槐定碱对永久性大脑中动脉栓塞大鼠脑细胞的作用及机制研究

薛玉梅[1]，李献军[1]，孟　岩[2]，宋　哲[1]，刘惠钦[1]，李晓兵[2*]

1. 石家庄市人民医院 神经内科，河北 石家庄　050027
2. 石家庄市人民医院 药学部，河北 石家庄　050027

摘　要：目的　探究槐定碱对永久性大脑中动脉栓塞（permanent middle cerebral artery occlusion，pMCAO）大鼠脑细胞的作用及机制。**方法**　SD 大鼠随机分为对照组、模型组和槐定碱低、中、高剂量（2.5、5.0、10.0 mg/kg）组，给予槐定碱 5 d 后，建立 pMCAO 大鼠模型。考察槐定碱对 pMCAO 大鼠神经功能评分的影响；考察槐定碱对 pMCAO 大鼠脑梗死率的影响；采用流式细胞术检测各组大鼠缺血半暗带区细胞凋亡率；采用苏木素-伊红（HE）染色法观察各组大鼠脑组织病理变化；采用 Western blotting 法考察各组大鼠脑组织 B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）蛋白表达情况。**结果**　与模型组比较，槐定碱组大鼠神经缺陷症状改善，脑梗死率显著降低（P＜0.05、0.01），缺血半暗带细胞凋亡率明显降低（P＜0.05、0.01），脑组织损伤有所改善，脑组织 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低（P＜0.05、0.01），Bcl-2 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05、0.01）。**结论**　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑细胞具有保护作用，其机制可能与上调 Bcl-2 及下调 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平，进而抑制细胞凋亡有关。

关键词：槐定碱；永久性大脑中动脉栓塞；脑细胞凋亡；Bcl-2；Bax；Caspase-3

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2021)11 - 3306 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.018

Mechanism of sophoridine on cerebral cell in rats with permanent middle cerebral artery occlusion

XUE Yu-mei[1], LI Xian-jun[1], MENG Yan[2], SONG Zhe[1], LIU Hui-qin[1], LI Xiao-bing[2]

1. Department of Neurology, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang 050027, China
2. Department of Pharmacy, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang 050027, China

Abstract: Objective　To explore the effect and mechanism of sophoridine on brain cells in rats with permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). **Methods**　SD rats were randomly divided into control group, model group, low-, medium- and high-dose (2.5, 5.0, 10.0 mg/kg) sophoridine groups. After ip sophoridine for 5 d, pMCAO rat model was established. Effect of sophoridine on neurological function score in pMCAO rats were investigated; Effect of sophoridine on cerebral infarction rate in pMCAO rats were investigated; Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate in ischemic penumbra of rats in each group; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes in brain tissue of rats in each group; Western blotting was used to investigate expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and Caspase-3 in brain tissue of rats. **Results**　Compared with model group, neurological deficit symptoms of rats in sophoridine group were improved, cerebral infarction rate was significantly reduced (P < 0.05, 0.01), cell apoptosis rate in ischemic penumbra was significantly reduced (P < 0.05, 0.01), tissue damage was improved, expressions of Caspase-3 and Bax in brain tissue were significantly reduced (P < 0.05, 0.01), and Bcl-2 expression was significantly increased (P < 0.05, 0.01). **Conclusion**　Sophoridine has a protective effect on brain cells in pMCAO rats, its mechanism may be related to up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax and Caspase-3 expressions, thereby inhibiting cell apoptosis.

Key words: sophoridine; permanent middle cerebral artery occlusion; cerebral cell apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-3

