

清热化痰方对脑缺血再灌注大鼠脑组织氧化应激反应的影响及机制^{*}

秦红玲 农必华 卢健锋 林荣清 李晓琼 杨璧璘 胡跃强

(广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023)

【摘要】 目的 探讨清热化痰方对脑缺血再灌注(I/R)大鼠脑组织氧化应激反应的影响及其作用机制。方法 32 只 SD 大鼠分为正常组、假手术组、模型组及清热化痰方组 4 组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组均采用线栓法进行处理; 大鼠造模后正常饲养, 自由饮水; 清热化痰方组给予清热化痰方(1.4 mL/100 g, bid)灌胃, 其余各组均给予等体积生理盐水灌胃, 4 天后处死。采用 RT-qPCR、Western blot 和 ELISA 法分别检测缺血灶脑组织中 miR-18a-3p 表达、Keap1、Nox-2、Nox-4、HO-1、SOD2 mRNA 和蛋白表达、Nrf2 核转位及 ROS 水平。双荧光素酶报告基因检测 miR-18a-3p 与 Keap1 的相互作用。结果 与正常组相比, 模型组缺血灶脑组织中 miR-18a-3p、HO-1、SOD2 表达及 Nrf2 核转位显著降低, Nox-2、Nox-4、Keap1 表达及 ROS 水平显著升高(均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 清热化痰方组缺血灶脑组织中 miR-18a-3p、HO-1、SOD2 表达及 Nrf2 核转位显著升高, Nox-2、Nox-4、Keap1 表达和 ROS 水平显著降低(均 $P < 0.05$); 假手术组与正常组的检测结果比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。双荧光素酶报告基因检测结果证实, miR-18a-3p 靶向 Keap1 基因的 3'UTR。结论 清热化痰方可抑制脑缺血再灌注大鼠脑组织氧化应激反应, 其机制可能与促进缺血灶脑组织 miR-18a-3p 表达, 进而抑制 Keap1 表达, 促进 Nrf2 核转位有关。

【关键词】 清热化痰方; 缺血性脑卒中; Keap1; Nrf2; miR-18a-3p; ROS

【中图分类号】 R285 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 03. 004

The effect and mechanism of Qingre Huayu Decoction on oxidative stress in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

QIN Hongling, NONG Bihua, LU Jianfeng, LIN Rongqing, LI Xiaoqiong, YANG Bilin, HU Yueqiang

(The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of Qingre Huayu prescription on oxidative stress in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (I/R) and further explore its mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group and Qingre Huayu prescription group, with 8 rats in each group. Except for the normal group, all the other groups were treated by suture method. The rats were fed normally and drank freely after modeling. The Qingre Huayu prescription group was given the Qingre Huayu prescription (1.4 mL/100g, bid, i. g.), and the other groups were given the same volume of normal saline by gavage, and were killed after 4 days. The expression of miR-18a-3p, Keap1, Nox-2, Nox-4, HO-1, SOD2 mRNA and protein, Nrf2 nuclear translocation and ROS levels in ischemic brain tissue were observed by RT-qPCR, Western blot and ELISA separately. The interaction between miR-18a-3p and Keap1 was detected by the double luciferase reporter gene. **Results** As compared with the normal group, the expressions of miR-18a-3p, HO-1, SOD2 and Nrf2 nuclear translocation in ischemic brain tissues of the model group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expressions of Nox-2, Nox-4, Keap1 and ROS levels

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81704034); 2020 广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划(桂教人才[2020]6 号); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才培养项目(2018003); 广西中医药大学第一附属医院学术团队建设(院字[2018]146 号); 广西医学高层次骨干人才培养“139”计划(桂卫科教发[2018]22 号)

通信作者: 胡跃强, 博士研究生导师, E-mail: shitousay1111@tom.com

引用本文: 秦红玲, 农必华, 卢健锋, 等. 清热化痰方对脑缺血再灌注大鼠脑组织氧化应激反应的影响及机制[J]. 西部医学, 2022, 34(3): 328-334. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 03. 004

were significantly increased ($P < 0.05$). As compared with the model group, the expressions of miR-18a-3p, HO-1, SOD2 and Nrf2 nuclear translocation in the ischemic brain tissues of the Qingre Huayu prescription group were significantly increased ($P < 0.05$), and the expressions of Nox-2, Nox-4, Keap1 and ROS levels were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the results between the sham operation group and the normal group ($P > 0.05$). The results of dual luciferase reporter gene testing confirmed that miR-18a-3p targets the 3' UTR of Keap1 gene. **Conclusion** Qingre Huayu prescription can inhibit the oxidative stress response in brain tissues of cerebral I/R rats, and the mechanism may be related to promoting the expression of miR-18a-3p in ischemic brain tissues, thereby inhibiting the expression of Keap1 and promoting the nuclear translocation of Nrf2.

