

• 药理与临床 •

基于 MAPK 信号通路研究脑震宁对三重脑震荡模型大鼠海马神经元损伤的影响

王 钱^{1,2}, 谭贝西², 冯 忆², 王恬恬², 赵 乐², 王永辉², 周 然^{1*}

1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

2. 山西中医药大学, 山西 晋中 030600

摘要:目的 研究脑震宁对三重脑震荡模型 (multiple cerebral concussion, MCC) 大鼠海马神经元损伤的影响及其机制。方法 采用自由落体法制备 MCC 大鼠模型, 将造模成功的大鼠随机分为吡拉西坦 (0.16 g/kg) 组和脑震宁低、中、高剂量 (6.68、13.36、26.73 g/kg) 组, 各给药组 ig 相应药物, 2 次/d, 连续给药 14 d。造模前后进行水迷宫平台实验, 观察大鼠学习记忆能力变化; 采用 ELISA 法检测大鼠血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 水平, WST-1 法检测血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 硫代巴比妥酸法检测血清丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; qRT-PCR 法检测大鼠海马组织 p38、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) mRNA 表达; Western blotting 法检测大鼠海马组织 p38、p-p38、ERK、p-ERK、JNK 和 p-JNK 蛋白表达; 采用苏木素-伊红 (HE)、尼氏体染色以及透射电镜 (TEM) 法分别观察大鼠海马神经元病理、尼氏体及超微结构的变化。结果 与对照组相比, 模型组大鼠逃避潜伏时间增加 ($P < 0.01$), 固定象限停留时间百分比减少 ($P < 0.01$); 血清中 IL-1 β 、IL-6 和 MDA 水平升高 ($P < 0.05$ 、0.01), SOD 活性下降 ($P < 0.01$); 海马组织 p38、JNK 和 ERK mRNA 表达水平平均升高 ($P < 0.01$); 海马组织 p38、p-p38、JNK、p-JNK、ERK 和 p-ERK 蛋白表达水平平均升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组相比, 脑震宁组大鼠逃避潜伏时间减少 ($P < 0.05$ 、0.01), 固定象限停留时间百分比增加 ($P < 0.05$ 、0.01); 血清中 IL-1 β 、IL-6、MDA 水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01), SOD 活性升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 海马组织 p38、JNK 和 ERK mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 脑震宁各剂量组海马组织 p38、p-p38 和 p-ERK 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), 脑震宁低、中剂量组 JNK 和 ERK 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 脑震宁中、高剂量组 p-JNK 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。HE、尼氏染色结果显示, 模型组神经元排列稀疏, 数量减少, 部分细胞核消失或核仁破裂, 胞质内混浊, 尼氏体颜色变浅; 脑震宁组大部分神经元细胞形态较完整, 核大而圆, 着色浅, 部分细胞出现核仁消失, 尼氏体颜色增加。TEM 结果显示, 模型组神经元细胞体积缩小, 核仁破裂分散, 微丝排列紊乱, 板层崩解、断裂甚至消失; 脑震宁组神经元细胞核大, 核膜完整, 核仁偏移, 线粒体内嵴结构清晰, 微丝排列较模型组整齐, 部分崩解。结论 脑震宁可能通过影响丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的激活改善 MCC 模型大鼠海马神经元损伤。

关键词: 脑震宁; 丝裂原活化蛋白激酶; 神经元; 三重脑震荡模型; 炎症; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)12-3670-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.012

Effect of Naozhenning on hippocampal neuron injury in multiple cerebral concussion rats model based on MAPK signaling pathway

WANG Qian^{1,2}, TAN Bei-xi², FEN Yi², WANG Tian-tian², ZHAO Le², WANG Yong-hui², ZHOU Ran¹

1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030600, China

收稿日期: 2021-12-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8210151374); 山西省卫生健康委员会科研项目 (2021041); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项” (2020PY-JC-13)

作者简介: 王 钱, 博士研究生, 从事方剂效用及其物质基础研究。Tel: 18830160121 E-mail: 790965803@qq.com

*通信作者: 周 然, 博士生导师, 从事方剂效用及其物质基础研究。Tel: 18636117158 E-mail: wyh766188@sina.com

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of Naozhenning (脑震宁) on hippocampal neuron injury in multiple cerebral concussion (MCC) model rats. **Methods** Free fall method was processed to establish MCC models, MCC rats were randomly divided into piracetam (0.16 g/kg) group and low-, medium-, high-dose Naozhenning (6.68, 13.36, 26.73 g/kg) groups, each administration group was ig given corresponding drugs, twice a day for 14 d. Water maze platform experiment was carried out before and after modeling to observe the changes of learning and memory ability of rats; Levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in serum of rats were detected by ELISA; Superoxide dismutase (SOD) content was detected by WST-1 method; Malondialdehyde (MDA) content was detected by thiobarbituric acid method; mRNA expressions of *p38*, extracellular regulated protein kinases (*ERK*) and c-Jun *N*-terminal kinase (*JNK*) in hippocampus were detected by qRT-PCR; *p38*, *p-p38*, *ERK*, *p-ERK*, *JNK* and *p-JNK* protein expressions in hippocampus were detected by Western blotting; HE, Nissl staining and transmission electron microscopy were used to observe the changes of pathology, Nissl body and ultrastructure of hippocampal neurons. **Results** Compared with control group, escape latency in model group was increased ($P < 0.01$), percentage of residence time in fixed quadrant was decreased ($P < 0.01$); IL-1 β , IL-6 and MDA levels in serum were increased ($P < 0.05, 0.01$), SOD activity was decreased ($P < 0.01$); mRNA expressions of *p38*, *JNK* and *ERK* in hippocampus were increased ($P < 0.01$); *p38*, *p-p38*, *JNK*, *p-JNK*, *ERK* and *p-ERK* protein expressions in hippocampus were increased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, escape latency of rats in Naozhenning groups was decreased ($P < 0.05, 0.01$), percentage of fixed quadrant residence time was increased ($P < 0.05, 0.01$); IL-1 β , IL-6 and MDA levels were decreased ($P < 0.05, 0.01$), SOD activity was increased ($P < 0.01, 0.001$); mRNA expressions of *p38*, *JNK* and *ERK* in hippocampus were decreased ($P < 0.05, 0.01$); *p38*, *p-p38* and *p-ERK* protein expressions of hippocampus in Naozhenning groups were decreased ($P < 0.01$), *JNK* and *ERK* protein expressions were decreased in Naozhenning low- and medium-dose groups ($P < 0.05$), *p-JNK* protein expression was increased in Naozhenning medium- and high-dose groups ($P < 0.01$). The results of HE and Nissl staining showed that neurons in model group were sparse, numbers of neurons were decreased, some nuclei disappeared or nucleoli ruptured, cytoplasm was turbid, and Nissl body color became lighter; Most neurons in Naozhenning groups had complete morphology, large and round nuclei, light staining, disappearance of nucleoli in some cells and increase of Nissl body color. The results of electron microscope showed that volume of neurons in model group was decreased, nucleoli broke and dispersed, microtubules and microfilaments disintegrated, broke or even disappeared; In Naozhenning groups, nucleus were large, nuclear membrane were complete, nucleolus were offset, cristae structure in mitochondria were clear, microtubules and microfilaments were arranged orderly and partially depolymerized. **Conclusion** Naozhenning may improve the injury of hippocampal neurons in MCC rats model by inhibiting the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.