收稿日期：2021-01-12

基金项目：石家庄市科学技术研究与发展指导计划项目（161460713）

作者简介：薛玉梅，女，主治医师，从事脑血管疾病基础与临床研究。E-mail: 3165078182 @qq.com

***通信作者：**李晓兵，男，副主任药师，从事心脑血管药理学研究。Tel: (0311)86907320　E-mail: 963685787@qq.com

脑梗死是临床中常见的脑血管疾病，组织缺血缺氧导致坏死或软化，严重危害人类的生命。细胞凋亡是脑梗死引起神经损伤的重要机制之一，缺血缺氧下凋亡相关信号通路激活，引起神经细胞凋亡，脑梗死灶体积和神经功能缺损严重程度与细胞凋亡程度呈正相关[1]。槐定碱是从豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.中提取分离的单体生物碱，具有抑制炎性因子分泌、抗氧化、抗癌、保护心脑血管等作用[2-3]。槐定碱能够通过下调肿瘤坏死因子受体相关因子 6（tumor necrosis factor receptorassociated factor6，TRAF6）、上调磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2（extracellular regulated kinase 1/2，p-ERK1/2）表达，从而减轻大鼠脑损伤和脑水肿程度[4]。本课题组前期研究表明，槐定碱能够抑制氧化应激和炎性反应，对局灶性脑缺血大鼠具有神经保护作用[5]。本研究探究槐定碱对永久性大脑中动脉栓塞（permanent middle cerebral artery occlusion，pMCAO）大鼠脑细胞凋亡的影响，为槐定碱的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 70 只，雌雄各半，8 周龄，体质量 240～275 g，购自宁夏医科大学实验动物中心，动物许可证号 SYXK（宁）20100001。动物于温度（24±1）℃、湿度 50%～70%的环境中适应性饲养 1 周，自由进食饮水。动物实验经石家庄市人民医院伦理委员会批准（批准号 2016017）。

1.2 药品与试剂

槐定碱（质量分数＞98%，批号 960324）购自宁夏药物研究所；BCA 蛋白定量试剂盒、Annexin V-FITC/碘化丙啶（PI）细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司；2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）溶液（批号 T8170）购自北京索莱宝科技有限公司；兔源 B 淋巴细胞瘤 2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）抗体（批号 sc-492）购自美国 Santa Cruz 公司；兔源 Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（批号 2772s）、兔源半胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）抗体（批号 9662s）、β-actin 抗体（批号 4970s）、HRP 标记的山羊抗兔抗体购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

PAC 1000 电泳仪、FACSCanto 流式细胞仪、GelDoc XR＋凝胶成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；TS-8S 型双层脱色摇床（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；JY92-IID 型超声波细胞破碎机（南京贝帝实验仪器有限公司）。

2 方法

2.1 分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组及槐定碱低、中、高剂量（2.5、5.0、10.0 mg/kg）组[4]，每组 14 只。槐定碱溶于 0.9%氯化钠溶液，分别配制成质量浓度为 2.5、5.0、10.0 mg/mL 的溶液。各给药组 ip 相应溶液（1 mL/kg），对照组和模型组 ip 等体积 0.9%氯化钠溶液，1 次/d，连续 5 d。末次给药后，模型组和各给药组立即制备 pMCAO 模型。

2.2 pMCAO 模型的制备

采用 Longa 改良线栓法[6]建立大鼠 pMCAO 模型，大鼠 ip 20%乌拉坦（6 mL/kg）麻醉后，于颈部正中切口并进行动脉分离，结扎右侧颈总动脉近心端，在颈内动脉下方穿线备用；在右侧颈总动脉距离分叉约 4 mm 处剪口，将栓线经过颈内动脉插入大脑中动脉起始端（栓线最远端距分叉处 18～20 mm），阻断大脑中动脉供血；结扎颈内动脉固定拴线，记录时间作为大脑局灶性缺血开始的时间，线栓阻断血流 24 h。对照组仅进行动脉分离，不插线。

2.3 槐定碱对 pMCAO 大鼠神经功能评分的影响

术后大鼠进行神经行为症状评分，判定神经功能损伤程度[6]。评分标准：0 分为大鼠无神经功能缺失症状；1 分为大鼠梗死对侧前爪内收、不能伸展对侧前肢；2 分为大鼠前肢屈曲对侧抵抗推力下降，行走时向偏瘫侧旋转；3 分为大鼠行走时向偏瘫侧倾倒；4 分为大鼠不能自发行走，意识丧失。

2.4 槐定碱对 pMCAO 大鼠脑梗死率的影响

术后各组随机选取 5 只大鼠，断头处死，取脑，去掉嗅球、小脑和低位脑干，以 2 mm 为间隔行脑组织冠状切片，于 2% TTC 染液中避光孵育 30 min，于 4%多聚甲醛溶液中固定 1 h，拍照并观察梗死情况，红色区域为正常脑组织，白色区域为梗死病变的脑组织，采用 Image J 软件计算脑梗死率[7]。

