

基于 TGF- β 1/Smad3 信号探讨红景天苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用机制

蔡 静, 黄文静, 刘时喜, 黄 媛

贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550001

摘 要: **目的** 探讨红景天苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用机制及在 TGF- β 1/Smad3 信号通路的调节机制。**方法** 将 48 只 12~15 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组 ($n=12$): 假手术组、模型组、红景天苷组 (治疗组)、信号通路强化干预组 (TGF- β 1 组)。模型组、治疗组、TGF- β 1 组采用线栓法建立永久性局灶性缺血大鼠模型, 假手术组不插尼龙线。造模手术前 48 h, 治疗组、TGF- β 1 组大鼠每天上午固定时间进行药物干预: 治疗组以 10 mg/kg 红景天苷 icv 给药, TGF- β 1 组以 20 mg/kg TGF- β 1 icv 给药, 假手术组、模型组给予等体积的生理盐水, 连续给药 14 d 后, 将各组大鼠施以断头处死。分别采用 TTC 染色、尼氏染色、TUNEL 染色、免疫荧光、Western blotting 法检测各组大鼠脑梗死体积、完整神经元数目、细胞凋亡, 以及 Bax、Bcl-2、TGF- β 1、p-Smad3 的蛋白表达水平; 电镜观察各组大鼠脑组织的超微结构的改变。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠脑梗死体积明显增大, 脑组织中完整的神经元数量明显减少, 神经细胞凋亡率明显升高, Bax 的表达明显升高, Bcl-2 的表达明显降低, TGF- β 1、p-Smad3 的表达明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 电镜下观察模型组大鼠大脑超微结构破坏严重, 缺血性脑卒中病理症状明显。与模型组相比, 治疗组、TGF- β 1 组大鼠脑梗死体积明显减少, 脑组织中完整的神经元数量明显增多, 神经细胞凋亡率明显降低, Bax 的表达明显降低, Bcl-2 的表达明显升高, TGF- β 1、p-Smad3 的表达明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 电镜下观察治疗组大鼠大脑超微结构缺血性脑卒中病理症状明显减轻; 治疗组和 TGF- β 1 组相比, 观察指标差异不显著 ($P>0.05$)。**结论** 红景天苷可以激活缺血性脑卒中后的 TGF- β 1/Smad3 信号通路, 从而减轻神经功能损害, 发挥对神经细胞的保护作用。

关键词: 红景天苷; TGF- β 1/Smad3 信号通路; 缺血性脑损伤; 脑卒中; 保护机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6294-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.019

Study on neuroprotective mechanism of salidroside after ischemic stroke based on TGF- β 1/Smad3 signaling pathway

CAI Jing, HUANG Wen-jing, LIU Shi-xi, HUANG Yuan

The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To investigate the neuroprotective mechanism of salidroside after ischemic stroke and its regulation mechanism in TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. **Methods** A total of 48 SPF SD male rats aged 12—15 weeks were randomly divided into four groups ($n = 12$): Sham-operated group (sham group), model group, salidroside group (treatment group), and signaling pathway-enhanced intervention group (TGF- β 1 group). In the model group, treatment group, and TGF- β 1 group, a permanent focal cerebral ischemia rat model was established by suture method, and the sham group was not inserted with nylon thread. 48 h before the modeling operation, the treatment group and the TGF- β 1 group were given drug intervention at a fixed time every morning: the treatment group was administered with 10 mg/kg salidroside ventricle, and the TGF- β 1 group was treated with 20 mg/kg TGF- β 1. The intraventricular injection was administered, and the sham group and the model group were given an equal volume of physiological saline. After 14 d of continuous administration, each group of rats was sacrificed by decapitation. TTC staining, Nissl staining, TUNEL staining, immunofluorescence, and Western blot were used to determine the infarct volume, the number of intact neurons, the cell apoptosis, the expression of Bax and Bcl-2 expression, the expression levels of Bax, Bcl-2, TGF- β 1, and p-Smad3. The ultrastructural changes of brain tissue were observed by electron microscopy. **Results** Compared with the sham group, the cerebral infarction volume

收稿日期: 2020-04-01

基金项目: 贵州省中药管理局项目 (QZYY2017-039)

作者简介: 蔡 静 (1983—), 女, 贵州遵义人, 主治医师, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合治疗脑血管病及认知障碍。

Tel: 13984397243 E-mail: gu3und@163.com

of the model group was significantly increased, the number of intact neurons in the brain tissue was significantly reduced, the apoptosis rate of nerve cells was significantly increased, and the expression of Bax was significantly increased, the expression of Bax was significantly decreased. The expression of TGF- β 1 and p-Smad3 was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Under the electron microscope, the ultrastructural damage of the brain in the model group was severe, and the pathological symptoms of ischemic stroke were obvious; Compared with the model group, the cerebral infarction volume of the treatment group and the TGF- β 1 group was significantly reduced, the number of intact neurons in the brain tissue was significantly increased, the apoptosis rate of nerve cells was significantly decreased, the expression of Bax was significantly decreased, and the expression of Bcl-2 was significantly increased. The expression of TGF- β 1 and p-Smad3 was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The pathological symptoms of ultrastructural ischemic stroke in the model group were significantly reduced under electron microscope. The differences of the observation indexes between TGF- β 1 group and treatment group were not obvious, and it was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Salidroside can activate the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway after ischemic stroke, thereby alleviating neurological damage and exerting protective effects on nerve cells.

