

芒柄花素磺酸钠调节 NETs 减轻脑缺血再灌注损伤作用机制

李思博¹, 万彦军², 陈娟³, 庄佳慧¹, 李雅楠^{4,5*}, 黄怀鹏^{1,3,4*}

1. 河北中医药大学 药学院, 河北 石家庄 050091

2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 天然药物生物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

3. 石家庄平安医院 中医内科, 河北 石家庄 050051

4. 河北中医药大学 中西医结合学院, 河北 石家庄 050091

5. 石家庄平安医院 检验科, 河北 石家庄 050051

摘要: **目的** 探究芒柄花素磺酸钠 (Sul-F) 调节中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 减轻脑缺血再灌注 (I/R) 损伤的作用机制。**方法** SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组、模型组、精氨酸阿司匹林组 (AAFI, 200 mg·kg⁻¹) 和 Sul-F 低、高剂量组 (20、40 mg·kg⁻¹)。除对照组外, 其余各组均采用大鼠中动脉栓塞 (MCAO) 法造模, 缺血 2 h、再灌注 24 h 后处死。于再灌注 0、12 h 后 ip 给药, 对照组和模型组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液。Bederson 评分法评估神经功能; TTC 染色法测定脑梗死率; Western blotting 检测脑匀浆磷脂酶 C-β3 (PLC β3) 和磷酸化 PLC β3 (p-PLC β3) 的表达; 酶联免疫法检测脑匀浆血栓素 B2 (TXB2) 及炎症因子白细胞介素-1β (IL-1β)、白细胞介素-6 (IL-6) 含量; 免疫荧光检测血小板活化相关分子 P 选择素 (P-selectin)、中性粒细胞活化相关分子中性粒细胞表面黏附分子 (CD11b) 的表达; 三色免疫荧光联合检测组蛋白 3B (H3B)、髓过氧化物酶 (MPO) 和脱氧核糖核酸 (DNA), 以标识 NETs。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠神经功能评分、脑指数、脑梗死率以及脑匀浆 IL-1β、IL-6、TXB2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), p-PLC β3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 大量 NETs 形成, P-selectin 和 CD11b 表达均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Sul-F 显著降低神经功能评分、脑指数、脑梗死率以及脑匀浆 IL-1β、IL-6、TXB2 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 显著升高 p-PLC β3 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); NETs 产生明显减少, 显著降低 P-selectin 和 CD11b 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** Sul-F 通过促进 p-PLC β3 蛋白表达, 减少血小板活化, 抑制血小板介导的 NETs 形成, 减轻炎症反应, 进而改善脑 I/R 损伤。

关键词: 缺血性脑卒中; 芒柄花素; 中性粒细胞胞外诱捕网; 缺血再灌注损伤; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)07-1798-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.010

Sodium formononetin-3'-sulphonate alleviates cerebral ischemia reperfusion injury via regulating NETs formation

LI Sibo¹, WAN Yanjun², CHEN Juan³, ZHUANG Jiahui¹, LI Yanan^{4,5}, HUANG Huaipeng^{1,3,4}

1. College of Pharmacy, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang Ping'an Hospital, Shijiazhuang 050051, China

4. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

5. Department of Clinical Laboratory, Shijiazhuang Ping'an Hospital, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: Objective To study the mechanism of sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) in regulating neutrophil extracellular traps (NETs) to alleviate cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: control

收稿日期: 2025-01-07

基金项目: 河北省科学技术厅石家庄平安医院有限公司院士合作重点单位项目

作者简介: 李思博 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生产与质量控制。E-mail: 1399378938@qq.com

*通信作者: 黄怀鹏 (1971—), 男, 医学博士, 研究员, 研究方向为中西医结合临床。E-mail: huang71526@163.com

李雅楠 (1989—), 女, 医学硕士, 副主任检验技师, 研究方向为临床检验诊断学。E-mail: niwawa941@163.com

group, model group, arginine aspirin group (AAFI, 200 mg·kg⁻¹), Sul-F low and high dose groups (20, 40 mg·kg⁻¹). Except for the control group, the other groups were modeled by middle cerebral artery occlusion, and sacrificed after ischemia for 2 h and reperfusion for 24 h. The drugs were given by ip injection at 0 h and 12 h after reperfusion, and the control group and the model group were given the same volume of 0.9% sodium chloride solution. Neurological function was assessed by the Bederson score. TTC staining was used to determine the cerebral infarction volume. Western blotting was used to detect the expression of phospholipase C-β3(PLC β3) and phosphorylated PLC β3(p-PLC β3) in brain homogenate, and to verify its signaling pathway. The contents of thromboxane B2 (TXB2), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6) in brain homogenate were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of P-selectin and neutrophil surface adhesion molecule (CD11b) on platelet activation and neutrophil activation was detected by immunofluorescence. H3BB (H3B), myeloperoxidase (MPO) and deoxyribonucleic acid (DNA) were detected by three-color immunofluorescence. **Results** Compared with the control group, the neurological function score, brain index, cerebral infarction rate, and the protein expressions of IL-1β, IL-6, and TXB2 in brain homogenate of rats in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), while the protein expression of p-PLC β3 was significantly decreased ($P < 0.01$), and a large number of NETs were formed. The expressions of P-selectin and CD11b were both increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, Sul-F significantly reduced the neurological function score, brain index, cerebral infarction rate, and the protein expressions of IL-1β, IL-6, and TXB2 in brain homogenate ($P < 0.05, 0.01$); Significantly increased the protein expression of p-PLC β3 ($P < 0.05, 0.01$); The production of NETs was significantly reduced, and the protein expressions of P-selectin and CD11b were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Sul-F improves cerebral I/R injury by promoting the expression of p-PLC β3 protein, inhibiting PLC β3 expression, reducing platelet activation, inhibiting NETs formation, and reducing inflammatory response.

