

# 基于 Nrf2/ARE 信号通路研究绞股蓝皂苷 XVII 抗脑缺血 / 再灌注机制

王文杰<sup>1</sup> 徐煜彬<sup>2</sup> 徐珊珊<sup>2</sup> 毛玲群<sup>1</sup>

<sup>1</sup>台州市中心医院(台州学院附属医院)神经内科,浙江台州 318000; <sup>2</sup>台州市中心医院(台州学院附属医院)药剂科,浙江台州 318000

通信作者:毛玲群, Email: maolq@tzzxyy.com

**【摘要】 目的** 探讨绞股蓝皂苷 XVII 调控核因子 E2 相关因子 2/ 抗氧化反应元件 (Nrf2/ARE) 信号通路抗脑缺血 / 再灌注 (I/R) 的机制。**方法** 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、I/R 模型组及 25、50 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组, 每组 8 只。绞股蓝皂苷 XVII 组分别给予绞股蓝皂苷 XVII 25、50、100 mg/kg 灌胃 (灌胃量 0.01 mL/g), 连续给药 14 d; 其余两组给予相同剂量生理盐水灌胃。然后采用改良线栓法制备大鼠脑 I/R 模型; 假手术组大鼠采用相同方法手术, 但不产生实质性栓塞。再灌注后 24 h, 评估各组大鼠神经功能缺损评分; 采集大鼠腹主动脉全血检测血清活性氧 (ROS)、血红素加氧酶 -1 (HO-1)、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ( $\gamma$ -GCS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、醌 NADH 氧化还原酶 1 (NQO1)、丙二醛 (MDA) 水平; 随后取完整大脑组织并分离大脑皮质脑梗死周围半暗带组织, 观察大鼠脑组织大体情况及脑梗死体积, 光镜下观察脑组织病理学变化, 采用实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测脑缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 表达, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测脑缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的蛋白表达。**结果** 再灌注后 24 h, 与假手术组比较, I/R 模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高, 脑组织梗死体积明显增大, 血清 NQO1、SOD 和  $\gamma$ -GCS 水平均明显降低、血清 MDA、HO-1 和 ROS 水平均明显升高, 脑缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 及蛋白表达均明显升高。与 I/R 模型组比较, 50 mg/kg 与 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显降低脑 I/R 大鼠的神经功能缺损评分 (分:  $1.50 \pm 0.53$ 、 $1.37 \pm 0.52$  比  $2.75 \pm 0.46$ ), 缩小脑组织梗死体积 [( $19.8 \pm 5.1$ )%、( $21.4 \pm 6.4$ )% 比 ( $42.3 \pm 5.8$ )%], 明显提高血清 NQO1、SOD、HO-1 和  $\gamma$ -GCS 水平 [NQO1 (ng/L):  $186.05 \pm 10.38$ 、 $220.75 \pm 16.22$  比  $131.36 \pm 5.95$ , SOD (kU/L):  $63.23 \pm 5.30$ 、 $72.70 \pm 8.62$  比  $36.75 \pm 6.55$ , HO-1 (ng/L):  $60.57 \pm 7.93$ 、 $60.35 \pm 4.72$  比  $42.72 \pm 4.95$ ;  $\gamma$ -GCS (kU/L):  $8.81 \pm 0.53$ 、 $8.72 \pm 0.69$  比  $6.80 \pm 0.56$ ], 明显降低血清 MDA 和 ROS 水平 [MDA ( $\mu$ mol/L):  $5.94 \pm 0.66$ 、 $5.61 \pm 0.53$  比  $10.88 \pm 1.34$ , ROS (kU/L):  $69.11 \pm 4.23$ 、 $67.12 \pm 4.52$  比  $104.43 \pm 7.54$ ], 同时可明显提高脑缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 及蛋白表达 [Nrf2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.90 \pm 0.13$ 、 $2.13 \pm 0.18$  比  $1.48 \pm 0.11$ , Keap1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.78 \pm 0.11$ 、 $1.85 \pm 0.10$  比  $1.43 \pm 0.10$ , Nrf2/ $\beta$ -actin:  $0.73 \pm 0.04$ 、 $0.79 \pm 0.03$  比  $0.60 \pm 0.03$ , Keap1/ $\beta$ -actin:  $0.71 \pm 0.01$ 、 $0.76 \pm 0.03$  比  $0.61 \pm 0.01$ ], 比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 无明显作用。**结论** 绞股蓝皂苷 XVII (50 mg/kg 和 100 mg/kg) 可能通过 Nrf2/ARE 信号通路调节 NQO1、SOD、HO-1、 $\gamma$ -GCS、ROS 及 MDA 起到抗脑 I/R 损伤的作用。

