

吴茱萸次碱对永久性大鼠局灶性脑缺血的保护作用

杨成俊¹, 宋捷²

(1. 江苏联合职业技术学院 连云港中医药分院, 江苏 连云港 222007;
2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] **目的:**观察吴茱萸次碱(Rut)对局灶性脑缺血(pMCAO)大鼠的保护作用,进一步探讨其对Toll样受体2/4(TLR2/4)和核因子- κ B(NF- κ B)表达的影响。**方法:**采用改进的Koizumi方法制备大鼠永久性大脑中动脉阻塞(pMCAO)模型,分为模型组,假手术组和Rut高、中、低剂量组(10, 5, 1 mg·kg⁻¹)。造模3 d后ip Rut,模型与假手术组ip相应体积的生理盐水,连续给药1周后观察Rut对大鼠脑缺血后脑梗死体积、脑组织含水量的影响。采用蛋白印迹法及免疫组织化学法检测脑组织中TLR2/4和NF- κ B的表达;酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-1 β (IL-1 β)含量。**结果:**大鼠局灶性脑缺血后,脑梗死体积和脑组织含水量升高;和假手术组相比,缺血侧TLR2, TLR4, NF- κ B的蛋白表达升高,阳性细胞也明显增多;血清中TNF- α 和IL-1 β 含量显著提高($P < 0.01$)。和模型组相比,Rut可显著减少脑梗死体积和脑组织含水量($P < 0.05$);Rut干预后TLR2/4-NF- κ B信号通路被抑制($P < 0.05$);血清中TNF- α 和IL-1 β 含量明显降低($P < 0.05$)。**结论:**吴茱萸次碱对大鼠局灶性脑缺血损伤有明显的保护作用,其作用机制可能与调节TLR2/4-NF- κ B的表达有关。

[关键词] 吴茱萸次碱;永久性大脑中动脉阻塞;Toll样受体;核因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0130-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010130

Protective Effect of Rutaecarpine on Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

YANG Cheng-jun¹, SONG Jie² (1. Lianyungang Traditional Chinese Medicine Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222007, China; 2. Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of rutaecarpine (Rut) on the expression of Toll like receptor 2/4 (TLR2/4) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) in permanent focal cerebral ischemia rats and to explore the mechanism involved. **Method:** The rat permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) model was reproduced according to the revised Koizumi method. Three days after the surgery, rats were divided into model group, sham group, and rutaecarpine (Rut) group. Rut was injected intraperitoneally at the doses of 10, 5, 1 mg·kg⁻¹ for seven days. The cerebral infarction area and water content of brain tissue were determined. Protein expression of TLR2/4 and NF- κ B in brain tissue was detected by Western blot and immunohistochemical methods. **Result:** Compared with the sham group, the infarct volume and brain water content were significantly increased after pMCAO; the protein expression of TLR2, TLR4, and NF- κ B were increased significantly with western blotting and immunochemical methods ($P < 0.01$), and increased TNF-alpha and IL-1 beta levels in serum as well ($P < 0.01$). Rutaecarpine could significantly reduce infarct volume and brain water content ($P < 0.05$), the expression of TLR2/4 and NF- κ B in rats was significantly attenuated ($P < 0.05$), and TNF-alpha and IL-1beta content was alleviated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Rut can ameliorate the rats focal cerebral ischemic injury, and the mechanism may be related with the regulation of TLR2/4-NF- κ B signaling.

