

# 牡荆苷调控 Nrf2/ARE 通路减轻急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应研究

刘 磊<sup>1</sup>, 张静文<sup>2</sup>, 张新玥<sup>2</sup>

1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

**摘要:** **目的** 探讨牡荆苷通过调控核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 通路对急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应的作用。**方法** 54 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照依达拉奉 (0.56 mg/kg) 组和牡荆苷低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg) 组, 除假手术组外均制备急性脑缺血大鼠模型, 再灌注后假手术组、模型组大鼠 ip 生理盐水, 依达拉奉组和牡荆苷各剂量组按照相应剂量 ip 给药, 8 h 给药 1 次, 共 3 次。对比干预前后大鼠神经行为学评分; HE 染色检测大鼠大脑皮质病理变化; 试剂盒检测大鼠大脑皮质组织氧化应激指标丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 水平; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 检测大鼠大脑皮层 Nrf2/ARE 通路相关基因 mRNA 与蛋白表达水平。**结果** 干预前后假手术组大鼠神经行为学评分无明显变化, 模型组较干预前增高 ( $P<0.01$ ), 依达拉奉组、牡荆苷各剂量组均较干预前降低 ( $P<0.01$ ), 且干预后各组间神经行为学评分比较差异显著 ( $P<0.01$ )。假手术组大鼠大脑皮质组织神经细胞分布均匀、密集, 神经细胞的胞体、胞核形态正常; 模型组、依达拉奉组和牡荆苷各剂量组大鼠脑组织神经细胞排列均有紊乱、疏松, 其中模型组可见液化性坏死、细胞结构消失等表现; 牡荆苷低剂量组可见细胞排列严重紊乱、疏松, 部分液化性坏死、细胞结构消失; 牡荆苷中剂量组和依达拉奉组液化性坏死部分面积小, 大多细胞结构正常; 牡荆苷高剂量组仅可见极少液化性坏死, 细胞结构基本正常, 细胞排列轻微紊乱。与假手术组比较, 模型组大鼠大脑皮质 MDA 和 NO 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), SOD 和 GSH 水平显著降低 ( $P<0.01$ ), Nrf2、 $\gamma$ -GCS mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.01$ ), 细胞质 Nrf2、 $\gamma$ -GCS 蛋白表达水平平均显著升高 ( $P<0.01$ ), 细胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平平均显著降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 依达拉奉组和牡荆苷低、中、高剂量组大鼠大脑皮质 MDA 和 NO 水平均显著降低 ( $P<0.01$ ), SOD 和 GSH 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), Nrf2、 $\gamma$ -GCS mRNA 表达水平显著降低 ( $P<0.01$ ), 细胞质 Nrf2、 $\gamma$ -GCS 蛋白表达水平平均显著降低 ( $P<0.01$ ), 细胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平平均显著升高 ( $P<0.01$ )。且牡荆苷各剂量组大鼠大脑皮质 MDA、NO、SOD、GSH 水平及 Nrf2、 $\gamma$ -GCS、HO-1 mRNA 和蛋白表达水平均呈剂量依赖性, 组间差异显著 ( $P<0.01$ )。**结论** 牡荆苷可减轻急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应, 推测与调控 Nrf2/ARE 信号通路, 上调 Nrf2 基因与蛋白表达, 促进其由细胞质向细胞核移动, 上调 HO-1 表达, 抑制  $\gamma$ -GCS 表达, 增强机体的抗氧化应激反应能力有关。

**关键词:** 牡荆苷; 核转录因子 E2 相关因子 2; 抗氧化反应元件; 急性脑缺血; 再灌注; 氧化应激反应

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)05-1287-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.027

## Effect of vitexin on Nrf2/ARE pathway in alleviating oxidative stress in rats with acute cerebral ischemia-reperfusion

LIU Lei<sup>1</sup>, ZHANG Jing-wen<sup>2</sup>, ZHANG Xin-yue<sup>2</sup>

1. School of Basic Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. School of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of vitexin on oxidative stress in rats with acute cerebral ischemia-reperfusion by regulating the pathway of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE). **Methods** A total of 54 SD rats were randomly divided into Sham group, model group, positive control (edaravone 0.56 mg/kg) group and vitexin low, medium, and high dose (10, 20, 40 mg/kg) groups. The rat models with acute cerebral ischemia were established except the Sham group. After reperfusion, rats in Sham group and model group were received ip saline. The edaravone group and vitexin groups were administered according to the corresponding dose, once every 8 h for a total of three times. The neurobehavioral scores of rats before and after

