

补阳还五汤通过甲酰肽受体2减轻大鼠脑缺血再灌注后氧化应激损伤

巫芳华, 刘玉莲, 高宇容, 杨开令, 刘微*
(广州中医药大学基础医学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤通过甲酰肽受体2(FPR2)对脑缺血再灌注模型大鼠氧化应激反应的抑制作用及神经保护作用。方法:将48只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、补阳还五汤组和补阳还五汤联合FPR2抑制剂(Boc-2)组,假手术组仅游离血管,不做插线处理。其他各组运用改良Longa法构建大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型,缺血2h后再灌注;再灌注后补阳还五汤组和补阳还五汤联合Boc-2组给予补阳还五汤($16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,每日2次;补阳还五汤联合Boc-2组术前30 min腹腔注射Boc-2($0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);假手术组与模型组给予等体积生理盐水。再灌注24 h后,退化神经元染色(FJC)观察FJC阳性细胞数目的变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缺血侧脑组织凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)和活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达;生化试剂盒检测缺血侧脑组织中超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),谷胱甘肽(GSH),一氧化氮(NO)水平;免疫荧光检测还原型辅酶II(NADPH)氧化酶2(NOX2)平均荧光强度。结果:与假手术组比较,模型组的FJC阳性细胞数目增加($P<0.01$),Bcl-2表达减少($P<0.01$),Bax和cleaved Caspase-3表达增加($P<0.01$),NO和MDA含量增加($P<0.05$, $P<0.01$),GSH和SOD活性下降($P<0.05$, $P<0.01$),NOX2表达增加($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组FJC阳性细胞数目减少($P<0.01$),Bcl-2表达增加($P<0.01$),cleaved Caspase-3和Bax明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),NO和MDA减少($P<0.05$, $P<0.01$),GSH和SOD增加($P<0.01$),NOX2表达减少($P<0.01$)。给予Boc-2后,补阳还五汤的作用部分被抑制。结论:补阳还五汤可以减轻脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,其作用机制可能与FPR2调控NOX2的表达有关。

[关键词] 补阳还五汤;脑缺血再灌注;氧化应激;细胞凋亡;甲酰肽受体2(FPR2)

[中图分类号] R2-0;R743.31;R33;R322.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0009-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211838

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210727.1053.001.html>

[网络出版日期] 2021-07-27 11:00

Buyang Huanwutang Alleviated Oxidative Stress Following Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats by Formyl Peptide Receptor 2

WU Fang-hua, LIU Yu-lian, GAO Yu-rong, YANG Kai-ling, LIU Wei*
(School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of formyl peptide receptor 2 (FPR2) in the inhibitory effects of Buyang Huanwutang (BYHWT) on the oxidative stress and its protective effects on cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Method:** Forty-eight male SD rats were randomly divided into sham group, model group, BYHWT group and BYHWT combined with FPR2 inhibitor (Boc-2) group. In the sham group, only the vessels were isolated. In other groups, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was constructed using the modified Longa method and reperfused after 2 h of ischemia. BYHWT ($16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) was given by gavaged twice

[收稿日期] 20210612(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673772);广州中医药大学“青年英才培养工程”项目(QNYC20170102)

