等继发性脑损伤,这种现象被称为脑缺血再灌注损伤(CIRI)^[2]。CIRI是多种病理生理过程相互作用的结果,其潜在机制非常复杂,主要包括炎症反应、氧化应激、神经细胞凋亡和细胞自噬等,有研究表明,CIRI后会导致多种疾病的发病率和死亡率增高^[3-4],因此,改善CIRI是治疗缺血性脑血管病的一个重要切入点。

栀子苷为环烯醚萜苷类化合物,是茜草科栀子的主要活性成分,目前,栀子苷已被证实具有免疫调节、抗氧化和抗炎等作用^[5-6]。Lv等^[7]研究表明栀子苷可通过抑制炎症反应改善阿尔茨海默病小鼠的认知功能来发挥神经保护作用;Chen等^[8]发现栀子苷可以通过增强帕金森病小鼠的生长因子信号传导和减少细胞凋亡来发挥神经保护作用。此外,栀子苷在各种组织器官缺血再灌注损伤中具有良好的治疗作用,例如肾脏缺血再灌注损伤^[9]、心肌缺

血再灌注损伤^[10],还有研究表明其在CIRI中发挥一定的保护作用^[11],然而,关于栀子苷对CIRI中神经元凋亡作用以及相关信号机制的研究罕见报道。为进一步明确栀子苷在CIRI中发挥的神经保护作用,本研究通过构建CIRI大鼠模型,观察栀子苷对大鼠CIRI和神经元凋亡的影响,以及对GLP-1R/Akt信号通路的影响,探讨其对脑血管疾病的治疗作用及相关机制。

1 材料

1.1 实验动物

50只健康SPF级雄性SD大鼠8~10周龄,体重(200±30)g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证号SYXK(粤)2016-0167。饲养在12 h/12 h光暗交替、湿度(55±10)%、温度(22±4)℃的饲养箱内,期间自由摄食与饮水。动物实验符合3R原则。

1.2 药品与试剂

栀子苷购自江苏永健医药公司,质量分数≥98%,批号102674;尼莫地平片(规格每片30 mg)购自拜耳医药保健有限公司。大鼠特异性肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介

素-6(IL-6) ELISA检测试剂盒购自美国R&D公司; 尼氏染色试剂和免疫组化染色试剂购自上海源叶生物科技有限公司; RIPA裂解液和BCA蛋白测定试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; HE染色试剂、PVDF膜与ECL发光液购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)单克隆抗体(ab32124)、兔抗Bcl-2关联X蛋白(Bax)单克隆抗体(ab32503)、兔抗细胞色素C(Cyt-C)单克隆抗体(ab133504)、兔抗胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)单克隆抗体(ab218532)及兔抗磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)多克隆抗体(ab8933)、兔抗半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)单克隆抗体(ab32351)、兔抗半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)单克隆抗体(ab32539)及兔抗 β -actin多克隆抗体(ab8227)购自英国Abcam公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

HHQ-2508切片机购自华海科教仪器厂, MHL1200光学显微镜购自广州市明慧科技有限公司, MK3酶标仪购自芬兰雷勃公司, RZ-10低温离心机购自德国Eppendorf公司, PowerPac 3000电泳系统购自美国伯乐公司。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组

将50只SD大鼠按照随机数字表法随机分为假手术组, 模型组, 栀子苷低、高剂量组, 尼莫地平片组, 每组10只。除对照组外, 其余各组大鼠根据改良Zea-Longa线栓法制备大鼠CIRI模型, 大鼠ip 10%水合氯醛麻醉后, 从颈正中切口后分离颈总动脉, 从颈外动脉向头端置入尼龙丝线栓, 向内插入 (18.0 ± 2.0) mm, 结扎缺血2 h后将尼龙丝线栓取出以恢复血流灌注, 再灌注24 h, 缝合皮肤并消毒。假手术组大鼠仅在切开颈部皮肤后将尼龙丝线栓插入颈动脉, 不深入到脑中动脉, 其余操作相同。