[Key words] rutaecarpine; permanent middle cerebral artery occlusion; Toll like receptor 2/4, nuclear factor kappa B

脑卒中是一类以脑缺血及出血性损伤症状为主要临床表现的疾病,主要分为出血性和缺血性脑卒

中两大类。脑缺血后产生一系列级联反应,包括线粒体代谢障碍、炎症反应、氧化应激、细胞程序性死

亡等,其中炎症反应扮演着重要角色。而 Toll 样受体 2/4 (Toll-like receptor) 作为炎症反应传导通路的门户蛋白之一,是近来研究的热点,有望成为治疗脑缺血的新靶点。尤其是 TLR4 可以活化抗炎通路,起着促炎症与抗炎症的双向调节作用^[1]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是下游的关键转录因子。吴茱萸次碱是从中药吴茱萸中提取的生物碱,具有抗血栓、舒张血管、降血压等的生理活性^[2];尤其是对心脑血管的保护作用引起了广泛关注,有学者报道吴茱萸次碱对大鼠心脏缺血再灌注 (I/R) 损伤有保护作用,研究证实吴茱萸次碱可以提高脑 I/R 损伤小鼠的学习记忆能力^[3],对缺氧/复氧诱导的大鼠海马神经元凋亡有较好的保护作用^[4],为进一步揭示其脑保护的作用机制,本研究拟采用大鼠永久性大脑中动脉梗死模型,观察吴茱萸次碱腹腔注射对急性脑梗死的保护作用以及对 TLR2/4-NF- κ B 通路的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂 吴茱萸次碱(批号 Z4632,纯度 98%,南京泽朗医药科技有限公司),尼莫地平注射液(批号 028741,天津金耀氨基酸有限公司),兔多克隆抗 GAPDH(批号 4325)、兔多克隆抗 TLR2(批号 453)、兔多克隆抗 TLR4(批号 254)、羊多克隆抗 NF- κ B p65(批号 1145),以上均购于美国 PeproTech 公司,PVDF 膜(0.45 μ m,批号 k3511,美国 Millipore 公司),预染蛋白 Marker(批号 E4202,加拿大 Fermentas 公司),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),X 射线胶片显影粉和定影粉(冠龙照相器材公司),其他常用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 1-15K 型低温离心机(美国 Sigma 公司),XSZ-Dz 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂),电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 动物 SD 大鼠,体重 200 ~ 220 g,雄性,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXX(沪)2012-0002。室内温度控制在(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,自由饮食和饮水。

2 方法

2.1 永久性大脑中动脉阻塞(pMCAO)模型的制备 造模方法参照 Koizumi 方法^[5]并稍加改进制作 pMCAO 模型。大鼠麻醉后切开皮肤,暴露并分离右侧颈总动脉(CCA)、右侧颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),动脉夹暂时夹闭 ICA 远心端,CCA 和 ECA 近心端,在 ECA 中段作一小切口,插入钓鱼尼

龙线(直径 0.25 mm),插入深度约为 19 mm,插入时会有一定的阻力感,造成大脑中动脉阻塞脑缺血。固定鱼线、逐层缝合肌肉,剪掉多余的鱼线,然后缝合。假手术组不栓塞大脑中动脉,其余处理同模型组。手术全过程注意保温。

2.2 分组与给药 pMCAO 术后第 3 天按照 Zea Longa 评分法,对动物神经功能行为进行评估。将评分值为 1 ~ 3 分的动物随机分成模型组、吴茱萸次碱低、中、高剂量组(1, 5, 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)以及假手术组,每组 20 只。分组后第 1 天开始给药,给药组 ip 吴茱萸次碱,模型与假手术组 ip 相应体积的生理盐水,连续 1 周。各组各选出 5 只进行脑含水量测定、5 只进行 TTC 染色、5 只用于蛋白印迹实验、5 只用于免疫组化实验。

2.3 脑梗死面积和脑含水量检测 动物末次给药结束后断头取脑,在脑槽中进行冠状切片,切成 5 片,每片 2 mm 厚。迅速将脑片置于 2% 的氯化 2,3,5-三苯基四氮唑(TTC)染液中,37 $^{\circ}$ C 保温箱中避光温孵,每 5 min 翻动 1 次,直至染红为止。梗死区经染色后为白色,非缺血区为红色,梗死体积为各层梗死面积之和。大鼠处死后缺血半球立即用滤纸轻轻吸干表面水分,并用电子天平称重,作为湿重(WW)。然后缺血侧在 100 $^{\circ}$ C 下干燥 24 h,获得的恒定质量为干重(DW)。根据下列公式计算大脑含水量:

