

- [15] LI J, WEI J, MEI Z, et al. Suppressing role of miR-520a-3p in breast cancer through CCND1 and CD44 [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(1): 146-154.
- [16] ZHANG R, LIU R, LIU C, et al. A novel role for MiR-520a-3p in regulating EGFR Expression in colorectal cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1559-1574.
- [17] WANG X, XU Y, CHEN X, et al. [ARTICLE WITHDRAWN] Dexmedetomidine inhibits osteosarcoma cell proliferation and migration, and promotes apoptosis by regulating MiR-520a-3p [J]. Oncol Res, 2018, 26(3): 495-502.
- [18] OOSTERWEGEL M, DE WETERING MVAN, TIMMERMAN J, et al. Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis [J]. Development, 1993, 118(2): 439-448.
- [19] BILLIN AN, THIRLWELL H, AYER DE. Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(18): 6882-6890.
- [20] BARKER N, CLEVERS H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(12): 997-1014.
- [21] NIKUŠEVA-MARTIĆ T, SERMAN L, ZELJKO M, et al. Expression of secreted frizzled-related protein 1 and 3, T-cell factor 1 and lymphoid enhancer factor 1 in clear cell renal cell carcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19(3): 545-551.
- [22] CUI BH, HONG X. miR-6852 serves as a prognostic biomarker in colorectal cancer and inhibits tumor growth and metastasis by targeting TCF7 [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2): 879-885.
- [23] WANG Y, ZHANG S, XU Y, et al. Upregulation of miR-192 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis by targeting TCF7 in human osteosarcoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37(11): 15211-15220.

(收稿日期:2019-04-15,修回日期:2019-07-15)

引用本文:葛海,何良霞,朱迎春,等.山茱萸环烯醚萜苷通过介导胞外信号调节激酶信号通路对急性脑梗死小鼠的神经保护作用[J].安徽医药,2021,25(9):1727-1731.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.007.

◇ 药学研究 ◇



山茱萸环烯醚萜苷通过介导胞外信号调节激酶信号通路对急性脑梗死小鼠的神经保护作用

葛海,何良霞,朱迎春,李军

作者单位:安徽省第二人民医院神经内科,安徽 合肥 230041

通信作者:李军,男,副主任医师,研究方向为神经内科常见疾病内科治疗,Email:439712162@qq.com

摘要: **目的** 研究山茱萸环烯醚萜苷(CIG)对急性脑梗死小鼠的神经保护作用,并探讨其可能机制。**方法** 将18只ICR小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、实验组,每组6只。参考大脑中动脉栓塞法对小鼠进行造模,实验组小鼠腹腔注射150 mg/kg CIG,连续给药7 d,对比三组小鼠的神经损伤评分,并观察小鼠的脑梗死体积,使用TUNEL检测测定小鼠神经元的凋亡率,使用实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法检测脑组织中磷酸化胞外信号调节激酶1/2(p-ERK1/2)蛋白、胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)蛋白及mRNA的表达情况。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、神经元凋亡率、Bax mRNA及其蛋白和p-ERK1/2蛋白表达升高,Bcl-2 mRNA及其蛋白表达降低($P < 0.05$),其中神经元凋亡率(79.678 ± 7.203)%、Bax mRNA(3.84 ± 0.29)及其蛋白表达(1.01 ± 0.07)、p-ERK1/2蛋白表达(0.90 ± 0.08)高于对照组的(1.983 ± 1.071)%、(1.04 ± 0.09)、(0.21 ± 0.07)、(0.41 ± 0.08),Bcl-2 mRNA(1.00 ± 0.07)及其蛋白表达(0.50 ± 0.07)低于对照组的(3.86 ± 0.32)、(1.29 ± 0.08)。与模型组相比,实验组小鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、神经元凋亡率、Bax mRNA及其蛋白降低,Bcl-2 mRNA及其蛋白表达和p-ERK1/2蛋白表达升高($P < 0.05$),其中神经元凋亡率(49.171 ± 10.914)%、Bax mRNA(2.04 ± 0.23)及其蛋白表达(0.51 ± 0.08)低于模型组,Bcl-2 mRNA(2.58 ± 0.24)及其蛋白表达(0.93 ± 0.34)、p-ERK1/2蛋白表达(1.52 ± 0.09)高于模型组。**结论** CIG可能是通过ERK信号通路发挥对急性脑梗死小鼠的神经保护作用。

