

补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠认知功能的影响

张 扬¹, 严 寒^{1*}, 梁 永²

(1. 长沙市第一医院中西医结合科, 湖南 长沙 410005; 2. 长沙市第一医院神经内科, 湖南 长沙 410005)

摘要: **目的** 探讨补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠认知功能的影响。**方法** 将大鼠随机分为假手术组, 模型组, 补阳还五汤低、中、高剂量组 (14.5、29.0、58.0 g/kg), 补阳还五汤+Compound C 组 (补阳还五汤 58.0 g/kg+AMPK 抑制剂 Compound C 0.3 mg/kg), 每组 18 只, 采用改良线栓法构建大脑中动脉阻塞 (MCAO) 大鼠模型, 连续灌胃给予相应药物 2 周, 评估大鼠神经功能缺损评分和认知能力, TTC 染色检测脑梗死情况, HE 染色观察脑组织海马神经元形态变化, 透射电镜观察细胞自噬情况, Western blot 法检测海马自噬、AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分、逃避潜伏期、脑梗死面积和海马 p62、p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 穿越平台位置次数和海马 Beclin-1、LC3-II/LC3-I、p-AMPK/AMPK 蛋白表达减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分、逃避潜伏期和海马 p62、p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 穿越平台位置次数和海马 Beclin-1、LC3-II/LC3-I、p-AMPK/AMPK 蛋白表达升高 ($P<0.05$); Compound C 能逆转补阳还五汤对缺血性脑卒中的保护作用 ($P<0.05$)。**结论** 补阳还五汤可能通过激活 AMPK/mTOR 通路进而激活自噬, 减轻认知功能损害。

关键词: 补阳还五汤; 缺血性脑卒中; 自噬; 认知功能; 腺苷酸活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白 (AMPK/mTOR)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1309-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.048

缺血性脑卒中又称脑梗死, 具有高死亡率和高致残率的特点^[1]。使用组织纤溶酶原激活剂 (t-PA) 对闭塞血管进行再通是其主要的治疗手段, 但是在随后再灌注过程中可能发生严重的组织损伤, 而且 t-PA 治疗时间窗有限 (卒中后 4.5 h 内), 有 90% 以上的患者无法进行静脉 t-PA 治疗^[2]。尽管近年来发现了许多潜在的治疗靶标和药物^[3], 但很少将其转化为可行的临床实践。补阳还五汤在我国已被用于恢复神经功能障碍和治疗中风后残疾^[4-5]。研究发现补阳还五汤具有抑制神经元凋亡, 促进神经干细胞的增殖、分化以及增强学习和记忆功能恢复的作用^[6]。最近的研究发现, 在许多神经变性疾病如阿尔茨海默症、帕金森和亨廷顿病中均可观察到自噬和溶酶体功能破坏^[7-8], 说明自噬可能与神经功能障碍关系密切。已有研究证实自噬在缺血性脑损伤中被激活^[9], 而补阳还五汤可调节大鼠脑卒中后自噬, 稳定线粒体功能, 保护神经元^[10]。关于补阳还五汤对缺血性脑卒中后认知能力下降的恢复作用是否与自噬有关的研究报道却很少, 为了进一步明确补阳还五汤对缺血性脑卒中的保护机制, 本研究从自噬的角度探讨其对缺血性脑卒中后大鼠认知功能的影响, 以期补阳还五汤更广泛的应用和缺血性脑卒中的治疗提供参考。

1 材料

1.1 动物 108 只 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体质量 250~300 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0011, 饲养于温度 (24±2)℃、相对湿度 50%~60% 的环境。研究经长沙市第一医院动物伦理委员会批准。

1.2 试剂与药物 补阳还五汤由生黄芪 120 g、当归 3 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g 组成, 以上药材均购自北京同仁堂股份有限公司, 经长沙市第一医院戴先红副主任中药师鉴定为正品。药材加水充分浸泡后煎煮 2 次, 每次 40 min, 滤过, 合并 2 次滤液, 浓缩至生药量 4 g/mL, 保存备用。线栓 (北京西浓科技有限公司); AMPK 抑制剂 Compound C (美国 TargetMol 公司, 批号 S7840); 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑试剂 (TTC, 美国 Sigma 公司, 批号 T8877); AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、微管相关蛋白轻链 3 (LC3A/B)、p62 抗体 (批号 ab207442、ab23875、ab32028、ab137133、ab128025、ab91526, 英国 Abcam 公司); Unc-51 样激酶 1 (Ulk1)、p-Ulk1 (Ser757) 抗体 (批号 8054、14202, 美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.3 仪器 Morris 水迷宫 (型号 WMT-100S) 购自成都泰