【Key words】 Qingre Huayu prescription; Cerebral ischemic stroke; Keap1; Nrf2; miR-18a-3p; ROS

缺血性脑卒中(Cerebral ischemic stroke, CIS)是多因素所致的脑组织血液供应障碍性疾病。目前早期恢复血液供应是急性 CIS 治疗的目标,但它进一步加重了由于缺血再灌注(Ischemia/reperfusion, I/R)引起的神经元损伤^[1]。氧化应激是脑 I/R 损伤的主要机制,开发具有抗氧化作用的神经保护剂是治疗 CIS 的有效策略。清热化痰方是本课题组研制的中药复方,主要用于治疗脑梗死^[2],具有解毒、化痰祛瘀之功效。前期研究证实,清热化痰方可显著降低神经元氧化应激损伤,其可能通过激活 Keap1/Nrf2 内源性抗氧化应激通路,进而改善大鼠脑 I/R 损伤^[3-4]。MicroRNA(miRNA)是调控人类约 20%~30% 基因表达的关键因子^[5],并在脑 I/R 损伤的进程中起调控作用^[6]。本研究采用 TargetScan 预测,结果显示 Keap1 是 miR-18a-3p 的潜在靶标;预实验发现 miR-18a-3p 在清热化痰方治疗 I/R 大鼠脑组织中存在差异表达,提示清热化痰方改善脑 I/R 损伤的机制可能与 miR-18a-3p 和 Keap1/Nrf2 通路有关。因此,本研究旨在深入探讨清热化痰方对 I/R 大鼠脑组织氧化应激反应的影响及作用机制,为清热化痰方的临床应用提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK2016-0002。清热化痰方(水牛角 30 g、丹参 15 g、赤芍 15 g、地龙 10 g、石菖蒲 10 g、川芎 10 g、郁金 10 g、酒大黄 6 g、天竺黄 10 g,共 9 味中药)单味中药浓缩颗粒剂,由江阴天江药业有限公司制备(批号:0904099)。293T 细胞(SCSP-502)购于中科院上海细胞库,DMEM(Invitrogen, 11960044),FBS(Gibco),pmirGLO 载体(Promega, Madison, WI),Lipofectamine 2000(Invitrogen),双荧光素酶报告基因检测系统(Promega),Keap1 用网站预测(<http://www.targetscaan.org>)与 miR-18a-3p 结合序列,miR-18a-3p mimics 与 mimics-NC 均由广州锐博公司合成。Keap1 抗体(ab139729)、Nrf2 抗体(ab92946)、NOX-2 抗体(ab129068)、NOX-4 抗体

(ab154244)、HO-1 抗体(ab68477)、SOD2 抗体(ab13533)、山羊抗兔 HRP-IgG(ab6721)、 β -actin(ab8227)、H3(ab1791)均为 abcam 产品,总 RNA 提取试剂盒(R6834),逆转录试剂盒(RR047A),miScript 逆转录试剂盒(Qiagen),Realtime PCR 试剂盒(RR820A),ROS 检测试剂盒为酶联生物产品。细胞核和细胞质蛋白抽提试剂盒为碧云天产品(P0027)。氯化三苯基四氮唑(TTC)染色液(北京鼎国,批号:16S08342)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 32 只 SD 大鼠,250~300 g,16~20 周龄,于 SPF 条件下饲养,分为正常组、假手术组、模型组、清热化痰方组,每组 8 只。除正常组外,其余各组均采用线栓法进行处理。动物实验均符合动物伦理要求,并经医院伦理委员会审核同意。

1.2.2 动物模型建立 采用大鼠大脑中动脉梗阻(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,参照 Longa^[7]线栓法进行,再灌注后规定时间点处死动物。假手术组:以假手术代替 I/R,线栓只插入颈内动脉 9 mm,不栓塞大脑中动脉。模型组和清热化痰方组线栓插入颈内动脉 17~21 mm 阻断血流,缺血 2 h,制备脑缺血模型,缺血后去除线栓再灌注 24 h。清热化痰方组灌胃清热化痰方剂,灌胃液体量为每次 1.4 mL/100 g 大鼠,其浓度及等效剂量按体表面积折算,2 次/d。正常组、假手术组、模型组均灌胃等体积生理盐水。各组均正常饲养,自由饮水,4 天后处死取缺血灶周围脑组织进行检测。模型制备后,用 4% 多聚甲醛灌注后,断头处死,取大脑组织,由前至后冠状切面,约 200 μ m 左右厚度,每个大脑切 5 个层面,放入 2% TTC 溶液中染色,通过 TTC 染色法以观察脑梗死区域的分布情况,以验证模型制备成功。

1.2.3 RT-qPCR 法测定 miR-18a-3p、Keap-1、Nox-2、Nox-4、HO-1 和 SOD2 的表达 用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,进行逆转录及实时荧光定量 PCR 反应,按操作说明书进行。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 34 s,40 个循环。引

