

阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用及机制分析

龚婉^{1*}, 陈晓玲¹, 周莉², 章科娜¹

(1. 浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

[摘要] 目的: 观察阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。方法: 取 SD 雄性大鼠, 建立大脑中动脉阻塞(MCAO)致脑缺血/再灌注损伤模型, 造模成功的 36 只随机分成模型组, 阿魏酸钠低、中、高剂量组(25, 50, 100 mg·kg⁻¹), 并另取 9 只作为假手术组。采用神经功能评分法观察大鼠神经功能情况; 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠脑组织病理学形态变化; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清和脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-6(IL-6)含量变化; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缺血周边区核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)蛋白表达。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠神经行为学评分升高, 神经元坏死, 大量炎症细胞产生, 血清和脑组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平显著升高($P < 0.01$), 细胞核/细胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达比例显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿魏酸钠可明显降低脑损伤大鼠神经行为学评分($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抑制神经元坏死, 减少炎症细胞产生, 并可明显降低血清和脑组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抑制 NF- κ B p65 由细胞质向细胞核转位($P < 0.05$, $P < 0.01$), 最终减轻缺血再灌注造成的神经细胞炎症损伤。结论: 阿魏酸钠可通过抑制 NF- κ B p65 核转位减轻缺血再灌注大鼠脑神经细胞炎症反应, 维持脑部正常形态, 这可能是其发挥脑保护作用的机制之一。

[关键词] 阿魏酸钠; 脑缺血再灌注; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 白细胞介素-1 β (IL-1 β); 白细胞介素-6(IL-6); 核转录因子- κ B(NF- κ B)

[中图分类号] R285; R285.5; R743.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0094-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190341

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181115.1019.029.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 14:42

Protective Effect and Mechanism of Sodium Ferulate on Cerebral Ischemia-reperfusion Inflammatory Injury in Rats

GONG Wan^{1*}, CHEN Xiao-ling¹, ZHOU Li², ZHANG Ke-na¹

(1. College of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;
2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of sodium ferulate on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and to explore its possible mechanism. **Method:** The cerebral ischemia reperfusion injury model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in SD male rats. 36 modeled rats with neurologic damage were randomly divided into 4 groups: model group, low, medium, high-dose sodium ferulate groups (25, 50, 100 mg·kg⁻¹). Another nine rats were selected as a sham operation group. Neurological function was assessed by neurological scoring system in rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the pathological changes of the rats' brain. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in serum and brain tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the protein expression of nucleus and cytoplasm nuclear factor-kappa B

[收稿日期] 20180906(006)

[基金项目] 浙江中医药大学校级科研基金项目(2014ZY01); 浙江中医药大学基础医学院科研基金项目(JC201409)

[通信作者] * 龚婉, 硕士, 助理实验师, 从事中药药效物质基础研究, E-mail: gongw@zcmu.edu.cn

p65 (NF- κ B p65) in brain tissues. **Result:** As compared with normal group, neurological deficit score was increased; the neuronal necrosis and inflammatory cell number were present; the serum and brain tissue levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were increased; nucleus/cytoplasm NF- κ B p65 protein expression ratio was increased significantly in model group ($P < 0.01$). As compared with model group, sodium ferulate distinctly decreased the neurological deficit score ($P < 0.05$, $P < 0.01$), inhibited neuronal necrosis, reduce inflammatory cell number, significantly reduce the serum and brain tissue levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western blot showed that sodium ferulate could inhibit the nuclear translocation of NF- κ B p65 protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and finally, it can alleviate the inflammatory injury caused by ischemia reperfusion. **Conclusion:** Sodium ferulate protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury, and the mechanism may be related to inhibiting nuclear translocation of NF- κ B p65 protein to alleviate inflammatory response.