关键词: 脑梗死; 山茱萸环烯醚萜苷; ERK信号通路; 神经; 凋亡; 小鼠,近交ICR

Neuroprotective effects of cornel iridoid glycoside on acute cerebral infarction in mice through extracellular regulated protein signaling pathway

GE Hai, HE Genxia, ZHU Yingchun, LI Jun

Author Affiliation: Department of Neurology, Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei, Anhui 230041, China

Abstract: **Objective** To study the neuroprotective effect of cornel iridoid glycoside (CIG) on acute cerebral infarction in mice and explore its possible mechanism. **Methods** Eighteen ICR mice were divided into control group, model group and experiment group by

random number table method, with 6 mice in each group. Experimental models were established according to the middle cerebral artery embolization method, mice in the experimental group were intraperitoneally injected with 150 mg/kg CIG for 7 days. The neurological injury scores of three groups of mice were compared and the cerebral infarction volume of mice was observed. Apoptotic rate of mice neurons was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression of phosphorylation extracellular regulated protein 1/2(p-ERK1/2) protein, ERK1/2, B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) protein and mRNA in brain tissue were detected by quantitative Real-time PCR and Western blotting. **Results** Compared with the control group, the neurological deficit score, cerebral infarction volume, neuronal apoptosis rate, Bax mRNA and protein and p-ERK1/2 protein expression in the model group were increased, while Bcl-2 mRNA and protein expression were decreased ($P<0.05$). The neuronal apoptosis rate ($79.678\pm7.203\%$), Bax mRNA (3.84 ± 0.29) and protein expression (1.01 ± 0.07), p-ERK1/2 protein (0.90 ± 0.08) were higher than those of the control group ($1.983\pm1.071\%$), (1.04 ± 0.09), (0.21 ± 0.07), (0.41 ± 0.08), and the expression of Bcl-2 mRNA (1.00 ± 0.07) and protein (0.50 ± 0.07) were lower than that of the control group (3.86 ± 0.32), (1.29 ± 0.08). Compared with the model group, the neurological deficit score, cerebral infarction volume, neuronal apoptosis rate, Bax mRNA and protein in the experimental group were decreased, while Bcl-2 mRNA and protein expression, p-ERK1/2 protein expression were increased ($P<0.05$). The neuronal apoptosis rate ($49.171\pm10.914\%$), Bax mRNA (2.04 ± 0.23) and protein expression (0.51 ± 0.08) were lower than those of the model group, and the expression of Bcl-2 mRNA (2.58 ± 0.24) and protein (0.93 ± 0.34), p-ERK1/2 protein (1.52 ± 0.09) were higher than those of the model group. **Conclusion** CIG may play a neuroprotective role in mice with acute cerebral infarction through ERK signaling pathway.

Key words: Brain infarction; Cornus officinalis; ERK signaling pathway; Neuron; Apoptosis; Mice, inbred ICR