物由华大基因合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

基因	引物序列	产物长度 (bp)
miR-18a-3p-F	ACTGCCCTAAGTGCTC	61
miR-18a-3p-R	CAGTGCCTGTCGTGGAGT	
U6-F	CCTGCTTCGGCAGCACA	94
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT	
Keap1-F	CTTCGGGGAGGAGGAGTTCT	125
Keap1-R	CGTATTTGACCCAGTCGATGC	
Nox-2-F	TAGCACTTACACGGCCATT	86
Nox-2-R	ATATGGGTCCGAAGTCCGA	
Nox-4-F	ACAGGATCAGCTTGTGGCT	117
Nox-4-R	CACAATCCTAGGCCAACATC	
SOD2-F	CGGGGGCCATATCAATCACA	86
SOD2-R	TAGCCTCCAGCAACTCTCCT	
HO-1-F	GTAGAGGCGCTGTTCTGAG	95
HO-1-R	ATCAAAGTGCCATGACGCT	
β actin-F	CGTAAAGACCTCTATGCCAACA	100
β actin-R	TAGGAGCCAGGGCAGTAATC	

1.2.4 Western blot 检测 Keap-1、Nox-2、Nox-4、HO-1、SOD2 蛋白表达及 Nrf2 核转位 裂解组织提取蛋白,BCA 法蛋白定量,蛋白变性后取 50 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法转移蛋白至 PVDF 膜,以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h,分别孵育一抗 Keap-1、Nrf2、Nox-2、Nox-4、HO-1 和 SOD2,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 振摇洗膜 10 min \times 4 次,孵育相应种属的 HRP 标记二抗,室温 1 h,TBST 振摇洗膜 10 min \times 4 次。ECL 底物化学发光显色后机器扫描存盘,以 Image 软件进行条带分析。其中 Nrf2 蛋白表达量以组蛋白 H3 作为内参,其余蛋白表达量均以 β -actin 作为内参。

Nrf2 蛋白采用细胞核和细胞质蛋白抽提试剂盒提取,具体方法为将 10 倍体积的胞质蛋白抽提试剂 A 裂解液加入脑组织中,震荡 5 s,加入 1/2 体积试剂 B,震荡 5 s,冰浴 1 min。4 $^{\circ}$ C、13000 \times g 离心 5 min,所得上清为胞质蛋白。再往沉淀加入 2 倍体积的含细胞核提取试剂,震荡 30 s,冰浴 30 min,期间每隔 1~2 min 涡旋 30 s,13000 \times g 离心 5 min,上清为胞核蛋白。

1.2.5 Elisa 法检测脑组织 ROS 表达 按 ROS Elisa 检测试剂盒说明要求制备脑组织匀浆,1000 \times g 离心 10 min 取上清,并用标本稀释液按 1:1 稀释待用。平衡试剂盒至室温并充分混匀,制备标准品。取出加样板条,设置标准孔和样品孔。标准孔加相应浓度的标准品 50 μ L,样品孔加入 50 μ L 稀释好的待检样品。立即加入 50 μ L 的生物素标记的抗体,用封板膜封板,轻轻震荡混匀,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 1 h。弃反应液,吸

水纸上拍干,每孔加入 300 μ L 震荡洗涤液 30 s,弃液拍干,重复洗涤 3 次,拍干。每孔加入 80 μ L 的亲链霉素-HRP,封板,轻轻震荡混匀,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 30 min,再次按要求洗涤 3 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ L,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min,每孔立即加入 50 μ L 终止液,立即用酶标仪于 450 nm 波长处读取各孔 OD 值。绘制标准品线性回归曲线,并按方程计算各样本中 ROS 的含量。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 293T 细胞按说明书要求用含 10% FBS 的 DMEM 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。将 Keap1 基因的 3'UTR WT(WT-Keap1 3'UTR)及其突变体(MUT-Keap1 3'UTR)构建到 pmirGLO 载体中,该载体的荧光素酶 luc2 作为主要报告基因,荧光素酶 hRluc-neo 为对照报告基因,不含任何外源片段的 pmirGLO 载体作为空载对照。根据 Lipofectamine 2000 转染说明书要求,将 miR-18a-3p mimics 与 mimics-NC 分别与荧光素报告基因共转染到 293T 细胞中,分别为 WT-Keap1 组、MUT-Keap1 组和 Vector 组,每组设置 3 个复孔,转染后培养 12 h,用双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性,以海參荧光素酶 hRluc-neo 的活性作为对照报告基因。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析 实验数据应用 SPSS 22.0 进行统计分析,结果以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析和 LSD 检验对实验数据进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组大鼠脑组织 TTC 染色 选取再灌注 24 h 后的模型组大鼠脑组织行 TTC 染色,模型制备成功的脑组织中,正常脑组织呈玫瑰红色,缺血损伤的脑组织呈苍白色,可见明显的梗死灶,见图 1。



