

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

李雅楠¹, 李思博², 白月¹, 肖维刚³, 陈娟³, 黄怀鹏^{1,2*}

1. 河北中医药大学附属石家庄平安医院 科研中心, 河北 石家庄 050051

2. 河北中医药大学药学院, 河北 石家庄 050091

3. 河北中医药大学附属石家庄平安医院 中医内科, 河北 石家庄 050051

摘要: 目的 研究芒柄花素磺酸钠(sodium formononetin-3'-sulphonate, Sul-F)调控线粒体凋亡通路改善脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法 建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 随机分为假手术组、模型组、依达拉奉(3 mg/kg)组和 Sul-F 高、低剂量(80、40 mg/kg)组, 分别于再灌注 0、12 h 尾 iv 药物干预, 假手术组和模型组给予等体积的生理盐水。再灌注 24 h 后, Zea Longa 评分法评估神经功能; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色测定脑梗死体积; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察脑缺血半暗带病理变化; 原位末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色检测脑缺血半暗带细胞凋亡情况; JC-1 探针流式细胞术检测脑缺血半暗带线粒体膜电位水平; 透射电镜观察脑组织超微结构; ELISA 法检测脑缺血半暗带丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性; qRT-PCR 和 Western blotting 分别检测脑缺血半暗带 B 淋巴细胞瘤-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(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) mRNA 和蛋白表达。结果 与模型组比较, Sul-F 高剂量组大鼠神经功能评分显著降低($P<0.01$), 脑梗死体积显著减小($P<0.05$), 脑缺血半暗带病理损伤减轻, 细胞凋亡显著减少($P<0.01$), 线粒体膜电位的去极化显著逆转($P<0.05$), 线粒体嵴更加清晰、自噬现象更少见, MDA 含量显著降低($P<0.01$), SOD 和 GSH-Px 活力显著升高($P<0.05$ 、 0.01); Bcl-2 表达显著增加($P<0.01$), Bax 和 Caspase-3 表达显著减低($P<0.01$)。结论 Sul-F 通过调控线粒体凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 平衡, 改善线粒体氧化应激水平, 减轻脑缺血再灌注损伤。

关键词: 缺血性脑卒中; 芒柄花素磺酸钠; 线粒体; 脑缺血再灌注; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)11-3759-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.018

Sodium formononetin-3'-sulphonate alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating mitochondrial apoptosis pathway

LI Yanan¹, LI Sibao², BAI Yue¹, XIAO Weigang³, CHEN Juan³, HUANG Huaipeng^{1,2}

1. Scientific Research Center, Hebei University of Chinese Medicine Affiliated Shijiazhuang Ping'an Hospital, Shijiazhuang 050051, China

2. School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

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

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** The rat model of cerebral I/R injury was established, rats were randomly divided into sham group, model group, edaravone (3 mg/kg) group and high-, low-dose (80, 40 mg/kg) Sul-F groups. Drug intervention was administered through the caudal vein at 0, 12 h of reperfusion, respectively. Sham group and model group were given the equal volume of saline simultaneously. After 24 h of reperfusion, Zea Longa score was used to assess the neural function; The volume of cerebral infarction was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to observe the

收稿日期: 2023-12-04

基金项目: 河北省科学技术厅院士合作重点单位和院士工作站项目

作者简介: 李雅楠(1989—), 女, 副主任技师, 从事中药药理研究。E-mail: niwawa941@163.com

*通信作者: 黄怀鹏(1971—), 男, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药理研究。E-mail: Huang71526@163.com

pathological changes of ischemic penumbra; TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to detect apoptosis in ischemic penumbra; JC-1 probe was applied to detect the mitochondrial membrane potential in ischemic penumbra by flow cytometry; Transmission electron microscopy was used to observe ultrastructure of brain tissue; The level of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH Px) were detected by ELISA; qRT-PCR and Western blotting were applied to measure the mRNA and protein expressions of B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*), Bcl-2 associated X protein (*Bax*) and cystein-aspartate protease-3 (*Caspase-3*) in ischemic penumbra. **Results** Compared with model group, neurological function score of rats was significantly reduced in Sul-F high-dose group ($P < 0.01$), cerebral infarction volume was decreased ($P < 0.05$), pathological damage to the ischemic penumbra was reduced, apoptosis was decreased ($P < 0.01$), depolarization of mitochondrial membrane potential was reversed ($P < 0.05$), mitochondrial cristae was clearer and autophagy phenomenon was less, level of MDA was decreased ($P < 0.01$), activities of SOD and GSH-Px were increased ($P < 0.05, 0.01$), Bcl-2 expression was increased ($P < 0.01$), expressions of Bax and Caspase-3 were decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Sul-F can alleviate mitochondrial function and alleviate cerebral I/R injury by regulating the balance of mitochondrial apoptosis related genes Bcl-2/Bax.

