

李佳娜,郭苏兰,肖水秀. 莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能的保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 84-89.

Li JN, Guo SL, Xiao SX. Protective effects of curdione on cognitive and neurological function in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 84-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.02.013

莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能的保护作用研究

李佳娜,郭苏兰,肖水秀*

(深圳市龙华区中心医院,广东 深圳 518110)

【摘要】 目的 探讨莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能、神经功能及作用机制。**方法** 使用线栓法建立小鼠脑缺血再灌注损伤模型,低分子肝素钠组、莪术二酮低、高剂量组和造模后分别灌胃给药 1 mg/(kg·d), 20 mg/(kg·d), 60 mg/(kg·d), 观察各组小鼠 Morris 水迷宫实验、行为学评分、脑梗死率、脑组织水含量,测定血清 6-keto-PGF1 α 和 6-keto-PGF1 α /TXB2 比值,脑组织匀浆 cAMP 和 p-CREB 的表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,站台穿越次数明显减少 ($P<0.01$),行为学评分、脑梗死率、脑组织水含量、血清 TXB2 含量明显升高 ($P<0.01$),血清 6-keto-PGF1 α 、6-keto-PGF1 α /TXB2 比值、脑组织匀浆 cAMP、p-CREB 明显降低 ($P<0.01$);与模型组比较,莪术二酮给药组逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.05$),站台穿越次数明显增加 ($P<0.05$),行为学评分、脑梗死率和脑组织水含量明显降低 ($P<0.05$),血清 TXB2 含量明显降低 ($P<0.01$),血清 6-keto-PGF1 α 、6-keto-PGF1 α /TXB2 比值、脑组织匀浆 cAMP、p-CREB 明显升高 ($P<0.05$),且呈剂量依赖性。**结论** 莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能有较好的保护作用,其机制可能改善微循环障碍以及激活 cAMP/CREB/BDNF 信号通路有关。

【关键词】 莪术二酮;脑缺血再灌注损伤;cAMP/CREB/BDNF 信号通路;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 02-0084-06

Protective effects of curdione on cognitive and neurological function in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury

LI Jiana, GUO Sulan, XIAO Shuixiu*

(Central Hospitol of Longhua District of Shenzhen City, Shenzhen 518110, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of curdione on cognitive and neurological function in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** A middle cerebral artery occlusion mouse model was developed using middle cerebral artery embolization (equivalent normal saline; model group; 20). Mice received the following treatments: low-molecular-weight heparin sodium [1 mg/(kg·d); HS group; 20], low-dose curdione [20 mg/(kg·d); CD-L group; 20] or high-dose curdione [60 mg/(kg·d); CD-H group; 20]. We observed changes in behavioral evaluation, Morris water maze, cerebral infarction volume and cerebral water content, and measured the content of 6-keto prostaglandin F1 α (6-keto PGF1 α), thromboxane B2 (TXB2), 6-keto-PGF1 α /TXB2 in serum, and cAMP and p-CREB in brain homogenates. **Results** Compared with the sham operation group, the escape latency in the model group was

[作者简介] 李佳娜 (1989—) 女, 学士, 主治医师, 研究方向: 脑血管疾病。E-mail: 3031524325@ qq.com

[通信作者] 肖水秀 (1989—) 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 脑血管疾病。E-mail: 542124116@ qq.com

