

赵霞,薛娣,师少军. 芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 671-678.

Zhao X, Xue D, Shi SJ. Protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the LKB1/AMPK signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 671-678.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.010

芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用

赵霞^{1*}, 薛娣¹, 师少军²

(1. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473000; 2. 河南省安阳市中医院神经外科, 河南 安阳 455000)

【摘要】 目的 探讨芍药苷通过激活肝激酶 B1(LKB1)/5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用。方法 通过线栓闭塞大鼠大脑中动脉建立急性脑梗死模型,随机分为模型组、芍药苷(10 mg/kg)组、AMPK 抑制剂 CC(0.2 mg/kg)组、芍药苷(10 mg/kg)+CC(0.2 mg/kg)组,每组 12 只,另取 12 只大鼠仅分离出颈总动脉与颈外动脉,不插线栓,设为假手术组,分组给药处理后,采用 Morris 水迷宫实验评测大鼠认知功能;采用三苯基氯化四氮唑(TTC)染色检测各组大鼠脑梗死情况;采用 TUNEL 染色测定各组大鼠海马神经元凋亡率;采用试剂盒测量各组大鼠血清炎症因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)与白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平、脑组织过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)与丙二醛(MDA)含量;采用蛋白免疫印迹法检测各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、BCL2 相关 X 蛋白(Bax)与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白(p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK)表达状况。结果 与假手术组相比,模型组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间、脑组织 CAT 含量、p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低($P < 0.05$),脑梗死面积、海马神经元凋亡率、血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 ROS 与 MDA 含量、Bax 表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,芍药苷组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间、脑组织 CAT 含量、p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著升高($P < 0.05$),脑梗死面积、海马神经元凋亡率、血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 ROS 与 MDA 含量、Bax 表达水平显著降低($P < 0.05$)。CC 可减轻芍药苷对大鼠脑梗死的保护作用。结论 芍药苷可能通过激活 LKB1/AMPK 信号通路,而阻止炎症发生发展,降低氧化应激水平,减轻大鼠脑组织梗死及海马神经元凋亡,改善其认知功能,起到保护神经的作用。CC 可减轻芍药苷对大鼠脑梗死的保护作用。

【关键词】 芍药苷;肝激酶 B1/5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶;急性脑梗死;神经损伤;保护作用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0671-08

Protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the LKB1/AMPK signaling pathway

ZHAO Xia^{1*}, XUE Di¹, SHI Shaojun²

(1. Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China. 2. Department of Neurosurgery, Henan Anyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anyang 455000)

Corresponding author: ZHAO Xia. E-mail: nyzx010608@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the liver kinase B1 (LKB1)/5'-amp activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. **Methods** An acute cerebral infarction model was established by occlusion of the middle cerebral artery in rats using sutures,

[基金项目] 南阳市 2020 年市级科技计划项目(KJGG132)。

Funded by Nanyang 2020 Municipal Science and Technology Plan Project (KJGG132)。

[作者简介] 赵霞(1977—),女,副教授,研究方向:基础医学研究。Email:nyzx010608@163.com

and the rats were randomly divided into a Model group, Paeoniflorin (10 mg/kg) group, AMPK inhibitor Compound C (CC) (0.2 mg/kg) group, and Paeoniflorin (10 mg/kg) + CC (0.2 mg/kg) group, with 12 animals per group. In addition, 12 rats were separated from the common carotid artery and external carotid artery without the suture plug and used as the Sham group. After group administration, a Morris water maze test was used to evaluate the cognitive function of the rats. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to detect the cerebral infarction of rats in each group. TUNEL staining was used to determine the hippocampal neuron apoptosis rate of rats in each group. Kits were used to measure the levels of serum inflammatory factor inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β) levels, brain catalase (CAT), reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) in the brain tissues of the rats. Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), BCL2-associated X protein (Bax), and LKB1/AMPK pathway related proteins (p-LKB1/LKB1, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK) in the brain tissues. **Results** Compared with the Sham operation group, the number of times crossing the original platform, residence time in the original platform quadrant, brain tissue CAT content, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK, and Bcl-2 expression levels in the Model group were significantly less ($P < 0.05$), and the cerebral infarction area, hippocampal neuron apoptosis rate, serum iNOS and IL-1 β levels, brain tissue ROS and MDA content, and Bax expression level were significantly greater ($P < 0.05$). Compared with the Model group, the number of times crossing the original platform, residence time in the original platform quadrant, brain tissue CAT content, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK, and Bcl-2 expression levels in the Paeoniflorin group were significantly greater ($P < 0.05$), the cerebral infarction area, hippocampal neuron apoptosis rate, serum iNOS and IL-1 β levels, brain tissue ROS and MDA contents, and Bax expression level were significantly less ($P < 0.05$). CC can reverse the protective effect of paeoniflorin in a rat cerebral infarction. **Conclusions** Paeoniflorin may activate the LKB1/AMPK signal to prevent the occurrence and development of inflammation, reduce the oxidative stress level, reduce brain tissue infarction and hippocampal neuronal apoptosis in rats, improve cognitive function, and play a role in protecting nerves. CC can reduce the protective effect of paeoniflorin in a rat cerebral infarction.

