

辣椒素通过 p38 MAPK/COX-2 信号通路对局灶性脑缺血大鼠 认知功能的影响

曹定岩, 包红, 何涛, 张海军, 武焕颖, 程晓峰, 梅赞*
(承德市中心医院, 河北承德 067000)

[摘要] 目的:探讨辣椒素对脑缺血再灌注大鼠认知功能障碍的影响及可能的作用机制。方法:SD 雄性大鼠随机选取 12 只作为假手术组,其余大鼠采用线栓法复制大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。将建模成功的大鼠分为模型组、SB203580 [p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)抑制剂, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]组、辣椒素低、高剂量($50, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、anisomycin(p38 MAPK 激动剂, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)+辣椒素($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,每组 12 只。再灌注及给药结束后对大鼠进行神经功能缺陷评分;Morris 水迷宫和新型物体识别实验检测大鼠学习和认知能力;苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织海马区病理学变化;免疫荧光法检测海马组织小胶质细胞的活化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测脑组织白细胞介素- 1β (IL- 1β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素 E_2 (PGE $_2$)炎症因子的水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织瞬时受体电位香草酸亚型 1(TRPV1)、p38 MAPK、磷酸化(p)-p38 MAPK、环氧合酶-2(COX-2)蛋白的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺陷评分、逃避潜伏期、海马 CA1 区钙结合蛋白-1(Iba-1)阳性表达的小胶质细胞数量、脑组织 IL- 1β 、TNF- α 、PGE $_2$ 水平、海马组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达显著升高($P < 0.01$);穿越平台位置次数、新颖物体辨别指数(DI)、海马组织 TRPV1 的表达显著减少($P < 0.01$),且海马神经细胞数量减少,大量炎性细胞浸润;与模型组比较,辣椒素低、高剂量组神经功能缺陷评分、逃避潜伏期、海马 CA1 区 Iba-1 阳性表达的小胶质细胞数量、脑组织 IL- 1β 、TNF- α 、PGE $_2$ 水平、海马组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);穿越平台位置次数、DI、TRPV1 的表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),少量炎性细胞浸润,神经细胞数量明显增多;且使用 p38 MAPK 的激活剂 anisomycin 可增加 COX-2 的表达,明显减弱辣椒素对小胶质细胞活化的抑制作用。结论:辣椒素对脑缺血再灌注大鼠的认知功能具有保护作用,其作用机制可能与抑制 p38 MAPK/COX-2 信号通路的激活,进而抑制小胶质细胞的过度活化有关。

[关键词] 辣椒素; 脑缺血再灌注; 认知功能障碍; p38 丝裂原活化蛋白激酶/环氧合酶 2 信号通路

[中图分类号] R242;R285.5;R966;R259;R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0122-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222294

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220110.1728.022.html>

[网络出版日期] 2022-01-11 14:20

Effect of Capsaicin on Cognitive Function of Rats with Focal Cerebral Ischemia by p38 MAPK/COX-2 Signaling Pathway

CAO Dingyan, BAO Hong, HE Tao, ZHANG Haijun, WU Huanying, CHENG Xiaofeng, MEI Zan*
(Chengde Central Hospital, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of capsaicin on cognitive dysfunction in rats with cerebral ischemia-reperfusion and its possible mechanism. **Method:** Twelve SD male rats were randomly selected as a sham operation group, and the remaining rats were sutured to replicate the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO). The successfully modeled rats were divided into a model group, a SB203580 [p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) inhibitor, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$] group, capsaicin low- and high-dose ($50,$

[收稿日期] 2021-04-14

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划项目(20200381);承德市科技计划项目(202109A183)

[第一作者] 曹定岩, 硕士, 主治医师, 从事神经外科疾病诊治研究, E-mail: 495541246@qq.com

[通信作者] *梅赞, 硕士, 主治医师, 从事神经外科疾病诊治研究, E-mail: 297329339@qq.com

100 mg·kg⁻¹) groups, and anisomycin (p38 MAPK agonist, 2 mg·kg⁻¹) + capsaicin (100 mg·kg⁻¹) group, with 12 rats in each group. After reperfusion and administration, the rats were scored for neurological deficits. Morris water maze and new object recognition experiments were used to test the learning and cognitive abilities of rats. The hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the hippocampus of the brain tissue. Immunofluorescence method was used to detect the activation of microglia in the hippocampus. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and prostaglandin E₂ (PGE₂) inflammatory factors in the brain tissue. Western blot was used to determine the protein expression levels of transient receptor potential vanillin subfamily 1 (TRPV1), p38 MAPK, p-p38 MAPK, and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the hippocampal tissue. **Result:** As compared with the sham group, the neurological deficit score, escape latency, the number of Iba-1 positive microglia in the hippocampal CA1 area, the IL-1 β , TNF- α , and PGE₂ levels in the brain tissue, and the p-p38 MAPK/p38 MAPK and COX-2 expression in the hippocampus tissue was significantly increased in the model group ($P < 0.01$). In the model group, the number of crossing the platform position, the novel object discrimination index (DI), and the TRPV1 expression in the hippocampus tissue was significantly reduced ($P < 0.01$), the number of hippocampal nerve cells was reduced, and a large number of inflammatory cells infiltrated. As compared with the model group, the neurological deficit score, escape latency, the number of Iba-1 positive microglia in the hippocampal CA1 area, the IL-1 β , TNF- α , and PGE₂ levels in the hippocampus tissue, and the p-p38 MAPK/p38 MAPK and COX-2 expression in the hippocampus tissue were significantly reduced in the capsaicin low-dose and high-dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the capsaicin low-dose and high-dose groups, the number of crossing the platform position, the DI, and the TRPV1 expression in the hippocampus tissue were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), a small amount of inflammatory cells were infiltrated, and the number of nerve cells was significantly increased. The use of anisomycin, an activator of p38 MAPK, increased the expression of COX-2, and significantly weakened the inhibitory effect of capsaicin on the activation of microglia. **Conclusion:** Capsaicin has a protective effect on the cognitive function of rats with cerebral ischemia-reperfusion, and its mechanism may be related to the inhibition of the activation of p38 MAPK/COX-2 signaling pathway, thereby inhibiting the excessive activation of microglia.