[第一作者] 巫芳华,在读硕士,从事中医药防治心脑血管疾病研究,Tel:020-39358028,E-mail:416985212@qq.com

[通信作者] *刘微,博士,教授,从事中医药防治心脑血管疾病研究,Tel:020-39358028,E-mail:weiliu1980@yahoo.com

daily after reperfusion in BYHWT group and BYHWT+Boc-2 group. Boc-2 ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was injected intraperitoneally 30 min before surgery. Equal volume of saline were given instead in sham and model group. After 24 h of reperfusion, Fluoro-Jade C (FJC) staining was performed to observe the changes in the number of FJC-positive cells. Western blot was performed to detect the expression of apoptosis-related B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X (Bax), and cleaved aspartic acid cysteine proteolytic enzyme-3 (Caspase-3). Besides, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and nitric oxide (NO) was measured. The mean fluorescence intensity of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate II (NADPH) oxidase 2 (NOX2) was examined by immunofluorescence. **Result:** Compared with sham group, the model group showed increased number of FJC-positive cells ($P<0.01$), decreased Bcl-2 expression ($P<0.01$), increased Bax and cleaved Caspase-3 expression ($P<0.01$), increased NO and MDA content ($P<0.05, P<0.01$), decreased GSH and SOD activities ($P<0.05, P<0.01$), and increased NOX2 expression ($P<0.01$). Compared with model group, there were decreased FJC-positive cells ($P<0.01$), up-regulated Bcl-2 expression ($P<0.01$) with down-regulated cleaved Caspase-3 and Bax ($P<0.05, P<0.01$), decreased NO and MDA ($P<0.05, P<0.01$) with increased GSH and SOD ($P<0.01$), and decreased NOX2 expression ($P<0.01$) in the BYHWT group. All the above effects were partially blocked by Boc-2. **Conclusion:** BYHWT can reduce oxidative stress injury and inhibit apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion rats, which may be related with the down-regulation of NOX2 expression by FPR2.

[Keywords] Buyang Huanwutang; cerebral ischemia/reperfusion; oxidative stress; apoptosis; formyl peptide receptor 2(FPR2)

脑卒中是导致人类死亡和致残的主要原因之一,严重危害人类的生命健康,其中缺血性脑卒中约占所有病例的80%~85%,其特征是脑血流中断和受影响区域缺氧^[1]。组织纤溶酶原激活剂(tPA)是目前主要的溶栓手段,但有着严格的时间窗限制。缺血性脑卒中病理机制复杂,其中氧化应激是缺血再灌注损伤的一个重要病理机制^[2]。出自清代王清任《医林改错》的补阳还五汤在临床上被广泛运用于缺血性卒中患者,现代药理学研究发现补阳还五汤可以通过增加超氧化物歧化酶(SOD),减少丙二醛(MDA)从而减轻氧化应激损伤^[3],但其作用机制仍需进一步探索。课题组前期研究发现补阳还五汤可以增加内源性甲酰肽受体2(FPR2)的表达。FPR2是一种广泛分布于大脑的G蛋白偶联受体,研究表明FPR2可与其内源性配体如消退素 D_1 (RvD₁)等结合发挥神经保护作用^[4],FPR2缺失会加重脑缺血再灌注损伤^[5]。因此课题组以FPR2为切入点,探讨补阳还五汤减轻氧化应激损伤的分子机制,从而为临床运用补阳还五汤治疗缺血性脑卒中提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康成年SD雄性大鼠48只,体重250~300 g,购于广州中医药大学(大学城)实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2018-0034。大鼠放

置于(24 ± 0.5) °C,12 h的昼夜循环的安静环境下适应性饲养1周,自由饮食。实验过程中动物的处置方法符合广州中医药大学动物伦理委员会规范。

1.2 补阳还五汤溶液的制备 补阳还五汤由黄芪120 g,当归6 g,赤芍4.5 g,桃仁3 g,红花3 g,川芎3 g,地龙3 g组成(康美药业股份有限公司,批号分别为200100961, 200250141, 190900811, 191203021, 190400371, 1909000291, 191103011),以上中药饮片均由广州中医药大学中药学院杜先华副教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》规范。所有药材纯水浸泡2 h,煎煮40 min后过滤药液,滤渣加纯水再次煎煮40 min后过滤,2次煎煮滤液浓缩成生药含量为 $2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 试剂 FPR2抑制剂(Boc-2,中国Absin公司,货号abs45120618); β -肌动蛋白(β -actin),还原型辅酶II(NADPH)氧化酶2(NOX2)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab8226, ab80508);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-7382, sc-7480);活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)抗体(美国CST公司,批号9664S);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗兔IgG(英国Abcam公司,批号分别为ab6789, ab6721);MDA,一氧化氮(NO),SOD,谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程

研究所,批号分别为A003-1, A013-2-1, A001-3, A006-1-1); Pierce BCA Protein Assay Kit(美国 Thermo 公司,批号 23225);退化神经元染色(FJC)试剂盒(美国 Biosensis 公司,批号 BSS-TR-100-FJT);牛血清白蛋白(BSA,德国 Roche 公司,批号 10735078001);SDS-PAGE 试剂盒(武汉博士德公司,批号 P0012A);DPX 封片剂(北京海德公司,货号 M1000);抗荧光衰减封片剂(含 DAPI,北京索莱宝科技有限公司,货号 S2110)。