Key words: ischemic stroke; formononetin; neutrophil extracellular trap; ischemia-reperfusion injury; inflammatory factor

脑卒中是严重危害人类健康的脑血管疾病之一^[1]。缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型, 占全部卒中的 87% 左右^[2], 具有高发病率、高致残率和高复发率等特点。在临床上, 尽快恢复缺血脑组织的灌注是治疗缺血性脑卒中的关键。然而, 脑组织的血管再通与复流复氧常造成更严重的脑组织损伤, 即缺血再灌注(I/R)损伤^[3-4]。I/R 是一个复杂的过程, 与兴奋性氨基酸毒性、氧化应激、离子失衡、自由基损伤、炎症、细胞凋亡等多个因素有关^[5]。

中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)在缺血性心脑血管疾病的发生发展过程中扮演着重要角色。研究表明, 在脑 I/R 急性期, 血栓素 A2 (TXA2) 与 G 蛋白耦联受体结合, 引起磷脂酶 C (PLC) β 活化, 细胞内钙离子浓度增加, 引起血小板聚集, 血小板释放的高迁移率族蛋白组 1 与晚期糖基化末端受体结合, 激活中性粒细胞释放 NETs, 从而加重脑 I/R 损伤^[6]。

补阳还五汤由清代名医王清任所创, 记载于《医林改错》, 是治疗卒中后遗症的代表方剂。方中以生黄芪为君药, 补益元气, 对卒中之气虚血瘀证有显著疗效。现代药理学证实芒柄花素是黄芪的重要组成部分之一, 经碘化后得到的芒柄花素碘酸钠(Sul-F), 具有抗炎^[7]、抗氧化^[8]、神经保护^[9]等作用。目前, Sul-F 对脑 I/R 损伤的改善作用机制尚不明确。本研究通过建立大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模

型, 考察 Sul-F 是否通过抑制血小板介导的 NETs 形成减轻炎症反应, 进而改善脑 I/R 损伤。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠(雄), 体质量(230±10) g, 清洁级, 购自斯贝福(北京)有限公司, 实验动物生产许可证号 SYXK(冀) 2021-006。大鼠饲养于动物房, 温度(25±1)℃, 相对湿度(50±10)%, 昼夜周期为 12 h, 自由摄食饮水, 实验开展前适应性饲养 1 周。本实验所有操作均严格按照动物伦理要求进行, 且经河北中医学院实验动物管理和伦理委员会批准(批准号 DWLL202306001)。

1.2 药品与主要试剂

Sul-F(质量分数>95%, 批号 160901)购自河北国金药业有限责任公司; 注射用精氨酸阿司匹林(AAFI, 批号 23111301)购自瑞阳制药股份有限公司; 异氟烷(批号 LAT2021033)购自北京莱艾特科技发展有限公司; 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC, 货号 SAB1407906-50UG)购自美国 Sigma 公司; PLC β3(货号 AF4754)和 p-PLC β3(货号 AF2383)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 白细胞介素 1β(IL-1β)(货号 ab255730)和 IL-6(货号 ab234570)ELISA 试剂盒, 抗 CD62P 抗体(货号 ab202983)、抗 CD11b 抗体(货号 ab133357)、抗髓过氧化物酶(MPO)抗体(货号 ab90812)均购自

英国 Abcam 公司; 血栓素 B2 (TXB2) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (货号 GV-E13489) 购自上海极威生物科技有限公司; Tris (货号 105897A)、甘氨酸 (货号 65953D)、3% H₂O₂ (货号 82427G)、过硫酸胺 (货号 82463A)、组蛋白 3B (H3B) 免疫荧光抗体 (货号 P4232-50 μL) 购自上海 Adamas 试剂有限公司; 显影液 (货号 R30152-100 mL) 购自上海源叶生物科技有限公司; 5×protein Loading Buffer 缓冲液 (货号 20316ES05)、DAPI 染液 (货号 40728ES03) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; β-肌动蛋白 (β-actin) 一抗 (货号 sc-47778) 购自美国 SANTA 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的免疫球蛋白 G (IgG) 二抗 (货号 ZB-2301) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 抗荧光淬灭剂 (E-IR-R119-5 mL) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器

AE160 电子天平购自瑞士 Mettler Toledo 公司; M200 酶标仪购自日本 TECA 公司; JYO2S 凝胶成像系统购自北京君意东方电泳设备有限公司; LF-2000 SDS-PAGE 电泳系统购自北京龙方科技有限公司; XS-2100 光学显微镜购自 NOVEL 公司; LEICA CM 1850 冰冻切片机购自德国徕卡仪器公司; 5418R 离心机购自德国 Eppendorf 公司; 6100 化学发光成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 MCAO 诱导大鼠脑 I/R 模型的制备

采用异氟烷吸入麻醉大鼠, 沿颈部中线暴露颈前区, 分离左侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA)。结扎 ECA, 并用动脉钳夹住 CCA。为阻断左大脑中动脉血供, 将尖圆的单丝尼龙缝线经 CCA 插入 ICA, 深度为 18~20 mm。缺血 2 h 后, 将缝线塞取出约 0.5 cm, 恢复血流灌注。