图 1 模型大鼠脑组织 TTC 染色切片

Figure 1 TTC stained sections of brain tissue of model rats

注:玫瑰红色为正常脑组织;苍白色为缺血损伤脑组织

2.2 清热化痰方对大鼠脑组织 Nox-2、Nox-4 表达及 ROS 生成的影响 采用 Western blot、RT-qPCR 和 ELISA 分别检测大鼠脑组织 Nox-2、Nox-4 的表达、ROS 生成量,结果显示,与正常组相比,模型组缺血灶脑组织中 Nox-2、Nox-4 mRNA 和蛋白表达量显著升高,ROS 的生成量显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组

相比,清热化痰方组 Nox-2、Nox-4 mRNA 和蛋白表达量显著降低,ROS 产生量显著降低(均 $P < 0.05$);

假手术组与正常组的检测结果相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

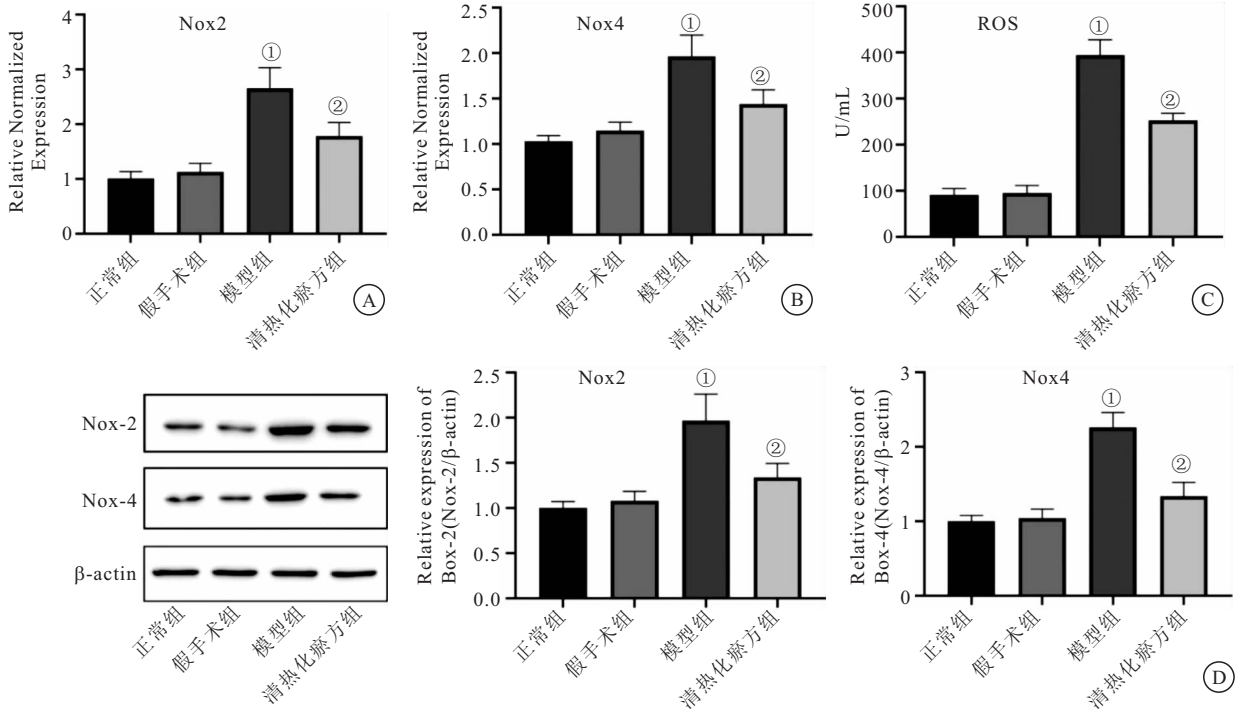


图2 各组 Nox-2、Nox-4 和 ROS 检测结果($n=8$)

Figure 2 The detection results of Nox-2, Nox-4 and ROS in each group

注:A. Nox-2 mRNA 表达;B. Nox-4 mRNA 表达;C. ROS 含量;D. Nox-2 和 Nox-4 的蛋白表达。与正常组相比,① $P < 0.05$;与模型组相比,② $P < 0.05$

2.3 清热化痰方对大鼠脑组织 Keap1、SOD2、HO-1 表达及 Nrf2 核转位的影响 采用 Western blot 和 RT-qPCR 法检测各组大鼠脑组织 Keap1、SOD2、HO-1 表达和 Nrf2 核转位。结果显示,与正常组相比,模型组 Keap1 mRNA 及蛋白表达显著升高,SOD2、HO-1 mRNA 和蛋白表达及 Nrf2 核转位显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组相比,清热化痰方组 Keap1 mRNA 及蛋白表达显著降低,而 SOD2、HO-1 mRNA 和蛋白表达及 Nrf2 核转位显著增加(均 $P < 0.05$);假手术组与正常组的检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 清热化痰方对大鼠脑组织 miR-18a-3p 表达的影响 采用 RT-qPCR 法检测各组大鼠脑组织中 miR-18a-3p 表达。结果显示,与正常组相比,模型组 miR-18a-3p 的表达显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比,清热化痰方组 miR-18a-3p 的表达量显著升高($P < 0.05$)。假手术组与正常组的检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 双荧光素酶报告基因实验证实 miR-18a-3p 与 Keap1 结合 使用双荧光素酶报告基因实验检验 miR-18a-3p 与 Keap1 的相互作用,结果显示,与阴性对照相比,过表达 miR-18a-3p 能显著至弱 WT-Keap1