significantly increased. Number of passes through the platform was obviously reduced ($P < 0.01$). Behavioral evaluation, cerebral infarction volume, and content of cerebral water(%) and TXB2(pg/mL) were obviously increased. The content of 6-keto-PGF1 α , 6-keto-PGF1 α /TXB2 ratios, cAMP and p-CREB were all significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the escape latency in the CD-L and CD-H group was significantly decreased. The numbers of passing through the platform were obviously increased ($P < 0.05$). Behavioral evaluation, cerebral infarction volume, the content of cerebral water and TXB2 were obviously decreased. The content of 6-keto-PGF1 α , 6-keto-PGF1 α /TXB2 ratios, cAMP and p-CREB were significantly decreased ($P < 0.05$), and appeared dose-dependent. **Conclusions** Curdione had a protective effect on cognitive function and neurological function in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury. Its mechanism may be related to the reduction of TXB2, the increment of 6-keto-PGF1 α , 6-keto-PGF1 α /TXB2 ratio, cAMP and p-CREB, thereby improving microcirculation disorders in cerebral ischemia reperfusion injury in a manner involving activation of the cAMP/CREB/BDNF signaling pathway.

[Keywords] curdione; cerebral ischemia-reperfusion injury; cAMP/CREB/BDNF signaling pathway; mice

缺血性脑病是由于脑局部供血不足或中断而引起的脑组织局灶性损伤。缺血性脑病具有高发病率、高致残率和高死亡率的特点,严重危害着人们的健康^[1-2]。临床上治疗时,往往通过药物溶栓或其它手术方法实现血管再通,然而会进一步引发脑缺血再灌注损伤^[3]。目前,脑缺血再灌注损伤机制尚不明确,但有研究表明脑缺血再灌注损伤期间,血液系统有促凝倾向^[4],有研究发现抗凝药物对脑缺血再灌注损伤有较好的保护作用,但由于有严重的出血副作用,限制了临床应用^[5-6]。因此,寻找有抗凝作用和出血副作用小的抗脑缺血再灌注损伤新药具有重要意义。

广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)为姜科姜黄属植物广西莪术的干燥根茎,是广西的道地药材^[7]。莪术二酮是广西莪术的主要有效成分之一,具有明显抗血小板、抗炎和抗肿瘤作用等药理作用^[8-9]。关于莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能的作用未见相关研究报道。因此,本研究旨在探讨莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能的保护作用,为莪术二酮的进一步研究开发提供部分实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 2 月龄 C57BL/c 小鼠 100 只,雌雄各半,体重为 18~22 g,购买于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2016-0002]。动物饲养于广东省实验动物监测所 SPF 级屏障动物实验设施进行[SYXK(粤)2016-0122],实验动物的使用过程中严格遵守 3R 原则,并得到了广东省实验动物监测所实验动物伦理委员会的批准(伦理审批号:2016005)。

1.2 主要试剂与仪器

莪术二酮(纯度 $\geq 98\%$,批号:13657-68-6)购于成都格利普生物科技有限公司;依诺肝素钠注射液(批号:20170321)购于法国 Sanofi 公司;血栓素 B2(TXB2) ELISA 试剂盒(批号:20170214)购于南京建成生物工程研究所;6-酮-前列腺素 F1 α (6-keto-PGF1 α) ELISA 试剂盒(批号:20170313)购于南京建成生物工程研究所;一抗 cAMP(货号 AB:26657,批号:20161204)和一抗 p-CREB(货号 AB:26321,批号:20170121)购于上海碧云天生物技术有限公司。

BW-MWM101morris 水迷宫:上海软隆科技发展有限公司;550 酶标测定仪:日本 Bio-red 公司;LG10-2.4 A 型超速离心机:北京医用离心机厂;DGG-9070B 电热鼓风干燥箱:上海森信实验仪器有限公司;体式显微镜:深圳市西派克光学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠脑缺血再灌注损伤模型

小鼠按体重随机分为假手术组(20)、模型组(20)、低分子肝素钠组(HS 组,20)、莪术二酮低剂量组(CD-L 组,20)和莪术二酮高剂量组(CD-H 组,20)。各组小鼠于造模当天连续灌胃给药 5 d,HS 组小鼠灌胃给药 1 mg/(kg·d),CD-L 组和 CD-H 组小鼠分别灌胃给药 20 mg/(kg·d),60 mg/(kg·d),假手术组和模型组小鼠灌胃给予等量生理盐水。参照文献方法^[10]进行造模。主要方法如下:4%戊巴比妥钠麻醉小鼠,将小鼠仰卧固定于 37℃ 手术台,剃去颈部毛发,用碘伏消毒液消毒颈部皮肤,小心暴露和分离颈部左侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,先结扎颈外动脉远端,于颈外动脉远心端剪一小口,将尼龙线由颈外动脉剪口处插入,稍遇阻力停止推进并固定栓线。缺血 30 min,拔出尼龙线,