[Keywords] capsaicin; cerebral ischemia-reperfusion; cognitive dysfunction; p38 mitogen-activated protein kinase/cyclooxygenase 2 signaling pathway

缺血性卒中是全世界最普遍的心血管疾病,仍然是导致死亡和致残的主要原因之一^[1]。临床上对缺血性卒中的治疗策略主要是尽快恢复向缺血性脑组织的血液和氧气供应,但是脑血流恢复后可能导致局部缺血半影区的脑组织受到更广泛的损害,被称为脑缺血再灌注损伤(CIR)^[2]。临床和动物研究均表明,CIR常导致不同程度的脑损伤,导致认知功能障碍和智力下降,严重影响患者的健康和生活质量^[3];而且认知功能障碍与缺血性卒中复发有关^[4],也是导致缺血性卒中后致残率和死亡率增加的重要因素^[5]。因此,调节缺血性卒中引起的多种神经损伤,增强认知能力,对缺血性卒中的治疗具有重要意义。

CIR损伤是一个复杂的病理生理过程,其发病机制中的一个重要步骤是由氧化应激和炎症反应

之间的相互作用触发。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族是非常保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是信号转导过程中一组主要的信号分子,在发育和疾病发生过程中起重要作用。p38是MAPK家族控制炎症反应最重要的成员,据报道p38 MAPK信号转导通路位于中枢神经系统,可能与CIR的恢复有关^[6]。环氧合酶(COX)是一种具有氧化酶和过氧化氢酶活性的双功能酶,也是前列腺素(PG)花生四烯酸代谢的关键酶。CIR损伤后,COX-2的表达上调至正常水平的数倍;前列腺素E₂(PGE₂)水平的变化与CIR损伤后缺血半球COX-2的表达变化相关,因此,PGE₂可用作COX-2活性的标志物^[7]。p38 MAPK可调节CIR损伤后COX-2的表达;研究发现,抑制p38 MAPK的磷酸化,可下调COX-2的表达,抑制神经元死亡和小胶质细胞激活介导的炎症

反应^[8]。在 CIR 损伤后,小胶质细胞以时间依赖性的方式被激活,参与神经变性、炎症和氧化应激的产生,与认知功能障碍密切相关^[9]。因此,p38 MAPK/COX-2 信号通路介导的小胶质细胞激活在 CIR 损伤后认知功能障碍中具有重要作用。

瞬时受体电位香草酸亚型 1 (TRPV1) 是一种非选择性阳离子通道,在大脑中广泛表达,并参与多种功能,例如调节突触传递和可塑性以及认知功能^[10-11]。辣椒素 (capsaicin) 是辣椒的主要辛辣成分,也是 TRPV1 的激动剂,具有多种生物活性,已有的研究发现辣椒素对认知障碍具有积极作用,可以选择性激活 TRPV1,减轻阿尔茨海默病 (AD) 小鼠的认知和突触可塑性损伤^[10],改善慢性脑低灌注大鼠认知功能障碍^[11-12];对 CIR 损伤也有一定的保护作用^[13]。然而,辣椒素对 CIR 后认知障碍的影响及其相关机制尚不明确。基于此,在本研究中课题组通过建立大脑中动脉阻塞 (MCAO) 大鼠模型,探讨了辣椒素是否可以改善 CIR 大鼠的认知功能障碍及可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 72 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量 250~300 g,由北京维通利华动物中心提供,合格证号为 SCXK(京)2016-0011,所有动物均严格按照动物饲养规则喂养,温度 (24±2) °C,湿度 50%~60%,自由饮水和摄食。研究程序已由机构动物护理和使用委员会批准,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 药品及试剂 辣椒素(批号 C191,纯度≥98%)、p38 MAPK 抑制剂 SB203580(批号 S8307,纯度≥98%)、p38 MAPK 激动剂 anisomycin(批号 176880)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,苏木素-伊红(HE)染色试剂、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C0105、P0013B、P0010),白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、PGE₂酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ml003057、ml002859、ml003036);兔抗大鼠离子钙结合蛋白-1(Iba-1)、山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG) H&L、p38 MAPK、磷酸化(p)-p38 MAPK、环氧合酶-2(COX-2)、 β -肌动蛋白(β -actin)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG H&L、小鼠抗大鼠 TRPV1、HRP 山羊抗小鼠 IgG H&L(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab178846、ab150080、ab170099、ab4822、ab179800、ab8227、ab205718、ab203103、