Key words: salidroside; TGF- β 1/Smad3 signaling pathway; ischemic brain injury; protection mechanism

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是一种常见的中枢神经系统疾病, 在临床上被称为脑梗死, 具有较高的发病率、致残率和致死率, 该疾病预后差、易复发, 严重影响人类的健康和生存质量^[1]。研究表明缺血性脑卒中的病理生理过程十分复杂, 是一种在炎性、氨基酸兴奋毒性、自由基异常积累共同作用引起的神经细胞凋亡或者不正常坏死, 最终导致大脑组织的功能障碍^[2]。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是具有高度多效性、多种生物功能的多肽蛋白分子。在正常生理状况下, TGF- β 1 在大脑组织呈现基本不表达的状态。研究表明在缺血等条件下, 脑组织中 TGF- β 1 的表达大幅上调^[3]; 异常表达的 TGF- β 1 能促进下游的受体 Smad 蛋白 (主要是 Smad3 蛋白) 的磷酸化, 将 Smad3 转位至细胞核内, 启动相关转录因子的基因表达, 参与星型胶质细胞和小胶质细胞的激活, 引起生物级联反应将受体信号进一步强化, 从而参与神经元细胞的生长、分化、增殖和凋亡, 发挥神经保护作用^[4]。Kotlarz 等^[5]研究报道 TGF- β 1 的表达缺失导致患者脑部组织炎性损伤的加重。Caruso 等^[6]通过用 TGF- β 1 对体外培养的神经细胞进行 24 h 干预治疗, 结果发现由一氧化氮导致的神经毒性明显降低。红景天苷是我国分布广泛的红景天中的主要活性组分。红景天苷对心、肝、肾等组织具有保护作用, 并且具有抗氧化、抗疲劳、免疫调节、改善血流动力学以及抗肿瘤的活性^[7]。韩静等^[8]证实红景天苷能够促进脑缺血大鼠的神经再生。但是针对红景天苷在缺血性脑卒中的研究少有报道。本研究采用线栓法建立永久性局灶脑缺血大鼠模型, 探讨红景天苷对缺血性脑卒中的保护作用,

同时分析其对 TGF- β 1/Smad3 信号通路的调控作用, 从而为红景天临床治疗缺血性脑卒中提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12~15 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只, 体质量 280~320 g, 由贵州医科大学实验动物中心提供 (许可证号 2019AQ-Y5A-C); 依照贵州中医药大学实验动物管理办法, 室温下标准饲料、自由饮水、分笼 (4 笼) 适应性饲养 1 周后用于实验。本研究经贵州中医药大学伦理委员会审批 (编号 20200006)。

1.2 主要试剂与仪器

红景天苷 (美伦生物有限公司, 批号 070539802, 质量分数 > 98%); TGF- β 1 蛋白 (美国 Selleck 公司, 批号 23458S0A-2, 4 °C 冰箱保存), 实验时采用标准医用生理盐水配制至所需浓度; 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC, 批号 BCBL1305V)、原位末端标记 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL) 试剂盒, 购自 Sigma 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAB 化学发光试剂盒购自北京华夏远洋科技有限公司; Bax、Bcl-2 抗体购自 Santa 公司; 戊巴比妥钠 (德国进口分装, 250 g/瓶)、多聚甲醛 (批号 050406)、二甲苯 (批号 83090501) 购自北京化学试剂公司; 冰冻切片包埋剂购自美国樱花公司; TGF- β 1、p-Smad3、山羊抗兔 IgG 抗体均购自瑞典 Perimed 公司。苏净 Airtech 超净工作台 (北京六一仪器厂); 组织包埋机 (型号 LEICAEG1150, 德国 Leica 公司); Nikon

Ti-U/Ti-s 倒置荧光显微镜 (型号 H-7650, 日本三菱公司); 5810R 型高速离心机 (日本岛津公司); 脑立体定位仪 (美国 Corning 公司); E-Gel Imager 凝胶成像仪 (美国 Beckma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 造模、分组及给药 所有大鼠均适应性喂养 7 d, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别为假手术组、模型组、红景天苷组 (治疗组) 和信号通路强化干预组 (TGF- β 1 组), 模型组、治疗组、TGF- β 1 组按照文献方法^[8]采用线栓法建立永久性局灶脑缺血大鼠模型, 假手术组不插尼龙线。造模手术前 48 h, 治疗组和 TGF- β 1 组大鼠每天上午固定时间进行药物干预: 治疗组以 10 mg/kg 红景天苷 icv 给药, TGF- β 1 组以 20 mg/kg TGF- β 1 icv 给药, 假手术组、模型组给予等体积的生理盐水, 连续给药 14 d。