完成再灌注,建立小鼠 MCAO 模型。

1.3.2 小鼠神经功能学评分

造模 24 h 后,参照 Longa 等^[11] 5 分制法进行行为学评分。评分方法如下:无精神损伤症状记为 0 分;未能完全伸展对侧前爪记为 1 分;向对侧转圈记为 2 分;向对侧倾倒记为 3 分;不能自发行走,意识丧失记为 4 分,其中 0 分视为造模不成功,剔除。

1.3.3 小鼠 Morris 水迷宫实验

参考文献^[12] 的实验方法,具体实验分为定位航行实验和空间探索实验两部分,定位航行实验:每次实验将小鼠分别从 1、2、4 象限中点放入水池,记录小鼠找到平台的时间,即潜伏期,假如小鼠在 1 min 内还没找到平台,需引导小鼠到平台上停留 20 s,并记录其潜伏期按 1 min,连续 4 d。第 5 天撤掉平台,进行空间探索实验,记录小鼠 60 s 内通过平台的次数以及分析小鼠寻找平台的策略。

1.3.4 小鼠脑梗死体积测定

小鼠取血后,颈椎脱臼处死小鼠,开颅取脑,生理盐水冲洗干净,-20℃ 冰箱内冰冻 30 min,从额极向枕极方向把脑组织作冠状切片,厚度为 2 mm,共 4 片,1% TTC 染液 37℃ 并避光孵育 30 min,扫描仪扫描,使用 Image-Pro Plus 图像分析处理软件计算和统计脑梗死率,其中脑梗死率=梗死面积/总面积×100%。

1.3.5 脑水含量测定

小鼠开颅取脑后,生理盐水冲洗干净,滤纸吸干表面水分,准确称量为湿重,将脑组织放入恒温干燥箱(105℃)烤 48 h,称取脑组织为干重,脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.6 血清 6-keto-PGF1α 和 TXB2 含量测定

各组小鼠取血,4℃ 放置 3 h,3000 r/min,离心 30 min。吸取上层血清,按照试剂盒说明书步骤检测血清 6-keto-PGF1α 和 TXB2 含量。

1.3.7 脑组织匀浆 cAMP 和 p-CREB 的表达

BCA 试剂盒检测脑组织匀浆总蛋白浓度,加入等量样品于电泳槽进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。经过转膜、封闭、孵育 cAMP(1:2000)、p-CREB(1:1500)一抗过夜;洗膜、孵育二抗(1:8000)、洗膜、显影,使用 Image J 软件半定量分析各条带灰度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据进行方差齐性分析,多组间均数比较采用单因素方差分析(one way ANOVA)和 LSD 检验,计量资料用平

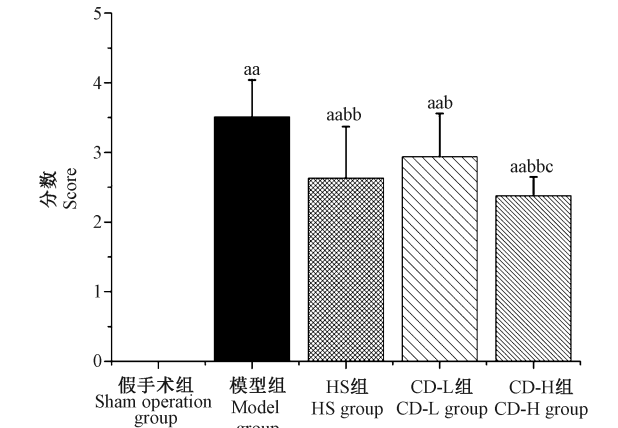
均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 莪术二酮对 MCAO 小鼠行为学评分的影响