收稿日期: 2021-09-28
基金项目: 湖南省科技创新计划项目 (2018JJ6129)
作者简介: 张 扬 (1985—), 女, 硕士, 主治医师, 从事脑血管病研究。Tel: 13787255416, E-mail: kevinkui@yeah.net
* 通信作者: 严 寒 (1980—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合治疗脑血管病研究。Tel: 15073145920, E-mail: missyanhan@126.com

盟软件有限公司；透射电子显微镜（型号 H-7500）购自日本日立公司。

2 方法

2.1 分组与造模 将大鼠随机分为假手术组，模型组，补阳还五汤低、中、高剂量组（14.5、29.0、58.0 g/kg），补阳还五汤+Compound C 组（补阳还五汤 58.0 g/kg+AMPK 抑制剂 Compound C 0.3 mg/kg）^[11]，每组 18 只。参照文献[12]报道，采用改良线栓法阻断大脑中动脉 2 h 后恢复血流再灌注复制 MCAO 大鼠模型，以大鼠神经功能缺陷评分在 1~3 分者为造模成功；假手术组不插线栓，其余操作同造模大鼠，造模过程中如出现死亡则随时补充，以保证每组不少于 18 只。

2.2 给药 再灌注 24 h 后开始给药，补阳还五汤低、中、高剂量组灌胃给予 14.5、29.0、58.0 g/kg 补阳还五汤（相当于人临床用量的 1、2、4 倍），补阳还五汤+Compound C 组在灌胃给予 58.0 g/kg 补阳还五汤的同时腹腔注射 0.3 mg/kg Compound C，假手术组、模型组灌胃和腹腔注射等量生理盐水，每天 1 次，共干预 2 周。

2.3 神经功能缺陷评分 评分标准为无明显神经功能缺陷，0 分；不能完全伸展对侧前肢，1 分；向对侧旋转，2 分；向对侧倾斜，3 分；无自主活动，4 分，分数越高表示神经功能缺陷越严重。

2.4 Morris 水迷宫实验 给药结束后进行 Morris 水迷宫实验，将水池平分为 4 个象限，其中 1 个象限放置隐藏平台。在定位航行实验中，将大鼠从不同象限放入池中，记录大鼠找到目标平台的游泳时间，即为逃避潜伏期，若 90 s 内未找到平台，则记录逃避潜伏期为 90 s，连续 4 d（每天 4 次，间隔 5 min），计算平均值。在空间探索实验中，撤去隐藏平台，从同一象限将大鼠放入水中，记录 60 s 内大鼠穿过平台所在位置的次数。

2.5 大鼠脑梗死面积测定 行为学检测结束后，每组随机选取 6 只大鼠处死并断头取脑，进行冠状切片，每只平均 5 片，将脑片放入 1% TTC 溶液中，37 ℃ 孵育 8 min 后翻面，再孵育 10 min，拍照，并用 Image pro plus 6.0 软件进行分析，计算脑梗死面积百分比。

2.6 HE 染色观察海马神经元形态变化 每组随机选取 6 只大鼠，断头取脑后分为两部分，一部分固定在 2.5% 戊二醛溶液中，另一部分固定在 4% 多聚甲醛中，石蜡包埋后切片，进行 HE 染色，观察脑组织海马神经元形态变化。分级判断标准为 0 级，神经元正常；Ⅰ级，少数神经元皱缩或变性；Ⅱ级，神经细胞数排列疏松，部分细胞皱缩或变性；Ⅲ级，神经细胞大量减少，较多神经细胞皱缩或坏死；Ⅳ级，大片神经细胞皱缩及坏死。

2.7 透射电镜观察细胞自噬情况 取出固定于戊二醛溶液中的脑组织，置于 1% 锇酸中再固定 2 h，脱水，包埋，进行超薄切片（60~70 nm），3% 醋酸柚-枸橼酸铅双染色，透射电镜下观察观察海马区自噬小体的形成情况。