ab205719)。

1.3 仪器 WMT-100S 型 Morris 水迷宫实验装置(成都泰盟软件有限公司),BX61 型电动显微镜(日本 Olympus 公司),1704150 型蛋白转膜装置(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组、模型制备及给药 大鼠适应性饲养 7 d 后开始实验,随机选取 12 只大鼠为假手术组,其余大鼠参照文献^[5]采用改良线栓法复制 MCAO 大鼠模型。大鼠用戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后仰卧位固定,行颈中切口;将颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)暴露分离,结扎 CCA 近心端和 ECA 根部;用显微动脉夹夹闭 ICA,在 CCA 结扎处附近穿线打一活结;在活结与 CCA 结扎处之间剪开一个切口,线栓缓慢从 CCA 插入 ICA,感受到明显阻力时停止(18~20 mm),系紧活结;脑缺血 2 h 后,将线栓拔出约 15 mm,形成再灌注。假手术组不将线栓插入 ICA,其余处理方法相同。待大鼠清醒后,若大鼠提尾时左侧前肢不能完全伸展,爬行时向对侧转圈,不能走直线,Longa 评分在 1~3 分者为造模成功。为了保证实验样本的充足,手术中死亡大鼠进行随时补充,保证每组大鼠≥18 只。将模型制备成功的 60 只大鼠根据神经评分分为模型组、SB203580(p38 MAPK 抑制剂,1 mg·kg⁻¹)组^[14]、辣椒素低、高剂量(50、100 mg·kg⁻¹)组^[13]、anisomycin(p38 MAPK 激动剂,2 mg·kg⁻¹)+辣椒素(100 mg·kg⁻¹)组^[15],每组 12 只。SB203580 组大鼠于再灌注后即刻腹腔注射 1 mg·kg⁻¹的 SB203580,此后隔天注射 1 次,即术后第 2、4、6 天,共计 4 次;辣椒素各剂量组大鼠以 10 mL·kg⁻¹的体积灌胃相应剂量的药物(溶于 0.5% 的 CMC-Na 溶液制备成混悬液),1 次/d,连续给药 7 d;anisomycin+辣椒素组在再灌注后即刻、术后第 2、4、6 天腹腔注射 anisomycin,并每日再给予辣椒素 100 mg·kg⁻¹灌胃,1 次/d,连续给药 7 d;假手术组、模型组灌胃等量 CMC-Na 溶剂。

2.2 检测指标

2.2.1 神经功能缺陷评分 评定大鼠神经功能 所有实验大鼠在手术清醒后自由饮食,清醒后及末次给药 1 h 后,对造模大鼠神经行为进行评分:0 分,无明显神经功能缺损;1 分,提尾时不能伸展对侧前肢;2 分,行走时向对侧旋转;3 分,行走时向对侧倾斜;4 分,不能自主活动或伴意识障碍。分数越高表示神经功能缺陷越严重。

2.2.2 新型物体识别测试检测大鼠认知功能 测量动物在熟悉的环境中识别新颖物体的能力。实验方法包括3个阶段:适应阶段、定向阶段和最后测试阶段。实验装置由白色长方形盒子(50 cm×50 cm×40 cm)和3个物体(分别命名为A、B和C)组成,其中A与B相同,而C物体的形状与颜色完全不同于A和B。在适应的第1天,每只大鼠每天1次适应测试区域(包括A和B)10 min。24 h后,将大鼠与物体A和B放在白色盒子中,每只大鼠在测试区域中探索物体5 min。24 h后,将B换成C,并将动物放回盒子5 min。计算机设备分别记录了探索新颖物体(TN)和熟悉物体(TF)所花费的时间。将大鼠的认知功能表示为辨别指数(DI)=(TN-TF)/(TN+TF)×100%。此外,测试区和物体用70%的乙醇洗涤,以避免大鼠在每次测试后受到气味的影响。

2.2.3 Morris水迷宫实验检测大鼠学习、认知功能 将水池平均分为I、II、III、IV象限,在第IV象限中央放置一圆形隐藏平台。水中倒入墨水,保持水温21~23℃。定位航行实验:每次从不同象限将大鼠放入池中,逃避潜伏期记录为大鼠从起点到目标平台的游泳时间;若大鼠90 s内未找到平台,则潜伏期记为90 s。每天训练4次,每次间隔30 min,连续4 d,记录每天逃避潜伏期的平均值。空间探索实验:定位航行实验第5天,撤掉平台,将大鼠从第I象限放入水中,记录在大鼠60 s内穿过平台的次数。逃避潜伏期越短,穿过平台次数越多提示学习和认知能力越强。

2.2.4 HE染色检测脑组织病理变化 每组随机选6只大鼠麻醉,用4%多聚甲醛-2.5%戊二醛溶液灌注,然后断头取脑,分为两部分,一部分称质量后按照1:9的比例加入预冷的生理盐水,研磨后离心,制成10%的脑组织匀浆;另一部分4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片、进行HE染色,观察脑组织病理学变化。

2.2.5 免疫荧光法检测海马组织小胶质细胞的活化 取1.5.4项下的切片,二甲苯脱蜡,0.01 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,柠檬酸修复液做抗原修复,加入3% H₂O₂孵育10 min,滴加一抗Iba-1(1:300)于脑组织上,4℃孵育过夜,洗去一抗,加二抗[Alexa Fluor[®] 594标记山羊抗兔IgG(H+L),1:400],37℃避光孵育1 h,洗去二抗,加含DAPI的抗荧光淬灭剂复染细胞核,封片;荧光显微镜观察缺血侧脑组织海马区Iba-1免疫阳性细胞,Image Pro Plus 6.0进行图象采集和分析。每只大鼠选择