与假手术组比较,模型组、HS 组和 CD 给药组小鼠行为学分数明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,HS 组和 CD 给药组行为学分数明显降低($P<0.05$)。与 CD-L 组比较,CD-H 组小鼠行为学分数明显降低($P<0.05$),见图 1。

与假手术组比较,模型组、HS 组和 CD 给药组小鼠行为学分数明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,HS 组和 CD 给药组行为学分数明显降低($P<0.05$)。与 CD-L 组比较,CD-H 组小鼠行为学分数明显降低($P<0.05$)。



注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$;与 CD-L 组比较,^c $P<0.05$,^{cc} $P<0.01$ 。

图 1 行为学评分结果($\bar{x} \pm s$)
Note. Compared with sham operation group,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$. Compared with model group,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$. Compared with CD-L group,^c $P<0.05$,^{cc} $P<0.01$.

Figure 1 Results of behavioral evaluation

2.2 莪术二酮对 MCAO 小鼠学习记忆能力的影响

与假手术组比较,模型组小鼠寻找到平台的潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越平台所在位置的次数显著减少($P<0.01$),探索策略也多采用趋向式。与模型组比较,HS 组和 CD 给药组小鼠找到平台的潜伏期均显著降低($P<0.05$),穿越平台所在位置的次数显著增多($P<0.05$),探索策略也多采用直线式。与 CD-L 组比较,CD-H 组小鼠找到平台的潜伏期均显著降低($P<0.05$),穿越平台所在位置的次数显著增多($P<0.05$),见表 1 和表 2。

2.3 莪术二酮对 MCAO 小鼠梗死率和脑水含量的影响

与假手术组比较,模型组小鼠脑梗死率和脑含水量明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,HS 组和 CD 给药组小鼠脑梗死率和脑含水量明显降低($P<0.05$)。与 CD-L 组比较,CD-H 组小鼠脑梗死率和脑含水量明显降低($P<0.05$),见图 2 和表 3。

2.4 莪术二酮对 MCAO 小鼠血清 6-keto-PGF1 α 和 TXB2 含量的影响

与假手术组比较,模型组小鼠血清 TXB2 含量明显升高($P<0.01$), 6-keto-PGF1 α 和 6-keto-PGF1 α /TXB2 含量明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,HS 组和 CD 给药组小鼠血清 TXB2 含量明显降低($P<0.05$), 6-keto-PGF1 α 和 6-keto-PGF1 α /TXB2 含量明显升高($P<0.05$)。与 CD-L 组比较,CD-H 组小鼠血清 TXB2 含量明显降低($P<0.05$), 6-keto-PGF1 α 和 6-keto-PGF1 α /TXB2 含量明显升高($P<0.05$),见表 4。

表 1 各组小鼠潜伏期结果($\bar{x}\pm s, n=20$)
Table 1 Results of escape latency of mice in various group

