

人参皂苷Rb₁调控MAPK通路改善小鼠脑缺血再灌注诱导血脑屏障损伤的作用研究

黄 鹏, 吴 斌, 高增祥, 余学成, 涂济源, 艾中柱, 曹国胜*

湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430065

摘 要: 目的 探讨人参皂苷Rb₁对小鼠脑缺血再灌注诱导的血脑屏障(BBB)损伤的作用及机制。方法 将C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组和人参皂苷Rb₁低、中、高剂量(5、10、20 mg·kg⁻¹)组,采用线栓法栓塞颈内动脉1 h后复灌建立脑缺血再灌注损伤模型,假手术组不栓塞,其余操作同模型小鼠。缺血1 h后ip相应药物,于再灌注24 h后处死取材。采用伊文思蓝染色法检测各组小鼠BBB损伤程度;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测各组小鼠脑组织中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)以及紧密连接蛋白1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)的mRNA表达水平;同时采用Western blotting检测各组小鼠脑组织中ZO-1、Occludin蛋白,金属基质蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)以及MAPK通路相关蛋白磷酸化的表达水平。结果 与模型组相比,人参皂苷Rb₁可显著减少脑缺血再灌注小鼠脑组织中伊文思蓝的渗漏量($P < 0.05$),显著降低脑组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的mRNA转录水平($P < 0.05$ 、0.01);显著上调ZO-1和Occludin的mRNA转录和蛋白表达水平($P < 0.05$ 、0.01);显著降低MMP-2、MMP-9的蛋白表达水平($P < 0.05$ 、0.01);显著抑制MAPK通路p38、JNK及ERK磷酸化蛋白的表达($P < 0.05$ 、0.01)。结论 人参皂苷Rb₁对小鼠脑缺血再灌注诱导的BBB损伤具有一定的改善作用,其作用机制可能与抑制MAPK信号通路激活,减少MMP-2、MMP-9蛋白的表达,进而减轻对ZO-1、Occludin等紧密连接蛋白的降解有关。

关键词: 人参皂苷Rb₁; 脑缺血再灌注; 血脑屏障; 紧密连接蛋白; MAPK通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)03-0513-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.008

Ginsenoside Rb₁ improve cerebral ischemia-reperfusion induced blood-brain barrier injury in mice by regulating MAPK pathway

HUANG Peng, WU Bin, GAO Zengxiang, YU Xuecheng, TU Jiyuan, AI Zhongzhu, CAO Guosheng

College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To explore the effects and underlying mechanisms of ginsenoside Rb₁ (Rb₁) on the blood-brain barrier (BBB) injury induced by cerebral ischemia reperfusion in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into sham operated group, model group, low, medium, high dose group of Rb₁ (5, 10, and 20 mg·kg⁻¹). This research used the middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO/R) animal model. After 1 h of ischemia and 24 h reperfusion, brain tissues of mice were extracted from executed mice. The evaluation of BBB damage in each group of mice was measured using Evans blue staining. The mRNA expression levels of the inflammatory factors—interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), as well as the expression of Zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin were examined in the brain tissues of mice by the qRT-PCR. Western blotting method was used to detect the expression levels of ZO-1, Occludin, Matrix metalloproteinase-2/9 (MMP-2/9), and MAPK related proteins in the brain tissue of each group of mice. **Results** Compared with the model group, Rb₁ significantly reduced the leakage of Evans blue in brain tissue of mice with cerebral ischemia-reperfusion ($P < 0.05$), and significantly reduced the mRNA transcription level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in brain tissue ($P < 0.05$, 0.01), significantly upregulated the mRNA transcription and protein expression levels of ZO-1 and Occludin ($P < 0.05$, 0.01), significantly reduced the protein expression levels of MMP-2 and MMP-9 ($P < 0.05$, 0.01), significantly inhibited the expression of phosphorylated proteins p38, JNK, and ERK in the

收稿日期: 2023-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81904028)

第一作者: 黄 鹏(2001—), 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: 2331800664@stmail.hbctm.edu.cn

*通信作者: 曹国胜(1989—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: caoguosheng2006@163.com

MAPK pathway ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Rb₁ can ameliorate BBB damage via inhibiting the activation of MAPK signal pathway, down-regulate the expression of MMP-2 and MMP-9, attenuate the degradation of ZO-1 and Occludin in MCAO/R-induced mice.