$$\text{大脑含水量} = (\text{WW} - \text{DW}) / \text{WW} \times 100\%$$

2.4 检测 TLR2/4 和 NF- κ B 的表达 将脑组织制备成匀浆,低温高速离心 15 min,取上清备用。蛋白样品经 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,通过半干式电转仪将蛋白转移至 PVDF 膜上。膜用丽春红预染,直至出现红色条带。膜用 TBS 缓冲液洗膜 2 h,再与适当稀释的抗 TLR2/4、NF- κ B 多克隆抗体共同孵育 2 h,洗膜 3 次,5 min/次。加入二抗共孵 2 h,同法洗涤膜,加入 ECL 作用 1 min。暗室显影冲洗胶片并拍照。采用光密度软件进行灰度扫描并进行分析。

2.5 检测 TLR2/4 和 NF- κ B 的表达 大鼠末次给药结束后腹腔麻醉,4% 多聚甲醛心脏灌注。取出缺血侧大脑固定,乙醇梯度洗脱,浸蜡包埋,切片连续切片。3 次二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水,加入 0.3% H_2O_2 孵育 10 min,消除内源性辣根过氧化物酶作用。血清封闭,与适当稀释的抗 TLR2/4、NF- κ B 多克隆抗体共同孵育 2 h。PBS 洗 3 遍,生物素标记的二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 遍,辣根过氧化物酶标记的生物素卵白素复合物作用 1 h,DAB 显

色剂显色,常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,倒置显微镜观察染色切片。

2.6 血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量的测定 腹主动脉取血,37 °C 静置 30 min,离心取血清,-20 °C 保存,严格按照 ELISA 试剂盒规范流程进行测定。

2.7 统计学处理 所有数据均用 SPSS 16.0 进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,并进一步用 ANOVA 和 Dunnett's test 检验,比较组间差异。

3 结果

3.1 对 pMCAO 大鼠脑梗死体积及脑含水量的影响 pMCAO 造模后大鼠的脑梗死体积明显升高,吴茱萸次碱中、高剂量组 ip 1 周后脑梗死体积明显减少,高剂量组的脑梗死体积与模型组相比具有显著性差异($P < 0.05$),见表 1。模型组大鼠的脑含水量显著高于假手术组($P < 0.01$)。吴茱萸次碱高剂量组脑含水量明显降低,与模型组相比,有显著性差异($P < 0.05$),见表 1。

表 1 吴茱萸次碱对 pMCAO 大鼠脑梗死体积和脑含水量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 The effect of rutaecarpin on the volume of the ischemic lesion and cerebral water content($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	梗死体积/%	脑含水量/%
假手术	-	-	78.8 \pm 0.6 ²⁾
模型	-	26.6 \pm 5.7	85.4 \pm 1.3
吴茱萸次碱	1	24.0 \pm 5.3	85.2 \pm 1.5
	5	20.8 \pm 4.6	84.5 \pm 1.4
	10	18.7 \pm 4.1 ¹⁾	82.6 \pm 1.5 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对 pMCAO 大鼠缺血侧 TLR2/4-NF- κ B 表达的影响 光镜下观察胞浆或胞核有棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性细胞。免疫组化结果显示,与假手术组比较,pMCAO 大鼠缺血侧模型组 TLR2,TLR4,NF- κ B 阳性表达的细胞数增加($P < 0.05$),吴茱萸次碱高剂量组明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

