

基于JNK信号通路调控细胞自噬探讨 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤的保护作用

赵敏茵¹, 储心乔², 曹晓慧³, 霍瑞卿¹, 孙阔¹, 李芳钊¹, 韩宇帆¹, 田军彪^{4*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053;

3. 石家庄市厚仁中医门诊部, 石家庄 050011; 4. 河北省中医院, 石家庄 050000)

[摘要] 目的:研究化浊解毒活血通络方通过c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路调控神经细胞自噬减轻脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法:60只SD大鼠随机分为假手术组、大脑中动脉阻塞/再灌注(MCAO/R)组(模型组)、化浊解毒活血通络方(中药)组(25.0 g·kg⁻¹)、JNK抑制剂SP600125(SP)组(5 mg·kg⁻¹)、中药+SP组和JNK激动剂Anisomycin(Ani)组(15 mg·kg⁻¹)6组。造模24 h后中药组和中药+SP组给予中药汤剂灌胃,连续给药3 d,其余各组灌胃等容积蒸馏水。神经功能评分评估神经功能缺损程度,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色确定脑梗死体积;苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织结构变化;尼氏染色检测神经元损伤;原位末端标记法(TUNEL)观察细胞凋亡;透射电镜观察自噬小体超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织中微管相关蛋白1轻链3A/B(LC3A/B)、自噬相关基因5(Atg5)、自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)、p62、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、JNK、磷酸化(p)-JNK和c-Jun的蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠脑组织中LC3A/B、Beclin1、p62、Atg5、Bcl-2、JNK、c-Jun mRNA表达量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高($P<0.05$),脑组织梗死体积明显变大($P<0.05$),海马区及其周围脑组织形成典型梗死表现,皮层有大量神经元细胞变性、坏死、液化、固缩和深染,有炎性细胞浸润,电镜下可见炎症细胞浸润,线粒体、溶酶体、自噬体和自噬溶酶体严重肿胀。细胞凋亡情况较重,TUNEL阳性细胞明显增加($P<0.05$),脑组织内神经元核膜和核仁模糊,突起不连续,胞质尼氏体色浅且数量减少。Western blot结果显示大鼠脑组织LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun蛋白表达明显升高($P<0.05$),p62和Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$),Real-time PCR结果显示LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、c-Jun mRNA表达明显增加($P<0.05$),p62、Bcl-2 mRNA表达明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,中药组、SP组与中药+SP组大鼠神经功能缺损评分均明显降低($P<0.05$),梗死体积明显缩小($P<0.05$),脑组织病理状态均有所改善,尤以中药组改善明显;线粒体M嵴丰富,基本正常,内质网轻度扩张,高尔基体轻度肿胀,细胞核核膜轻度融合,溶酶体、自噬小体、自噬溶酶体可见,但数量较少,TUNEL阳性细胞明显减少($P<0.05$),凋亡情况有所减轻,尤以中药组最为显著,脑组织神经元核仁、核膜可辨,胞浆尼氏体有一定程度的脱失,但较模型组明显减轻。Western blot结果显示中药组、SP组与中药+SP组LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun蛋白表达明显降低($P<0.05$),中药组和SP组p62蛋白表达明显升高($P<0.05$),中药组和中药+SP组Bcl-2蛋白表达明显升高($P<0.05$)。Real-time PCR显示中药组、SP组和中药+SP组大鼠脑组织LC3A、LC3B、Beclin1、Atg5、JNK、c-Jun mRNA表达明显降低($P<0.05$),p62 mRNA表达明显增加($P<0.05$);中药组和中药+SP组Bcl-2 mRNA表达明显增加($P<0.05$)。Ani组评分明显升高($P<0.05$),梗死体积显著增加,神经元细胞坏死情况加重,炎性浸润明显,神经元核膜融合、异型凸起,异染色质增加,边缘聚集,线粒体肿胀严重,内质网扩张,溶酶体增加,胞浆内囊泡增多,可见自噬体和自溶酶体,TUNEL阳性细胞增加($P<0.05$),凋亡情况较重,尼氏小体数量明显减少,脱失较重,着色浅,核仁核膜模糊;Ani组Atg5、c-Jun、JNK mRNA表达增加($P<0.05$),Beclin1、p62、Bcl-2 mRNA表达明显降低($P<0.05$)。与中药组和SP组比较,Ani组LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun蛋白表达明显升高($P<0.05$),p62、Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与中药组比较,SP组和中药+SP组大鼠脑组织JNK mRNA表达降低($P<0.05$);Ani组LC3A、LC3B、Atg5、c-Jun、JNK mRNA表达增加($P<0.05$),Bcl-2表达明显降低($P<0.05$)。与SP组比较,Ani组Atg5、c-Jun、JNK mRNA表达明显升高($P<0.05$),Beclin1、p62、Bcl-2 mRNA表达明显降低($P<0.05$)。结论:化浊解毒活血通络方可上调LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun蛋白的表达,下调p62、Bcl-2蛋白表达;提高LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun mRNA表达,降低p62、Bcl-2 mRNA表达,表明化浊解毒活血通络方可通过JNK信号通路抑制自噬减少大鼠缺血/再灌注损伤。

[收稿日期] 2022-01-06

[基金项目] 河北省重点研发项目(20377710D);河北省中医药管理局科研计划项目(2020119);河北中医学院科研能力提升重点项目(KTZ2019028)

[第一作者] 赵敏茵,在读博士,从事中西医结合脑血管病研究,E-mail:1178654840@qq.com

[通信作者] *田军彪,教授,从事中西医结合脑血管病研究,E-mail:jbt1965@sina.com

[关键词] 化浊解毒活血通络方; 脑缺血再灌注损伤; 自噬; c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路; 大脑中动脉阻塞/再灌注(MCAO/R)模型

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R255.2;R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)07-0115-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230793

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220510.1805.002.html>

[网络出版日期] 2022-05-11 10:24:39

Protective Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo Prescription on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury via Regulating Autophagy Based on JNK Signaling Pathway

ZHAO Minhan¹, CHU Xinqiao², CAO Xiaohui³, HUO Ruiqing¹, SUN Kuo¹,
LI Fangzhao¹, HAN Yufan¹, TIAN Junbiao^{4*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