Key words: ginsenoside Rb₁; cerebral ischemia-reperfusion; blood-brain barrier; tight junction proteins; MAPK pathway

脑卒中是一种很常见的疾病,是位居我国居民第1位的死亡病因,也是全球死亡以及发生残疾的首要病因,主要包括出血性和缺血性2大类,其中缺血性脑卒中大约占85%^[1-2]。缺血性脑卒中是一种常见的病变率高和发病率高的脑血管疾病,由于血管阻塞致血液不能流入大脑而引起脑组织损伤,而脑组织对于缺血缺氧非常敏感,当脑缺血发生后,会引起氧化应激损伤、免疫炎症损伤等一系列瀑布级联反应。该病具有发病率、致残率、复发率以及死亡率高的特点^[3]。因此,该病给人类的生命安全和生活质量带来严重威胁,也给社会经济带来沉重负担^[4]。

脑缺血再灌注损伤的病理生理机制十分复杂,其中血脑屏障(BBB)损伤是脑缺血再灌注损伤重要的病理特征之一^[5]。BBB是一种独特的动态调节屏障,在结构上由星形胶质细胞、神经元、小胶质细胞以及脑微血管内皮细胞等细胞相互作用构成,对于维持中枢神经系统的平衡具有至关重要的作用^[6]。紧密连接蛋白1(ZO-1)与闭合蛋白(Occludin)等紧密连接相关蛋白是限制性最强的密封元件之一,可以限制血液中有毒物质和底物的波动对大脑产生影响^[7-9]。因此,这两者的表达水平与BBB的通透性是否改变密切相关^[10]。

此外,影响BBB完整性的关键因素之一是基质金属蛋白酶(MMPs)的激活,特别是在缺血性脑卒中发生后,锌积累激活MMP-2和MMP-9表达,进而降解细胞外基质并破坏脑微血管内皮细胞间的紧密连接,导致紧密连接相关蛋白复合物的丧失,从而诱导BBB破坏,加重脑损伤^[11-12]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)属于丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,MAPK通路是所有真核细胞共有的信号通路,主要包括细胞外调节蛋白激酶(ERK),c-Jun氨基末端激酶(JNK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK),分别介导3条并行的MAPK信号通路。大量研究表明MAPK通路参与脑缺血再灌注损伤的发生发展过程,并可介导MMPs的激活,调控紧密连接蛋白的表达,影响BBB损伤的进程^[12]。

人参是五加科人参属多年生草本植物,中医临

床广泛用于治疗各种心脑血管疾病^[13-15],作为人参发挥药理活性的主要成分之一,有大量研究表明人参皂苷Rb₁具有广泛的生物活性,包括抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡等作用,尤其是神经保护作用,具有很好的应用前景以及潜在药用价值,可成为一种新型治疗缺血性卒中候选药物^[16-17]。课题组前期研究证实人参皂苷Rb₁可通过抗炎途径发挥改善脑缺血再灌注诱导的脑损伤作用,但其作用机制仍有待于深入研究。本研究拟在前期研究基础上,通过制备小鼠大脑中动脉栓塞/再灌注(MCAO/R)模型,进一步探讨人参皂苷Rb₁对脑缺血再灌注损伤后BBB损伤的影响及其潜在的保护机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性C57BL/6J小鼠,体质量18~22 g,购自三峡大学动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(鄂)2022-0017。小鼠随机分笼饲养,每笼6~8只,饲养室温度为22℃,相对湿度为50%~70%,小鼠均可自由饮水和摄食,在适应性喂养3 d后进行实验。本实验方案已获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准文号SYXK(鄂)2017-0067。

1.2 药品与主要试剂

人参皂苷Rb₁(南京泽朗医药科技有限公司,批号41753-43-9,质量分数为98%);伊文思蓝(美国Sigma公司);氯化钠注射液(辰药业股份有限公司);ECL超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号PE0010);Western blotting及IP细胞裂解液(批号P0013J)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0012),碧云天生物技术有限公司;β-actin抗体(批号12620)、p38一抗(批号9212)、JNK一抗(批号9252)、p-JNK一抗(批号4668)、ERK一抗(批号4695)、p-ERK一抗(批号9101),Cell Signaling公司;ZO-1一抗(批号ab216880)、Occludin抗体(批号ab167161),Abcam公司;MMP-2抗体(美国圣克鲁斯生物技术公司,批号J0317);MMP-9抗体(密理博中国有限公司,批号3305885)。

1.3 仪器与耗材

6-0医用真丝编织线(上海浦东金环医疗用品

股份有限公司);灭菌医用缝合针(巢湖市宾雄医疗器械有限公司);外科显微剪、显微镊、眼科剪(上海金钟手术器械厂);PB303-N电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);WB印迹电泳仪系统(美国Bio-Rad公司);1730R高速冷冻离心机(美国基因有限公司);凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 小鼠MCAO/R模型的制备

MCAO/R模型制作采用线栓法^[18]:将C57BL/6小鼠麻醉后,仰卧位固定,颈部中线切口,分离并暴露右侧的颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,依次在颈总动脉近心端预留结扎线,在远心端结扎颈外动脉,并远离颈外动脉远端,沿颈内动脉向深部游离一段颈内动脉,于颈外动脉近心端预留结扎线,接着采用6-0缝合线结扎近心端颈总动脉及远端颈内动脉。于颈外动脉远心端戳一小口,插入线栓(规格为0621/0623),通过颈总动脉分叉,进入颈内动脉。插入线段直至遇到轻微阻力,深度以过颈总动脉分叉9~10 mm为宜。栓塞1 h后拔掉线栓,再灌注24 h后处死取材。假手术组不栓塞,其余操作同模型小鼠。整个手术造模过程中小鼠肛温维持在37℃左右。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒中,自由饮水、进食。