Key words: ischemic stroke; sodium formononetin-3'-sulphonate; mitochondrion; cerebral ischemia-reperfusion; apoptosis

缺血性脑卒中是人类死亡的主要原因之一，也是全球范围内成人致残的主要原因^[1]。2019 年我国有缺血性脑卒中患者 2 418 万例，给我国医疗卫生系统造成巨大负担^[2]。缺血后大脑血液供应的中断会引发一系列病理生理改变。尽管恢复脑血流对挽救缺血组织至关重要，但血流恢复可能会进一步加重脑损伤^[3]。再灌注损伤的机制包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)的突然产生、自噬的激活和细胞因子的释放，其中线粒体功能障碍在介导这些病理生理过程中发挥重要作用^[4]。目前，重组组织纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)已被批准应用于缺血性脑卒中的治疗^[5]。由于治疗时间窗窄，能够应用 rt-PA 治疗的患者不足 10%^[6]。因此，寻找更有效的防治缺血性脑卒中的药物至关重要。

在中医理论中，缺血性脑卒中属于“中风”范畴。补阳还五汤是治疗缺血性脑卒中的经典方剂，已有数百年的临床应用历史^[7-8]。方中以生黄芪为君药，补益元气，旨在气旺则血行，瘀去则络通，对中风之气虚血瘀证有显著疗效。现代药理学研究证实，芒柄花素是黄芪的主要活性成分之一，具有抗炎^[9]、抗氧化^[10]、神经保护^[11]等作用。但是，水溶性差限制了其在中枢神经系统的应用。通过磺化反应合成的芒柄花素磺酸钠(sodium formononetin-3'-sulphonate, Sul-F)克服了其水溶性差的难题，为其应用于缺血性脑卒中的研究提供了物质基础。

本研究通过建立大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型，考察 Sul-F 对大鼠脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤的改善作用和对线粒体凋亡通路的影响，

旨在探讨 Sul-F 是否通过调控线粒体凋亡通路改善脑 I/R 损伤。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 75 只，体质量(300±10) g，购自斯贝福(北京)有限公司，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 药品与试剂

依达拉奉注射液(国药准字 H20080056，批号 2109050)购自国瑞药业有限公司；Sul-F(质量分数>95%，批号 160901)由河北国金药业有限责任公司提供；2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染液(批号 1222A23)购自美国 Sigma-Aldrich 公司；苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液试剂盒(批号 MD070823)购自碧云天生物技术有限公司；原位末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测试剂盒(批号 061223240108)、线粒体膜电位(JC-1)检测试剂盒(批号 C2006)购自碧云天生物技术有限公司；谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒(批号 A005-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(批号 A001-3)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号 A003-1)均购自南京建成生物工程研究所；电镜固

定液(批号 02607-BA)、包埋剂(批号 90529-77-4)、醋酸双氧铀(批号 H60602624A8)购自 SPI 公司;无水乙醇(批号 100092183)、丙酮(批号 10000418)购自国药集团化学试剂有限公司;铜网(批号 BZ100205a)购自北京中镜仪技术有限公司;钨酸(批号 18456)购自 Ted Pella 公司;柠檬酸铅(批号 180705-C5382)购自 EMS 公司; β -actin 抗体(批号 86e1489)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 35y4418)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 43z8686)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)抗体(批号 53j2158)购自 Affinity 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 20220521)购自北京百奥思生物科技有限公司;Trizol(批号 342430AX)购自艾德莱公司;ExonScript First-Strand Synthesis SuperMix with dsDNase 试剂盒(批号 231106-A5)购自成都市蓉为基因生物科技有限公司;硅胶线栓(批号 230701162)购自长沙迈越生物科技有限公司。

1.3 仪器

JT-12J 型全自动脱水机、JB-L5 型加热石蜡包埋系统(武汉俊杰电子有限公司);RM2235 型石蜡切片机、UC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司);XS-2100 型光学显微镜(NOVEL 公司);ELCIPSE-CI 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);7800 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);LF-2000 型 SDS-PAGE 电泳系统(北京龙方科技有限公司);JYO2S 型凝胶成像系统(北京君意东方电泳设备有限公司);chemiscope 6100 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);272005652 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Life Technologies 公司);BeamCyte-1026 型流式细胞仪(必达科生物科技有限公司);680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

大鼠 I/R 损伤模型的建立参照文献方法^[12],大鼠 ip 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,置于加热垫上,保持肛温 37℃。颈前皮肤备毛,在前正中线做切口,暴露颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,结扎颈外动脉远端,夹闭颈内动脉远端颈总动脉近端,将线栓经颈内动脉送入大脑中动脉,推送线栓 18~20 mm,缺血 2 h 后拔出线栓并且结扎端口。再灌注 0 h 时,选择神经功能评分为 1~3 分的大鼠,随机

分为模型组、依达拉奉(3 mg/kg)^[13]组和 Sul-F 高、低剂量(80、40 mg/kg)组,每组 15 只。另取 15 只大鼠仅分离血管不插线栓作为假手术组。分别于再灌注 0、12 h 尾 iv 给药(4 mL/kg),假手术组和模型组给予等体积的生理盐水。再灌注 24 h 后取材进行后续实验。