组荧光活性($P < 0.05$),而 MUT-Keap1 组荧光活性无明显抑制作用($P > 0.05$),miR-18a-3p 可与野生型 Keap1 3'UTR 直接结合,见图 5。

3 讨论

CIS 的治疗方法是早期恢复血流再灌注,进行血流重建术,保证血氧供应,但当脑缺血超过一定时间后,缺血再灌注使神经元产生一系列级联反应,进一步加重脑组织损伤,即脑 I/R 损伤。故神经保护药物在脑 I/R 损伤治疗研究中备受关注。近年来,中医药以其多靶点、多途径等优势已成为中风疾病治疗研究中的热点^[8]。中风病的主要病机为毒损脑络,痰瘀阻滞,气血逆乱,而痰毒、瘀毒、热毒往往交织为患,故“清热解毒,化痰通络”是其有效治法。本研究研制的清热化痰方具有解毒、化痰祛瘀之功效,是治疗中风病的有效方剂。前期大量研究表明,该方可通过抗氧化、抗炎和抗凋亡等多种途径改善缺血性脑损伤,对脑 I/R 损伤具有显著的保护作用^[9],表明清热化痰方作为神经保护剂在临床应用中具有一定的价值。因此,深入探讨清热化痰方对脑 I/R 损伤的保护效应具有重要的意义。

脑 I/R 损伤是一个复杂的病理生理过程,其机制包括能量衰竭、细胞内 Ca^{2+} 的积累、氧化应激、炎症^[10]