2.2 动物分组与给药

将C57BL/6J小鼠随机分成5组:假手术组、模型组和人参皂苷Rb₁低、中、高剂量(5、10、20 mg·kg⁻¹)组,人参皂苷Rb₁用0.9%氯化钠溶液溶解并稀释至相应溶度。在模型小鼠缺血1 h后,ip相应药物,假手术组与模型组给予等量0.9%氯化钠溶液,于再灌注24 h后处死取材待检。

2.3 伊文思蓝染色

造模24 h后,尾iv 2%伊文思蓝溶液(4 mL·kg⁻¹),2 h后用0.9%氯化钠溶液经心脏灌注小鼠,取各组小鼠大脑,置于-20℃冰箱中冷冻20 min,取出后将其置于冰上进行连续冠状切片(每片厚约0.2 mm,共切5片)。随后分离缺血侧大脑,称质量,每50毫克脑组织加入0.5 mL二甲基甲酰胺溶液中,水浴箱60℃恒温孵育24 h,10 000 r·min⁻¹离心30 min,取200 μL上清液加入96孔板中,于630 nm处测定吸光度(A)值。甲酰胺溶液作为空白对照,配制64.000、32.000、16.000、8.000、4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 μg·mL⁻¹伊文思蓝溶液,制作标准曲线,依据绘制的标准曲线计算出伊文思蓝的含量。

2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测相关性因子以及紧密连接蛋白mRNA的表达情况

从冰箱中取出适宜质量的脑组织,置于研钵内,加入1 mL的TRIzol,4℃进行研磨,研磨至观察不到块状组织时,吸取转移到1.5 mL的EP管中,再加入200 μL的氯仿或者二氯甲烷,剧烈震荡15 s,室温静置5 min。在高速离心机中进行离心,吸取上清液于1.5 mL的EP管中,加入异丙醇,充分混匀后,常温静置5 min,12 000 r·min⁻¹离心10 min。弃去上清液,加入适量的75%乙醇,轻轻混匀。7 500 r·min⁻¹离心10 min,弃掉上清液,晾干RNA,加入30 μL无酶水混匀,在超微量核酸蛋白测定仪上测定所提取样本总RNA的浓度和纯度。按照Q RT SuperMix for qPCR试剂盒说明将其逆转录为cDNA。将cDNA按照SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明进行循环扩增,采用2^{-ΔΔC_t}法计算各组mRNA的相对表达量,引物序列及长度见表1。

2.5 Western blotting法检测各组小鼠脑组织中相关蛋白的表达水平

在小鼠脑缺血再灌注24 h后,将小鼠处死,取出大脑,置于-20℃冰箱进行冷冻,0.5 h之后取出。分离缺血部分的大脑,称质量,放入研钵中,根据质量加入适量的RIPA裂解液和蛋白抑制剂(PMSF),在冰上进行手工研磨,研磨至肉眼看不到块状时停止。吸取匀浆组织至离心管中,放入低温保存箱中,冷冻30 min。然后将离心管超声2次。设置离心机参数为12 000 r·min⁻¹、10 min、4℃,离心2次,取上清液。留5 μL用于试剂盒做蛋白定量,另一部分加入适量体积Loading buffer,进行恒温金属浴,100℃条件下加热5 min,结束后即可塑封,放入冰箱-20℃保存备用。常规进行上样、电泳、转膜,5%的牛奶封闭1 h,用TBST缓冲液清洗3次,每次5 min,进行一抗4℃冰箱孵育过夜,隔日回收一抗后,用TBST缓冲液清洗3次,进行孵育二抗,在室温摇床上摇晃2 h,清洗3次,加入显影液进行凝胶成像,并拍照。