2.2 神经功能评分

再灌注 0、24 h 时,采用盲法对各组大鼠进行 Zea-Longa 评分^[14]:0 分,活动基本正常;1 分,提起时对侧前爪无法完全伸展;2 分,向手术对侧转圈;3 分,向手术对侧倾倒;4 分,意识丧失。

2.3 TTC 染色测定脑梗死体积

大鼠麻醉,断头取脑,-20℃冷冻 30 min,以 1.5~2 mm 厚度进行冠状面切片。置于 TTC 染液玻璃皿中,37℃避光孵育 30 min,吸出多余的 TTC 染液,倒入 4%多聚甲醛固定过夜,相机拍照后用 Image J 软件进行分析,记录脑梗死面积(灰白色)及全脑面积(红色),计算脑梗死体积率^[15]。

$$\text{脑梗死体积率} = (\text{脑梗死面积} \times \text{厚度}) / (\text{全脑面积} \times \text{厚度})$$

2.4 HE 染色观察脑组织病理变化

大鼠麻醉,断头取脑,4%多聚甲醛固定 24 h,沉糖 1 周,石蜡包埋,以 4 μ m 厚度行冠状切片,HE 染色后于光学显微镜下进行观察与拍照。

2.5 TUNEL 荧光染色观察脑组织细胞凋亡情况

将石蜡切片标本进行脱蜡、复水、抗原修复以及 H₂O₂ 封闭,按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行 TUNEL 染色,并使用 DAPI 对细胞核进行复染。封片后置于荧光显微镜下观察与拍照,并计算细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = \text{TUNEL 阳性细胞数} / \text{DAPI 阳性细胞数}$$

2.6 JC-1 探针检测脑缺血半暗带组织线粒体膜电位情况

取脑缺血半暗带组织,经 300 目钢网研磨、滤过到 60 mm 培养皿中,将滤过后的组织悬液转入 15 mL 新离心管中。加入 Hank 平衡盐溶液稀释至 10 mL,反复吹打 30 次,冰上静置 5 min,取上清液至 15 mL 新离心管中。滤过 2 次,滤液经 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 Hank 平衡盐溶液重悬,离心后弃上清。加入 1 mL Hank 平衡盐溶液重悬,细胞计数板计数,并调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。取 200 μ L 细胞,重悬于 0.5 mL 细胞培养液中。按照试剂说明书进行染色,流式细胞仪上机检测,以红绿荧光的比值表示线粒体膜电位变化。

2.7 透射电镜观察脑缺血半暗带组织超微结构

取缺血半暗带脑组织,剪成 1 mm³ 小块,经 PBS 漂洗、4 ℃ 固定 (2.5%戊二醛, 12 h)、PBS 漂洗、固定 (1%锇酸, 2 h)、PBS 漂洗、丙酮脱水 (30%、50%、70%、80%、95%、100%)、渗透包埋 (Epon812)、超薄切片、染色 (醋酸双氧铀和柠檬酸铅) 后,在透射电子显微镜下采集图像分析。

2.8 ELISA 检测脑缺血半暗带组织匀浆中 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性

取缺血半暗带脑组织匀浆,按照试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪测量吸光度 (*A*) 值,并计算 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性。

2.9 qRT-PCR 检测脑缺血半暗带组织 *Caspase-3*、*Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 表达

取缺血半暗带脑组织,Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。利用逆转录试剂盒 Superscript III 将 RNA 反转录成 cDNA,加入引物,以 β -actin 为内参,荧光定量 PCR 仪扩增,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算缺血半暗带 *Caspase-3*、*Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>Caspase-3</i>	F: 5'-TGTGGACCTGAAAAAC-3' R: 5'-GCCTGAATGATGAAGAG-3'
<i>Bcl-2</i>	F: 5'-CCCCATCCCTGAAGAGTTCCT-3' R: 5'-GCCACCTACCTGAATGACCAC-3'
<i>Bax</i>	F: 5'-ATTGGCGATGAAGTGGACAACA-3' R: 5'-CCCAGTTGAAGTTGCCGTCT-3'
β -actin	F: 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3' R: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'

2.10 Western blotting 检测脑缺血半暗带组织 *Caspase-3*、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达

取缺血半暗带脑组织,加入裂解液提取蛋白,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。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% 牛血清白蛋白中封闭,分别加入 *Caspase-3*、*Bcl-2*、*Bax* 抗体 (1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,洗膜后,加入二抗 (1:20 000),37 ℃ 孵育 1 h。滴加 ECL 混合液反应 4 min 后,采用化学发光成像系统显影并对条带灰度值进行分析。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布计量资料以 *M*

(*P*₂₅~*P*₇₅) 表示。多组间均数比较,服从正态分布与方差齐者,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验;不服从正态分布者,采用 Kruskal-Wallis 检验。

3 结果

3.1 Sul-F 对 MCAO 大鼠神经功能评分的影响

如表 2 所示,与假手术组比较,模型组大鼠神经功能评分显著升高 (*P*<0.01);与模型组比较,依达拉奉组和 Sul-F 高剂量组大鼠神经功能评分均显著降低 (*P*<0.01),Sul-F 低剂量组神经功能评分无显著变化;依达拉奉组与 Sul-F 高剂量组比较,神经功能评分无统计学差异。