Key words: Naozhenning; mitogen-activated protein kinase; neuron; multiple cerebral concussion model; inflammation; oxidative stress

脑震荡是在应力刺激下产生的神经胶质细胞功能异常表达和血管通透性增加,进而导致神经元轴突损伤和胞体破裂等病理变化的一种轻度颅脑损伤。接触性体育运动是普通人群遭受脑震荡的主要原因之一^[1-2]。随着脑震荡发病人数的增加及其后遗症和对血管性痴呆^[3]、帕金森^[4]等疾病潜在作用的暴露,近年来对脑震荡发病机制及治疗的研究受到众多学者的关注。

脑震宁由当归、丹参、川芎、地龙、地黄、牡丹皮、炒酸枣仁、柏子仁、陈皮、茯苓、竹茹组成,具有凉血活血、化瘀通络、益血安神、宁心定智、除烦止呕的功效,是经多年临床实践研制出的山西首批名药。临床研究证实,脑震宁对脑外伤和颅内血肿以及脑震荡后出现的头痛、头晕及健忘、失眠等症状有良好的缓解作用^[5]。网络药理学提示脑震宁可作用于活性氧的生物合成以及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、

Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (Janus kinase/signal transducer and activator of tran-ions, JAK/STAT) 等信号转导通路^[6]。MAPK 通路在细胞内信号转导和细胞分化、增殖和凋亡中发挥重要作用。因此本研究以 MAPK 信号通路为出发点,研究脑震宁对三重脑震荡 (multiple cerebral concussion, MCC) 模型大鼠海马神经元损伤的影响及机制,为脑震宁治疗脑震荡的临床使用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体质量 (250 $\pm$ 10) g,由北京维通利华有限公司提供,合格证号 NO.110011210106224553。动物房于温度 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度 50%~60%环境下饲养,自然昼夜节律,自由进食饮水,保持室内安静。动物实验获得山西中医药大学实验动物伦理委员会批准,严格执行伦理委员会要求,审查编号为 2021DW031。

1.2 药材

脑震宁主要由地黄、牡丹皮、当归、丹参、川芎、炒酸枣仁、柏子仁、陈皮、竹茹、茯苓、地龙等组成, 药物比例为 8:6:8:15:6:10:10:10:10:10:6, 以上药材均购自山西省晋中市同仁堂有限公司, 经山西中医药大学王永辉教授鉴定分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根(批号 201202)、川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎(批号 201001)、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 干燥块根(批号 200801)、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮(批号 201101)、钜蚓科环毛属参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥虫体(批号 201001)、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎(批号 210501)、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核(批号 210301)、芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮(批号 201201)、鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子(批号 200401)、禾本科植物淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 的茎秆的干燥中间层(批号 201001)、柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥成熟种仁(批号 201201), 均符合《中国药典》2020 年版要求。

1.3 药品与试剂

吡拉西坦片(批号 6190608)购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 试剂盒购自 Bioswamp 公司, 批号为 20210810; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 20211030)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 20211110)购自南京建成生物工程研究所; p38 抗体(批号 T55600F)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抗体(批号 GB112329)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)抗体(批号 T40071S)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 磷酸化 p38(phosphorylated p38, p-p38)抗体(批号 BJ2147044)购自 Bioss 公司; HRP 标记的山羊抗兔抗体(批号 GR3358778-6)、p-JNK 抗体(批号 GR3323833-2)、p-ERK 抗体(批号 GR3368531-3)购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体(批号 F813AA0021)购自上海生工生物工程有限公司; 异氟烷(批号 21061901)购自 RWD 公司。

1.4 仪器

EPOCH2NS 型酶标仪(美国 BioTek 公司); KDC-160HR 型台式高速冷冻离心机(安徽中佳公司); ImageQuant LAS 型灰度分析软件(Alpha Innotech 公司); ImageQuant LAS 500 型化学发光仪(Alpha Innotech 公司); HT7800 型透射电子显微镜(TEM, 日立公司); R50 型呼吸麻醉机(RWD 公司); 自制击打仪。