[Key words] sodium ferulate; cerebral ischemia reperfusion; tumor necrosis factor- α (TNF- α); interleukin-1 β (IL-1 β); interleukin-6 (IL-6); nuclear factor-kappa B (NF- κ B)

缺血性脑卒中是一类由于脑部血液供应不足引起脑缺血、缺氧,进而导致局限性脑组织缺血性坏死或脑软化的疾病^[1],约占脑血管疾病的 60% ~ 80%^[2],且发病率和致死率正逐年上升,已成为威胁人类健康的主要疾病之一。随着临床上溶栓治疗的开展,血流重建后脑组织缺血再灌注(IR)损伤日益引起人们的关注。已有大量研究表明,脑缺血/再灌注后释放大量炎症信号,介导大量炎性细胞的聚集和炎性因子的释放,进而加重脑组织的损伤^[3]。炎症反应是脑缺血/再灌注后脑组织继发性损伤的重要机制之一,其中包括转录因子的激活以及下游炎症因子的释放。核转录因子- κ B(NF- κ B)是关键的转录因子家族,参与多种炎症基因的转录调控,在脑损伤炎症反应中发挥重要作用^[4-5]。因此,抑制 NF- κ B 的活性,阻断脑缺血/再灌注后的炎症应答过程,对脑组织具有保护作用。

阿魏酸钠是阿魏酸的钠盐。阿魏酸属酚酸类化合物,是当归、川芎等常用中药的主要活性成分之一^[6-7]。现代药理研究表明,阿魏酸具有抗氧化、抑制血小板聚集、抑制血栓形成、抗炎等作用^[8]。由于它在空气中不稳定,临床常用其钠盐,主要用于心脑血管疾病、肾小球疾病、肺心病、糖尿病性血管病变等疾病的治疗。目前关于阿魏酸及其钠盐对缺血性脑损伤的作用机制研究主要集中在抗氧化、抑制凋亡、血管新生等方面^[9-11],而对缺血性脑损伤的抗炎作用鲜有文献报道。本实验旨在观察阿魏酸钠对大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型脑缺血/再灌注后炎症反应的影响,探讨其神经保护作用的机制,为临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,共 72 只,体质量

250 ~ 300 g,用于制备大鼠脑缺血模型,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心,温度为(22 ± 1) °C,相对湿度为 40% ~ 60%,自由进食和饮水,使用许可证号 SYXK(浙)2013-0184。本实验经过浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号 ZSLL-2017-021。

1.2 药物及试剂 阿魏酸钠(上海源叶生物科技有限公司,批号 H26M6L1);尼龙线(北京西浓科技有限公司,批号 2838-4A);大鼠肿瘤坏死因子(TNF)- α ,白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 EK0526, EK0393, EK0412);二奎琳甲酸法(BCA)蛋白定量试剂盒,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒,细胞核细胞浆蛋白提取试剂盒,鼠源单克隆抗体 β -肌动蛋白(β -actin),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G, ECL 显色液(碧云天生物技术公司,批号分别为 P0010S, P0012A, P0027, AF0003, A0216, P0018A);鼠源单克隆抗体组蛋白 H3(Histone H3),鼠源单克隆抗体 NF- κ B 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3638T, 6956T);苏木素染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号 717082);伊红染色液(国药集团化学试剂有限公司,批号 20140909)。

1.3 仪器 ST16R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司);HM315 型石蜡切片机(德国 Thermo 公司);BX51 型正置生物显微镜(日本 Olympus 公司);PT-3502G 型酶标仪(北京普天新桥技术有限公司);DYCZ-25D 型电泳仪, DYCZ-40G 型垂直电泳转膜仪(北京六一生物科技有限公司);720BR/01492

型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤模型制备 取 SD 雄性大鼠,采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞模型^[12]。经适应性喂养后,采用 10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠。取仰卧位固定,消毒,正中切口。先分离右侧颈总动脉,再分离颈外动脉及颈内动脉,结扎颈外动脉主干,在颈外动脉剪小口,将尼龙线的头端(光滑球形并涂有多聚赖氨酸)从切口轻轻插入颈内动脉,当尼龙线头端距颈总动脉分叉约 18~20 mm 处有轻微阻力时,结扎入口处,固定尼龙线。缺血 2 h 后将尼龙线小心拔出,实现再灌。假手术组尼龙线约插入 4 mm 左右。术中用白炽灯照动物,维持肛温在 37 ℃ 左右,术后将大鼠置于恒温箱中待其苏醒。

2.2 实验分组 大鼠苏醒后参照 Longa 评分法^[13],对神经功能损伤程度进行评价,1~3 分为造模成功,并随机分为模型组,阿魏酸钠低、中、高剂量组,每组 9 只。大鼠苏醒后立即尾静脉注射给药,参照参考文献^[14]的给药方法,阿魏酸钠低、中、高剂量组给药剂量分别为 25,50,100 mg·kg⁻¹,假手术和模型组大鼠注射同等体积的生理盐水,各组大鼠均每日给药 1 次,连续给药 7 d。于末次给药 24 h 后,每组实验动物麻醉,取血、脑,用于后续实验。