表 2 各组大鼠神经功能评分 (*n* = 15)

Table 2 Neurological function scores of rats in each group (*n* = 15)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评分
假手术	—	0 (0~0)
模型	—	3 (3~3) **
依达拉奉	3	2 (1~2) $\Delta\Delta$
Sul-F	40	2 (1~2)
	80	1 (1~2) $\Delta\Delta$

与假手术组比较: ***P*<0.01;与模型组比较: $\Delta\Delta$ *P*<0.01。

***P*<0.01 vs sham group; $\Delta\Delta$ *P*<0.01 vs model group.

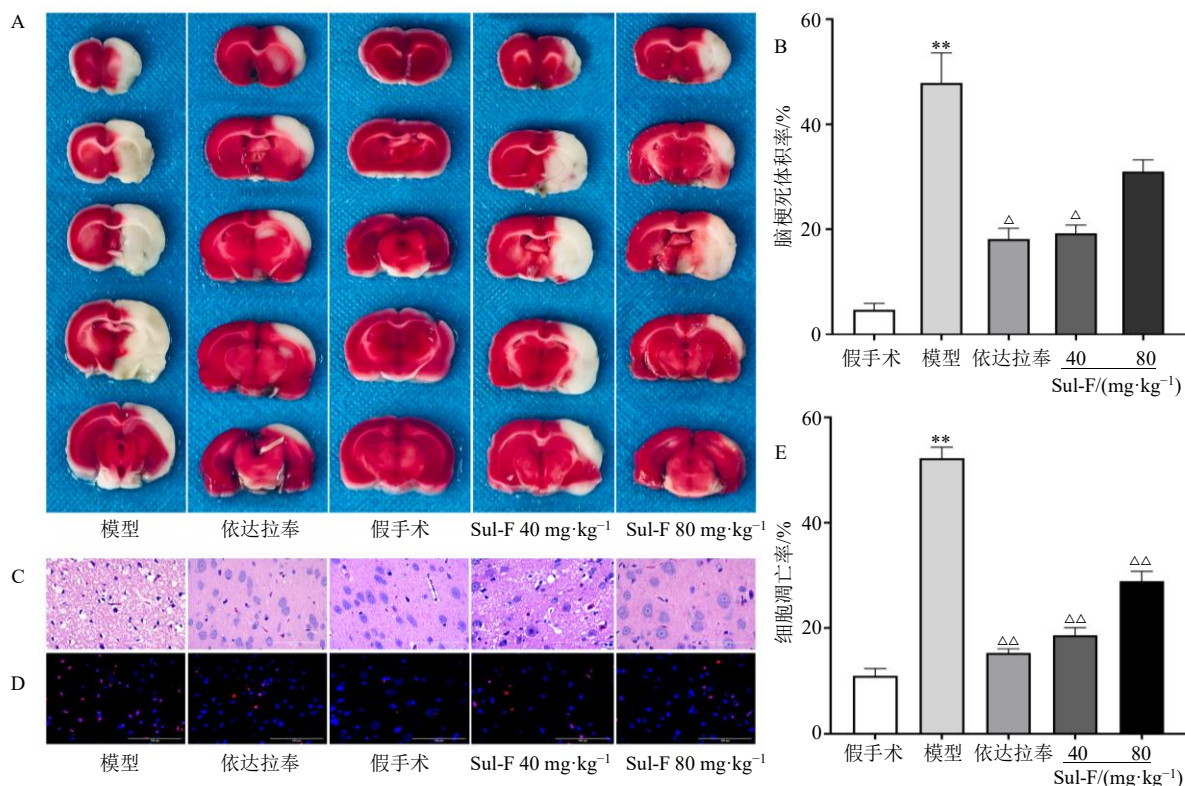
3.2 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑梗死体积的影响

如图 1-A、B 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积率显著升高 (*P*<0.01);与模型组比较,依达拉奉组和 Sul-F 高剂量组大鼠的脑梗死体积率显著降低 (*P*<0.05);依达拉奉组与 Sul-F 高剂量组比较差异无统计学意义。

3.3 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带病理损伤与细胞凋亡的影响

如图 1-C 所示,假手术组大鼠脑缺血半暗带神经细胞形态结构正常,结构致密,核仁清晰;模型组脑缺血半暗带神经细胞肿胀,空泡增多,细胞核大小不一,形态不规则,核固缩偏于细胞一侧,部分核溶解。与模型组比较,依达拉奉组与 Sul-F 高剂量组脑缺血半暗带组织病理损伤情况明显改善,Sul-F 低剂量组脑缺血半暗带组织病理损伤情况无明显改善。

如图 1-D、E 所示,与假手术组比较,模型组脑缺血半暗带 TUNEL 阳性细胞数显著增多 (*P*<0.01);与模型组比较,各给药组 TUNEL 阳性细胞数显著降低 (*P*<0.01);依达拉奉组与 Sul-F 高剂量



