

# 淫羊藿次苷 II 调节 miR-141-3p/Notch/Nrf2 轴对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能的改善作用研究<sup>Δ</sup>

高琛<sup>1\*</sup>, 支应鹏<sup>2#</sup> (1. 济南市中医医院脑病科, 济南 250012; 2. 济南市中医医院高血压科, 济南 250012)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)19-2386-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.19.15

**摘要** 目的: 研究淫羊藿次苷 II (ICS II) 通过调节微核糖核酸-141-3p/Notch 信号通路/核因子 E2 相关因子 2 (miR-141-3p/Notch/Nrf2) 轴对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能的改善作用。方法: 将大鼠分为假手术组、模型组、尼莫地平组 (20 mg/kg) 和 ICS II 低、中、高剂量组 (4、8、16 mg/kg), 每组 20 只。构建局灶性脑缺血大鼠模型 24 h 后, 分别灌胃生理盐水或相应药物, 每天 2 次, 连续给药 3 d。对各组大鼠神经功能缺损进行评分; 采用 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色法测定大鼠脑梗死体积; 测定大鼠脑组织含水量、血脑屏障通透性; 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察大鼠脑组织病理学变化; 采用实时荧光定量 PCR 法测定大鼠脑组织中 miR-141-3p 表达水平; 采用 Western blotting 法测定大鼠脑组织中 Notch、Nrf2 蛋白表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分和脑组织中 Notch-1、Nrf2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 脑梗死体积、脑组织含水量、血脑屏障通透性、miR-141-3p 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 脑皮质细胞分布杂乱, 可见大量神经细胞炎性浸润和坏死。与模型组比较, ICS II 各剂量组大鼠神经功能缺损评分和脑组织中 Notch-1、Nrf2 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 脑梗死体积、脑组织含水量、血脑屏障通透性、miR-141-3p 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 脑皮质细胞排列规则, 神经细胞炎性浸润和坏死数明显减少。结论: ICS II 能促进局灶性脑缺血模型大鼠神经功能的恢复, 这可能与下调 miR-141-3p 水平, 从而激活 Notch/Nrf2 轴有关。

**关键词** 淫羊藿次苷 II; 微核糖核酸-141-3p; Notch 信号通路; 核因子 E2 相关因子 2; 局灶性脑缺血模型; 大鼠

## Study on Improvement Effects of Icariside II on Neurological Function of Focal Cerebral Ischemia Model Rats by Regulating miR-141-3p/Notch/Nrf2 Axis

GAO Chen<sup>1</sup>, ZHI Yingpeng<sup>2</sup> (1. Dept. of Encephalopathy, Jinan Hospital of TCM, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Hypertension, Jinan Hospital of TCM, Jinan 250012, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improvement effects of icariside II (ICS II) on neurological function of focal cerebral ischemia model rats by regulating miR-141-3p/Notch/nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) axis (miR-141-3p/Notch/Nrf2). METHODS: The rats were divided into sham operation group, model group, nimodipine group (20 mg/kg) and ICS II low-dose, medium-dose and high-dose groups (4, 8, 16 mg/kg), with 20 rats in each group. Twenty-four hours after establishing

[3] 许利嘉, 马培, 肖伟, 等. 别样茶-藤茶的古今应用历史初步调查[J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 62-66.  
[4] HOU XL, TONG Q, WANG WQ, et al. Dihyromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways[J]. *Life Sci*, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.03.007.  
[5] 侯小龙, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(2): 603-609.  
[6] 付明, 黎晓英, 王登宇, 等. 显齿蛇葡萄叶中黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(7): 574-578.  
[7] 白秀秀, 夏广萍, 赵娜夏, 等. 张家界产莓茶中的酚性化学成分[J]. 中药材, 2013, 36(1): 65-67.  
[8] HOU W, HU SY, SU ZZ, et al. Myricetin attenuates LPS-

induced inflammation in RAW264.7 macrophages and mouse models[J]. *Future Med Chem*, 2018, 10(19): 2253-2264.  
[9] 周春权, 林静瑜, 姚欣, 等. 藤茶总黄酮体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国医药科学, 2012, 2(9): 50-51.  
[10] 蔡晓翠, 毛艳, 贺金华, 等. 新疆一枝蒿不同极性部位体外抗炎作用的谱-效关系分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1580-1589.  
[11] 梁健钦, 王剑, 熊万娜, 等. 基于灰色关联分析的芒果叶提取物抗炎作用的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 121-125.  
[12] 相美容, 王孝霞, 孙启慧, 等. 细辛不同极性部位 HPLC 指纹图谱与其镇痛抗炎活性的谱效关系研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(12): 2603-2607.  
[13] 孙振阳, 张景珍, 王思雨, 等. 基于灰色关联度法评价西红花饮片质量[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2430-2434.