2.3 神经功能损伤评分 大鼠缺血再灌注损伤后第 1,3,7 天,按照随机盲法原则对大鼠进行神经功能损伤评分,Longa 5 分制标准为 0 分,无神经功能缺损症状;1 分,轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2 分,中度局灶性神经功能缺损,向左侧转圈,追尾;3 分,重度局灶性神经功能缺损,向左侧倾倒;4 分,不能自行行走,意识水平障碍^[13]。

2.4 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠脑组织病理学变化 大鼠脑缺血再灌注损伤后第 7 天行为学评价后,腹腔注射 10% 水合氯醛使其麻醉。先用预冷的生理盐水快速灌注心脏,清除血液,直至流出液体澄清。再用 4% 多聚甲醛灌注,待大鼠全身僵硬后,立即取出脑组织,于 4% 多聚甲醛中固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,在显微镜下观察各组大鼠大脑皮层神经细胞的形态结构变化及炎症损伤情况。

2.5 ELISA 检测大鼠血清和脑组织中 IL-1 β , TNF- α , IL-6 的含量 大鼠脑缺血再灌注损伤后第 7 天,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,腹腔静脉取血,室温静置 2 h 后,于 4 ℃ 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取

上清液。取适量缺血周边区脑组织于离心管中,用高速匀浆器进行匀浆,采用 BCA 法测定蛋白质含量。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清和脑组织匀浆中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的含量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脑组织 NF- κ B p65 蛋白的表达 大鼠脑缺血再灌注损伤后第 7 天,取适量缺血周边区脑组织于离心管中,用高速匀浆器进行匀浆,按照细胞核蛋白和细胞浆蛋白提取试剂盒说明提取细胞浆蛋白和细胞核蛋白,并采用 BCA 法测定样品蛋白质含量。将等量蛋白样品与上样缓冲液按比例混合,94 ℃ 水浴 10 min,使蛋白充分变性,采用 10% SDS-PAGE 进行电泳,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,室温下 10% 脱脂牛奶封闭 2 h,分别与 NF- κ B p65 单克隆抗体(1:1 000),Histone H3 单克隆抗体(1:1 000), β -actin 单克隆抗体(1:1 000),4 ℃ 共同孵育过夜,TBST 洗膜 10 min,共洗 3 次。用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2 000)室温孵育 1 h,洗膜,ECL 化学发光试剂盒在暗室中显色,并进行凝胶图像采集及分析。采用 Quantity One 软件分析条带相应的灰度值。

2.7 统计方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 阿魏酸钠对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的影响 与假手术组比较,脑缺血再灌注损伤后第 1 天,模型组大鼠即呈现出严重的神经功能缺失($P < 0.01$);与模型组比较,脑缺血再灌注损伤后第 3 天,阿魏酸钠高剂量组评分明显降低($P < 0.05$);损伤后第 7 天,阿魏酸钠中、高剂量组神经功能评分均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 缺血再灌注损伤大鼠神经功能损伤情况($\bar{x} \pm s, n = 9$)

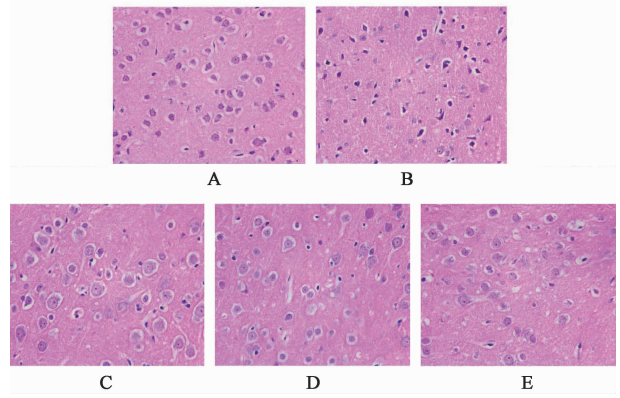
Table 1 Neurological deficit score of rats after ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第 1 天	第 3 天	第 7 天
假手术	-	0	0	0
模型	-	2.667 ± 0.500 ¹⁾	2.444 ± 0.527 ¹⁾	2.222 ± 0.441 ¹⁾
阿魏酸钠	25	2.556 ± 0.527	2.222 ± 0.441	1.778 ± 0.441
	50	2.444 ± 0.527	2.111 ± 0.601	1.556 ± 0.527 ²⁾
	100	2.222 ± 0.667	1.778 ± 0.441 ²⁾	1.111 ± 0.601 ³⁾