收稿日期: 2019-11-05

作者简介: 刘 磊 (1983—), 男, 陕西汉中, 硕士研究生, 讲师, 主要研究方向为心脑血管疾病损伤及防治机制研究。

intervention were compared. HE staining was used to detect the pathological changes of cerebral cortex. The levels of MDA, NO, SOD, and GSH in cerebral cortex of rats were detected by the kit. The mRNA and protein expression levels of Nrf2/ARE pathway related gene in rat cerebral cortex were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Before and after intervention, there was no significant change in the neurobehavioral score of rats in the Sham group, the model group was higher than before intervention ( $P < 0.01$ ), the edaravone group and the vitexin groups were lower than before intervention ( $P < 0.01$ ), and there was a significant difference in the neurobehavioral score between the groups after intervention ( $P < 0.01$ ). In the Sham group, the distribution of nerve cells was uniform and dense, and the morphology of cell body and nucleus was normal. In the model group, edaravone group and vitexin group, the arrangement of brain tissue was disordered and loose, in which liquefying necrosis and disappearance of cell structure were observed in the model group; in the low-dose group, the arrangement of cells was seriously disordered and loose. In the vitexin medium dose group and edaravone group, the area of liquefying necrosis was small, and most of the cells were normal; In the vitexin high dose group, only a few liquefying necrosis were found, the cell structure was basically normal, and the cell arrangement was slightly disordered. Compared with the Sham group, the levels of MDA and NO in the cerebral cortex of the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ), the levels of SOD and GSH were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the expression levels of Nrf2 and  $\gamma$ -GCS mRNA were significantly increased ( $P < 0.01$ ), the expression of cytoplasmic Nrf2 and  $\gamma$ -GCS proteins were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the expression levels of nuclear Nrf2 and HO-1 proteins were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the levels of MDA and NO in the cerebral cortex of rats in the edaravone group and low, medium and high dose groups of vitexin were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the levels of SOD and GSH were significantly increased ( $P < 0.01$ ), Nrf2 and  $\gamma$ -GCS mRNA expression levels were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), cytoplasmic Nrf2,  $\gamma$ -GCS protein expressions were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and nuclear Nrf2 and HO-1 protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). And the levels of MDA, NO, SOD, GSH and Nrf2,  $\gamma$ -GCS, HO-1 mRNA and protein expression in rat cerebral cortex in each dose group were dose-dependent, with significant differences between groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Vitexin can alleviate oxidative stress in rats with acute cerebral ischemia-reperfusion. It is speculated that it is related to the regulation of Nrf2/ARE signaling pathway, the up-regulation of Nrf2 gene and protein expression, the promotion of its movement from cytoplasm to nucleus, the up-regulation of HO-1 expression, the inhibition of  $\gamma$ -GCS expression, and the enhancement of the body's ability to response to oxidative stress.

**Key words:** viticillin; nuclear factor E2 related factor 2; antioxidant response elements; acute cerebral ischemia; reperfusion; oxidative stress response

急性脑缺血是指由于脑部血管血液供应不足突然出现的急性缺血性脑血管病,可出现头晕、视物模糊/旋转等症状,多由于颅内动脉系统或椎-基底动脉血流突然中断所致。急性脑血管病多发生在 60 岁以上人群,可导致局部脑组织血流供应障碍,还可由于缺血、缺氧等导致脑组织软化,增加细胞凋亡,损伤相应的神经功能<sup>[1-2]</sup>。据统计<sup>[3]</sup>,我国急性脑缺血发病率较高,每年有超过 200 万新发病例,且死亡率较高,其中仅急性期死亡者占比高达 10.5%~38%。血管再通是目前急性脑缺血疾病患者常用的治疗方案,但是再灌注时可诱发脑组织炎症反应和氧化应激反应损伤,需加强控制<sup>[4]</sup>。牡荆苷具有抗肿瘤、脑组织保护等作用,有研究发现牡荆苷可减轻急性脑缺血再灌注所致的脑组织损伤<sup>[5]</sup>,证实其在此类疾病治疗方面有良好的应用价值。但是牡荆苷是否可减轻氧化应激反应仍需深入研究。核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 通路是经典的氧化应激反应调控通路<sup>[6]</sup>,

牡荆苷是否可通过调控该通路发挥抗急性脑缺血再灌注大鼠的氧化应激损伤尚鲜有相关报道。鉴于此,本研究制备急性脑缺血再灌注大鼠模型,探讨牡荆苷对其氧化应激损伤的保护作用,以期对牡荆苷的应用及药理研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 54 只,雌雄各半,体质量 180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号 SCXK (京) 2018-001,合格证号 2018213。