(收稿日期: 2020-04-03 修回日期: 2020-08-05)

(编辑: 段思怡)

<sup>Δ</sup> 基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目 (No. 2019-0555)

\* 主治中医师, 硕士。研究方向: 中西医结合治疗脑病基础及临床。E-mail: 2713853661@qq.com

# 通信作者: 主治中医师, 硕士。研究方向: 中西医结合治疗心脑血管病基础及临床。E-mail: lishuming26@126.com

focal cerebral ischemia model, model rats were given relevant medicine or normal saline intragastrically, twice a day, for consecutive 3 d. The neurological deficit of rats in each group was scored; the volume of cerebral infarction was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; water content of cerebral tissue and the permeability of blood-brain barrier were measured; HE staining was performed to observe the pathological change of cerebral tissue of rats; the expression of miR-141-3p in cerebral tissue of rats was measured by qRT-PCR; the protein expression of Notch and Nrf2 in cerebral tissue of rats were measured by Western blotting assay. RESULTS: Compared with sham operation group, the neurological deficit score, expression of Notch-1 and Nrf2 in model group were significantly lowered ( $P<0.05$ ); infarction volume, brain water content, the permeability of blood-brain barrier and the expression of miR-141-3p in cerebral tissue were increased significantly ( $P<0.05$ ); the distribution of cortical cells was disordered, and inflammatory infiltration and necrosis were observed in a large number of nerve cells. Compared with model group, the neurological deficit score, the protein expression of Notch-1 and Nrf2 in cerebral tissue were significantly increased in ICS II groups ( $P<0.05$ ); infarction volume, brain water content, the permeability of blood-brain barrier and the expression of miR-141-3p in cerebral tissue were decreased significantly ( $P<0.05$ ); the arrangement of cortical cells was regular, and the inflammatory infiltration and necrosis of nerve cells were decreased significantly. CONCLUSIONS: ICS II can promote the recovery of neurological function in focal cerebral ischemic model rats, which may be related to down-regulation of miR-141-3p and activation of Notch/Nrf2 axis.

**KEYWORDS** Icariside II; miR-141-3p; Notch; Nuclear factor erythroid-2-related factor 2; Focal cerebral ischemia model; Rats

缺血性脑卒中是一种病因复杂、危害性大的脑血管疾病,临床表现为认知功能障碍、肢体残疾等症状,而且脑组织长期缺血缺氧还可引起永久性神经元凋亡和损伤,严重影响患者的生命健康和生活质量<sup>[1-2]</sup>。临床上治疗缺血性脑卒中常采用调节血压、调节血脂、抗血小板聚集、溶栓等方法,同时在该疾病早期进行神经保护也十分重要<sup>[3]</sup>。目前,采用中药治疗缺血性脑卒中已经成为研究热点,其中淫羊藿的主要活性成分淫羊藿次苷 II (Icariside II, ICS II)具有延缓衰老、抗疲劳、改善心脑血管功能、抗氧化等药理作用<sup>[4]</sup>。研究还发现,ICS II具有缓解大鼠脑缺血再灌注损伤的作用<sup>[5-6]</sup>。微核糖核酸-141-3p(miR-141-3p)是非编码微小RNA(miRNA),能够与目标mRNA的3'-非编码区域碱基互补配对结合,导致mRNA降解或翻译抑制<sup>[7]</sup>。Notch信号通路(Notch)与神经系统疾病密切相关,在血管发育、血管损伤修复及减轻炎症反应中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。核因子E2相关因子2(Nrf2)具有抗炎和抗氧化作用,研究发现,Notch-1能够靶向调控Nrf2的表达,进而参与抗氧化作用<sup>[9]</sup>。基于此,本研究通过构建局灶性脑缺血大鼠模型并使用ICS II进行干预,旨在从miR-141-3p/Notch/Nrf2轴探讨ICS II对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能的改善作用,为ICS II在临床上用于缺血性脑卒中的治疗提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ZF-388型全自动凝胶成像分析系统(深圳三利化学有限公司);CFX96型qRT-PCR扩增仪、Trans-Blot Turbo™型Western转膜仪、DDY-10型电泳仪、JS680D型凝胶成像仪、蛋白凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);HY704-4型双层烘箱(上海精密仪器仪表有限公司);UV-1800紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);AB204-A型电子分析天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];SMZ645型光学显微镜(日本Nikon公