注:与假手术比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

3.2 阿魏酸钠对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理学的影响 脑缺血再灌注损伤后第 7 天, HE 染色结果显示, 假手术组神经元排列整齐, 细胞核大且清晰, 核仁完整, 细胞质丰富; 模型组大脑皮层梗死区和缺血周边区神经细胞排列紊乱, 稀疏, 核固缩, 核仁变小, 部分细胞变性坏死, 可见炎性细胞产生; 与模型组比较, 阿魏酸钠给药组神经细胞损伤程度明显减轻, 炎性细胞减少, 其中高剂量组效果最好。见图 1。

3.3 阿魏酸钠对脑缺血再灌注损伤大鼠血清和脑组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清和脑组织中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量均显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿魏酸钠中、高剂量组大鼠血清和脑组织中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 的含量明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2, 3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 阿魏酸钠低剂量组; D. 阿魏酸钠中剂量组; E. 阿魏酸钠高剂量组 (图 2 同)

图 1 阿魏酸钠对缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理形态学影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of sodium ferulate on pathomorphology of brain rats in tissues after cerebral ischemia-reperfusion (HE, $\times 400$)

表 2 阿魏酸钠对缺血再灌注损伤大鼠血清中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg \cdot kg $^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术	-	62.028 \pm 10.845	68.364 \pm 13.281	108.500 \pm 35.757
模型	-	260.500 \pm 27.255 ¹⁾	353.023 \pm 23.481 ¹⁾	669.125 \pm 44.496 ¹⁾
阿魏酸钠	25	217.375 \pm 20.937 ³⁾	338.136 \pm 18.674	623.500 \pm 42.088 ²⁾
	50	178.347 \pm 14.015 ³⁾	233.705 \pm 15.602 ³⁾	476.625 \pm 38.931 ³⁾
	100	153.278 \pm 16.798 ³⁾	190.636 \pm 19.607 ³⁾	419.438 \pm 49.442 ³⁾

表 3 阿魏酸钠对缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg \cdot kg $^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术	-	20.212 \pm 1.456	7.474 \pm 2.215	9.939 \pm 4.702
模型	-	36.752 \pm 2.490 ¹⁾	21.274 \pm 2.708 ¹⁾	28.667 \pm 4.760 ¹⁾
阿魏酸钠	25	31.655 \pm 2.165 ³⁾	17.431 \pm 1.705 ³⁾	24.366 \pm 3.643
	50	23.642 \pm 2.136 ³⁾	15.193 \pm 1.805 ³⁾	19.033 \pm 8.097 ²⁾
	100	20.871 \pm 2.393 ³⁾	13.747 \pm 1.399 ³⁾	17.890 \pm 4.874 ³⁾

3.4 阿魏酸钠对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白核转位的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血再灌注后细胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达下调, 核蛋白表达上调, 核浆比显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿魏酸钠高剂量组细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$), 阿魏酸钠中、高剂量组细胞核与细胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达比例明显下降 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 2。

4 讨论

目前脑缺血再灌注后的损伤机制尚未完全阐

明, 涉及到炎症反应、自由基过度生成、能量代谢障碍、细胞内钙超载、线粒体功能紊乱、兴奋性氨基酸毒性反应等^[15-16]。近年来, 许多研究提示炎症在缺血再灌注损伤的发生发展中起着关键性的作用^[3]。脑缺血再灌注时, 参与受损区域的炎症反应随即启动, 氧自由基等激活炎性细胞因子, 上调黏附分子, 导致白细胞黏附于血管内皮细胞, 从而阻塞微血管, 聚集的白细胞可释放自由基直接损伤内皮细胞, 破坏血脑屏障, 从而产生脑水肿, 造成神经元的损伤。同时, 白细胞激活后在微血管内聚集, 还可大量释放