1.4 仪器 JX-2016型匀浆仪(上海净信实业发展有限公司);Neofuge23R型低温高速离心机(力康生物医疗科技控股有限公司);iMark型多功能酶标仪,1645050型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanno5200型全自动化学发光仪(上海天能科技有限公司);CM1860型冰冻切片机(德国 Leica 公司);ZEISS 8.0型激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 大鼠中动脉栓塞(MCAO)参照 LONGA 等^[6]的方法,大鼠麻醉后固定于手术台,消毒后沿颈部正中中线切开皮肤,暴露右侧颈总(CCA),颈外(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎 ECA 后,通过 ECA 残端将线栓插进 ICA(20±0.5) mm, 2 h 后拔出线栓形成再灌注。大鼠清醒后,进行神经功能评分^[6]:无任何神经病学征象为 0 分;提尾时不能完全伸直病灶对侧前肢为 1 分;爬行时向瘫痪侧旋转为 2 分;爬行时向病灶对侧跌倒为 3 分;无自发活动甚者意识障碍为 4 分。神经功能在 1~3 分为造模成功,纳入实验对象。

2.2 分组及给药 将 48 只大鼠随机分为假手术组、模型组、补阳还五汤组、补阳还五汤+Boc-2 组,每组 12 只。其中假手术组只分离血管,其余组随机分配 36 只造模成功的大鼠。补阳还五汤组及补阳还五汤+Boc-2 组在大鼠清醒后开始给药,补阳还五汤给药剂量按照成人与大鼠等效剂量换算^[7-8],剂量设为 16 g·kg⁻¹,2 次/d,连续给药 2 d;另外 Boc-2 参照参考文献^[9]于术前 30 min 腹腔注射 0.4 mg·kg⁻¹;假手术组与模型组给予等体积生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 FJC 试剂盒检测 FJC 阳性细胞数目 各组大鼠于再灌注后 24 h 取材,麻醉后使用 4 °C 生理盐水和 4% 多聚甲醛心脏灌注及固定,取出大脑依次放入 15%,30% 蔗糖溶液脱水后于冰冻切片机进行冠状切片(片厚 10 μm)。按试剂盒说明将 A, B, C, D 液以 1:10 稀释,将冰冻切片依次浸入 A 染液 5 min,

70% 乙醇 2 min,蒸馏水 2 min, B 染液 10 min, C 与 D 混合染液避光孵育 20 min 后蒸馏水漂洗 3 次;避光在 50 °C 烘箱干燥 10 min;二甲苯清洗 5 min;DPX 封片。放置 1 h 以上在激光共聚焦显微镜下选择缺血侧进行观察拍照。

2.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缺血侧脑组织 Bcl-2, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达 麻醉大鼠后用 4 °C 生理盐水进行心脏灌注,断颈取脑,取缺血侧脑组织,匀浆后 4 °C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清进行 BCA 定量。取蛋白样品 50 μg 与 Loading buffer 缓冲液按比例混匀,100 °C 加热变性 8 min。SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5% BSA 封闭后加入一抗(Bcl-2 1:1 000, Bax 1:1 000, cleaved Caspase-3 1:1 000, β-actin 1:5 000),4 °C 摇床孵育过夜。次日洗涤后加入相应二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,再次洗涤,ECL 显影,化学发光仪收集图像。使用 Image J 软件进行灰度值分析。