急性脑梗死又称为缺血性脑卒中,脑组织血氧供应不足,再加上缺血后再灌注等损伤,均会造成神经元的凋亡^[1-2]。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK),包括 ERK1 和 ERK2,统称为 ERK1/2,是 MAPKs 家族主要成员之一,参与细胞编码相关基因和细胞信号转导,与神经系统的功能有关^[3]。有研究发现,ERK1/2 磷酸化在脑梗死后发挥神经保护作用^[4]。山茱萸环烯醚萜苷(Cornus iridoid glycoside, CIG)是山茱萸科植物山茱萸的有效成分之一,具有抗炎、抗氧化等作用,可促进缺血大鼠的血管生成和神经发生并减轻脑缺血大鼠的细胞凋亡和炎症,改善神经功能^[5]。有研究发现,山茱萸可能通过激活 ERK 途径,作用机制可能是 ERK1/2 磷酸化水平增高,可以调节树突蛋白合成,影响与神经突触可塑性相关的核转录因子和蛋白质翻译起始因子的磷酸化状态,提高老年性痴呆大鼠学习记忆能力;山茱萸多糖改善老年性痴呆大鼠学习记忆能力通过激活 ERK 途径实现^[6]。另有研究发现,山茱萸环烯醚萜总苷可抑制核因子- κ B(NF- κ B)信号通路和 ERK1/2 信号通路激活,从而降低机体炎性水平,改善小鼠胰岛素敏感水平和肝损伤程度^[7]。但是 CIG 对缺血再灌注小鼠神经元细胞的影响及 ERK1/2 信号通路的调控报道较少。因此,本研究于 2019 年 3—6 月对此进行了初步研究,并探究其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及试剂 18 只清洁级雄性 ICR 小鼠由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供,周龄

5~6 周,体质量平均 25 g,合格证号:SCXK(沪)20130024;CIG 购自中国北京同仁堂(集团)有限责任公司;氯化三苯四氮唑(TTC)购自中国国药集团上海化学试剂公司;TUNEL 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;ERK1/2, B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X(Bax)蛋白,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)扩增序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成;实时荧光定量 PCR 试剂、cDNA Reverse Transcription kit、RNAiso plus (D9108A) Trizol 均购自大连宝生物 Takara 公司;Bestar™ Real time PCR Master Mix 购自德国 DBI 公司;抗磷酸化胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)、Bcl-2、Bax 抗体均购自 Santa Cruz 公司, ERK1/2、GAPDH 抗体购自上海康成生物工程有限公司;RIPA 裂解液购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.1.2 实验仪器 RM2235 石蜡切片机购自 Leica 公司;ABI7500fast 荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司;PCR 扩增仪购自美国 Life technologies 公司;紫外分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司;电泳仪、转膜仪购自 Bio-rad 公司;酶标仪购自 Thermo 公司;化学发光成像系统购自 GE 公司;线栓购自广州佳灵公司(线栓头直径 0.18 mm);CH-2 CX31 荧光倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及分组 参照文献^[8]采用大脑中动脉栓塞法(MCAO)建立小鼠急性脑梗死模型。使用异氟烷麻醉小鼠后,暴露颈外动脉、颈总动脉、颈内动脉,颈外动脉近心端结扎,颈总动脉近心端结扎,于颈总动脉远心端插入线栓,进线 5 mm。根

据随机数字表法将 18 只清洁级雄性 ICR 小鼠分为对照组、模型组和实验组,每组各 6 只。对照组小鼠不插入线栓,模型组小鼠腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液,实验组小鼠腹腔注射 150 mg/kg CIG,连续给药 7 d,每天给药 1 次,7 d 后再次对小鼠进行神经损伤评分。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2.2 小鼠神经功能缺损评分 参照《现代药理实验方法学》^[9]进行小鼠的神经功能缺损评分,评分 ≥ 5 分表明造模成功,剔除模型组及实验组造模评分 < 5 分的小鼠,评分越高代表小鼠神经功能缺损越严重。

1.2.3 TTC 染色法测定小鼠的脑梗死体积 给药 7 d 后对小鼠进行麻醉并处死,断头取出脑组织去掉嗅觉、小脑和低位脑干后,在海马齿状回平面连续冠状切片,切成 5 组,每组约 2 mm 厚,置于 2% 的 TTC 溶液中避光染色,10% 甲醛固定 12 h,用图像分析软件计算梗死体积百分比,其中红色为正常脑组织,白色为脑梗死组织。