2.2 分组及给药

SD 雄性大鼠 125 只, 随机分成 5 组: 对照组、模型组、AAFI (阳性药, 200 mg·kg⁻¹) 组及 Sul-F 低、高剂量 (20、40 mg·kg⁻¹) 组, 每组 25 只。除对照组外, 其余各组均采用 MCAO 法造模, 缺血 2 h、再灌注 24 h 后处死。于再灌注 0 h、12 h 后 ip 给药, 对照组和模型组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液, 体积为 10 mL·kg⁻¹, 自由饮食水。

2.3 神经功能评分

神经功能评分是评估脑损伤后神经功能缺损

程度的重要方法。各组大鼠在脑 I/R 损伤 24 h 后, 按 Bederson^[10] 的 5 级评分法进行分级评价。0 级: 运动正常, 未见神经功能缺损表现; 1 级: 提尾悬空时, 动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲, 肘外展, 肩内旋, 紧贴胸壁; 2 级: 将动物放置于光滑平面上, 推手术侧肩向对侧移动时, 阻力降低, 两侧阻力不同; 3 级: 动物自由行走时向手术对侧旋转或者转圈; 4 级: 无法自行行走或表现为意识障碍。提前死亡及处死时发现蛛网膜下腔出血的动物均弃之不用。

2.4 脑指数的检测

脑水肿是缺血性脑卒中的常见病理特征之一, 通常是由于血脑屏障破坏和细胞内外水分失衡引起的。在神经功能评分后, 采用异氟烷吸入麻醉大鼠, 立即断头取脑, 去除小脑、脑干和嗅脑, 称脑湿质量, 计算脑指数。脑指数升高表明脑组织含水量增加, 提示损伤加重。

脑指数 = 脑质量 / 体质量

2.5 脑梗死率的测定

脑梗死率直接反映 I/R 后脑组织坏死的范围, 是评估脑损伤严重程度的重要指标。大鼠脑称质量后, 立即放于 -20 °C 冰箱冷冻 10~15 min, 时间以脑的硬度适宜为准。将冻好的大脑取出, 沿冠状面连续均匀切取 6 张脑片, 厚度约为 2 mm, 置于配制好的 2% TTC 溶液中, 并于 37 °C 水浴锅中孵育 20 min, 严格避光。缺血脑组织呈苍白色, 正常脑组织呈鲜红色。相机拍照扫描入电脑后, 用 Image J 软件测量脑梗死面积, 计算脑梗死率。

脑梗死率 = Σ 梗死面积 / Σ 全脑片面积

2.6 Western blotting 检测脑匀浆 p-PLC β3、PLC β3 蛋白表达

取缺血半暗带脑组织, -80 °C 保存备用。采用 BCA 法定量蛋白浓度, 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离蛋白质样品, 并转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。5% 脱脂牛奶封闭后, 分别加 PLC β3、p-PLC β3 抗体。4 °C 孵育过夜, 次日洗膜后, 加入二抗室温孵育 1 h, 再次洗膜后采用化学发光成像系统显影。

2.7 脑匀浆细胞因子检测

测定大鼠 I/R 后脑匀浆中 IL-1β、IL-6 和 TXB2 的水平可以评估炎症反应和血小板活化的程度。在脑 I/R 损伤 24 h 后, 用异氟烷麻醉, 立即断头取脑, 取缺血侧梗死灶边缘相同部位脑组织称质量, 按

1 : 10 的比例加入 0.9%氯化钠溶液, 在匀浆机上进行冰浴匀浆 5 次, 每次 2 min, 将匀浆液在 4 ℃、高速离心机 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取其上清, 首先采用 BCA 法测定蛋白含量, 根据 IL-1β、IL-6、TBX2 试剂盒说明书进行检测, 计算细胞因子浓度。

细胞因子浓度 = 细胞因子含量 / 蛋白含量

2.8 荧光免疫组化检测 P-selectin、CD11b、NETs

在脑 I/R 损伤 24 h 后, 用异氟烷麻醉, 先用 0.9%氯化钠溶液经心脏灌注 (开胸, 将灌注针头插入左心室, 止血钳固定, 剪开右心耳, 使血液经右心耳流出), 待大鼠组织器官泛白, 血液基本流出 (大约 50 mL 0.9%氯化钠溶液), 换用 4%多聚甲醛溶液进行固定, 方法和灌注 0.9%氯化钠溶液手法相同, 待大鼠身体僵直 (大约 50 mL 4%多聚甲醛溶液), 迅速取脑, 去除小脑、脑干和嗅脑, 放置于 4%多聚甲醛溶液 24 h 以上, 然后换置于 20%的蔗糖溶液中, 取脑缺血半暗带组织, 当脑组织沉入瓶底, 换置于 30%的蔗糖溶液中, 当脑组织沉入瓶底后, 即可冰冻切片, 进行荧光染色, 抗荧光淬灭剂封固, 荧光显微镜观察。

2.9 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用采用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 Sul-F 对神经功能评分的影响