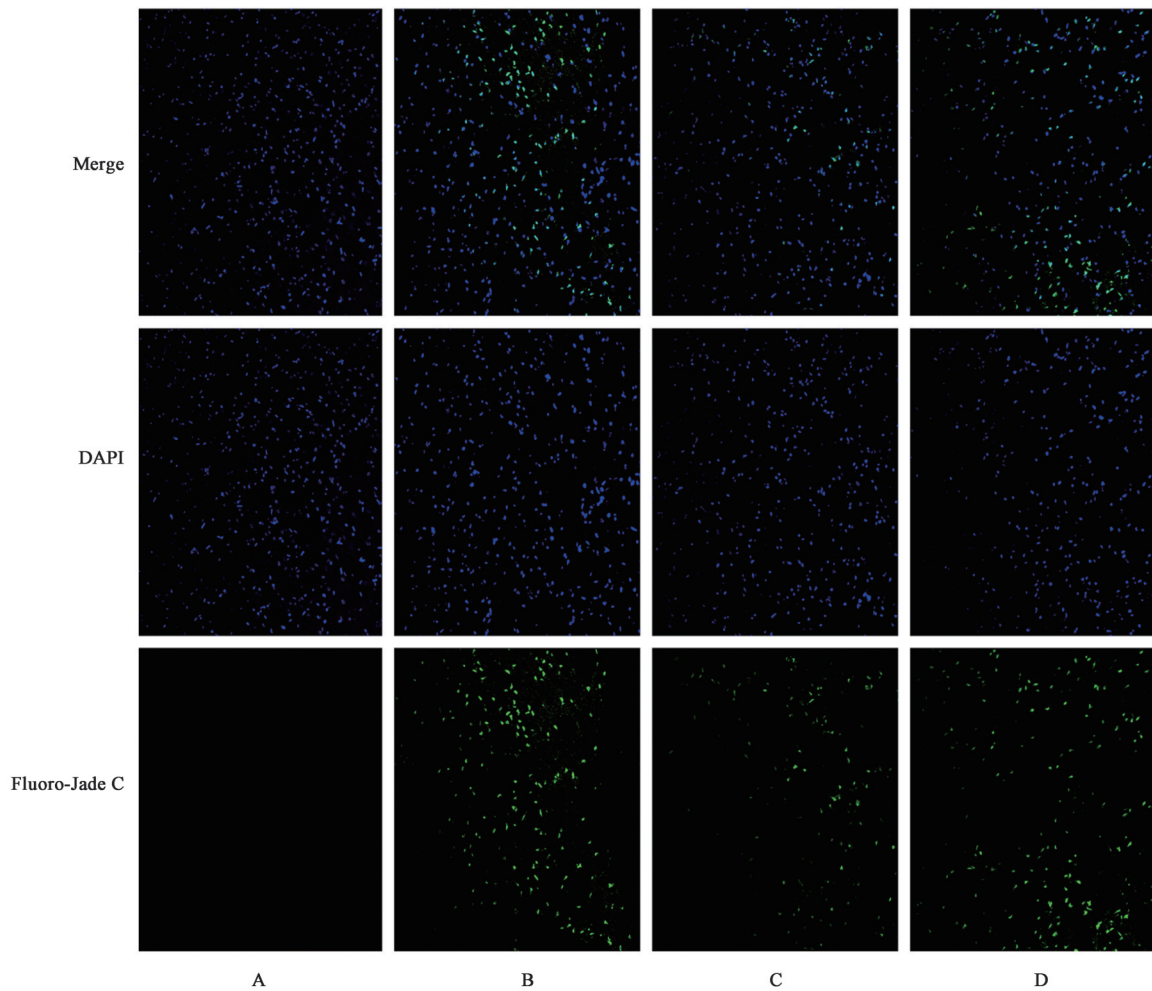
2.3.3 氧化应激指标检测 取缺血侧脑组织匀浆,采用硫代巴比妥酸法检测 MDA 的含量,采用硝酸盐显色法测定 NO 浓度,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,同时采用分光光度法检测 GSH 含量,操作严格按照试剂盒说明进行。

2.3.4 免疫荧光检测 NOX2 的表达 冰冻切片加 TBS 漂洗 5 min;冰冻切片抗原修复液浸泡 5 min;TBS 清洗 3 次,5 min/次;0.3% Triton X-100/TBS 浸泡 15 min;山羊血清封闭 2 h 后加稀释后一抗(NOX2 1:800)4 °C 孵育过夜;TBS 漂洗 3 次,10 min/次;滴加稀释后的荧光二抗,室温避光孵育 2 h;TBS 漂洗 3 次,10 min/次;抗荧光淬灭剂封片。最后激光共聚焦显微镜下观察拍照。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较,数据服从正态分布,满足方差齐性,采用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著性差异法(LSD)检验;不满足方差齐性,采用 Dunnett' T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注模型大鼠 FJC 阳性细胞数目的影响 与假手术组比较,模型组 FJC 阳性细胞数目显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组的 FJC 阳性细胞数目显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与补阳还五汤组比较,补阳还五汤+Boc-2 组的 FJC 阳性细胞数目显著增加($P < 0.01$)。见图 1,表 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 补阳还五汤组; D. 补阳还五汤+Boc-2组(图2~3同)