司);KH19型台式高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

ICS II原料药(南京泽郎医药科技有限公司,批号:MH150601S02,纯度:98%);甲酰胺(上海麦克林生化科技有限公司,批号:F809511);RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号:DP430);逆转录试剂盒(美国Genecopoeia公司,批号:C0210B);ECL蛋白显色试剂盒(上海生工生物工程有限公司,批号:32109);兔抗鼠Notch-1单克隆抗体(美国Abcam公司,批号:EP1238Y);兔抗鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体(美国Sigma公司,批号:A5441);兔抗鼠Nrf2多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:BS-1074R);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG二抗(批号:873703275671)、伊文思蓝(EB)染色液(批号:DK0001)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号:C200201)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色液(批号:181532)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号:20170502)均购自北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水(三级)。

### 1.3 动物

SPF级雄性Wistar大鼠130只,7~8周龄,体质量220~250 g,购自四川大学实验动物中心[动物生产许可证号:SCXK(川)2018-026]。大鼠饲养于山东大学实验动物中心动物房屏障环境[动物使用许可证号:SYXK(鲁)2019-0005],室温为20~25℃,相对湿度为50%~60%,通风良好。大鼠自由进食饮水,适应性饲养1周后进行实验。实验严格遵循“3R”原则给予实验动物人道关怀。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

造模前大鼠均行神经功能评分(方法见“2.2”项),剔除异常大鼠后,采用文献方法<sup>[10]</sup>改良后构建局灶性脑缺

血大鼠模型:取110只大鼠进行造模,腹腔注射2%戊巴比妥钠以麻醉大鼠,固定,用手术剪剪开大鼠颈部皮肤,分离颈内、颈外、颈总动脉,结扎颈外动脉和颈总动脉的近心端,夹闭远端颈内动脉,用手术剪在距颈内动脉分叉1 cm处剪一切口,将头端涂上硅胶的尼龙线自大鼠左侧颈总动脉缓慢插入颈内动脉至线栓到达大脑中动脉分叉处(此时有少许阻力),固定线栓,缝合伤口,2 h后以抽回线栓恢复再灌注,大鼠造模完成。建模成功标准:进行提尾悬空实验时,即大鼠对侧肢体瘫痪、同侧眼裂减小、向对侧转弯。另取20只大鼠作为假手术组,除不结扎和插线外,其余操作步骤与上述方法相同。造模结束后,将造模成功的100只大鼠分为模型组、尼莫地平组(20 mg/kg)<sup>[11]</sup>和ICS II低、中、高剂量组(4、8、16 mg/kg)<sup>[6]</sup>,每组20只。造模24 h后,各给药组大鼠每天9:00和16:00时灌胃相应药物1次,每天2次,每次给药体积均为2 mL,连续给药3 d;假手术组和模型组大鼠同法灌胃等体积生理盐水。

## 2.2 大鼠神经功能缺损评分

在给药第0天(即造模后24 h后、给药前即刻)、给药第1天和第3天,根据文献方法<sup>[12]</sup>对各组大鼠进行神经功能缺损评分:从前肢对称外展(对称伸展3分、轻度不对称伸展2分、显著不对称伸展1分、偏瘫0分)、体态对称运动(对称运动3分、轻度不对称运动2分、显著不对称运动1分、偏瘫0分)、两侧身体触觉反射(双侧对称反应3分、一侧反应迟钝2分、一侧无反应1分)、自主活动(活动正常3分、轻度影响2分、重度影响1分、无自主运动0分)、触须对钝棒触及的反应(对称反应3分、不对称反应2分、一侧无反应1分)、攀爬(攀爬容易及抓持有有力3分、一侧损害表现2分、不能攀爬或转圈1分)等6个方面评估大鼠神经功能损伤的程度,总分值为3~18分,得分越高说明其神经功能损伤越小。