### 1.2 药品与试剂

依达拉奉 (批号 171011A,质量分数 $\geq 99\%$ ,海南龙圣堂制药有限公司);牡荆苷 (批号 170914002,质量分数 $\geq 98\%$ ,上海纪宁实业有限公司);丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司);苏木素-伊红 (HE) 染

色试剂盒(美国 Bio-Rad 公司); Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司); 二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(深圳晶美生物科技有限公司); 化学发光(ECL)试剂盒(大连宝生物科技有限公司); 兔抗鼠 Nrf2、血红素加氧酶 1(HO-1)和  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -GCS)单克隆抗体,山羊抗兔过氧化物酶标记的 Nrf2、HO-1 和  $\gamma$ -GCS 多克隆抗体(美国 Acdam 公司); 电泳凝胶(北京泛博生物化学有限公司)。

### 1.3 仪器

36XL 型光学显微镜(上海光学仪器厂); H1650 型台式离心机(湖南湘仪仪器厂); QuantStudio™ 3D 型聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI 公司); DYCZ-20G 型基因检测电泳仪、DYCP-31E 型蛋白检测电泳仪(北京六一仪器厂); 311 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司); ZF-258 型凝胶成像分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组、模型制备与给药

54 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药依达拉奉(0.56 mg/kg)组和牡荆苷低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg, 即 1.62、3.24、6.48  $\mu$ mol/kg)<sup>[5]</sup>组, 每组 9 只, 除假手术组外均制备急性脑缺血大鼠模型。大鼠称定质量后麻醉(ip 水合氯醛 400 mg/kg), 仰卧位固定于手术台上, 备皮消毒。参照文献方法<sup>[7]</sup>制备脑缺血/再灌注模型, 持续阻断双侧颈总动脉 5 min, 然后血液再灌注。假手术组与上述操作完全相同, 但仅对双侧颈总动脉暴露、插线, 不实施结扎处理。术后所有大鼠均预防性应用抗生素, 再灌注后假手术组、模型组大鼠 ip 生理盐水, 依达拉奉、牡荆苷各剂量组按照相应剂量 ip 给药, 8 h 给药 1 次, 共 3 次。

### 2.2 神经行为学观察

采用 Clark 量表<sup>[8]</sup>对各组存活大鼠进行神经行为学评价, 总分为 0~28 分, 评分越低认为神经行为学越接近正常, 注意各组均需要在干预前后评价。

### 2.3 HE 染色检测大鼠大脑皮质病理变化

于再灌注 24 h 后麻醉大鼠, 心脏灌注后处死, 取脑缺血侧新鲜的大脑皮质组织, 做病理切片。参照《病理学基础》<sup>[9]</sup>常规固定、包埋、切片、脱水、透明、浸蜡、水化, HE 染色, 镜下观察。

### 2.4 氧化应激反应指标检测

于再灌注 24 h 后麻醉大鼠, 心脏灌注后取缺血侧新鲜的大脑皮质组织, 将其表面的附属物去除,

并以生理盐水冲洗, 吸干水分后制作脑匀浆, 浓度为 10%。取 MDA、NO、SOD、GSH 检测试剂盒测定脑组织中的氧化应激反应指标。

### 2.5 Nrf2/ARE 通路相关基因 mRNA 表达检测

实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 Nrf2、HO-1 和  $\gamma$ -GCS mRNA 水平。取大鼠大脑皮质组织, 以液氮研磨, 提取总 RNA, 检测 RNA 的纯度, 要求所得产物 260、280 nm 波长处吸光度(A)的比值为 1.8~2.0。构建 20  $\mu$ L 反应体系, 其中 Nrf2 上游引物: 5'-ACGTAGATCGATATAGCTATGGGATCAGT-3', 下游引物: 5'-CTGATAGCTAGATATTCA GTATAGCTA-3'; HO-1 上游引物: 5'-ACGCTAGATATTAGATAGATCGAT-3', 下游引物: 5'-ACGCTAGATATGTTAGACTAGATC-GAT-3';  $\gamma$ -GCS 上游引物: 5'-AGCTCGATATAGAT-CTAGATGCTAGT-3', 下游引物: 5'-ACGCTAGATATAGCTATTTAGCAGATAGC-3';  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-CTGATAGATCAGTAGCTATAGATCGATAAC-3', 下游引物: 5'-TCGCTAGATATTCGATATGGCTAGTAG-3', 长度均为 20 bp。反应条件: 95  $^{\circ}$ C、15 min; 92  $^{\circ}$ C、10 s, 72  $^{\circ}$ C、75 s, 60  $^{\circ}$ C、15 s, 35 个循环; 54  $^{\circ}$ C、10 min。校正每个待检测样本的 Ct 值, 计算  $\Delta$ Ct,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  即为目的基因 mRNA 的相对表达。