组别 Groups	潜伏期(s)Escape latency			
	第 1 天 Day1	第 2 天 Day2	第 3 天 Day3	第 4 天 Day4
假手术组 Sham operation group	34.7 $\pm$ 3.6	30.6 $\pm$ 2.8	22.5 $\pm$ 3.3	10.0 $\pm$ 0.6
模型组 Model group	43.5 $\pm$ 4.1 ^{aa}	40.4 $\pm$ 3.2 ^{aa}	33.3 $\pm$ 3.6 ^{aa}	18.3 $\pm$ 0.6 ^{aa}
HS 组 HS group	38.2 $\pm$ 4.1 ^{abb}	35.5 $\pm$ 3.4 ^{aab}	27.5 $\pm$ 2.7 ^{aab}	14.4 $\pm$ 0.7 ^{abb}
CD-L 组 CD-Lgroup	40.8 $\pm$ 3.8 ^{aab}	37.2 $\pm$ 2.4 ^{aab}	29.6 $\pm$ 4.5 ^{aab}	16.7 $\pm$ 1.2 ^{aab}
CD-H 组 CD-H group	37.5 $\pm$ 3.7 ^{abbc}	34.3 $\pm$ 4.4 ^{abbc}	26.5 $\pm$ 3.3 ^{abbc}	13.3 $\pm$ 0.8 ^{abbc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$;与 CD-L 组比较,^c $P<0.05$,^{cc} $P<0.01$ 。
Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with model group, ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$. Compared with CD-L group, ^c $P<0.05$, ^{cc} $P<0.01$.

表 2 各组小鼠空间探索能力结果($\bar{x}\pm s, n=20$)
Table 2 Results of space exploration capability of mice in various group

组别 Groups	穿越平台次数 Crossing platform times	探索策略选择 Exploration strategy selection	
		直线式 Linear	趋向式 Tendency
假手术组 Sham operation group	8.3 $\pm$ 1.2	9	1
模型组 Model group	4.6 $\pm$ 0.8 ^{aa}	2	8
HS 组 HS group	6.4 $\pm$ 0.9 ^{abbc}	7	3
CD-L 组 CD-L group	5.5 $\pm$ 0.8 ^{aab}	4	6
CD-H 组 CD-H group	7.6 $\pm$ 1.1 ^{abbc}	7	3

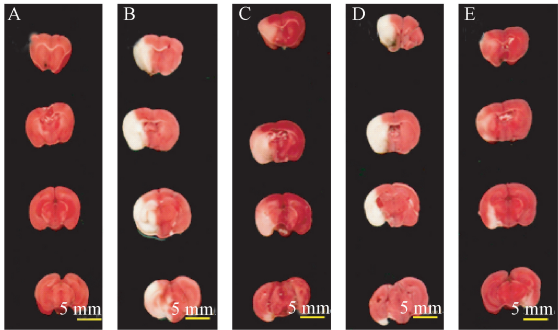
注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$;与 CD-L 组比较,^c $P<0.05$,^{cc} $P<0.01$ 。
Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with model group, ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$. Compared with CD-L group, ^c $P<0.05$, ^{cc} $P<0.01$.

表 3 脑梗死率和脑水含量结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Results of cerebral infarction rate and cerebral water content

组别 Groups	脑梗死率(%) Cerebral infarction	脑组织含水量(%) Cerebral water content
假手术组 Sham operation group	0 $\pm$ 0	0.12 $\pm$ 0.011
模型组 Model group	42.33 $\pm$ 5.43 ^{aa}	1.35 $\pm$ 0.12 ^{aa}
HS 组 HS group	25.42 $\pm$ 2.32 ^{aabb}	0.63 $\pm$ 0.17 ^{aabb}
CD-L 组 CD-L group	30.65 $\pm$ 3.41 ^{aab}	0.86 $\pm$ 0.12 ^{aab}
CD-H 组 CD-H group	12.58 $\pm$ 1.89 ^{aabbc}	0.42 $\pm$ 0.16 ^{aabbc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$;与 CD-L 组比较,^c $P<0.05$,^{cc} $P<0.01$ 。
Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with model group, ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$. Compared with CD-L group, ^c $P<0.05$, ^{cc} $P<0.01$.