2.2 给药处理

模型制备完成后, 栀子苷低、高剂量组大鼠分别ig给予10、40 mg·kg⁻¹的栀子苷, 每天1次, 连续7 d; 尼莫地平片组大鼠ig给予8.1 mg·kg⁻¹尼莫地平, 每天1次, 连续7 d; 假手术组和模型组大鼠ig等体积生理盐水。

2.3 神经功能缺损评分

分别于造模后和给药治疗后, 参照文献报道^[12]方法对各组大鼠进行神经功能缺损评分。评价标准: 无神经功能缺损, 记为0分; 缺血对侧前爪无法

充分外展, 记为1分; 行走时向对侧转圈, 记为2分; 行走时向对侧倾倒, 记为3分; 无法自主行走, 意识丧失, 记为4分。

2.4 酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清炎症因子水平

给药结束进行神经功能缺损评分后, 使用10%水合氯醛麻醉大鼠, 心脏采血, 血液置于4℃离心机中以2 000 r·min⁻¹离心30 min, 取上清液, 根据ELISA试剂盒说明书检测血清中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平, 采用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(A)值。

2.5 苏木精-伊红(HE)染色检测大鼠脑组织病理改变

给药结束各组大鼠神经功能缺损评分和采血后, ip 10%水合氯醛麻醉并处死, 分离脑组织, 一部分在液氮中迅速冷冻后保存在-80℃中备用, 另一部分经石蜡包埋后, 制成4 μ m切片。参照说明书步骤进行HE染色, 切片脱蜡至水后, 苏木素染色液染色5 min, PBS冲洗后, 再用伊红染色液染色1 min, PBS洗涤, 并以梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 采用中性树胶封片, 在光镜下观察组织病理变化并采集图像。

2.6 尼氏染色观察神经元形态改变

大鼠脑组织经4%多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋, 切成约10 μ m的切片, 进行尼氏染色, 以1%甲酚紫溶液作为染料, 对脑组织神经元进行特异性染色, 在光镜下观察脑组织神经元形态及尼氏小体改变。

2.7 免疫组化染色检测大鼠脑组织Bcl-2和Bax表达

大鼠脑组织石蜡切片经脱蜡至水后, 在微波炉中进行高温修复, 自然降至室温, 以3%过氧化氢在37℃下孵育30 min, 5%山羊血清室温封闭1 h, 加入稀释的兔抗Bcl-2单克隆抗体(1:200)、兔抗Bax单克隆抗体(1:200), 放于4℃下孵育过夜, 次日, PBS洗涤, 加入相应稀释的二抗, 经DAB显色后, 进行复染、洗涤, 中性树胶封片后光镜观察并拍照, 使用Image J软件对图像进行测定分析。

2.8 Western blotting检测脑组织相关蛋白表达

将脑组织剪碎后加入RIPA裂解液提取总蛋白, BCA试剂盒检测蛋白浓度, 取50 μ g各组样品液经过15% SDS-PAGE电泳进行分离, 湿转法转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 将膜与稀释的兔抗Cyt-C单克隆抗体(1:1 000)、兔抗Caspase-3单克隆抗体(1:1 000)、兔抗Caspase-9单克隆抗体(1:

1 000)、兔抗GLP-1R单克隆抗体(1:500)、兔抗p-Akt多克隆抗体(1:1 000),置于4℃下孵育过夜,以兔抗 β -actin多克隆抗体(1:1 000)为内参,次日,TBST清洗,加入稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(1:5 000),室温孵育2 h,TBST清洗后,滴加ECL发光液曝光,用Image J软件分析各蛋白条带灰度值。

2.9 统计学分析

数据采用SPSS 20.0软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

各组大鼠神经功能缺损评分结果显示,造模后模型组和各给药组大鼠神经功能缺损评分均较假手术组显著升高($P < 0.05$),说明模型大鼠神经功能受损。给药治疗后,与模型组比较,栀子苷高剂量组和尼莫地平片组大鼠神经功能缺损评分均显著降低($P < 0.05$),但与假手术组比较,模型组和各给药组大鼠神经功能缺损评分仍显著升高($P < 0.05$);栀子苷高剂量组与尼莫地平片组大鼠神经功能缺损评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

3.2 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平比较

ELISA检测结果显示,模型组和各给药组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平较假手术组均显著