A-TTC 染色; B-TTC 染色相对定量; C-HE 染色 ($\times 400$); D-TUNEL 染色 ($\times 100$), 蓝色表示 DAPI 阳性, 红色表示 TUNEL 阳性, 紫色表示两者均阳性; E-凋亡率的相对定量; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$, 下同。
A-TTC staining; B-relative quantification of TTC; C-HE staining ($\times 400$); D-TUNEL staining ($\times 100$), blue indicates DAPI positive, red indicates TUNEL positive, purple indicates merged; E-relative quantification of apoptosis rate; ** $P < 0.01$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑梗死体积、脑缺血半暗带病理损伤与细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of Sul-F on volume of cerebral infarction, pathological damage to ischemic penumbra and cell apoptosis in MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组比较, TUNEL 阳性细胞数无统计学差异。

3.4 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带线粒体膜电位变化的影响

如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑缺血半暗带线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 依达拉奉组和 Sul-F 高剂量组线粒体膜电位显著升高 ($P < 0.05$), 两组之间比较无明显差异。

3.5 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑组织超微结构的影响

如图 3 所示, 假手术组大鼠脑组织线粒体丰富, 分布均匀, 线粒体嵴清晰可见, 未见明显损伤的线粒体, 无典型的线粒体自噬结构。模型组线粒体总体数量减少, 线粒体嵴不清晰、水肿, 可见典型自噬小体形成。与模型组比较, 依达拉奉组线粒体数量增多, 大部分线粒体嵴清晰, 偶见线粒体自噬结构; Sul-F 低剂量组线粒体数量增多, 一部分线粒体

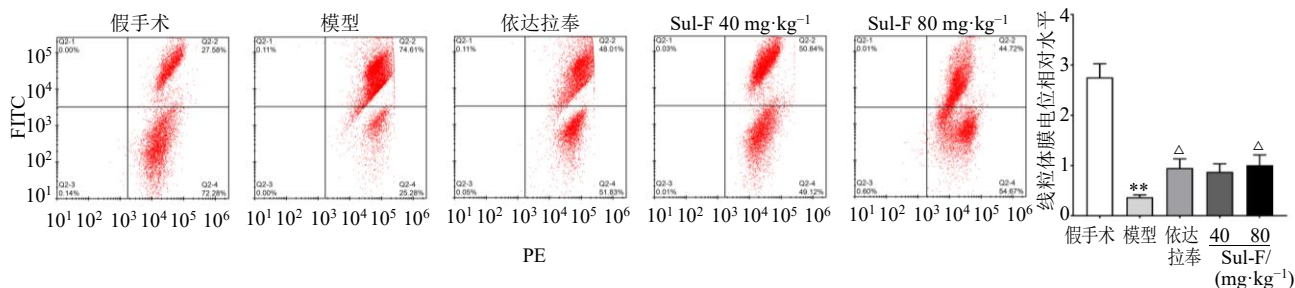
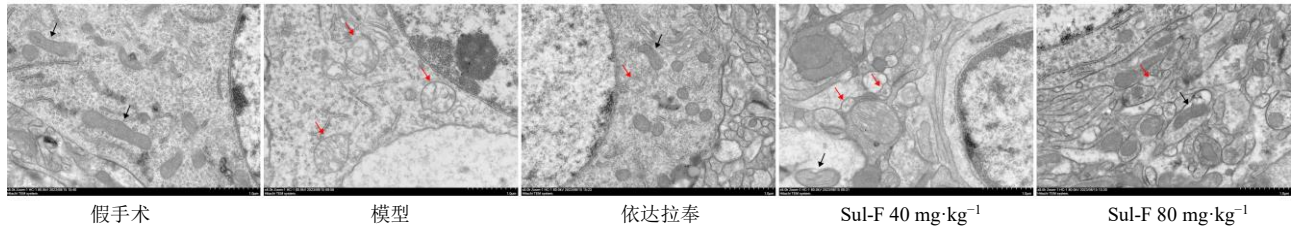


图 2 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带线粒体膜电位变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Sul-F on changes of mitochondrial membrane potential in ischemic penumbra of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



黑色箭头指向正常线粒体, 红色箭头指向异常线粒体。

Black arrows point to normal mitochondria, red arrows point to abnormal mitochondria.

图 3 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑组织超微结构的影响 ($\times 8\ 000$)

Fig. 3 Effect of Sul-F on ultrastructure of brain tissues in MCAO rats ($\times 8\ 000$)

嵴清晰, 另一部分线粒体水肿, 可见典型自噬小体形成; Sul-F 高剂量组线粒体数量增多, 大部分线粒体嵴清晰, 偶见线粒体自噬结构。

3.6 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带组织氧化应激水平的影响

如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑缺血半暗带区组织 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$),

SOD 和 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$); Sul-F 高剂量组 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$)。

3.7 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带组织 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 和蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠缺

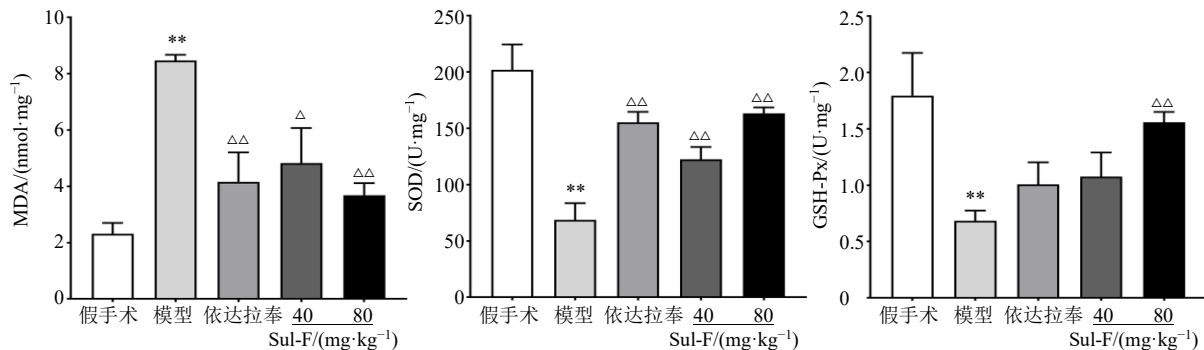


图 4 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带组织 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Sul-F on MDA level and SOD, GSH-Px activities in ischemic penumbra tissue of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

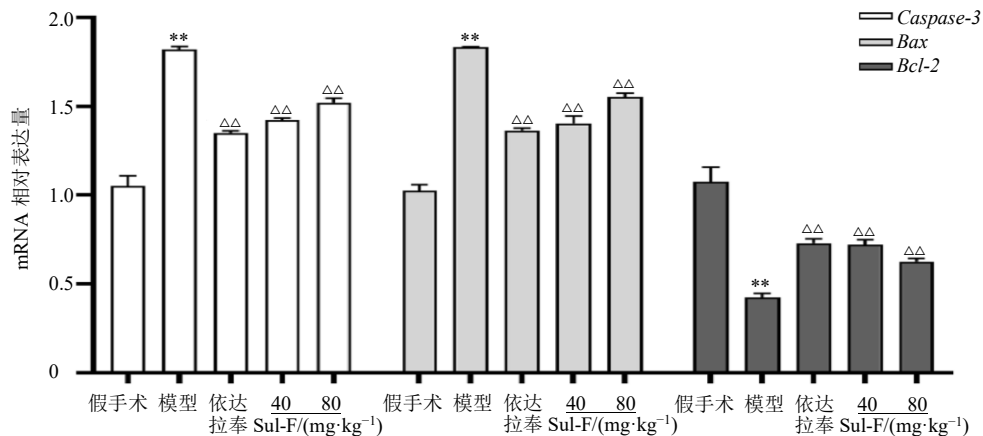


图 5 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带组织 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of Sul-F on mRNA expressions of *Bcl-2*, *Bax* and *Caspase-3* in ischemic penumbra tissue of MCAO rats

($\bar{x} \pm s, n = 5$)

血半暗带区 *Caspase-3* 和 *Bax* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠缺血半暗带区 *Caspase-3* 和 *Bax* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与依达拉奉组比较, Sul-F 高剂量组大鼠缺血半暗带区 *Caspase-3*、*Bax* 和 *Bcl-2* mRNA 表达水平无显著差异。

如图 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血半暗带区 *Caspase-3* 和 *Bax* 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), *Bcl-2* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠缺血半暗带区 *Caspase-3* 和 *Bax* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), *Bcl-2* 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与依达拉奉组比较, Sul-F 高剂量组大鼠缺血半暗带区 *Caspase-3*、*Bax* 和 *Bcl-2* 蛋白表达水平无显著差异。

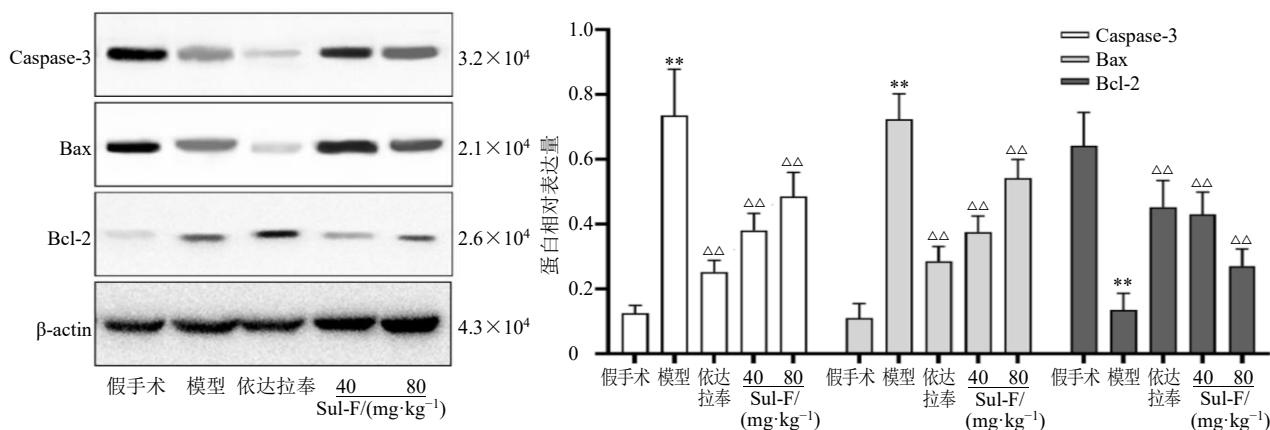


图 6 Sul-F 对 MCAO 大鼠脑缺血半暗带组织 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of Sul-F on protein expressions of *Bcl-2*, *Bax* and *Caspase-3* in ischemic penumbra tissue of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