注:A:假手术组;B:模型组;C:HS 组;D:CD-L 组;E:CD-H 组。TTC 染色

图 2 脑梗死体积观察

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, HS group. D, CD-L group. E, CD-H group. TTC staining

Figure 2 Observation of cerebral infarction volume

2.5 莪术二酮对 MCAO 小鼠脑组织匀浆 cAMP 和 p-CREB 表达的影响

与假手术组比较,模型组小鼠脑匀浆 cAMP 和 p-CREB 表达明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,HS 组和 CD 给药组小鼠脑匀浆 cAMP 和 p-CREB 表达明显升高($P<0.05$)。与 CD-L 组比较,CD-H 组小鼠脑匀浆 cAMP 和 p-CREB 表达($P<0.05$),见图 3。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤常常会导致不可逆的脑组织损伤,进而引起运动、认知等方面的脑功能损伤。脑缺血再灌注损伤发病机制复杂,目前尚未完全阐明,可能与氧化应激、内质网应激、自噬、细胞凋亡等密切相关^[13]。但近年来研究发现脑缺血再灌注损伤常常可引起脑组织微循环障碍,通过抗凝药物防治具有较好的改善作用^[14]。低分子量肝素钠是一种新型的抗凝血酶Ⅲ依赖性抗血栓形成药,药理作用与普通肝素钠基本相似。但其抗凝出血倾向较弱,使用相对安全,临床上可用于孕妇抗血栓防治^[15],故本实验选用低分子量肝素钠作为阳性对照药。莪术二酮是广西莪术的主要有效成分之一,药理学研究发现其具有明显抗血小板、抗炎和抗肿瘤

作用等药理作用。此外,石红等^[9]研究发现莪术二酮可显著改善老年小鼠部分肝切除术后认知功能障碍,其机制可能与其通过抑制海马组织中氧化应激,抑制 NF- κ B 激活,减少炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的释放有关。那么莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能是否有较好的保护作用?这是本文章重点探讨的问题。

脑缺血再灌注损伤常会引起运动功能损伤,Longa 5 分制法评分主要用于评价小鼠的运动功能。本研究发现模型组小鼠的行为学分数较假手术组有明显升高,差异具有统计学意义。而给与莪术二酮后,小鼠行为学分数明显降低,差异具有统计学意义,且具有剂量依赖性,提示莪术二酮可明显改善 MCAO 小鼠运动能力。Morris 水迷宫是评价学习、记忆能力等认知能力的经典方法^[16]。本研究发现模型组小鼠潜伏期较假手术组明显延长,穿越平台所在位置的次数明显减少,多采用趋向式的探索策略,差异具有统计学意义。提示模型组小鼠的认知能力受到损害,而 CD 给药组小鼠上述指标较模型组明显改善,呈剂量依赖性,提示莪术二酮可明显改善 MCAO 的认知能力。脑梗死率和脑组织病理学变化是评价模型成功和药物有效的最直接简便的观察方法^[17]。本研究发现模型组小鼠脑梗死

表 4 血清 6-keto-PGF1 α 和 TXB2 含量结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Content of 6-keto-PGF1 α and TXB2 in serum

组别 Groups	血栓素 B2 (pg/mL) TXB2	6-酮-前列腺素 1 α (pg/mL) 6-keto-PGF1 α	血栓素 B2/6-酮-前列腺素 1 α 6-keto-PGF1 α /TXB2
假手术组 Sham operation group	257.42 $\pm$ 42.21	354.22 $\pm$ 62.76	1.37 $\pm$ 0.13
模型组 Model group	415.65 $\pm$ 65.87 ^{aa}	216.63 $\pm$ 43.79 ^{aa}	0.52 $\pm$ 0.02 ^{aa}
HS 组 HS group	325.73 $\pm$ 52.36 ^{aabbc}	304.32 $\pm$ 57.21 ^{aabbc}	0.94 $\pm$ 0.11 ^{aabb}
CD-L 组 CD-L group	372.42 $\pm$ 63.13 ^{aab}	285.75 $\pm$ 37.86 ^{aabb}	0.77 $\pm$ 0.10 ^{aab}
CD-H 组 CD-H group	312.58 $\pm$ 51.27 ^{abbc}	322.31 $\pm$ 63.63 ^{abbc}	1.03 $\pm$ 0.16 ^{aabbc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$;与 CD-L 组比较,^c $P<0.05$,^{cc} $P<0.01$ 。
Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with model group, ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$. Compared with CD-L group, ^c $P<0.05$, ^{cc} $P<0.01$.