表1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of neurologic deficit scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	神经功能缺损评分	
		造模后	治疗后
假手术	—	0	0
模型	—	5.31±0.43*	4.67±0.33*
栀子苷	10	5.40±0.46*	4.23±0.35*
	40	5.37±0.39*	2.97±0.19**
尼莫地平片	8.1	5.38±0.47*	2.76±0.14**

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

* $P < 0.05$ vs sham operation group; ** $P < 0.05$ vs model group

升高($P < 0.05$)。与模型组比较,栀子苷高剂量组和尼莫地平片组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均显著降低($P < 0.05$),而栀子苷高剂量组与尼莫地平片组间这些因子水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

3.3 各组大鼠脑组织病理学变化

HE染色结果表明,假手术组大鼠脑皮质细胞排列整齐,神经元细胞形态正常,无损伤现象。在模型组中观察到细胞间质疏松、增宽,有大量的神经元细胞质萎缩和细胞核损伤。与模型组比较,栀子苷低、高剂量组和尼莫地平片组大鼠神经元细胞变性的数量减少,且栀子苷高剂量组和尼莫地平片组的完整神经元数量较栀子苷低剂量组增加,见图1。

表2 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
假手术	—	2.71±0.23	9.75±1.05	21.31±2.43
模型	—	24.46±2.09*	15.44±1.21*	52.77±4.97*
栀子苷	10	22.89±2.14*	14.87±1.43*	51.48±4.48*
	40	14.45±1.56**	12.16±1.25**	34.90±3.16**
尼莫地平片	8.1	12.37±1.10**	10.87±0.97**	35.67±3.20**

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

* $P < 0.05$ vs sham operation group; ** $P < 0.05$ vs model group

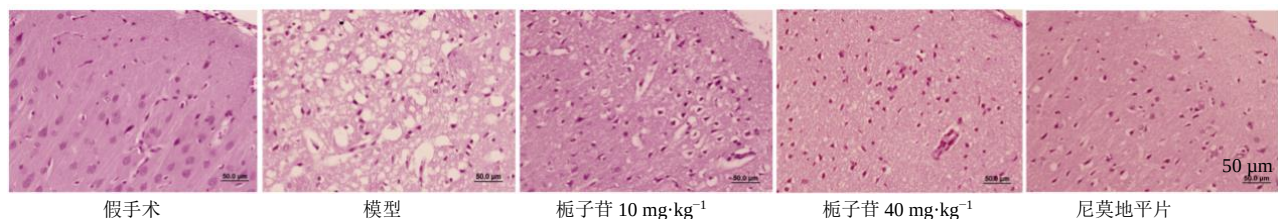


图1 HE染色检测大鼠脑组织病理学变化(×100)

Fig. 1 Pathological changes of rat brain detected by HE staining (×100)

3.4 各组大鼠神经元细胞凋亡比较

尼氏染色结果显示,假手术组大鼠脑组织神经元结构清晰,细胞呈圆形或椭圆形,可见丰富的尼氏小体。与假手术组比较,模型组大鼠脑神经元皱缩,尼氏小体变小,数目明显减少。与模型组比较,栀子苷高剂量组和尼莫地平片组大鼠神经元形态病理改变减轻,尼氏小体数目有所增加,见图2。

3.5 各组大鼠脑组织中Bcl-2和Bax蛋白表达水平比较

免疫组化染色结果显示,Bcl-2和Bax阳性染色均呈棕褐色颗粒。与假手术组比较,模型组和各给药组大鼠脑组织Bcl-2表达显著降低($P < 0.05$),Bax表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,栀子苷低、高剂量组和尼莫地平片组大鼠脑组织Bcl-2表达均显著升高($P < 0.05$),Bax表达均显著降低($P < 0.05$),结果见图3和4。