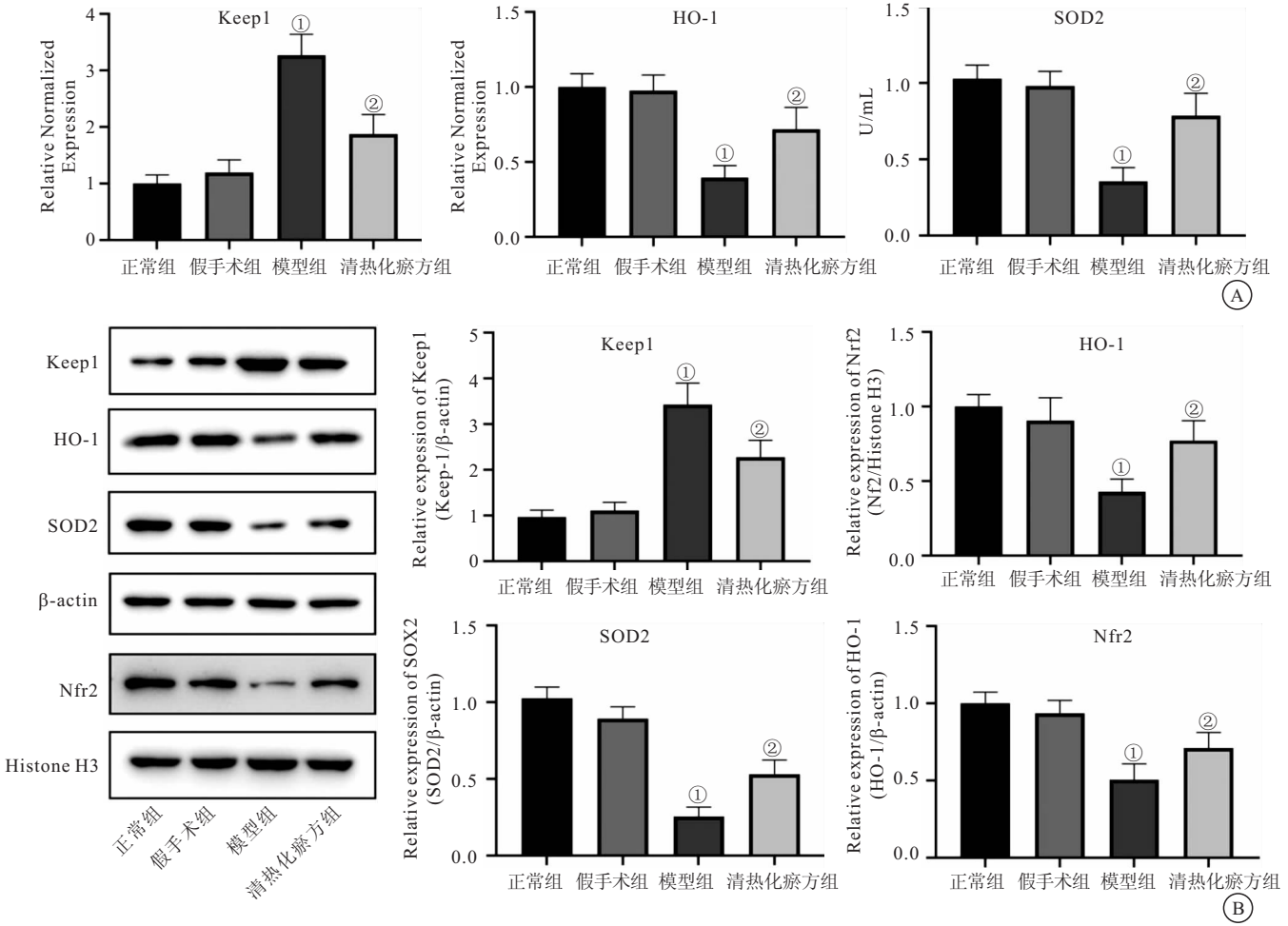


图3 各组 Keap1、SOD2、HO-1 和 Nrf2 的检测结果 (n=8)

Figure 3 The detection results of Keap1, SOD2, HO-1 and Nrf2 in each group

注: A. Keap1、SOD2、HO-1 的 mRNA 表达; B. Keap1、SOD2、HO-1 和 Nrf2 蛋白表达。与正常组相比, ①P<0.05; 与模型组相比, ②P<0.05

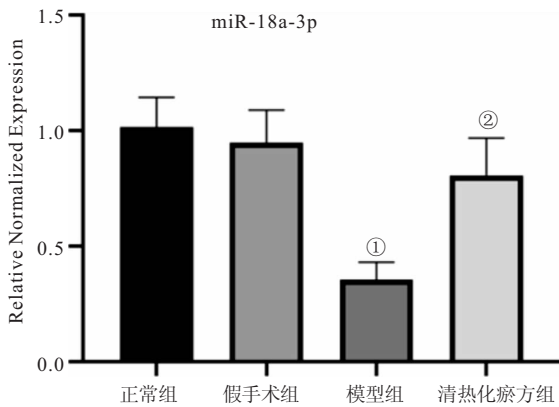


图4 各组 miR-18a-3p 检测结果 (n=8)

Figure 4 The detection results of miR-18a-3p in each group

注: 与正常组相比, ①P<0.05; 与模型组相比, ②P<0.05

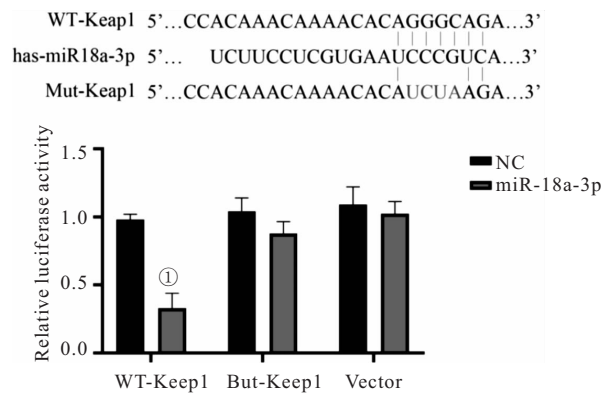


图5 双荧光素酶报告基因实验结果 (n=3)

Figure 5 Experimental results of dual luciferase reporter gene

注: 与 NC 相比, ①P<0.05

和细胞凋亡等^[11]。氧化应激在 CIS 脑损伤过程中发挥关键作用^[12]。急性缺血性中风后, ROS 的迅速增加会迅速压倒抗氧化防御, 造成脑组织损伤; 这些 ROS 可损伤细胞大分子, 诱导神经元自噬、凋亡和坏

死等; 此外, 血流的快速恢复增加了组织氧合水平, 导致 ROS 产生的第二次爆发, 从而导致再灌注损伤, 进一步加重脑组织损伤^[13]。NADPH 氧化酶的非吞噬细胞氧化酶 (NOX) 家族是脑缺血氧化应激中产生

ROS 的主要体系。当大脑受到氧化应激时, NOX 家族被激活, 使电子从 NADPH 转移到氧分子中, 从而产生大量的 ROS^[14]。Nox-2、Nox-4 主要分布于脑组织中, 是 NOX 家族介导脑损伤的关键亚型。既往研究发现, Nox4^{-/-}小鼠在局灶性 MCAO 模型中, 梗死体积、氧化应激、血脑屏障破坏和神经元凋亡均显著减少^[15]。此外, Nox-2 诱导 ROS 生成增多可进一步促进脑 I/R 大鼠的炎症反应^[16]。本研究发现, 相较于正常组, 模型组缺血脑组织中 ROS 的生成量显著升高, 但清热化痰方治疗脑 I/R 大鼠后, 可明显降低脑缺血组织中 ROS 含量, 表明脑 I/R 造成了严重的氧化应激损伤, 而清热化痰方有助于改善脑 I/R 引起的氧化应激损伤, 其可通过抑制 Nox-2 和 Nox-4 的表达和 ROS 生成, 从而抑制脑 I/R 所致的氧化应激损伤。