图1 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注后FJC阳性细胞数目的影响(免疫荧光, ×100)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwutang (BYHWT) on number of FJC-positive cells after cerebral ischemia/reperfusion in rats (IF, ×100)

表1 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注后FJC阳性细胞数目的影响(̄x±s, n=6)

Table 1 Effect of BYHWT on number of FJC-positive cells after cerebral ischemia/reperfusion in rats (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FJC阳性细胞数目/个
假手术		12.39±8.65
模型		285.78±53.92 ²⁾
补阳还五汤	16	112.44±23.34 ⁴⁾
补阳还五汤+Boc-2	16+4×10 ⁻⁴	189.28±21.36 ⁶⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01;与补阳还五汤组比较⁵⁾P<0.05, ⁶⁾P<0.01(表2~4同)。

3.2 对脑缺血再灌注模型大鼠凋亡相关蛋白Bcl-2, Bax和cleaved Caspase-3表达的影响 与假手术组比较,模型组的Bcl-2表达显著减少(P<0.01), Bax和cleaved Caspase-3表达显著增加(P<0.01), Bcl-2/Bax明显下降(P<0.05);与模型组比较,补阳还五汤组Bcl-2表达显著增加(P<0.01), cleaved

Caspase-3和Bax表达明显减少(P<0.05, P<0.01), Bcl-2/Bax显著升高(P<0.01);与补阳还五汤组比较,补阳还五汤+Boc-2组Bcl-2表达显著减少(P<0.01), Bax和cleaved Caspase-3表达显著增加(P<0.01), Bcl-2/Bax显著下降(P<0.01)。见图2,表2。

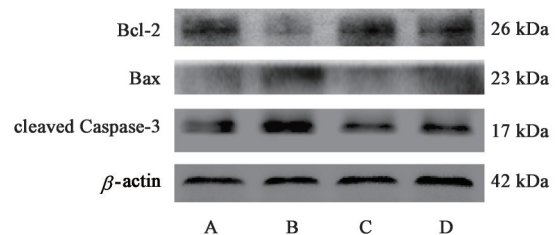


图2 大鼠脑缺血再灌注后凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of apoptosis-related proteins expression after cerebral ischemia/reperfusion in rats

3.3 对脑缺血再灌注模型大鼠MDA, NO, SOD和GSH的影响 与假手术组比较,模型组大鼠NO和MDA含量明显增加(P<0.05, P<0.01), GSH和SOD

表 2 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注后凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of BYHWT on expression of apoptosis-related proteins after cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/Bax	cleaved Caspase-3/ β -actin
假手术		0.80±0.30	0.70±0.15	1.15±0.40	0.80±0.12
模型		0.45±0.11 ²⁾	1.08±0.13 ²⁾	0.42±0.09 ¹⁾	1.16±0.16 ²⁾
补阳还五汤	16	0.93±0.24 ⁴⁾	0.69±0.15 ⁴⁾	1.33±0.12 ⁴⁾	0.84±0.12 ³⁾
补阳还五汤+Boc-2	16+4×10 ⁻⁴	0.52±0.13 ⁶⁾	1.20±0.32 ⁶⁾	0.44±0.08 ⁶⁾	1.22±0.35 ⁶⁾

活性明显下降 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤组的 NO 和 MDA 含量明显下降 ($P<0.05, P<0.01$), SOD 和 GSH 活性显著增加 ($P<0.01$); 与补

阳还五汤组比较, 补阳还五汤+Boc-2 组的 MDA 和 NO 含量显著增加 ($P<0.01$), SOD 和 GSH 活性显著下降 ($P<0.01$)。见表 3。