【Keywords】 paeoniflorin; liver kinase B1/5'-amp activated protein kinase; acute cerebral infarction; nerve injury; protective effect

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 是一种常发生于中老年人群的脑血管疾病, 发病率高, 病情进展快, 治愈困难, 可导致偏瘫、认知功能障碍等后遗症, 是我国主要的致死、致残疾病之一^[1-2]。ACI 发病机制复杂, 抗炎因子和致炎因子表达失衡引发的炎症在其中发挥着重要作用, 研究显示, 抑制炎症, 降低氧化应激水平, 可减轻缺血再灌注脑组织损伤, 改善 ACI 引发的神经功能障碍^[3-4]。

芍药苷是从芍药中提取的活性成分, 具有抗炎、抗过敏、抗氧化及改善认知等多种生物学效应, 可通过抑制 NLRP3 炎症小体信号激活而减轻脑缺血再灌注损伤^[5], 还可激活 SIRT1/NF- κ B 信号通路, 改善缺氧缺血性脑损伤新生大鼠认知功能^[6], 是治疗 ACI 的一种重要药物, 但其治疗 ACI 的机制还未有具体定论。肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1)/5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (5'-amp activated protein kinase, AMPK) 是调控脂质代谢、氧化应激和炎症的重要通路。上调 SIRT1 表达, 可激活 LKB1/AMPK 信号通路, 显著减轻氧化应激损伤,

抑制脂质合成^[7-8], 还可通过减轻炎症、氧化应激和神经细胞凋亡来改善 ACI 引发的脑损伤^[9]。因而推测激活 LKB1/AMPK 信号通路可能是芍药苷治疗 ACI 的药理机制。本文以线栓闭塞大鼠大脑中动脉的方法建立 ACI 模型, 探讨芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对其神经损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 SPF 级健康成年 SD 大鼠, 雌雄各半, 8 周龄, 体重 290 ~ 310 g, 购自北京华阜生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2019-0008】, 分笼饲养在河南中医药大学动物房中【SYXK (豫) 2020-0004】, 室内温度、相对湿度分别设为 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、55% $\pm$ 5%, 12 h/12 h 明暗交替照明, 大鼠自由饮水采食, 饲喂普通维持饲料购于江苏省协同医药生物工程有限公司。大鼠适应性饲养 1 周后进行研究。本研究符合本校动物实验与伦理审查 (2021-0003)。

1.1.2 主要试剂与仪器

芍药苷(纯度 $\geq 98\%$, 货号 VTY31585), 购于北京德航五洲科技有限公司; AMPK 的抑制剂 Compound C (CC) (货号 HY-13418A), 购于美国 MedChemExpress 公司; 三苯基氯化四氮唑 (Triphenyltetrazolium chloride, TTC) (货号 T8170)、高效 RIPA 裂解液(货号 R0010)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号 T2190), 购于北京索莱宝科技有限公司; 大鼠诱导型一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) 酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒(货号 SBJ-R00), 购于上海木燊科技有限公司; 白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒(货号 H002)、活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 测定试剂盒(货号 E004-1-1), 购于南京建成生物工程研究所有限公司; 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒(货号 ab238537)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性测定试剂盒(货号 ab83464)、BCA 蛋白检测试剂盒(货号 ab102536)、兔源 Anti-B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 一抗(货号 ab194583)、兔源 Anti- β -actin 一抗(货号 ab8227)、羊抗兔二抗(货号 ab150077)、兔源 Anti-BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2-associated X protein, Bax) 一抗(货号 ab32503), 购于美国 Abcam 公司; 兔源 Anti-LKB1 一抗(货号 AF7389)、兔源 Anti-p-AMPK 一抗(货号 AF5908)、兔源 Anti-AMPK 一抗(货号 AF6195), 购于上海碧云天生物技术有限公司; 兔源 Anti-p-LKB1 一抗(货号 sc-271924) 购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司等。