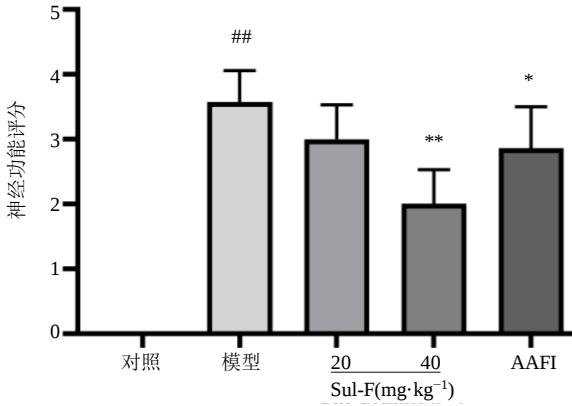
神经功能评分能够直观反映脑 I/R 损伤对动物行为学和运动功能的影响。如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠神经功能评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, AAFI 组和 Sul-F (40 mg·kg⁻¹) 组大鼠神经功能评分均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.2 Sul-F 对脑指数的影响

脑 I/R 损伤后, 血脑屏障破坏和细胞毒性水肿会导致患侧脑组织水分增加, 质量增加, 脑指数升高。如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组脑指数显著升高 ($P < 0.01$), 脑损伤加重; 与模型组相比, Sul-F (20、40 mg·kg⁻¹) 组与 AAFI 组脑指数均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 脑损伤减轻。

3.3 Sul-F 对脑梗死率的影响

TTC 染色常是检测脑梗死率的常用检测技术。TTC 与活细胞线粒体中的脱氢酶反应, 生成红色产物; 梗死区域因细胞死亡而不染色, 呈白色。如图 2 所示, 对照组脑组织 TTC 染色呈均匀红色, 模型



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 1 大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Neurological function score of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 1 大鼠脑指数 ($n=6$)

Table 1 Brain index of rats ($n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑指数/%
对照	—	57.40±2.45
模型	—	70.76±3.09##
AAFI	200	68.23±2.06*
Sul-F	20	64.95±2.18*
	40	67.95±1.28**

与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

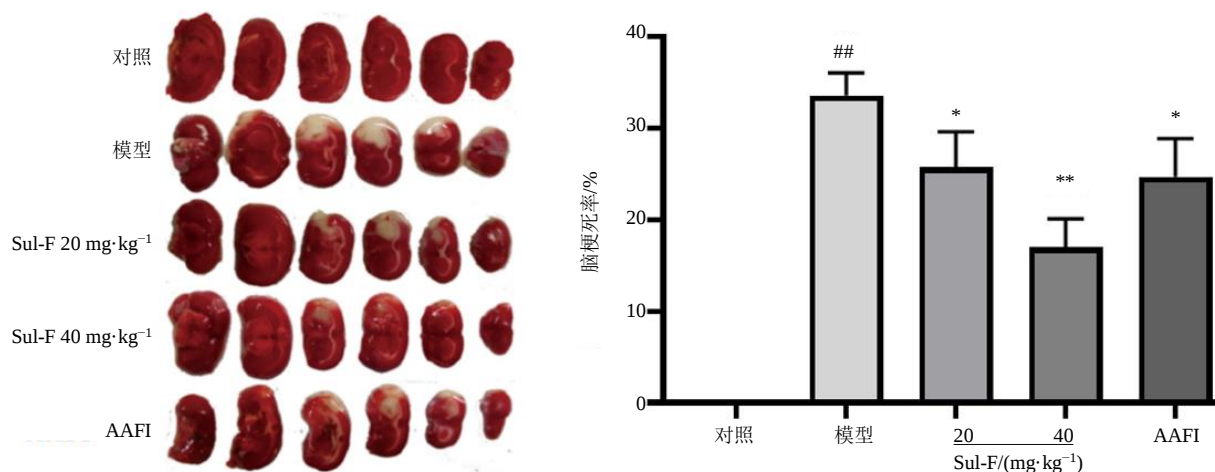
组脑组织出现大面积白色梗死区。与模型组比较, Sul-F (20、40 mg·kg⁻¹) 组与 AAFI 组脑梗死率均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.4 Sul-F 对脑匀浆中 p-PLC β3、PLC β3 蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组 p-PLC β3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Sul-F (20、40 mg·kg⁻¹) 组 p-PLC β3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), Sul-F (20、40 mg·kg⁻¹) 组 PLC β3 蛋白表达降低, 但差异无统计学意义。

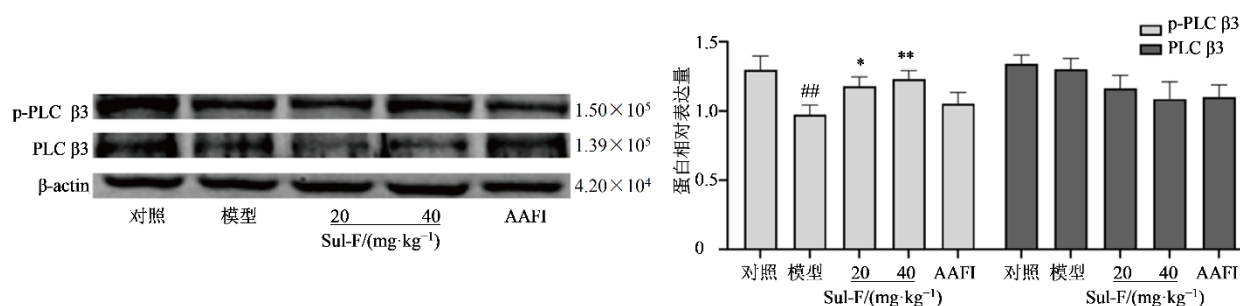
3.5 Sul-F 对脑匀浆细胞因子含量的影响

测定脑匀浆细胞因子含量可评估炎症反应和血小板活化的程度, IL-1β 和 IL-6 反映 I/R 后脑组织的炎症状态, TXB2 可以反映 I/R 后血小板活化和血栓形成的程度。如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组脑匀浆 IL-1β、IL-6、TXB2 含量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, Sul-F (20、40 mg·kg⁻¹) 组和 AAFI 组脑匀浆 IL-1β、IL-6、TXB2 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。