2.8 Western blot 法检测海马自噬、AMPK/mTOR 通路相

关蛋白表达 每组剩余 6 只大鼠处死取脑，分离海马组织，提取总蛋白后 SDS-PAGE 凝胶电泳分离转膜，封闭后，在 4 ℃ 下将膜与相应的一抗（AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、Ulk1、p-Ulk1、Beclin-1、LC3A/B、p62，1：1 000；β-actin，1：2 000）孵育过夜，室温下与二抗（1：5 000）孵育 1 h，显影，Image pro plus 6.0 软件分析各蛋白条带灰度值，以 β-actin 为内参，计算目的蛋白的相对表达量。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，计量资料符合正态分布，以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示；2 组间比较采用 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 事后检验；等级资料比较采用 Ridit 分析。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤对 MCAO 大鼠神经功能的影响 与假手术组比较，模型组大鼠神经功能缺损评分升高（*P*<0.05）；与模型组比较，补阳还五汤中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分降低（*P*<0.05）；与补阳还五汤高剂量组比较，补阳还五汤+Compound C 组大鼠神经功能缺损评分升高（*P*<0.05），见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=18）

组别	神经功能缺损评分/分
假手术组	0±0
模型组	2.34±0.38 [*]
补阳还五汤低剂量组	2.11±0.31
补阳还五汤中剂量组	1.85±0.26 [▲]
补阳还五汤高剂量组	1.47±0.18 [▲]
补阳还五汤+Compound C 组	1.78±0.22 ^{▲#}

注：与假手术组比较，^{*}*P*<0.05；与模型组比较，[▲]*P*<0.05；与补阳还五汤高剂量组比较，[#]*P*<0.05。

3.2 补阳还五汤对 MCAO 大鼠认知能力的影响 与假手术组比较，模型组大鼠逃避潜伏期延长（*P*<0.05），穿越平台次数减少（*P*<0.05）；与模型组比较，补阳还五汤各剂量组大鼠逃避潜伏期缩短（*P*<0.05），穿越平台次数增多（*P*<0.05）；与补阳还五汤高剂量组比较，补阳还五汤+Compound C 组大鼠逃避潜伏期延长（*P*<0.05），穿越平台次数减少（*P*<0.05），见表 2~3。

3.3 补阳还五汤对 MCAO 大鼠脑梗死面积的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死面积增加（*P*<0.05）；与模型组比较，补阳还五汤各剂量组大鼠脑梗死面积减少（*P*<0.05）；与补阳还五汤高剂量组比较，补阳还五汤+Compound C 组大鼠脑梗死面积增加（*P*<0.05），见图 1、表 4。

3.4 补阳还五汤对 MCAO 大鼠海马神经元的影响 假手术组大鼠海马 CA1 区细胞形态规则，排列紧密；模型组大鼠海马 CA1 区可见细胞核皱缩深染，神经元数量减少，存在较多变性坏死神经元；与模型组比较，补阳还五汤高剂量组大鼠病理损伤明显减轻，神经元数量增多，染色较为均匀；补阳还五汤+Compound C 组大鼠海马 CA1 区神经元数量减少，变性、坏死神经元较补阳还五汤高剂量组增

表 2 各组大鼠逃避潜伏期比较 (s, $\bar{x}\pm s$, $n=18$)

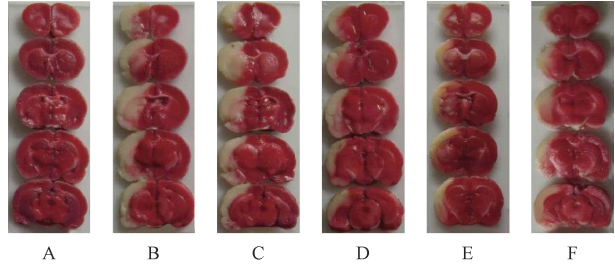
组别	1 d	2 d	3 d	4 d
假手术组	53.04±4.16	42.21±4.12	33.64±4.05	29.45±4.30
模型组	66.33±5.08 [*]	63.45±5.17 [*]	60.88±6.11 [*]	59.34±5.68 [*]
补阳还五汤低剂量组	63.40±5.11	58.93±5.36 [▲]	53.40±5.06 [▲]	48.11±4.57 [▲]
补阳还五汤中剂量组	60.86±6.09 [▲]	54.97±5.21 [▲]	48.45±5.15 [▲]	44.85±5.32 [▲]
补阳还五汤高剂量组	58.64±5.47 [▲]	49.76±4.39 [▲]	45.59±4.86 [▲]	41.47±4.18 [▲]
补阳还五汤+Compound C 组	60.41±6.12	55.52±5.06 [#]	50.76±5.23 [#]	47.78±5.22 ^{▲#}