MG-3Y 迷宫刺激器, 成都泰盟科技有限公司产品; Morris 水迷宫, 购自安徽正华生物仪器设备有限公司; 自动酶标仪购于美国伯腾公司, 型号 2010ELX-808; 包埋机、倒置光学显微镜、切片机购于德国 Leica 公司, 型号 EG1160、DMI3000B、CM3050S; 高通量垂直电泳仪、转印电泳仪购于北京六一生物科技有限公司, 型号 DYCZ-20H、DYCZ-40K; 蛋白凝胶成像仪购于美国 Bio-Rad 公司, 型号 170-8200 等。

1.2 方法

1.2.1 ACI 大鼠模型制备及分组给药

参照文献制备 ACI 大鼠模型^[10]; 大鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 45 mg/kg 戊巴比妥钠, 待大鼠进入深度麻醉状态后仰卧固定, 颈部备皮消毒后切开

皮肤、肌肉组织, 找到颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉, 将其游离, 永久结扎颈外动脉远心端, 暂时夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉远心端, 于距离分叉处 2 mm 的颈外动脉处作切口, 插入圆头线栓, 沿颈内动脉前进至圆头端距离分叉处约 16 mm 为止, 2 h 后取出线栓, 恢复供血, 即完成造模, 将其随机分为模型组、芍药苷组、CC 组、芍药苷 + CC 组, 每组 12 只, 另取 12 只大鼠仅分离出颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉, 不插线栓, 作为假手术组。

将芍药苷与 CC 分别溶于 0.9% 氯化钠溶液, 获得 1 mg/mL 的芍药苷药液^[10], 0.02 mg/mL 的 CC 药液^[11], 芍药苷 + CC 组大鼠以 10 mL/kg 剂量的芍药苷药液每天灌胃干预 1 次, 同时以 10 mL/kg 剂量的 CC 药液每天尾静脉注射干预 1 次; 芍药苷组大鼠以 10 mL/kg 剂量的芍药苷药液每天灌胃干预 1 次, 同时以 10 mL/kg 剂量的 0.9% 氯化钠溶液每天尾静脉注射干预 1 次; CC 组大鼠以 10 mL/kg 剂量的 0.9% 氯化钠溶液每天灌胃干预 1 次, 同时以 10 mL/kg 剂量的 CC 药液每天尾静脉注射干预 1 次, 共给药 14 d。假手术组与模型组在相应位置注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 检测大鼠认知功能

药物干预结束后 24 h, 通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠认知功能: 将大鼠面朝水池 (水深 22 cm, 有 4 个等大的象限) 壁放入水中, 训练其寻找平台 (位于象限正中, 高 20 cm), 5 d 后撤去平台, 将大鼠自每个象限面朝水池壁依次放入水中, 记录其 60 s 内运动轨迹, 分析得到各组大鼠跨越原平台次数及原平台象限内停留时间^[12]。

1.2.3 检测大鼠脑梗死情况及标本收集

Morris 水迷宫实验结束后, 以 1.2.1 中的方法麻醉大鼠, 自颈总动脉抽血, 静置离心, 取出上清, 放置于干净 EP 管中分组标记, 在 -80°C 保存。各组大鼠中任意选出 6 只, 断头后分离出大脑, 切片得到厚度大致相同的冠状切片, 将其浸入 TTC 溶液中染色, 然后固定、拍照, 使用 Image pro 软件进行图像分析, 计算出脑梗死面积 (%) = 全脑梗死面积 / 全脑片面积 $\times 100\%$ 。将各组剩余的 6 只大鼠断头分离出大脑后, 剪下 1.2 g 脑组织, 剪成小碎块后加入适量高效 RIPA 裂解液, 匀浆离心, 以 BCA 试剂盒测量上清中蛋白总浓度后, 将其分组标记, 在 -80°C 保存; 剩余脑组织漂洗、固定、脱水后, 以仪器进行包埋、切片备用。