## 2.3 大鼠脑梗死体积测定

末次给药24 h后,各组随机选取5只大鼠,脱颈处死后取出脑组织,置于-20℃冰箱中冷冻30 min后切片,避光条件下放入含有TTC染色液的棕色瓶中,于37℃下染色30 min;染色后置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,以滤纸吸干后,置于显微镜下观察。镜下可见大鼠脑组织正常区域呈红色,梗死区域呈苍白色。采用Image Pro Plus 6.0软件计算各组大鼠脑组织的梗死体积。

## 2.4 大鼠脑组织含水量测定

末次给药24 h后,各组随机选取5只大鼠,脱颈处死后立刻手术开颅,取出脑组织,以滤纸吸干表面血迹,称定脑湿质量( $W$ );随后将脑组织置于80℃烘箱中,烘干至恒质量,称定其干质量( $D$ )。根据公式计算大鼠脑组织含水量:脑组织含水量(%)=( $W-D$ )/ $W$ ×100%。

## 2.5 大鼠血脑屏障通透性测定

末次给药24 h后,各组随机选取5只大鼠,采用2%

血-脑脊液屏障通透性示踪剂EB于大鼠尾静脉注射。2 h后,脱颈处死大鼠并开颅取脑组织,称定脑组织质量,随后置于含有甲酰胺(1 mL/100 g)的离心管中,37℃水浴48 h,以3 000 r/min离心10 min后,取上清液。使用分光光度计在635 nm波长处,测定上清液的吸光度。以EB含量( $\mu\text{g/g}$ )为横坐标、吸光度值为纵坐标,绘制EB标准曲线,并以标准曲线计算脑组织中EB含量。EB含量越高,表示大鼠血脑屏障的通透性越大。

## 2.6 大鼠脑组织的病理学变化观察

末次给药24 h后,各组取剩余5只大鼠,脱颈处死后立刻手术开颅,取出脑组织,一部分保存于-80℃的冰箱中待用,一部分用4%多聚甲醛溶液固定24 h。固定后的脑组织用石蜡包埋,切片,采用HE染色后,置于显微镜下观察脑组织病理学变化。

## 2.7 大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平检测

采用荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测。取出“2.6”项下冷冻的脑组织适量,采用RNA提取试剂盒提总RNA,再使用反转录试剂盒处理得到cDNA。用qRT-PCR仪测定miR-141-3p表达水平。反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):cDNA模板1  $\mu\text{L}$ ,上游引物0.5  $\mu\text{L}$ ,下游引物0.5  $\mu\text{L}$ , $\text{H}_2\text{O}$  8  $\mu\text{L}$ ,2×Mix 10  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性10 s,62℃退火30 s,78℃延伸30 s,45个循环;72℃再延伸5 min。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对miR-141-3p表达水平进行定量分析。使用在线软件Primer 5.0设计所得qRT-PCR所需引物,其中miR-141-3p上游引物序列为5'-TAA-CACTGTCTGGTAAAGATGG-3',下游引物序列为5'-ATCTTTACCAGACAGTGTATT-3',引物长度为60 bp;内参U6上游引物序列为5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3',下游引物序列为5'-GGAACGCTT-CACGAATTTG-3',引物长度为100 bp。

## 2.8 大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白相对表达水平检测

采用Western blotting法检测。取出“2.6”项下冷冻的脑组织适量,加入RIPA蛋白裂解液,研磨均匀,以3 000 r/min离心10 min后,取上清液,采用BCA法测定蛋白水平。蛋白煮沸变性后,取20  $\mu\text{g}$ ,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,湿法转膜,以5% BSA封闭结合位点,再分别加入Notch-1、Nrf2、 $\beta$ -actin一抗(1:2 000),4℃孵育过夜;加入HRP标记的羊抗兔IgG二抗(1:5 000),37℃孵育1 h,使用ECL蛋白显色试剂盒曝光显色后,于凝胶成像分析系统中观察拍照。使用软件Image Lab 5.1分析各蛋白条带灰度值,以 $\beta$ -actin为内参对照计算目标蛋白的相对灰度值,来表示其表达水平。