脑梗死率＝脑梗死体积/全脑体积

2.5 槐定碱对 pMCAO 大鼠缺血半暗带区细胞凋亡的影响

大鼠 ip 20%乌拉坦麻醉，打开胸腔，用 200 mL 4%多聚甲醛进行心脏灌注。大鼠断头处死，取 60 mg 大脑缺血半暗带区组织，即右侧大脑半球距离嗅球尖端 7～11 mm 额顶皮质上部，制成单细胞悬液，调整细胞密度至 1×10^9/L，2000 r/min 离心 5 min，

弃上清，细胞沉淀加入 5 μL Annexin V-FITC 和 PI，避光孵育，再加入 490 μL 1×Binding Buffer，采用流式细胞仪于 1 h 内检测细胞凋亡情况[8]。

2.6　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑组织病理变化的影响

大鼠断头取脑，取缺血部位脑组织，于 4%多聚甲醛溶液中固定，梯度乙醇脱水、无水乙醇及二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋后切片（厚 5 μm），冠状切片贴于载玻片上，于 4 ℃保存；石蜡切片经脱蜡、染色、脱水、透明后，中性树脂封片，于显微镜下观察脑组织病理变化。

2.7　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

取大鼠缺血部位脑组织，于液氮中研碎，加入裂解液提取总蛋白，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h，分别加入 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 β-actin 抗体（1∶1000），4 ℃孵育过夜；加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体室温孵育 2 h，加入 ECL 试剂显影，采用 Quantity One 软件分析。

2.8　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，多组间均数比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），两两之间比较采用最小显著差数法。

3　结果

3.1　槐定碱对 pMCAO 大鼠神经功能评分的影响

如表 1 所示，对照组大鼠神经功能正常，模型组大鼠出现缺血对侧前肢不能伸直、转圈等不同程度的神经缺陷症状。与模型组相比，各给药组大鼠神经缺陷症状得到改善。

3.2　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑梗死率的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠脑梗死率显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，槐定碱中、高剂量组大鼠脑梗死率显著降低（$P<0.05$、0.01）。

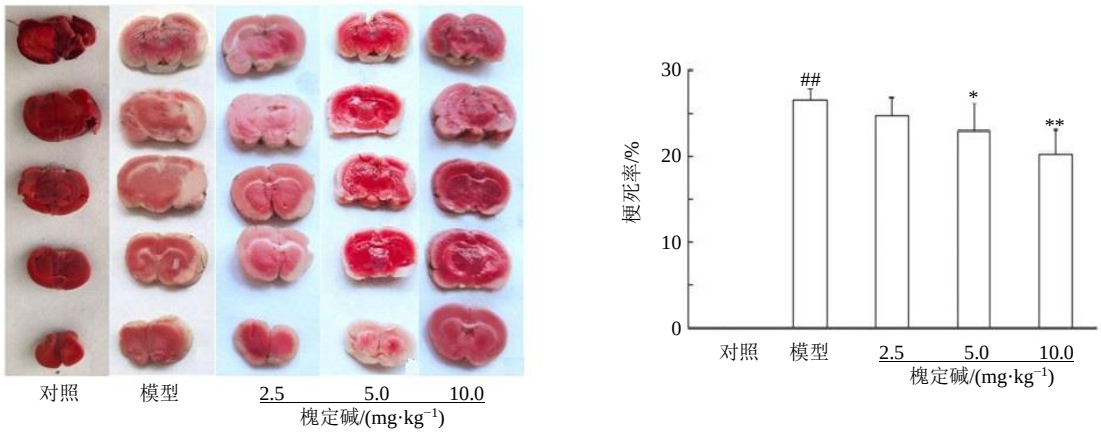
3.3　槐定碱对 pMCAO 大鼠缺血半暗带区细胞凋亡的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠缺血半暗带细胞凋亡率明显升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠缺血半暗带细胞凋亡率明显降低（$P<0.05$、0.01）。

表 1　槐定碱对 pMCAO 大鼠神经功能评分的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 14$）