2 方法

2.1 脑震宁水煎剂的制备

脑震宁成人临床用量为 2 剂/d, 约合生药 148.5 g/d, 大鼠给药剂量参考《药理实验方法学》^[7], 按人和动物体表面积折算, 低、中、高剂量分别设定为 6.68、13.36、26.73 g/kg, 分别相当于临床剂量的 1.24、2.47、4.95 倍。称取脑震宁组方中的药材, 加入 10 倍体积水浸泡 1 h, 煎煮 1 h, 纱布滤过, 随后加入 8 倍体积水继续煎煮 1 h, 合并 2 次滤液, 分别浓缩成含生药量 0.668、1.336、2.673 g/mL 的溶液, 经 Q-Orbitrap 高分辨液质联用测定水煎剂中主要含丹酚酸 B 7.32 mg/mL、柚皮苷 3.29 mg/mL、没食子酸 2.48 mg/mL、阿魏酸 1.67 mg/mL、芍药苷 0.82 mg/mL、地黄苷 0.15 mg/mL、绿原酸 17.11 μ g/mL、酸枣仁皂苷 A 11.23 μ g/mL、咖啡酸 5.01 μ g/mL、斯皮诺素 0.97 μ g/mL。

2.2 造模、分组及给药

实验动物按数字表法随机分为对照组和造模组, 造模组大鼠每 24 小时使用砵码自由落体撞击大鼠额颞叶部^[8], 致单纯性脑震荡(cerebral concussion, CC)^[9], 连续撞击 3 d 复制 MCC 大鼠模型。期间如果任何 1 次撞击造成非单纯性脑震荡, 将其剔除出模型组。对照组不进行砵码撞击, 其他步骤与造模组相同。将造模成功的大鼠随机分为模型组、吡拉西坦(0.16 g/kg)组和脑震宁低、中、高剂量(6.68、13.36、26.73 g/kg)组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 2 次/d, 连续 14 d。

2.3 水迷宫实验

分别在造模前后对大鼠进行水迷宫水下平台隐匿和无平台探测实验, 根据大鼠逃避潜伏期和平台固定象限停留时间百分比, 判断其空间学习记忆能力。

2.4 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、MDA 水平和 SOD 活性

给药结束后, 取样前大鼠禁食不禁水 12 h, ip

10%水合氯醛麻醉 (3 mL/kg), 腹主动脉取血, 3500 r/min 离心 20 min, 取上清, 按试剂盒说明书检测血清 IL-1 β 、IL-6、MDA 水平及 SOD 活性。

2.5 qRT-PCR 检测海马组织 p38、ERK 和 JNK mRNA 表达

待腹主动脉取血后, 开颅取脑, 冰上迅速分取海马组织, 将同组海马组织混匀, 取适量组织匀浆, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
GAPDH	F: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	R: GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	
p38	F: CGGTGTGTGCTGCTTTTGAT	100
	R: CTGTAGGTCCTTTTGGCGTG	
JNK	F: TGAGCAGAAGTAAACGTGACAACAA	134
	R: ATCATAAGCTGCACACACTATTCCT	
ERK	F: GCAAGAGGGAAATCTATGTGGC	206
	R: GCCGGAGGAAAGAGTCTAAAGC	

2.6 Western blotting 检测海马组织 p38、p-p38、JNK、p-JNK、ERK 和 p-ERK 蛋白表达

取各组大鼠海马组织, 加入裂解液提取蛋白, 蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后孵育相应一抗和二抗, 快速洗涤 3 次, 加入 ECL 发光液显影, X 片曝光定影, 采用 Alpha 软件分析条带灰度值。

2.7 苏木素-伊红 (HE) 染色检测海马神经元病理变化

给药结束后, 大鼠禁食不禁水 12 h, ip 10%水合氯醛麻醉 (3 mL/kg), 打开胸腔, 50 mL 注射器针头自心尖搏动处直接插入主动脉弓, 先后给予 4 ℃生理盐水、4%多聚甲醛进行心脏灌注, 待灌注完毕后开颅取全脑, 于 4%多聚甲醛中固定 48 h, 进行石蜡包埋, 65 ℃烘烤 60 min, 二甲苯浸泡 15 min, 梯度乙醇浸泡 2 min, 于苏木素染色液中浸染 5 min, 自来水浸洗, 盐酸乙醇分色, 水洗, 蒸馏水返蓝, 于梯度乙醇浸泡 5 s, 无水乙醇浸泡 1 min, 二甲苯浸泡 2 min 透明, 中性树胶封片, 于显微镜下观察海马神经元病理变化。

2.8 尼氏染色检测海马神经元尼氏体变化

取“2.7”项下石蜡切片, 冲洗后, 滴加 1%甲苯胺蓝水溶液, 37 ℃浸染 25 min, 蒸馏水冲洗, 95%乙

醇分化 30 s, 于梯度乙醇中脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 于显微镜下观察海马神经元尼氏体的颜色变化, 并用 ImageJ 软件统计海马 CA1 区 3 张不同位置的神经元数量变化。

2.9 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色检测海马组织神经元及轴索超微结构变化

取“2.5”项下大鼠海马组织, 切成 0.5 mm×3 mm 的组织切块, 2.5%戊二醛固定, 0.1 mol/L PBS 溶液浸洗; 1%锇酸继续固定 30 min, PBS 溶液再次浸洗; 梯度乙醇脱水, 于环氧丙烷中浸泡 5 min, 于环氧丙烷与 Epon812 包埋混合液浸泡 30 min; 37 ℃下于纯 Epon812 包埋液浸透 30 min, 加入包埋剂, 100 ℃包埋聚合 1 h; 醋酸铀染液避光浸染 20 min, 水洗 30 min; 枸橼酸铅染液浸染 5 min, 水洗 30 min; 采用 TEM 观察海马组织神经元及线粒体超微结构的变化。

2.10 统计学方法

使用 SPSS 24.0 统计软件包, 计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 在方差齐的情况下, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 方差不齐的情况下, 采用 Tamhane's *T2* 检验, 相关性分析采用线性回归法。