1.2.4 TUNEL 检测测定脑梗死小鼠缺血侧海马区神经元凋亡 上述脑组织冠状切片脱蜡、水化后严格按照试剂盒说明书进行操作。染色后显微镜下观察并记录每个视野中细胞核被染成棕褐色和蓝色的个数,每组记录 5 个视野,计算平均凋亡率。其中细胞核被染为棕褐色的是凋亡细胞,细胞核被染为蓝色的是正常细胞。计算凋亡率=100% $\times$ 凋亡细胞数/(凋亡细胞数+正常细胞数)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测急性脑梗死小鼠脑组织 ERK1/2、Bcl-2、Bax mRNA 的相对表达量 将小鼠梗死区脑组织消化离心后提取总 RNA,测定总 RNA 浓度并将其浓度调节为 1 mg/L,经 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 反转录为互补 DNA(cDNA)。cDNA 用超纯水稀释后进行定量 PCR,PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 31 s, 40 个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s。以 GAPDH 作为参照,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。PCR 引物序列见表 1。

1.2.6 蛋白质印迹法检测急性脑梗死小鼠脑组织 p-ERK1/2、ERK1/2、Bcl-2、Bax 蛋白的相对表达量 将小鼠梗死区脑组织细胞裂解后,根据蛋白定量试剂盒提取总蛋白,测定总蛋白的浓度,取 40 μg 总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕凝胶上的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜,用丽春红染色后加入 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗膜后加入 ECL 发光试剂,曝光后采集图像,计算各蛋白相对内参蛋白 GAPDH 的表达。

表 1 PCR 引物序列

基因	正向序列	反向序列
ERK1/2	5'-GACTCCTTACCTT- GAAGCATAC-3'	5'-TTCCTTGACACG- CAGAATTG-3'
Bax	5'-TGCTTGCCCTCTTC- TACTTTGC-3'	5'-CCAGTGTC- CAGCCCATGATG-3'
Bcl-2	5'-AGCGTCAACAGGGA- GATG-3'	5'-CTTCAGAGACAGC- CAGGAG-3'
GAPDH	5'-ACAGCAACAGGGTG- GTGGAC-3'	5'-TTTGAGGGTGCAGC- GAACCTT-3'

注:ERK1/2 为胞外信号调节激酶 1/2, Bax 为 Bcl-2 相关 X, Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 19.0 进行统计学分析,所有结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较使用 LSD-*t* 检验;神经功能缺损评分及脑梗死体积采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

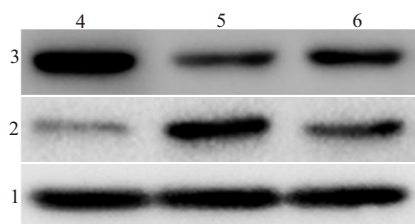
2.1 CIG 对急性脑梗死小鼠神经功能的影响 给药前,对照组、模型组、实验组小鼠神经功能缺损评分分别为 0 分、(9.500 $\pm$ 0.837) 分、(9.667 $\pm$ 0.516) 分 ($H=12.793$, $P=0.002$),模型组和实验组评分显著高于对照组 ($P < 0.05$),但是模型组和实验组差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明造模成功。给药后,对照组、模型组、实验组小鼠神经功能缺损评分分别为 0 分、(3.667 $\pm$ 0.516) 分、(2.333 $\pm$ 0.516) 分 ($H=15.395$, $P < 0.001$),实验组评分显著低于模型组 ($P < 0.05$),说明 CIG 能明显缓解脑梗死小鼠的神经功能损伤。

2.2 CIG 对急性脑梗死小鼠脑梗死体积的影响 给药 7 d 后,对照组、模型组、实验组脑梗死小鼠脑梗死体积分别为 0、(40.572 $\pm$ 10.580)%、(22.795 $\pm$ 6.680)%,实验组小鼠脑梗死体积明显小于模型组 ($H=13.008$, $P=0.001$),说明 CIG 能明显缩小脑梗死小鼠的脑梗死体积,见图 1。