**【关键词】** 绞股蓝皂苷 XVII; 脑缺血 / 再灌注; Nrf2/ARE 信号通路; 氧化应激

**基金项目:** 浙江省基础公益研究计划项目 (LGD19H310003); 浙江省中医药科技计划项目 (2023ZL776); 浙江省台州市科技计划项目 (1901ky40)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221214-01094

## Mechanism of gypenoside XVII against cerebral ischemia/reperfusion injury based on nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant responsive element signaling pathway

Wang Wenjie<sup>1</sup>, Xu Yubin<sup>2</sup>, Xu Shanshan<sup>2</sup>, Mao Lingqun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Neurology, Taizhou Central Hospital (Taizhou University Hospital), Taizhou 318000, Zhejiang, China; <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Taizhou Central Hospital (Taizhou University Hospital), Taizhou 318000, Zhejiang, China

Corresponding author: Mao Lingqun, Email: maolq@tzzxyy.com

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of gypenoside XVII against cerebral ischemia/reperfusion (I/R) through nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant responsive element (Nrf2/ARE) signaling pathway. **Methods** Forty SPF Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operated group, I/R model group, 25, 50 and 100 mg/kg gypenoside XVII groups ( $n = 8$ ). Gypenoside XVII groups were administered 25, 50 or 100 mg/kg (0.01 mL/g) gypenoside XVII by intragastric administration for 14 days; the other two groups received the same dose of saline. Rat cerebral I/R model was established by modified line bolt method; rats in the sham operated group underwent the same procedure without producing substantial embolization. After 24 hours of reperfusion, the neurological deficit scores of the rats in each group were assessed. Rat abdominal aortic whole blood was collected

and the serum reactive oxygen species (ROS), heme oxygenase-1 (HO-1),  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase ( $\gamma$ -GCS), superoxide dismutase (SOD), quinone NADH oxidoreductase 1 (NQO1), and malondialdehyde (MDA) were detected. Then whole brain tissue was harvested and penumbra tissue was isolated from cerebral cortex, the general condition of rat brain tissue and the volume of cerebral infarction were evaluated, the histopathological changes in the brain were observed under light microscopy, the mRNA expressions of Nrf2 and Keap1 were measured by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), the protein expressions of Nrf2 and Keap1 were determined by Western blotting. **Results** After 24 hours of reperfusion, compared with the sham operated group, the score of neurological deficit and infarct volume were significantly increased, the NQO1, SOD and  $\gamma$ -GCS levels in serum were significantly decreased, MDA, HO-1 and ROS levels in serum were significantly increased, the Nrf2 and Keap1 mRNA and protein expressions in the ischemic penumbra were significantly increased in rats from I/R model group. Compared with the I/R model group, the neurological deficit scores ( $1.50 \pm 0.53$ ,  $1.37 \pm 0.52$  vs.  $2.75 \pm 0.46$ ) and brain infarct volume [( $19.8 \pm 5.1$ )%, ( $21.4 \pm 6.4$ )% vs. ( $42.3 \pm 5.8$ )%] were significantly reduced, serum NQO1, SOD, HO-1 and  $\gamma$ -GCS were significantly increased [NQO1 (ng/L):  $186.05 \pm 10.38$ ,  $220.75 \pm 16.22$  vs.  $131.36 \pm 5.95$ , SOD (kU/L):  $63.23 \pm 5.30$ ,  $72.70 \pm 8.62$  vs.  $36.75 \pm 6.55$ , HO-1 (ng/L):  $60.57 \pm 7.93$ ,  $60.35 \pm 4.72$  vs.  $42.72 \pm 4.95$ ,  $\gamma$ -GCS (kU/L):  $8.81 \pm 0.53$ ,  $8.72 \pm 0.69$  vs.  $6.80 \pm 0.56$ ], serum MDA and ROS levels were significantly reduced [MDA ( $\mu\text{mol/L}$ ):  $5.94 \pm 0.66$ ,  $5.61 \pm 0.53$  vs.  $10.88 \pm 1.34$ , ROS (kU/L):  $69.11 \pm 4.23$ ,  $67.12 \pm 4.52$  vs.  $104.43 \pm 7.54$ ], the mRNA and protein expressions of Nrf2 and Keap1 in the ischemic penumbra were significantly increased in rats from 50 mg/kg and 100 mg/kg gypenoside XVII groups [Nrf2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.90 \pm 0.13$ ,  $2.13 \pm 0.18$  vs.  $1.48 \pm 0.11$ , Keap1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.78 \pm 0.11$ ,  $1.85 \pm 0.10$  vs.  $1.43 \pm 0.10$ , Nrf2/ $\beta$ -actin:  $0.73 \pm 0.04$ ,  $0.79 \pm 0.03$  vs.  $0.60 \pm 0.03$ , Keap1/ $\beta$ -actin:  $0.71 \pm 0.01$ ,  $0.76 \pm 0.03$  vs.  $0.61 \pm 0.01$ ], all the comparative differences were statistically significant (all  $P < 0.01$ ); 25 mg/kg gypenoside XVII had no significant effect. **Conclusion** Gypenoside XVII (50 mg/kg and 100 mg/kg) may play a role in anti-cerebral I/R injury by regulating NQO1, SOD, HO-1,  $\gamma$ -GCS, ROS and MDA through Nrf2/ARE signaling pathway.