表 4 阿魏酸钠对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of sodium ferulate on NF-κB p65 protein expression in ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	细胞核 NF-κB p65/Histone H3	细胞浆 NF-κB p65/β-actin	细胞核 NF-κB p65/细胞浆 NF-κB p65
假手术	-	0.384 ± 0.125	1.422 ± 0.215	0.271 ± 0.076
模型	-	0.704 ± 0.055 ¹⁾	0.772 ± 0.099 ²⁾	0.917 ± 0.074 ²⁾
阿魏酸钠	25	0.784 ± 0.227	0.919 ± 0.149	0.845 ± 0.139
	50	0.536 ± 0.169	1.180 ± 0.220 ³⁾	0.454 ± 0.131 ⁴⁾
	100	0.385 ± 0.101 ³⁾	1.172 ± 0.169 ³⁾	0.324 ± 0.039 ⁴⁾

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⁾ $P < 0.01$ 。

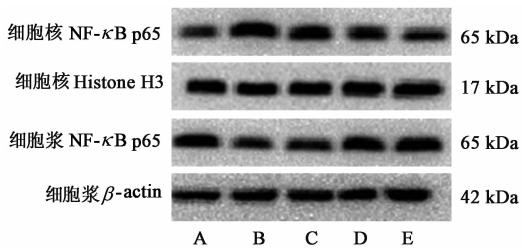


图 2 脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NF-κB p65 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of expression of NF-κB protein in ischemia-reperfusion rats

炎症细胞因子,如 IL-1β, IL-6, TNF-α 等,使更多的炎症细胞,如中性粒细胞, T 细胞,单核细胞,巨噬细胞等聚集到炎症反应部位,加重脑组织损伤^[17-18]。IL-1 在脑缺血区表达增加,尤以 IL-1β 表达较高,其对局部炎症和细胞损伤起重要作用,可加强白细胞浸润,加重局部炎症反应。TNF-α 是由单核细胞、巨噬细胞以及 T 细胞等分泌的前炎症细胞因子,参与机体炎症反应和免疫应答。IL-6 是具有多种生物活性的细胞因子,主要由单核巨噬细胞、血管内皮细胞、角质细胞等细胞产生,在免疫和炎症反应中发挥着重要作用^[19]。脑缺血再灌注损伤时,血脑屏障破坏,这些炎症因子可释放到血液中,产生炎症反应。

NF-κB 是由 p65 和 p50 两个亚基构成的同源或异源二聚体,可调控脑缺血再灌注损伤中涉及的多数黏附分子和细胞因子的转录^[20]。非活化状态的 NF-κB 主要存在于细胞浆中,与 IκB 聚合成三聚体。许多因素如细胞因子、炎症因子、钙超载等均可刺激 NF-κB 活化,通过多种不同的信号通路激活 NF-κB 诱导激酶(NIK)或途径中其他激酶,使 IκB 分子磷酸化,与 NF-κB 脱离,进而 NF-κB 活化发生核转位,与其靶基因的启动子或增强子结合,激活多种细胞因子的转录^[21]。脑缺血时 NF-κB 等转录因子激活,使脑组织中的炎症细胞迅速活化,炎症细胞因子

如 TNF-α, IL-6, IL-8, IL-1β 等大量表达,这些炎症细胞除了发挥吞噬作用、免疫作用,还向细胞外释放大量氧自由基、细胞因子、溶酶体酶等炎症介质,进一步加重缺血部位的损伤^[22-23]。

许多研究表明,阿魏酸钠具有抗炎作用。它可通过调节 ERK 信号通路抑制脂多糖刺激的小胶质细胞(BV2)活化,抑制神经性炎症^[24]。还可通过抑制 β 淀粉样蛋白 1-40 对神经细胞的毒性,使得胶质细胞合成的炎症细胞因子含量减少,进而减轻痴呆大脑组织中炎症的形成^[25]。有研究发现,阿魏酸可降低慢性轻度应激小鼠前额叶皮质促炎症因子 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 水平,抑制小胶质细胞活化,降低 NF-κB 的磷酸化以及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症体的表达,从而抑制神经炎症^[26]。

本研究发现,脑缺血再灌注损伤可引起神经元损伤坏死、炎症细胞增多,脑组织和血清中促炎症因子显著升高。阿魏酸钠给药后,神经功能显著改善,病理损伤明显减轻,炎症因子的释放显著减少。进一步研究发现大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织 NF-κB p65 亚基发生核转位, NF-κB 信号通路被活化。这一结果与脑缺血再灌注所致 TNF-α, IL-1β, IL-6 的上调具有同向变化趋势。阿魏酸钠给药后, NF-κB p65 核转位明显被抑制。