Table 1　Effect of sophoridine on neurological score in pMCAO rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	神经功能评分				
		0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
对照	—	14	0	0	0	0
模型	—	0	0	3	8	3
槐定碱	2.5	0	1	6	7	0
	5.0	0	1	9	4	0
	10.0	0	3	9	2	0



与对照组比较：$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$，下同

$^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$ *vs* model group, same as belows

图 1　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑梗死率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

Fig. 1　Effect of sophoridine on cerebral infarction rate in pMCAO rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

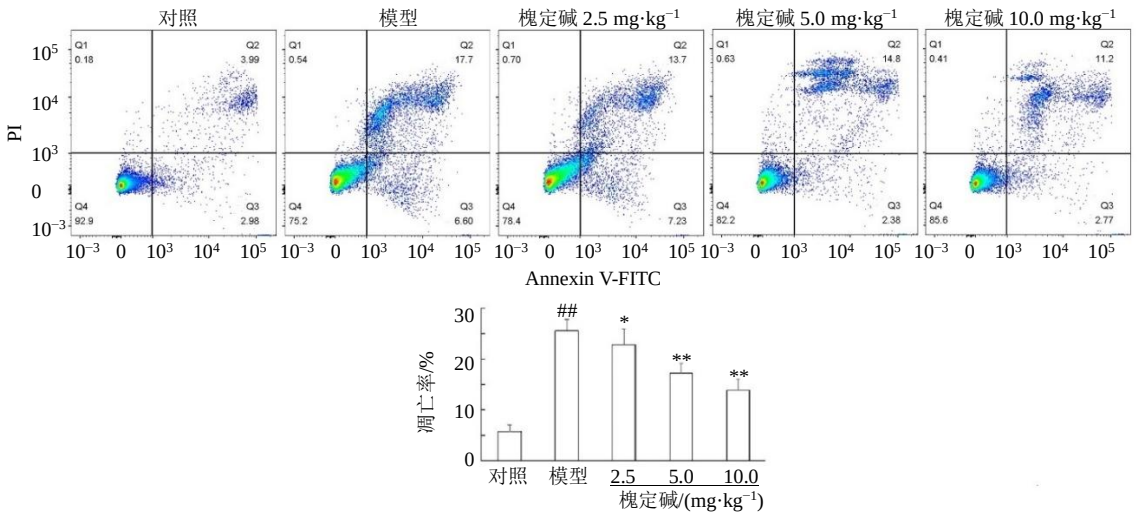


图 2　槐定碱对 pMCAO 大鼠缺血半暗带区细胞凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$, n = 9）

Fig. 2　Effect of sophoridine on apoptosis of ischemic penumbra in pMCAO rats ($\bar{x} \pm s$, n = 9)

3.4　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑组织病理变化的影响

如图 3 所示，对照组大鼠大脑皮质结构完整，神经细胞排列及形态正常，胞膜完整，胞质丰富，核仁清楚；模型组大鼠大脑皮质广泛水肿，细胞排列紊乱，胞质空泡样变，部分核固缩，核仁消失，神经元数目明显减少，间质血管扩张充血，炎性细胞浸润；与模型组相比，各给药组大鼠脑组织水肿减轻，神经细胞形态有所改善，核固缩和核溶解程度减轻，细胞凋亡与坏死减少，神经元数目增加。

3.5　槐定碱对大鼠 pMCAO 脑组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01），Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05、0.01），Bax 蛋白表达水平

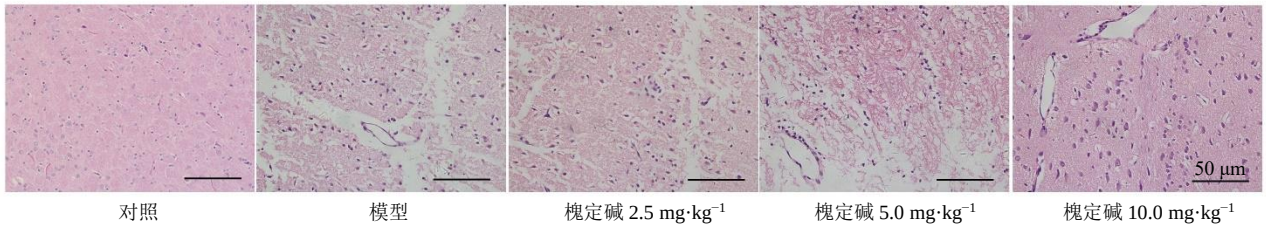


图 3　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑组织病理变化的影响

Fig. 3　Effect of sophoridine on pathological changes of brain tissue in pMCAO rats