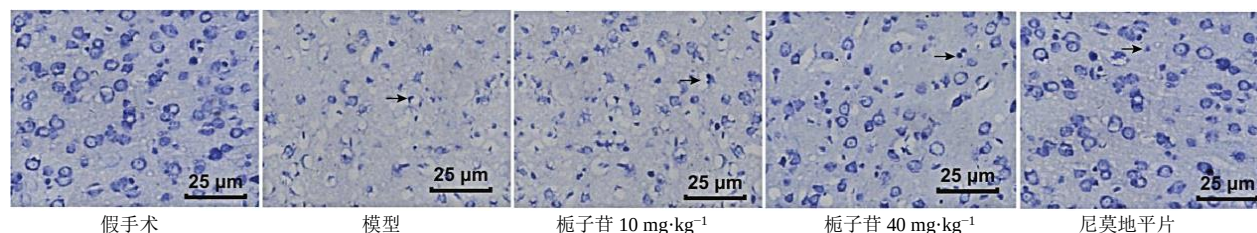
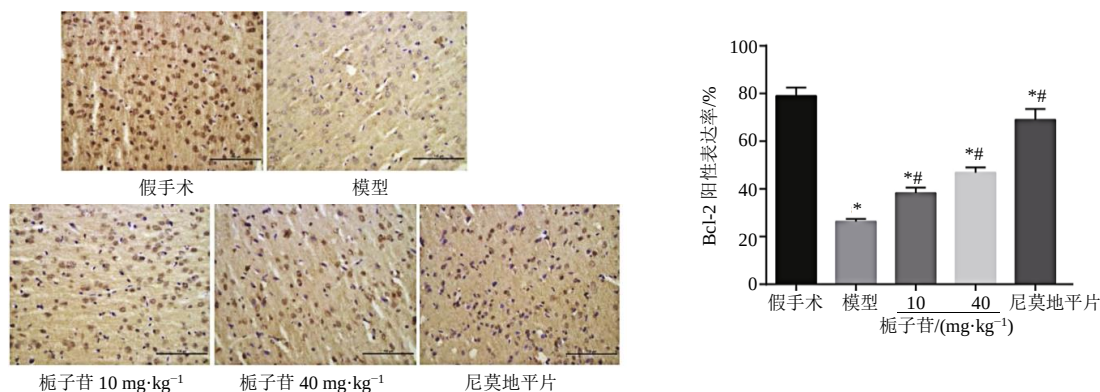


图2 尼氏染色检测大鼠神经元变化(×200)

Fig. 2 Changes of neurons in rats detected by Nissl staining (×200)

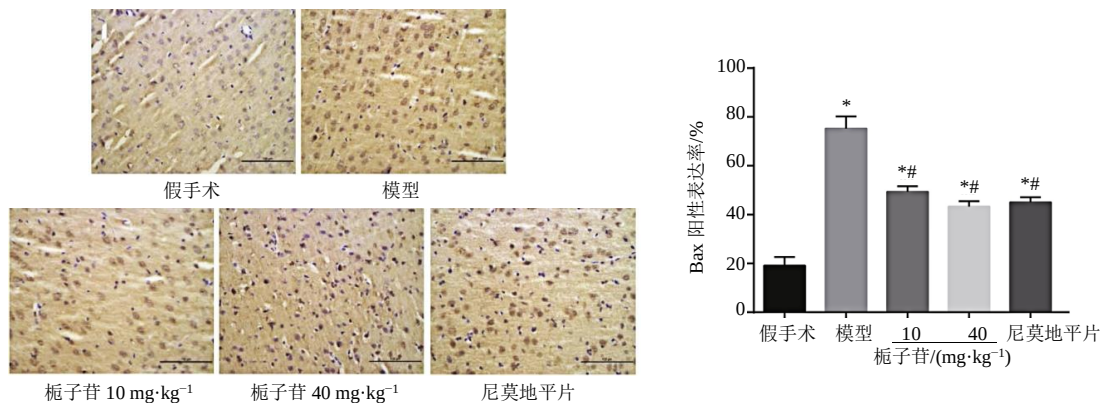


与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

图3 免疫组化染色检测大鼠脑组织 Bcl-2 表达(×200)

Fig. 3 Expression of Bcl-2 in rat brain detected by immunohistochemical staining (×200)



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

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

图4 免疫组化染色检测大鼠脑组织 Bax 表达(×200)

Fig. 4 Expression of Bax in rat brain detected by immunohistochemical staining (×200)