注：与假手术组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[▲] $P<0.05$ ；与补阳还五汤高剂量组比较，[#] $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠穿越平台次数比较 (次, $\bar{x}\pm s$, $n=18$)

组别	穿越平台次数
假手术组	5.78±0.30
模型组	0.84±0.16 [*]
补阳还五汤低剂量组	1.66±0.20 [▲]
补阳还五汤中剂量组	2.45±0.23 [▲]
补阳还五汤高剂量组	2.97±0.24 [▲]
补阳还五汤+Compound C 组	1.83±0.22 ^{▲#}

注：与假手术组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[▲] $P<0.05$ ；与补阳还五汤高剂量组比较，[#] $P<0.05$ 。



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 为补阳还五汤低、中、高剂量组，F 为补阳还五汤+Compound C 组。

图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色

表 4 各组大鼠脑梗死面积比较 (% , $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

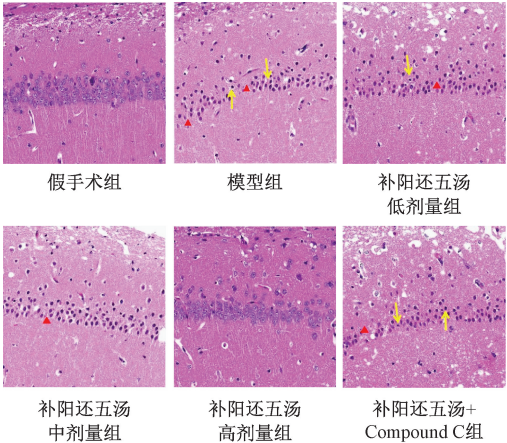
组别	脑梗死面积
假手术组	0±0
模型组	34.58±2.21 [*]
补阳还五汤低剂量组	30.47±2.19 [▲]
补阳还五汤中剂量组	25.85±2.27 [▲]
补阳还五汤高剂量组	19.37±2.06 [▲]
补阳还五汤+Compound C 组	25.56±2.34 ^{▲#}

注：与假手术组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[▲] $P<0.05$ ；与补阳还五汤高剂量组比较，[#] $P<0.05$ 。

多，见图 2。

经 Ridit 分析，与假手术组比较，模型组大鼠海马 CA1 区出现显著病理损伤 ($P<0.05$)；与模型组比较，补阳还五汤各剂量组可不同程度改善大鼠海马 CA1 区病理损伤，其中高剂量组最明显 ($P<0.05$)；与补阳还五汤高剂量组比较，补阳还五汤+Compound C 组大鼠海马 CA1 区病理损伤增加 ($P<0.05$)，见表 5。

3.5 补阳还五汤对 MCAO 大鼠海马神经元自噬的影响 假手术组大鼠海马 CA1 区神经元结构正常，细胞核完整，有少量自噬小体形成；模型组大鼠海马 CA1 区细胞结构破坏，可见线粒体肿胀，神经元呈空泡样变，自噬小体形成最少；



注：黄色箭头指示细胞核固缩深染；红色三角指示神经细胞数量减少，排列疏松。

图 2 各组大鼠海马 CA1 区 HE 染色 (×200)

表 5 各组大鼠海马 CA1 区病理分级分布 ($n=6$)

组别	分级/只				
	0	I	II	III	IV
假手术组	6	0	0	0	0
模型组 [*]	0	0	0	2	4
补阳还五汤低剂量组	0	0	1	1	4
补阳还五汤中剂量组	0	0	2	2	2
补阳还五汤高剂量组 [▲]	0	2	2	1	1
补阳还五汤+Compound C 组 [#]	0	0	1	2	3

注：与假手术组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[▲] $P<0.05$ ；与补阳还五汤高剂量组比较，[#] $P<0.05$ 。