1.2.4 检测大鼠海马神经元凋亡情况

选出 1.2.3 中含有完整海马结构的脑组织切片,进行脱蜡、水化、TUNEL 染色、脱水、透明、封片,镜下观察着色情况,以 Image pro 软件分析图像,计算出凋亡率(%)= 凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%,具体操作参照试剂盒说明书指导进行。

1.2.5 检测大鼠血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 CAT、ROS 与 MDA 含量

取出 1.2.3 中血清与脑组织蛋白样品液,以冰水浴缓慢解冻,各取出 0.15 mL,测定血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 CAT、ROS 与 MDA 含量,具体操作参照试剂盒说明书指导进行。

1.2.6 检测大鼠脑组织凋亡蛋白与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白表达

取出 1.2.5 中剩余的脑组织蛋白样品液,根据蛋白浓度测定结果将其调至各组相等,然后加入适量上样缓冲液,变性蛋白(煮沸,5 min),取 20 μ L 样品液,依次通过电泳、湿转实验,将总蛋白分离后转至 PVDF 膜上,以 3% 牛血清白蛋白溶液封闭蛋白非特异位点,分别以兔源 Bcl-2、Bax、p-LKB1、LKB1、p-AMPK、AMPK、 β -actin 一抗孵育、TBST 洗膜、二抗孵育、TBST 洗膜、化学发光法显影、拍照,使用 Image pro 软件分析蛋白条带图像灰度值,计算出各组蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

实验数据为计量资料,均采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 24.0 软件统计分析,多组间比较行单因素方差,组间两两进一步比较采用 SNK- q 检验分析, $P < 0.05$,表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠认知功能检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间显著降低($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间均显著升高($P < 0.05$),CC 组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间均显著降低($P < 0.05$)(见表 1)。

2.2 各组大鼠脑梗死情况检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死面积显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠脑梗死面积均显著降低($P < 0.05$);CC 组大鼠脑梗死面积均显著升高($P < 0.05$)(见图 1、表 2)。

表 1 各组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of times of crossing the original platform and residence time in the original platform quadrant of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Groups	跨越原平台次数(n) Times of crossing the original platform(n)	原平台象限内停留时间(s) Dwell time in quadrant of original platform(s)
假手术组 Sham operation group	13.01 $\pm$ 3.12	34.76 $\pm$ 4.07
模型组 Model group	6.28 $\pm$ 0.54 ^a	21.93 $\pm$ 2.02 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	8.26 $\pm$ 1.22 ^{bc}	26.54 $\pm$ 2.75 ^{bc}
CC 组 CC group	1.02 $\pm$ 0.11 ^{bc}	7.01 $\pm$ 1.63 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	6.79 $\pm$ 0.68	23.04 $\pm$ 2.28

注:与假手术组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与芍药苷 + CC 组相比,^c $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with sham operation group, ^a $P < 0.05$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$. Compared with paeoniflorin + CC group, ^c $P < 0.05$. (The same in the following tables)

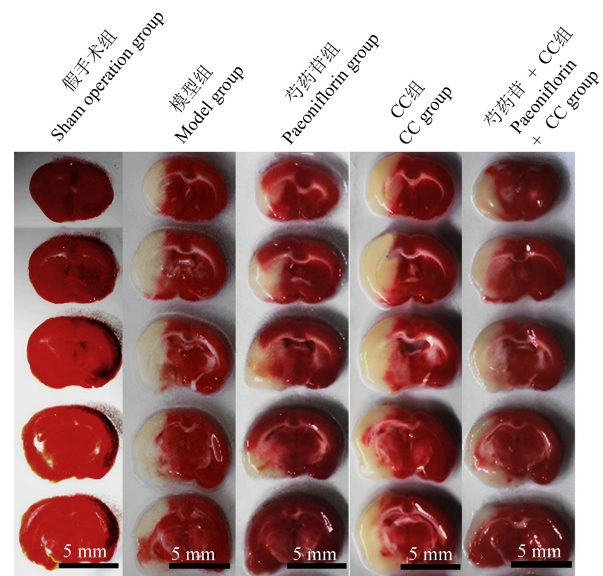


图 1 TTC 染色检测各组大鼠脑梗死情况

Figure 1 TTC staining was used to detect the cerebral infarction of rats in each group

