

菊花提取物对大鼠缺血性脑卒中后肌肉萎缩的改善作用

祁 琥^{1,2}, 田 丹^{1,3}, 张雄伟^{1,2}, 高元琳^{1,2}, 张泽洋^{1,2}, 曾 南^{1,2*}, 杨若聪^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

3. 成都中医药大学针灸推拿学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 采用大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型, 探究菊花 *Chrysanthemum morifolium* 提取物对缺血性脑卒中后肌肉萎缩的改善作用。方法 雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、二甲双胍 (0.2 g/kg) 组和菊花提取物高、低剂量 (1.08、0.54 g/kg) 组, 每组 7 只。建立 MCAO 大鼠模型, 连续给药 7 d。通过激光散斑系统评估 MCAO 模型稳定性; 采用 Zea-Longa 评分评估大鼠的神经功能损伤; 采用小动物跑步机评估运动能力; 使用小动物超声系统检测肌肉厚度。末次行为学检测后, 取比目鱼肌, 测定长度和质量, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色检测肌肉细胞横截面积; 采用 ELISA 法检测血清和比目鱼肌中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 水平; 采用免疫组化法检测比目鱼肌中肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶-1 (muscle ring-finger protein-1, MuRF1) 和肌肉萎缩 F 盒蛋白 (muscle atrophy F box protein, MAFbx) 的表达; 采用 Western blotting 检测比目鱼肌中 MuRF1、MAFbx、TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达。结果 与模型组比较, 菊花提取物可以改善 MCAO 模型大鼠的神经功能损伤和运动能力 ($P < 0.01$ 、 0.001), 增加肌肉厚度、比目鱼肌长度和质量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 改善术后肌肉细胞横截面减少 ($P < 0.05$), 降低血清和比目鱼肌中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 下调比目鱼肌中 MuRF1、MAFbx、TNF- α 和 IL-6 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 菊花提取物能够通过抑制血清和肌肉中炎症因子水平, 下调肌肉萎缩因子 MuRF1 和 MAFbx 的表达, 减少肌肉蛋白质分解, 从而提高卒中后大鼠的运动能力并改善肌肉萎缩。

关键词: 菊花; 缺血性脑卒中; 肌肉萎缩; 运动能力; 炎症; 蛋白质分解; 绿原酸; 木犀草苷; 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸; 木犀草素; 芹菜素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)20-6973-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.014

Improvement effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on muscle atrophy after ischemic stroke in rats

QI Hu^{1,2}, TIAN Dan^{1,3}, ZHANG Xiongwei^{1,2}, GAO Yuanlin^{1,2}, ZHANG Zeyang^{1,2}, ZENG Nan^{1,2}, YANG Rucong^{1,2}

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To investigate the improvement effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on muscle atrophy after ischemic stroke using a rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham group, model group, metformin (0.2 g/kg) group, *C. morifolium* extract high- and low-dose (1.08, 0.54 g/kg) groups, with seven rats in each group. MCAO rat model was established and drugs were administered continuously for 7 d. The stability of MCAO model was

收稿日期: 2024-06-05

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104732); 成都中医药大学杏林学者项目 (BSH2020022); 天府青城计划专项-天府名师 (500005006)

作者简介: 祁 琥 (1998—), 男, 博士研究生, 主要从事中药药效学与毒理学研究。Tel: 13348823345 E-mail: qihu@stu.cdutcm.edu.cn

*通信作者: 杨若聪 (1992—), 男, 讲师, 主要从事中药及中药复方药效研究。Tel: 18801176468 E-mail: yangrucong@163.com

曾 南 (1969—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药效学与毒理学研究。Tel: 13198502352 E-mail: 19932015@cdutcm.edu.cn

evaluated through laser speckle system; The Zea-Longa score was used to evaluate the neurological damage in rats; A small animal treadmill was used to evaluate exercise ability; A small animal ultrasound system was used to detect muscle thickness. After the last behavioral test, the soleus muscle was taken and its length and weight were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the cross-sectional area of muscle cells; ELISA was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 in serum and soleus muscle; Immunohistochemistry was used to detect the expressions of muscle ring-finger protein-1 (MuRF1) and muscle atrophy F box protein (MAFbx) in soleus muscle; Western blotting was used to detect the protein expressions of MuRF1, MAFbx, TNF- α , and IL-6 in soleus muscle. **Results** Compared with model group, *C. morifolium* extract could improve the neurological damage and motor ability of MCAO model rats ($P < 0.01, 0.001$), increase muscle thickness, soleus muscle length and weight ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), improve the reduction of muscle cell cross-section after surgery ($P < 0.05$), reduce the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum and soleus muscle ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and down-regulate the expressions of MuRF1, MAFbx, TNF- α and IL-6 in soleus muscle ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** *C. morifolium* extract can improve the motor ability and muscle atrophy of post-stroke rats by inhibiting the levels of inflammatory factors in serum and muscle, down-regulating the expressions of muscle atrophy factors MuRF1 and MAFbx to reduce muscle protein breakdown.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; ischemic stroke; muscle atrophy; motor ability; inflammation; breakdown of proteins; chlorogenic acid; cynaroside; 3,5-*O*-dicafeoylquinic acid; luteolin; apigenin

脑卒中是导致死亡的第二大杀手以及我国首位的疾病致死原因，也是导致长期残疾的重要危险因素。缺血性脑卒中占脑卒中的 69.6%~70.8%^[1]，80% 的幸存者存在严重的身体障碍^[2]，大多数患者无法重返工作岗位或胜任以前的工作，给患者家庭带来了巨大的经济压力，严重阻碍社会发展^[3]。肌少症是一种以骨骼肌质量和力量减少为特征的疾病，最早由 Rosenberg 于 1989 年发现^[3]。最初认为肌少症主要影响 65 岁以上的人群，2018 年欧洲老年人肌肉减少症工作组将肌少症这一观点扩展到年轻人群^[4]，并强调其与各种疾病的关联。