3. Shijiazhuang Houren Clinic of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shijiazhuang 050011, China;

4. Hebei Province Hospital of TCM, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription in alleviating cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating nerve cell autophagy based on c-Jun N-terminal kinase(JNK) signaling pathway. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups: sham group, middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) group (model group), Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription group [traditional Chinese medicine (TCM) group (25.0 g·kg⁻¹)], JNK inhibitor SP600125 (SP) group (5 mg·kg⁻¹), TCM+SP group and JNK agonist Anisomycin (Ani) group (15 mg·kg⁻¹). After 24 h of modeling, TCM group and TCM+SP group were given TCM decoction (*ig*) for 3 consecutive days, and the other groups were given equal volume of normal saline (*ig*). Neurological deficit was evaluated by neurological function score and cerebral infarct volume was determined by 2,3,5-triphenyltetrazole chloride (TTC) staining. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe the structural changes of brain tissue and the damage of neurons, respectively. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) was performed to detect cell apoptosis. The ultrastructure of autophagosomes was observed by transmission electron microscope. Western blot was employed to detect the protein expressions of microtubule-associated protein 1 light chain 3A/B (LC3A/B), autophagy related 5 (Atg5), the ortholog of yeast Atg6 (Beclin1), p62, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), JNK, phosphorylated (p)-JNK and c-Jun in brain tissue. The mRNA expressions of LC3A/B, Beclin1, p62, Atg5, Bcl-2, JNK and c-Jun were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the sham group, the model group had elevated neurological deficit score ($P<0.05$), enlarged cerebral infarct volume ($P<0.05$) and typical infarction manifestations formed in hippocampal region and its surrounding brain tissue. In addition, there were a large number of neuronal cell degeneration, necrosis, liquefaction, nucleus pyknosis and deep staining, and inflammatory cell infiltration in the cortex in the model group, and severe swelling of mitochondria, lysosomes, autophagosomes and autophagolysosomes were clearly seen under electron microscope. TUNEL positive cells were increased ($P<0.05$), and cell apoptosis was severe. The nuclear membrane and nucleolus of neurons in brain tissue were blurred with discontinuous processes, and Nissl bodies in cytoplasm were stained light with reduced number. Western blot revealed that the model group had up-regulated protein expressions of LC3A/B, Beclin1, Atg5, JNK, p-JNK and c-Jun in brain tissue ($P<0.05$),

while down-regulated protein expressions of p62 and Bcl-2 ($P<0.05$) as compared with the sham group. Real-time PCR indicated that the mRNA expressions of LC3A/B, Beclin1, Atg5, JNK and c-Jun in the model group were higher ($P<0.05$) while the mRNA expressions of p62 and Bcl-2 were lower ($P<0.05$) than those in the sham group. Compared with the conditions in model group, the neurological deficit scores of TCM, SP and TCM+SP groups were lowered ($P<0.05$), and the cerebral infarct volume was reduced ($P<0.05$), with improved pathological status of brain tissue, especially in the TCM group. Furthermore, there were abundant and basically normal mitochondrial cristae, slightly dilated endoplasmic reticulum, slightly swollen golgi apparatus, slightly fused nuclear membrane, and few visible lysosomes, autophagosomes and autophagolysosomes. TUNEL positive cells were decreased ($P<0.05$), displaying reduced apoptosis, especially in the TCM group. The nucleolus and nuclear membrane of neurons in brain tissue were discernible, and Nissl bodies in cytoplasm was reduced to a certain degree as compared with those in the model group. Western blot showed a decrease in the protein expressions of LC3A/B, Beclin1, Atg5, JNK, p-JNK and c-Jun in the TCM group, the SP group, and the TCM+SP group ($P<0.05$), while an increase in the protein expressions of p62 in the TCM group and SP group ($P<0.05$), and an increase in the protein expressions of Bcl-2 in the TCM group and TCM+SP group. By Real-time PCR, the mRNA expressions of LC3A, LC3B, Beclin1, Atg5, JNK and c-Jun had a down-regulation ($P<0.05$) while the mRNA expression of p62 a up-regulation in the TCM group, the SP group, and the TCM+SP group ($P<0.05$), and the mRNA expression of Bcl-2 a up-regulation in the TCM group and the TCM+SP group ($P<0.05$). Scores of the Ani group were raised ($P<0.05$), and infarct volume was increased significantly, with aggravated neuronal cell necrosis and obvious inflammatory infiltration. Moreover, there were neuronal nuclear membrane fusion with abnormal protrusion, increased heterochromatin aggregation in edge, severe mitochondrial swelling, endoplasmic reticulum expansion, increased lysosomes, increased intracytoplasmic vesicles, and visible autophagosomes and autophagolysosomes. TUNEL positive cells were increased ($P<0.05$), representing severe apoptosis. The number of Nissl bodies dropped with light staining, and the nucleolus and nuclear membrane were blurred. Real-time PCR found that the mRNA expressions of Atg5, c-Jun, JNK were up-regulated ($P<0.05$), while Beclin1, p62, Bcl-2 were down-regulated in the Ani group ($P<0.05$). Compared with the TCM group and SP group, the protein expressions of LC3A/B, Beclin1, Atg5, JNK, p-JNK, c-Jun were decreased, and p62, Bcl-2 were increased in the Ani group ($P<0.05$). Compared with the TCM group, the mRNA expressions of JNK mRNA had a down-regulation in the SP group and TCM+SP group, while LC3A, LC3B, Atg5, c-Jun, JNK had an up-regulation ($P<0.05$) and Bcl-2 had a down-regulation in the Ani group ($P<0.05$). Compared with the SP group, the mRNA expressions of Atg5, c-Jun, JNK had an up-regulation ($P<0.05$), and Beclin1, p62, Bcl-2 had a down-regulation in the Ani group ($P<0.05$).

Conclusion: Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription significantly up-regulates the protein and mRNA expressions of LC3A/B, Beclin1, Atg5, JNK, p-JNK and c-Jun, and down-regulates the protein and mRNA expressions of p62 and Bcl-2, suggesting that the prescription can inhibit autophagy through JNK signaling pathway to reduce ischemia/reperfusion injury in rats.

[Keywords] Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription; cerebral ischemia-reperfusion injury; autophagy; c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway; middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model

脑卒中是一种十分严重的脑血管疾病,是世界范围内死亡和残疾的第二大原因^[1]。同时,脑血管疾病也是我国因病致死的主要原因之一,至少 1/5 的人死于卒中,约占全球脑血管疾病死亡的 1/3^[2]。严重危害人类生命健康,且给社会带来较大的

负担。卒中后及时恢复血供很重要,但溶栓治疗受时间窗和缺血再灌注损伤的影响,治疗效果往往不尽人意,造成较高的死亡率和致残率,临床亟需新的治疗方向和新的有效药物^[3]。缺血再灌注损伤 (CIRI)是指恢复血液供应后不仅没有减轻而且

加重损伤的一种病理过程^[4-7]。如何有效减轻脑CIRI是改善治疗效果的关键。近年来在CIRI过程中细胞自噬的作用被广泛关注,大量研究表明,脑缺血再灌注过程中会激活自噬,然而,自噬激活对脑CIRI的影响是双向的^[8]。细胞自噬适度的激活可以保护脑组织,而过度激活则会导致细胞自噬性死亡,加重脑损伤。