1.3.2 TTC 染色测定各组大鼠脑梗死体积 连续给药 14 d 后, 将各组大鼠施以断头处死, 无菌取脑, 50%脑组织迅速转移至惰性气体罐中, -20°C 低温冰箱独立保存待测, 同时将 50%脑组织制成冠状切片, 2% TTC 染色液室温染色 20 min, 10%福尔马林溶液固定, 置于 4°C 冰醋酸上 24 h, 数码相机拍照, 正常脑组织呈现红色, 脑梗死组织呈白色, 图像分析软件分析图像并计算脑梗死面积 (A), 进而得到脑梗死体积 (V), 其中 $V=t(A_1+A_2+\cdots+A_n)-t/2$ (t 为脑冠状切片厚度, n 表示切片数量)。

1.3.3 尼氏染色检测各组大鼠脑组织中完整神经元数量 从冰箱中取出 10%大鼠脑组织, 至冰器皿并即刻以 4%多聚甲醛固定, 再用梯度乙醇在真空条件下脱水二甲苯透明后用石蜡将脑组织包埋处理。处理好的脑组织进行冠状切片 ($5\text{ }\mu\text{m}$ 厚), 并参照文献方法^[10]进行尼氏染色。光学显微镜 ($\times 400$) 下观察每组切片 6 个不同的视野, 并通过 Image-Pro 6.2 软件处理图像, 观察缺血侧大脑皮层区域内完整神经元的数量。

1.3.4 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织中的细胞凋亡 从冰箱中取出 10%大鼠脑组织, 常规方法固定, 冰冻切片, 二甲苯浸洗 2 次, 梯度酒精浸洗 5 min, 风干后 3%双氧水-甲醇浸泡 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 3 次, 每次 3 min, 然后 4°C 预冷乙醇上依次采用 0.1% TritonX-100、0.1%缓冲液处理 2 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 加入 TUNNEL 反应混合液, 加封口膜在暗湿盒中反应 1 h, 温度 37°C , PBS 漂洗, 梯度酒精脱水, 二甲

苯透明, 中性树脂封片, 荧光显微镜观察神经细胞凋亡情况。

1.3.5 电镜观察各组大鼠脑组织的超微结构的变化 从冰箱中取出 10%大鼠脑组织, 制成超薄组织切片: 采用 2.5%聚甲醛预固定 15 min, 1%锇酸固定 20 min, 无菌滤纸吸干水分, 环氧树脂 812 浸透包埋切片, 醋酸双氧铀及枸橼酸铅进行双重染色, 做成 50 nm 切片, 待切片完全干燥后载于铜网上, 上透射电镜观察脑组织超微病理结构。

1.3.6 免疫荧光检测各组大鼠脑组织中 Bax、Bcl-2 的表达 从冰箱中取出 10%大鼠脑组织, 常规方法固定, 冰冻切片, 按照免疫荧光试剂盒说明书进行操作, 观察 Bax、Bcl-2 的表达情况。

1.3.7 Western blotting 检测各组大鼠脑组织中 Bax、Bcl-2 以及信号通路相关蛋白 TGF- β 1、p-Smad3 的表达水平 从冰箱中取出 10%大鼠脑组织, 迅速剥离颅骨取缺血侧半脑组织在冰浴条件下分离大脑皮质, 加入 RIPA 组织裂解液中匀浆器打碎, 冰浴 5 min 后离心, 13 000 r/min、 4°C , 离心 10 min, 获得上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行上清中蛋白浓度的定量检测, 用 $2\times$ 电泳缓冲液稀释蛋白至相同浓度。10%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白, 用三羟甲基氨基甲烷 (Tris)/甘氨酸缓冲液将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% TBST 液中室温封闭 2 h, 将 PVDF 膜放入相应一抗稀释液 (均为 $1:1\ 000$) 中孵育, 4°C 过夜。次日, 将膜取出, TBST 液洗涤 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗稀释液 (均为 $1:10\ 000$), 室温孵育 2 h, 加入 DAB 发光液, 凝胶成像仪下读取灰度值, 以磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内参, 计算目的蛋白相对表达水平。

1.4 统计学分析

数据分析采用软件 SPSS 16.0, 符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两间比较采用独立 t 检验。

2 结果

2.1 TTC 检测各组大鼠脑梗死体积

TTC 染色结果以及各组大鼠脑梗死体积比较如图 1 所示, 假手术组基本无脑梗死现象, 与假手术组相比, 模型组大鼠脑梗死体积明显增大 ($P<0.05$), 与模型组相比, 治疗组、TGF- β 1 组大鼠脑