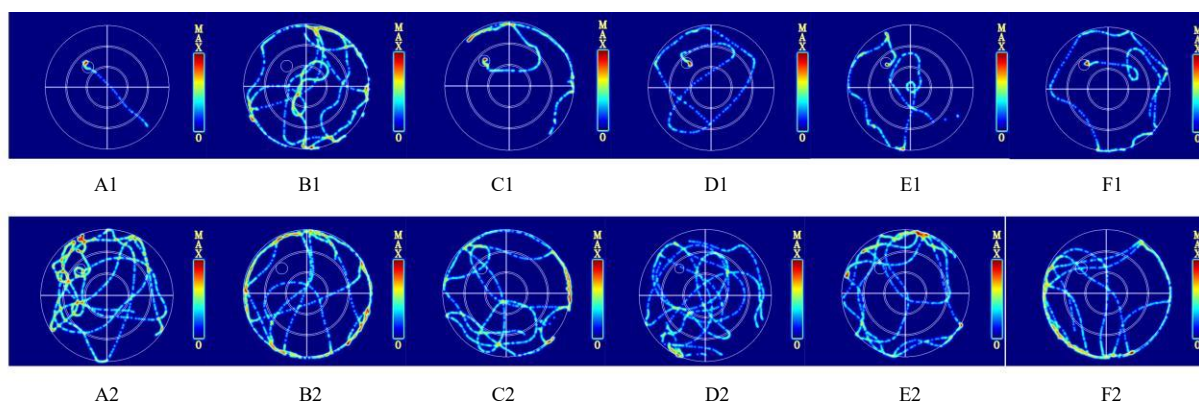
3 结果

3.1 脑震宁对 MCC 模型大鼠学习记忆能力的影响

如图 1 和表 2 所示, 在隐匿平台实验中, 与对照组相比, 模型组大鼠运动速度减慢 ($P < 0.05$), 潜伏期时间明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠运动速度明显加快 ($P < 0.05$), 潜伏期时间明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与吡拉西坦组相比, 脑震宁低剂量组大鼠运动速度加快 ($P < 0.05$), 潜伏期时间降低 ($P < 0.05$), 脑震宁中剂量组大鼠运动速度加快 ($P < 0.05$), 潜伏期时间无明显差异。在无平台实验中, 与对照组相比, 模型组大鼠所在平台时间百分比明显下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠所在平台时间百分比均明显上升 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与吡拉西坦组相比, 脑震宁低、中剂量组大鼠所在平台时间百分比均上升 ($P < 0.05$)。

3.2 脑震宁对 MCC 模型大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、MDA 水平和 SOD 活性的影响

如表 3 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠血清中 IL-6、MDA 水平均显著降低 ($P <$



A-对照组 B-模型组 C-吡拉西坦组 D~F-脑震宁低、中、高剂量组, 下图同 1-有平台 2-无平台

A-control group B-model group C-piracetam group D~F-Naozhenning low-, medium- and high-dose groups, same as below figures 1-with platform 2-no platform

图 1 各组大鼠学习记忆的轨迹图

Fig. 1 Trajectories of learning and memory of rats in each group

表 2 脑震宁对 MCC 模型大鼠学习记忆的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Naozhenning on learning and memory of MCC rats model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	运动速度/(m·s ⁻¹)	潜伏期/s	所在平台百分比/%
对照	—	67.25 ± 7.83	19.94 ± 1.83	58.66 ± 7.77
模型	—	17.49 ± 2.00 [#]	53.33 ± 6.59 ^{##}	8.94 ± 3.42 ^{##}
吡拉西坦	0.16	23.62 ± 2.74 [*]	38.72 ± 3.12 [*]	23.13 ± 5.84 ^{**}
脑震宁	6.68	46.55 ± 4.20 ^{*△}	24.60 ± 4.93 ^{**△}	33.89 ± 4.01 ^{**△}
	13.36	33.62 ± 2.82 ^{*△}	33.31 ± 7.31 [*]	31.03 ± 4.91 ^{**△}
	26.73	23.51 ± 2.67 [*]	38.68 ± 7.00 [*]	20.43 ± 3.61 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与吡拉西坦组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$, 下同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs piracetam group, same as below tables

表 3 脑震宁对 MCC 模型大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、MDA 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Naozhenning on IL-1 β , IL-6, MDA levels and SOD activity in serum of MCC rats model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	77.20 ± 1.68	125.38 ± 8.46	165.94 ± 1.84	4.56 ± 0.29
模型	—	117.55 ± 4.09 ^{##}	144.78 ± 2.41 [#]	107.96 ± 3.42 ^{##}	12.05 ± 0.72 ^{##}
吡拉西坦	0.16	82.73 ± 8.02 ^{**}	128.23 ± 4.29 [*]	135.09 ± 0.85 ^{**}	5.79 ± 0.43 ^{**}
脑震宁	6.68	88.54 ± 4.96 ^{**}	120.85 ± 7.79 ^{**}	130.98 ± 4.86 ^{***}	5.43 ± 0.14 ^{**}
	13.36	91.12 ± 7.16 ^{*△}	124.29 ± 8.83 [*]	145.11 ± 5.28 ^{**△}	4.91 ± 0.29 ^{**△}
	26.73	95.51 ± 8.82	125.31 ± 12.26 [*]	113.08 ± 3.51 ^{△△}	7.54 ± 0.14 ^{**△}

0.05、0.01), 吡拉西坦组和脑震宁低、中剂量组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), SOD 活性升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 与吡拉西坦组相比, 脑震宁中剂量组大鼠血清中 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$), SOD 活性升高 ($P < 0.05$), MDA 水平降低 ($P < 0.05$); 脑震宁高剂量组大鼠血清中 MDA 水平升高 ($P < 0.05$), SOD 活性降低 ($P < 0.01$)。

3.3 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马组织 p38、JNK 和 ERK mRNA 表达的影响

如表 4 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠海马组织 p38、JNK 和 ERK mRNA 表达水平均明显升高