2.3 各组大鼠海马神经元凋亡情况检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠海马神经元凋亡率显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠海马神经元凋亡率均显著降低($P < 0.05$);CC 组大鼠海马神经元凋亡率均显著升高($P < 0.05$)(见图 2、表 3)。

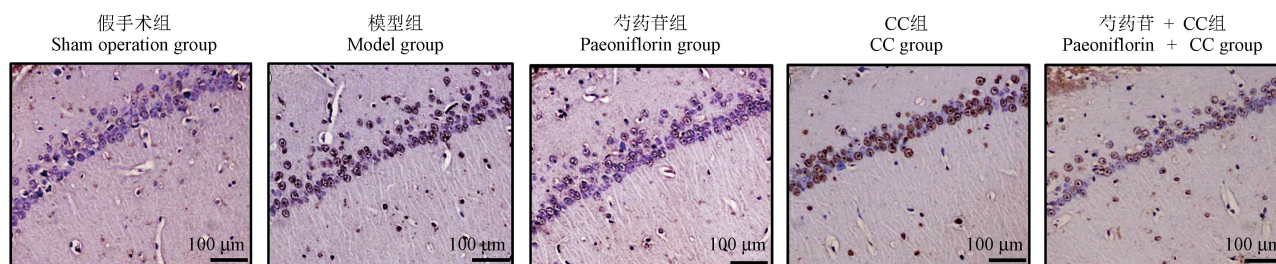


图 2 TUNEL 染色检测各组大鼠海马神经元凋亡情况

Figure 2 TUNEL staining was used to detect the apoptosis of hippocampal neurons in each group

表 2 各组大鼠脑梗死面积比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Comparison of cerebral infarction area of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	脑梗死面积(%) Cerebral infarction area(%)
假手术组 Sham operation group	0.00 ± 0.00
模型组 Model group	26.10 ± 1.36 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	9.25 ± 0.92 ^{bc}
CC 组 CC group	45.32 ± 4.01 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	24.86 ± 1.75

表 3 各组大鼠海马神经元凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Comparison of apoptosis rate of hippocampal neurons in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate(%)
假手术组 Sham operation group	1.20 ± 0.36
模型组 Model group	26.07 ± 1.25 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	5.13 ± 0.86 ^{bc}
CC 组 CC group	59.34 ± 5.25 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	25.78 ± 1.62

2.4 各组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.05$); CC 组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平均显著升高($P < 0.05$)(见表 4)。

表 4 各组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平比较结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 4 Serum inflammatory factors iNOS and IL-1 of rats in each group β Horizontal comparison results($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Groups	iNOS (U/mL)	IL-1 β (pg/mL)
假手术组 Sham operation group	15.16 ± 3.25	62.43 ± 5.89
模型组 Model group	67.43 ± 8.09 ^a	117.39 ± 10.54 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	17.08 ± 3.56 ^{bc}	64.28 ± 7.21 ^{bc}
CC 组 CC group	108.02 ± 10.15 ^{bc}	168.46 ± 12.96 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	65.37 ± 8.61	115.25 ± 9.12

2.5 各组大鼠脑组织氧化应激水平检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 CAT 含量显著降低($P < 0.05$),ROS、MDA 含量显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠脑组织 CAT 含量均显著升高($P < 0.05$),ROS、MDA 含量均显著降低($P < 0.05$); CC 组大鼠脑组织 CAT 含量均显著降低($P < 0.05$),ROS、MDA 含量均显著升高($P < 0.05$)(见表 5)。

表 5 各组大鼠脑组织 CAT、ROS 与 MDA 含量比较结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Comparison results of cat, ROS and MDA contents in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	CAT (U/mg prot)	ROS (U/kg prot)	MDA (nmol/mg prot)
假手术组 Sham operation group	6.59 ± 0.71	0.92 ± 0.21	1.12 ± 0.13
模型组 Model group	2.65 ± 0.18	6.84 ± 0.67 ^a	3.90 ± 0.35 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	6.17 ± 0.83 ^{bc}	1.14 ± 0.32 ^{bc}	1.20 ± 0.29 ^{bc}
CC 组 CC group	0.68 ± 0.15 ^{bc}	12.38 ± 2.26 ^{bc}	6.04 ± 0.41 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	2.92 ± 0.39	6.57 ± 0.84	3.71 ± 0.39