骨骼肌为卒中致残的主要效应器之一，这种致残主要来自中枢病变。目前认为卒中通过多种机制导致肌肉异常，如废用性萎缩、慢性炎症、去神经支配、线粒体功能障碍等^[5]。有报道指出肌肉萎缩主要与慢性炎症诱导的泛素化蛋白酶体降解途径有关，在地塞米松诱导的 C1C12 肌管细胞中检测到了肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、细胞白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等炎症因子含量的显著增加^[6]，同时观察到了肌管细胞的减小与横截面缩小^[7]。在诱导后的 C1C12 细胞中检测到肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶-1 (muscle ring-finger protein-1, MuRF1) 和肌肉萎缩 F 盒蛋白 (muscle atrophy F box protein, MAFbx) 表达显著升高，成肌分化蛋白 1 (myogenic differentiation 1, MyoD1) 的表达显著减少，蛋白质合成受到抑制^[8]；而用 sh-RNA 沉默 MAFbx 后，肌管细胞蛋白质降解显著减少。还有研究指出，肌肉生长抑制素、MuRF1/MAFbx、

TNF- α 、IL-6 在恶病质诱导的肌少症患者中起决定性因素^[9-10]。现有的大多数文献对肌病的研究是孤立的，往往忽略了其与其他疾病或恶病质之间的相互关系，因此目前对卒中后肢体肌肉损伤机制的研究尚不清楚。

亳菊是《中国药典》2020 年版所载菊花的基原之一^[11]，在我国的药食领域中广泛应用^[12]。《本经》中提到：“亳菊主风头眩肿痛，恶风，湿痹，久服利血气，轻身”。《别录》中指出：“疗腰痛去来陶陶，利五脉，调四肢”。《药性论》提到：“治热头风眩倒地，脑骨疼痛，身上诸风令消散”。菊花中富含大量碳环芳香族酚酸、黄酮类和萜类化合物，《中国药典》2020 年版中以绿原酸、木犀草苷和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为标志物^[13]。已有文献报道，菊花提取物通过抑制 MuRF1/MAFbx 的表达和改善线粒体功能，缓解地塞米松诱导的肌肉萎缩^[14]。此外，绿原酸能够通过调控半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3/6 (cysteine-aspartate protease-3/6, Caspase-3/6) 的表达减少肌肉细胞凋亡^[15]；木犀草苷可以抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体的表达减少 C1C12 细胞焦亡，从而改善细胞萎缩^[16-17]。课题组前期研究发现，卒中后的肌肉组织中 TNF- α 、NLRP3 等炎症因子的表达显著上调，推测菊花提取物能够通过抑制卒中后肌肉组织的慢性炎症，从而改善肌肉萎缩并提高运动表现。故本研究通过建立大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型，探究菊花提取物能否通过减少炎症因子的含量来抑制肌肉萎缩因子 MuRF1/MAFbx 的表达

从而改善卒中后的肌肉萎缩,以期进一步丰富、完善菊花提取物改善卒中后肢体症状的作用机制。

1. 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只,体质量 240~260 g,购自北京 SPF 生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010。大鼠饲养于温度 22~25 ℃、相对湿度 40%~60% 的 SPF 环境中,适应性喂养 1 周。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 2024054)。

1.2 药材

毫菊(产地安徽,批号 220322)购自四川省中药饮片有限公司,经成都中医药大学中药鉴定教研室严铸云教授鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序,符合《中国药典》2020 年版规定。

1.3 药品与试剂

注射用盐酸替来他明/盐酸唑拉西洋(舒泰-50,批号 BN8LXLA)、二甲双胍(国药准字 H20113492,批号 FCS1208001)购自华北制药有限公司;IL-1 β 试剂盒(批号 MM-0047R1)、IL-6 试剂盒(批号 MM-0163M1)、TNF- α 试剂盒(批号 MM-0180R1)购自江苏酶免实业有限公司;胶原酶 II(批号 40508ES76)购自翌圣生物科技有限公司;10% SDS-PAGE 凝胶(批号 P0012A)、RIPA 缓冲液(批号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 120720210429)购自碧云天生物技术有限公司;MuRF1 抗体、MAFbx 抗体、TNF- α 抗体、IL-6 抗体(批号分别为 55456-1-AP、67172-1-Ig、17590-1-AP、66146-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;GAPDH 兔多克隆抗体(批号 GB11002)购自 Servicebio 公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;ECL 试剂盒(批号 4AW011-100)购自四正柏生物技术有限公司。二抗 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自博士德生物(批号 BST16A04A16A54)。

1.4 仪器

Ultimate3000 型高效液相色谱仪、Revos 脱水机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SYNS00000 型纯水仪(美国 Millipore 公司);JCS 型电子天平秤(英衡电器有限公司);VarioskanFlash 全波长多功能酶标仪、SA101B 型小动物跑步机、SA417 型握力仪(SANS 公司);RFSLI ZW/RFLSI III 型激光散斑系统(瑞沃德公司);JB-P5 型包埋机、TP1020

型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);PannoramicSCAN II 型病理切片扫描仪(山东斯瑞缔医疗科技有限公司);ChemiDoc 免染型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 菊花提取物的制备及成分分析