**【Key words】** Gypenoside XVII; Cerebral ischemia/reperfusion; Nrf2/ARE signaling pathway; Oxidative stress

**Fund program:** Zhejiang Province Basic Public Welfare Research Project (LGD19H310003); Zhejiang Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Plan (2023ZL776); Zhejiang Province Taizhou Science and Technology Plan (1901ky40)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20221214-01094

脑梗死又称缺血性脑卒中,为临床常见病和多发病,具有高发病率、高致残率和高病死率的特点,目前临床治疗效果欠佳<sup>[1-2]</sup>。脑部供血不足会引起脑组织区域性缺血、低氧,从而导致脑组织损伤<sup>[3]</sup>。及时恢复脑组织血液供应是挽救脑缺血患者生命的最优方法,但是恢复血流灌注后又会造成继发性脑损伤<sup>[4]</sup>。如何防治脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤一直是目前研究的热点内容。

有研究表明,核因子E2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是连接炎症与氧化应激的关键因子,在氧化应激条件下Nrf2会被激活,与Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)发生解离进入细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合形成Nrf2/ARE信号通路并激活,维持细胞氧化还原稳态<sup>[5-6]</sup>。因此,Nrf2-Keap1-ARE信号通路在氧化应激损伤自我防御中发挥重要作用,是重要的抗氧化应激通路之一。

绞股蓝皂苷XVII是中药绞股蓝中分离出来的一种达玛烷型四环三萜类皂苷<sup>[7]</sup>。前期研究已表明,

绞股蓝皂苷XVII对脑I/R模型大鼠具有较好的保护作用<sup>[8]</sup>,但对于其抗氧化机制并未进行深入研究,因此本研究基于Nrf2/ARE信号通路探讨绞股蓝皂苷XVII抗脑I/R的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:** 40只SPF级SD大鼠,雌雄对半,体质量( $220 \pm 20$ )g,购自北京维通利华有限公司[动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001],常规适应性饲养1周。

**1.2 实验药物、试剂及仪器:** 绞股蓝皂苷XVII购自上海如吉生物科技发展有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -GCS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、醌NADH氧化还原酶1(NADH quinone oxidoreductase 1, NQO1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;UV8500-紫外分光光度计购自上

海坤科仪器设备有限公司, anthos2010 型酶标仪购自郑州安图生物工程股份有限公司, 5424R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司, CFX Connect™ 实时荧光 PCR 仪、Chemi Doc™ XRS+ 超高灵敏度化学发光成像系统购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司, SHA-B 型恒温水浴振荡器购自常州国华设备厂, Tiss-12 全自动样品快速研磨仪购自上海净信实业发展有限公司, DYY-6C 蛋白垂直电泳仪购自北京市六一仪器厂, TC-100B 恒温摇床购自上海领成生物科技有限公司。

**1.3 实验分组及处置:** 将 40 只大鼠随机分为假手术组、I/R 模型组和 25、50、100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组, 每组 8 只。绞股蓝皂苷 XVII 组分别给予绞股蓝皂苷 XVII 25、50、100 mg/kg 灌胃, 灌胃量为 0.01 mL/g, 连续灌胃 14 d; 假手术组和 I/R 模型组给予相同剂量的生理盐水灌胃。随后采用改良线栓法对 I/R 模型组和绞股蓝皂苷 XVII 组大鼠进行脑 I/R 制模, 具体方法参考文献 [9]; 假手术组大鼠采用相同方法手术, 但钓鱼线插入深度较浅, 不产生实质性栓塞。再灌注后 24 h 麻醉大鼠, 采集腹主动脉全血 5 mL, 静置 30 min 分离血清, -80 °C 保存备用; 之后迅速于冰面上取出完整大脑组织, 分离大脑皮质梗死周围半暗带组织, -80 °C 保存待检; 假手术组取相应部位的脑组织进行检测。制模 24 h 内若有大鼠死亡, 则取大鼠重新补齐, 保证每组 8 只。

本研究动物实验方案符合实验动物福利和伦理要求, 符合国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》等法规规定, 已通过台州学院实验动物福利与伦理委员会批准(审批号: TZXY-2022-20221020)。