表 3 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注后 MDA, NO, SOD 和 GSH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of BYHWT on levels of MDA, NO, SOD and GSH after cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹	NO/ μ mol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	GSH/mg·g ⁻¹
假手术		1.46±0.38	1.44±0.18	74.70±5.46	4.75±1.22
模型		7.07±1.57 ²⁾	2.59±0.60 ¹⁾	42.18±13.55 ²⁾	2.65±0.78 ¹⁾
补阳还五汤	16	2.60±1.28 ⁴⁾	1.26±0.16 ³⁾	68.37±11.45 ⁴⁾	5.58±2.92 ⁴⁾
补阳还五汤+Boc-2	16+4×10 ⁻⁴	6.55±1.24 ⁶⁾	4.24±1.62 ⁶⁾	42.72±10.90 ⁶⁾	2.41±0.54 ⁶⁾

3.4 对脑缺血再灌注模型大鼠 NOX2 表达的影响
与假手术比较, 模型组的 NOX2 显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤组的 NOX2 显著减少 ($P<0.01$); 与补阳还五汤组比较, 补阳还五汤+Boc-2 组的 NOX2 显著增加 ($P<0.01$)。见图 3, 表 4。

4 讨论

脑缺血再灌注后, 机体产生氧自由基的速度远远超出自身抗氧化系统的清除能力, 氧化应激迅速发生, 这是缺血性脑卒中的病理级联反应中的重要环节之一。缺血性脑卒中在中医属“中风”范畴, 中风后脏腑功能失调导致气血虚弱, 阳气虚弱, 不能载血运行于脉道, 则生瘀滞; 气血生化无源, 则无以濡养四肢、充养脑窍。补阳还五汤在临床上被广泛运用于中风患者, 此方重用生黄芪为君, 补益元气; 配以当归尾、川芎、赤芍、桃仁、红花活血化瘀。大量补气药与少量活血药为伍, 既可补虚之本, 又可祛瘀之标, 两者相辅相成。大量研究发现补阳还五汤可以显著减少氧化应激的发生^[10], 并抑制细胞凋亡^[11], 包括降低 Caspase-3 的表达, 上调 Bcl-2/Bax^[12] 和增加 SOD 水平^[13]。目前涉及补阳还五汤减轻脑缺血再灌注后氧化应激损伤的相关分子机制的研究较少。FPR2 是一种 G 蛋白偶联受体, 广泛分布于大脑, 研究表明 FPR2 与其内源性配体 RvD₁ 结合具有神经保护作用^[4], RvD₁ 在糖尿病和非酒精性脂肪性肝炎等模型中被证实可以减轻氧化应激反

应^[14-15]。因此本研究旨在探讨 FPR2 是否为补阳还五汤减轻脑缺血再灌注后氧化应激损伤的靶点之一。

本研究发现补阳还五汤治疗后 FJC 阳性细胞数目减少, 但在给予 FPR2 抑制剂 Boc-2 后部分消除了补阳还五汤的神经保护作用。Bcl-2 是最经典的抑凋亡蛋白, Bax 是促凋亡蛋白, 二者的比率决定了细胞的结局。事实上, 促凋亡和抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白的表达因氧化应激而改变^[16]。补阳还五汤可以抑制促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达, 上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达^[17], 与本研究实验结果一致, 但在补阳还五汤联合使用 Boc-2 后 Bcl-2/Bax 下降, 细胞凋亡增加, 这些结果提示补阳还五汤可以通过 FPR2 减轻脑缺血再灌注后的细胞凋亡。

氧化应激产生的 MDA 和 NO 会损伤细胞和导致神经元死亡, SOD 和 GSH 则是机体抗氧化系统主要成员之一, 因此这四者是可以反映机体氧化应激程度的指标。研究发现补阳还五汤可以降低 MDA 和 NO 的水平, 增加 SOD 活性^[18]。与本研究氧化应激指标实验结果一致, 补阳还五汤可以降低 MDA 和 NO 的水平, 增加 SOD 和 GSH 活性。而补阳还五汤联合使用 Boc-2 后, 氧化应激指标升高, 抗氧化应激指标降低, 提示补阳还五汤可以通过 FPR2 减轻脑缺血再灌注后氧化应激损伤。