Keap1/Nrf2 是生物体的内源性抗氧化通路。Keap1 是 Nrf2 的天然抑制剂, 正常生理状态下两者结合, 诱导 Nrf2 泛素化并随后被 26S 蛋白酶体降解, 从而阻止 Nrf2 的核转位及其与 ARE 序列的结合 (Nrf2 激活), 维持其活性的稳定; 当细胞受到 ROS 刺激后, Nrf2 与 Keap1 解偶联, Nrf2 激活, 从而促进下游含 ARE 序列的抗氧化剂基因的转录, 例如 HO-1、SOD 等, 进而在脑 I/R 损伤中发挥抗氧化作用^[17]。HO-1 可催化血红素氧化生成游离铁、胆绿素和 CO, 阻止游离血红素参与氧化反应, 发挥抗氧化、抗炎以及抑制细胞凋亡等作用^[18]。SOD 是机体重要的抗氧化酶, 可通过歧化反应清除氧自由基并阻断脂质过氧化反应。根据结合金属离子种类, SOD 分为 SOD1、SOD2 和 SOD3。SOD2 (Mn-SOD) 存在于线粒体内, 参与保护细胞免受氧化应激, 在脑 I/R 损伤中起着神经保护作用^[19-20]。大量研究证实, Nrf2 的缺失或下降会加剧脑 I/R 大鼠的脑梗塞和神经功能缺损, 并降低下游抗氧化酶的表达^[21-22]。本研究发现, 相较于正常组, 脑 I/R 大鼠损伤后, 其脑缺血组织的 Keap1 表达升高, Nrf2 核转位及 HO-1 和 SOD2 的表达显著降低, 但清热化痰方可明显促进脑 I/R 损伤组织中 Nrf2 核转位及 HO-1 和 SOD2 的表达, 抑制 Keap1 表达, 表明脑 I/R 损伤减弱了机体的抗氧化防御机制, 而清热化痰方可显著增强内源性抗氧化剂防御的能力, 且可通过抑制 Keap1 表达, 激活 Nrf2 信号通路, 具有显著的抗氧化效应, 进一步说明激活 Nrf2 介导的抗氧化机制可抑制脑 I/R 损伤。

miRNA 是一种短链的非编码单链 RNA, 通过与目标 mRNA 的 3' UTR 结合来抑制基因表达。近年来越来越多的研究证实, miRNA 的异常表达与 CIS 的发生、发展、治疗及预后均有密切联系。干扰 miR-

129-5p 表达逆转了金钱草提取物对 I/R 大鼠脑损伤的保护作用^[23], 表明 miRNA 在药物改善脑 I/R 损伤中起关键作用。另外, miR-34b 可通过直接靶向抑制 Keap1 蛋白水平, 增加 Nrf2 和 HO-1 的表达, 进而对脑 I/R 大鼠诱导的氧化应激损伤发挥保护作用^[24], 表明 Keap1/Nrf2 在脑 I/R 损伤中的抗氧化机制可能受 miRNA 的调控。人参皂苷 Rg1 可通过抑制 miR-144 的表达, 进而促进 miR-144 下游靶标 Nrf2 的转录水平, 从而减轻 I/R 后的氧化应激损伤^[25], 进一步提示神经保护剂在脑 I/R 损伤中的抗氧化效应与 miRNA 有关。本研究发现, TargetScan 预测结果显示, Keap1 是 miR-18a-3p 的潜在靶标, 经双荧光素酶报告基因检测结果证实, miR-18a-3p 靶向 Keap1 基因的 3' UTR; 并且, miR-18a-3p 在脑 I/R 大鼠模型脑组织中的表达显著低于正常大鼠, 而清热化痰方治疗脑 I/R 大鼠后, 可显著上调 miR-18a-3p 的表达, 表明 miR-18a-3p 参与了脑 I/R 损伤机制, 且清热化痰方对脑 I/R 的抗氧化作用机制与 miR-18a-3p 密切相关。

4 结论

清热化痰方是治疗脑 I/R 损伤的有效方剂, 可有效抑制脑 I/R 大鼠脑组织氧化应激反应, 其机制可能与促进缺血脑组织 miR-18a-3p 表达, 进而抑制 Keap1 表达, 促进 Nrf2 核转位有关, 这进一步表明清热化痰方作为神经保护剂在临床应用方面具有较高的价值。脑 I/R 损伤是一个复杂的病理生理过程, 涉及多种机制与多条信号通路, 且清热化痰方也具有多种效用, 故清热化痰方改善脑 I/R 损伤的效应与机制仍需要深入探讨。

【参考文献】

- [1] M-S SUN, JIN H, SUN X, *et al.* Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 20183804979.
- [2] 胡跃强, 兰鹏, 梁妮, 等. 清热化痰方联合西药治疗缺血性中风 90 例临床观察[J]. *中医药导报*, 2017, 23(20): 79-81.
- [3] 胡跃强, 秦红玲, 唐农, 等. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨清热化痰方对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14): 128-133.
- [4] 胡跃强, 廖泰荣, 唐农, 等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后 P62/Keap1 表达变化及清热化痰方的干预研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3409-3412.
- [5] J CHOU, SHAHI P, WERB Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(20): 3262-3271.
- [6] Y HU, DENG H, XU S, *et al.* MicroRNAs Regulate Mitochondrial Function in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 24895-24917.