2.1.1 菊花提取物的制备 用高速研磨机将 250 g 毫菊研磨成 0.2 cm 大小的颗粒,用甲醇以 1:1 000 的比例超声处理样品 50 min;在 65 ℃ 的恒温条件下使用冷凝管进行萃取,连续萃取 3 次,浓缩得到提取物(53.42 g)。将菊花提取物溶解在纯水中,制成 250 mL 浓缩液备用。菊花提取物经过冷冻干燥后,精确称取 0.01 g 后加入 1 mL 甲醇配制成 1% 的溶液,用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过,待进一步分析。

2.1.2 菊花提取物成分分析 参照《中国药典》2020 年版方法,并对 HPLC-MS 条件进行优化。

(1) 色谱条件: Accucore™ C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.2 μ m),流动相为 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱: 0~14 min, 8%~18% B; 14~40 min, 18% B; 40~50 min, 18%~30% B; 50~70 min, 30%~45% B; 70~80 min, 45%~95% B。体积流量 0.5 mL/min;柱温 27 ℃;进样量 5 μ L。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子源(ESI)进行正、负离子检测;喷雾电压为 3 000 V;离子源温度为 350 ℃;鞘气体积流量为 35 arb;辅助气体流量为 10 arb;离子传输管温度为 320 ℃;扫描模式为全扫描/依赖数据的二级扫描,一级分辨率为 70 000,二级分辨率为 17 500,扫描范围为 m/z 100~1 500。

2.2 动物造模、分组与给药

SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、二甲双胍(0.2 g/kg)组和菊花提取物高、低剂量(1.08、0.54 g/kg,分别相当于临床等效剂量的 10、5 倍)组,每组 7 只。使用舒泰 50 对大鼠进行麻醉,用手术剪刀在每只大鼠的喉部和胸骨之间沿紧密的中腹线切开 2.5~4.0 cm 的切口。依次暴露左颈总动脉(left common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid, ICA)、动脉(artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid, ICA)。然后,将带有圆形尖端的尼龙缝合线从 CCA 轻轻推进 ICA 内腔,以闭合颈动脉^[18]进行 MCAO 造模。于术后第 1 天开始给药,每日

1 次, 连续给药 7 d, 各给药组大鼠 ig 相应药物 (10 mL/kg), 假手术组与模型组 ig 等体积的生理盐水。在第 7 天给药采集行为学数据后进行取材。

2.3 激光散斑系统评估 MCAO 模型稳定性

在术中使用激光散斑系统对梗死侧的脑灌注进行模型稳定性评价, 以保持插栓深度一致避免人为误差。波长设置为 671 nm, 自动曝光、最大分辨率模式。采集图像后分析平均灌流量。

2.4 神经功能损伤评分

MCAO 术后第 1、3、5、7 天, 采用 Zea-Longa 评分^[18]评估大鼠的神经功能损伤。评分标准: 0 分, 无损伤; 1 分, 抬起时左前爪不能完全伸展; 2 分, 缓慢爬行和向对侧倾斜; 3 分, 只有在受到刺激时才能行走且意识水平下降; 4 分, 对刺激无反应。

2.5 体质量与运动功能评价

MCAO 术后第 1、3、5、7 天, 测定大鼠体质量, 并使用跑步机 (刺激电流强度为 1.50 mA、跑道速度为 10 m/min) 评估 5 min 内大鼠的跑步距离和力竭次数, 6 只动物同时接受测试, 仪器停止后收集各组数据。

2.6 肌肉厚度评价

采用小动物超声系统对 MCAO 术后第 1、7 天的大鼠患侧后肢腿部肌肉进行超声扫描。参数设置为: 大鼠模式、21 MHz、100%电源、34 FPS、18 dB。斜侧平稳扫描肌肉并记录拍照, 使用 Vevo Analysis 软件分析。

2.7 比目鱼肌的长度和质量测定

MCAO 术后第 7 天, 大鼠麻醉后仰卧位固定, 用玻璃钩剥离皮肤与肌肉, 小心分离比目鱼肌避免组织损伤。称定比目鱼肌的质量并测量长度。

2.8 比目鱼肌 HE 染色

取大鼠比目鱼肌, 固定于 4%多聚甲醛溶液中 72 h, 脱水后包埋在石蜡中, 切成 3 mm 薄片, 脱蜡后按试剂盒说明书进行染色^[19]。装片后, 于显微镜下观察并拍照, 采用病理切片扫描仪分析肌肉细胞横截面。

2.9 血清和比目鱼肌中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平的检测

大鼠腹主动脉采血后, 静置 2 h, 3 500 r/min 离心 15 min, 收集血清。取大鼠比目鱼肌 50 mg, 用胶原酶 II 匀浆, 2 500 r/min 离心 20 min, 收集上清液。按照试剂盒说明书测定血清和比目鱼肌中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量^[20]。

2.10 免疫组化法检测比目鱼肌 MuRF1 和 MAFbx 表达

取固定后的比目鱼肌, 石蜡包埋后, 切片, 脱蜡, 进行抗原修复, 滴加血清封闭后, 滴加 MuRF1 和 MAFbx 一抗, 孵育过夜; 孵育二抗, DAB 显色后, 复染细胞核, 脱水封固。于显微镜下观察并拍照。

2.11 Western blotting 检测比目鱼肌 TNF- α 、IL-6、MuRF1、MAFbx 蛋白表达

取各组大鼠比目鱼肌, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。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, 加入 5%牛血清白蛋白, 室温封闭 2 h, 加入 MuRF1、MAFbx、TNF- α 、IL-6 抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 5 次, 每次 30 min, 加入二抗, 室温孵育 1.5 h。TBST 洗膜后, 使用 ECL 试剂盒显影, 使用 Image Lab 3.0 软件分析条带灰度值。