5个高倍视野,取均值为阳性细胞数量。

2.2.6 ELISA检测脑组织中IL-1β、TNF-α、PGE₂水平 取制备的10%的组织匀浆,ELISA检测脑组织IL-1β、TNF-α、PGE₂炎性因子的水平,严格按照试剂盒说明书的步骤操作。

2.2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织MAPK/COX-2信号通路相关蛋白的表达 每组剩余6只大鼠,断头取脑,分离海马组织。按照试剂盒说明书的操作提取海马组织中的总蛋白,BCA法测定蛋白浓度后取等量蛋白质样品上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳,湿转法转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗(TRPV1、p38 MAPK、p-p38 MAPK、COX-2、β-actin 1:1 000),4℃下孵育过夜,HRP标记的羊抗兔IgG二抗(1:5 000)室温孵育1 h,ECL显色,以β-actin为内参,通过与内参的灰度比,得出目的条带的相对表达水平。

2.3 统计学方法 使用SPSS 21.0和Image Pro Plus 6.0软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用t检验,采用单向方差分析(ANOVA)比较多组数据之间的差异,组间有差异进一步采用SNK-q检验;P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组大鼠的神经功能缺损评分的影响 与假手术组比较,模型组大鼠活动减少、毛色无光泽,提尾时不能完全伸展对侧前爪,行走时不能走直线,出现不同程度的向对侧转圈的现象,神经功能缺损评分显著升高(P<0.01);与模型组比较,SB203580组和辣椒素低、高剂量组神经功能缺损评分显著降低(P<0.01);与辣椒素高剂量组比较,anisomycin+辣椒素组的神经功能缺损评分显著升高(P<0.01)。见表1。

表1 辣椒素对各组大鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effect of capsaicin on neurological deficit score in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	神经功能缺损评分/分
假手术组		0.00±0.00
模型组		2.43±0.28 ²⁾
SB203580组	1	1.47±0.15 ⁴⁾
辣椒素低剂量组	50	1.91±0.21 ⁴⁾
辣椒素高剂量组	100	1.53±0.15 ⁴⁾
anisomycin+辣椒素组	2+100	1.96±0.17 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;与辣椒素高剂量组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01(表2-表6同)

3.2 对 各 组 大 鼠 的 学 习 及 认 知 能 力 的 影 响 水 迷 宫 实 验 结 果 显 示, 与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 大 鼠 逃 避 潜 伏 期 显 著 延 长, 穿 越 平 台 位 置 次 数 显 著 减 少 ($P<0.01$); 与 模 型 组 比 较, SB203580 组 和 辣 椒 素 高 剂 量 组 大 鼠 逃 避 潜 伏 期 显 著 缩 短, 穿 越 平 台 位 置 次 数 显

著 增 多 ($P<0.01$), 辣 椒 素 低 剂 量 组 大 鼠 1、3、4 d 逃 避 潜 伏 期 明 显 缩 短, 穿 越 平 台 位 置 次 数 明 显 增 多 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 辣 椒 素 高 剂 量 组 比 较, anisomycin+辣 椒 素 组 的 2、3、4 d 逃 避 潜 伏 期 显 著 增 加, 穿 越 平 台 位 置 次 数 显 著 减 少 ($P<0.01$)。 见 表 2 和 表 3。

表 2 辣 椒 素 对 各 组 大 鼠 定 位 航 行 逃 避 潜 伏 期 的 影 响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of capsaicin on latency of navigation escape in rats of each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	2 d	3 d	4 d
假手术组		52.04±4.16	41.21±4.50	32.64±4.05	29.45±4.30
模型组		65.33±5.08 ²⁾	62.45±7.17 ²⁾	59.43±6.11 ²⁾	55.26±5.68 ²⁾
SB203580 组	1	58.41±6.12 ⁴⁾	50.12±5.06 ⁴⁾	43.76±5.24 ⁴⁾	38.78±4.26 ⁴⁾
辣椒素低剂量组	50	62.86±6.09 ⁴⁾	57.97±6.21	54.26±6.17 ³⁾	49.85±5.32 ³⁾
辣椒素高剂量组	100	60.64±5.47 ⁴⁾	52.86±5.39 ⁴⁾	47.59±4.86 ⁴⁾	41.47±4.68 ⁴⁾
anisomycin+辣椒素组	2+100	63.40±5.11	60.93±5.36 ⁶⁾	55.40±5.31 ⁶⁾	50.11±4.57 ⁶⁾

表 3 辣 椒 素 对 各 组 大 鼠 空 间 探 索 穿 越 平 台 次 数 与 新 颖 物 体 辨 别 指 数 的 影 响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of capsaicin on times of space exploration crossing platform and identification index of novel objects in rats of each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