诱导自噬的因素很多,可能与氧化应激和细胞兴奋性毒性等有关;自噬在脑CIRI中的调节作用机制尚未明确,是当前研究的焦点。多种蛋白通路参与自噬的调控,发挥复杂的作用,其中c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路自噬密切相关,探讨JNK对自噬的调节作用,可能为缺血性脑卒中的治疗提供理论和分子依据。

缺血性脑卒中在中医理论中归属“中风”范畴,中风是一种以猝然昏倒,不省人事,口舌喎斜,言语不利,半身不遂为主证的疾病。中风病的发病机制十分复杂,医家多认为“风、火、气、虚、痰、瘀”是中风病发生的重要病因病机^[9]。“湿浊瘀血阻滞清窍,化热成毒损伤脑络”是课题组总结的其病因病机的关键,浊毒是指因机体阴阳失调,脏腑功能紊乱,气血津液不能正常运行,痰浊瘀血等病理产物蕴结日久化热,湿浊瘀血内生所形成的复杂的致病因素。化浊解毒活血通络方是据此病机进行拟定并筛选出来的有效方剂,前期动物实验表明,给予该自拟方进行干预,可有效改善实验性脑CIRI模型神经功能缺损症状,抑制炎症细胞因子的表达,提高CIRI模型小鼠脑组织Ca²⁺-腺苷三磷酸(ATP酶)及Na⁺-K⁺-ATP酶活性,抑制细胞内钙超载,下调CIRI模型小鼠脑组织海马区胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的表达,减少细胞凋亡的产生^[10-14]。然而,具体治疗机制尚不明确。因此,本研究采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞/再灌注(MCAO/R)模型,以化浊解毒活血通络方中药为干预措施,观察其对大鼠神经功能评分、脑组织结构、自噬因子表达及JNK信号通路的影响,探究大鼠CIRI与该通路的关系和化浊解毒活血通络方治疗作用的可能机制。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠60只,6~8周龄,体质量(220±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号SCXK(京)2016-0006。采用标准实验室动物饲料及水饲养,实验动物于造模前适应性饲养7d,自由进食和饮水。本实验经过河北中医学院伦理委员会批准,动物伦理

许可证号为DWLL2018047。

1.2 药物 化浊解毒活血通络方药物组成为石菖蒲15g、茯苓15g、地龙15g、泽泻6g、川芎9g、黄连6g、丹参15g、当归9g、赤芍15g、郁金15g。购于河北省中医院药房,为广东一方制药有限公司免煎颗粒制剂,批号分别为0061663、0092923、0057083、0081833、0086363、0071783、0071563、0070963、0060823、0072803。

1.3 试剂 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染液、尼氏染色液、苏木素-伊红(HE)染色液、脱脂奶粉(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G3005、G1434、G1100、20161123),原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(瑞士Roche Group公司,批号11684817910),三羟甲基乙二胺(Tris)、甘氨酸、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)(美国Coolaber公司,批号分别为CT11411、CG5831、tCAA1161A、CS9701),过硫酸胺(AP)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、焦碳酸二乙酯(DEPC)(美国Sigma公司,批号分别为A3678、T8133、D5758),发光试剂盒、ECL发光液(美国Millipore公司,批号分别为WBKLS0500、1716501),微管相关蛋白1轻链3A/B(LC3A/B)、自噬相关基因5(Atg5)、自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)、p62、JNK、磷酸化(p)-JNK、 β -肌动蛋白(β -actin)兔多克隆一抗(美国CST公司,货号分别为CST12741T、CST12994T、CST3495T、CST5114T、CST4668T、CST9165T、CST9252T),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)兔多克隆一抗(英国Abcam公司,货号ab196495),c-Jun兔多克隆一抗(美国Boster公司,货号AB0035),山羊抗兔二抗(BE0101)、蛋白预染Marker(BE26616)(柏奥易杰生物科技有限公司,批号分别为80920904、80930614),RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0013E),甲醇(天津永大试剂厂,批号20170630);Easstep Super Total RNA Extraction Kit、GoScript Reverse Transcription System、GoTaq qPCR Master Mix(美国Promega公司,批号分别为LS1040、A5001、A6002),引物[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号260064816],MicroAmp Optical 8-Cap Strip、MicroAmp Fast Reaction Tubes(美国Life Technologies公司,批号REF4323032、REF4358293)。

1.4 仪器 SHA-B型恒温振荡器(常州国华公司),DL-CJ-1N型高性能无菌实验台(哈尔滨东联公司),YXQ-LS-50A型高压灭菌器(上海博迅实业有限

公司),2720型基因扩增仪(美国AB公司),HM-200型电子天平(日本A&D有限责任公司),1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司),MDF-382E型超低温保存箱(日本三洋公司),S25型电动玻璃匀浆机(德国IKA公司),756MC型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司),0.22 μm PVDF膜(美国Millipore公司),DYCZ-24DN型电泳仪、垂直电泳槽、转移槽(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 造模及干预方法 将60只雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组、MCAO/R组(模型组)、化浊解毒活血通络方组(中药组)、JNK抑制剂SP600125(SP)组、中药+SP组和JNK激动剂Anisomycin(Ani)组6组(每组10只)。SP组、中药+SP组大鼠于术前30 min侧脑室注射SP600125 10 μL(5 mg·kg⁻¹),Ani组大鼠于术前30 min侧脑室注射Anisomycin 10 μL(15 mg·kg⁻¹)。假手术组、模型组和TCM组注射等量生理盐水。大鼠麻醉后固定于立体定位仪上,在穿刺点(坐标为前囟向后1.0 mm,中线旁开1.5 mm处)使用微量注射器缓慢注入。采用LONGA等^[3]改良线栓法建立大鼠MCAO局灶性脑缺血动物模型,仰卧位沿前正中中线做颈部切口,暴露一侧粗大的颈总动脉以及颈外动脉、颈内动脉,在颈总动脉上做一切口插入线栓,朝颈内动脉方向适度推送,当黑色标记约到分叉处时感轻微阻力停止推进,造成大脑中动脉起始部阻断。待脑缺血2 h后拔出线栓,模型制作完成。按照大鼠与成人等效剂量折算系数,以成人剂量的6.25倍为中剂量,根据前期研究^[7]高剂量组脑保护作用最佳,故本实验选用高剂量给药,终质量分数为25.0 g·kg⁻¹,给药前均用蒸馏水制备成中药混悬液。再灌注2 h大鼠苏醒后,中药和中药+SP组给予中药汤剂灌胃,给药体积为10 mL·kg⁻¹,连续给药3 d,假手术组、模型组、SP组和Ani组灌胃等容积蒸馏水,干预期间各组实验动物自由进食和饮水。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 一般情况 观察各组大鼠不同干预后的精神,饮食二便,体质量及毛发情况。