2.3 CIG 对急性脑梗死小鼠梗死区神经元凋亡率的影响 对照组小鼠脑组织中神经元细胞核基本未出现棕黄色, TUNEL 检测阳性细胞很少,神经元的凋亡率为 (1.983 $\pm$ 1.071)%;模型组小鼠脑组织中出现较多深褐色、形态不规则、大小不一的固缩核细胞,神经元凋亡率为 (79.678 $\pm$ 7.203)%;实验组小鼠脑组织中出现深染、固缩核细胞的数量明显较模型组少,神经元凋亡率为 (49.171 $\pm$ 10.914)%,明显高于对照组 ($P < 0.05$),少于模型组 ($P < 0.05$),说明 CIG 可明显减少脑梗死小鼠脑组织的神经元凋亡。见图 2。

2.4 CIG 对急性脑梗死小鼠脑组织凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 表达的影响 实时荧光定量 PCR 实验及

蛋白质印迹法结果均显示,三组小鼠脑组织中 Bcl-2、Bax mRNA 及蛋白的表达差异有统计学意义(均 $P < 0.001$),实验组小鼠脑组织中 Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达明显较对照组下调($P < 0.05$),较模型组上调($P < 0.05$); Bax mRNA 及其蛋白的表达明显较对照组上调($P < 0.05$),较模型组下调($P < 0.05$),说明 CIG 能明显上调 Bcl-2 的表达,下调 Bax 的表达。见图 3、表 2。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—Bax 蛋白;3—Bcl-2 蛋白;4—对照组;5—模型组;6—实验组。

图3 山茱萸环烯醚萜苷(CIG)对急性脑梗死小鼠脑组织凋亡相关因子B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)蛋白表达的影响

表2 山茱萸环烯醚萜苷(CIG)对急性脑梗死小鼠B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)mRNA 和蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

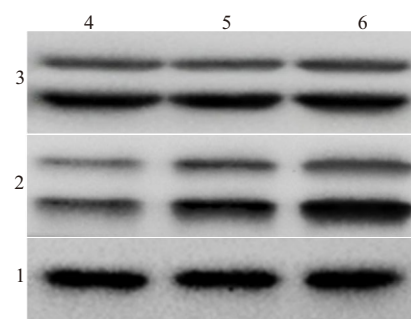
组别	鼠数	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
对照组	6	3.86±0.32	1.04±0.09	1.29±0.08	0.21±0.07
模型组	6	1.00±0.07 ^①	3.84±0.29 ^①	0.50±0.07 ^①	1.01±0.07 ^①
实验组	6	2.58±0.24 ^{①②}	2.04±0.23 ^{①②}	0.93±0.34 ^{①②}	0.51±0.08 ^{①②}
F 值		221.897	249.689	149.879	171.562
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。

2.5 CIG 对急性脑梗死小鼠 ERK1/2 表达的影响
实时荧光定量 PCR 实验结果显示,对照组小鼠 ERK1/2 mRNA 表达量为(1.14±0.28),模型组小鼠 ERK1/2 mRNA 表达量为(1.21±0.12),实验组小鼠 ERK1/2 mRNA 表达量为(1.16±0.14),三组小鼠脑组织中 ERK1/2 mRNA 表达差异无统计学意义($F = 0.238, P = 0.791$);蛋白质印迹法结果显示,三组小鼠脑组织中 ERK1/2 蛋白的表达差异无统计学意义($P = 0.633$),实验组 p-ERK1/2 蛋白的表达明显较对照组和模型组上调($P < 0.05$),模型组 p-ERK1/2 蛋白的表达明显较对照组上调($P < 0.05$),说明 CIG 可促进脑组织中 ERK1/2 的磷酸化,见图 4、表 3。

3 讨论

脑梗死会造成缺血缺氧中心区的神经细胞迅速坏死,处于缺血半暗带的细胞易受到氧化应激、炎症反应及兴奋性毒性等刺激,若未得到及时有效的治疗,神经细胞会发生凋亡,并产生不可逆的脑损伤^[10-11]。因此,减少缺血半暗带尚未病变的神经