#### 1.4 检测指标及方法

**1.4.1 神经功能缺损评分:** 再灌注后 24 h, 参照 Longa 等<sup>[8]</sup>的方法对各组大鼠神经功能缺损情况进行评分, 其中无症状为 0 分, 能完全伸展对侧前爪为 1 分, 向对侧转圈为 2 分, 向对侧倾倒是 3 分, 不能自发行走、意识丧失为 4 分。

**1.4.2 脑组织大体观察及梗死体积:** 全脑解剖冷冻 30 min, 切片厚 2 mm, 2% 氯化三苯四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride method, TTC) 于 37 °C 染色 30 min 后用 10% 多聚甲醛固定, 显微镜下观察梗死组织, 通过 Image J 软件对梗死组织体积进行拍照和分析。

**1.4.3 脑组织病理学改变:** 用 10% 多聚甲醛固定大鼠脑组织, 石蜡包埋并切片(厚度 5 μm), 用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 光镜下观察

大鼠大脑皮质神经元的病理变化。

**1.4.4 血清氧化应激指标水平测定:** 采用生化免疫法和酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组大鼠血清 ROS、HO-1、γ-GCS、SOD、NQO1、MDA 水平, 参照试剂盒说明书进行操作。

**1.4.5 RT-qPCR 检测缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 表达:** 剪取 50 mg 脑缺血半暗带组织样品, 依次加入 1 mL TRIzol 试剂和 200 μL 氯仿, 震荡 15 s 后置于冰盒上 5 min, 以 12 000 r/min (离心半径 10 cm) 于 4 °C 离心 15 min, 吸取上清 500 μL 加入等体积预冷 70% 乙醇溶液, 提取总 RNA。吸取 1.5 μL RNA 原液, 采用紫外分光光度仪测定浓度和纯度, 按照试剂盒说明制备 cDNA, 之后加入 PCR 反应体系 20 μL, 反应条件为 95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 10 min、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。Nrf2 的基因正反引物为 5'-GCCCTCAGCATGATGGACTT-3' 和 5'-GTTTGGGAATGTGGGCAACC-3', Keap1 的基因正反引物为 5'-TGGGTCAAATACGACTGCC-3' 和 5'-TGGCTCATATCTCTCCACGC-3', β-肌动蛋白(β-actin)的基因正反引物为 5'-AGGGAATCGTGCCTGAC-3' 和 5'-CATACCCAAGAAGGAAGGCT-3', 根据 Ct 值采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 Nrf2 和 Keap1 mRNA 的相对表达量<sup>[10]</sup>。

**1.4.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的蛋白表达:** 剪取脑缺血半暗带组织样品, 匀浆裂解后使用 BSA 试剂盒检测蛋白浓度, 配平, 加入 5× 蛋白上样缓冲液煮沸。制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 上样, 电泳约 2 h, 结束后采用聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)进行湿转, 用 5% 脱脂牛奶封闭约 2 h 后孵育一抗, 4 °C 过夜。之后孵育二抗 2 h, 将清洗后的 PVDF 膜用电化学发光法(electrochemiluminescence, ECL)发光后放入化学发光成像系统进行扫描, 结果用 Image J 图像处理软件分析, 以 β-actin 作为内参, 计算 Nrf2 和 Keap1 蛋白相对表达量。

**1.5 统计学方法:** 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 大鼠神经功能缺损评分的影响 (表 1):**再灌注后 24 h, 各组大鼠神经功能缺损评分均较假手术组明显升高 (均  $P < 0.01$ ); 50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显降低脑 I/R 模型大鼠的神经功能缺损评分 (均  $P < 0.01$ ), 而 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 对神经功能缺损评分并无明显作用 ( $P > 0.05$ )。

组别	动物数 (只)	神经功能缺损评分 (分)	脑组织梗死体积占比 (%)
假手术组	8	0 ± 0	0 ± 0
I/R 模型组	8	2.75 ± 0.46 <sup>a</sup>	42.3 ± 5.8 <sup>a</sup>
25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组	8	2.62 ± 0.52	37.4 ± 6.9
50 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组	8	1.50 ± 0.53 <sup>b</sup>	19.8 ± 5.1 <sup>b</sup>
100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组	8	1.37 ± 0.52 <sup>b</sup>	21.4 ± 6.4 <sup>b</sup>

注: I/R 为缺血/再灌注; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 I/R 模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

**2.2 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 大鼠脑组织梗死体积的影响 (表 1; 图 1):**与假手术组比较, I/R 模型组大鼠出现明显白色脑梗死组织 ( $P < 0.01$ ); 而与 I/R 模型组比较, 50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组脑梗死体积明显缩小 (均  $P < 0.01$ ), 提示绞股蓝