3.6 各组大鼠脑组织中 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9、GLP-1R 及 p-Akt 蛋白表达水平比较

Western blotting 检测结果显示,模型组大鼠脑组织中 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平较假手术组显著升高($P<0.05$),GLP-1R 和 p-Akt 蛋白表达水平较假手术组显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,栀子苷低、高剂量组和尼莫地平片组大鼠脑组织中 Cyt-C 和 Caspase-3 蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),GLP-1R 和 p-Akt 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),栀子苷高剂量组和尼莫地平片组大鼠脑组织中 Caspase-9 蛋白表达水平较模型组显著下降($P<0.05$),结果见图 5 和表 3。

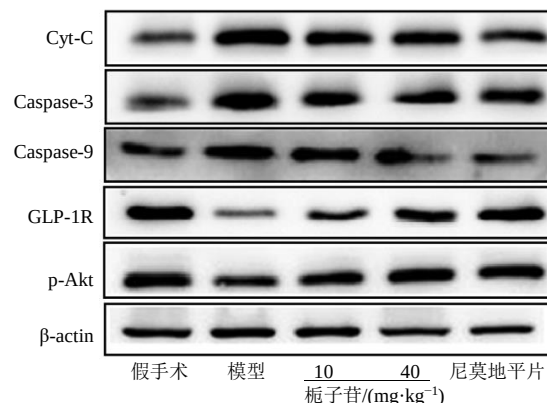


图5 Western blotting 检测大鼠脑组织中 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9、GLP-1R 及 p-Akt 蛋白表达

Fig. 5 Expression of Cyt-C, Caspase-3, Caspase-9, GLP-1R and p-Akt proteins in rat brain tissue detected by Western blotting

表3 各组大鼠脑组织中 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9、GLP-1R 及 p-Akt 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Comparison of expression levels of Cyt-C, Caspase-3, Caspase-9, GLP-1R and p-Akt proteins in brain tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		Cyt-C	Caspase-3	Caspase-9	GLP-1R	p-Akt
假手术	—	0.82±0.13	0.71±0.08	0.90±0.08	1.52±0.14	1.75±0.18
模型	—	2.30±0.19*	1.85±0.22*	1.57±0.12*	0.44±0.05*	0.88±0.09*
栀子苷	10	1.59±0.11 [#]	1.39±0.13 [#]	1.49±0.09	0.80±0.07 [#]	1.32±0.11 [#]
	40	1.51±0.13 [#]	1.22±0.09 [#]	0.98±0.11 [#]	1.28±0.11 [#]	1.54±0.15 [#]
尼莫地平片	8.1	1.26±0.10 [#]	1.32±0.14 [#]	0.88±0.07 [#]	1.51±0.14 [#]	1.51±0.17 [#]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; [#] $P<0.05$ vs model group

4 讨论

随着我国人口老龄化的加剧,缺血性脑血管疾病患者的数量也在逐年增加,采取有效措施抑制血管再通过程中 CIRC 一直是国内外临床及科学研究的重点内容,这对于改善患者的生存质量与减轻经济负担意义重大^[13]。在 CIRC 治疗中,神经元凋亡以及细胞坏死时分泌的炎性物质是加重脑组织损伤改善 CIRC 造成的神经功能缺损。此外,炎症反应是 CIRC 的主要机制之一,包括转录因子的激活和下游炎性因子的释放。在众多调控炎症反应的信号作用下,能够介导 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎性因子的合成和释放,从而加剧 CIRC 损伤反应^[15]。本研究结果表明,高剂量栀子苷治疗 CIRC 大鼠后,血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平较模型组明显降低,由此说明栀子苷能够抑制 CIRC 中炎症反应,从而达到改善 CIRC 大鼠脑组织损伤的作用。