2.2.2 神经功能缺损程度评定 术后3 d对实验大鼠采用Zea-Longa评分行中枢神经功能缺损评分。0分,无任何神经功能缺损体征,活动正常,与寻常大鼠无异;1分,不能自由舒展梗死灶对侧前肢(左

前爪);2分,爬行时向左侧转圈;3分,行走时身体向左侧倾倒;4分,昏迷或不能自行行走;5分,死亡。选取分数为1~3分的大鼠入组^[12]。

2.2.3 TTC染色测定脑梗死体积 麻醉后冰上断头取脑,去除脑干和嗅球,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后置于脑模具中,-20℃冰箱冷冻15 min,冠状位切5片,每片约2 mm厚,放入2%TTC染液中,避光37℃孵育25 min,4%多聚甲醛固定液中固定24 h后拍照,后使用Image J分析软件计算梗死体积。

2.2.4 HE染色观察大鼠脑组织病理变化 将脑组织置于组织液中固定24 h后梯度乙醇脱水,用石蜡进行包埋,切片机切片(每片4 μm);60℃烘烤2 h,放入二甲苯中10 min×2次;梯度乙醇脱蜡至水,ddH₂O冲洗5 min;加入苏木素染色5 min,1%盐酸乙醇分化3 s,冲洗后加入返蓝液返蓝,冲洗后加伊红染液染色2 min,自来水冲洗1 min;梯度乙醇脱水后二甲苯透明,用中性树胶封片;光学显微镜下观察、拍照分析。

2.2.5 透射电子显微镜检测神经元超微结构 取缺血半暗带部位新鲜脑组织(每组1只),切成1 mm³小块;4℃4%戊二醛固定,12 h;入PBS浸洗15 min,3次;1%锇酸固定2 h后PBS浸洗20 min,2次;丙酮逐级脱水,每次15 min;包埋后于在37℃温箱中聚合12 h,60℃温箱中聚合48 h;按50 nm厚度进行超薄切片;采用醋酸铀和柠檬酸铅对样品进行双重染色;透射电子显微镜下进行观察、拍照。

2.2.6 TUNEL染色检测细胞凋亡 将脑组织石蜡切片加入二甲苯中10 min,2次;梯度乙醇脱水,加入Proteinase K工作液室温孵育20 min;冲洗后放入4%多聚甲醛中室温固定5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗5 min,2次;干后加TUNEL反应混合液50 μL,37℃湿盒中孵育1 h,PBS冲洗3次;干后加converter-POD 50 μL于标本上,加盖玻片在37℃湿盒中反应30 min;PBS冲洗3次;加DAB底物50~100 μL,15~25℃反应10 min;PBS冲洗3次;拍照后再用苏木素复染,几秒后立即用自来水冲洗。梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。显微镜下观察并采集图像,组织切片上凋亡的细胞为棕褐色。

2.2.7 尼氏染色检测神经元损伤 脑组织石蜡切片脱蜡至水;用尼氏染色液(甲苯胺蓝法)置于60℃温箱浸染30 min;蒸馏水冲洗3次;95%乙醇快速分化;无水乙醇脱水,二甲苯透明后用中性树胶封固。在光学显微镜下进行观察拍照。

2.2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JNK 信号通路相关蛋白表达 取缺血半暗带脑组织称重后磨至细粉末状,加入 RIPA 裂解液,离心,提取上清液,测定蛋白浓度,95 °C 变性后十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶中封闭 2 h;分别加入一抗(LC3A/B 为 1: 800, p62 为 1: 5 000, Atg5、Bcl-2、Beclin1、JNK、p-JNK、c-Jun 及 β -actin 均为 1: 1 000), 4 °C 反应过夜。PBS 洗膜 3 次,加入二抗(1: 10 000)室温孵育 1.5 h,再次洗膜后使用 ECL 试剂盒曝光洗片,扫描胶片,采用 Image J 软件测定 Western blot 条带灰度值。

2.2.9 Real-time PCR 检测 JNK 信号通路相关 mRNA 表达 取动物组织 5~20 mg 经液氮研磨,裂解后稀释离心提取总 RNA,在含 Oligo(dT)Primer、Random Primers 的混合液中 70 °C 5 min 使 RNA 变性,冷却后加入反转录反应液进行逆转录反应。加入 PCR 反应液(cDNA 模板 2 μ L, 2 \times PCR PreMix 10 μ L, 上游引物、下游引物各 0.4 μ L, 去离子水 7.2 μ L)进行 Real-time PCR 检测,应用两步法反应程序,预变性 95°C 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 60 s,循环 44 次。扩增后得到各样本目的基因及内参基因 β -actin 的 C_q 值,目的基因 C_q 值-内参基因的 C_q 值= ΔC_q ,按照公式 $Q=2^{-\Delta C_q}$,得到每个目的基因的 Q 值及 Q 均值,即可获得 RQ 值,即各靶基因表达的相对定量值,用 RQ 值进行统计分析。引物由生工上海合成部合成。引物序列见表 1。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行分析,实验数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组数据分析前均进行正态性和方差齐性检验。若满足正态性和方差齐性,多组数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 检验;如果方差不齐,则使用 Games-Howell 检验; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 造模 3 d 后假手术组大鼠精神状态良好,饮食二便正常,体质量稳定,毛发光泽,行动自如灵敏,行为体征未见明显异常;模型组、Ani 组精神均明显较手术前差,进食量、饮水量均明显下降,体质量降低,毛色暗淡,自发性活动减少,对外界敏感性降低;中药组、SP 组和中药+SP 组较模型组和 Ani 组一般情况较好。

3.2 对大鼠神经功能缺损评分的影响 与假手术组比较,模型组评分明显升高($P<0.05$)。与模型组

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74
	下游 ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	
Beclin1	上游 AACTCTGGAGGTCTCGCTCT	131
	下游 CGCCTTAGACCCCTCCATTC	
LC3 I	上游 TTGGTCAAGATCATCCGGCG	172
	下游 CGAAGGTTTCTTGGGAGGCA	
LC3 II	上游 TGTTAAGCCCCTACCAAGGC	129
	下游 ATGGCACTCAGTTTCTGGCT	
p62	上游 ATGCCTTTGGCTTTTTCGCA	115
	下游 GGGAAAGTCCGCAAGTGTA	
Bcl-2	上游 CATGTGTGTGGAGAGCGTCA	71
	下游 ACTCAGTCATCCACAGAGCG	
Atg5	上游 CAGAAGCTGTTCCGTCCTGT	128
	下游 CCGTGAATCATCACCTGGCT	
JNK	上游 TCCAGTTCTCGTACCCGCTA	135
	下游 AGCATGGCGTGACACAGTAA	
c-Jun	上游 GCACATCACCCTACCCGA	110
	下游 TATGCAGTTCAGCTAGGGCG	