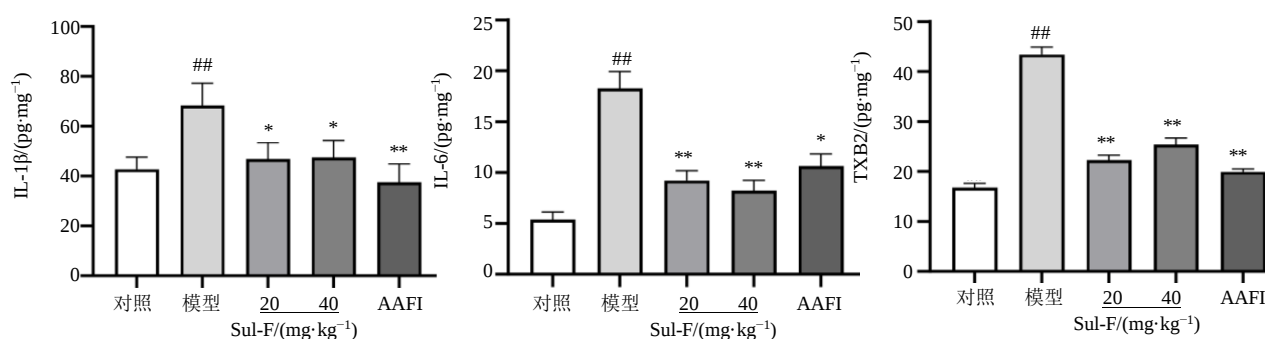
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 2 大鼠脑梗死率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
 Fig. 2 Rate of cerebral infarction in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 3 大鼠脑组织中 p-PLC β3 和 PLC β3 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
 Fig. 3 Expression of p-PLC β3 and PLC β3 protein in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 4 大鼠脑组织 IL-1β、IL-6、TXB2 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
 Fig. 4 Expression of IL-1β, IL-6 and TXB2 in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