2.6 各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax) 与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白 (p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK) 表达检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,芍药苷组大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); CC 组大鼠脑组

织 p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), p-LKB1/LKB1 水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。与芍药苷 + CC 组相比,芍药苷组大鼠脑组织 p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p-LKB1/LKB1 水平无显著性差异 ($P > 0.05$); CC 组大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$) (见图 3,表 6)。

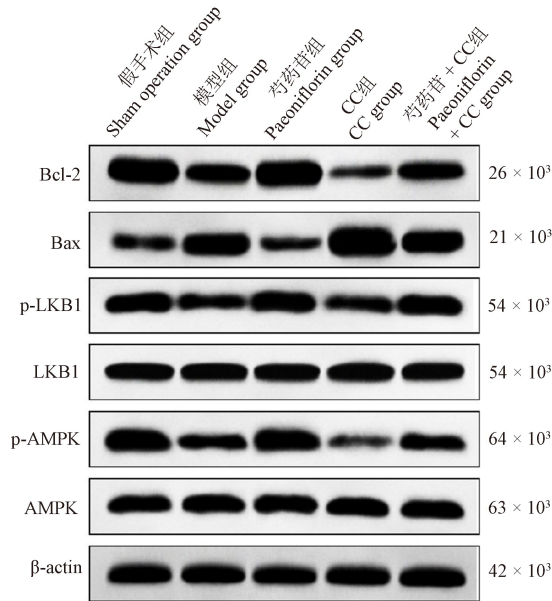


图 3 免疫印迹检测各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白表达水平

Figure 3 Expression levels of apoptosis related proteins and LKB1/AMPK pathway related proteins in rat brain were detected by Western Blot

表 6 各组大鼠凋亡相关蛋白与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of relative expression levels of apoptosis related proteins and LKB1/AMPK pathway related proteins in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	p-LKB1/LKB1	p-AMPK/AMPK
假手术组 Sham operation group	1.84 $\pm$ 0.37	0.22 $\pm$ 0.07	1.31 $\pm$ 0.28	1.68 $\pm$ 0.33
模型组 Model group	0.71 $\pm$ 0.14 ^a	1.48 $\pm$ 0.23 ^a	0.47 $\pm$ 0.09 ^a	0.72 $\pm$ 0.12 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	1.79 $\pm$ 0.42 ^{bc}	0.25 $\pm$ 0.08 ^{bc}	1.26 $\pm$ 0.25 ^b	1.64 $\pm$ 0.41 ^{bc}
CC 组 CC group	0.12 $\pm$ 0.03 ^{bc}	2.13 $\pm$ 0.31 ^{bc}	0.45 $\pm$ 0.08 ^c	0.18 $\pm$ 0.05 ^{bc}
芍药苷+CC 组 Paeoniflorin + CC group	0.74 $\pm$ 0.13	1.45 $\pm$ 0.29	1.23 $\pm$ 0.30	0.76 $\pm$ 0.14

3 讨论

ACI 具有高发病率、高病死率、高致残率等特点,我国每年因此而致死致残的人数众多,所花费

的金钱、精力、时间给患者家庭带来了沉重的负担,极大降低了患者及其家庭的生活质量,是目前神经临床医学亟需解决的热点和难点问题^[13]。线栓法构建的大脑中动脉栓塞模型是常用的模拟动物脑

缺血损伤的模型之一,被广泛应用于脑部缺血疾病的研究,可较好类比人脑缺血损伤的病理机制。因此本文以线栓闭塞大鼠大脑中动脉的方法建立急性脑梗死模型,结果显示,造模大鼠脑梗死面积、血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 ROS 与 MDA 含量、Bax 表达水平显著升高,导致强烈的炎症及氧化应激,造成大鼠海马神经元凋亡,跨越原平台次数、原平台象限内停留时间降低,学习认知能力受损,提示模型构建成功。