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—磷酸化胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK1/2);3—胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2);4—对照组;5—模型组;6—实验组。

图4 山茱萸环烯醚萜苷(CIG)对急性脑梗死小鼠p-ERK1/2、ERK1/2 蛋白表达的影响

表3 山茱萸环烯醚萜苷(CIG)对急性脑梗死小鼠 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	ERK1/2 蛋白	p-ERK1/2 蛋白
对照组	6	1.49±0.08	0.41±0.08
模型组	6	1.54±0.10	0.90±0.08 ^①
实验组	6	1.51±0.07	1.52±0.09 ^{①②}
F 值		0.471	285.870
P 值		0.633	<0.001

注:ERK1/2、p-ERK1/2 分别为胞外信号调节激酶 1/2 及其磷酸化。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。

细胞凋亡成为治疗缺血性脑病的关键。CIG 具有广泛的生物活性,能够抑制免疫作用、抗炎、抗血栓等^[12]。有研究发现,CIG 的单体能降低大鼠脑缺血再灌注 3d 皮层梗死周边区基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9 的表达,从而保护血脑屏障功能^[13]。Qu 等^[14]研究发现,CIG 可通过抑制 Janus 激酶/信号转导与转录激活子信号(JAK/STAT)通路抑制神经炎症和小胶质细胞活化,其可能是预防多发性硬化症等神经系统疾病的治疗药物。本研究结果显示,实验组小鼠的神经功能损伤评分显著低于模型组,脑梗死体积和海马区神经元细胞的凋亡率显著低于模型组。提示 CIG 可明显改善小鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积及神经元细胞的凋亡。

神经元细胞的凋亡受多种因素调控,Bcl-2 和 Bax 均是与细胞凋亡相关的基因,二者相互作用共同参与细胞的程序性凋亡过程。Bcl-2 可与 Bax 蛋白形成多种二聚体,Bcl-2/Bcl-2、Bax/Bax、Bcl-2/Bax,而氧自由基及脂质过氧化物的生成、 Ca^{2+} 超载均与二聚体比例有关^[15-16]。本研究结果显示,实验组小鼠脑组织中 Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达明显较模型组上调,Bax mRNA 及蛋白的表达明显较模型组下调。提示了 CIG 可上调急性脑梗死小鼠 Bcl-2 的表达,下调 Bax 的表达,抑制细胞凋亡。

ERK1/2 介导信号通路是经典的 MAPK 信号转

导途径,与神经元的生存和死亡密切相关^[17]。ERK1/2被磷酸化激活后会进入细胞核,参与某些基因的转录与表达,从而调节细胞的增殖与凋亡^[18]。Li^[19]的研究结果显示,激活的ERK可降低N-甲基-D-天冬氨酸受体活性,抑制Ca²⁺内流,发挥神经元保护作用。另有研究发现,大鼠脑梗死后p-ERK1/2表达增加,采用骨髓间充质干细胞(BMMNCs)干预后,p-ERK1/2的表达进一步上调,结果提示BMMNCs能够促进ERK1/2的磷酸化水平,从而改善神经功能,降低梗死范围^[20]。本研究实时荧光定量PCR实验及蛋白质印迹法均显示,与对照组及模型组比较,实验组小鼠脑组织中ERK1/2 mRNA及蛋白表达差异无统计学意义,但是p-ERK1/2蛋白的水平明显较对照组和模型组升高。提示了CIG能促进急性脑梗死小鼠脑组织中ERK1/2的磷酸化。因此本研究推测CIG通过促进ERK1/2的磷酸化,使得细胞核ERK1/2被磷酸化为p-ERK1/2,并进入细胞核,从而调节Bcl-2及Bax的转录与表达,减少神经元细胞的凋亡。

综上所述,CIG具有缩小脑梗死体积、减少海马区神经元凋亡的作用,通过抑制Bax的表达,促进Bcl-2的表达实现其神经保护作用,可能通过调节ERK磷酸化实现调节抗凋亡及促凋亡蛋白之间的平衡,其具体机制还有待进一步的研究。