### 2.6 Nrf2/ARE 通路相关蛋白表达检测

Western blotting 法检测细胞质 Nrf2、细胞核 Nrf2、HO-1、 $\gamma$ -GCS 蛋白表达。取大鼠大脑皮质组织制备样品, 细胞质和细胞核 Nrf2 蛋白表达检测时需制备细胞质和细胞核蛋白样品, 电泳 90 min 后转膜, 封闭 1 h。加入一抗(1:1 000), 4  $^{\circ}$ C 过夜。洗膜 3 次, 加入二抗(1:5 000), 室温孵育 2 h。洗膜并加入 ECL 试剂, 其中细胞核 Nrf2 内参为 H3, 细胞质 Nrf2、HO-1、 $\gamma$ -GCS 内参均为  $\beta$ -actin, 电泳并分析目的蛋白的相对表达。

### 2.7 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学检验, 多样本计量资料以单因素方差分析, 每 2 组间差异以 SNK-*q* 检验, 本组内干预前后对比以配对 *t* 检验。检验标准均为  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠神经行为学影响

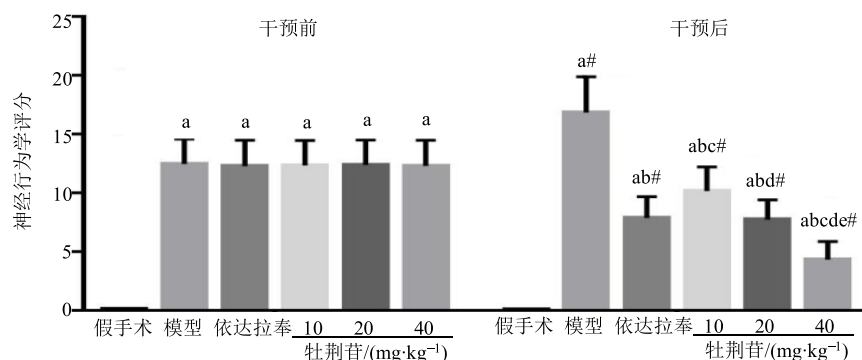
假手术组、模型组、依达拉奉组和牡荆苷低、中、高剂量组实验期间分别有 0、2、1、1、0、0

只大鼠死亡,多死于感染、咬伤等,死亡大鼠均剔除本研究。除假手术组外,干预前后各组神经行为学评分对比差异均显著( $P<0.01$ )。且干预后,各组间神经行为学评分比较差异显著( $P<0.01$ ),见图 1。

### 3.2 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质组织病理学影响

假手术组大鼠神经细胞分布均匀、密集,神经细胞的胞体、胞核形态正常。模型组、依达拉奉组

和牡荆苷各剂量组大鼠脑组织神经细胞排列均有紊乱、疏松,其中模型组可见液化性坏死、细胞结构消失等表现;牡荆苷低剂量组可见细胞排列严重紊乱、疏松,部分液化性坏死、细胞结构消失;牡荆苷中剂量组和依达拉奉组大鼠神经细胞液化性坏死部分面积小,大多细胞结构正常,且 2 组病理学变化相近;牡荆苷高剂量组仅可见极少神经细胞液化性坏死,细胞结构基本正常,细胞排列轻微紊乱,见图 2。



与假手术组比较: <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较: <sup>b</sup> $P<0.01$ ; 与依达拉奉组比较: <sup>c</sup> $P<0.01$ ; 与牡荆苷低剂量组比较: <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 与牡荆苷中剂量组比较: <sup>e</sup> $P<0.01$ ; 与干预前比较: <sup>#</sup> $P<0.01$ , 下图同

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs Sham group; <sup>b</sup> $P<0.01$  vs model group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs edaravone group; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs low dose group of vitexin; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs medium dose group of vitexin; <sup>#</sup> $P<0.01$  vs before intervention, same as below

图 1 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠神经行为学的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Effect of vitexin on neurobehavior of rats with acute cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ )

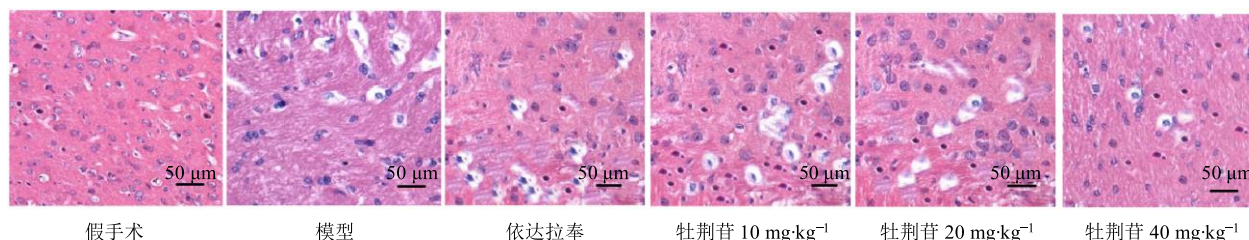


图 2 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质组织病理学的影响 (HE 染色,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of vitexin on histopathology of cerebral cortex in rats with acute cerebral ischemia-reperfusion (HE staining,  $\times 400$ )

### 3.3 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质氧化应激反应指标的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮质 MDA 和 NO 水平显著升高( $P<0.01$ ),SOD 和 GSH 水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,依达拉奉组和牡荆苷低、中、高剂量组大鼠大脑皮质 MDA 和 NO 水平均显著降低( $P<0.01$ ),SOD 和 GSH 水平显著升高( $P<0.01$ )。且牡荆苷各剂量组大鼠大脑皮质 MDA、NO、SOD 和 GSH 水平呈剂量依赖性,组间差异显著( $P<0.01$ ),见图 3。

### 3.4 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质 Nrf2/ARE 通路相关基因 mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮质 Nrf2、 $\gamma$ -GCS mRNA 表达水平显著升高( $P<0.01$ ),HO-1 mRNA 表达水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,依达拉奉组和牡荆苷各剂量组大鼠大脑皮质 Nrf2、 $\gamma$ -GCS mRNA 表达水平显著降低( $P<0.01$ ),HO-1 mRNA 表达水平显著升高( $P<0.01$ )。牡荆苷各剂量组大鼠 Nrf2、 $\gamma$ -GCS 和 HO-1 mRNA 表达水平呈剂量依赖性,组间差异显著( $P<0.01$ ),见图 4。

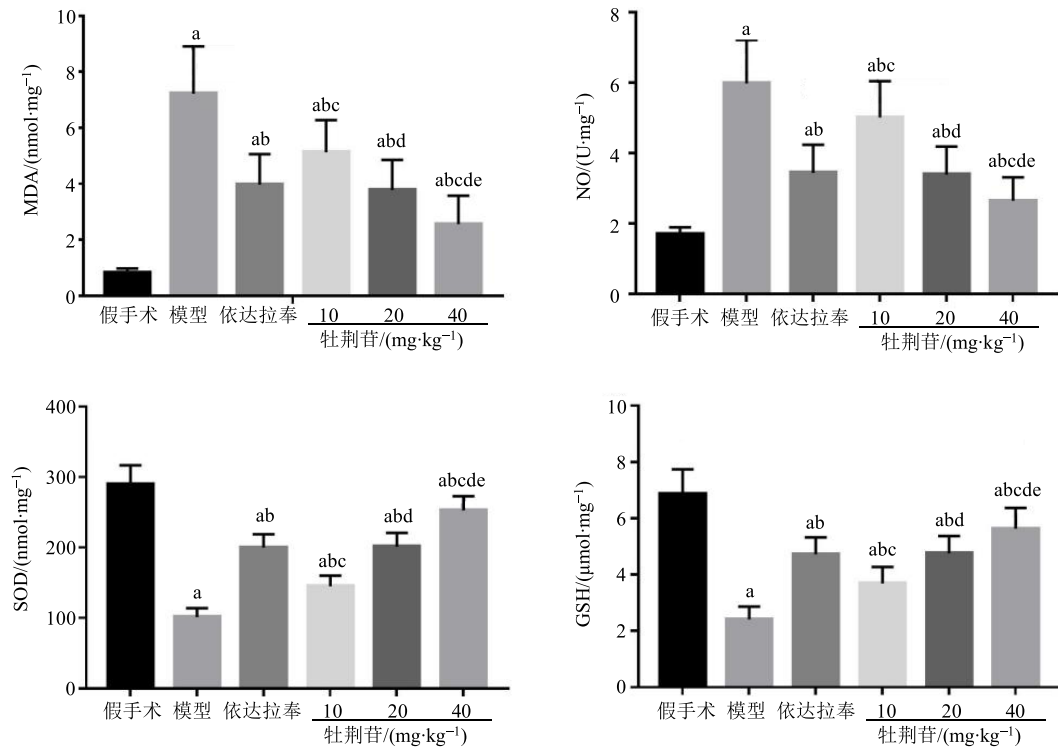


图 3 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质氧化应激反应指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 3 Effect of vitexin on oxidative stress in cerebral cortex of rats with acute cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ )

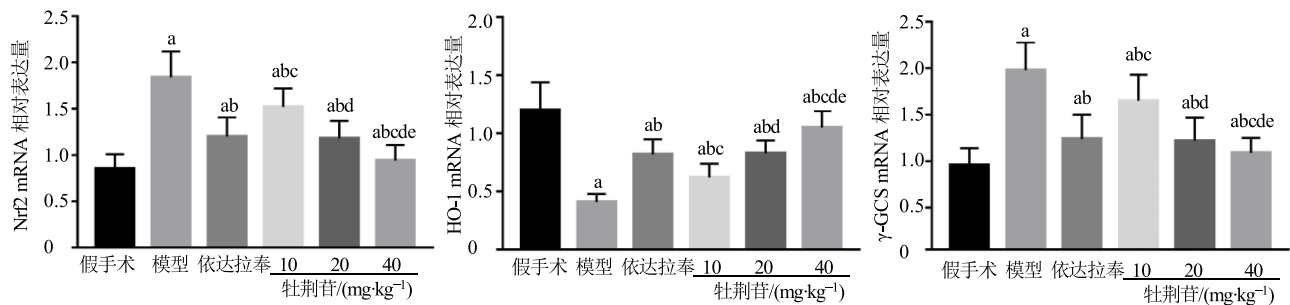


图 4 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质 Nrf2/ARE 通路相关基因 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effect of vitexin on mRNA expressions of Nrf2/ARE pathway related genes in cerebral cortex of rats with acute cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3.5 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质 Nrf2/ARE 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠大脑皮质细胞质 Nrf2、γ-GCS 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 细胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 依达拉奉组和牡荆苷各剂量组大鼠大脑皮质细胞质 Nrf2、γ-GCS 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 细胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ )。牡荆苷各剂量组大鼠大脑皮质细胞质 Nrf2、γ-GCS 蛋白和细胞核 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平呈剂量依赖性, 组间差

异显著 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。

### 4 讨论

急性脑缺血再灌注可导致局部脑组织损伤, 在此过程中氧化应激、炎症反应等均积极参与且起着至关重要的作用。研究发现<sup>[10]</sup>, 急性脑缺血再灌注后机体氧化应激反应指标可出现明显异常, 抗氧化应激能力则显著下降, 其中 MDA、NO 水平显著升高, 而 SOD、GSH 水平显著降低。MDA 属于氧化终产物, 会引起蛋白质、核酸等大分子交联聚合, 并且具有细胞毒性, 其活性增强意味着机体脂质过氧化反应增强, 可引发氧化应激损伤<sup>[11]</sup>。NO 带有



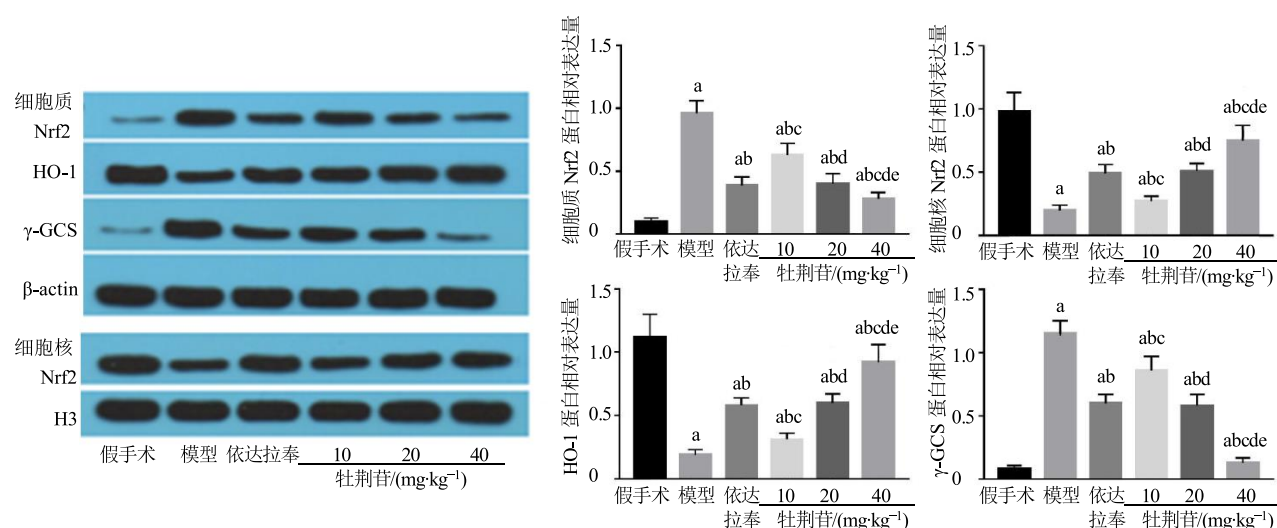


图 5 牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质 Nrf2/ARE 通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 5 Effect of vitexin on Nrf2/ARE pathway related protein expressions in cerebral cortex of rats with acute cerebral ischemia-reperfusion ( $\bar{x} \pm s$ )