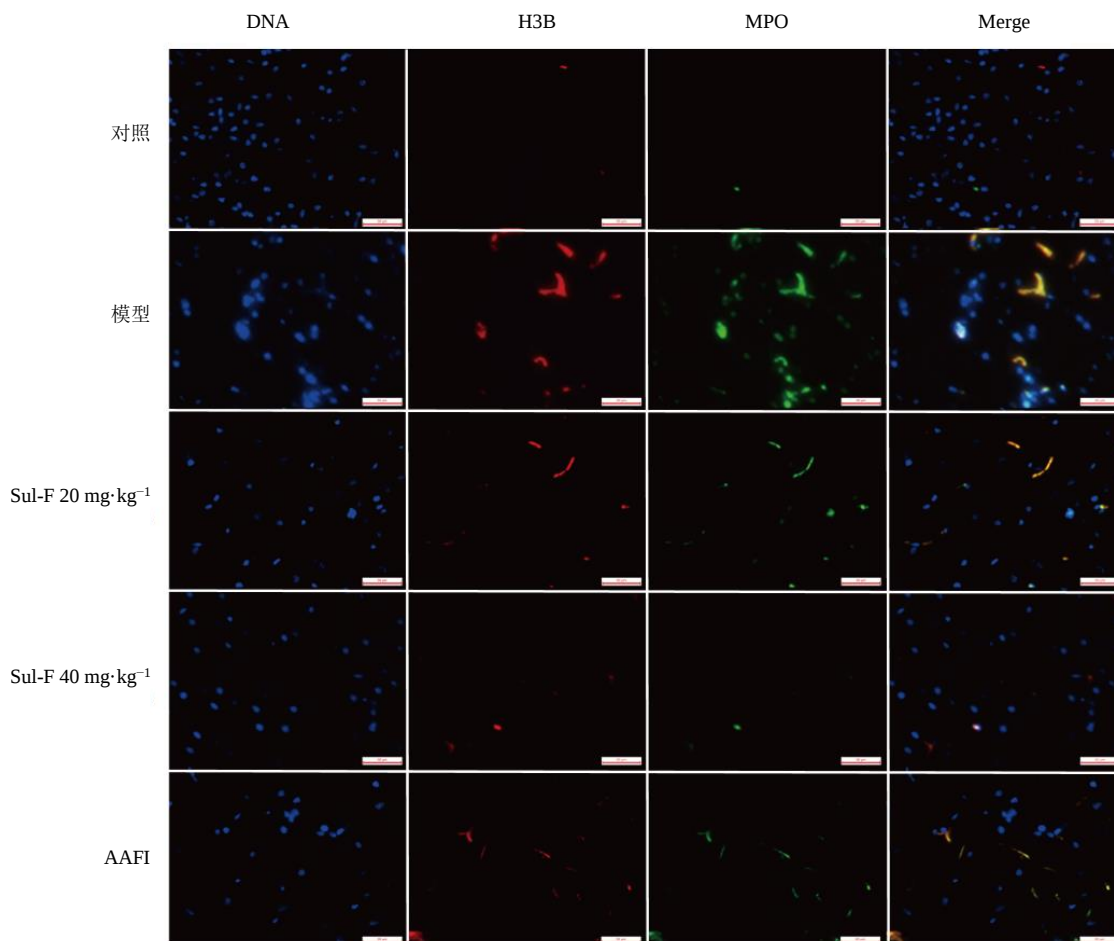
3.6 Sul-F 对 NETs 形成的影响

H3B、MPO 和 DNA 是 NETs 结构和形成过程

中的关键成分。H3B 反映染色质解聚, MPO 反映中性粒细胞活化, DNA 反映 NETs 的骨架结构。三者

共同检测可以全面评估 NETs 的形成过程和功能状态。如图 5 所示, 模型组大鼠 I/R 脑组织区域可观察到 H3B、MPO 及 DNA 的共存。与完整的中性粒细胞不同, 这 3 种物质相互融合, 分散分布, 没有

完整的细胞形态, 提示该区域有 NETs 产生, 对照组大鼠相应区域则不存在该现象。与模型组相比, AAFI 组和 Sul-F ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组 NETs 产生明显减少。



DNA 染色呈蓝色 ($\times 100$); H3B 染色呈红色 ($\times 100$); MPO 染色呈绿色 ($\times 100$)。
DNA staining showed blue ($\times 100$); H3B staining showed red ($\times 100$); MPO staining showed green ($\times 100$).

图 5 大鼠脑缺血半暗带组织 NETs 形成情况

Fig. 5 Formation of NETs in brain tissue of rats

3.7 Sul-F 对 P-selectin、CD11b 表达的影响

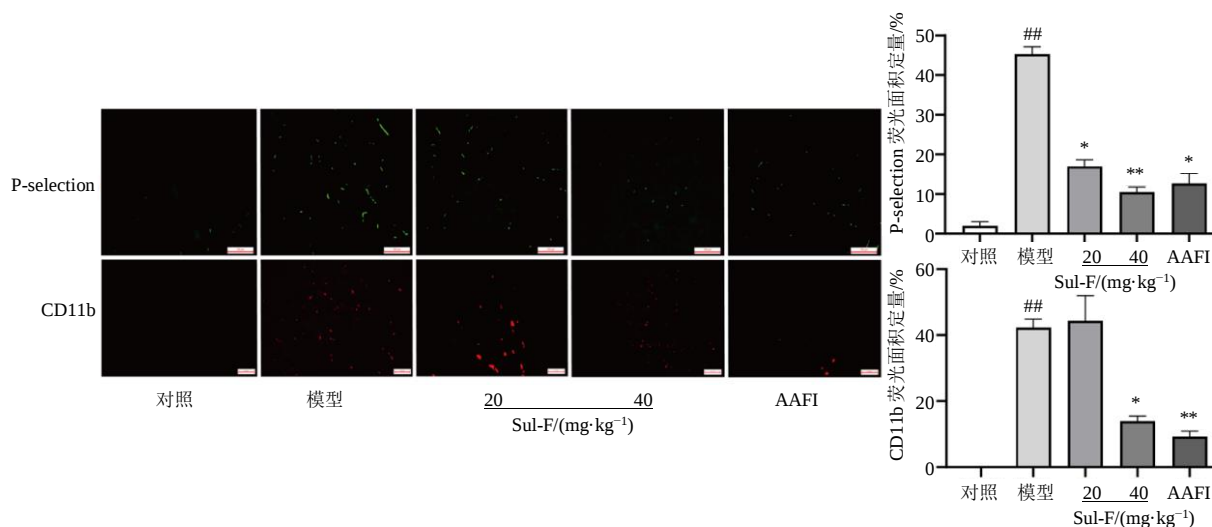
如图 6 所示, 对照组 I/R 脑组织区域有微量 P-selectin 表达, 未见 CD11b 表达, 模型组 P-selectin 和 CD11b 均表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, Sul-F ($20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组与 AAFI 组 P-selectin 表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), Sul-F ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组与 AAFI 组 CD11b 表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

脑卒中是全球第二大死亡原因, 55 岁以下人群脑卒中的发病率逐年上升, 对人类健康和社会经济造成的负担不断扩大^[11]。缺血性脑卒中发生时, 血流中断导致大脑代谢所需的氧气和葡萄糖缺乏, 能

量产生不足, 毒性代谢产物如兴奋性氨基酸、酸性代谢产物、氧化应激产物和炎症介质等在局部堆积, 造成组织损伤和神经元死亡, 死亡的神经元通过释放损伤相关分子模式 (DAMPs) 进一步诱发炎症反应^[12]。

中性粒细胞是缺血性脑卒中急性炎症反应的重要组成部分, 在缺血性脑卒中后, 中性粒细胞首先从血液循环系统进入缺血灶, 分泌炎症因子和蛋白酶, 并形成 NETs, 加重内皮损伤和血脑屏障损害, 与缺血性脑卒中不良预后成正相关^[13]。同时, 中性粒细胞和 NETs 参与血栓形成, 阻碍血管重构, 加剧缺血性神经元损伤^[14]。



P-selectin 呈绿色 ($\times 50$), CD11b 呈红色 ($\times 50$); 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
P-selectin showed green ($\times 50$), CD11b showed red ($\times 50$); ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 6 大鼠脑缺血半暗带组织 P-selectin、CD11b 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Fig. 6 Expression of P-selectin and CD11b protein in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