比较,中药组、SP 组与中药+SP 组大鼠神经功能缺损评分均明显降低($P<0.05$);与中药组及 SP 组比较, Ani 组神经功能评分明显升高($P<0.05$)。见表 1。

表 1 化浊解毒活血通络方对大鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

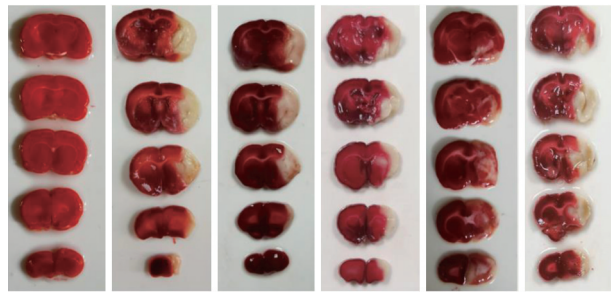
Table 1 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on neurological deficit score in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	神经功能评分/分
假手术组		0
模型组		3.13 \pm 0.64 ¹⁾
中药组	25.0	1.00 \pm 0.71 ²⁾
SP 组	0.005	1.63 \pm 0.74 ^{2,3)}
中药+SP 组	25.0+0.005	0.89 \pm 0.60 ^{2,4)}
Ani 组	0.015	3.00 \pm 0.76 ^{3,4)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与中药组比较³⁾ $P<0.05$;与 SP 组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表 2-表 5 同)

3.3 对大鼠脑梗死体积的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织梗死体积明显增加($P<0.05$);与模型组比较,中药组、SP 组和中药+SP 组大鼠脑组织梗死体积明显缩小($P<0.05$), Ani 组大鼠脑组织梗死体积明显增加($P<0.05$)。见图 1、表 2。

3.4 对大鼠脑组织病理的影响 假手术组大鼠脑组织细胞结构正常,无炎性水肿等病理改变。与



注:A.假手术组;B.模型组;C.中药组;D.SP组;E.中药+SP组;F.Ani组(图2-图5同)

图1 化浊解毒活血通络方对大鼠脑梗死体积的影响

Fig. 1 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on cerebral infarction volume in rats

表2 化浊解毒活血通络方对大鼠脑梗死体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on cerebral infarction volume in rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	脑梗死体积/%
假手术组		0
模型组		$19.73 \pm 0.13^{1)}$
中药组	25.0	$15.06 \pm 0.04^{2)}$
SP组	0.005	$16.77 \pm 0.13^{2)}$
中药+SP组	$25.0 + 0.005$	$10.12 \pm 0.20^{2,3,4)}$
Ani组	0.015	$27.88 \pm 0.01^{2,3,4)}$

假手术组比较,模型组大鼠大脑海马区及其周围脑组织形成典型梗死表现。神经元细胞变性、坏死、炎性浸润、核固缩,质呈空泡。与模型组比较,重要组、SP组和中药+SP组脑组织病理状态均有所改善,尤以中药组改善明,Ani组大鼠脑组织梗死区增加,神经元细胞坏死情况加重,炎性浸润明显。见图2。

3.5 对大鼠脑组织神经元形态和超微结构的影响

透射电镜下可见,假手术组细胞器正常,神经元细胞核正常,双层核膜清晰完整,未见自噬小体。MCAO/R组,线粒体严重肿胀,内质网明显扩张,高尔基体肿胀;细胞核核膜融合,异染色质增多,溶酶体、自噬小体、自噬溶酶体可见。中药组:线粒体嵴丰富,基本正常,内质网轻度扩张,高尔基体轻度肿胀,细胞核核膜轻度融合。SP组,线粒体嵴丰富,内质网少部分扩张,高尔基体轻微肿胀,细胞核核膜轻度融合。ANI组,神经元核膜融合、异型凸起,异染色质增多、边聚化,线粒体严重肿胀,内质网扩张,溶酶体增多,胞浆内囊泡增多,自噬小体和自噬溶酶体可见。见图3。

3.6 对大鼠脑神经细胞凋亡率的影响 与假手术

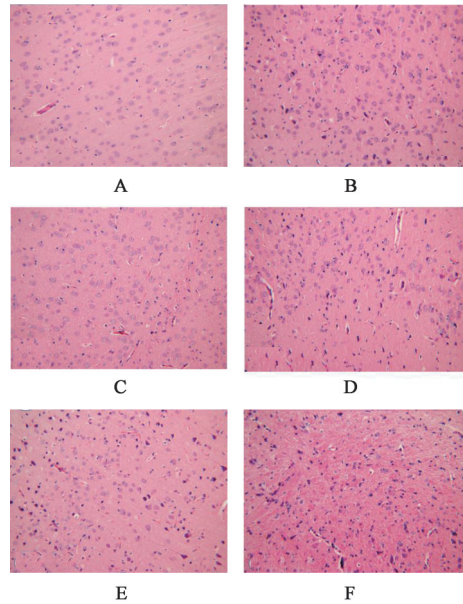


图2 化浊解毒活血通络方对大鼠脑组织病理的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on brain histopathology of rats (HE, $\times 200$)

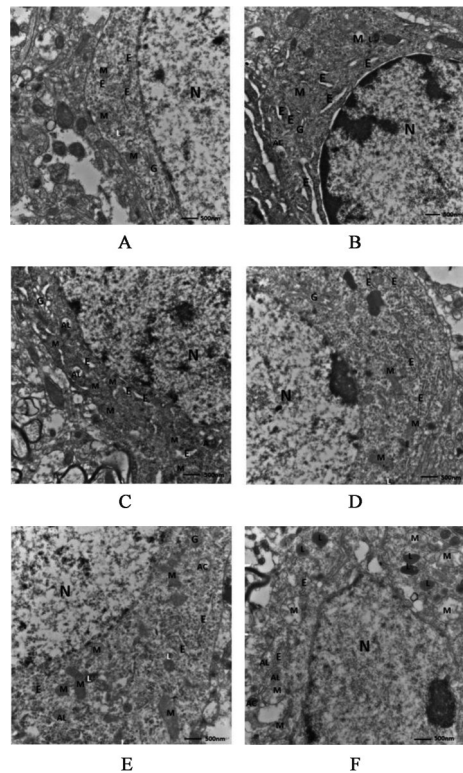


图3 化浊解毒活血通络方对大鼠脑组织神经元形态和超微结构的影响(透射电镜, $\times 25\ 000$)

Fig. 3 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on morphology and ultrastructure of neurons in rat brain tissue (transmission electron microscope, $\times 25\ 000$)

组比较,模型组 TUNEL 阳性细胞率明显增加 ($P < 0.05$),细胞凋亡情况较重。与模型组比较,中药组、SP组和中药+SP组阳性细胞明显减少 ($P < 0.05$),凋