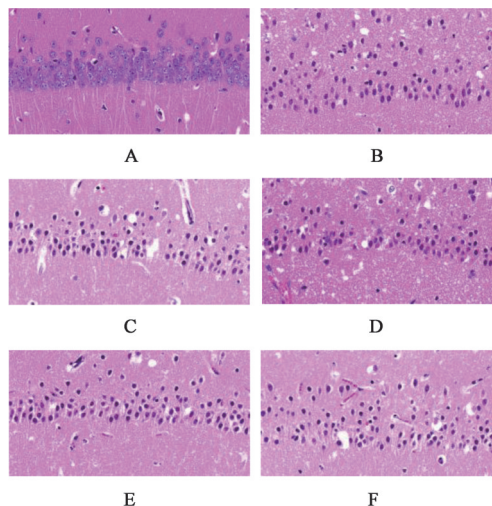
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	越平台次数/次	DI/%
假手术组		5.78±0.36	0.72±0.05
模型组		1.24±0.19 ²⁾	0.21±0.03 ²⁾
SB203580 组	1	3.64±0.33 ⁴⁾	0.60±0.07 ⁴⁾
辣椒素低剂量组	50	2.37±0.24 ⁴⁾	0.37±0.04 ³⁾
辣椒素高剂量组	100	3.22±0.31 ⁴⁾	0.54±0.06 ⁴⁾
anisomycin+辣椒素组	2+100	2.05±0.20 ⁶⁾	0.36±0.04 ⁵⁾

在 新 颖 物 体 识 别 测 试 中, 与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 大 鼠 DI 水 平 显 著 降 低 ($P<0.01$); 与 模 型 组 比 较, SB203580 组 和 辣 椒 素 低、高 剂 量 组 大 鼠 DI 水 平 明 显 升 高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 辣 椒 素 高 剂 量 组 比 较, anisomycin+辣 椒 素 组 的 DI 水 平 明 显 降 低 ($P<0.05$)。 见 表 3。

3.3 对 各 组 大 鼠 脑 组 织 海 马 病 理 的 影 响 研 究 结 果 显 示 假 手 术 组 大 鼠 脑 组 织 海 马 区 可 见 大 量 神 经 元 细 胞, 形 态 规 则, 核 大 而 圆; 模 型 组 大 鼠 海 马 区 可 见 神 经 元 细 胞 数 量 减 少, 排 列 疏 松, 细 胞 核 固 缩 深 染, 部 分 细 胞 肿 胀 呈 空 泡 样 变, 大 量 炎 性 细 胞 浸 润; SB203580 组 和 辣 椒 素 低、高 剂 量 组 大 鼠 上 述 病 理 改 变 明 显 减 轻, 神 经 元 细 胞 数 量 明 显 增 多, 少 量 炎 性 细 胞 浸 润; 而 anisomycin+辣 椒 素 组 与 辣 椒 素 高 剂 量 组 相 比, 神 经 元 细 胞 数 量 明 显 减 少, 炎 性 细 胞 浸 润 增 加。 见 图 1。

3.4 对 各 组 大 鼠 海 马 组 织 小 胶 质 细 胞 活 化 的 影 响

与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 大 鼠 海 马 CA1 区 Iba-1/DAPI 阳 性 表 达 的 小 胶 质 细 胞 数 量 显 著 升 高 ($P<$



注: A. 假 手 术 组; B. 模 型 组; C. SB203580 组; D. 辣 椒 素 低 剂 量 组; E. 辣 椒 素 高 剂 量 组; F. anisomycin+辣 椒 素 组 (图 2 和 图 3 同)

图 1 辣 椒 素 对 各 组 大 鼠 海 马 神 经 元 结 构 和 病 理 的 影 响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of capsaicin on structure and pathology of hippocampal neurons in rats of each group (HE, ×200)

0.01); 与 模 型 组 比 较, SB203580 组 和 辣 椒 素 低、高 剂 量 组 大 鼠 Iba-1/DAPI 标 记 的 小 胶 质 细 胞 数 量 明 显 降 低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 辣 椒 素 高 剂 量 组 比 较, anisomycin+辣 椒 素 组 的 小 胶 质 细 胞 数 量 明 显 升 高 ($P<0.05$)。 见 图 2、表 4。

3.5 对 各 组 大 鼠 脑 组 织 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 水 平 影 响 与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 大 鼠 脑 组 织 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 水 平 显 著 升 高 ($P<0.01$); 与 模 型 组 比 较, SB203580 组 和 辣 椒 素 低、高 剂 量 组 大 鼠 脑 组 织 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 水 平 明 显 降 低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 辣 椒 素 高 剂 量 组 比 较, anisomycin+辣 椒 素 组 脑 组 织 上 述 指 标 显 著 升 高 ($P<0.01$); 见 表 5。

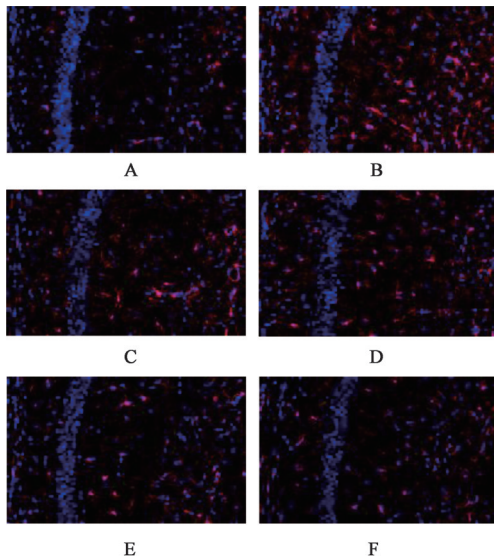


图2 辣椒素对各组大鼠海马区小胶质细胞活化的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Effect of capsaicin on microglia activation in hippocampus of rats in each group (IF, ×200)