2.6 统计学分析

应用统计分析软件Graphpad 8.0对数据进行处理,不同组间比较采用单因素方差分析,各组间差异的两两比较采用*t*检验。

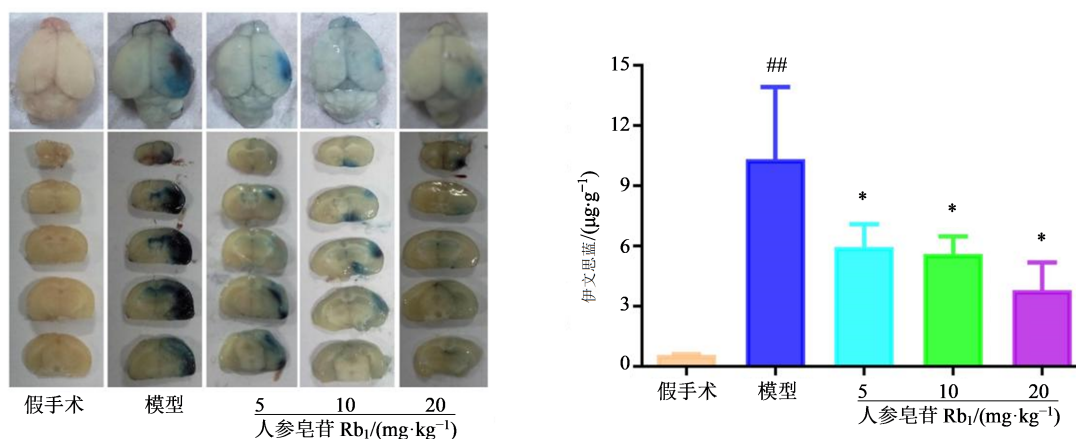
3 结果

3.1 各组小鼠脑组织中伊文思蓝渗漏

结果如图1所示,假手术组小鼠脑组织冠状切片中几乎不含有伊文思蓝,而模型组小鼠脑组织冠状切片中显示含有大量伊文思蓝,与假手术组比较

表1 引物序列
Table 1 primer sequences

基因名称	引物	片段长度/bp
β -actin	F: 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3' R: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3'	224
<i>IL-1β</i>	F: 5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3' R: 5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'	146
<i>IL-6</i>	F: 5'-AGACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA-3' R: 5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCCAGC-3'	105
<i>TNF-α</i>	F: 5'-TATGGCTCAGGGTCCAACTC-3' R: 5'-GCTCCAGTGAATTCGGAAG-3'	140
<i>ZO-1</i>	F: 5'-CACAAGGAGCCATTCTGAAG-3' R: 5'-ATCACTAGGGGGCTCAGCAG-3'	21
<i>Occludin</i>	F: 5'-AGGACGGACCCTGACCACTA-3' R: 5'-CCTGCAGACCTGCATCAAAA-3'	20



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

$^{##}P < 0.01$ vs sham-operated group; $^{*}P < 0.05$ vs model group.

图1 各组小鼠脑组织中伊文思蓝的渗漏量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Leakage of Evans blue in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

差异显著 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组伊文思蓝含量明显减少 ($P < 0.05$)。结果表明, 与模型组相比, 人参皂苷 Rb_1 3 个剂量组均可减少脑缺血再灌注小鼠脑组织中伊文思蓝的渗漏量, 初步证实人参皂苷 Rb_1 对缺血性脑卒中诱导的 BBB 损伤具有一定的改善作用。

3.2 各组小鼠脑组织中的炎症因子 mRNA 表达

结果如图2所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠脑组织中 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *TNF- α* 的 mRNA 转录水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组相比, 人参皂苷 Rb_1 中、高剂量组 *IL-1 β* 、*TNF- α* 的 mRNA 转录水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 各剂量组 *IL-6* mRNA 转录水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明人参皂苷 Rb_1 可以明显抑制脑缺血再灌注小鼠脑组织中相关炎

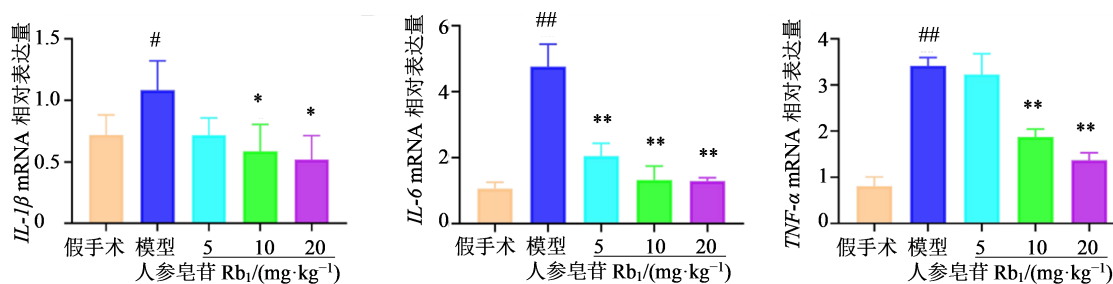
症因子的表达, 减轻炎症反应的发生。

3.3 各组小鼠脑组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* mRNA 表达水平

结果如图3所示, 与假手术组相比, 模型组小鼠脑组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* 的 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组小鼠脑组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* 的转录水平均有不同程度升高, 其中中、高剂量组具有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果表明人参皂苷 Rb_1 可通过上调脑缺血再灌注小鼠脑组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* 的 mRNA 表达水平, 维持屏障损伤的完整性。