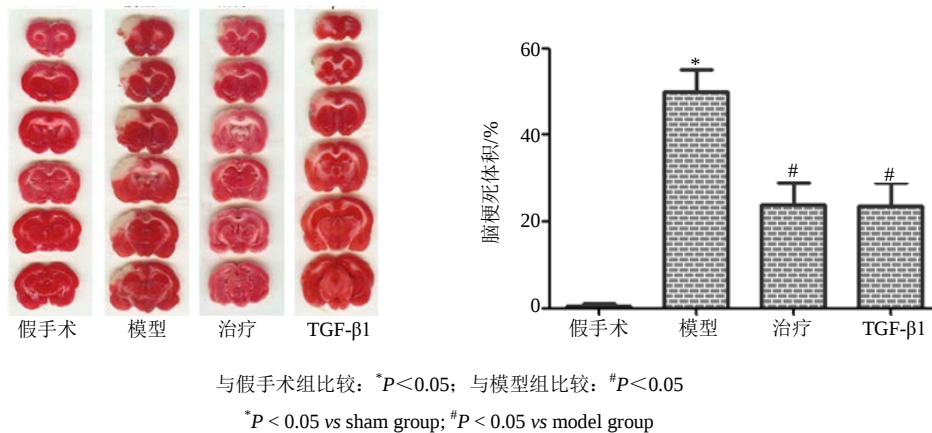


图 1 各组大鼠 TTC 染色结果及脑梗死体积

Fig. 1 TTC staining results and cerebral infarction volume of rats in each group

梗死体积明显减少 ($P < 0.05$), 治疗组和 TGF- $\beta 1$ 组相比, 大鼠脑组织脑梗死体积差异不明显, 不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 尼氏染色检测各组大鼠脑组织中神经元数量

完整神经元经过尼氏染色在光镜下观察呈蓝紫色, 如图 2 所示, 假手术组神经元结构形态正常。与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织内神经元出现异常结构, 完整的神经元数量明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组、TGF- $\beta 1$ 组大鼠脑组织内完整神经元的数量明显增多 ($P < 0.05$); 治疗组和 TGF- $\beta 1$ 组相比, 大鼠脑组织完整神经元的数量差异不明显。

2.3 电镜观察各组大鼠脑组织的超微结构变化

电镜下观察各组大鼠脑组织超微结构, 结果如图 3 所示。假手术组大鼠脑组织结构完整, 神经元细胞形态规整, 核膜完整, 清晰光滑, 核仁结构完

整, 染色质分布均匀, 细胞内容物皆清晰可辨, 线粒体数量丰富, 形状规则, 嵴结构规则排列, 内质网均匀散在核仁周围; 模型组大鼠脑组织神经元细胞形状不规则, 排列有重叠, 细胞膜不规则膨出, 核膜内陷、固缩或者缺损, 核仁肿胀明显, 染色体呈现凝聚状态, 细胞核质界限消失, 线粒体出现不同程度的肿胀、重叠, 嵴结构排列紊乱、减少甚至消失, 呈现空泡样性状, 内质网扩张肿胀明显; 与模型组相比, 治疗组大鼠脑组织神经元细胞形状趋于规整, 细胞核及核膜皱缩不明显, 核仁水肿程度明显减轻, 染色质轻度聚集, 细胞内容物形态较为规整, 线粒体轻度水肿, 嵴结构趋于完整, 排列分布趋于正常, 内质网扩张程度减轻; TGF- $\beta 1$ 组神经元细胞损伤较模型组明显减轻, 核膜核仁界限清晰可辨, 线粒体轻度肿胀, 内质网形状趋于规则。

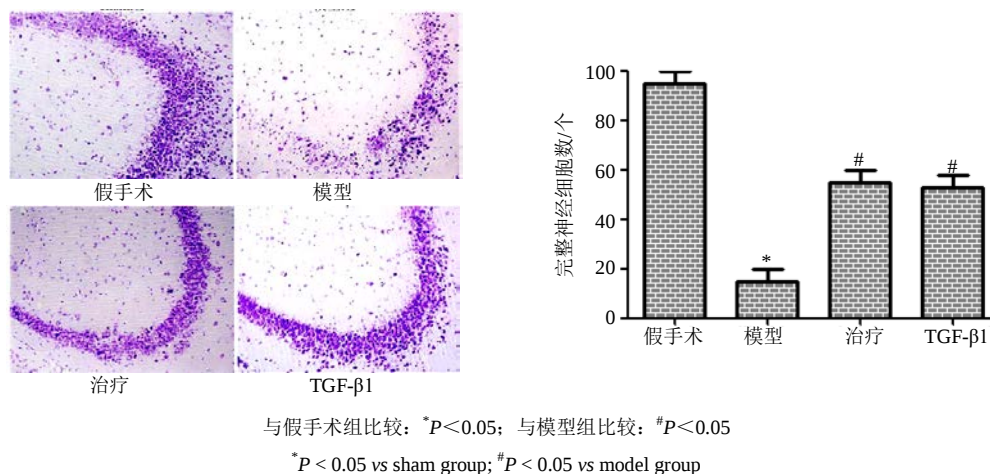


图 2 尼氏染色检测各组大鼠脑组织中神经元数目 (SP, ×400)