NETs 形成是区别于凋亡和坏死的另一种细胞死亡方式,通过还原型辅酶II (NADPH) 及 RAF-丝裂原活化蛋白激酶激酶 (MEK)-细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 途径使细胞核核膜及颗粒膜溶解、染色质与胞浆内颗粒蛋白结合,随后被排至细胞外形成网络状结构以捕获致病原可防止其扩散^[15],与此同时利用高浓度的蛋白质杀灭细菌^[16]。NETs 的形成受多种生物和化学刺激,如激活的血小板、细菌以及活性氧 (ROS) 等^[17]。正常条件下,NETs 是固有免疫的一部分,在对抗病原微生物入侵过程中发挥重要作用。但在脑卒中病理条件下,NETs 扮演了“双刃剑”的角色。多数研究认为 NETs 会加剧脑损伤,对脑卒中的预后有着不良影响^[18]。有研究指出血小板、影响 NETs 形成的物质以及 NETs 组成成分等都可以成为调控 NETs 形成的潜在靶标^[19]。

NETs 的网状结构可以网络血小板,其中的组蛋白可以引起血小板聚集,刺激血栓形成 DNA 网状结构,与组蛋白共同促进深静脉血栓的形成。因此 NETs 连接了炎症反应与血栓形成,二者相互促进。相关研究表明激活 PLC $\beta 3$,可能会通过血小板聚合加重脑 I/R 损伤^[20]。Yang 等^[21]通过大鼠心肌 I/R 模型证实 I/R 过程中 NETs 过量形成,导致心肌衰弱,说明 I/R 引起的损伤可能是由于 NETs 的作用。

P-selectin 是血小板活化的重要标志物,静息状态下主要储存于血小板的 α -颗粒中,血小板活化后

可以在血小板膜表面表达并且分泌到血液中^[22]。脑 I/R 过程中, P-selectin 的表达会进一步增加,导致白细胞在微血管中的滞留和炎症反应的加剧,从而加重脑组织损伤^[23]。CD11b 是中性粒细胞活化和迁移的重要分子,属于 $\beta 2$ 整合素家族,与 CD18 结合形成异二聚体,在中性粒细胞的免疫反应中起重要作用^[24]。Sreeramkumar 等^[25]通过活体显微成像技术发现活化的血小板表面 P-selectin 可以与中性粒细胞表面 P-selectin 配体 PSGL-1 结合,介导血小板与中性粒细胞相互作用,引起中性粒细胞迁移、黏附和形成 NETs 等,并且通过小鼠急性肺炎与脑缺血模型证明这种相互作用可以引起炎症反应,血小板、中性粒细胞缺失或者抑制 PSGL-1、CD11b 可以减轻这种损伤,降低死亡率。对富含 P-selectin 配体的小鼠研究表明, P-selectin 与中性粒细胞表面 PSGL-1 相互作用能增加血浆中凝血因子产生,从而刺激 NETs 生成^[23]。本研究表明 Sul-F 能够抑制 P-selectin 和 CD11b 的产生,发挥对血小板和中性粒细胞活化的抑制作用,进而抑制 NETs 形成,减轻脑 I/R 损伤。

前期研究表明^[26], Sul-F 干预能够降低脑组织氧化应激水平,降低细胞凋亡,改善脑梗死体积和神经功能评分, Sul-F 具有保护大鼠脑 I/R 损伤的作用。本研究制备 MCAO 诱导的脑 I/R 损伤模型,通过评估神经功能、脑指数、脑梗死率等指标,考察 Sul-F 对脑 I/R 的保护作用,表明 Sul-F 显著改善神

经功能缺损,降低脑水肿、脑梗死率,与已有文献报道一致。本研究通过荧光免疫组化证实 Sul-F 能够降低 MCAO 诱导模型脑组织 P-selectin、CD11b 表达,提示 Sul-F 可抑制血小板、中性粒细胞活化。

在脑卒中发生发展过程中,NETs 的形成对机体有较大的危害,减少 NETs 产生对于预防和减轻脑 I/R 损伤具有重要意义。本研究旨在探讨 Sul-F 是否通过调控 NETs 产生发挥脑保护作用。研究发现,Sul-F 能够促进 p-PLC β 3 蛋白表达,减少血小板活化,进而使 P-selectin、CD11b 等促 NETs 因子释放减少,削弱血小板-中性粒细胞相互作用,减轻炎症反应和血栓形成,促进脑 I/R 时血管再通,改善微循环血液供应,降低脑梗死体积,发挥脑保护作用。

本研究以大鼠 MCAO 模型模拟脑 I/R 损伤,发现 Sul-F 干预能够促进 p-PLC β 3 蛋白表达,减少血小板活化,进而抑制血小板介导的 NETs 形成,降低炎症反应,改善脑 I/R 损伤。