## 2.9 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间

两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

与假手术组比较,模型组、尼莫地平组、ICS II各剂量组大鼠神经功能缺损评分显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,给药第1、3天,除给药第1天时ICS II低剂量组外,ICS II各剂量组大鼠神经功能缺损评分均显著升高( $P < 0.05$ );ICS II高剂量组大鼠神经功能缺损评分与尼莫地平组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表1。

表1 各组大鼠神经功能缺损评分比较( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

Tab 1 Comparison of neurological deficit scores of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

组别	神经功能缺损评分,分		
	给药第0天	给药第1天	给药第3天
假手术组	18.00±0.00	18.00±0.00	18.00±0.00
模型组	8.26±1.29*	7.06±1.13*	5.27±1.22*
尼莫地平组	8.17±1.35*	9.47±1.58**	12.39±1.67**
ICS II低剂量组	8.21±1.28*	8.06±1.25* <sup>Δ</sup>	7.92±1.08** <sup>Δ</sup>
ICS II中剂量组	8.24±1.42*	8.73±1.29** <sup>Δ</sup>	9.54±1.46** <sup>Δ</sup>
ICS II高剂量组	8.16±1.54*	9.84±1.58**	12.84±1.55**

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与尼莫地平组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, \*\* $P < 0.05$ ; vs. nimodipine group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

#### 3.2 各组大鼠脑梗死体积比较

与假手术组比较,模型组、尼莫地平组、ICS II各剂量组大鼠脑梗死体积显著增大( $P < 0.05$ );与模型组比较,ICS II各剂量组大鼠脑梗死体积均有不同程度缩小,且ICS II中、高剂量组差异有统计学意义( $P < 0.05$ );ICS II高剂量组大鼠脑梗死体积与尼莫地平组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图1、表2。

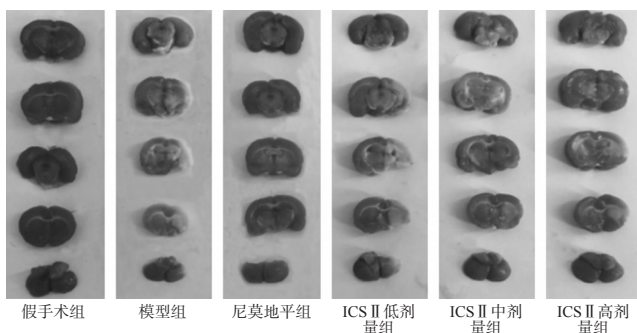


图1 各组大鼠脑梗死情况比较( $n=5$ )

Fig 1 Comparison of cerebral infarction of rats in each group( $n=5$ )

#### 3.3 各组大鼠脑组织含水量和血脑屏障通透性比较

与假手术组比较,模型组、尼莫地平组、ICS II各剂量组大鼠脑组织含水量和血脑屏障通透性均显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,ICS II各剂量组大鼠脑组织

含水量和血脑屏障通透性显著降低( $P < 0.05$ );ICS II高剂量组大鼠脑组织含水量和血脑屏障通透性与尼莫地平组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表3。

表2 各组大鼠脑梗死体积比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 Comparison of cerebral infarction volume of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	脑梗死体积,mm <sup>3</sup>	组别	脑梗死体积,mm <sup>3</sup>
假手术组	0.00±0.00	ICS II低剂量组	56.37±6.59** <sup>Δ</sup>
模型组	64.12±10.84*	ICS II中剂量组	39.64±8.49** <sup>Δ</sup>
尼莫地平组	22.36±5.28**	ICS II高剂量组	20.98±5.91**

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与尼莫地平组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, \*\* $P < 0.05$ ; vs. nimodipine group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

表3 各组大鼠脑组织含水量和血脑屏障通透性比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 3 Comparison of brain water content and blood-brain barrier permeability of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	脑组织含水量,%	脑组织EB含量,μg/g
假手术组	60.98±2.36	0.30±0.08
模型组	79.87±2.26*	0.98±0.12*
尼莫地平组	66.13±2.15**	0.43±0.15**
ICS II低剂量组	77.15±2.21** <sup>Δ</sup>	0.79±0.16** <sup>Δ</sup>
ICS II中剂量组	72.48±2.59** <sup>Δ</sup>	0.58±0.12** <sup>Δ</sup>
ICS II高剂量组	64.88±2.11**	0.40±0.13**

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与尼莫地平组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, \*\* $P < 0.05$ ; vs. nimodipine group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