与模型组比较，补阳还五汤各剂量组大鼠海马 CA1 区可见自噬小体数量明显增多，线粒体、溶酶体形态相对正常；与补阳还五汤高剂量组比较，补阳还五汤+Compound C 组大鼠海马 CA1 区自噬小体、溶酶体、线粒体肿数量明显减少，见图 3。

3.6 补阳还五汤对 MCAO 大鼠海马 Beclin-1、LC3-II、LC3-I、p62 蛋白表达的影响 与假手术组比较，模型组大鼠海马 Beclin-1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，p62 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，补阳还五汤中、高剂量组大鼠海马 Beclin-1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，p62 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与补阳还五汤高剂量组比较，补阳还五汤+Compound C 组大鼠海马 Beclin-1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，p62 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，见图 4、表 6。

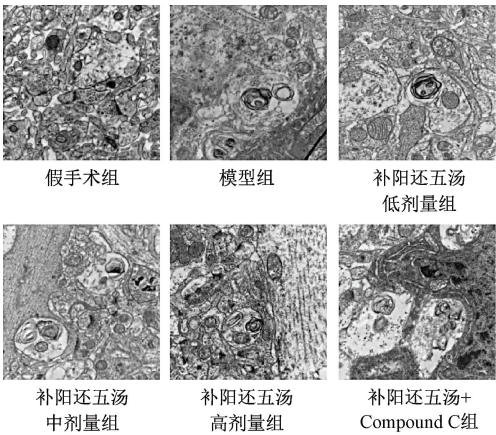
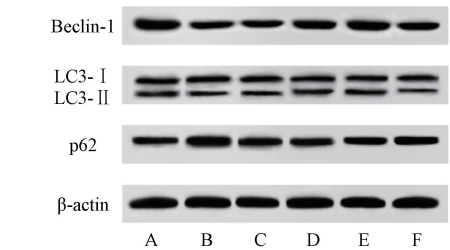


图 3 各组大鼠海马 CA1 区超微结构 (×20 000)



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 为补阳还五汤低、中、高剂量组，F 为补阳还五汤+Compound C 组。

图 4 各组大鼠海马组织 Beclin-1、LC3-II、LC3- I、p62 蛋白条带

表 6 各组大鼠海马组织 Beclin-1、LC3-II、LC3- I、p62 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

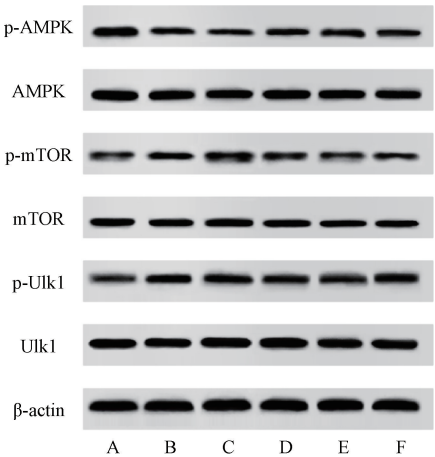
组别	Beclin-1	LC3-II/LC3- I	p62
假手术组	0.92±0.08	0.86±0.07	0.55±0.06
模型组	0.64±0.07 *	0.48±0.06 *	0.87±0.07 *
补阳还五汤低剂量组	0.67±0.06	0.52±0.08	0.75±0.06 ▲
补阳还五汤中剂量组	0.78±0.05 ▲	0.64±0.09 ▲	0.68±0.05 ▲
补阳还五汤高剂量组	0.84±0.07 ▲	0.71±0.06 ▲	0.63±0.04 ▲
补阳还五汤+Compound C 组	0.69±0.08 ▲#	0.57±0.08 ▲#	0.74±0.06 ▲#

注：与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$;与补阳还五汤高剂量组比较,# $P<0.05$ 。

3.7 补阳还五汤对 MCAO 大鼠海马组织 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,补阳还五汤中、高剂量组大鼠海马组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达升高 ($P<0.05$), p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与补阳还五汤高剂量组比较,补阳还五汤+Compound C 组大鼠海马组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达升高 ($P<0.05$),见图 5、表 7。

4 讨论

脑缺血再灌注可导致认知功能障碍,严重影响患者的健康和生活质量^[13]。补阳还五汤由黄芪、当归、赤芍、地



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 为补阳还五汤低、中、高剂量组，F 为补阳还五汤+Compound C 组。