表4 辣椒素对各组大鼠小胶质细胞数量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of capsaicin on the number of microglia in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	小胶质细胞数量/个
假手术组		131.65±12.47
模型组		219.24±17.53 ²⁾
SB203580组	1	174.31±18.36 ⁴⁾
辣椒素低剂量组	50	193.92±21.45 ³⁾
辣椒素高剂量组	100	182.43±17.36 ⁴⁾
anisomycin+辣椒素组	2+100	195.87±18.24 ⁵⁾

3.6 对各组大鼠海马组织 TRPV1、p38 MAPK、p-p38 MAPK、COX-2 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织 TRPV1 的蛋白表达水平显著降低, p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较, SB203580 组海马组织 TRPV1 的表达差异无统计学意义, p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达显著降低($P<$

0.01),辣椒素低、高剂量组大鼠海马组织 TRPV1 的表达显著升高($P<0.01$), p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达明显降低($P<0.05, P<0.01$);与辣椒素高剂量组比较, anisomycin+辣椒素组 p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达明显升高($P<0.05, P<0.01$), TRPV1 的表达差异无统计学意义,推测其原因可能是 SB203580 和 anisomycin 并不影响 TRPV1 的表达。见图3、表6。

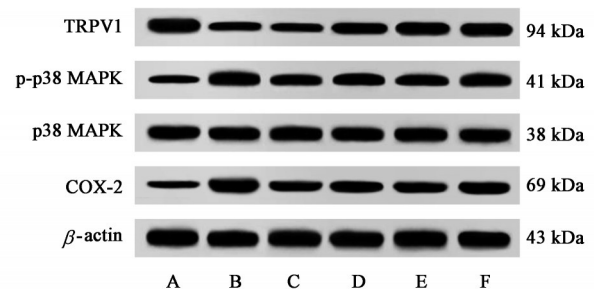


图3 各组大鼠海马组织 TRPV1、p-p38 MAPK、p38 MAPK、COX-2 的蛋白表达电泳

Fig. 3 electrophoresis of TRPV1, p-p38 MAPK, p38 MAPK and COX-2 protein expression in hippocampus of rats in each group

4 讨论

辣椒素是一种天然生物碱,衍生自辣椒属植物,辣椒特有的辣味是由于辣椒素的存在;具有抗炎、镇痛、抗肿瘤等多种作用^[16-17]。近年来的研究发现其对各种缺血再灌注损伤具有保护作用,如心肌^[18]、肾^[19]、脑^[13]等;还可以改善认知障碍,欧阳梦琪等^[11]发现辣椒素可通过上调海马线粒体-内质网结构偶联的表达,改善慢性脑低灌注大鼠受损的认知功能;还可以通过激活 TRPV1,减轻 AD 小鼠的认知和突触可塑性损伤^[10]。而辣椒素是否能改善 CIR 损伤后的认知功能障碍,还未见相关报道。因此,本研究对此展开了进一步的探讨。

辣椒素是 TRPV1 的激动剂,最初认为 TRPV1 是一种主要在传入感觉神经元中表达的突出的伤害性离子通道^[20];然而,越来越多的研究表明,

表5 辣椒素对各组大鼠脑组织 IL-1β、TNF-α、PGE₂ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1β	TNF-α	PGE ₂
假手术组		131.06±12.89	189.75±18.11	6.17±0.58
模型组		198.14±20.23 ²⁾	352.81±24.65 ²⁾	14.94±1.22 ²⁾
SB203580组	1	154.91±18.05 ⁴⁾	220.56±21.39 ⁴⁾	8.23±0.75 ⁴⁾
辣椒素低剂量组	50	178.09±17.44 ⁴⁾	314.42±27.16 ⁴⁾	11.27±1.06 ³⁾
辣椒素高剂量组	100	163.57±15.91 ⁴⁾	253.90±22.45 ⁴⁾	9.98±1.15 ⁴⁾
anisomycin+辣椒素组	2+100	182.60±19.37 ⁶⁾	317.61±29.87 ⁶⁾	12.06±1.23 ⁶⁾

表6 辣椒素对各组大鼠海马组织 TRPV1、p-p38 MAPK/p38 MAPK、COX-2 的表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of capsaicin on expression of TRPV1, p-p38 MAPK/p38 MAPK and COX-2 in hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TRPV1/ β -actin	p-p38 MAPK/p38 MAPK	COX-2/ β -actin
假手术组		0.92±0.08	0.52±0.07	0.25±0.04
模型组		0.44±0.05 ²⁾	0.95±0.11 ²⁾	0.68±0.07 ²⁾
SB203580组	1	0.49±0.06	0.67±0.07 ⁴⁾	0.40±0.05 ⁴⁾
辣椒素低剂量组	50	0.61±0.07 ⁴⁾	0.83±0.09 ³⁾	0.59±0.06 ³⁾
辣椒素高剂量组	100	0.78±0.06 ⁴⁾	0.74±0.08 ³⁾	0.47±0.04 ⁴⁾
anisomycin+辣椒素组	2+100	0.75±0.08	0.86±0.10 ⁵⁾	0.62±0.05 ⁶⁾