皂苷 XVII 能有效减少脑 I/R 大鼠脑梗死组织, 抑制梗死灶扩大。

**2.3 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 大鼠脑组织病理的影响 (图 2):**光镜下显示, 假手术组大鼠脑组织无明显病理学改变; I/R 模型组大鼠脑组织神经细胞出现明显损伤; 50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组大鼠神经细胞损伤程度较 I/R 模型组明显减轻。

**2.4 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 大鼠血清氧化应激指标水平的影响 (图 3):**再灌注后 24 h, I/R 模型组大鼠 NQO1、SOD 和  $\gamma$ -GCS 水平均较假手术组明显降低, 而 MDA、HO-1 和 ROS 水平均较假手术组明显升高 (均  $P < 0.01$ )。50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显提高脑 I/R 大鼠 NQO1、SOD、HO-1 和  $\gamma$ -GCS 水平, 降低 ROS 和 MDA 水平 (均  $P < 0.01$ ); 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 无明显作用 (均  $P > 0.05$ )。

**2.5 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 大鼠缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达的影响 (图 4):**再灌注后 24 h, I/R 模型组大鼠 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 表达均较假手术组明显升高 (均  $P < 0.01$ )。50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显提高脑 I/R 模型大鼠 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 表达 (均  $P < 0.01$ ); 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 无明显作用 (均  $P > 0.05$ )。

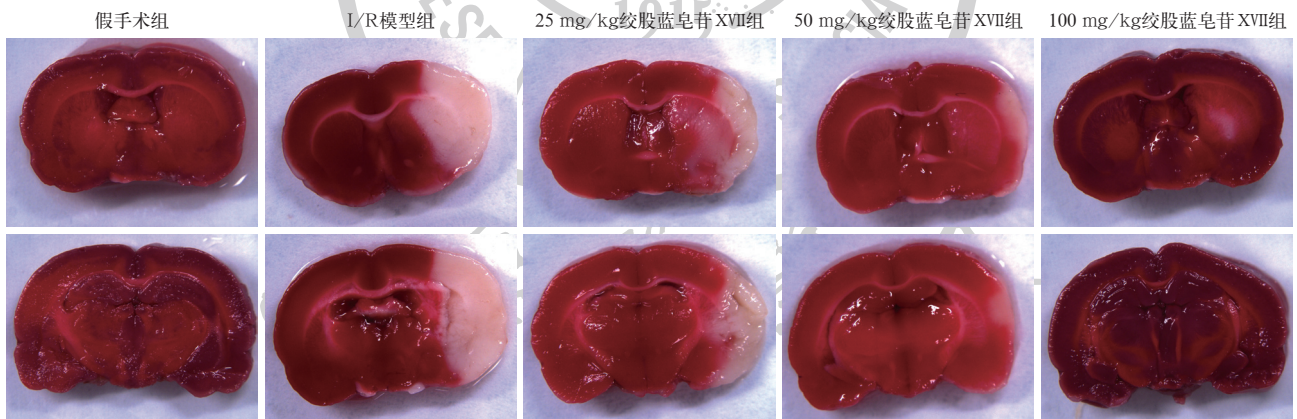


图 1 各组大鼠脑组织大体观察 梗死组织为白色。假手术组大鼠未见脑梗死组织; 缺血/再灌注 (I/R) 模型组大鼠可见明显脑梗死组织; 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组大鼠较 I/R 模型组无明显变化; 50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组大鼠脑梗死面积较 I/R 模型组明显缩小 氯化三苯四氮唑 (TTC) 染色