芍药苷作为具有很强抗炎、抗氧化作用的天然活性物质,可抑制 NLRP3 炎症小体信号,进而延缓视网膜缺血性损伤^[14],还可减少氯化钴诱导的神经细胞 PC12 内 ROS 水平,降低氧化应激水平,抑制细胞凋亡,并对脑缺血再灌注损伤大鼠起到明显的神经保护作用^[5,15],半暗带损伤是脑梗死不良预后的主要原因,其具有可逆性,及时采取药物恢复血流可恢复半暗带损伤。氧自由基增多可能会促进半暗带细胞的凋亡,因此抑制氧自由基的释放,恢复半暗带区域的神经元活力是治疗脑缺血损伤的方法之一。本研究芍药苷处理的 ACI 大鼠脑组织脑梗死面积明显减少,ROS 与 MDA 含量、海马神经凋亡比例降低,CAT 含量升高,脑梗死面积减少的可能原因是芍药苷清除氧自由基,促进了缺血半暗带的转换,脑梗死面积减少。同时芍药苷处理大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间升高,大鼠认知功能提升,证实了芍药苷对 ACI 大鼠的疗效。此外芍药苷处理大鼠血清 iNOS 与 IL-1 β 水平降低,表明芍药苷可抑制致炎因子表达,阻碍炎症发生与进展。

脑组织缺血再灌注引发的严重炎症反应和高水平的氧化应激造成神经元细胞变性凋亡,是 ACI 的主要致病基础,抑制炎症及脂质过氧化是减轻 ACI 所致神经损伤的有效手段^[16-17]。LKB1/AMPK 作为机体调控炎症与氧化应激反应的重要通路,在脑损伤、阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统疾病的发病及病情进展过程中发挥着关键作用,促进 LKB1、AMPK 的磷酸化激活,可通过促进自噬抑制氧-葡萄糖剥夺/复氧诱导的神经细胞 PC12 凋亡^[18],还可减轻神经炎症,缓解脑缺血再灌注引发的氧化应激损伤,起到神经保护作用^[9,19-20]。由此可知,LKB1/AMPK 信号是 ACI 的一个重要治疗靶点。本文结果显示,芍药苷干预可阻止 ACI 大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK 水平的降低,

以 AMPK 抑制剂 CC 处理 ACI 大鼠,可加重神经炎症及氧化应激反应,增强脑梗死及海马神经元凋亡,导致大鼠认知功能进一步受损,并可减弱芍药苷改善 ACI 大鼠脑损伤的作用,逆转其对大鼠的神经保护功能,表明芍药苷可通过激活 LKB1/AMPK 信号通路,阻碍氧化应激与炎症反应发生发展,减轻脑梗死及海马神经元凋亡,增强 ACI 大鼠认知能力,改善其神经功能。

综上所述,芍药苷可增强 LKB1、AMPK 的磷酸化,清除氧自由基,减少炎症细胞因子表达,减轻神经炎症,减弱氧化应激,抑制脑梗死与海马神经元凋亡,修复 ACI 大鼠认知功能,起到神经保护作用,促进 LKB1/AMPK 信号传导是其药理机制之一。

参 考 文 献 (References)

- [1] 阮中繁, 谢明, 李艳, 等. 参麦对急性脑梗死小鼠脑组织的保护作用及相关机制的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 23-27.
Ruang ZF, Xie M, Li Y, et al. Exploration of the protective effect of shenmai injection on brain tissue and its related mechanisms in a mouse model of cerebral infarction [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 23-27.
- [2] Liu L, Zhang L. Posterior reversible encephalopathy syndrome coexists with acute cerebral infarction: challenges of blood pressure management [J]. Quant Imaging Med Surg, 2020, 10(12): 2356-2365.
- [3] 何明月, 陆菁菁. 炎症与急性缺血性脑卒中出血转化研究进展 [J]. 中华神经科杂志, 2020, 53(9): 732-735.
He MY, Lu JJ. Research progress of update on inflammation and hemorrhagic transformation [J]. Chin J Neurol, 2020, 53(9): 732-735.
- [4] 王志成, 吕晓红. 缺血性脑卒中的氧化应激相关因子研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(1): 87-89.
Wang ZC, Lv XH. Research progress of oxidative stress related factors in ischemic stroke [J]. J Apoplexy and Nervous Diseases, 2013, 30(1): 87-89.
- [5] 刘湘, 乔丽菲, 刘垚君, 等. 芍药苷对脑缺血再灌注损伤大鼠 NLRP3 炎症体信号通路相关因子表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(10): 40-44.
Liu X, Qiao LF, Liu YJ, et al. Effect of paeoniflorin on the expression of NLRP3 inflammatory signal pathway related factors in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Inform Tradit Chin Med, 2019, 26(10): 40-44.
- [6] 刘延霞, 涂丰霞, 林则彬. 芍药苷对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠认知功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(24): 3992-3994.
Liu YX, Tu FX, Lin ZB. Effect of paeoniflorin on cognitive function in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(24): 3992-3994.
- [7] Sharma A, Anand SK, Singh N, et al. Berbamine induced