自由基，常发挥信使作用，属于强效抗氧化剂，在机体内其水平多处于动态平衡，一旦发生氧化应激损伤，可在短时间内生成大量 NO 以减轻氧化应激反应所致的损伤。SOD 属于一种源于生命体的重要活性成分，可消除有害物质，维持良好的新陈代谢状态，其水平降低意味着机体抗氧化损伤的能力减弱<sup>[12]</sup>。GSH 属于一种含 γ-酰胺键和巯基的三肽，具有整合解毒、抗氧化等作用，也是衡量机体抗氧化能力的常用指标<sup>[13]</sup>。因此对急性脑缺血再灌注所致的损伤治疗时需积极控制氧化应激反应，调整上述指标，方可显著减轻脑损伤。

本研究中，牡荆苷各剂量和依达拉奉干预后大鼠神经行为学评分均下降，且脑组织病理损伤均减轻，脑组织 MDA、NO、SOD 和 GSH 水平均显著改善，其中牡荆苷中剂量组与依达拉奉组相近，牡荆苷各剂量的作用呈剂量依赖性，可知牡荆苷可改善急性脑缺血再灌注大鼠模型的神经行为学，减轻脑组织病理损伤，减轻氧化应激反应，且高剂量牡荆苷的作用效果最佳。牡荆苷具有较强的抗氧化应激反应能力，既往报道中均证实其对脑缺血再灌注、心肌缺血再灌注损伤有良好的控制效果<sup>[14-16]</sup>，且抗氧化应激能力显著，在此类疾病临床治疗中显示出良好的挖掘价值和应用前景。牡荆苷属于一种黄酮类化合物，是金银花中的主要成分，现代药理研究也证实其具有理想的体外抗氧化应激活性，且在既往实验中还证实该药物可以增强急性脑缺血再灌注小鼠机体的抗氧化应激损伤能力<sup>[17]</sup>。结合相关报

道及本研究结果，可以推测牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠具有抗氧化应激反应效用，因此可减轻神经和脑组织病理损伤，改善神经行为学状态。

此外，本研究还发现牡荆苷各剂量和依达拉奉干预后大鼠脑皮质 Nrf2、γ-GCS mRNA 表达均较模型组显著下降，且牡荆苷高剂量组最低，依达拉奉组与牡荆苷中剂量组均相近，牡荆苷低剂量组均最高，而 HO-1 mRNA 表达的变化趋势相反，且在蛋白检测对比结果中显示模型组大鼠脑皮质细胞质 Nrf2 蛋白表达水平较高，而牡荆苷各剂量组大鼠细胞核 Nrf2 蛋白表达水平均较模型组升高，HO-1、γ-GCS 蛋白表达与 mRNA 表达趋势一致，推测牡荆苷可能是通过调控 Nrf2/ARE 通路，促进细胞质中 Nrf2 蛋白向细胞核中移动，上调 HO-1 表达，抑制 γ-GCS 的表达实现抗急性脑缺血再灌注氧化应激反应所致的损伤的。Nrf2/ARE 是常用的氧化应激反应变化研究信号传导通路，可调节细胞抗氧化应激能力，保护脑组织。静息状态下 Nrf2 可与其抑制因子相耦联，使其对细胞抗氧化物质的能力处于基础水平，当收到活性氧簇攻击后 Nrf2 被解耦联，向细胞质中大量释放，并且可结合 ARE，启动抗炎蛋白、生长因子及抗氧化酶等调控氧化应激反应<sup>[18]</sup>。与此同时，Nrf2/ARE 下游的 HO-1、γ-GCS 均可受到刺激，前者被显著抑制，而后者被激活，共同参与氧化应激和损伤。研究指出<sup>[19]</sup>，调控 Nrf2/ARE 信号通路可促进氧自由基恢复平衡，进而控制各种外源性刺激对机体产生的氧化应激损伤。既往已有研究