2.12 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据符合正态分布使用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 非正态分布数据使用非参数检验分析。

3 结果

3.1 菊花提取物成分分析

如图 1 所示, 绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、木犀草素、芹菜素的质量分数分别为 0.314%、1.126%、1.204%、0.545%、0.163%, 符合《中国药典》2020 年版规定。

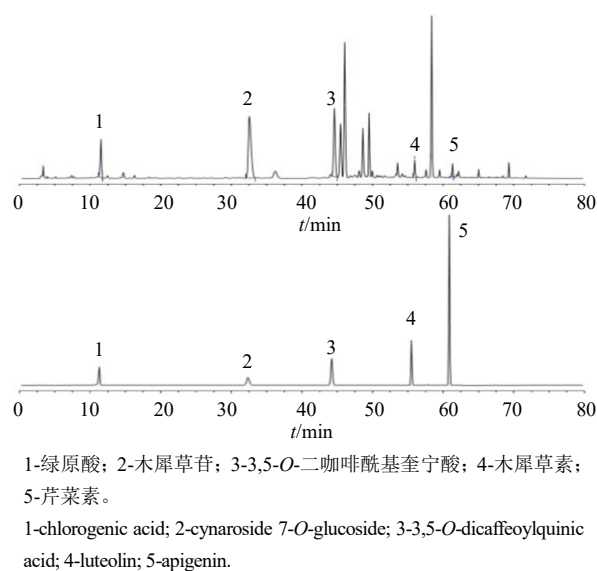


图 1 菊花提取物的成分分析

Fig. 1 Component analysis of *C. morifolium* extract

3.2 MCAO 模型稳定性评价

为了保证 MCAO 模型损伤程度一致,减少人为误差,对所有模型动物进行激光散斑血流评价。如

图 2 和表 1 所示,除假手术组外,其余大鼠右脑均表现出缺血症状且组间无显著差异,说明造模成功并且 MCAO 模型损失程度一致。

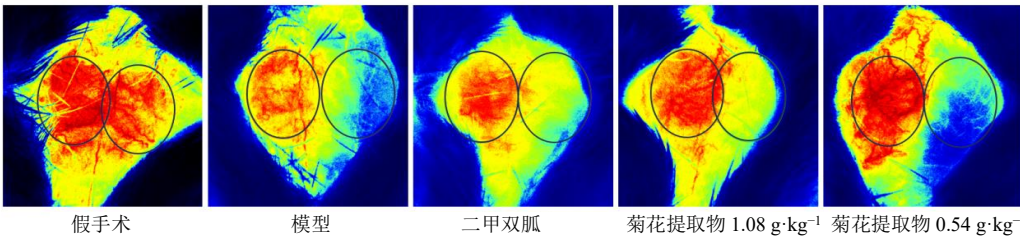


图 2 造模后大鼠激光散斑血液灌注图

Fig. 2 Laser speckle blood perfusion map of rats after modeling

表 1 造模后大鼠左右脑灌注量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Left and right brain perfusion of rats after modeling ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	左脑灌注量/PU	右脑灌注量/PU
假手术	—	1 204.5±76.9	1 122.9±63.3
模型	—	1 144.5±76.3	730.2±23.6###
二甲双胍	0.20	1 184.7±82.3	735.8±54.1###
菊花提取物	1.08	1 155.9±53.6	697.3±68.7###
	0.54	1 175.8±54.4	698.9±21.1###

与假手术组比较: ### $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs sham group.

3.3 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠神经功能损伤的影响

如表 2 所示,与假手术组比较,模型组大鼠神经功能损伤评分均显著升高 ($P < 0.001$);与模型组

比较,第 5、7 天各给药组大鼠神经功能损伤评分均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。表明菊花提取物具有改善 MCAO 模型大鼠神经功能损伤的作用。

3.4 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠运动功能的影响

如表 3 所示,与假手术组比较,模型组大鼠 5 min 内的跑步距离显著减少 ($P < 0.001$),力竭次数显著增加 ($P < 0.001$);与模型组比较,第 5、7 天二甲双胍组和菊花提取物高剂量组大鼠 5 min 内的跑步距离显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001),力竭次数显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01);第 7 天菊花提取物低剂量组大鼠 5 min 内的跑步距离显著增加 ($P < 0.05$)。

3.5 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠肌肉厚度的影响

如图 3 和表 4 所示,与假手术组比较,第 7 天

表 2 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠神经功能损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of *C. morifolium* extract on neurological dysfunction of MCAO model rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经功能损伤评分			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
假手术	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	3.66±0.52###	3.67±0.52###	3.83±0.41###	4.00±0.00###
二甲双胍	0.20	3.50±0.55	3.50±0.55	2.83±0.75**	2.00±0.89***
菊花提取物	1.08	3.17±0.75	3.50±0.55	2.33±0.52***	1.50±0.55***
	0.54	3.33±0.52	3.33±0.82	2.66±0.82**	2.83±0.75**

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;下表同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; same as below tables.