(本文图1,2见插图9-2)

参考文献

- [1] LIU S, WU JR, ZHANG D, et al. Comparative efficacy of Chinese herbal injections for treating acute cerebral infarction: a network meta-analysis of randomized controlled trials[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1):120.
- [2] 李永军. 舒血宁注射液对脑梗死患者临床疗效及血浆Hcy、UCH-L1及血清fibulin-5水平的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(1):143-146.
- [3] 宋加兴, 张清秀, 何磊, 等. 美金刚通过调节ERK、CREB信号通路及突触可塑性保护脑缺血再灌注小鼠的作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6):1-7.
- [4] JIANG C, YU K, WU Y, et al. Enriched environment enhances poststroke neurological function recovery on rat: involvement of p-ERK1/2[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25(7):1590-1598.
- [5] MA DL, WANG N, FAN XT, et al. Protective effects of cornel iridoid glycoside in rats after traumatic brain injury[J]. Neurochem Res, 2018, 43(4):959-971.
- [6] 邵嘉, 刘子纯, 詹项, 等. 阿尔海默茨病模型大鼠ERK的变化及山茱萸多糖干预[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(6):39-40, 42.
- [7] 王世伟, 徐宁. 山茱萸环烯醚萜总苷对小鼠胰岛素抵抗和非酒精性肝损伤的改善作用及其机制研究[J]. 天津中医药, 2017, 34(3):195-199.
- [8] XU YY, ZHANG GH, KANG ZC, et al. Cornin increases angiogenesis and improves functional recovery after stroke via the Ang1/Tie2 axis and the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(1):133-142.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 现代药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1065-1068.
- [10] WU C, ZHAO X, ZHANG X, et al. Effect of Ginkgo biloba extract on apoptosis of brain tissues in rats with acute cerebral infarction and related gene expression[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2):6387-6394.
- [11] FENG DY, WANG B, WANG L, et al. Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings[J/OL]. J Pineal Res, 2017, 62(3): e12395. DOI:10.1111/jpi.12395.
- [12] ZHENG TT, PENG J, PEI T, et al. Cornel iridoid glycoside exerts a neuroprotective effect on neuroinflammation in rats with brain injury by inhibiting NF- κ B and STAT3[J]. 3 Biotech, 2019, 9(5):195.
- [13] 侯虹丽, 孙芳玲, 艾厚喜, 等. 莫诺苷对脑缺血再灌注大鼠皮层梗死周边区基质金属蛋白酶表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(1):5-8.
- [14] QU Z, ZHENG N, WEI YZ, et al. Effect of cornel iridoid glycoside on microglia activation through suppression of the JAK/STAT signalling pathway[J]. J Neuroimmunol, 2019, 330:96-107.
- [15] 杜衍捷, 金醒昉. 脑梗死患者神经细胞凋亡研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(14):3600-3602.
- [16] 张珊珊, 蒲超, 张翼, 等. 微小RNA-503在急性脑梗死病人血清中的表达及对胰岛素样生长因子1受体信号通路的调控[J]. 安徽医药, 2019, 23(11):2146-2151.
- [17] CHEN W, FENG JG, TONG WS. Phosphorylation of astrocytic connexin43 by ERK1/2 impairs blood-brain barrier in acute cerebral ischemia[J]. Cell Biosci, 2017, 7:43-52.
- [18] 陈良, 余锋, 刘晓敏. 脂氧素A4抑制5-LOX合成对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(6):530-533.
- [19] LI Z, FANG F, WANG YY, et al. Resveratrol protects CA1 neurons against focal cerebral ischemic reperfusion-induced damage via the ERK-CREB signaling pathway in rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2016, 146-147:21-27.
- [20] 陈宁宁, 王建平, 付晓杰, 等. 骨髓单个核细胞移植对脑梗死大鼠ERK1/2信号通路的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2017, 26(8):678-683.

(收稿日期:2019-11-27,修回日期:2020-02-17)