#### 3.4 各组大鼠脑组织病理学变化比较

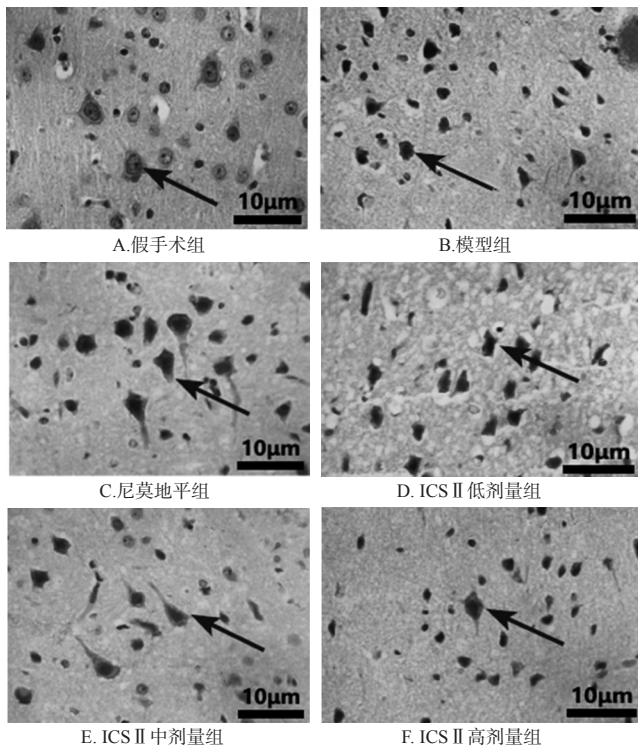
假手术组大鼠脑皮质细胞分布均匀,核仁可见、呈椭圆形、轮廓可辨,未见神经细胞炎性浸润或坏死;模型组可见脑皮质细胞分布杂乱,核仁固缩、破裂,可见大量神经细胞炎性浸润和坏死;ICS II各剂量组大鼠脑皮质细胞排列规则,核仁完整,神经细胞炎性浸润和坏死数减少,详见图2。

#### 3.5 各组大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平比较

与假手术组比较,模型组、尼莫地平组、ICS II各剂量组大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,ICS II各剂量组大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平显著降低( $P < 0.05$ );ICS II高剂量组大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平与尼莫地平组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表4。

#### 3.6 各组大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白表达水平比较

与假手术组比较,模型组、尼莫地平组、ICS II各剂量组大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,ICS II各剂量组大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ );



注:箭头表示核仁固缩  
Note: the arrows indicate nucleolar constriction

图2 各组大鼠脑组织病理学变化显微图(HE染色, ×200)

Fig 2 Micrograph of pathological change of cerebral tissue of rats in each group(HE staining, ×200)

表4 各组大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 4 Comparison of the expression of miR-141-3p in cerebral tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	miR-141-3p/U6	组别	miR-141-3p/U6
假手术组	1.04 ± 0.12	ICS II 低剂量组	2.25 ± 0.24 <sup>***Δ</sup>
模型组	2.47 ± 0.26*	ICS II 中剂量组	1.86 ± 0.19 <sup>***Δ</sup>
尼莫地平组	1.51 ± 0.15 <sup>**</sup>	ICS II 高剂量组	1.51 ± 0.17 <sup>**</sup>

注:与假手术组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与尼莫地平组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; vs. nimodipine group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

ICS II 高剂量组大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白表达水平与尼莫地平组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图3、表5。

#### 4 讨论

脑血管疾病是威胁人类生命健康的三大疾病之一,主要表现为缺血性脑卒中,其病因为脑动脉粥样硬化引起脑血栓、栓塞形成,使脑组织局部血液循环障碍,导致脑组织局部缺氧、缺血,诱发水肿、神经损伤等病变<sup>[13]</sup>。目前,中医药治疗缺血性脑卒中受到越来越多的关注,其中中药淫羊藿的主要活性成分ICS II对心脑血管系统疾病具有一定防治作用<sup>[4]</sup>。本研究通过构建局灶性脑缺