[7] E-Z LONGA, WEINSTEIN P-R, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[8] 于潇,王贵阳,侯宇东,等. 中药抗脑缺血再灌注损伤的作用及其机制的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(5): 1471-1484.

[9] 胡跃强,毛丹凤,甘业贤,等. 清热化痰方联合 HP-BMSCs 移植对脑缺血损伤大鼠 PI3K/Akt 表达影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(4): 8-11.

[10] 王洪海,周颖臻,周德生,等. JAK2/STAT 3 通路在脑缺血再灌注损伤炎症反应中的作用[J]. *西部医学*, 2017, 29(2): 172-178.

[11] M-Y WU, YIANG G-T, LIAO W-T, *et al.* Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.

[12] 张巧莲,李双英,孙艳,等. 氧化应激与缺血性脑卒中神经功能评分及神经功能恢复的相关性研究[J]. *现代医学*, 2019, 47(3): 287-291.

[13] R RODRIGO, FERNANDEZ-GAJARDO R, GUTIERREZ R, *et al.* Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12(5): 698-714.

[14] S-P GRAY, JANDELEIT-DAHM K. The pathobiology of diabetic vascular complications--cardiovascular and kidney disease [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(5): 441-452.

[15] Q-Y ZHANG, WANG Z-J, SUN D-M, *et al.* Novel Therapeutic Effects of Leonurine On Ischemic Stroke: New Mechanisms of BBB Integrity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 20177150376.

[16] H LIU, WEI X, KONG L, *et al.* NOD2 is involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(5): 525-535.

[17] C-A SILVA-ISLAS, CHANEZ-CARDENAS M-E, BARRERA-OVIEDO D, *et al.* Diallyl Trisulfide Protects Rat Brain Tissue against the Damage Induced by Ischemia-Reperfusion through the Nrf2 Pathway[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(9): 410.

[18] 邱文娟,王建红,郭富强. 血红素加氧酶-1 在脑缺血再灌注损伤中的作用和机制[J]. *国际脑血管病杂志*, 2018, 26(6): 464-467.

[19] G-E YANG, TAE H-J, LEE T-K, *et al.* Risperidone Treatment after Transient Ischemia Induces Hypothermia and Provides Neuroprotection in the Gerbil Hippocampus by Decreasing Oxidative Stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4621.

[20] S GUO, ZHANG Y-Y, PENG J-J, *et al.* Natural compound methyl protodioscin protects rat brain from ischemia/reperfusion injury through regulation of Mul1/SOD2 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 84950-849558.

[21] Q LIU, JIN Z, XU Z, *et al.* Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(2): 441-452.

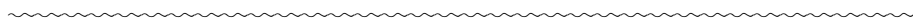
[22] X CHENG, ZHANG F, LI J, *et al.* Galuteolin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via anti-apoptotic, antioxidant, and anti-inflammatory mechanisms [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 152671-2680.

[23] 阚桐,王越,王瑞刚. 金钱草提取物通过调控 miR-129-5p 表达对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用[J]. *中国药师*, 2021, 24(1): 12-15.

[24] R HUANG, MA J, NIU B, *et al.* MiR-34b Protects Against Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion (I/R) Injury in Rat by Targeting Keap1[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(1): 1-9.

[25] S-F CHU, ZHANG Z, ZHOU X, *et al.* Ginsenoside Rg1 protects against ischemic/reperfusion-induced neuronal injury through miR-144/Nrf2/ARE pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(1): 13-25.

(收稿日期:2021-01-28;修回日期:2021-12-08;编辑:郭翠)



(上接第 327 页)

[15] 邱璐璐,蔡钊萌,张宁. 丹酚酸 B 对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(16): 2419-2421.

[16] HESSE R, LAUSSER L, GUMMERT P, *et al.* Reduced cGMP levels in CSF of AD patients correlate with severity of dementia and current depression[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2017, 9(1):17.

[17] ZHENG J J, LI W X, LIU J Q, *et al.* Low expression of aging-related NRXN3 is associated with Alzheimer disease: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(28): e11343.

[18] BATE C, WILLIAMS A. Monomeric amyloid-β reduced amyloid-β oligomer-induced synapse damage in neuronal cultures[J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 111:48-58.

[19] SINCLAIR L I, TAYLER H M, LOVE S. Synaptic protein levels altered in vascular dementia[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41(4): 533-543.

[20] IACOBUCCI G J, POPESCU G K. NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(4):236-249.

[21] DENG W W, HU Q, LIU Z R, *et al.* KDM4B promotes DNA damage response via STAT3 signaling and is a target of CREB in colorectal cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 449(1-2): 81-90.

(收稿日期:2021-04-13;修回日期:2021-10-12;编辑:刘灵敏)