研究表明,栀子苷可提高细胞抗凋亡活性并抑制血脑屏障的泄漏,从而保护神经元免受缺血后神

的主要原因^[14],因此,抑制神经元的凋亡与减轻炎症反应是防治 CIRC 的关键环节。

CIRC 的预后与神经功能缺损密切相关,本研究结果显示,CIRC 大鼠经过高剂量栀子苷治疗后神经功能缺损评分显著降低,皮层细胞的数量及神经元形态病理改变较模型组明显减轻,尼氏小体数目增加,这提示栀子苷可以减轻 CIRC 后的脑损伤程度,经血管的损害^[16],此外,栀子苷还能够降低炎症级联反应、促进脑部血流恢复,从而保护脑血管神经单元,减少大脑半暗带神经组织的损伤,并对神经功能修复产生积极作用^[11]。为了进一步探讨 CIRC 后栀子苷对机体内神经元凋亡水平的调控作用,本研究检测了脑组织内凋亡相关蛋白的表达水平,结果显示,模型组大鼠脑组织中 Bcl-2 表达明显降低,而 Bax、Cyt-C、Caspase-3 以及 Caspase-9 表达水平均明显升高;而给予栀子苷治疗的 CIRC 大鼠脑组织中 Bax、Cyt-C、Caspase-3 与 Caspase-9 表达水平明显降低,同时,Bcl-2 表达水平明显升高。其中,

Bcl-2 可通过影响线粒体膜的通透性来调控细胞凋亡,具有抑制凋亡的功能,而 Bax 可以与 Bcl-2 结合形成异二聚体,从而促进细胞凋亡^[17]。在线粒体凋亡途径中,释放到胞浆中的 Cyt-C 能够与凋亡诱导因子相互作用激活 Caspase,其中 Caspase-3 和 Caspase-9 是多种细胞凋亡途径中关键的因子^[18]。由此推测栀子苷可能通过调控凋亡相关蛋白的表达,从而抑制 CIRI 大鼠脑组织神经元凋亡水平从而减轻缺血再灌注损伤。

CIRI 的发病机制复杂,栀子苷在 CIRI 中的作用机制目前尚未明确。GLP-1R 是 G 蛋白偶联受体 B 簇亚类中的一员,激活后表现出良好的神经保护作用^[19],并且能够触发参与促进细胞存活的途径,例如 Akt、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 和糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β) 的磷酸化,这些途径是增强线粒体功能、逆转神经元损伤和细胞凋亡的关键下游效应子^[20]。Wang 等^[21]研究显示在脂多糖诱导的腹腔巨噬细胞与大脑皮层中, GLP-1 能够发挥抑制炎症细胞因子分泌的作用, Laviola 等^[22]的报道指出 GLP-1R 通过调控降低氧化应激反应来抑制心肌细胞的凋亡。本研究结果显示,经过栀子苷作用后 CIRI 大鼠脑组织中 GLP-1R 与 p-Akt 蛋白表达水平明显升高,由此推测,栀子苷可能是通过激活 GLP-1R/Akt 信号通路对 CIRI 大鼠起到一定的改善作用。