Fig. 2 Number of neurons in brain tissue of rats in each group measured by Nissl staining (SP, ×400)

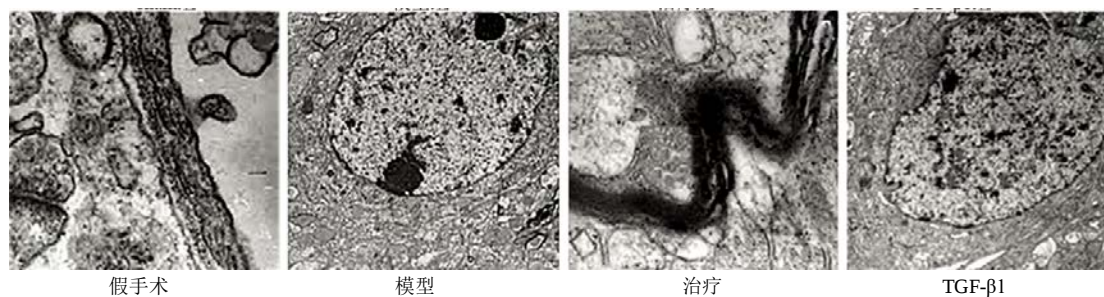


图3 电镜观察各组大鼠脑组织超微结构 (SP, $\times 15\ 000$)

Fig. 3 Brain ultrastructure of rat in each group observed by electron microscope (SP, $\times 15\ 000$)

2.4 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织中的细胞凋亡

TUNEL 染色结果如图 4 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织神经细胞凋亡率明显升高, 与模型组相比, 治疗组、TGF- $\beta 1$ 组大鼠脑组织神经细胞凋亡率明显降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗组和 TGF- $\beta 1$ 组相比, 大鼠脑组织神经细胞凋亡率差异不明显。

2.5 各组大鼠脑组织中 Bax、Bcl-2 表达

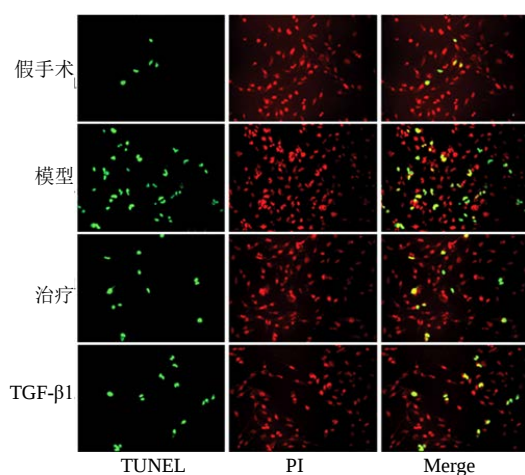
采用免疫组化和 Western blotting 检测各组大鼠脑组织相关凋亡蛋白的表达, 结果如图 5、6 所示。与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织中 Bax 的表达明显升高, Bcl-2 的表达明显降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组、TGF- $\beta 1$ 组大鼠脑组织的 Bax 的表达明显降低, Bcl-2 的表达明显升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗组和 TGF- $\beta 1$ 组相比, 大鼠脑组织中 Bax、Bcl-2 表达差异不明显。

2.6 Western blotting 检测各组大鼠脑组织中 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3 的蛋白表达水平

采用蛋白免疫印迹法检测各组大鼠脑组织中 TGF- $\beta 1$ /Smad3 信号通路相关蛋白的表达水平, 结果如图 7 所示。与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织的 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3 的蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组、TGF- $\beta 1$ 组大鼠脑组织的 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3 的蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 治疗组和 TGF- $\beta 1$ 组相比, 大鼠脑组织 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3 的蛋白表达差异不明显。

3 讨论

大脑负责调控机体的所有生理功能, 当缺血性脑卒中发生后, 神经元细胞损伤的级联信号将对脑组织造成进一步的损害, 包括氧化应激、氨基酸的毒性作用、钙离子超载等, 促成神经元细胞的凋亡, 使脑组织出现缺血性坏死, 临床表现为不省人事、猝然昏倒、言语及行动障碍、认知功能障碍等, 给