亡情况有所减轻,尤以中药组最为显著;与中药组及SP组比较, Ani组阳性细胞明显增加($P<0.05$), 凋亡情况较重。见表3。

表3 化浊解毒活血通络方对大鼠脑神经细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on apoptosis rate of rat brain nerve cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	凋亡率/%
假手术组		2.00±1.00
模型组		33.00±6.08 ¹⁾
中药组	25.0	7.33±2.08 ²⁾
SP组	0.005	17.00±3.00 ^{2,3)}
中药+SP组	25.0+0.005	15.00±5.29 ^{2,3)}
Ani组	0.015	27.67±2.08 ^{3,4)}

3.7 对大鼠脑神经元及尼氏小体的影响 与假手术组比较,模型组神经元核膜和核仁模糊,突起不连续,胞质尼氏体浅色且数量减少。与模型组比较,中药组、SP组和中药+SP组脑组织神经元核仁、核膜可辨,胞浆尼氏体有一定程度的脱失,但较模型组明显减轻; Ani组尼氏小体数量明显减少,脱失较重,着色浅,核仁核膜模糊。见图4。

3.8 对大鼠脑组织 LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun 蛋白表达明显升高($P<0.05$), p62、Bcl-2 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,

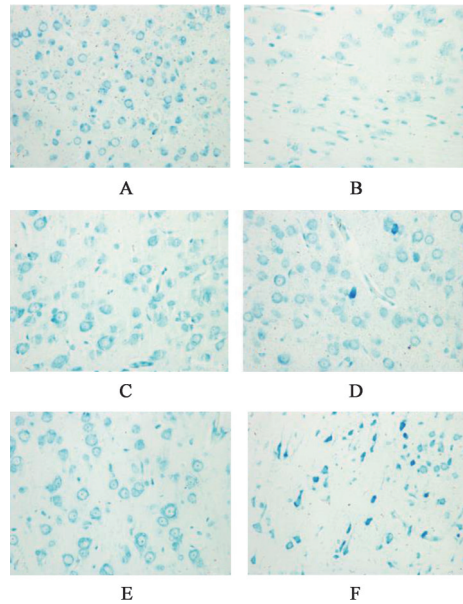


图4 化浊解毒活血通络方对大鼠脑神经元及尼氏小体的影响(尼氏染色, $\times 400$)

Fig. 4 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on brain neurons and Nicosia corpuscles in rats (Nissl staining, $\times 400$)

中药组、SP组和中药+SP组脑组织中 LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK 和 c-Jun 蛋白表达明显降低($P<0.05$), 中药组和 SP组 p62 蛋白表达明显升高($P<0.05$), 中药组和中药+SP组 Bcl-2 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。与 SP组和中药组比较, Ani组 LC3A/B、Beclin1、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun 蛋白表达明显升高($P<0.05$), p62、Bcl-2 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见表4、图5。

表4 化浊解毒活血通络方对大鼠脑组织 LC3A/B、Beclin1、p62、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on LC3A/B, Beclin1, p62, Atg5, Bcl-2, JNK, p-JNK, c-Jun protein expression in brain tissue of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $mg\cdot kg^{-1}$	LC3A/B	Beclin1/ β -actin	p62/ β -actin	Atg5/ β -actin
假手术组		0.33±0.19	0.38±0.08	0.77±0.11	0.30±0.06
模型组		0.88±0.16 ¹⁾	0.85±0.05 ¹⁾	0.29±0.08 ¹⁾	0.77±0.07 ¹⁾
中药组	25.0	0.56±0.15 ²⁾	0.55±0.13 ²⁾	0.50±0.11 ²⁾	0.41±0.06 ²⁾
SP组	0.005	0.52±0.34 ²⁾	0.52±0.20 ²⁾	0.50±0.10 ²⁾	0.54±0.11 ²⁾
中药+SP组	25.0+0.005	0.50±0.10 ²⁾	0.54±0.22 ²⁾	0.42±0.16	0.49±0.08 ²⁾
Ani组	0.015	0.96±0.16 ^{3,4)}	0.92±0.05 ^{3,4)}	0.18±0.02 ^{3,4)}	0.93±0.13 ^{3,4)}
组别	剂量/ $mg\cdot kg^{-1}$	Bcl-2/ β -actin	JNK/ β -actin	p-JNK/ β -actin	c-Jun/ β -actin
假手术组		0.95±0.14	0.26±0.12	0.78±0.12	0.22±0.07
模型组		0.46±0.13 ¹⁾	1.25±0.10 ¹⁾	0.83±0.20 ¹⁾	1.12±0.07 ¹⁾
中药组	25.0	0.74±0.04 ²⁾	0.83±0.17 ²⁾	0.54±0.04 ²⁾	0.61±0.29 ²⁾
SP组	0.005	0.62±0.08	0.80±0.19 ²⁾	0.57±0.04 ²⁾	0.62±0.21 ²⁾
中药+SP组	25.0+0.005	0.82±0.21 ²⁾	0.70±0.20 ²⁾	0.41±0.08 ²⁾	0.53±0.31 ²⁾
Ani组	0.015	0.36±0.16 ^{3,4)}	1.11±0.24 ^{3,4)}	0.84±0.11 ^{3,4)}	1.03±0.22 ^{3,4)}

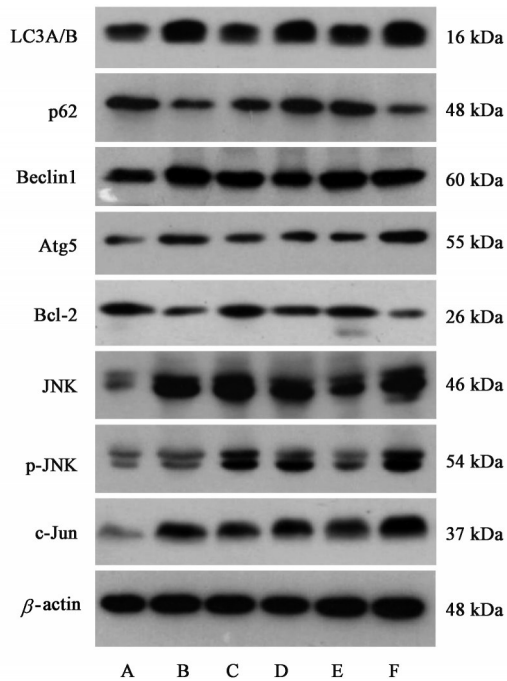


图5 大鼠脑组织 LC3A/B、Beclin1、p62、Atg5、JNK、p-JNK、c-Jun 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of LC3A/B, Beclin1, p62, Atg5, Bcl-2, JNK, p-JNK, c-Jun protein expression in brain tissue of rats