图 5 各组大鼠海马组织 AMPK/mTOR 通路相关蛋白条带

表 7 各组大鼠海马组织 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-Ulk1/Ulk1
假手术组	0.82±0.05	0.47±0.08	0.52±0.07
模型组	0.44±0.07 *	0.89±0.06 *	0.96±0.06 *
补阳还五汤低剂量组	0.48±0.08	0.77±0.07 ▲	0.89±0.05
补阳还五汤中剂量组	0.56±0.07 ▲	0.68±0.08 ▲	0.73±0.05 ▲
补阳还五汤高剂量组	0.68±0.06 ▲	0.56±0.06 ▲	0.65±0.07 ▲
补阳还五汤+Compound C 组	0.55±0.08 ▲#	0.67±0.07 ▲#	0.78±0.06 ▲#

注：与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$;与补阳还五汤高剂量组比较,# $P<0.05$ 。

龙、川芎等组成,其中黄芪为君药,补气为主,推动血液运行;当归为臣药,与赤芍、地龙、川芎合用,可增强活血化瘀的效果,与脑卒中气虚、血瘀阻络的病因相应。临床研究已经证实补阳还五汤可改善缺血性脑卒中患者神经和认知功能^[5,13-14]。现代药理研究也发现,黄芪及其主要成分(黄芪甲苷、多糖)可减轻脑缺血再灌注损伤^[15];当归的有效成分阿魏酸具有抗氧化、防止血栓形成等作用^[16]。本研究通过构建 MCAO 大鼠模型来模拟缺血性脑卒中,结果显示,模型大鼠出现明显的认知功能障碍,补阳还五汤干预后大鼠学习、记忆能力增强,脑梗死面积减少,进一步证明了补阳还五汤对大鼠认知功能的改善作用。

海马区是大脑处理学习与记忆的主要区域,与认知功能密切相关。本研究发现模型大鼠海马 CA1 区细胞结构破坏,线粒体肿胀,自噬小体形成最少,说明大鼠自噬被抑制。研究发现,自噬可能是缺血性脑卒中的关键调节因子,与认知障碍有关^[17-18],自噬激活可减少局部缺血后神经退行性损伤^[19],但过度的自噬可能加剧脑损伤^[20]。赵欣等^[10]发现补阳还五汤可诱导脑卒中大鼠皮质缺血区自噬,稳定线粒体功能,发挥神经保护作用;而郭晓辉等^[21]却发现现在脊髓缺血再灌注过程中,补阳还五汤可抑制细胞自噬,

保护神经细胞。本研究结果显示，补阳还五汤干预后大鼠自噬小体和溶酶体数量增多，提示补阳还五汤在缺血性脑卒中后可激活自噬。

mTOR 是细胞生长、自噬、翻译和存活的关键调节剂，mTOR 激活后，可通过调节下游通路蛋白（如 LC3-II、p62、Beclin-1）调节细胞自噬和凋亡^{〔22-23〕}。Singh 等^{〔24〕}发现，给予阿尔茨海默病大鼠 mTOR 通路抑制剂（雷帕霉素）可降低 p-mTOR、p62 蛋白表达，升高 Beclin-1、LC3-II 表达，诱导自噬激活，提高大鼠的认知能力。AMPK 和 Ulk1 是哺乳动物的自噬启动因子^{〔25〕}，AMPK 和 mTOR 通过 Ulk1 的协同磷酸化来调节缺血诱导的自噬，AMPK 活化后可抑制 mTOR 磷酸化，使 mTOR 与 Ulk1 解离，促进自噬发生^{〔26〕}。本研究发现，补阳还五汤可升高 Beclin-1 和 LC3-II/LC3-I、p-AMPK/AMPK 蛋白表达，降低 p62、p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达；而 Compound C 可逆转补阳还五汤对自噬的激活作用，提示补阳还五汤可能通过 AMPK/mTOR 通路诱导自噬激活。

综上所述，补阳还五汤可能通过 AMPK/mTOR 通路激活自噬，改善 MCAO 大鼠认知功能，但其能否通过其他途径调节自噬，改善脑卒中后认知功能障碍，有待进一步深入研究。

参考文献：

[1] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1736-1788.

[2] Chen X, Jiang H. Tau as a potential therapeutic target for ischemic stroke [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (24) : 12827-12843.