缺血性脑卒中占有所有脑卒中的 80%~85%, 具有较高的致死率和致残率^[16]。目前, 缺血性脑卒中的治疗手段有机械取栓和药物溶栓, 以尽快恢复脑血流、挽救缺血脑组织, 但复流复氧可能加重脑组织损伤^[3,17]。脑 I/R 损伤会引发一系列的病理反应, 如离子失衡、细胞膜通透性改变、能量代谢障碍等, 最终触发凋亡程序, 引发细胞凋亡。细胞凋亡涉及线粒体通路和死亡受体通路, 其中线粒体通路是启动凋亡程序的关键。因此, 改善线粒体功能、保护神经元是治疗脑 I/R 损伤的关键。

正常情况下, 线粒体产生的自由基及其清除处于动态平衡, 在缺血等应激条件下, ROS 生成过多, 氧化还原平衡受损线粒体膜脂质过氧化和结构破坏, 造成线粒体功能紊乱和氧化应激损伤^[17]。SOD 与 GSH-Px 是机体抗氧化酶系统的重要物质, 通过清除线粒体 ROS 来减轻氧化应激损伤。线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 是由三羧酸循环产生的能量传递给电子并经呼吸链传递过程中, 将质子从线粒体内膜的基质侧泵到内膜外所形成的跨膜电位差, MMP 的下降是线粒体氧化

应激损伤的早期指标^[18]。本研究显示, 在脑 I/R 损伤时, 脑组织线粒体受损, 主要表现为线粒体肿胀变形、线粒体嵴结构不清, 可见线粒体自噬小体。同时, 线粒体膜电位显著下降, 氧化应激反应被激活, MDA 含量显著升高, SOD 和 GSH-Px 活力显著降低。

线粒体途径作为细胞凋亡的关键途径, 主要受到 *Bcl-2* 家族和 *Caspase* 家族相关基因的调控。线粒体功能受损产生大量 ROS, ROS 过度累积会触发线粒体膜通透性转换孔打开, 线粒体膜电位下降^[19]。*Bcl-2* 家族蛋白通过调节线粒体外膜通透性在细胞内凋亡信号转导中发挥重要作用。*Bax* 和 *Bcl-2* 是 *Bcl-2* 家族的主要成员, 二者通常以异源二聚体的形式存在。MMP 升高时, *Bcl-2* 表达上调, 抑制细胞色素 C 释放以维持线粒体平衡, 当 *Bax* 高表达时, MMP 降低, 线粒体中的细胞色素 C 释放入胞质中, 在三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和 dATP 的协助下生成凋亡复合物, 招募并启动 *Caspase-9*, *Caspase-9* 解体形成 cleaved *Caspase-9* 并进一步启动 *Caspase-3*, 激活下游 *Caspase* 级联瀑布, 启动线粒体介导的细胞凋亡^[20-21]。*Caspase-3* 是 *Caspase* 家族

中参与细胞凋亡的关键酶,可致线粒体膜通透性增加、DNA 断裂和染色质浓缩,可能是缺血性神经元核降解的关键执行者^[17]。本研究中,脑 I/R 损伤使促凋亡基因 Bax 表达显著上调,抑凋亡基因 Bcl-2 表达显著下调,Caspase-3 表达显著上调,提示脑 I/R 损伤时,线粒体介导的细胞凋亡途径启动。

芒柄花素是经典名方补阳还五汤君药黄芪的活性成分之一。体外研究发现,芒柄花素能够抑制多腺苷二磷酸核糖聚合酶 1/凋亡诱导因子/蛋白激酶 B (poly-adenosine diphosphate ribose polymerase/apoptosis inducing factor/protein kinase B, PARP1/AIF/Akt) 信号通路减轻糖氧剥夺/复氧复糖条件下 HT22 小鼠神经元细胞损伤^[22]。为提高其水溶性和生物利用度,经碘化反应合成芒柄花素碘酸钠。前期研究证实,Sul-F 能够通过血脑屏障、低毒^[23-25]。本研究发现,Sul-F 能够减低脑 I/R 损伤大鼠的神经功能评分、降低脑梗死体积、减轻脑缺血半暗带的病理损伤及细胞凋亡,进而改善脑 I/R 损伤。