3.4 各组小鼠脑组织中 *ZO-1* 和 *Occludin* 的蛋白表达水平

结果如图4所示, 与假手术组相比, 模型组小鼠

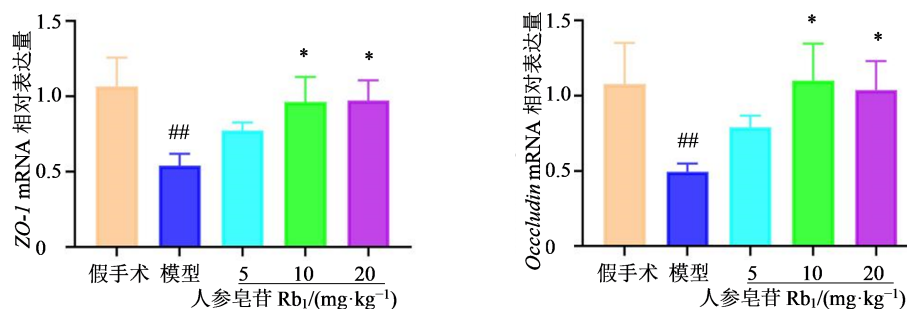


与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham-operated group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图2 各组小鼠脑组织中炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的mRNA水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Expression levels of inflammatory cytokine IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA in brain tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)



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

^{##} $P < 0.01$ vs sham-operated group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

图3 各组小鼠脑组织中ZO-1与Occludin的mRNA水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

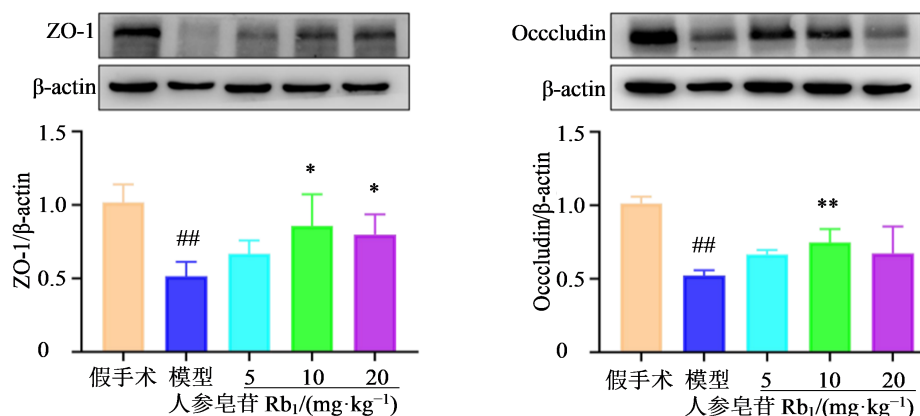
Fig. 3 Expression levels of ZO-1 and Occludin mRNA in brain tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

脑组织中ZO-1和Occludin的蛋白表达水平显著性下降($P < 0.01$);与模型组相比,各给药组小鼠脑组织中ZO-1和Occludin的蛋白表达水平均有不同程度升高,其中中、高剂量组ZO-1和中剂量组Occludin具有显著性差异($P < 0.05, 0.01$)。结果表明人参皂苷Rb₁可通过上调MCAO/R小鼠脑组织中紧密连接蛋白ZO-1和Occludin的蛋白表达水平,发

挥保护屏障损伤的作用。

3.5 各组小鼠脑组织中MMP-2和MMP-9蛋白表达

结果如图5所示,与假手术组比较,模型组小鼠脑组织中MMP-2和MMP-9的蛋白表达水平显著性上升($P < 0.01$);与模型组比较,人参皂苷Rb₁各给药组小鼠脑组织中MMP-2和MMP-9的蛋白表达水平均显著性下降($P < 0.05, 0.01$)。结果表明人参皂



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-operated group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图4 各组小鼠脑组织中ZO-1与Occludin蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Expression levels of ZO-1 and Occludin proteins in brain tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

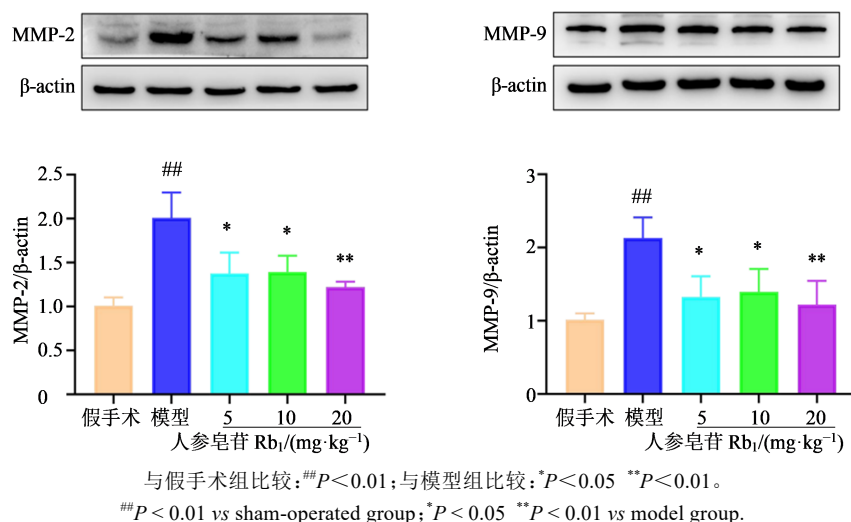


图 5 各组小鼠脑组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Expression levels of MMP-2 and MMP-9 proteins in brain tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