证实在急性脑缺血再灌注大鼠抗氧化应激反应损伤治疗中调控该信号通路的重要性<sup>[20]</sup>。结合本研究结果和上述分析可知, 牡荆苷很可能是通过调控该信号通路发挥抗急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应, 从而减轻病理损伤的。

综上, 牡荆苷可控制急性脑缺血再灌注大鼠的氧化应激反应, 且其作用呈剂量依赖性, 还可改善神经行为学, 减轻脑组织病理损伤, 推测其通过调控 Nrf2/ARE 通路, 增强 Nrf2 的表达并促使其向细胞核移动, 上调 HO-1 的表达, 抑制  $\gamma$ -GCS 的活性实现上述作用的。本研究显示出牡荆苷在此类患者临床治疗中具有良好的应用价值, 而如何利用该药物减轻此类患者局部脑组织的氧化应激损伤仍需探讨, 应作为下一个重点研究的课题。

#### 参考文献

- [1] Jahan R, Saver J L, Schwamm L H, *et al.* Association between time to treatment with endovascular reperfusion therapy and outcomes in patients with acute ischemic stroke treated in clinical practice [J]. *JAMA*, 2019, 322(3): 252-263.
- [2] Marquardt R J, Cho S M, Thatikunta P, *et al.* Acute ischemic stroke therapy in infective endocarditis: Case series and systematic review [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(8): 2207-2212.
- [3] 王欢欢, 薛茜, 邹玉安, 等. 脑缺血预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(8): 699-702.
- [4] Broocks G, Hanning U, Flottmann F, *et al.* Clinical benefit of thrombectomy in stroke patients with low ASPECTS is mediated by oedema reduction [J]. *Brain*, 2019, 142(5): 1399-1407.
- [5] 杜云广, 曹欣欣, 王晓茹, 等. 牡荆苷对脑缺血再灌注大鼠脑损伤保护作用及其机制研究 [J]. 神经药理学报, 2017, 7(1): 10-23.
- [6] Xu W, Li F, Liu Z, *et al.* MicroRNA-27b inhibition promotes Nrf2/ARE pathway activation and alleviates intracerebral hemorrhage-induced brain injury [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 70669-70684.
- [7] 张晓波, 金征宇, 李明利, 等. 大鼠急性脑缺血再灌注模型的建立及 CT 灌注扫描的评价 [J]. 基础医学与临床, 2006, 26(6): 631.
- [8] 刘新峰, 陈春富. 实验神经病学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2006.
- [9] 易慧智, 赵建龙. 病理学基础 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2008.
- [10] Shang S, Zhao W, Li C, *et al.* Intra-arterial thrombolysis improves the prognosis of acute ischemic stroke patients without large vessel occlusion [J]. *Eur Neurol*, 2018, 80(5/6): 277-282.
- [11] 努尔买买提·亚生. 疏血通注射液对急性脑梗死缺血再灌注氧化应激水平的影响 [J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(10): 1193-1196.
- [12] El Nawar R, Lapergue B, Piotin M, *et al.* Higher annual operator volume is associated with better reperfusion rates in stroke patients treated by mechanical thrombectomy: The ETIS registry [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2019, 12(4): 385-391.
- [13] 沈玲玲, 逯丹, 李克深, 等. 尿酸在脑缺血再灌注中的神经保护作用 [J]. 国际脑血管病杂志, 2018, 26(9): 701-707.
- [14] 颜娟, 郑茂东, 崔玉环, 等. 牡荆苷对脑缺血再灌注损伤小鼠抗氧化酶的影响 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(33): 12-15.
- [15] Xu X, Zhang L, Ye X, *et al.* Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(1): 57-65.
- [16] 曹欣欣. 牡荆苷对脑缺血再灌注大鼠脑损伤保护作用及其机制研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2016.
- [17] 颜娟, 郑茂东, 崔玉环, 等. 牡荆苷对小鼠脑缺血/再灌注损伤抗氧化应激作用 [J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2016, 32(2): 19-22.
- [18] Zhang L, Yang J, Wu S, *et al.* Activation of Nrf2/ARE signaling pathway attenuates lanthanum chloride induced injuries in primary rat astrocytes [J]. *Metallomics*, 2017, 9(8): 1120-1131.
- [19] Zhang M, Wu J, Ding H, *et al.* Progesterone provides the pleiotropic neuroprotective effect on traumatic brain injury through the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Neurocrit Care*, 2017, 26(2): 292-300.
- [20] Ya B L, Li H F, Wang H Y, *et al.* 5-HMF attenuates striatum oxidative damage via Nrf2/ARE signaling pathway following transient global cerebral ischemia [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2017, 22(1): 55-65.