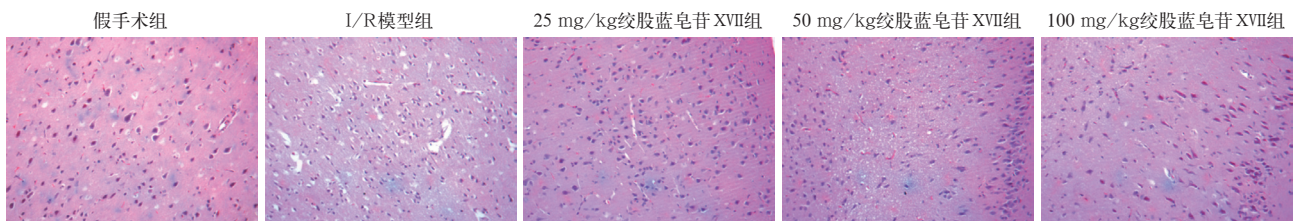
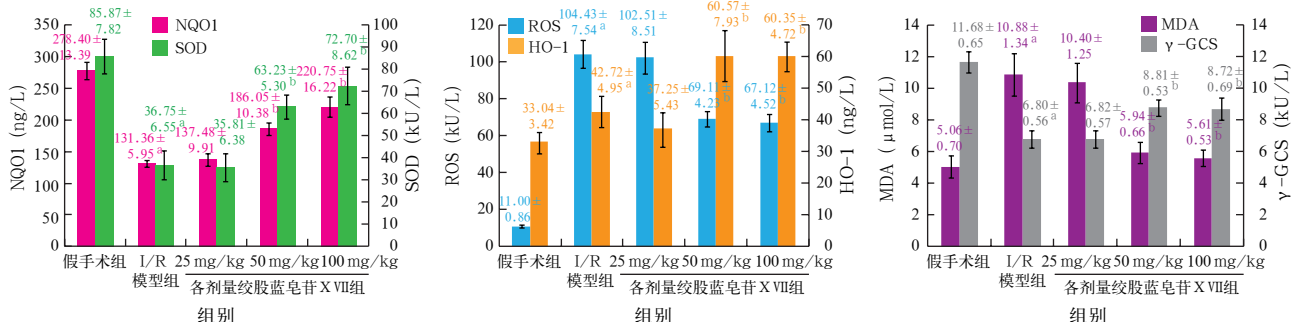
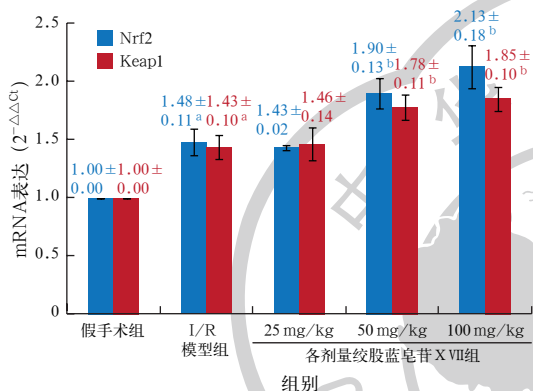


图 2 光镜下观察各组大鼠脑组织病理学改变 假手术组大鼠大脑神经细胞大部分完整, 轮廓清晰, 细胞核规律地排列于细胞中心, 细胞质染为浅蓝色, 无明显病理改变; 缺血/再灌注 (I/R) 模型组大鼠的神经细胞排列不规则, 细胞核破裂, 排列至细胞边缘, 伴有间质水肿和炎症细胞浸润; 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组大鼠较 I/R 模型组无明显变化; 50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 组大鼠神经细胞损伤明显减轻 苏木素-伊红 (HE) 染色 高倍放大



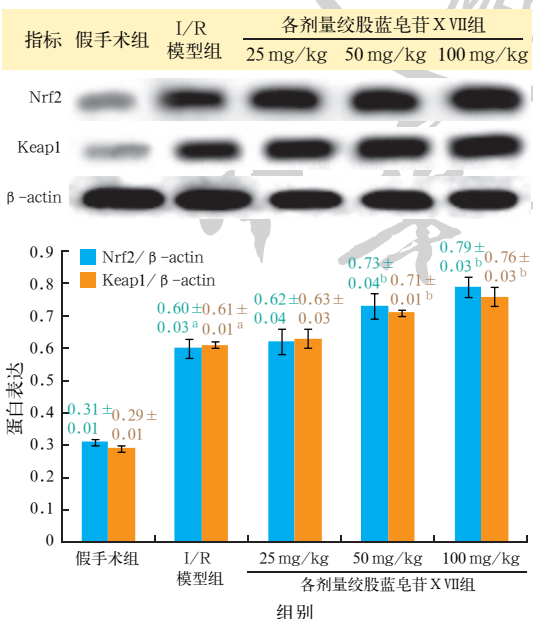
注: I/R 为缺血 / 再灌注, NQO1 为醌 NADH 氧化还原酶 1, SOD 为超氧化物歧化酶, ROS 为活性氧, HO-1 为血红素加氧酶 -1, MDA 为丙二醛, γ-GCS 为 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 I/R 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01

图 3 各组大鼠血清氧化应激指标水平比较



注: I/R 为缺血 / 再灌注, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, Keap1 为 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 I/R 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01

图 4 各组大鼠脑缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达比较



注: I/R 为缺血 / 再灌注, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, Keap1 为 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 I/R 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01

图 5 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组大鼠脑缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 的蛋白表达

2.6 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 大鼠缺血半暗带组织 Nrf2 和 Keap1 蛋白表达的影响 (图 5): 再灌注后 24 h, I/R 模型组大鼠 Nrf2 和 Keap1 的蛋白表达均较假手术组明显升高 (均 *P*<0.01)。50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显提高脑 I/R 模型大鼠 Nrf2 和 Keap1 的蛋白表达 (均 *P*<0.01); 25 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 并无明显作用 (均 *P*>0.05)。