志谢:天津中医药大学中药学院庄朋伟教授为本实验提供的帮助。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Y J, Li Z X, Gu H Q, et al. China stroke statistics 2019: A report from the national center for healthcare quality management in neurological diseases, China national clinical research center for neurological diseases, the Chinese stroke association, national center for chronic and non-communicable disease control and prevention, Chinese center for disease control and prevention and institute for global neuroscience and stroke collaborations [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2020, 5(3): 211-239.
- [2] Stuckey S M, Ong L K, Collins-Praino L E, et al. Neuroinflammation as a key driver of secondary neurodegeneration following stroke?[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 13101.
- [3] Mao Z G, Tian L Y, Liu J, et al. Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154111.
- [4] Zhang H Y, Jin B W, You X Y, et al. Pharmacodynamic advantages and characteristics of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of ischemic stroke [J]. *CHM*, 2023, 15(4): 496-508.
- [5] Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8): 869-881.
- [6] Denorme F, Portier I, Rustad J L, et al. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e154225.
- [7] 陈利城, 杨帆. 芒柄花素磺酸钠通过 MAPKS 信号通路缓解 OVA 诱导哮喘小鼠肺部炎症 [J]. *天津中医药大学学报*, 2024, 43(5): 407-412.
Chen L C, Yang F. Study on the effect and mechanism of sodium formononetin-3'-sulfonate on OVA-induced asthma mice [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2024, 43(5): 407-412.
- [8] Bai Y, He Z W, Duan W S, et al. Sodium formononetin-3'-sulphonate alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [J]. *BMC Neurosci*, 2022, 23(1): 74.
- [9] 孙瑜, 罗西, 王健, 等. 芒柄花素磺酸钠在脑缺血再灌注大鼠脑组织的药动学研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(8): 1870-1874.
Sun Y, Luo X, Wang J, et al. Pharmacokinetic study of sodium formononetin-3'-sulphonate in brain of cerebral ischemia-reperfusion rat [J]. *Drugs Clin*, 2018, 33(8): 1870-1874.
- [10] Bieber M, Gronewold J, Scharf A C, et al. Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2019, 50(10): 2875-2882.
- [11] Feigin V L, Owolabi M O. Pragmatic solutions to reduce the global burden of stroke: a World Stroke Organization-Lancet Neurology Commission [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(12): 1160-1206.
- [12] 张建文, 王萍, 任超, 等. 缺血性卒中后期炎症反应机制研究进展与新药研发的契机 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4): 468-473.
Zhang J W, Wang P, Ren C, et al. Advance in mechanism study of inflammation in post-ischemic stroke and opportunity of new drug development [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2019, 35(4): 468-473.
- [13] Mu Q C, Yao K, Syeda M Z, et al. Neutrophil targeting platform reduces neutrophil extracellular traps for improved traumatic brain injury and stroke theranostics [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(21): 2308719.
- [14] 古力加乃提·麦麦吐逊, 麦路德木·麦麦吐逊, 于慧娟, 等. NETs 在脑卒中患者血栓中的含量及对治疗、预后的影响 [J]. *河北医药*, 2023, 45(11): 1672-1675.
Gulijianaiti M, Mailudemu M, Yu H J, et al. Content of

- neutrophil extracellular traps in thrombus of stroke patients and its influence on thrombectomy and prognosis [J]. *Hebei Med J*, 2023, 45(11): 1672-1675.
- [15] Sollberger G, Tilley D O, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: The biology of chromatin externalization [J]. *Dev Cell*, 2018, 44(5): 542-553.
- [16] Mutua V, Gershwin L J. A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: Potential anti-NETs therapeutics [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 61(2): 194-211.
- [17] Chou M L, Babamale A O, Walker T L, et al. Blood-brain crosstalk: The roles of neutrophils, platelets, and neutrophil extracellular traps in neuropathologies [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(9): 764-779.
- [18] Kim S W, Lee J K. Role of HMGB1 in the interplay between NETosis and thrombosis in ischemic stroke: A review [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1794.
- [19] 徐跃轩, 赵晓丽. 中性粒细胞胞外诱捕网在急性缺血性脑卒中的研究进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2022, 14(12): 2219-2222.
- Xu Y X, Zhao X L. Research progress of neutrophil extracellular traps (NETs) in acute ischemic stroke [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2022, 14(12): 2219-2222.
- [20] Gupta S, Cooper M, Zhao X F, et al. A regulatory node involving $G\alpha_q$, $PLC\beta$, and RGS proteins modulates platelet reactivity to critical agonists [J]. *J Thromb Haemost*, 2023, 21(12): 3633-3639.
- [21] Yang K, Gao R F, Chen H C, et al. Myocardial reperfusion injury exacerbation due to ALDH2 deficiency is mediated by neutrophil extracellular traps and prevented by leukotriene C4 inhibition [J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(18): 1662-1680.
- [22] Schönlichen C, Montague S J, Brouns S L N, et al. Antagonistic roles of human platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ and chemokines in regulating neutrophil activation and fate on arterial thrombi under flow [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(9): 1700-1712.
- [23] Li X, Ma Y M, Wang D B. The role of P-selectin/PSGL-1 in regulating NETs as a novel mechanism in cerebral ischemic injury [J]. *Front Neurol*, 2024, 15: 1442613.
- [24] Aries M, Cook M, Hensley-McBain T. A pilot study to investigate peripheral low-level chronic LPS injection as a model of neutrophil activation in the periphery and brain in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10): 5357.
- [25] Sreeramkumar V, Adrover J M, Ballesteros I, et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation [J]. *Science*, 2014, 346(6214): 1234-1238.
- [26] 李雅楠, 李思博, 白月, 等. 芒柄花素磺酸钠调控线粒体凋亡通路改善脑缺血再灌注损伤的研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(11): 3759-3767.
- Li Y N, Li S B, Bai Y, et al. Sodium formononetin-3'-sulphonate alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(11): 3759-3767.

[责任编辑 兰新新]