表 3 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠运动功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of *C. morifolium* extract on motor function of MCAO model rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	5 min 内的跑步距离/m				5 min 内的力竭次数			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
假手术	—	49.30±0.00	49.30±0.00	49.30±0.00	49.50±0.00	4.80±3.11	5.40±3.36	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	21.48±8.51###	14.80±7.94###	8.70±5.75###	8.10±2.87###	96.00±6.28###	100.00±0.00###	100.00±0.00###	100.00±0.00###
二甲双胍	0.20	21.84±6.22	13.10±7.79	19.96±4.38**	26.38±9.55***	96.40±5.13	88.21±16.20	65.61±30.62*	51.00±15.03**
菊花提	1.08	20.00±6.06	15.10±3.87	19.60±7.53**	22.60±5.64**	98.40±2.61	91.60±14.29	66.00±34.69*	62.00±29.76**
取物	0.54	18.26±8.75	12.38±5.35	14.38±4.21	16.66±6.27*	96.41±5.13	100.00±0.00	85.60±16.77	76.80±26.58

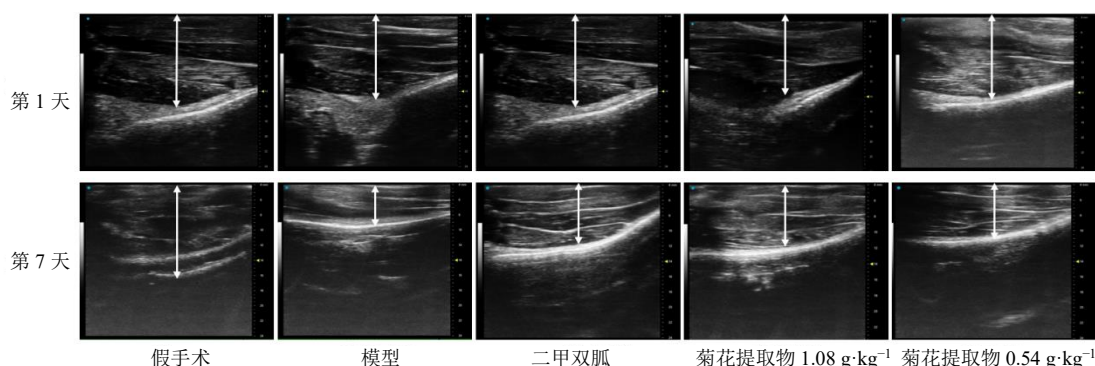


图 3 各组大鼠肌肉超声图

Fig. 3 Ultrasound images of muscles in each group of rats

表 4 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠肌肉厚度的影响
($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 4 Effect of *C. morifolium* extract on muscle thickness of MCAO model rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	肌肉厚度/mm	
		第 1 天	第 7 天
假手术	—	11.32 ± 1.02	11.79 ± 1.09
模型	—	11.67 ± 1.14	6.88 ± 1.20 ^{###}
二甲双胍	0.20	11.56 ± 1.38	10.32 ± 1.68 ^{**}
菊花提取物	1.08	11.90 ± 1.02	10.12 ± 1.46 ^{**}
	0.54	11.47 ± 1.25	9.11 ± 1.08 [*]

模型组大鼠肌肉厚度显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肌肉厚度显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌质量与长度的影响

如表 5 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠比目鱼肌质量显著降低 ($P < 0.001$), 长度显著缩短 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 二甲双胍组和菊花提取物高剂量组比目鱼肌质量显著升高 ($P < 0.01$), 二甲双胍组和菊花提取物各剂量组比目鱼肌长度显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.001), 与肌肉超声结果一致。

表 5 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌质量与长度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 5 Effect of *C. morifolium* extract on weight and length of soleus muscle in MCAO model rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

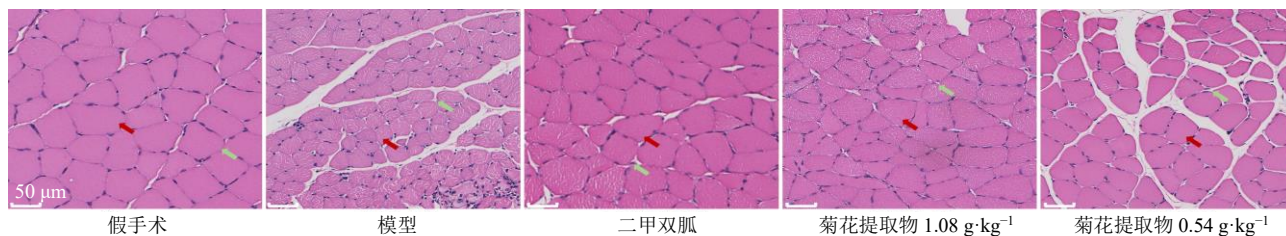
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肌肉质量/g	肌肉长度/mm
假手术	—	0.13 ± 0.01	19.91 ± 2.31
模型	—	0.08 ± 0.01 ^{###}	12.66 ± 2.79 ^{###}
二甲双胍	0.20	0.13 ± 0.01 ^{**}	18.03 ± 2.39 ^{***}
菊花提取物	1.08	0.13 ± 0.01 ^{**}	17.81 ± 2.23 ^{***}
	0.54	0.10 ± 0.03	14.65 ± 1.53 [*]

3.7 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌病理变化的影响

如图 4 和表 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠肌肉细胞横截面积显著降低 ($P < 0.001$), 肌肉细胞间隙增大, 细胞形态趋于圆形并且伴随炎性细胞浸润; 与模型组比较, 菊花提取物高剂量组大鼠肌肉细胞横截面积显著增加 ($P < 0.05$), 同时具有显著维持细胞间隙紧密的作用。表明菊花提取物可以通过增加肌肉细胞横截面积来对抗 MCAO 后肌肉萎缩的发生。

3.8 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠血清和比目鱼肌中炎症因子水平的影响

如表 7、8 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠



红色箭头表示典型细胞, 绿色箭头表示典型细胞间隙。

Red arrows represent typical cells and green arrows represent typical intercellular spaces.