NADPH 酶的上调会加重氧化应激^[19], 因此其

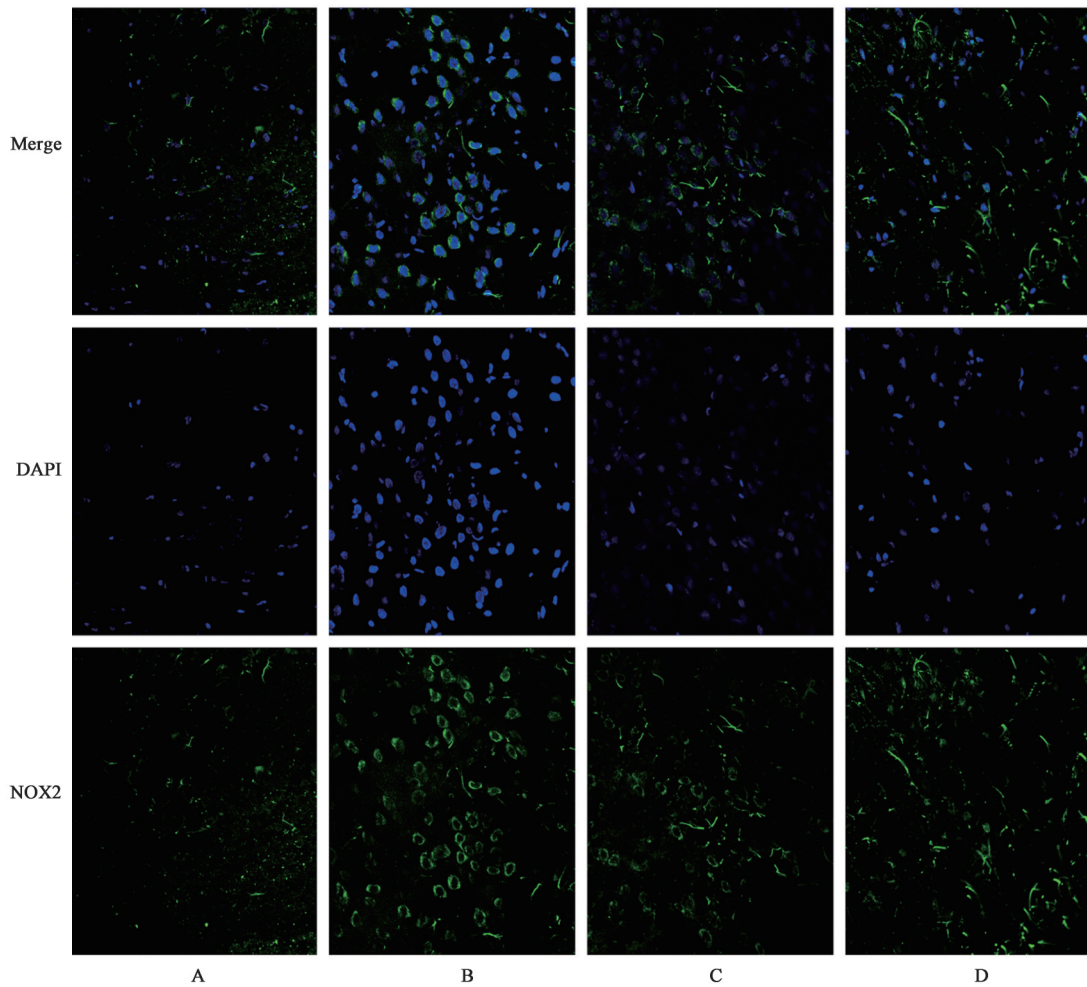


图3 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注后NOX2平均荧光强度的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of BYHWT on mean fluorescence intensity of NOX2 after cerebral ischemia/reperfusion in rats(IF,×200)

表4 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注后NOX2平均荧光强度的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of BYHWT on mean fluorescence intensity of NOX2 after cerebral ischemia/reperfusion in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NOX2
假手术		0.09±0.05
模型		0.16±0.03 ²⁾
补阳还五汤	16	0.10±0.02 ⁴⁾
补阳还五汤+Boc-2	16+4×10 ⁻⁴	0.16±0.02 ⁶⁾

表达可以反应氧化应激的程度,其中NOX2主要存在于脑和神经元中。本研究采用免疫荧光染色对NOX2的表达进行了统计,发现补阳还五汤可以下调NOX2的表达。有研究发现FPR2通过NADPH酶依赖的ROS生成调节氧化应激^[20],且FPR2内源性配体RvD₁可以调控NADPH酶的表达^[21]。然而补阳还五汤联合使用Boc-2后,NOX2表达增加,提示FPR2可能是补阳还五汤减轻脑缺血再灌注后氧化应激损伤的一个潜在靶点。