($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠海马组织 p38、JNK 和 ERK mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 与吡拉西坦组相比, 脑震宁中、高剂量组大鼠海马组织 p38 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01), JNK mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$); 脑震宁低、中剂量组大鼠海马组织 ERK mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。

3.4 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马组织 p38、p-p38、JNK、p-JNK、ERK 和 p-ERK 蛋白表达的影响

如图 2 和表 5 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠海马组织 p38、p-p38、JNK、p-JNK、ERK 和 p-

表 4 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马组织 *p38*、*JNK* 和 *ERK* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Naozhenning on *p38*, *JNK* and *ERK* mRNA expressions in hippocampus of MCC rats model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		<i>p38</i>	<i>JNK</i>	<i>ERK</i>
对照	—	0.61 ± 0.03	0.53 ± 0.01	0.49 ± 0.03
模型	—	0.89 ± 0.01 ^{##}	0.99 ± 0.06 ^{##}	0.74 ± 0.03 ^{##}
吡拉西坦	0.16	0.68 ± 0.02 [*]	0.67 ± 0.01 ^{**}	0.56 ± 0.01 ^{**}
脑震宁	6.68	0.72 ± 0.03 [*]	0.70 ± 0.01 ^{**}	0.67 ± 0.01 ^{*△△}
	13.36	0.57 ± 0.05 ^{*△△}	0.75 ± 0.02 ^{**△}	0.65 ± 0.01 ^{**△△}
	26.73	0.61 ± 0.02 ^{*△}	0.79 ± 0.01 ^{**△}	0.54 ± 0.01 ^{**}

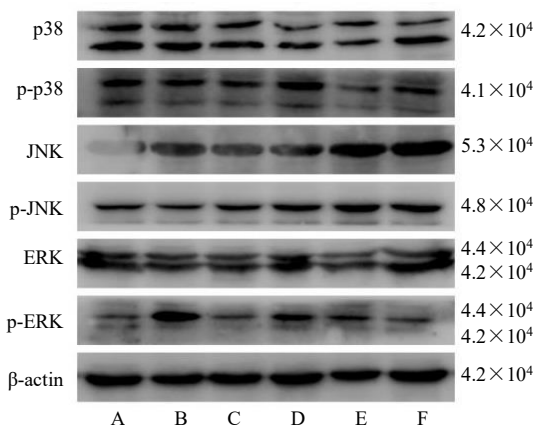


图 2 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马组织 *p38*、*p-p38*、*JNK*、*p-JNK*、*ERK* 和 *p-ERK* 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Naozhenning on *p38*, *p-p38*, *JNK*, *p-JNK*, *ERK* and *p-ERK* protein expressions in hippocampus of MCC rats model

表 5 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马组织 *p38*、*p-p38*、*JNK*、*p-JNK*、*ERK* 和 *p-ERK* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Naozhenning on *p38*, *p-p38*, *JNK*, *p-JNK*, *ERK* and *p-ERK* protein expressions in hippocampus of MCC rats model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		p-p38	p38	p-p38/p38	p-JNK	JNK
对照	—	0.61 ± 0.02	1.18 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.46 ± 0.01	1.30 ± 0.01
模型	—	0.64 ± 0.01 ^{##}	1.41 ± 0.02 [#]	0.46 ± 0.00 [#]	0.58 ± 0.01 ^{##}	1.55 ± 0.01 [#]
吡拉西坦	0.16	0.53 ± 0.01 ^{**}	1.17 ± 0.02 [*]	0.45 ± 0.01	0.69 ± 0.01 ^{**}	1.43 ± 0.01 ^{##}
脑震宁	6.68	0.76 ± 0.01 ^{**△△}	0.79 ± 0.06 ^{**△△}	0.96 ± 0.06 ^{**△△}	0.62 ± 0.01	1.31 ± 0.01 ^{*△}
	13.36	0.49 ± 0.01 ^{**△△}	1.06 ± 0.10 ^{**△}	0.46 ± 0.03	0.85 ± 0.02 ^{**△△}	1.39 ± 0.07 [*]
	26.73	0.58 ± 0.01 ^{**△△}	0.74 ± 0.02 ^{**△}	0.79 ± 0.01 ^{**△△}	0.73 ± 0.01 ^{**△}	1.57 ± 0.01 [△]

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		p-JNK/JNK	p-ERK	ERK	p-ERK/ERK
对照	—	0.35 ± 0.01	0.56 ± 0.01	1.27 ± 0.01	0.46 ± 0.01
模型	—	0.39 ± 0.01 [#]	0.91 ± 0.01 ^{##}	1.36 ± 0.01 [#]	0.67 ± 0.00 ^{##}
吡拉西坦	0.16	0.49 ± 0.01 ^{**}	0.70 ± 0.02 ^{**}	1.25 ± 0.01 ^{**}	0.53 ± 0.01 ^{**}
脑震宁	6.68	0.47 ± 0.01 ^{**}	0.78 ± 0.01 ^{**△△}	1.07 ± 0.05 ^{**△}	0.68 ± 0.04 ^{△△}
	13.36	0.59 ± 0.04 ^{**△△}	0.79 ± 0.01 ^{**△}	1.29 ± 0.02 [*]	0.60 ± 0.00 ^{*△}
	26.73	0.46 ± 0.01 ^{**}	0.53 ± 0.01 ^{**△△}	1.37 ± 0.02 ^{△△}	0.39 ± 0.00 ^{**△△}

ERK 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，*p-p38/p38* 降低 ($P < 0.05$)，*p-JNK/JNK* 和 *p-ERK/ERK* 升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，各给药

组海马组织 *p38*、*p-p38* 和 *p-ERK* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，*p-JNK/JNK* 升高 ($P < 0.01$)；吡拉西坦组和脑震宁低、中剂量组海马组织

JNK 和 ERK 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；脑震宁低、高剂量组 p-p38/p38 升高 ($P < 0.01$)；吡拉西坦组和脑震宁中、高剂量组海马组织 p-JNK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，p-ERK/ERK 降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马神经元病理变化的影响