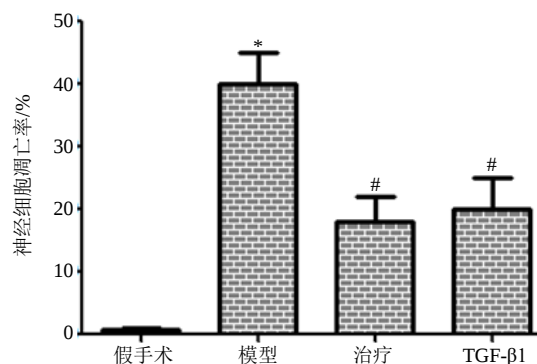


与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

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

图4 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织中的细胞凋亡

Fig. 4 Apoptosis in brain tissue of rats in each group measured by TUNEL staining



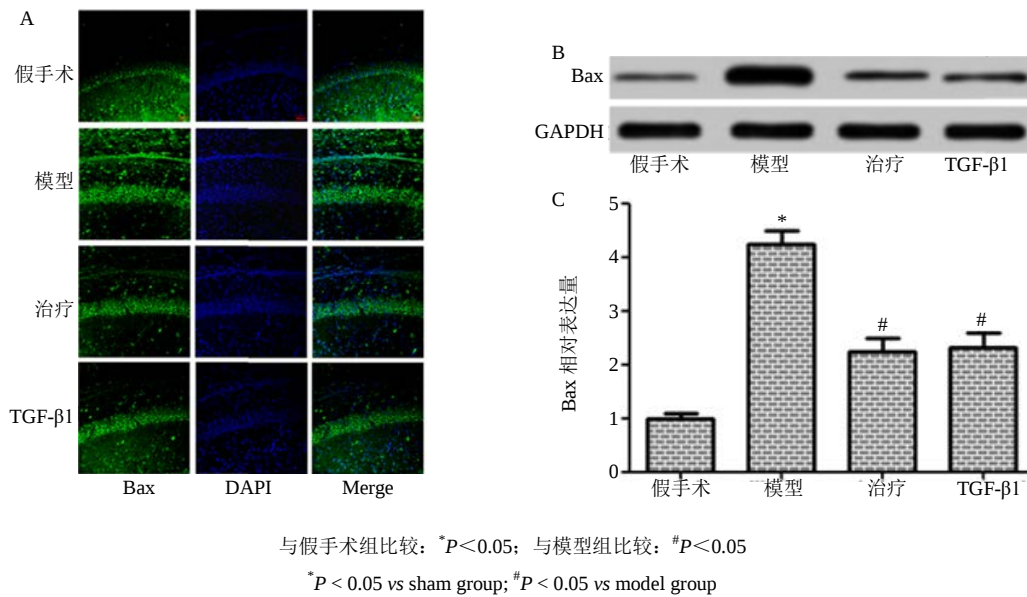


图 5 免疫组化法 (A) 和 Western blotting (B) 检测各组大鼠脑组织中 Bax 的表达及其差异 (C)

Fig. 5 Bax expression in rat brain tissue detected by immunohistochemistry (A), Western blotting (B), and its differences (C)

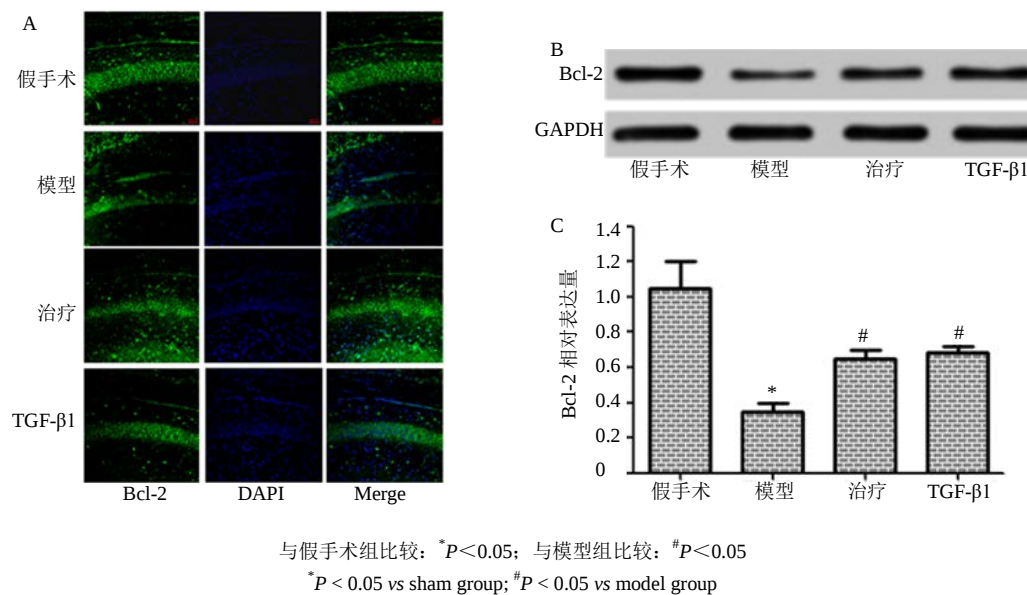


图 6 免疫组化法 (A) 和 Western blotting (B) 检测各组大鼠脑组织中 Bcl-2 的表达及其差异 (C)