昔 Rb₁ 可以抑制脑缺血再灌注损伤诱导的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的激活,进而减缓对紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 的降解,发挥对 BBB 完整性的保护作用。

3.6 各组小鼠脑组织 MAPK 通路相关蛋白表达

大量研究表明 MAPK 通路参与脑缺血再灌注损伤的发生发展过程,并可介导 MMPs 的激活,调控紧密连接蛋白的表达,从而影响 BBB 损伤的进

程^[12]。结果如图 6 所示,与假手术组相比,模型组 MAPK 信号通路相关蛋白 p-38/p38、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK 水平均显著升高 ($P < 0.01$),表明 MAPK 通路被激活;与模型组相比,人参皂昔 Rb₁ 低、中、高剂量组 p-38/p38、p-ERK/ERK 显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01);中、高剂量组 p-JNK/JNK 显著下降 ($P < 0.05$)。结果表明,人参皂昔 Rb₁ 可以通过抑制脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织 MAPK 通路的激活,介导 MMP-2

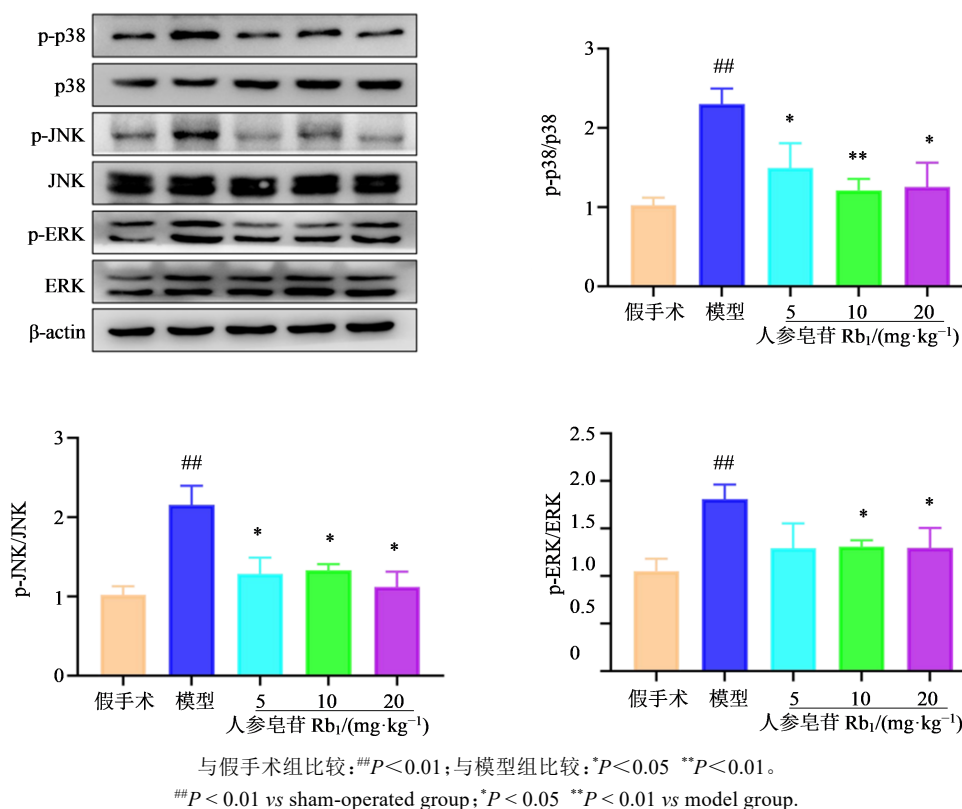


图 6 各组小鼠脑组织中 MAPK 通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Expression of MAPK pathway-related proteins in brain tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

和MMP-9激活,调节下游相关紧密连接蛋白的表达,从而发挥保护BBB损伤的作用。

4 讨论

在临床上,缺血性脑卒中是一种常见的脑血管疾病,也被称为脑梗死。目前,组织型纤溶酶原激活物(t-PA)是迄今为止唯一用于缺血性脑卒中溶栓治疗有效的药物,但由于其时间窗窄以及出现并发症风险等问题,容易造成再灌注损伤,因此,寻找与开发安全有效的缺血再灌注损伤防治药物尤为迫切。数千年来,中医中药在应用于治疗缺血性脑卒中方面已有悠久历史,并积累了丰富临床经验,具有独特优势。因此,本研究选取中药活性成分人参皂苷Rb₁作为研究对象,针对缺血性脑卒中诱导BBB损伤这一的关键病理环节为切入点,利用现代医学研究手段和技术方法,深入探讨人参皂苷Rb₁发挥改善脑缺血再灌注损伤保护作用的潜在分子机制。