3.9 对大鼠脑组织 LC3A、LC3B、p62、Beclin1、Atg5、JNK、c-Jun mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 LC3A、LC3B、Beclin1、Atg5、JNK、c-Jun mRNA 表达明显增加($P<0.05$), p62、Bcl-2 mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,中药组、SP 组和中药+SP 组大鼠脑组织 LC3A、LC3B、Beclin1、Atg5、JNK、c-Jun mRNA 表达明显降低($P<0.05$), p62 mRNA 表达明显增加($P<0.05$);中药组和中药+SP 组 Bcl-2 mRNA 表达明显增加($P<0.05$);SP 组大鼠脑组织 Bcl-2 mRNA 表达有增加趋势,但差异无统计学意义;Ani 组 Atg5、c-Jun、JNK mRNA 表达增加($P<0.05$), Beclin1、p62、Bcl-2 mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。与中药组比较,SP 组和中药+SP 组大鼠脑组织 JNK mRNA 表达降低($P<0.05$); Ani 组 LC3A、LC3B、Atg5、c-Jun、JNK mRNA 表达增加($P<0.05$), Bcl-2 表达明显降低($P<0.05$)。与 SP 组比较, Ani 组 Atg5、c-Jun、JNK mRNA 表达明显升高($P<0.05$), Beclin1、p62、Bcl-2 mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。见表 5。

表5 化浊解毒活血通络方对大鼠脑组织 LC3A、LC3B、Beclin1、p62、Atg5、c-Jun、Bcl-2、JNK mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on expression of LC3A, LC3B, Beclin1, p62, Atg5, c-Jun, Bcl-2, JNK mRNA in brain tissue of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	LC3A	LC3B	Beclin1	p62
假手术组		0.85±0.08	0.87±0.10	0.89±0.16	1.15±0.21
模型组		1.23±0.10 ¹⁾	1.21±0.29 ¹⁾	1.23±0.21 ¹⁾	0.86±0.21 ¹⁾
中药组	25.0	1.02±0.14 ²⁾	1.11±0.14 ²⁾	1.03±0.20 ²⁾	1.07±0.13 ²⁾
SP 组	0.005	0.99±0.15 ²⁾	0.98±0.19 ²⁾	0.93±0.15 ²⁾	1.07±0.17 ²⁾
中药+SP 组	25.0+0.005	0.93±0.12 ²⁾	0.86±0.11 ²⁾	0.79±0.22 ²⁾	1.11±0.11 ²⁾
Ani 组	0.015	1.32±0.17 ^{3,4)}	1.30±0.14 ^{3,4)}	1.12±0.14 ²⁾	0.81±0.15 ^{2,4)}
组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Atg5	c-Jun	Bcl-2	JNK
假手术组		0.87±0.14	0.79±0.16	1.19±0.23	0.95±0.20
模型组		1.18±0.24 ¹⁾	1.31±0.27 ¹⁾	0.84±0.16 ¹⁾	1.21±0.21 ¹⁾
中药组	25.0	0.84±0.11 ²⁾	1.03±0.12 ²⁾	1.12±0.13 ²⁾	0.99±0.16 ²⁾
SP 组	0.005	0.93±0.14 ²⁾	0.91±0.09 ²⁾	0.97±0.22	0.77±0.08 ^{2,3)}
中药+SP 组	25.0+0.005	0.92±0.12 ²⁾	0.88±0.16 ²⁾	1.07±0.14 ²⁾	0.72±0.12 ^{2,3)}
Ani 组	0.015	1.36±0.10 ^{2,3,4)}	1.49±0.13 ^{2,3,4)}	0.64±0.16 ^{2,3,4)}	1.41±0.06 ^{2,3,4)}

4 讨论

细胞自噬在脑 CIRI 的发生发展过程中扮演了重要角色,适度的自噬作为一种自我修复机制,通过降解受损蛋白和细胞器为合成新的蛋白提供原料和能量,对组织细胞进行修复,有助于细胞的存活;然而,过度激活的自噬可能通过凋亡依赖性

或非凋亡依赖性途径促进神经元细胞死亡^[15]。目前,自噬在 CIRI 中发挥的作用尚无定论。如 WANG 等^[16]、CARLONI 等^[17]、SHENG 等^[18]分别研究均认为激活自噬或增强线粒体自噬能够缩小脑 CIRI 后梗死体积,减少神经元的死亡。也有一些研究表明自噬加重了脑缺血/再灌注(I/R)的损伤,而抑制自

噬可有效缩小脑梗死体积、降低神经功能学评分^[19-20]。本实验研究主要通过透射电镜及自噬标志物的检测观察细胞自噬的发生,研究发现模型组电镜下自噬小体、溶酶体可见,自噬蛋白 LC3A/B、Beclin1、Atg5 表达上调,p62 表达下降,都是自噬被激活的证据。LC3 是目前公认的自噬标志物,Beclin1 可以募集关键的自噬蛋白,并与其他蛋白协同调控自噬体的形成和成熟。Atg5 是一种自噬蛋白,存在于大多数真核生物中,可形成复合物 Atg12-Atg5-Atg16 与自噬小泡外膜结合,促进自噬小泡的延伸和扩张,促进 LC3 向自噬小泡的募集^[21-22]。p62 是一种典型的自噬受体,通过与 LC3 的相互作用将泛素化蛋白传递给 LC3,然后定位于自噬体,作为底物被降解,其蛋白表达水平与自噬水平呈负相关^[23-24]。

在本实验中,细胞自噬的激活被证实,然而调节自噬的信号通路仍不明确,参与的主要通路包括依赖哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路等,JNK 是 AMPK 的家族成员之一。JNK 是一种广泛存在于哺乳动物细胞中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞炎症反应、细胞凋亡、自噬、细胞增殖和分化中具有广泛的调节作用。研究证实,CIRI 中存在 JNK 信号通路的显著激活,给予 JNK 信号通路阻断剂 SP600125 后能够减少神经元的死亡而发挥神经保护作用。正常情况下,JNK 主要存在于胞质内,应激刺激后,其分子内的酪氨酸和苏氨酸残基的羟基侧链发生双重磷酸化,从而被激活,进而迅速转位进入核内,以核转位方式激活核内 mRNA 因子,包括 BECN1、c-Jun(即刻早期基因)、c-Fos 等,增加 Beclin1、c-Jun 的表达水平,促进自噬的发生。抗凋亡蛋白 Bcl-2 可与自噬相关蛋白 Beclin1 形成二聚体,使其不能发挥相应的功能而抑制自噬,磷酸化的 JNK 即 p-JNK 可使 Bcl-2 磷酸化并由此导致其与 Beclin1 解聚,从而促进自噬^[25]。JNK 已被证实可通过磷酸化 Bcl-2/Bcl-xL 来触发自噬^[26-27]。MILLER 等^[28]发现线粒体 JNK 的激活,可诱导自噬和凋亡,加重心肌 CIRI,使用 JNK 抑制剂 SP600125 抑制 JNK 激活可使梗死面积缩小。