TRPV1 在大脑中 also 得到广泛表达,并参与多种功能,例如调节突触传递和可塑性,以及认知功能^[21]。BALLEZA-TAPIA 等^[22]发现 TRPV1 受体激动剂可逆转啮齿类动物的海马损伤和记忆障碍,并保护神经元免受 β 淀粉样蛋白(A β)诱导的细胞毒性作用。舒佳惠等^[12]发现辣椒素可上调海马组织 TRPV1 蛋白的表达,有效改善慢性脑低灌注大鼠认知功能障碍;说明辣椒素具有改善认知功能障碍的作用。在本研究中,课题组采用 MCAO 大鼠模型来模拟缺血性脑中风,并通过 Morris 水迷宫和新型物体识别测试来探究辣椒素对 CIR 大鼠认知功能的影响,结果显示模型大鼠出现明显的认知功能障碍,而辣椒素可明显缓解模型大鼠记忆力和学习障碍;Longa 评分和 HE 染色结果也表明辣椒素可改善模型大鼠神经功能缺损症状,减轻神经元损伤;进一步证明了辣椒素对 CIR 大鼠认知功能的改善作用;但其作用机制尚不明确。

海马区是大脑处理学习与记忆的主要区域,也是脑缺血再灌注后最容易受到损伤的区域,与认知功能密切相关。小胶质细胞是中枢神经系统固有的免疫调节细胞,其激活有两种模式,M1 模式,小胶质细胞活化后会分泌超氧自由基和促炎性因子(如 IL-6、TNF- α 、IL-1 β),损伤神经元;M2 模式,其活化后能分泌抗炎因子(如 IL-10、IL-4、TGF- β),有利于神经元损伤的修复^[23]。脑稳态的破坏促进了小胶质细胞的激活,小胶质细胞介导的炎症已被多项研究证明是缺血性脑中风发病的重要因素,参与认知功能障碍^[24]。BOK 等^[25]发现辣椒素可将促炎性 M1 小胶质细胞转变为抗炎性 M2 状态,有助于多巴胺能神经元的存活;CHUNG 等^[26]发现辣椒素激活 TRPV1 可以通过抑制帕金森小鼠模型中的神经胶质细胞激活介导的活性氧(ROS)和神经炎症(TNF- α 、IL-1 β)来保护黑质纹状体多巴胺神经元;以上研究提示,辣椒素对认知功能的改善作用可能

与小胶质细胞的活化有关。Iba-1 能与小胶质细胞发生特异性结合,常被作为鉴定小胶质细胞的标记物;过度的炎症介质如前列腺素和细胞因子的释放是小胶质细胞过度活化的标志。为了进一步验证猜想,笔者采用免疫荧光染色法检测了海马组织 Iba-1 标记的阳性细胞的表达情况,结果显示模型大鼠海马组织 Iba-1 阳性表达的小胶质细胞数量明显升高,辣椒素可降低 Iba-1 阳性表达的小胶质细胞数量,并可以降低脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂ 的水平;说明辣椒素可减少小胶质细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β ,抑制小胶质细胞活化。

COX-2 是一种氧化应激相关基因,是催化花生四烯酸产生 PGE₂ 的关键限制性酶,通常在炎症过程中被诱导,其激活被认为是大脑神经炎症的促发因素,可能导致认知能力下降^[27]。MAPK 在神经炎症和神经退行性疾病中的作用已得到很好的证实,且在小胶质细胞活化中,参与调节 COX-2 和细胞因子合成的主要途径是 MAPK 家族信号蛋白,如 p38 MAPK。YAO 等^[28]的研究表明在帕金森小鼠模型中,抑制 p38 MAPK 信号传导可减少小胶质细胞介导的神经炎症因子的释放,从而保护多巴胺能神经元并改善行为障碍;BHATIA 等^[29]发现辣椒素可减轻 p38 MAPK/MK2/PGE₂ 轴诱导的小胶质细胞活化。在本研究中,课题组发现在 CIR 大鼠脑组织中小胶质细胞的活化伴随着 p38 MAPK 的激活和 COX-2 表达的增加,而辣椒素可抑制 p38 MAPK 的激活,降低 COX-2 的表达,与 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 的结果一致;且使用 p38 MAPK 的激活剂 anisomycin 可增加 COX-2 的表达,明显减弱辣椒素对小胶质细胞活化的抑制作用,加重 CIR 大鼠的认知功能障碍;提示辣椒素可能通过抑制 p38 MAPK/COX-2 通路的激活,改善 CIR 大鼠的认知功能。