[3] Wei L K, Quan L S. Biomarkers for ischemic stroke subtypes: A protein-protein interaction analysis [J]. *Comput Biol Chem*, 2019, 83: 107116.

[4] Jiang C, Xu Y C, Zhang W, *et al.* Effects and safety of Buyang-Huanwu Decoction for the treatment of patients with acute ischemic stroke: A protocol of systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(23) : e20534.

[5] 张慧垒. 补阳还五汤联合头针对脑梗死后认知障碍患者 MoCA 评分及 MMSE 评分的影响 [J]. *实用中医内科杂志*, 2020, 34(5) : 71-73.

[6] Chen X, Chen H S, He Y B, *et al.* Proteomics-guided study on Buyang Huanwu Decoction for its neuroprotective and neurogenic mechanisms for transient ischemic stroke: Involvements of EGFR/PI3K/Akt/Bad/14-3-3 and Jak2/Stat3/Cyclin D1 signaling cascades [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57 (10) : 4305-4321.

[7] Wallings R L, Humble S W, Ward M E, *et al.* Lysosomal dysfunction at the centre of Parkinson's disease and frontotemporal dementia/amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Trends*

Neurosci, 2019, 42(12) : 899-912.

[8] Sarkar C, Jones J W, Hegdekar N, *et al.* PLA2G4A/cPLA2-mediated lysosomal membrane damage leads to inhibition of autophagy and neurodegeneration after brain trauma [J]. *Autophagy*, 2020, 16(3) : 466-485.

[9] Pan G Y, Jin L Q, Shen W M, *et al.* Treadmill exercise improves neurological function by inhibiting autophagy and the binding of HMGB1 to Beclin1 in MCAO juvenile rats [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117279.

[10] 赵欣, 姬孟艳, 董强. 补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠神经元自噬的保护作用及机制分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(9) : 910-914.

[11] 梁自强, 邓洁, 袁勇, 等. 香青兰总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 mTOR 信号通路及相关自噬蛋白水平的影响 [J]. *石河子大学学报 (自然科学版)*, 2020, 38 (4) : 513-518.

[12] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13) : 3127-3133.

[13] 向宪文, 刘西建. 补阳还五汤联合经颅磁刺激治疗脑卒中后认知功能障碍临床研究 [J]. *陕西中医*, 2020, 41 (7) : 885-887.

[14] 杨素婷. 补阳还五汤加减治疗缺血性脑卒中恢复期气虚血瘀证疗效观察 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2020, 8 (24) : 164; 167.

[15] Ni G X, Liang C, Wang J, *et al.* Astragaloside IV improves neurobehavior and promotes hippocampal neurogenesis in MCAO rats though BDNF-TrkB signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110353.

[16] 龚婉, 陈晓玲, 周莉, 等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3) : 94-99.

[17] Yi L T, Dong S Q, Wang S S, *et al.* Curcumin attenuates cognitive impairment by enhancing autophagy in chemotherapy [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 136: 104715.

[18] Castellazzi M, Patergnani S, Donadio M, *et al.* Autophagy and mitophagy biomarkers are reduced in sera of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1) : 20009.

[19] Wu J, Li Y, Yang P, *et al.* Novel role of carbon monoxide in improving neurological outcome after cardiac arrest in aged rats: Involvement of inducing mitochondrial autophagy [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(9) : e011851.

[20] Corti O, Blomgren K, Poletti A, *et al.* Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases [J]. *J Neurochem*, 2020, 154 (4) : 354-371.

[21] 郭晓辉, 卜保献, 李艳侠, 等. 补阳还五汤对脊髓缺血再灌注损伤后细胞自噬相关蛋白影响的研究 [J]. *新中医*, 2020, 52(7) : 33-36.

[22] Fernández Á F, Sebti S, Wei Y, *et al.* Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice

[J]. *Nature*, 2018, 558(7708): 136-140.

[23] Shim M S, Nettesheim A, Hirt J, *et al.* The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1248-1261.

[24] Singh A K, Kashyap M P, Tripathi V K, *et al.* Neuroprotection through rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against amyloid- β -induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 5815-5828.

[25] Liu J, Long S Y, Wang H, *et al.* Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 336.

[26] Wang F F, Cao M, Fan M J, *et al.* AMPK-mTOR-ULK1 axis activation-dependent autophagy promotes hydroxycamptothecin-induced apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4302-4315.