Fig. 6 Bcl-2 expression in rat brain tissue detected by immunohistochemistry (A), Western blotting (B), and its differences (C)

患者、家庭及其社会带来极大的痛苦和沉重的负担。针对缺血性脑卒中后的神经保护开展有效的治疗已成为脑血管疾病的研究热点。

动物的脑组织处于血脑屏障严密的保护下。研究表明近 200 个药物在离体和细胞试验中表现出对神经元细胞良好的保护作用,但是在动物实验以及临床试验中很少药物能透过血脑屏障,直接对脑组织损伤部位进行靶点修复^[11]。Jiang 等^[12]研究发现脑室注射给药能明显增强缺血性脑卒中大鼠脑组

织对维生素 A 的吸收以及生物利用度。Corcelli 等^[13]研究证实,与 iv 相比,脑室注射给药途径能明显降低缺血性脑卒中大鼠脑组织神经元细胞的凋亡率,缓解动物造模后的疼痛。因此,本研究造模成功后采用脑室注射更能体现药物的治疗作用。

中医药因其治疗多靶点、效用精准、来源广泛、价格低廉、不良反应小的特点成为防治缺血性脑卒中的研究热点^[14]。近年来,红景天苷对脑血管的保护作用备受关注。作为素有“高原人参”“雪山仙草”

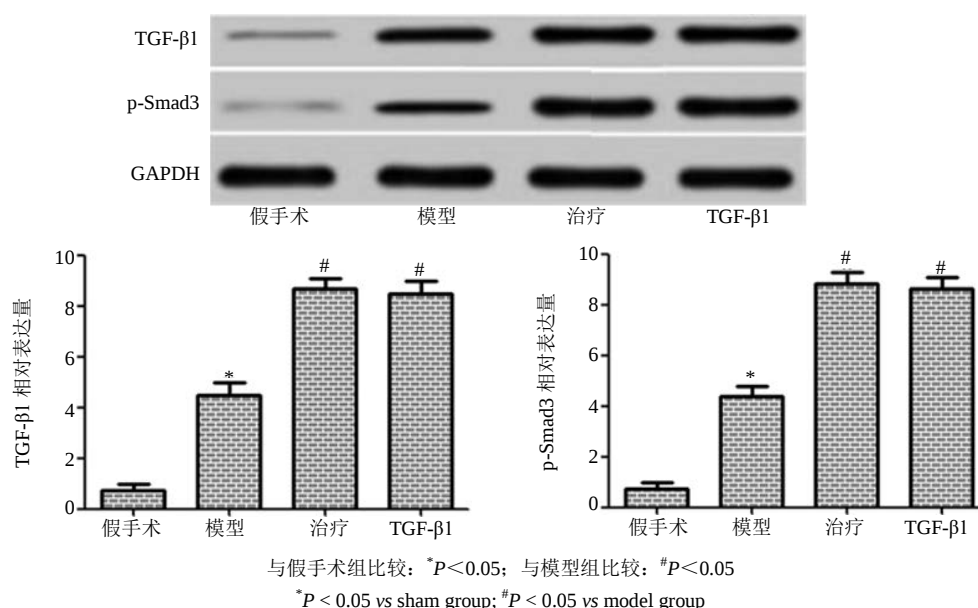


图7 Western blotting 检测各组大鼠脑组织中 TGF-β1、p-Smad3 的表达

Fig. 7 Expressions of TGF-1 and p-Smad3 in brain tissues of rat detected by Western blotting

之称的红景天的主要活性组分,红景天苷具有活血化瘀、扶正固本、理气养身以及健脑益智的功效。陆树萍等^[15]研究报道脑室注射红景天苷能抑制脑出血大鼠的神经元细胞的自噬凋亡,以发挥神经保护作用。作为生物机体内具有对抗作用的因子,促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 在细胞程序性凋亡线粒体途径中发挥关键的调控作用^[16]。龙艳芳等^[17]研究表明在大脑中动脉阻断模型大鼠中, Bcl-2/Bax 作为细胞凋亡的开关, Bcl-2/Bax 的值越大越利于神经元细胞的存活,反之, Bcl-2/Bax 的值减小时神经元细胞趋于凋亡。赖文芳等^[18]研究表明在大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤模型中,红景天苷能明显增强 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达。本研究表明,治疗组大鼠的组织损伤病理明显减轻,细胞凋亡率明显下降,大鼠脑组织中 Bax 的表达明显降低, Bcl-2 的表达明显升高 ($P < 0.05$)。与既往研究一致,再次证实了红景天苷对脑组织的神经保护作用。