综上所述,辣椒素对 CIR 大鼠的认知功能具有保护作用,其作用机制可能与抑制 p38 MAPK/

COX-2通路的激活,进而抑制小胶质细胞的过度活化有关。而辣椒素是否能通过调节其它与神经炎症相关的通路来改善脑中风后认知功能障碍,还有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUDA S, NITO C, YOKOBORI S, et al. Recent advances in cell-based therapies for ischemic stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6718.
- [2] ORELLANA-URZÚA S, ROJAS I, LÍBANO L, et al. Pathophysiology of ischemic stroke: Role of oxidative stress [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(34): 4246-4260.
- [3] DONNELLAN C, WERRING D. Cognitive impairment before and after intracerebral haemorrhage: A systematic review [J]. *Neurol Sci*, 2020, 41(3): 509-527.
- [4] KWON H S, LEE D, LEE M H, et al. Post-stroke cognitive impairment as an independent predictor of ischemic stroke recurrence: PICASSO sub-study [J]. *J Neurol*, 2020, 267(3): 688-693.
- [5] MATHILDE G, LUCIE G, SOPHIE M, et al. Influence of pre-existing mild cognitive impairment and dementia on post-stroke mortality. The Dijon stroke registry [J]. *Neuroepidemiology*, 2020, 54(6): 490-497.
- [6] GAD S N, NOFAL S, RAAFAT E M, et al. Lixisenatide reduced damage in hippocampus CA1 neurons in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion possibly via the ERK/p38 signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(7): 1026-1037.
- [7] JIA L, CHEN Y, TIAN Y H, et al. MAPK pathway mediates the anti-oxidative effect of chicoric acid against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1640-1646.
- [8] HWANG J H, KUMAR V R, KANG S Y, et al. Effects of flower buds extract of *Tussilago farfara* on focal cerebral ischemia in rats and inflammatory response in BV2 microglia [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(11): 844-852.
- [9] ZHANG W, MI Y, JIAO K, et al. Kellin alleviates cognitive impairment in mice after ischemic stroke by multiple mechanisms [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(9): 2258-2274.
- [10] DU Y, FU M, HUANG Z, et al. TRPV1 activation alleviates cognitive and synaptic plasticity impairments through inhibiting AMPAR endocytosis in APP23/PS45 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13113.
- [11] 欧阳梦琪,舒佳慧,张棋,等. 辣椒素对慢性脑低灌注大鼠认知行为受损及海马线粒体-内质网结构偶联表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(8): 1393-1402.
- [12] 舒佳慧,张棋,欧阳梦琪,等. 辣椒素对慢性脑低灌注大鼠认知障碍及海马 TRPV1 蛋白表达的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2018, 27(8): 722-726.
- [13] 李群英,何清华,徐露,等. 辣椒素对脑缺血再灌注大鼠的保护作用及机制探讨 [J]. *中国中医急症*, 2017, 26(5): 797-798, 803.
- [14] 赵晓云,韩影,赵雅宁,等. 抑制丝裂原活化蛋白激酶磷酸化对脑缺血后处理大鼠学习记忆及海马区神经细胞自噬的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2018, 27(6): 487-491.
- [15] 王富贵,夏永智,余海军,等. P38MAPK 在大鼠脊髓损伤后胶质瘢痕形成早期对 GFAP、vimentin 表达的调控作用 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(4): 462-467.
- [16] 王玲燕,夏欢,夏桂阳,等. 天然非生物碱类镇痛成分的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24): 5840-5865.
- [17] 周欣悦,刘夏阳,李壮,等. 辣椒素的抗肿瘤作用及分子机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(16): 4277-4283.
- [18] 曹翔,李晶,于海涛,等. 辣椒素对心肌梗死大鼠心功能及梗死面积的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(10): 2490-2492.
- [19] 任晓芬,韩毅,赵晓英,等. 辣椒素减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤的作用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(4): 384-388.
- [20] JUÁREZ-CONTRERAS R, MÉNDEZ-RESÉNDIZ K A, ROSENBAUM T, et al. TRPV1 channel: A noxious signal transducer that affects mitochondrial function [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8882.
- [21] BALLEZA-TAPIA H, DOLZ-GAITON P, ANDRADE-TALAVERA Y, et al. Capsaicin-induced impairment of functional network dynamics in mouse hippocampus via a TrpV1 receptor-independent pathway: Putative involvement of Na⁺/K⁺-ATPase [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(2): 1170-1185.
- [22] BALLEZA-TAPIA H, CRUX S, ANDRADE-TALAVERA Y, et al. TrpV1 receptor activation rescues neuronal function and network gamma oscillations from Aβ-induced impairment in mouse hippocampus *in vitro* [J]. *Elife*, 2018, 7: e37703.
- [23] TAO X, YAN M, WANG L, et al. Homeostasis Imbalance of microglia and astrocytes leads to

- alteration in the metabolites of the kynurenine pathway in LPS-induced depressive-like mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1460.
- [24] MCDONOUGH A, WEINSTEIN J R. The role of microglia in ischemic preconditioning[J]. *Glia*, 2020, 68(3):455-471.
- [25] BOK E, CHUNG Y C, KIM K S, et al. Modulation of M1/M2 polarization by capsaicin contributes to the survival of dopaminergic neurons in the lipopolysaccharide-lesioned substantia nigra *in vivo* [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(7):1-14.
- [26] CHUNG Y C, BAEK J Y, KIM S R, et al. Capsaicin prevents degeneration of dopamine neurons by inhibiting glial activation and oxidative stress in the MPTP model of Parkinson's disease[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(3):e298.
- [27] ZHU X, YAO Y, YANG J, et al. COX-2-PGE₂ signaling pathway contributes to hippocampal neuronal injury and cognitive impairment in PTZ-kindled epilepsy mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 87: 106801.
- [28] YAO C, LIU X, ZHOU Z, et al. Melatonin attenuates expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in activated microglia induced by lipopolysaccharide (LPS) [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2019, 82(7):437-446.
- [29] BHATIA H S, ROELOFS N, MUÑOZ E, et al. Alleviation of microglial activation induced by p38 MAPK/MK2/PGE₂ axis by capsaicin: Potential involvement of other than TRPV1 mechanism/s [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):116.

[责任编辑 王鑫]