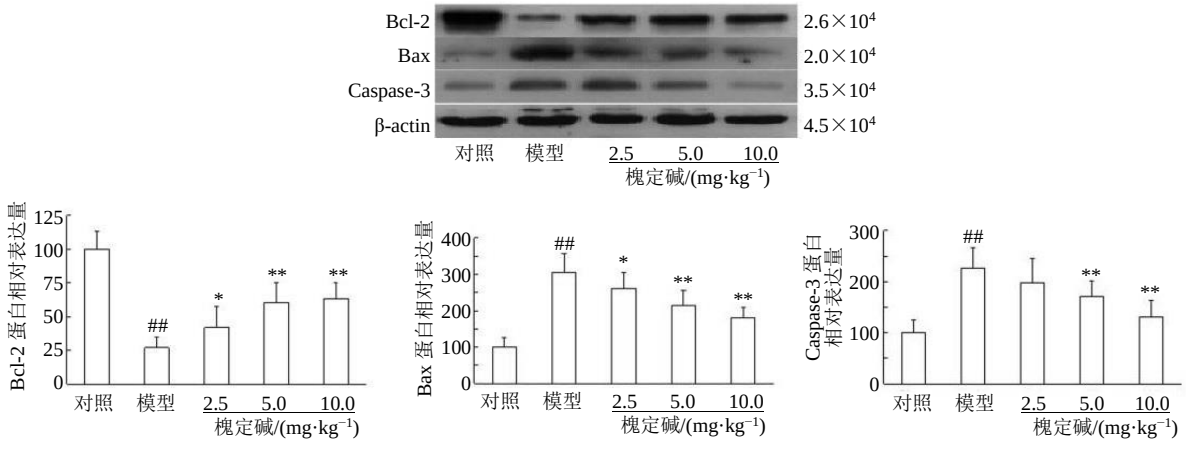


图 4　槐定碱对 pMCAO 大鼠脑组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$, n = 9）

Fig. 4　Effect of sophoridine on expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in brain tissue of pMCAO rats ($\bar{x} \pm s$, n = 9)

显著降低（P＜0.05、0.01），槐定碱中、高剂量组 Caspase-3 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01）。

4 讨论

缺血性脑卒中是临床上常见且多发的疾病，其病理过程涉及脑组织能量代谢障碍、神经细胞内钙超载、氧化应激损伤、炎性反应、细胞凋亡等多个环节，其中神经细胞凋亡是脑缺血损伤的重要环节[9]。脑细胞缺血缺氧后，脑梗死区域与正常脑组织间存在以细胞凋亡为主的缺血半暗带区，通过调节该区域神经细胞的凋亡，能够有效减少神经细胞坏死数量和梗死区域面积，减轻神经功能损伤[10]。因此，及时、有效地阻止脑缺血后神经细胞凋亡，对减轻脑缺血损伤尤为重要。研究发现，中药能够通过调节线粒体凋亡途径抑制细胞凋亡，从而发挥脑神经保护作用[11]。课题组前期研究发现，槐定碱对局灶性脑缺血大鼠模型具有神经保护作用。

Bcl-2 家族蛋白在线粒体介导的细胞凋亡中发挥着关键性作用，能够通过控制线粒体膜的通透性，影响凋亡相关因子的释放，进而调控细胞凋亡[12]。由线粒体释放的细胞色素 C（cytochrome C，CytC）与凋亡蛋白酶激活因子-1（apoptotic protease activating factor 1，Apaf-1）结合形成凋亡小体，进而促进 Caspase 前体活化，启动 Caspase 级联反应[13]。Caspase 家族是细胞凋亡的效应器，能够引发细胞骨架重排、DNA 断裂等细胞生化和形态学的改变，Caspase-3 是 Caspase 级联反应下游最关键的凋亡执行蛋白酶，Caspase-3 的活化可引起细胞凋亡[14]。Bax 为促凋亡蛋白，能够增加线粒体外膜通透性，促进凋亡相关因子的释放；Bcl-2 为抗凋亡蛋白，通过与 Bax 形成异源二聚体，抑制 Bax 的促凋亡作用[15]。研究发现，急性脑梗死患者血清中 Bcl-2 表达明显下降[12]。Bcl-2 与 Bax 之间的平衡维持着细胞凋亡的稳态，脑缺血后 Bcl-2/Bax 下降，Caspase-3 被激活，进而导致凋亡的发生[16]。