综上所述,阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,可能通过抑制 NF-κB 的活化,下调促炎症因子 TNF-α, IL-1β, IL-6 的表达,从而抑制炎症反应。

[参考文献]

[1] 陈丹丹,彭成,万峰,等. 氢溴酸樟柳碱对抗大鼠急性脑缺血/再灌注损伤的作用机制研究[J]. 中国药理学通报, 2017,33(8):1096-1102.
[2] 丁素菊,吴雄枫. 卒中中诊断治疗指南的缺陷——点

- 评《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》[J]. 医学与哲学(B), 2016, 37(6): 13-16.
- [3] CHEN Y K, ZHANG L, NI J S, et al. Ildt-8 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing post-stroke inflammation [J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131(2): 131-137.
- [4] 于凌志, 左艳丽, 贾孟辉, 等. 核转录因子 NF- κ B 对脑缺血再灌注干预机制的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21(7): 42-44.
- [5] 秦文熠, 荣晓凤, 陶涛, 等. 核转录因子- κ B 拮抗剂对大鼠海马 CA1 区局灶性脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(1): 45-53.
- [6] Ou S, Kwok K C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods [J]. J Sci Food Agric, 2004, 84(11): 1261-1269.
- [7] 管咏梅, 陶玲, 朱小芳, 等. 乳香没药挥发油对川芎中阿魏酸促透机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(17): 3350-3355.
- [8] Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 65(2): 185-195.
- [9] REN Z K, ZHANG R P, LI Y Y, et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Mol Med, 2017, 40(5): 1444-1456.
- [10] Koh P O. Ferulic acid attenuates the down-regulation of mek/erk/p90rsk signaling pathway in focal cerebral ischemic injury [J]. Neurosci Lett, 2015, 588: 18-23.
- [11] ZHANG Q, ZHAO Y H, XU Y H, et al. Sodium ferulate and n-butylidenephthalate combined with bone marrow stromal cells (BMSCs) improve the therapeutic effects of angiogenesis and neurogenesis after rat focal cerebral ischemia [J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 223-238.
- [12] Sasaki M, Honmou O, Kocsis J D. A rat middle cerebral artery occlusion model and intravenous cellular delivery [J]. Methods Mol Biol, 2009, 549: 187-195.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 李子广, 吴华璞, 郭梅, 等. 阿魏酸钠对 MCAO 大鼠缺血/再灌注损伤 p38MAPK 信号通路的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(2): 193-195.
- [15] TANG Q Q, HAN R D, XIAO H, et al. Protective effect of tanshinone IIA on the brain and its therapeutic time window in rat models of cerebral ischemia-reperfusion [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(5): 1616-1622.
- [16] 刘抒雯, 杨丽华, 马春, 等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 225-234.
- [17] Danton G H, Dietrich W D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127-136.
- [18] JIN R, YANG G, LI G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(5): 779-789.
- [19] 张予阳, 刘岩, 付守廷. 脑缺血与炎症反应 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 5-9.
- [20] Berti R, Williams A J, Moffett J R, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(9): 1068-1079.
- [21] 刘亭, 刘香香, 陈亭亭, 等. 灯盏细辛和赤芍配伍组方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对 NF- κ B 通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 111-115.
- [22] Stephenson D, YIN T, Smalstig E B, et al. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(3): 592-603.
- [23] TU X K, YANG W Z, CHEN J P, et al. Curcumin inhibits TLR2/4-NF- κ B signaling pathway and attenuates brain damage in permanent focal cerebral ischemia in rats [J]. Inflammation, 2014, 37(5): 1544-1551.
- [24] 吴建良, 沈敏敏, 杨水新, 等. 阿魏酸对小胶质细胞炎性反应的抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(1): 97-102.
- [25] 孟锐, 陈逸青, 陈勤. 阿魏酸对痴呆小鼠脑内胶质细胞活化与炎性细胞因子表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(1): 50-53.
- [26] LIU Y M, SHEN J D, XU L P, et al. Ferulic acid inhibits neuro-inflammation in mice exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 45: 128-134.

[责任编辑 孙丛丛]