浊毒蕴结脑络受损致血行不利是中风及中风后脑 CIRI 的病理根本。“浊毒”是指广义范围的浊毒,多由“风、火、痰、虚、气、瘀”等因素产生,既是病理产物,又是致病因素,大量聚集可进一步加重病情。中风的病位在脑,脑是元神之府,主宰人体的

一切生命活动,主神智和感觉运动。风邪、火邪上犯于脑,致脑络受损,络脉运行不畅或凝滞不行,或破溢出血,气血津液运行受阻,气血不畅,津液不行,化生为痰,脏腑虚衰,无力运化进一步加重痰浊,久之浊毒内生,形成瘀血,发为卒中。化浊解毒活血通络方是根据该病机所拟方剂,方中的石菖蒲、郁金、黄连共为君药,行醒神开窍,行气化痰,活血解毒之功;当归、川芎、赤芍、丹参、地龙共为臣药,行清热活血养血、熄风通络之功;茯苓、泽泻为佐药,健脾化湿,泄热利水通淋,宁心安神,两药相和,既健脾使湿浊无以生,又利水给邪以出路。此外,川芎味辛上行头目,为使药引药上行^[13]。

本研究项目发现,在脑 CIRI 发生的时候,模型组大鼠体质量降低,食欲不振,自主活动减少,出现感觉运动障碍,脑组织形态学改变严重,脑组织神经细胞自噬因子 LC3A/B、Beclin1、Atg5 均升高,p62 表达降低,电镜下自噬小体、溶酶体清晰可见,表明模型组大鼠的脑神经细胞自噬被激活,加重了 CIRI。给予中药干预的中药组自噬蛋白表达较模型组有所降低,形态学改变均有所改善,表明化浊解毒活血通络方可以降低 CIRI 后神经细胞自噬水平从而保护脑神经。通过设置 JNK 抑制剂组、JNK 抑制剂加中药组和 JNK 激活剂组发现,化浊解毒活血通络方干预后的 MCAO/R 大鼠,同给予 JNK 抑制剂 SP600125 具有非常类似的功效,与模型组相比,可有效抑制 JNK 的磷酸化,p-JNK 与 c-Jun 表达减少,抗凋亡因子 Bcl-2 增多,自噬因子 LC3A/B、Beclin1、Atg5 上调,p62 下调,提示化浊解毒活血通络方可通过抑制 JNK 信号通路抑制细胞自噬,发挥脑保护作用,为临床提供一定的理论依据。而在脑缺血过程中细胞凋亡与自噬的关系,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] VIRANI S S, ALONSO A, APARICIO H J, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: A report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2021, 143(8): e254-e743.
- [2] 佚名. 中国心血管健康与疾病报告(2019)节选二: 脑血管病[J]. 心脑血管病防治, 2020, 20(6): 544-552.
- [3] GOLDMAN S, PRIOR S M, BEMBENEK J P, et al. Activation of blood coagulation and thrombin generation in acute ischemic stroke treated with rtPA [J]. J Thromb Thrombolysis, 2017, 44(3): 362-370.

- [4] WANCHAO S, CHEN M, ZHIGUO S, et al. Protective effect and mechanism of *Lactobacillus* on cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(7): e7172.
- [5] LYU M, CUI Y, ZHAO T, et al. Tnfrsf12a-mediated atherosclerosis signaling and inflammatory response as a common protection mechanism of Shuxuening injection against both myocardial and cerebral ischemia-reperfusion injuries [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 312.
- [6] DIAZ-CAÑESTRO C, MERLINI M, BONETTI N R, et al. Sirtuin 5 as a novel target to blunt blood-brain barrier damage induced by cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 260: 148-155.
- [7] 霍瑞卿, 赵敏菡, 李芳钊, 等. 基于16S rRNA测序的肠道菌群探讨化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠脑-肠轴的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(1): 121-130.
- [8] 何鹤, 曾庆, 黄国志. 自噬——脑缺血中潜在的神经保护策略?[J]. *中国康复医学杂志*, 2018, 33(11): 1360-1365.
- [9] 李希, 万溪, 高晶晶, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠ZO-1和occludin表达的影响[J]. *环球中医药*, 2017, 10(7): 696-701.
- [10] 郭建文, 张晓云, 兰万成, 等. 陈绍宏教授“中风核心病机论”[J]. *天津中医药*, 2006, 23(1): 7-9.
- [11] 田军彪, 赵层闪, 高晶晶, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(9): 3341-3343.
- [12] 赵见文, 田军彪, 李佃贵, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤小鼠血清IL-6和TNF- α 水平的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2011, 33(7): 594-596.
- [13] 田军彪, 万溪, 高晶晶, 等. 化浊解毒活血通络方对大鼠脑缺血再灌注损伤后Bcl-2和Bax基因表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(6): 2727-2730.
- [14] 田军彪, 李希, 万溪, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠PKC δ 、PKC θ 和PKC ϵ 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(12): 2867-2870.
- [15] KRISHNA M, NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(22): 3525-3544.
- [16] WANG M, LI Y J, DING Y, et al. Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 932-943.
- [17] CARLONI S, BUONOCORE G, BALDUINI W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(3): 329-339.
- [18] SHENG R, ZHANG L S, HAN R, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning [J]. *Autophagy*, 2010, 6(4): 482-494.
- [19] WEN Y D, SHENG R, ZHANG L S, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways [J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 762-769.
- [20] SHI R, WENG J, ZHAO L, et al. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(3): 250-260.
- [21] XU J, KONG X, XIU H, et al. Combination of curcumin and vagus nerve stimulation attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced behavioral deficits [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 614-620.
- [22] CHEN Z H, CAO J F, ZHOU J S, et al. Interaction of caveolin-1 with Atg12-Atg5 system suppresses autophagy in lung epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(11): L1016-L1025.
- [23] NISHIDA K, KYOI S, YAMAGUCHI O, et al. The role of autophagy in the heart [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 31-38.
- [24] CHEN Y, LI Q, LI Q, et al. p62/SQSTM1, a central but unexploited target: Advances in its physiological/pathogenic functions and small molecular modulators [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(18): 10135-10157.
- [25] ZHOU Y Y, LI Y, JIANG W Q, et al. MAPK/JNK signalling: A potential autophagy regulation pathway [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(3): e00199.
- [26] SINHA S, LEVINE B. The autophagy effector Beclin1: A novel BH3-only protein [J]. *Oncogene*, 2008, 27Suppl 1(Suppl 1): S137-S148.
- [27] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(2): 520-534.
- [28] MILLER BRIAN C, ZIJIANG Z, STEPHENSON LINDA M, et al. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development [J]. *Autophagy*, 2008, 4(3): 309-314.

[责任编辑 王鑫]