线粒体功能障碍是脑缺血再灌注诱导神经元死亡的标志之一^[26],因此机制研究旨在探讨 Sul-F 对线粒体介导的细胞凋亡途径的影响。结果显示,Sul-F 能够降低脑组织氧化应激水平,部分逆转线粒体膜电位的降低,改善线粒体超微结构损伤,调节 Bcl-2/Bax 平衡,降低 Caspase-3 表达,进而抑制线粒体凋亡途径,降低细胞凋亡,对脑 I/R 损伤具有潜在的治疗价值。

本研究以大鼠大脑中动脉栓塞模型模拟脑 I/R 损伤,结果显示 Sul-F 干预能够降低脑组织氧化应激水平,部分逆转线粒体膜电位的降低,改善线粒体超微结构损伤,降低细胞凋亡,改善脑梗死体积和神经功能评分。进一步研究发现,Sul-F 能够降低 Bax 表达、升高 Bcl-2 表达,降低下游 Caspase-3 表达,抑制线粒体凋亡信号通路。综上,Sul-F 通过调控 Bcl-2/Bax 平衡,降低线粒体介导的细胞凋亡,改善脑缺血再灌注损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990—2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(5): 439-458.
- [2] 王拥军,李子孝,谷鸿秋,等. 中国卒中报告 2020 (中文版) (1) [J]. 中国卒中杂志, 2022, 17(5): 433-447.
- [3] Shen L A, Gan Q Y, Yang Y C, *et al*. Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 687246.
- [4] Wu M M, Gu X P, Ma Z L. Mitochondrial quality control in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10): 5253-5271.
- [5] Del Zoppo G J, Saver J L, Jauch E C, *et al*. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: A science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2009, 40(8): 2945-2948.
- [6] 霍晓川,高峰. 急性缺血性卒中血管内治疗中国指南 2018 [J]. 中国卒中杂志, 2018, 13(7): 706-729.
- [7] Shao L, She Y, Yong S N, *et al*. An evidence-based evaluation of Buyang Huanwu Decoction for the treatment of the sequelae of stroke: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154312.
- [8] 谯茹,樊启猛,贺鹏,等. 补阳还五汤抗脑卒中网络动力学研究 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 127-137.
- [9] 袁磊,杨进平,闻瑛,等. 补阳还五汤治疗缺血性中风恢复期(气虚血瘀)的临床疗效及对 Hcy 影响的临床研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 195-197.
- [10] Li L Q, Wang Y, Wang X Y, *et al*. Formononetin attenuated allergic diseases through inhibition of epithelial-derived cytokines by regulating E-cadherin [J]. *Clin Immunol*, 2018, 195: 67-76.
- [11] Mu H, Bai Y H, Wang S T, *et al*. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover) [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(4): 314-319.
- [12] Sun T, Wang J, Huang L H, *et al*. Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT_{2A/1B} receptors and α 1-adrenoceptors in spontaneously rat arteries [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 699(1/2/3): 241-249.
- [13] 胡泓博,夏传余,李光武. 丁香酚吸嗅对 MCAO 模型大鼠脑源性神经营养因子的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(1): 28-32.
- [14] 谢明,朱俊德,周璐,等. 依达拉奉对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激及凋亡的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(4): 418-424.
- [15] 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.
- [16] Zhao Z Y, Pan Z R, Zhang S, *et al*. Neutrophil extracellular traps: A novel target for the treatment of stroke [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 241: 108328.

- [17] Zhang Q, Jia M, Wang Y F, *et al.* Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12): 3525-3542.
- [18] Younes N, Alsahan B S, Al-Mesaifri A J, *et al.* JC-10 probe as a novel method for analyzing the mitochondrial membrane potential and cell stress in whole zebrafish embryos [J]. *Toxicol Res*, 2021, 11(1): 77-87.
- [19] Wang X Q, Tang D D, Zou Y W, *et al.* A mitochondrial-targeted peptide ameliorated podocyte apoptosis through a HOCl-alb-enhanced and mitochondria-dependent signalling pathway in diabetic rats and *in vitro* [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34(1): 394-404.
- [20] Liu Z, Mou G Z, Liang Z M, *et al.* Selenomethionine alleviates intestinal ischemia-reperfusion injury in mice through the Bax-Caspase pathway [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(7): 3205-3214.
- [21] Kaplan P, Tatarkova Z, Sivonova M K, *et al.* Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.
- [22] 郁丽, 王涓, 王文秀, 等. 基于 PARP1 信号通路研究芒柄花素对糖氧剥夺/复氧复糖神经元细胞损伤的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(2): 207-211.
- [23] Li C M, Gao Y L, Wang Y Z, *et al.* Genotoxicity testing of sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) by assessing bacterial reverse mutation, chromosomal aberrations and micronucleus tests [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 86: 374-378.
- [24] Li G S, Yang M L, Hao X M, *et al.* Acute toxicity of sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 73(2): 629-633.
- [25] Li C M, Li G S, Gao Y L, *et al.* A 90-day subchronic toxicity study with sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) delivered to dogs via intravenous administration [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 77: 87-92.
- [26] He Z, Ning N, Zhou Q, *et al.* Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 146: 45-58.

[责任编辑 李亚楠]