人参是我国珍贵的药用植物,中国历代医药典籍均有记载,早在《神农本草经》中就将其列为上品。人参皂苷Rb₁作为人参的主要活性成分之一,已有研究表证实,其具有较好的脑保护作用^[19]。另外还有研究表明,人参皂苷Rb₁可以通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路的表达,加速卒中后运动能力的恢复,上调生长关联蛋白43(GAP43)(轴突再生指标)蛋白与mRNA表达水平,促进卒中后轴突再生,改善脑卒中后的脑组织损伤^[20]。本研究在前期研究基础上,进一步对人参皂苷Rb₁发挥改善脑缺血再灌注损伤保护作用的潜在分子机制进行深入探讨。研究结果显示,人参皂苷Rb₁可明显增加脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织中的ZO-1和Occludin蛋白的表达,抑制脑缺血再灌注发生后MMP-2和MMP-9蛋白表达的升高,进一步研究发现,人参皂苷Rb₁还可减少p38、ERK和JNK蛋白磷酸化的高表达,从而抑制MAPK信号通路的激活。上述研究结果提示人参皂苷Rb₁可能是通过调控MAPK信号通路的激活,抑制MMPs蛋白的表达,增加ZO-1和Occludin蛋白的生成,从而减轻缺血性脑卒中诱导的BBB损伤,起到对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

BBB是存在于中枢神经系统中的一道关键屏障,可防止神经毒性物质、免疫相关因子随血液循环进入神经中枢系统^[21-22],从而形成并维持着大脑功能和平衡所需的高度稳定的微环境^[23]。伊文思蓝渗漏量的多少可以作为BBB的通透性及其结

构完整性的体现,本研究的结果显示给予不同剂量的人参皂苷Rb₁进行治疗后,给药组的伊文思蓝渗透量均显著下降,这表明人参皂苷Rb₁可有效改善脑缺血再灌注诱导BBB通透性的破坏。另有大量研究表明,炎症反应与BBB损伤存在着密切相关的联系,可以通过抑制炎症因子的表达来减轻创伤性脑损伤诱导的BBB损伤,发挥保护作用^[24-25],本实验研究结果也显示,给予不同剂量的人参皂苷Rb₁进行治疗后,各给药组的炎症因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)的mRNA转录水平均明显下降,提示人参皂苷Rb₁可有效改善减少脑缺血再灌注小鼠脑组织中相关炎症因子的释放,从而减轻炎症反应的进程,这与前期研究结果保持一致。

缺血性脑卒中的发病机制极其复杂,诱导BBB功能障碍的潜在机制也有很多^[26-27],因此,人参皂苷Rb₁是否可以通过其他相关信号发挥保护BBB损伤的作用尚不清楚,仍有待进一步研究,本课题组将在后续开展的实验中进行研究。本研究基于MAPK通路探讨了人参皂苷Rb₁对脑缺血再灌注诱导BBB损伤的保护作用及其可能机制,实验结果为应用中医药防治复杂性疾病提供理论参考,并为临床防治缺血性脑卒中的药物开发提供思路借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Campbell B C V, De Silva D A, MacLeod M R, et al. Ischaemic stroke [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 70.
- [2] Hostettler I C, Seiffge D J, Werring D J. Intracerebral hemorrhage: An update on diagnosis and treatment [J]. Expert Rev Neurother, 2019, 19(7): 679-694.
- [3] Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin E J, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics: 2016 update: A report from the American heart association [J]. Circulation, 2016, 133(4): 447-454.
- [4] Shah A S V, Lee K K, Pérez J A R, et al. Clinical burden, risk factor impact and outcomes following myocardial infarction and stroke: A 25-year individual patient level linkage study [J]. Lancet Reg Health Eur, 2021, 7: 100141.
- [5] Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson P T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: Targeting tight junctions and transporters for vascular protection [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(3): C343-C356.
- [6] Candelario-Jalil E, Dijkhuizen R M, Magnus T. Neuroinflammation, stroke, blood-brain barrier dysfunction, and imaging modalities [J]. Stroke, 2022, 53(5): 1473-1486.
- [7] Abbott N J, Patabendige A A K, Dolman D E M, et al.