如图 3 所示，对照组大鼠海马神经元排列整齐紧密，染色清晰，形态完整，核大而圆，着色浅，胞核与胞质界限清晰可见；模型组神经元排列明显稀疏，数量减少，部分细胞核消失或核仁破裂，胞质内混浊；吡拉西坦组神经元排列较稀疏，核大而圆，着色浅，少部分细胞出现核仁消失、胞质混浊；脑震宁低剂量组神经元排列较稀疏，大部分细胞形态较完整，核大而圆，着色浅，少数细胞出现核仁

消失；脑震宁中剂量组神经元排列稀疏分散，大部分细胞核不明显，胞质混浊不清晰，部分混浊；脑震宁高剂量组细胞排列明显稀疏分散，数量减少，大部分细胞核偏移，胞质边界不清晰，部分细胞出现溶解。

3.6 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马神经元尼氏体的影响

如图 4 所示，对照组大鼠海马神经元尼氏体清晰可见，呈深蓝色颗粒状或斑块状；模型组神经元尼氏体颜色变浅且尼氏体数量明显减少；吡拉西坦组神经元尼氏体颜色深蓝，少数细胞尼氏体颜色变浅；脑震宁组随剂量增加，尼氏体颜色逐渐变浅，数量减少，尤其是脑震宁高剂量组，大多数神经元尼氏体变浅明显。如表 6 所示，与对照组相比，模型组神经元数量明显减少 ($P < 0.01$)；与模型组相

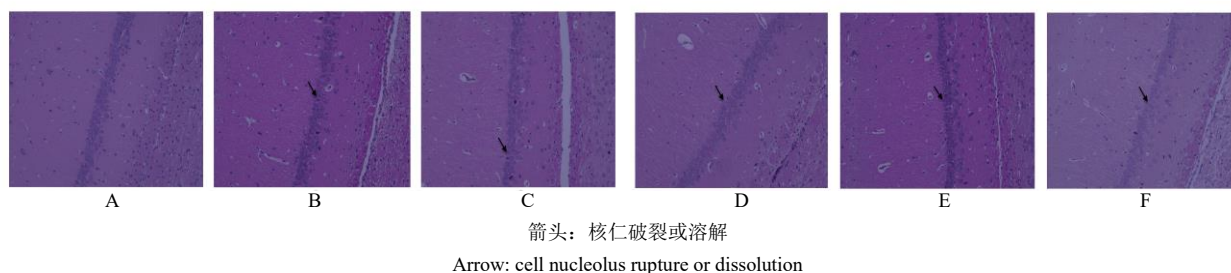


图 3 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马神经元变化的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of Naozhenning on hippocampal neurons changes in MCC rats model (×400)

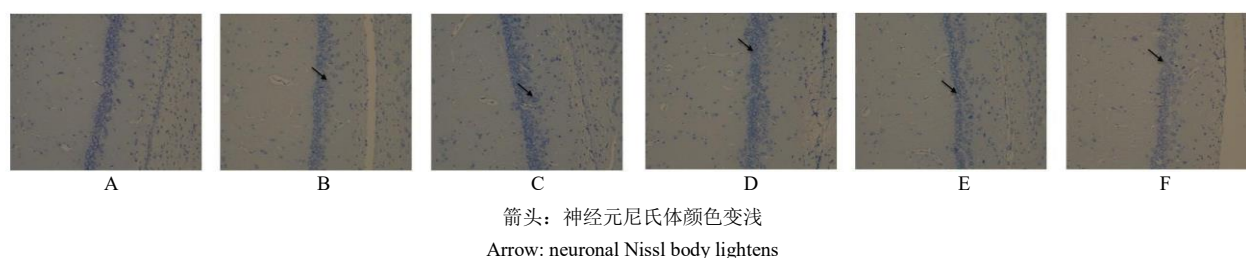


图 4 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马神经元尼氏体的影响 (×400)

Fig. 4 Effect of Naozhenning on Nissl body of hippocampal neurons in MCC rats model (×400)

表 6 脑震宁对三重脑震荡模型大鼠海马神经元数量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 Effect of Naozhenning on number of hippocampal neurons in MCC rats model ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经元数目
对照	—	126.67 ± 4.19
模型	—	79.67 ± 4.64 ^{##}
吡拉西坦	0.16	104.67 ± 2.05 ^{**}
脑震宁	6.68	101.00 ± 2.16 ^{**}
	13.36	99.00 ± 2.94 ^{**△}
	26.73	94.33 ± 4.26 ^{**△△}

比，各给药组神经元数量均明显增加 ($P < 0.01$)；与吡拉西坦组相比，脑震宁中、高剂量组神经元数量减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马组织神经元及轴索超微结构的影响

如图 5 所示，对照组神经元细胞核大而圆，细胞核膜完整，核仁可见，线粒体呈圆形或椭圆形，内嵴清晰可见，轴索形态规则，髓鞘板层呈同心圆致密排列，轴膜清晰，紧贴内层髓鞘，轴浆内神经