寻找药物的作用通路,可为开展针对药物靶向位点的研究提供依据。大量研究表明^[19] TGF-β1/Smad3 信号通路在脑缺血后发挥抑制细胞凋亡、促进脑血管新生等生物效应来促进脑缺血后的神经功能恢复。Zhu 等^[20]研究表明 TGF-β1/Smad3 通路能够明显抑制缺血性脑卒中后大鼠脑组织的细胞凋亡。本研究采用脑室注射 TGF-β1 作为对照,与治疗组的结果差异不明显 ($P > 0.05$),推断红景天苷

对缺血性脑卒中的保护作用可能是通过激活 TGF-β1/Smad3 通路,增强 TGF-β1、p-Smad3 的表达实现的。

综上所述,红景天苷可通过激活缺血性脑卒中后的 TGF-β1/Smad3 信号通路,从而减轻神经功能损害,发挥对神经细胞的保护作用。但红景天苷是否还能通过调节其他信号通路发挥作用,以及如何将红景天苷用于临床治疗缺血性脑卒中,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Irvine H J, Ostwaldt A C, Bevers M B, et al. Reperfusion after ischemic stroke is associated with reduced brain edema [J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 2018, 38(10): 1807-1817.
- [2] Powers W J, Rabinstein A A, Ackerson T, et al. 2018 Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2018, 49(3): e46-e99.
- [3] Yu Y, Li J, Zhou H, et al. Functional importance of the TGF-β1/Smad3 signaling pathway in oxygen-glucose-deprived (OGD) microglia and rats with cerebral ischemia [J]. *Int J Biolo Macromol*, 2018, 116(9): 537-544.
- [4] Islam A, Choudhury M E, Kigami Y, et al. Sustained anti-inflammatory effects of TGF-β1 on microglia/macrophages [J]. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*,

- 2018, 1864(3): 721-734.
- [5] Kotlarz D, Marquardt B, Barøy T, *et al.* Human TGF- β 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(3): 344-348.
- [6] Caruso G, Fresta C G, Musso N, *et al.* Carnosine prevents A β -induced oxidative stress and inflammation in microglial cells: A key role of TGF- β 1 [J]. *Cells*, 2019, 8(1): 64-87.
- [7] Zhu L, Chen T, Chang X, *et al.* Salidroside ameliorates arthritis-induced brain cognition deficits by regulating Rho/ROCK/NF- κ B pathway [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 103(4): 134-142.
- [8] 韩 静, 张继州, 肖 庆, 等. 红景天苷促大鼠脑缺血再灌注脑组织的神经再生作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(10): 1015-1022.
- [9] Machi P, Costalat V, Lobotesis K, *et al.* Solitaire FR thrombectomy system: immediate results in 56 consecutive acute ischemic stroke patients [J]. *J Neurointerv Surg*, 2018, 10(1): 27-32.
- [10] Sposato L A, Cerasuolo J O, Cipriano L E, *et al.* Atrial fibrillation detected after stroke is related to a low risk of ischemic stroke recurrence [J]. *Neurology*, 2018, 90(11): 924-931.
- [11] 曲晓宇, 张月明, 张四喜, 等. 醒脑静注射液保护大鼠脑缺血-再灌注损伤及血脑屏障的作用研究 [J]. 中药材, 2018, 41(9): 2196-2200.
- [12] Jiang W, Guo M, Gong M, *et al.* Vitamin A bio-modulates apoptosis via the mitochondrial pathway after hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1): 14-17.
- [13] Corcelli M, Hawkins K, Vlahova F, *et al.* Neuroprotection of the hypoxic-ischemic mouse brain by human CD117⁺CD90⁺CD105⁺ amniotic fluid stem cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2425-2435.
- [14] 陈岚榕, 王林林, 陈 松, 等. 艾灸曲池、合谷穴结合康复训练对脑梗死恢复期患者上肢功能障碍恢复疗效的回顾性分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5652-5655.
- [15] 陆树萍, 丁红生. 红景天苷经自噬途径减少脑出血后继发神经损伤的的机制探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 12(4): 814-818.
- [16] Sposato L A, Cerasuolo J O, Cipriano L E, *et al.* Atrial fibrillation detected after stroke is related to a low risk of ischemic stroke recurrence [J]. *Neurology*, 2018, 90(11): 924-931.
- [17] 龙艳芳, 王新蕾, 王明璞, 等. 雄激素干预成年雄性大脑中动脉阻断模型大鼠脑组织 Bcl-2、Bax 与 Cyt-C 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27): 4344-4349.
- [18] 赖文芳, 张小琴, 洪海棉, 等. 红景天苷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2015, 3(6): 775-779.
- [19] 周林甫, 石亚军, 焦亚楠, 等. 红景天苷对大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤的保护作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(5): 41-46.
- [20] Zhu H, Gui Q, Hui X, *et al.* TGF- β 1/Smad3 signaling pathway suppresses cell apoptosis in cerebral ischemic stroke rats [J]. *Med Sci Monitor: Int Med J Exp Clin Res*, 2017, 23(4): 366-377.