### 3 讨论

脑梗死是目前致残率最高的神经性疾病,其发病机制复杂,高达 70% 的脑卒中是由大脑局部缺血引起的<sup>[11-12]</sup>。有研究显示,脑缺血由低氧和血管反应两部分组成,低氧不仅破坏了正常的脑组织代谢,同时进一步增加了内皮细胞的通透性和水肿程度,最终导致机体神经功能障碍,这也表明氧化应激是脑 I/R 损伤的主要原因<sup>[13]</sup>。本研究从抗氧化方面探讨绞股蓝皂苷 XVII 调控 Nrf2/Keap1 信号通路对脑 I/R 大鼠的保护作用,神经功能缺损评分、TTC 染色和病理评价方面的研究结果提示,50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 具有较好的抗脑 I/R 损伤作用。

Nrf2 是调节细胞氧化还原功能的转录因子,也是调控内源性氧化应激的关键因子<sup>[14]</sup>,而氧化应激是脑 I/R 损伤的主要途径之一,Nrf2/Keap1 信号通路的激活可以增强细胞抗氧化能力从而维持细胞氧化还原的稳态,抵抗脑 I/R 造成的氧化应激损伤<sup>[15-16]</sup>。龙隆等<sup>[17]</sup>研究发现,治疗药物可以通过上调脑 I/R 模型大鼠脑组织中的 Nrf2 含量激活 Nrf2/Keap1 信号通路,上调下游抗氧化酶 SOD 和 NQO1 的表达,减轻脑 I/R 损伤。另有研究表明,对脑缺血大鼠给予治疗药物后,脑内 Nrf2 增加,ROS 含量降低,脑 I/R 损伤减轻,而一旦敲除 Nrf2,这些保护作用均受到抑制<sup>[18]</sup>。此外,Dai 等<sup>[19]</sup>采用治疗药物对体内外脑 I/R 模型进行干预,发现 I/R 模型组大鼠脑组织及细胞

核中 Nrf2 表达及 ROS 和 MDA 表达均明显降低,而治疗药物可以逆转这种现象,与上述研究结果一致。以上均表明 Nrf2 在脑 I/R 损伤中起着关键作用。本研究显示,50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显提高脑 I/R 模型大鼠脑缺血半暗带组织中 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 及蛋白表达,表明绞股蓝皂苷 XVII 能通过调节 Nrf2/Keap1 信号通路起到抗脑 I/R 损伤的作用。

由 ROS 引起的氧化应激已被认为是脑梗死诱发神经元损伤的潜在机制之一<sup>[20]</sup>。为了应对细胞氧化损伤,激活的 Nrf2 会转移到细胞核结合抗氧化反应基因的启动子区域,从而调节下游抗氧化基因的表达,如 HO-1<sup>[21]</sup>。HO-1 及其酶产物具有抗氧化、抗炎、抗凋亡和舒张血管的作用,同时可改善组织微循环<sup>[22]</sup>。有研究表明,Nrf2 激活可减轻脑缺血损伤引起的氧化损伤,HO-1 缺陷小鼠表现出更严重的脑损伤<sup>[23]</sup>。此外, $\gamma$ -GCS 是机体重要的抗氧化酶,也是机体内谷胱甘肽生物合成中的限速酶,在氧化还原平衡中起重要作用; $\gamma$ -GCS 水平与机体的抗氧化能力密切相关<sup>[24]</sup>。本研究显示,50 mg/kg 及 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 能明显提高脑 I/R 模型大鼠血清 NQO1、SOD、HO-1 和  $\gamma$ -GCS 水平,同时可明显降低 ROS 和 MDA 水平,表明绞股蓝皂苷 XVII 具有较好的抗氧化作用。