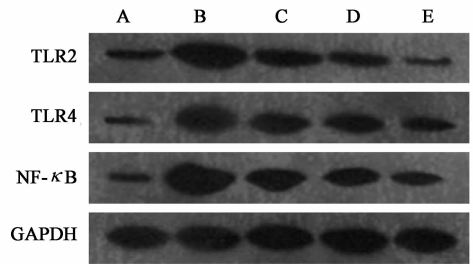
蛋白印迹实验也证实,假手术组有低水平 TLR2,TLR4 和 NF- κ B 的表达,模型组缺血侧脑组织匀浆中 TLR2,TLR4 和 NF- κ B 的表达明显上调,吴茱萸次碱腹腔注射 1 周后,TLR2/4-NF- κ B 通路的活性明显下调,吸光度扫描结果显示,吴茱萸次碱高剂量组和模型组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1 和表 3。

3.3 血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量 pMCAO 造模后大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高($P <$

表 2 pMCAO 大鼠缺血侧 TLR2/4,NF- κ B 表达阳性细胞个数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 The number of cells positive of TLR2/4,NF- κ B in the ischemic brain area($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	阳性细胞数/个		
		TLR2	TLR4	NF- κ B
假手术	-	8.8 \pm 1.9 ²⁾	5.2 \pm 0.9 ²⁾	15.2 \pm 3.5 ²⁾
模型	-	76.8 \pm 15.8	96.2 \pm 21.3	118.8 \pm 28.6
吴茱萸次碱	1	70.6 \pm 16.4	95.4 \pm 22.4	84.2 \pm 21.2
	5	36.7 \pm 9.8	82.2 \pm 18.6	45.8 \pm 11.4
	10	17.2 \pm 3.6 ¹⁾	42.6 \pm 12.5 ¹⁾	26.8 \pm 5.6 ¹⁾



A. 假手术组;B. 模型组;C. 吴茱萸次碱 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 吴茱萸次碱 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 吴茱萸次碱 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 吴茱萸次碱对缺血脑组织 TLR2,TLR4,NF- κ B 的蛋白印迹的影响

Fig. 1 Western blotting assays for TLR2, TLR4, NF- κ B in ischemic brain tissues

0.01),吴茱萸次碱中、高剂量组与模型组相比,TNF- α 和 IL-1 β 含量明显降低($P < 0.05$),见表 4。

表 3 吴茱萸次碱对缺血模型大鼠脑组织中 TLR2,TLR4,NF- κ B 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 The expressions of TLR2,TLR4,NF- κ B in ischemic brain tissues($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLR2	TLR4	NF- κ B
		/ GAPDH	/ GAPDH	/ GAPDH
假手术	-	0.31 \pm 0.09 ²⁾	0.26 \pm 0.05 ²⁾	0.28 \pm 0.04 ²⁾
模型	-	2.14 \pm 0.55	1.54 \pm 0.33	2.33 \pm 0.64
吴茱萸次碱	1	1.68 \pm 0.38	1.08 \pm 0.31	1.32 \pm 0.41
	5	1.42 \pm 0.39	0.97 \pm 0.27	1.11 \pm 0.35
	10	0.58 \pm 0.17 ¹⁾	0.74 \pm 0.20 ¹⁾	0.66 \pm 0.17 ¹⁾

4 讨论

缺血性卒中具有高致死率的特点,也是导致成人神经功能障碍的主要原因,寻找有效的治疗方案是当前亟待解决的问题。炎症反应在大脑缺血损伤的病理机制中扮演了重要的角色,参与了脑中风的发生,发展及预后。TLRs 是一类跨膜信号传递受体蛋白,TLRs 家族识别来自外源的或是应激细胞产生

表 4 吴茱萸次碱对 pMCAO 大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 The levels of TNF- α and IL-1 β in serum of pMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹
假手术	-	7.5 \pm 1.1 ²⁾	2.3 \pm 0.7 ²⁾
模型	-	21.2 \pm 2.3	15.4 \pm 3.9
吴茱萸次碱	1	19.5 \pm 2.8	14.3 \pm 3.5
	5	17.5 \pm 2.2	12.4 \pm 3.0
	10	13.5 \pm 1.7 ¹⁾	8.8 \pm 2.1 ¹⁾