- activation of the SIRT1/LKB1/AMPK signaling axis attenuates the development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced NAFLD rats [J]. *Food Funct*, 2021, 12(2): 892–909.
- [8] Li X, Liu J, Hu H, et al. Dichloroacetate ameliorates cardiac dysfunction caused by ischemic insults through AMPK signal pathway-not only shifts metabolism [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 167(2): 604–617.
- [9] Cai Z, Wang C, Chen Y, et al. An antioxidant role by minocycline via enhancing the activation of LKB1/AMPK signaling in the process of cerebral ischemia injury [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18(3): 142–151.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [11] 马蒂达, 吴洋, 王显, 等. 桃叶珊瑚苷通过 AMPK/NLRP3 通路对心肌梗死大鼠心功能的影响及机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(7): 773–780.
- Ma DD, Wu Y, Wang X, et al. Effect and mechanism of aucubin on cardiac function in rats with myocardial infarction through AMPK/NLRP3 pathway [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2021, 46(7): 773–780.
- [12] 何磊, 陈军, 陈丽莉, 等. 应用 Morris 水迷宫实验评估银屑病对小鼠模型认知功能的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(11): 836–839.
- He L, Chen J, Chen LL, et al. Evaluation of the effect of psoriasis on cognitive function of mouse model by Morris water maze test [J]. *Chin J Dermatol*, 2019, 52(11): 836–839.
- [13] Song XD, Li SX, Zhu M. Plasma miR-409-3p promotes acute cerebral infarction via suppressing CTRP3 [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(4): 324–333.
- [14] 杨佩瑶, 赵军, 张娟美, 等. 芍药苷通过调控 NLRP3 炎症小体保护视网膜缺血性损伤 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 36(12): 920–924.
- Yang PY, Zhao J, Zhang JM, et al. Paeoniflorin protects retinal ischemic injury by regulating NLRP3 inflammatory bodies [J]. *Chin J Expophthalmol*, 2019, 36(12): 920–924.
- [15] 雷昌, 黄丹, 向韵, 等. 芍药苷对氯化钴诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. *中成药*, 2020, 42(10): 2605–2610.
- Lei C, Huang D, Xiang Y, et al. Protective effect of paeoniflorin on oxidative stress injury of PC12 cells induced by cobalt chloride [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2020, 42(10): 2605–2610.
- [16] Yan W, Sun W, Fan J, et al. Sirt1-ROS-TRAF6 signaling-induced pyroptosis contributes to early injury in ischemic mice [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(8): 845–859.
- [17] Feng W, Liu G, Qin J. Ginkgo biloba damo injection combined with troxerutin regulates the TLR4/NF- κ B pathway and promotes the recovery of patients with acute cerebral infarction [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(4): 3344–3350.
- [18] Zhao DY, Yu DD, Ren L, et al. Ligustilide protects PC12 cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis via the LKB1-AMPK-mTOR signaling pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(3): 473–481.
- [19] Qiao P, Ma J, Wang Y, et al. Curcumin prevents neuroinflammation by inducing microglia to transform into the M2-phenotype via CaMKK β -dependent activation of the AMP-activated protein kinase signal pathway [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2020, 17(8): 735–752.
- [20] Cai ZY, Wang CL, Lu TT, et al. Berberine alleviates amyloid-beta pathogenesis via activating LKB1/AMPK signaling in the brain of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 19(5): 342–348.

[收稿日期] 2021-11-09