图 4 各组大鼠比目鱼肌 HE 染色 (×40)

Fig. 4 HE staining of soleus muscle of rats in each group (×40)

表 6 各组大鼠肌肉细胞横截面积 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 6 Cross sectional area of muscle cells of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肌肉细胞横截面积/μm ²
假手术	—	2 785.66±86.18
模型	—	1 560.93±36.30###
二甲双胍	0.20	2 524.31±82.99**
菊花提取物	1.08	2 317.09±130.29*
	0.54	1 919.42±372.93

表 7 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	73.76±22.12	33.40±10.00	52.15±11.25
模型	—	360.15±39.32###	170.34±15.53###	271.20±45.53###
二甲双胍	0.20	230.04±35.11***	73.82±12.24***	125.43±20.95***
菊花提取物	1.08	175.87±64.59***	44.13±9.17***	96.16±25.33***
	0.54	225.11±52.34***	69.80±27.06**	109.81±33.58**

表 8 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	95.79±27.24	27.87±8.35	47.20±13.76
模型	—	291.52±85.20###	141.25±40.31###	219.88±43.05###
二甲双胍	0.20	143.77±53.12***	51.01±13.54*	98.61±30.62***
菊花提取物	1.08	138.72±28.50***	47.27±20.70**	68.48±23.18***
	0.54	179.43±38.11**	56.67±19.32*	86.52±29.09**

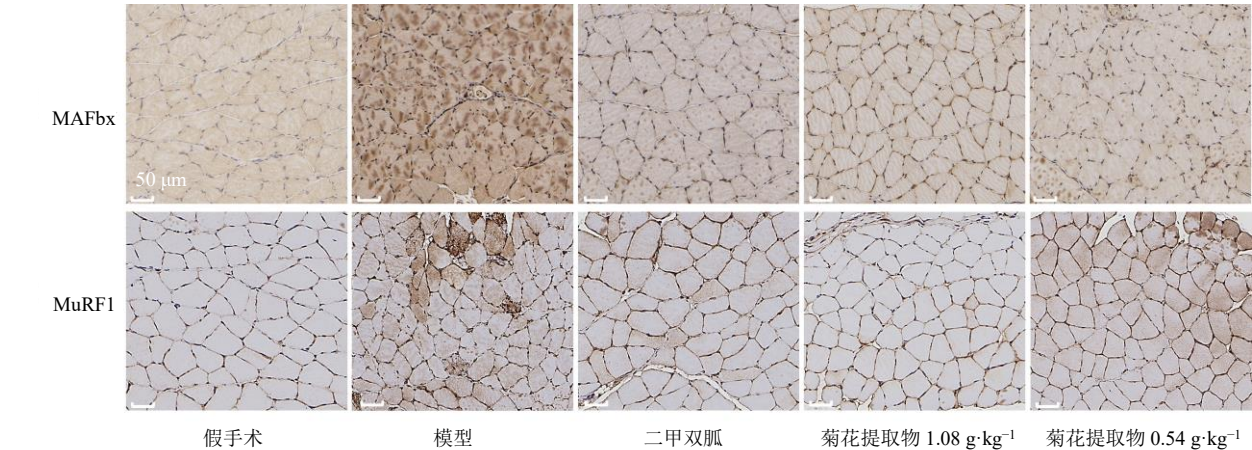


图 5 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌中 MuRF1 和 MAFbx 表达的影响 (×40)

Fig. 5 Effect of *C. morifolium* extract on expressions of MuRF1 and MAFbx in soleus muscle of MCAO model rats (× 40)

鼠比目鱼肌中肌肉萎缩因子 MuRF1 和 MAFbx 阳性表达显著增加 ($P < 0.001$), 提示卒中后肌肉萎缩的发生; 与模型组比较, 各给药组 MuRF1 和 MAFbx 的阳性表达显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明菊花提取物通过抑制肌肉萎缩因子表达改善卒中后肌肉

血清和比目鱼肌中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.001$), 各给药组大鼠血清和比目鱼肌中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明菊花提取物具有抑制肌肉中炎症的作用。

3.9 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌中 MuRF1 和 MAFbx 表达的影响

如图 5 和表 9 所示, 与假手术组比较, 模型组大

萎缩。

3.10 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌中 TNF-α、IL-6、MuRF1 和 MAFbx 蛋白表达的影响

如图 6 和表 10 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠比目鱼肌中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达

水平显著升高 ($P<0.01$), 提示卒中后肌肉组织存在炎症状态, 与 ELISA 结果一致; 同时肌肉萎缩因

表 9 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌中 MuRF1 和 MAFbx 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 9 Effect of *C. morifolium* extract on expressions of MuRF1 and MAFbx in soleus muscle of MCAO model rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	MuRF1 阳性率/%	MAFbx 阳性率/%
假手术	—	6.28±2.05	6.07±1.02
模型	—	24.86±3.38 ^{###}	26.08±1.69 ^{###}
二甲双胍	0.20	9.81±2.82 ^{***}	10.38±1.77 ^{***}
菊花提取物	1.08	10.97±2.44 ^{***}	11.58±1.73 ^{***}
	0.54	12.58±2.04 ^{***}	13.82±2.82 ^{**}

表 10 菊花提取物对 MCAO 模型大鼠比目鱼肌中 TNF-α、IL-6、MuRF1 和 MAFbx 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 10 Effect of *C. morifolium* extract on expressions of TNF-α, IL-6, MuRF1 and MAFbx protein in soleus muscle of MCAO model rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		TNF-α/Vinculin	IL-6/Vinculin	MuRF1/Vinculin	MAFbx/Vinculin
假手术	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	1.45±0.11 ^{##}	1.69±0.13 ^{##}	1.57±0.08 ^{###}	1.55±0.02 ^{##}
二甲双胍	0.20	1.12±0.17	1.19±0.08 [*]	1.16±0.05 ^{***}	1.01±0.15 ^{**}
菊花提取物	1.08	1.08±0.07 [*]	1.02±0.13 ^{**}	1.04±0.11 ^{***}	1.01±0.11 ^{**}
	0.54	1.07±0.14 [*]	1.08±0.22 ^{**}	0.99±0.10 ^{***}	0.99±0.32 ^{**}