本研究结果表明,栀子苷可通过激活 GLP-1R/Akt 信号通路抑制大鼠 CIRI 区神经元凋亡,并减轻脑组织的损伤程度,因此,激活 GLP-1R/Akt 信号通路可能是栀子苷治疗 CIRI 的机制之一。栀子苷对 GLP-1R/Akt 通路及其下游信号的调控机制仍需要后续深入探讨,进一步阐明栀子苷在 CIRI 中发挥保护作用的具体机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Abdel-Latif R G, Rifaai R A, Amin E F. Empagliflozin alleviates neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. Arch Pharm Res, 2020, 43(5): 514-525.
- [2] Thong-Asa W, Bullangpoti V. Neuroprotective effects of *Tiliacora triandra* leaf extract in a mice model of cerebral ischemia reperfusion [J]. Avicenna J Phytomed, 2020, 10 (2): 202-212.
- [3] 李郑琛, 贾英萍, 王媛, 等. 右美托咪定后处理对大鼠脑缺血再灌注损伤组织的保护作用 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2019, 54(3): 439-442.
- [4] Li Z C, Jia Y P, Wang Y, et al. Protective effects of dexmedetomidine postconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury tissue in rats [J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2019, 54(3): 439-442.
- [5] Wu L, Xiong X, Wu X, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 28.
- [6] Wang J, Li D, Hou J, et al. Protective effects of geniposide and ginsenoside Rg1 combination treatment on rats following cerebral ischemia are mediated via microglial microRNA1555p inhibition [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 3186-3193.
- [7] Yu M D, Zhao Y, Zhang X X. Gardenoside combined with ozone inhibits the expression of P2X3 and P2X7 purine receptors in rats with sciatic nerve injury [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 7980-7986.
- [8] Lv C, Wang L, Liu X L, et al. Multi-faced neuroprotective effects of geniposide depending on the RAGE-mediated signaling in an Alzheimer mouse model [J]. Neuropharmacology, 2015, 89: 175-184.
- [9] Chen Y M, Zhang Y F, Li L, et al. Neuroprotective effects of geniposide in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 768: 21-27.
- [10] 陈飞, 王颖, 李六生. 栀子苷对小鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 解放军药理学学报, 2017, 33(6): 550-553.
- [11] Chen F, Wang Y, Li L S. Protective effects of geniposide on renal ischemic reperfusion injury in mice [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army, 2017, 33(6): 550-553.
- [12] 蔡智慧, 任丽平. 栀子苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31(12): 1619-1622.
- [13] Cai Z H, Ren L P. Protective effect of geniposide on myocardial ischemic reperfusion injury in rats [J]. Chin J Public Heal, 2015, 31(12): 1619-1622.
- [14] 刘钊, 钟菊迎, 高尔宁, 等. 栀子苷、川芎嗪和葛根素配伍对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2020, 42(7): 1754-1759.
- [15] Liu Z, Zhong J Y, Gao E N, et al. Synergistic protective effects of gardenoside, ligustrazine and puerarin on ischemia-reperfusion-induced cerebral injury [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(7): 1754-1759.
- [16] 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.
- [17] 刘长江, 李可, 张大权, 等. 40 例缺血性脑血管病患者介入治疗后效果观察 [J]. 河北医科大学学报, 2017, 38 (11): 1327-1330.

- Liu C J, Li K, Zhang D Q, et al. Observation on the effect of interventional therapy in 40 patients with ischemic cerebrovascular disease [J]. J Hebei Med Univ, 2017, 38 (11): 1327-1330.
- [14] 麻恒翔, 王载忠. 神经介入疗法治疗脑血管疾病的临床效果 [J]. 实用临床医学, 2019, 20(9): 43-44.
- Ma H X, Wang Z Z. Clinical effect of neurointerventional therapy on cerebrovascular disease [J]. Pract Clin Med, 2019, 20(9): 43-44.
- [15] Long Y, Yang Q Y, Xiang Y, et al. Nose to brain drug delivery - A promising strategy for active components from herbal medicine for treating cerebral ischemia reperfusion [J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 104795.
- [16] 蔡智慧, 王晋, 吴琼, 等. 盐酸米诺环素联合栀子苷对NO诱导PC12细胞凋亡的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2017, 52(4): 424-427.
- Cai Z H, Wang J, Wu Q, et al. Effects of minocycline combined with geniposide on apoptosis of PC12 cells induced by nitric oxide [J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2017, 52(4): 424-427.
- [17] Tan Y Q, Wang Y X, Li L, et al. Chemokine-like factor 1-derived C-terminal peptides induce the proliferation of dermal microvascular endothelial cells in psoriasis [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125073.
- [18] Chen B, Wang G X, Li W W, et al. Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke [J]. Exp Cell Res, 2017, 351(2): 163-172.
- [19] Jiang Y Q, Chang G L, Wang Y, et al. Geniposide prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells: Improvement of mitochondrial dysfunction and activation of GLP-1R and the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 407-421.
- [20] Bassil F, Fernagut P O, Bezard E, et al. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: Targets for disease modification? [J]. Prog Neurobiol, 2014, 118: 1-18.
- [21] Wang X C, Gusdon A M, Liu H, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on non-alcoholic fatty liver disease and inflammation [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(40): 14821-14830.
- [22] Laviola L, Leonardini A, Melchiorre M, et al. Glucagon-like peptide-1 counteracts oxidative stress-dependent apoptosis of human cardiac progenitor cells by inhibiting the activation of the c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway [J]. Endocrinology, 2012, 153(12): 5770-5781.

[责任编辑 刘东博]