- Structure and function of the blood-brain barrier [J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(1): 13-25.
- [8] Beutel O, Maraschini R, Pombo-García K, et al. Phase separation of zonula occludens proteins drives formation of tight junctions [J]. Cell, 2019, 179(4): 923-936.e11.
- [9] Zhang S, An Q E, Wang T F, et al. Autophagy- and MMP-2/9-mediated reduction and redistribution of ZO-1 contribute to hyperglycemia-increased blood-brain barrier permeability during early reperfusion in stroke [J]. Neuroscience, 2018, 377: 126-137.
- [10] Wang F J, Li R Y, Tu P F, et al. Total glycosides of *Cistanche deserticola* promote neurological function recovery by inducing neurovascular regeneration via nrf-2/keap-1 pathway in MCAO/R rats [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 236.
- [11] Liu B W, Li Y Y, Han Y, et al. Notoginsenoside R1 intervenes degradation and redistribution of tight junctions to ameliorate blood-brain barrier permeability by Caveolin-1/MMP2/9 pathway after acute ischemic stroke [J]. Phytomedicine, 2021, 90: 153660.
- [12] Nian K Q, Harding I C, Herman I M, et al. Blood-brain barrier damage in ischemic stroke and its regulation by endothelial mechanotransduction [J]. Front Physiol, 2020, 11: 605398.
- [13] Ni X C, Wang H F, Cai Y Y, et al. Ginsenoside Rb₁ inhibits astrocyte activation and promotes transfer of astrocytic mitochondria to neurons against ischemic stroke [J]. Redox Biol, 2022, 54: 102363.
- [14] 曹瑞莹, 李劲恒, 袁硕, 等. 人参抗心律失常作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3157-3166.
Cao Y Y, Li S H, Yuan S, et al. Research progress on mechanism of antiarrhythmic action of *Panax ginseng* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(10): 3157-3166.
- [15] 王超, 孙浩栋, 魏凤凤, 等. 人参皂苷 Rb₁ 改善心力衰竭的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(3): 731-737.
Wang C, Sun H D, Wei F F, et al. Research progress on ginsenoside Rb₁ in improving heart failure [J]. Drugs Clin, 2023, 38(3): 731-737.
- [16] Shi Y H, Li Y, Wang Y, et al. Ginsenoside-Rb₁ for ischemic stroke: A systematic review and Meta-analysis of preclinical evidence and possible mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 285.
- [17] Zhao A M, Liu N, Yao M J, et al. A review of neuroprotective effects and mechanisms of ginsenosides from *Panax ginseng* in treating ischemic stroke [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 946752.
- [18] 李汶泽, 李智, 倪秀一, 等. 注射用丹参多酚酸对 MCAO/R 大鼠 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(8): 1638-1644.
Li W Z, Li Z, Ni X Y, et al. Effect of Salvianolic Acid for Injection on Nrf2/Keap1/HO-1 signaling pathway in MCAO/R rats [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(8): 1638-1644.
- [19] Su L J, Ren Y C, Chen Z, et al. Ginsenoside Rb₁ improves brain, lung, and intestinal barrier damage in middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) mice via the PPAR γ signaling pathway [J]. Chin J Nat Med, 2022, 20(8): 561-571.
- [20] Gao X, Zhang X J, Cui L L, et al. Ginsenoside Rb₁ promotes motor functional recovery and axonal regeneration in post-stroke mice through cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. Brain Res Bull, 2020, 154: 51-60.
- [21] Pu H, Hayashi K, Andras I E, et al. Limited role of COX-2 in HIV Tat-induced alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier [J]. Brain Res, 2007, 1184: 333-344.
- [22] Li J, Zeng B R, Hu X, et al. Protective effects of ginsenoside Rb₁ against blood-brain barrier damage induced by human immunodeficiency virus-1 tat protein and methamphetamine in sprague-dawley rats [J]. Am J Chin Med, 2018, 46(3): 551-566.
- [23] Zhu J C, Si M Y, Li Y Z, et al. Circulating tight junction proteins mirror blood-brain barrier integrity in leukaemia central nervous system metastasis [J]. Hematol Oncol, 2017, 35(3): 365-373.
- [24] Hauptmann J, Johann L, Marini F, et al. Interleukin-1 promotes autoimmune neuroinflammation by suppressing endothelial heme oxygenase-1 at the blood-brain barrier [J]. Acta Neuropathol, 2020, 140(4): 549-567.
- [25] Izawa Y, Gu Y H, Osada T, et al. β 1-integrin-matrix interactions modulate cerebral microvessel endothelial cell tight junction expression and permeability [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(4): 641-658.
- [26] Kim K A, Kim D, Kim J H, et al. Autophagy-mediated occludin degradation contributes to blood-brain barrier disruption during ischemia in bEnd.3 brain endothelial cells and rat ischemic stroke models [J]. Fluids Barriers CNS, 2020, 17(1): 21.
- [27] Zhu J, Li Z Q, Ji Z, et al. Glycocalyx is critical for blood-brain barrier integrity by suppressing caveolin1-dependent endothelial transcytosis following ischemic stroke [J]. Brain Pathol, 2022, 32(1): e13006.

[责任编辑 兰新新]