综上所述,50 mg/kg 和 100 mg/kg 绞股蓝皂苷 XVII 对脑 I/R 模型大鼠具有抗氧化作用,该作用可能是通过调控 Nrf2/ARE 信号通路调节 NQO1、SOD、HO-1、 $\gamma$ -GCS、ROS 和 MDA 水平实现的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 张琳,李云琦,刘阳阳,等.三氧预处理保护大鼠脑缺血/再灌注损伤及其对谷氨酸受体的影响[J].中华危重病急救医学,2022,34(3):280-283. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20211021-01533.
- [2] 邵华.不同生化指标在脑梗死患者中的表达及对神经功能损伤程度和预后的评估价值[J].实用检验医师杂志,2020,12(2):65-68. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.001.
- [3] Shao ZQ, Dou SS, Zhu JG, et al. Apelin-13 inhibits apoptosis and excessive autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2021, 16 (6): 1044-1051. DOI: 10.4103/1673-5374.300725.
- [4] Kryl'skii ED, Chupandina EE, Popova TN, et al. Neuroprotective effect of 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline mediated via regulation of antioxidant system and inhibition of inflammation and apoptosis in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion [J]. Biochimie, 2021, 186: 130-146. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.04.010.
- [5] Hu LX, Chen WM, Tian F, et al. Neuroprotective role of fucoxanthin against cerebral ischemia/reperfusion injury through activation of Nrf2/HO-1 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1484-1489. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.088.
- [6] Wen ZM, Hou WC, Wu W, et al. 6'-O-galloylpaconiflorin attenuates cerebral ischemia reperfusion-induced neuroinflammation and oxidative stress via PI3K/Akt/Nrf2 activation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 8678267. DOI: 10.1155/2018/8678267.
- [7] Yang K, Zhang HJ, Luo Y, et al. Gypenoside XVII prevents atherosclerosis by attenuating endothelial apoptosis and oxidative stress: insight into the ER  $\alpha$ -mediated PI3K/Akt pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (2): 77. DOI: 10.3390/ijms18020077.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [9] 王文秀,张普,刘倩,等.改良线栓法与传统线栓法制备 MCAO 大鼠模型 20 天存活率的比较 [J]. 西部中医药, 2020, 33 (4): 42-44. DOI: 10.12174/j.issn.1004-6852.2020.04.13.
- [10] Lu JQ, Gu LL, Li Q, et al. Andrographolide ameliorates maltol aluminium-induced neurotoxicity via regulating p62-mediated Keap1-Nrf2 pathways in PC12 cells [J]. Pharm Biol, 2021, 59 (1): 232-241. DOI: 10.1080/13880209.2021.1883678.
- [11] Zhang HY, Zhang TS, Wang DD, et al. IFN- $\gamma$  regulates the transformation of microglia into dendritic-like cells via the ERK/c-myc signaling pathway during cerebral ischemia/reperfusion in mice [J]. Neurochem Int, 2020, 141: 104860. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104860.
- [12] 杨蓉,李寅珍,严首春.丁苯酞氯化钠注射液联合 rt-PA 超时间窗溶栓治疗急性脑梗死患者的效果评价 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2021, 28 (3): 316-319. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.03.014.
- [13] Li L, Zhi DY, Cheng RB, et al. The neuroprotective role of SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling in limb postconditioning in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neurosci Lett, 2021, 749: 135736. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.135736.
- [14] 王菲,徐如彬,贾莉莉,等.肝缺血/再灌注所致远隔脏器损伤机制及麻醉药物的保护作用 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3 (6): 373-376. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2015.06.015.
- [15] 叶胜,曹钰.Nrf2-HO1 信号通路调控脑缺血-再灌注氧化应激损伤的研究进展 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28 (12): 1571-1575. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1671-0282.2019.12.026.
- [16] 卢志刚,卢青,李钊硕.Nrf2 信号通路在脑缺血/再灌注损伤神经保护机制中的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2022, 34 (3): 325-328. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20211018-01506.
- [17] 龙隆,徐应淑,雷鸣,等.淫羊藿次苷 II 对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2017, 36 (10): 598-602. DOI: 10.14109/j.cnki.xyylc.2017.10.007.
- [18] Zhou F, Wang MD, Ju J, et al. Schizandrin A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing inflammation and oxidative stress and regulating the AMPK/Nrf2 pathway regulation [J]. Am J Transl Res, 2019, 11 (1): 199-209.
- [19] Dai YY, Zhang HJ, Zhang JP, et al. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Chem Biol Interact, 2018, 284: 32-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.02.017.
- [20] Zhang SQ, Jiang XL, Wang Y, et al. Protective effect of An-Gong-Niu-Huang Wan pre-treatment against experimental cerebral ischemia injury via regulating GSK-3 $\beta$ /HO-1 pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 640297. DOI: 10.3389/fphar.2021.640297.
- [21] Fu K, Chen MC, Zheng H, et al. Pelargonidin ameliorates MCAO-induced cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by the action on the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Transl Neurosci, 2021, 12 (1): 20-31. DOI: 10.1515/tnsci-2021-0006.
- [22] Lei X, Li HX, Li M, et al. The novel Nrf2 activator CDDO-EA attenuates cerebral ischemic injury by promoting microglia/macrophage polarization toward M2 phenotype in mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27 (1): 82-91. DOI: 10.1111/cns.13496.
- [23] He J, Zhou D, Yan B. Eriocitrin alleviates oxidative stress and inflammatory response in cerebral ischemia reperfusion rats by regulating phosphorylation levels of Nrf2/NQO-1/HO-1/NF- $\kappa$ B p65 proteins [J]. Ann Transl Med, 2020, 8 (12): 757. DOI: 10.21037/atm-20-4258.
- [24] Ran SS, Liu JQ, Li SG. A systematic review of the various effect of arsenic on glutathione synthesis *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 9414196. DOI: 10.1155/2020/9414196.

(收稿日期: 2022-12-14)