本研究结果显示，脑缺血 24 h 后大鼠神经功能缺陷症状明显且细胞凋亡率显著增加，槐定碱能够明显改善 pMCAO 大鼠的神经功能症状，减小脑梗死率，降低缺血半暗带处细胞的凋亡率，减轻 pMCAO 大鼠病理性损伤，维持细胞的正常形态，抑制神经细胞凋亡和坏死。大鼠局灶性脑缺血后神经细胞的死亡可能与 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 凋亡途径的激活有关，本研究发现，槐定碱能够抑制 pMCAO 大鼠脑组织 Bax 的上调和 Bcl-2 的下调，维持 Bcl-2 与 Bax 之间的平衡，从而抑制 Caspase-3 的上调，从而抑制脑缺血后神经细胞凋亡。

综上，槐定碱能够通过改善脑细胞凋亡情况、减轻 pMCAO 大鼠神经损伤程度，从而发挥神经保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张海燕, 杨磊. 脑梗死患者 MRI 病灶体积与神经损害、氧化应激反应、细胞凋亡程度的相关性 [J]. 海南医学院学报, 2018, 24(3): 405-408.

[2] 抗晶晶, 刘晓宁. 槐定碱和氧化槐定碱对心脑血管疾病药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 794-798.

[3] Ur Rashid H, Rasool S, Ali Y, *et al*. Anti-cancer potential of sophoridine and its derivatives: Recent progress and future perspectives [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103863.

[4] Liu Z J, He D, Zhang X J, *et al*. Neuroprotective effect of early and short-time applying sophoridine in pMCAO rat brain: Down-regulated TRAF6 and up-regulated p-ERK1/2 expression, ameliorated brain infaction and edema [J]. *Brain Res Bull*, 2012, 88(4): 379-384.

[5] 薛玉梅, 李晓兵, 薛占苍, 等. 槐定碱对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(15): 2250-2253.

[6] 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.

[7] Nematipour S, Vahidinia Z, Nejati M, *et al*. Estrogen and progesterone attenuate glutamate neurotoxicity via regulation of EAAT3 and GLT-1 in a rat model of ischemic stroke [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(10): 1346-1352.

[8] 朱红灿, 孙圣刚, 李红戈, 等. 3-硝基丙酸预处理对大鼠局灶性脑缺血 caspase-3 活性和神经细胞凋亡的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23(5): 328-331.

[9] 刘小军, 吴开毅, 刘南午, 等. 巴曲酶注射液联合丁苯酞注射液治疗急性进展性脑梗死的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(15): 1751-1754.

[10] Saito T, Hayashi K, Nakazawa H, *et al*. Clinical characteristics and lesions responsible for swallowing hesitation after acute cerebral infarction [J]. *Dysphagia*, 2016, 31(4): 567-573.

[11] 魏霞, 祝清芬, 王海苹, 等. 珍龙醒脑胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1791-1796.

[12] Cheng C Y, Tang N Y, Kao S T, *et al*. Ferulic acid administered at various time points protects against

cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/bcl-2 anti-apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155748.

[13] 张红艳, 翟丽, 王婷婷, 等. 胡黄连苷 II 通过抑制 cyto C/caspase-9/caspase-3 通路发挥神经保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(5): 668-674.

[14] 应夏丽, 钟晓明, 徐慕蝶, 等. 哈巴苷对急性脑缺血小鼠神经保护作用及线粒体保护机制的研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(12): 1026-1031.

[15] 蔡静, 黄文静, 刘时喜, 等. 基于 TGF-β1/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 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6294-6301.

[16] Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, *et al*. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation [J]. *J Physiol Sci*, 2015, 65(5): 435-443.

[责任编辑 李亚楠]