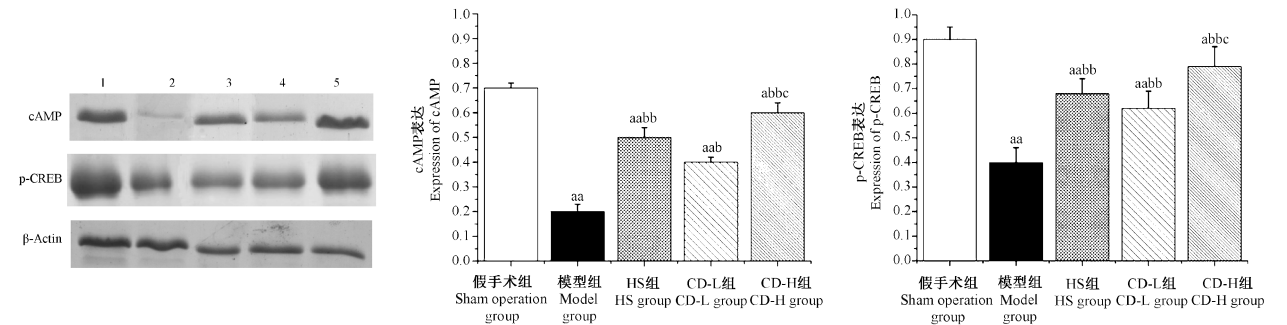


图 3 各组小鼠脑组织匀浆 cAMP 和 p-CREB Western blot 电泳图

Note. 1, Sham operation group. 2, Model group. 3, HS group. 4, CD-L group. 5, CD-H group. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with model group, ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$. Compared with CD-L group, ^c $P<0.05$, ^{cc} $P<0.01$.

Figure 3 Western blot electrophoresis of cAMP and p-CREB in brain tissue homogenization of various groups

率较假手术组明显升高,脑海马齿状回神经细胞损伤严重,差异具有统计学意义,提示造模成功。而给与莪术二酮后,小鼠脑梗死率明显降低,脑海马齿状回神经细胞损伤明显改善,差异具有统计学意义,具有剂量依赖性。提示莪术二酮可明显改善 MCAO 小鼠神经细胞的坏死。有研究表明脑水肿是脑缺血性疾病功能障碍的主要原因,也称为该疾病最严重的并发症^[18]。本研究发现模型组小鼠脑含水量较假手术组明显升高,差异具有统计学意义。而给与莪术二酮后,小鼠脑含水量明显降低,差异具有统计学意义,具有剂量依赖性。提示莪术二酮可明显减轻 MCAO 小鼠脑水肿程度。TXB2 和 6-keto-PGF1 α 反映机体的凝血功能的两个指标。它们分别是 TXA2 和 PGI2 的代谢产物, TXB2 和 6-keto-PGF1 α 的含量检测可间接反映血液 TXA2 和 PGI2 的水平,而调节 6-keto-PGF1 α /TXB2 比值对血栓形成有重要影响^[19]。本研究发现模型组小鼠血清 TXB2 含量较假手术组明显升高,而 6-keto-PGF1 α 和 6-keto-PGF1 α /TXB2 含量明显降低差异具有统计学意义。而给与莪术二酮后,小鼠血清 TXB2 含量明显降低, 6-keto-PGF1 α 和 6-keto-PGF1 α /TXB2 含量明显升高,差异具有统计学意义,具有剂量依赖性,提示莪术二酮可抑制血小板聚集,从而改善 MCAO 小鼠微循环障碍。研究发现^[20-21] cAMP/CREB/BDNF 信号通路是中枢神经维持正常生理和促进神经细胞存活、再生以及分化等有关,与学习记忆能力的形成也有密切的关系。莪术二酮给药组可明显升高 cAMP 和 CREB 的表达水平,提示莪术二酮可能通过促进神经细胞存活、再生、分化,从而保护小鼠的认知功能。