的病原相关分子模式, 激发下游的炎症瀑布。NF- κ B 参与多种炎症介质及细胞因子的基因调控, 与脑缺血后炎症反应密切相关。TLR2/4-NF- κ B 信号通路可引起促炎症介质的释放从而诱导炎症反应, 导致脑梗死和脑损伤加重。

在本研究中, 笔者用免疫组化与蛋白印迹法证实大鼠脑缺血后 TLR2 和 TLR4 蛋白表达均有上调趋势, 与文献报道一致^[6-7]。脑缺血模型中, TLR2 或 TLR4 基因敲除的小鼠的脑梗死体积和神经缺陷评分均优于野生型小鼠^[8-9]。TLR2/4-NF- κ B 信号通路活化下游的炎症因子, 包括 TNF- α 和 IL-1 β , 从而介导炎症反应^[10]。还有实验表明外源性内毒素刺激下, TLR4 表达升高, 诱导小胶质细胞过度炎症并引发神经毒性效, 造成的氧化应激直接损伤周围其他神经细胞^[11]。通过以中性粒细胞及小胶质细胞为对象的实验显示, 吴茱萸次碱体现出抗炎活性, 可能是通过抑制 NADPH 氧化酶或 NO 合成酶发挥作用, 此外吴茱萸次碱还具有抗皮肤炎症的作用^[12]。Heo^[13] 研究发现, 吴茱萸次碱对活化的单核细胞分泌的炎症因子, 如 TNF- α 和 IL-6 有显著的抑制作用, 显示了良好的抗炎和抗动脉粥样硬化的活性; Takada^[14] 指出吴茱萸次碱作用后 NF- κ B 通路及其下游基因表达明显下调; 本研究进一步证实, 吴茱萸次碱下调 TLR2/4 的表达同时抑制 NF- κ B 的活性, 缓解永久性局灶性脑缺血导致的脑梗死, 提示吴茱萸次碱可能通过调节 TLR2/4-NF- κ B 信号通路抑制炎症的级联反应。本文研究结果为吴茱萸次碱作为脑中风治疗药物的开发利用提供了药理学依据。

[参考文献]

[1] Vartanian K, Stenzel-Poore M. Toll-like receptor tolerance as a mechanism for neuroprotection[J]. *Transl Stroke Res*, 2010, 1(4):252-260.

[2] 余奇, 郭澄, 程泽能. 吴茱萸次碱的研究进展[J]. *药理学实践杂志*, 2007, 25(6):353-357.

[3] 严春临, 张季, 高艳青, 等. 吴茱萸次碱对脑缺血再

灌注小鼠的保护作用及作用机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6):264-266.

[4] Dai Z, Xiao J, Liu S Y, et al. Rutaecarpine inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in rat hippocampal neurons[J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(8):1307-1312.

[5] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced [J]. *Stroke*, 1986(8):1.

[6] Tu X K, Yang W Z, Shi S S, et al. Spatio-temporal distribution of inflammatory reaction and expression of TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent focal cerebral ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(8):1147-1155.

[7] Tu X K, Yang W Z, Shi S S, et al. Baicalin inhibits TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent cerebral ischemia [J]. *Inflammation*, 2011, 34(5):463-470.

[8] Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, et al. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(3):574-579.

[9] Caso J R, Pradillo J M, Hurtado O, et al. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke [J]. *Circulation*, 2007, 115(12):1599-1608.

[10] Barakat W, Safwet N, El-Maraghy N N, et al. Candesartan and glycyrrhizine ameliorate ischemic brain damage through downregulation of the TLR signaling cascade [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, (724):43-50.

[11] Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(7):2478-2486.

[12] 邱模昌, 彭维杰. 吴茱萸次碱药理作用研究进展 [J]. *科技信息*, 2012, (1):651-652.

[13] Heo S K, Yun H J, Yi H S, et al. Evodiamine and rutaecarpine inhibit migration by LIGHT via suppression of NADPH oxidase activation [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(1):123-133.

[14] Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal B B. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappa B-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17):17203-17212.

[责任编辑 聂淑琴]