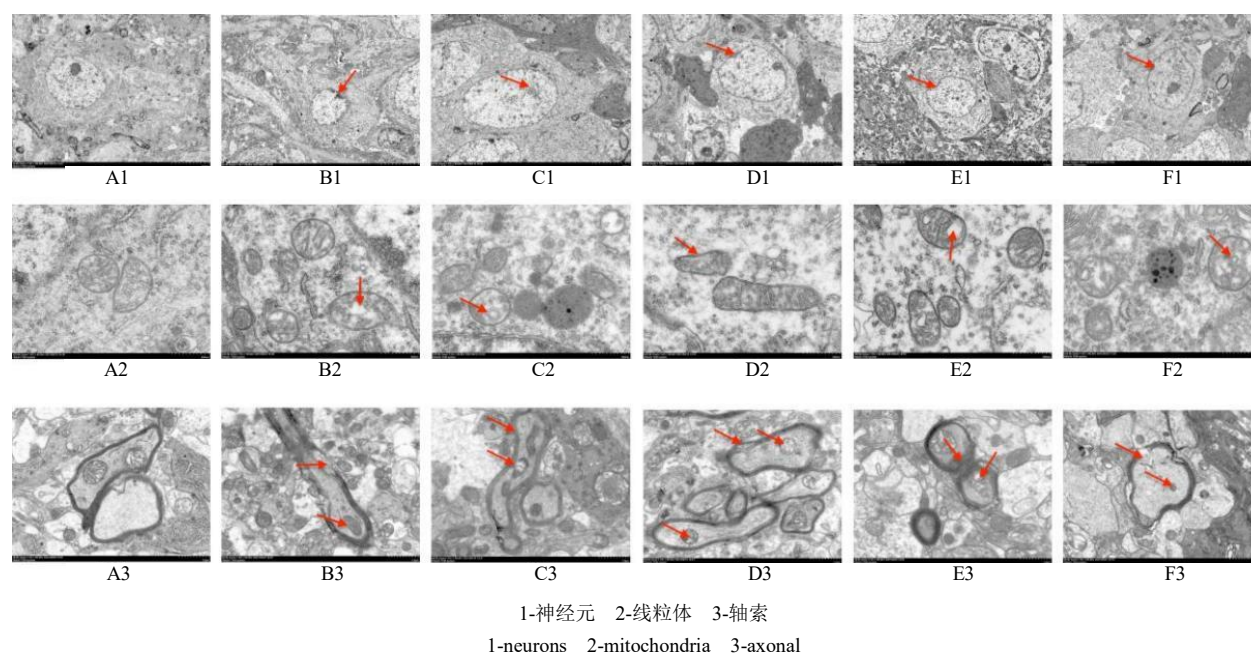


图 5 脑震宁对 MCC 模型大鼠海马神经元及轴突超微结构的影响

Fig. 5 Effect of Naozhenning on ultrastructure of hippocampal neurons and axons in MCC rats model

微丝及微管排列紧密，线粒体结构清晰（图 5-A1、A2、A3）；模型组神经元细胞体积缩小，核膜皱缩，核仁破裂分散（图 5-B1），线粒体内嵴结构基本清晰可见（图 5-B2），髓鞘板层严重分离，局部崩解、断裂，轴浆内线粒体模糊不清（图 5-B3）；吡拉西坦组神经元细胞核大而圆，核膜完整，核仁破裂（图 5-C1），线粒体偏圆形，内嵴结构模糊，个别肿胀有空泡（图 5-C2），轴索髓鞘板层排列模糊，板层局部崩解，轴浆内神经微丝及微管排列疏松，线粒体结构模糊，部分空泡化（图 5-C3）；脑震宁低剂量组神经元细胞核大而偏椭圆，核膜完整，核仁偏移（图 5-D1），线粒体呈细长，内嵴结构清晰可见（图 5-D2），轴索髓鞘板层排列模糊，板层部分崩解、断裂，轴浆内神经微丝及微管排列疏松，线粒体结构模糊且空泡化（图 5-D3）；脑震宁中剂量组神经元体积缩小，细胞核膜稍完整，核仁破裂分散（图 5-E1），线粒体肿胀变形有空泡，内嵴清晰可见（图 5-E2），轴索髓鞘板层模糊，大部分出现分离崩解及断裂，轴浆内神经微丝及微管排列紧密，线粒体结构紊乱，空泡化（图 5-E3）；脑震宁高剂量组神经元体积缩小，核仁固缩偏移（图 5-F1），线粒体内嵴结构模糊（图 5-F2），轴索髓鞘板层排列广泛分离，大部分板层崩解、断裂明显，轴浆内神经微丝无明显排列，线粒体模糊且结构溶解（图 5-F3）。

4 讨论

脑震荡中医分型主要有气虚痰瘀、心肾不交、瘀血内阻、肝郁痰瘀、肾虚痰瘀，其中痰瘀阻窍是脑震荡的核心病机。脑震荡因外力刺激导致瘀血阻滞头部，气机运行受阻，进而导致痰瘀阻窍，从而引起一过性的眩晕、昏迷、记忆缺失、恶心、呕吐等症状。因此脑震宁以当归、丹参、川芎、地龙活血止痛、化瘀通络为主，配伍地黄、牡丹皮清热凉血，炒酸枣仁、柏子仁养血安神、宁心定志，并佐以陈皮、茯苓、竹茹和胃降逆、化痰止呕。临床研究证实脑震宁可以缓解颅内血肿及头晕、头痛、失眠等临床症状^[5]。动物实验证实脑震宁能缓解小鼠疼痛并延长睡眠时间^[10]。在水迷宫实验中，潜伏时间反映学习能力，所在象限停留时间百分比反映记忆能力，学习能力越强潜伏时间值越低，记忆能力越好，所在象限停留时间百分比值越高。本研究结果显示，模型组大鼠平均运动速度降低，平台潜伏期时间延长，所在象限停留时间百分比下降，提示模型组可能出现了学习记忆能力的受损。此外，模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 炎症因子水平较对照组明显升高，氧化产物 MDA 水平增加，SOD 活性降低，p38、JNK、ERK 蛋白及磷酸化蛋白表达水平较对照组均有不同程度地增加，且尼氏染色显示海马神经元尼氏体颜色变浅，神经元数量明显减少，