美洲大蠊提取物对脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞炎症的抑制作用

陆西星^{1,2}, 施正梅^{2#}, 祁 麟¹, 何俊丽¹, 王家云¹, 周翠玲¹, 何丽明^{1,2,*}, 张成桂^{2,3*}
(1. 大理大学第一附属医院口腔科, 云南 大理 671000; 2. 大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000; 3. 药用昆虫资源开发与综合利用工程研究中心, 云南 大理 671000)

摘要: **目的** 探究美洲大蠊提取物对脂多糖 (LPS) 刺激人牙周膜成纤维细胞 (HPDLFs) 炎症的抑制作用。**方法** 采用原代培养法获得 HPDLFs 细胞, 经免疫组化鉴定为牙周膜成纤维细胞。分别以 600、300、150、75、37.5、18.25 $\mu\text{g/mL}$ 美洲大蠊水提物和醇提物进行处理, 采用 MTT 法检测 12、24、36、48 h HPDLFs 细胞存活率, 选择合适的实验时间及剂量。建立 LPS 诱导牙周膜成纤维细胞炎症模型, 相应剂量药物给药, RT-qPCR 法检测 *IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 相对表达, ELISA 法检测 *IL-1 β* 、*IL-6*、TNF- α 、iNOS 水平, Western blot 法检测 p-NF- κB 、NF- κB 、p-p38、p38 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 在 36 h、150 $\mu\text{g/mL}$ 剂量以下, 美洲大蠊水提物、醇提物组细胞存活率随剂量升高而增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 LPS 组比较, 美洲大蠊水提物和醇提物组细胞 *IL-6*、*IL-1 β* mRNA 表达, TNF- α 、*IL-6* 水平, p-NF- κB 、NF- κB 、p-p38、p38 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 美洲大蠊提取物可能通过抑制 NF- κB 活化, 从而抑制 LPS 诱导的 HPDLFs 细胞释放 *IL-6*、TNF- α 等炎症因子, 进而抑制炎症反应, 且美洲大蠊水提物效果优于醇提物。

关键词: 美洲大蠊; 牙周膜成纤维细胞; 牙周炎; 脂多糖; 炎症; NF- κB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1314-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.049

牙周炎是一种以牙周结缔组织破坏及牙槽骨吸收为特点的慢性炎症性口腔疾病, 它也是造成牙齿缺失并影响口腔健康的主要因素^[1]。牙菌斑生物膜中的细菌及其产物是牙周病的始动因子, 细菌分泌的脂多糖 (LPS) 激活宿主的免疫炎症反应, *IL-1 β* 、TNF- α 等表达升高, 并引起 MMPs 过度表达, 导致牙周软、硬组织逐渐形成不可逆性的破坏, 因此抑制炎症及促进牙周膜组织的再生是逆转牙周炎的关键^[2-3]。有关文献及课题组前期研究发现, 美洲大蠊乙醇提取物和水提物均有抗炎及促进口腔溃疡、胃溃疡和结肠黏膜损伤愈合的作用^[4-6]。本研究构建了人源性牙周

膜成纤维细胞的炎症模型, 进一步评价美洲大蠊提取物的抗炎作用, 以期为美洲大蠊应用于口腔牙周炎疾病的原位治疗提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人源性牙周膜成纤维细胞为原代培养细胞。

1.2 药物

1.2.1 美洲大蠊水提物 取美洲大蠊成虫的干燥全体 (1.2 kg), 粉碎后加 10 倍量纯水, 95 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 3 次, 每次 2 h, 收集提取液, 浓缩至 1.15 g/mL 左右, 加入 95% 乙醇, 调整含醇量为 50% ~ 70%, 搅拌 30 min, 冷藏室中静

收稿日期: 2022-09-09

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2020J0581); 云南省地方本科高校基础研究联合专项 (202001BA070001-044)

作者简介: 陆西星 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15087477213, E-mail: LXX15087477213@163.com

#共同第一作者: 施正梅 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 18214194674, E-mail: szm18214194674@163.com

*通信作者: 何丽明 (1975—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事中药抗牙周炎研究。Tel: 13987228988, E-mail: 1962334769@qq.com

张成桂 (1978—), 男, 博士, 教授, 研究方向免疫药理学。Tel: 18608729395, E-mail: chenggui_zcg@163.com