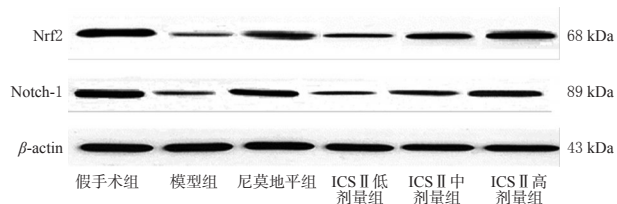


图3 各组大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白表达电泳图水平

Fig 3 Electrophoretogram of protein expression of Notch-1 and Nrf2 in cerebral tissue of rats in each group

表5 各组大鼠脑组织中Notch-1、Nrf2蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 5 Comparison of protein expression of Notch-1 and Nrf2 in cerebral tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	Notch-1	Nrf2
假手术组	1.13 ± 0.14	1.15 ± 0.15
模型组	0.31 ± 0.05*	0.27 ± 0.08*
尼莫地平组	0.82 ± 0.12 <sup>**</sup>	0.80 ± 0.16 <sup>**</sup>
ICS II 低剂量组	0.38 ± 0.08 <sup>***Δ</sup>	0.40 ± 0.09 <sup>***Δ</sup>
ICS II 中剂量组	0.52 ± 0.10 <sup>***Δ</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>***Δ</sup>
ICS II 高剂量组	0.85 ± 0.13 <sup>**</sup>	0.82 ± 0.15 <sup>**</sup>

注:与假手术组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与尼莫地平组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; vs. nimodipine group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

血大鼠模型,并使用ICS II进行干预,同时以急性缺血性脑卒中的常用治疗药物尼莫地平为阳性对照,探讨ICS II对缺血性脑卒中的作用及相关机制。

氧化应激损伤是造成缺血性脑卒中的主要因素,研究发现,ICS II能降低活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)的水平,提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性,从而抑制过氧化氢诱导的人神经母细胞瘤细胞凋亡<sup>[14]</sup>。此外,研究表明,ICS II能改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能评分,提高SOD活性,下调MDA水平,从而缓解大鼠的脑组织损伤<sup>[6]</sup>。另有研究发现,ICS II可通过下调海马体组织中β淀粉样蛋白1-42(Aβ<sub>1-42</sub>)的水平,上调微管相关蛋白1轻链3 II(LC3-II)/LC3-I的比值,以改善链簇佐菌素诱导的大鼠学习记忆减退症状<sup>[15]</sup>。本研究发现,与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分降低;脑梗死体积、脑组织含水量和血脑屏障通透性升高;脑皮质细胞分布杂乱以及大量神经细胞炎性浸润和坏死,说明模型大鼠出现脑组织损伤,具有缺血性脑卒中的症状。经ICS II干预后,大鼠神经功能缺损评分升高;脑梗死体积、脑组织含水量和血脑屏障通透性降低;脑皮质细胞排列规则,神经细胞炎性浸润和坏死数减少,说明ICS II能够促进大鼠神经功能恢复,改善缺血性脑卒中症状。

近年来研究发现,Nrf2是抗氧化应激的主要通路之一,柚皮素可能通过调控Nrf2通路,促进脑皮质神经元细胞增殖和抑制其凋亡,从而缓解氧化应激损伤<sup>[13]</sup>;另有研究发现,咖啡酸可降低海藻样ECH相关蛋白1(Keap1)的水平,激活Nrf2表达,从而导致抗氧化因子表达增加,降低对乙酰氨基酚诱导的肝毒性<sup>[16]</sup>。本研究发现,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中Nrf2蛋白表达水平降低,说明Nrf2与缺血性脑卒中密切相关;经ICS II干预后,大鼠脑组织中Nrf2蛋白表达水平显著升高,说明ICS II可上调Nrf2表达以缓解缺血性脑卒中的症状。研究发现,Notch和Nrf2相互关联,可以相互调节<sup>[17]</sup>;随后Yamaguchi M等<sup>[9]</sup>证明,Nrf2是Notch-1的下游调控因子。本研究发现,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中Notch-1蛋白表达水平显著降低,经ICS II干预后,大鼠脑组织中Notch-1蛋白表达水平显著升高,说明Notch-1与Nrf2可能存在一定的相关性,推测Notch-1可通过调控Nrf2水平参与缺血性脑卒中的进程。有研究发现,下调miR-141-3p水平可激活Notch/Nrf2轴,从而发挥抗氧化、抗炎、抗水肿等作用,减轻百草枯引起的急性肺损伤<sup>[18]</sup>。本研究同样发现,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平显著升高,说明miR-141-3p在缺血性脑卒中大鼠脑组织中呈现高表达,可促进缺血性脑卒中的发生、发展;经ICS II干预后,大鼠脑组织中miR-141-3p表达水平降低,提示miR-141-3p表达下调,可使Notch mRNA翻译能力减弱,导致Notch/Nrf2轴活化,从而缓解缺血性脑卒中症状,促进神经功能恢复。