子 MuRF1 和 MAFbx 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), 提示肌肉萎缩的发生。与模型组比较, 菊花提取物各剂量组显著抑制炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 并且效果优于二甲双胍; 同时菊花提取物各剂量组能够显著抑制 MuRF1 和 MAFbx 的表达 ($P<0.01$ 、 0.001), 从而减少肌肉蛋白质的分解。

4 讨论

大脑中动脉为脑梗塞高发区, 由于个体差异, 难以精确分析脑卒中病理生理特点和药物疗效。二甲双胍已被证实能够通过增强骨骼肌活力和抑制炎症小体激活来改善骨骼肌萎缩^[21-22]。然而, 二甲双胍在缺血性卒中中的应用仍具争议, 因此, 从传统中药挖掘安全有效的治疗药物十分重要。

当前依据缺血性脑卒中的临床表现, 将其归属于中医学“中风”范畴。现代研究认为, 缺血性脑卒中多因痰浊为病, 与瘀血交结, 留滞于经络, 脉道不利, 阴阳失调, 气血逆乱, 上犯于脑, 发为中风。《金匱要略》里面提到: “夫风之为病, 当半身不遂, 或但臂不遂者, 此为痹。脉微而数, 中风使然”。菊花是中医传统应用中药食同源的药物, 临床

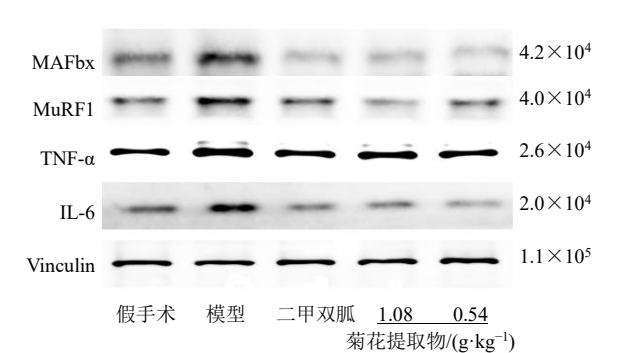


图 6 各组大鼠比目鱼肌中 TNF-α、IL-6、MuRF1 和 MAFbx 蛋白表达

Fig. 6 Expressions of TNF-α, IL-6, MuRF1 and MAFbx protein in soleus muscle of rats in each group

上具有广泛的应用。《金贵要略》所载侯氏黑散中具有“治大风, 四肢烦重”的功效, 菊花所用比例占 40%, 这一用药特征在《张氏医通》中得到进一步解释。《张氏医通》所载: “方中用菊花四十分为君, 以解心下之蕴热”。结合现代中药药理学对菊花及其有效成分如绿原酸、木犀草苷、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸等的报道, 提示其具有显著的抗炎作用, 并且能够减少细胞凋亡和焦亡^[17]。其具体机制可能与减少细胞 TNF-α、NO、ROS 等炎症因子和氧化应激有关^[16]。除复方中的应用和现代药理学研究外, 《神农本草经》中关于菊花载有“主诸风……皮肤死肌……轻身耐老延年”功效, 提示菊花具有改善运动系统组织的药效作用。然而, 这些功效缺乏相应的实验研究。因此, 本研究基于传统记载及菊花已有药理研究, 围绕菊花“皮肤死肌”“轻身耐老延年”这些较少被报道的传统功效, 从侯氏黑散中菊花作为君药的用药指示出发, 以期探讨其改善缺血性脑卒中后肌肉萎缩的药效作用及潜在机制。

二甲双胍可以通过增加线粒体生物发生和氧化代谢增强骨骼肌细胞的活力, 促进肌肉细胞生长, 抑制炎症^[22-24]。本研究结果显示, 在 MCAO 模型稳

定且损伤无显著差异的前提下,实验第 7 天部分组别存在动物死亡的情况,为保持统计样本量一致,将各组统计样本量控制在 5 只。菊花提取物能够显著改善 MCAO 大鼠的神经功能损伤,这可能与菊花提取物在中枢的抗炎作用更为显著有关^[25]。术后大鼠运动能力明显下降,实验第 5、7 天菊花提取物高剂量组对 MCAO 大鼠运动能力的改善作用尤为突出。卒中后大鼠肌肉厚度降低,比目鱼肌长度缩短,比目鱼肌质量减少;与模型组比较,菊花提取物高剂量组大鼠肌肉厚度、比目鱼肌长度和比目鱼肌质量均显著增加,这可能与菊花提取物中富含多糖,能够促进细胞生长、抑制肌肉炎症、减少萎缩相关^[25]。

HE 染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠肌肉细胞横截面积显著降低,细胞形态不规则,细胞间隙增大;与模型组比较,菊花提取物具有改善肌肉细胞横截面减小和维持细胞间隙和形态的效果。ELISA 检测结果显示,与模型组比较,菊花提取物组大鼠血清和比目鱼肌中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著降低,表明菊花提取物具有抑制肌肉中炎症的作用。泛素-蛋白酶体系关键因子 MuRF1 和 MAFbx 的表达在术后显著上调,提示卒中后的肌肉萎缩与炎症诱导的蛋白质分解增多有关;菊花提取物能够通过抑制肌肉炎症因子水平的升高来减少肌肉蛋白质分解,从而减少肌肉萎缩的发生^[26]。