综上所述,莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能有较好的保护作用,其机制可能与降低 TXB2 含量,升高 6-keto-PGF1 α 、6-keto-PGF1 α /TXB2 比值, cAMP 和 CREB 的水平,从而改善 MCAO 小鼠微循环障碍以及激活 cAMP/CREB/BDNF 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Wang X, Cheng JL, Ran YC, et al. Expression of RGMb in brain tissue of MCAO rats and its relationship with axonal regeneration [J]. J Neurol Sci, 2017, 383: 79-86.
- [2] Bano S, Chaudhary V, Garga UC. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A radiological review [J]. J Pediatr Neurosci, 2017, 12(1): 1-6.
- [3] Wang LY, Liu J, Li Y, et al. Time-dependent variation of pathways and networks in a 24-hour window after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. BMC Syst Biol, 2015, 9(1): 11-12.
- [4] Wu YM, Zhai YD, Zhou YT, et al. Protection of Shuxuetong

- combined with aspirin against cerebral ischemia/reperfusion injury through ameliorating coagulation and fibrinolysis system [J]. Chin Herb Med, 2018(10): 134-136.
- [5] Mocco J, Shelton CE, Sergot P, et al. O-desulfated heparin improves outcome after rat cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neurosurgery, 2007, 61(6): 1297-1303.
- [6] Imai T, Takagi T, Kitashoji A, et al. Nrf2 activator ameliorates hemorrhagic transformation in focal cerebral ischemia under warfarin anticoagulation [J]. Neurobiol Dis, 2016, 89: 136-146.
- [7] 吴庆华,黄宝优. 广西莪术栽培研究概述 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(6): 83-86.
- [8] 王秀. 莪术二酮抗血栓和抗血小板聚集作用研究 [D]. 安徽: 安徽医科大学, 2012.
- [9] 石红, 石磊, 李建雄. 莪术二酮对肝部分切除老年小鼠术后认知功能和海马区炎症因子表达的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(5): 749-752.
- [10] 李少金, 方婉仙, 肖水秀, 等. 鱼腥草挥发油对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. 天津中医药, 2018, 35(4): 297-301.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [12] Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124521.
- [13] 郭敏敏, 蔡乐, 王勇. 脑缺血再灌注损伤发病机制的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(30): 80-81.
- [14] 顾小飞, 李恒, 杨桐桦, 等. 低分子肝素通过促进 SUMO2/3 蛋白的表达及核转移对脑缺血再灌注大鼠发挥脑保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(11): 1123-1129.
- [15] 张敏. 低分子肝素的药理作用和临床应用研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(82): 38-39.
- [16] Ahmadi M, Rajaei Z, Hadjzadeh M A, et al. Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats [J]. Neurosci Lett, 2017, 642: 1-6.
- [17] Rousselet E, Kriz J, Seidah N G. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining [J]. J Vis Exp, 2012, 6(69): 4038.
- [18] Nakano T, Nishigami C, Irie K, et al. Goreisan prevents brain edema after cerebral ischemic stroke by inhibiting aquaporin 4 upregulation in mice [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(3): 758-763.
- [19] Kasimu R, Wang X, Wang X, et al. Antithrombotic effects and related mechanisms of Salvia deserta Schang root EtOAc extracts [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17753.
- [20] Lee Y, Kim J, Jang S, et al. Administration of phytoceramide enhances memory and upregulates the expression of pCREB and BDNF in hippocampus of mice [J]. Biomol Ther (Seoul), 2013, 21(3): 229-233.
- [21] Wang C, Guo J, Guo R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 73.