综上所述,ICS II可缓解大鼠局灶性脑缺血症状,促进其神经功能恢复,这可能与下调miR-141-3p水平、激活Notch/Nrf2轴相关。但本研究未深入探讨miR-141-3p与Notch/Nrf2轴之间的具体调控机制,有待于后续研究加以完善。

## 参考文献

- [ 1 ] HASEGAWA Y, NAKAGAWA T, MATSUI K, et al. Renal denervation in the acute phase of ischemic stroke provides brain protection in hypertensive rats[J]. *Stroke*, 2017, 48(4): 1104-1107.
- [ 2 ] PIEROT L, GAWLITZA M, SOIZE S. Techniques for endovascular treatment of acute ischemic stroke[J]. *Rev Neurol: Paris*, 2017, 173(9): 594-599.
- [ 3 ] KAMAL N, JEERAKATHIL T, MRKLAS K, et al. Improving door-to-needle times in the treatment of acute ischemic stroke across a Canadian province: methodology[J]. *Crit Pathw Cardiol*, 2019, 18(1): 51-56.
- [ 4 ] 鞠静, 谭人千, 潘宇政. 淫羊藿次苷 II 的药理作用研究进展[J]. *中南药学*, 2019, 17(1): 65-69.
- [ 5 ] 马山, 麻培培, 谌文元, 等. 基于抗氧化作用的淫羊藿抗衰老药效研究[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(6): 836-840.
- [ 6 ] 龙隆, 徐应淑, 雷鸣, 等. 淫羊藿次苷 II 对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2017, 36(10): 598-602.
- [ 7 ] LIEP J, KILIC E, MEYER HA, et al. Cooperative effect of miR-141-3p and miR-145-5p in the regulation of targets in clear cell renal cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0157801.
- [ 8 ] BALAGANAPATHY P, BAIK SH, MALLILANKARAMAN K, et al. Interplay between Notch and p53 promotes neuronal cell death in ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(10): 1781-1795.
- [ 9 ] YAMAGUCHI M, MURAKAMI S, YONEDA T, et al. Evidence of Notch-Hesr-Nrf2 axis in muscle stem cells, but absence of Nrf2 has no effect on their quiescent and undifferentiated state[J]. *PLoS One*, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0138517.
- [ 10 ] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [ 11 ] 李艳, 宋亚刚, 苗明三, 等. 月季花总黄酮对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12): 64-70.
- [ 12 ] GARCIA JH, WAGNER S, LIU KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-635.
- [ 13 ] KWAK KA, KWON HB, LEE JW, et al. Current perspectives regarding stem cell-based therapy for ischemic stroke[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(28): 3332-3340.
- [ 14 ] 高健美, 雷鸣, 令狐浪, 等. 基于ROS/GSK-3 $\beta$ 信号通路研究淫羊藿次苷 II 对过氧化氢诱导的SH-SY5Y细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(5): 23-27.
- [ 15 ] 邓媛媛, 李安霞, 尹彩霞, 等. 淫羊藿次苷 II 通过诱导自噬改善链脲佐菌素所致的大鼠学习记忆减退[J]. *中国新药与临床杂志*, 2017, 36(6): 347-352.
- [ 16 ] HUA K, SHENG X, LI TT, et al. The edaravone and 3-n-butylphthalide ring-opening derivative 10b effectively attenuates cerebral ischemia injury in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(8): 917-927.
- [ 17 ] WAKABAYASHI N, CHARTOUMPEKIS DV, KENSLER TW. Crosstalk between Nrf2 and Notch signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88(Pt B): 158-167.
- [ 18 ] JIN Y, LIU W, LIU X, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells attenuated paraquat-induced acute lung injury via miR-141-3p-Notch-Nrf2 axis[J]. *Cell Biosci*, 2018. DOI: 10.1186/s13578-018-0219-1.

(收稿日期:2020-01-14 修回日期:2020-09-07)

(编辑:罗 瑞)