综上所述,本研究表明在补阳还五汤对抗脑缺血再灌注损伤过程中,FPR2在减轻氧化应激损伤中起着重要作用。补阳还五汤通过FPR2减少氧自由基,增强抗氧化系统清除能力。另外,补阳还五汤通过FPR2刺激了抑凋亡蛋白的表达,抑制了促凋亡蛋白的表达,从而减轻了氧化应激导致的细胞凋亡。而这些作用可能是FPR2通过调控NOX2的表达来完成的。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ALLEN C, BAYRAKTUTAN U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke[J]. Int J Stroke, 2009, 4(6):461-470.
- [2] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E, GO A, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2015, 131:434-441.
- [3] 丁彩娟,江勤,王鑫,等. 补阳还五汤有效部位对动物

- 全脑缺血损伤的保护作用及抗氧化与凋亡机制[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 2-7.
- [4] BISICCHIA E, SASSO V, CANTANZARO G, et al. Resolvin D1 halts remote neuroinflammation and improves functional recovery after focal brain damage via ALX/FPR2 receptor-regulated microRNAs[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(8): 6894-6905.
- [5] VITAL S, BECKER F, HOLLOWAY P, et al. Formyl-peptide receptor 2/3/lipoxin A4 receptor regulates neutrophil-platelet aggregation and attenuates cerebral inflammation: impact for therapy in cardiovascular disease[J]. Circulation, 2016, 133(22): 2169-2179.
- [6] LONGA E, WEINSTEIN P, CARLSON S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-203.
- [8] 杨开令, 周颖, 闫福曼, 等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠恢复期突触可塑性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 43-49.
- [9] ROSSI S, DI F, GESUALDO C, et al. Interplay between intravitreal RvD₁ and local endogenous sirtuin-1 in the protection from endotoxin-induced uveitis in rats[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 126408.
- [10] 刘芳, 刘青萍, 王宇红, 等. 补阳还五汤及其精简方抗脑缺血损伤功效比较[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(9): 46-49.
- [11] WANG H, LIOU K, WANG Y, et al. Deciphering the neuroprotective mechanisms of Bu-yang Huan-wu decoction by an integrative neurofunctional and genomic approach in ischemic stroke mice [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 22-33.
- [12] 龚弟鸿. 补阳还五汤含药血清对神经元 OGD 损伤后凋亡和凋亡相关蛋白的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [13] SHEN J, ZHU Y, HUANG K, et al. Buyang Huanwutang attenuates H₂O₂-induced apoptosis by inhibiting reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 154.
- [14] BATHINA S, DAS U. Resolvin D₁ decreases severity of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus by enhancing BDNF levels, reducing oxidative stress, and suppressing inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1516.
- [15] LI J, DENG X, BAI T, et al. Resolvin D₁ mitigates non-alcoholic steatohepatitis by suppressing the TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK pathways and activating the Nrf2 pathway in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 88: 106961.
- [16] MUKHERJEE P, MARCHESELLI V, SERHAN C, et al. Neuroprotectin D₁: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(22): 8491-8496.
- [17] 钟芳芳, 吴承龙, 孙新芳, 等. 补阳还五汤联合依达拉奉对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(21): 5251-5253.
- [18] 张运克, 魏明, 宰军华. 补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注模型血清、脑组织的 SOD、MDA 及 NO 含量影响[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(6): 366-369.
- [19] YANG L, GUAN G, LEI L, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stresses are involved in palmitic acid-induced H9c2 cell apoptosis [J]. Biosci Rep, 2019, doi:10. 1042/BSR20190225.
- [20] CATTANEO F, RUSSO R, CASTALDO M, et al. Phosphoproteomic analysis sheds light on intracellular signaling cascades triggered by formyl-peptide receptor 2 [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 17894.
- [21] DIEKMANN D, ABO A, JOHNSTON C, et al. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity [J]. Science, 1994, 265(5171): 531-533.

[责任编辑 孙丛丛]