综上,菊花提取物能够通过抑制 MCAO 诱导的大鼠肌肉中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量,减少组织炎症,并通过下调泛素-蛋白酶体系关键因子 MuRF1 和 MAFbx 的表达,从而减少肌肉萎缩的发生。本研究丰富了菊花提取物在抗卒中后肌肉萎缩作用机制方面的认知,并为卒中后肌肉萎缩的康复治疗提供了新的药物选择。但是,本研究发现提高 5 倍临床用量的菊花提取物虽然在抗炎和减少泛素化因子表达上有效,但效果弱于菊花提取物高剂量组,这可能与活性成分含量有关。未来研究中需进一步基于菊花提取物的 LC-MS 结果来探讨成分差异。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 夏天晴,戎梦玮,但存燕,等.缺血性脑卒中与血管再生的前沿热点分析[J].中国组织工程研究,2024,28(23):3692-3698.
- [2] Saver J L, Levine S R. Alteplase for ischaemic stroke: Much sooner is much better [J]. *Lancet*, 2010, 375(9727):

1667-1668.

- [3] Lees K R, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: An updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials [J]. *Lancet*, 2010, 375(9727): 1695-1703.
- [4] Cruz-Jentoft A J, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis [J]. *Age Ageing*, 2019, 48(4): 601.
- [5] Qi H, Tian D, Luan F, et al. Pathophysiological changes of muscle after ischemic stroke: A secondary consequence of stroke injury [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(4): 737-746.
- [6] Park E, Choi H, Truong C S, et al. The inhibition of autophagy and pyroptosis by an ethanol extract of *Nelumbo nucifera* leaf contributes to the amelioration of dexamethasone-induced muscle atrophy [J]. *Nutrients*, 2023, 15(4): 804.
- [7] Seo E, Truong C S, Jun H S. *Psoralea corylifolia* L. seed extract attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy in mice by inhibition of oxidative stress and inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 296: 115490.
- [8] Hah Y S, Lee W K, Lee S, et al. β -Sitosterol attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy via regulating FoxO1-dependent signaling in C2C12 cell and mice model [J]. *Nutrients*, 2022, 14(14): 2894.
- [9] Fang W Y, Tseng Y T, Lee T Y, et al. Triptolide prevents LPS-induced skeletal muscle atrophy via inhibiting NF- κ B/TNF- α and regulating protein synthesis/degradation pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(15): 2998-3016.
- [10] Lee S J, Im M, Park S K, et al. BST204, a Rg₃ and Rh₂ enriched ginseng extract, upregulates myotube formation and mitochondrial function in TNF- α -induced atrophic myotubes [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 631-650.
- [11] 孙玲,王琦,杨轲.安徽亳菊挥发油成分 GC-MS 分析[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(12):42-44.
- [12] 陈萌,郭庆梅,周凤琴.亳菊生药学研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(23):14031-14033.
- [13] 中国药典[S].一部.2020:323.
- [14] Lee H, Kim Y I, Nirmala F S, et al. *Chrysanthemum zawadskii* Herbich attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy through the regulation of proteostasis and mitochondrial function [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 136: 111226.
- [15] Changizi Z, Moslehi A, Rohani A H, et al. Chlorogenic acid induces 4T1 breast cancer tumor's apoptosis via p53, Bax, Bcl-2, and caspase-3 signaling pathways in BALB/c mice [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(2): e22642.

- [16] Chen D C, Shen F Y, Liu J H, *et al.* Luteolin enhanced antioxidant capability and induced pyroptosis through NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 in splenic lymphocytes exposure to ammonia [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 919: 170699.
- [17] Chen T J, Li B, Xu Y, *et al.* Luteolin reduces cancer-induced skeletal and cardiac muscle atrophy in a Lewis lung cancer mouse model [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 1129-1137.
- [18] Bai S S, Lu X, Pan Q, *et al.* Cranial bone transport promotes angiogenesis, neurogenesis, and modulates meningeal lymphatic function in middle cerebral artery occlusion rats [J]. *Stroke*, 2022, 53(4): 1373-1385.
- [19] Maeo S, Huang M, Wu Y H, *et al.* Greater hamstrings muscle hypertrophy but similar damage protection after training at long versus short muscle lengths [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2021, 53(4): 825-837.
- [20] Isanejad A, Saraf Z H, Mahdavi M, *et al.* The effect of endurance training and downhill running on the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α and HSP72 in rat skeletal muscle [J]. *Cytokine*, 2015, 73(2): 302-308.
- [21] Zhang J, Huang L L, Shi X, *et al.* Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(23): 24270-24287.
- [22] Shang R, Miao J. Mechanisms and effects of metformin on skeletal muscle disorders [J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1275266.
- [23] Tezze C, Amendolagine F I, Nogara L, *et al.* A combination of metformin and galantamine exhibits synergistic benefits in the treatment of sarcopenia [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(15): e168787.
- [24] Hafner P, Bonati U, Erne B, *et al.* Improved muscle function in Duchenne muscular dystrophy through L-arginine and metformin: An investigator-initiated, open-label, single-center, proof-of-concept-study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147634.
- [25] Zhang H J, Wang B H, Wang X, *et al.* Handelin alleviates cachexia- and aging-induced skeletal muscle atrophy by improving protein homeostasis and inhibiting inflammation [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2024, 15(1): 173-188.
- [26] Zhang X, Wu J Z, Lin Z X, *et al.* Ameliorative effect of supercritical fluid extract of *Chrysanthemum indicum* Linnén against D-galactose induced brain and liver injury in senescent mice via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 234: 44-56.

[责任编辑 李亚楠]