TEM 结果显示神经元细胞体积缩小,核仁破裂分散,微管及微丝崩解、断裂。以上结果提示模型组大鼠海马神经元及线粒体也出现明显受损情况。

MAPK 信号通路主要由 p38、ERK 和 JNK 3 条通路组成,参与调控细胞生长、分裂、分化、死亡等各个阶段的生理、病理活动。MAPK 通路由各种细胞外和细胞内刺激激活,包括肽生长因子、细胞因子、激素和氧化应激和内质网应激等各种细胞应激。当脑组织出现损伤时,MAPK 信号通路激活,MAPK 激酶通过磷酸化活化下游调节蛋白 p38、ERK 和 JNK。激活的 p38 通过调控炎症因子的表达,影响脑组织炎症的同时,使机体发生氧化应激反应,当予以 p38 特异性抑制剂干预后,IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 等表达下降以及氧化应激反应也随之减轻^[11]。本研究结果显示,脑震宁组 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子水平明显较模型组降低, p38 总蛋白、p-p38 蛋白及 mRNA 表达也出现不同程度的降低,且脑震宁低、高剂量组比值也降低,说明脑震宁通过抑制 p38 通路的激活影响 MCC 模型大鼠神经元损伤,其中通过抑制 p38 通路的激活从而发挥抑炎作用以脑震宁中剂量组效果最佳。p38 通路还可以活化 JNK 信号通路,加剧炎症反应,抑制线粒体呼吸链,增加 MDA 水平,降低 SOD 活性,促进氧化损伤或细胞凋亡,本研究中模型组 JNK 及 p-JNK 蛋白表达较对照组增加,给予脑震宁后不同剂量组 JNK mRNA 表达逐渐降低, JNK 总蛋白表达较模型组减少, p-JNK 蛋白随剂量增加逐渐增多,吡拉西坦、脑震宁低、中、高剂量组比值均降低,这些提示脑震宁可能通过作用 JNK 信号通路影响 MCC 模型大鼠海马神经元的损伤,其中 p-JNK 蛋白含量虽随剂量明显增加,但脑震宁低、中剂量组 JNK 总蛋白较模型组明显降低,说明脑震宁可能在加剧 JNK 蛋白磷酸化的同时也控制了 JNK 总蛋白的含量,从而减轻海马神经元的损伤,也进一步提示脑震宁的治疗作用可能受剂量的反向调节。此外,ERK 信号通路的激活可以通过炎症因子介导细胞损伤,从而加剧轴索损伤^[12]。本研究中脑震宁低、中剂量组 ERK 总蛋白和各剂量组 p-ERK 蛋白及 mRNA 表达均比模型组降低,高剂量组 ERK 总蛋白表达与模型组无明显差异,脑震宁中、高剂量组比值均升高,脑震宁低剂量组比值降低,同时病理、电镜结果显示神经元、线粒体、轴索的损伤随给药剂量的增加逐渐加重。以上

结果提示脑震宁可能通过抑制 ERK 信号通路的激活改善神经元损伤,尤其以低剂量组效果佳。但是,也有研究发现 ERK 通路激活在细胞应激反应中起保护作用^[13],而激活 ERK 信号通路可以保护海马神经元的凋亡^[14]。因此,ERK 信号通路激活以及脑震宁在 MCC 模型大鼠发展过程中对机体是损伤抑或保护作用还有待进一步研究。p38 以及 JNK、ERK 参与下的 MAPK 信号通路,可能在脑震荡发生过程中介导炎症反应和氧化应激反应,进而导致脑内慢性神经炎症和神经元功能的丧失,而给予脑震宁治疗后,炎症反应、氧化应激反应得到抑制,神经元及其微管的损伤亦随之得到改善。

综上所述,脑震宁通过减轻炎症、降低氧化应激反应,改善 MCC 模型大鼠海马神经元损伤,其机制与抑制 MAPK 信号通路的激活相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gouttebarga V, Kerkhoffs G M M J. Sports career-related concussion and mental health symptoms in former elite athletes [J]. *Neuro-Chirurgie*, 2021, 67(3): 280-282.
- [2] Skandsen T, Nilsen T L, Einarsen C, *et al.* Incidence of mild traumatic brain injury: A prospective hospital, emergency room and general practitioner-based study [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 638.
- [3] Becker R E, Kapogiannis D, Greig N H. Does traumatic brain injury hold the key to the Alzheimer's disease puzzle? [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 431-443.
- [4] Lecca D, Bader M, Tweedie D, *et al.* (-)-Phenserine and the prevention of pre-programmed cell death and neuroinflammation in mild traumatic brain injury and Alzheimer's disease challenged mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 130: 104528.
- [5] Cao J H, Duan Y H, Liu Y Z, *et al.* Metabolomics coupled with SystemsDock reveal the protective effect and the potential active components of Naozhenning Granule against traumatic brain injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246: 112247.
- [6] 卢紫娟, 刘海霞, 李昆, 等. 基于网络药理学的脑震宁颗粒治疗脑外伤的机制分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3531-3540.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1439-1442.
- [8] Mychasiuk R, Farran A, Angoa-Perez M, *et al.* A novel model of mild traumatic brain injury for juvenile rats [J].

- JoVE, 2014(94): 51820.
- [9] 于建云, 李树华, 韩晓华, 等. 脑震荡鼠细胞组织病理学研究 [J]. 昆明医学院学报, 2003, 24(2): 1-5.
- [10] 张明升, 孙殿春, 高尚进, 等. 脑震宁冲剂的药效学实验研究 [J]. 中成药, 1997, 19(6): 33-34.
- [11] 罗波. 大鼠 SAH 早期脑损伤中 p38MAPK、P53 的表达及褪黑素作用研究 [D]. 南充: 川北医学院, 2016.
- [12] 刘宝华, 李海峰, 胡克邦, 等. 褪黑素对创伤性脑损伤大鼠 ERK-MAPK 信号传导机制的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(16): 4473-4475.
- [13] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, *et al.* Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis [J]. *Science*, 1995, 270(5240): 1326-1331.
- [14] 杨世宝, 马金玉. 盐酸纳美芬对七氟烷麻醉新生大鼠 MAPK/ERK/CREB 通路及海马神经元凋亡的影响 [J]. 中国药师, 2021, 24(9): 1652-1657.

[责任编辑 李亚楠]