

冠脉通片对脑缺血再灌注大鼠 TLR2 通路 ERK 与 p38 蛋白表达的影响

张翠香¹ 刘建勋¹ 李 丹¹ 李 磊¹ 付建华¹ 侯金才¹ 杜雪梅² 张发昌²

摘要 目的 探讨脑缺血再灌注后炎症级联反应中 Toll 样受体 2 (TLR2) 通路的作用机理和冠脉通片对脑组织损伤保护作用的分子机制。**方法** 采用栓线法阻断/放开大脑中动脉法制备脑缺血再灌注损伤模型。灌胃给药,分为冠脉通片高剂量组(1 200 mg/kg)、中剂量组(600 mg/kg)和低剂量组(300 mg/kg),阳性对照药用达纳康(20 mg/kg)。各组取右侧大脑组织,10%中性甲醛固定,免疫荧光染色法检测 TLR2 的表达;另取右侧大脑组织超声破碎提取总蛋白,用 Western blot 法检测细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phospho-extracellular regulated protein kinases, p-ERK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶[p38-mitogen activated protein kinases, p38-MAPKs (p38)]、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶[phospho-p38-mitogen activated protein kinases, p-p38-MAPKs (p-p38)]的表达;腹主动脉取血,用 ELISA 法检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)在脑组织和血清中的含量。**结果** 与假手术组比较,模型组 TLR2 的表达增高,ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白表达上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),脑组织和血清中 IL-6 和 IL-1 β 的含量均增加 ($P < 0.01$);冠脉通片中、高剂量组均下调了 TLR2、ERK、p-ERK、p38、p-p38 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);降低了脑组织和血清中 IL-6 和 IL-1 β 的含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** TLR2 通路参与了脑缺血再灌注损伤,冠脉通片通过下调 TLR2 通路 ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白及细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 含量实现了对神经元的保护作用。

关键词 脑缺血再灌注;Toll 样受体 2;细胞外调节蛋白激酶;p38 丝裂原活化蛋白激酶;白细胞介素

Effect of Guanmaitong Tablet on ERK and p38 Protein of TLR2 Pathway Expression in Cerebral Ischemia/Reperfusion Rats: an Experimental Study ZHANG Cui-xiang¹, LIU Jian-xun¹, LI Dan¹, LI Lei¹, FU Jian-hua¹, HOU Jin-cai¹, DU Xue-mei², and ZHANG Fa-chang² ¹ Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing (100091), China; ² Tianjin Tongrentang Group Corporation Limited, Tianjin (300204), China

ABSTRACT Objective To explore the inflammatory cascade mechanism through Toll like receptor 2 (TLR2) pathway after cerebral ischemia/reperfusion, and to study molecular mechanisms of Guanmaitong (GMT) Tablet for protecting brain damage. **Methods** We used bolt-line method to block/release the middle cerebral artery, causing cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury model. GMT Tablet was given by gastrogavage. Rats were then divided into the high dose GMT group (1200 mg/kg), the middle dose GMT group (600 mg/kg), the low dose GMT group (300 mg/kg), the positive control group (Tanakan, 20 mg/kg). Their right brain tissues were fixed in 10% neutral formalin. TLR2 expressions were detected by immunofluorescence staining. The total protein was extracted from right brain tissues by ultrasonication. Expression levels of extracellular regulated protein kinases (ERK), phospho-extracellular regulated

基金项目:国家科技重大专项资助项目(No. 2012zx09301002-004, 2012zx09103201-049)

作者单位:1.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所中药药理北京市重点实验室(北京 100091);2.天津同仁堂集团股份有限公司(天津 300204)

通讯作者:刘建勋, Tel:010-62835622, E-mail:xiujx0324@sina.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 06. 0712

protein kinases (p-ERK), p38-mitogen activated protein kinases (p-ERK), phospho-p38-mitogen activated protein kinases [p-p38-MAPKs (p-p38)] were assessed by Western blot. Abdominal aortic blood was withdrawn. IL-6 and IL-1 β levels were detected by ELISA in brain tissues and serum. Results Compared with the sham-operation group, expression levels of TLR2, ERK, p-ERK, p38, p-p38 protein were up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and contents of IL-6 and IL-1 β in brain tissues and serum were increased in the model group ($P < 0.01$). Expression levels of TLR2, ERK, p-ERK, p38, p-p38 were down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and contents of IL-6 and IL-1 β were reduced in brain tissues and serum in middle and high dose GMT groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions TLR2 pathway was involved in cerebral I/R injury. GMT protected neurons by down-regulating protein expressions of TLR2, ERK, p-ERK, p38, p-p38 and contents of IL-1 β and IL-6.

KEYWORDS cerebral ischemia-reperfusion; Toll like receptor 2; extracellular regulated protein kinases; p38-mitogen activated protein kinases; interleukin

“损伤级联反应”是脑血管病高致死率、致残率的核心病理,级联反应中大量细胞毒性成分诱导的氧自由基和其他介质导致了细胞因子和致炎症酶原产生,由此导致了炎症反应^[1]。炎症因子通过识别病原相关的分子模式及某些内源性配体,激活 Toll 样受体 2 (TLR2) 信号尤其是 TLR2 信号转导,再通过 MyD88 途径激活下游 MAPK 通路,进而激活细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 通路和 p38 通路^[2]。本实验利用冠脉通片对大鼠脑缺血再灌注模型进行干预,阐述脑缺血再灌注炎症损伤机制和冠脉通片的作用机制。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠 96 只,7~8 周龄,200~220 g 体重,雄性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2006-0009。SPF 级实验动物室饲养。

2 药物 冠脉通片(组成:枸杞子、何首乌、淫羊藿、红花、石菖蒲、丹参、桑寄生、冰片,每片 0.3 g,天津同仁堂集团股份有限公司提供,批号:20111201),使用时用无菌去离子水配制。阳性对照药:达纳康(银杏叶萃取物片),40 mg/片,法国博福-益普生制药有限公司生产,批号:S024),使用时用无菌去离子水配制。

3 试剂 白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 的 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司);TLR2、ERK、p-ERK、p38、p-p38、GAPDH 一抗(英国 ABCAM 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗(Sigma 公司);山羊抗小鼠 DYLIGHT594 二抗(康为世纪生物试剂公司)。

4 仪器 HH-SY21-N1 电热恒温水浴锅(上海医

疗器械厂),BioTek 微孔板检测系统(SYNERGY4),DM500 荧光显微镜(德国莱卡公司),Bio-Rad Gel Doc XR 加凝胶成像系统(美国伯乐公司)。0.24 mm 尼龙线(北京沙乐生物技术有限公司)。

5 方法

5.1 动物分组及模型制备 将 SD 大鼠按照随机数字表法分为 6 组,假手术组、模型组、达纳康组(20 mg/kg),冠脉通片高剂量(1 200 mg/kg)、中剂量(600 mg/kg)、低剂量(300 mg/kg),剂量确定依据文献[3]。每组 16 只,其中 8 只用于 TLR2 的免疫荧光实验,另 8 只用于 Western blot 和 ELISA 实验。手术前 7 天灌胃给药,模型、假手术组给予无菌纯净水灌胃,给药体积 1 mL/kg。

参考 Koizumi J 方法^[4]制备局灶脑缺血再灌注动物模型,动物以 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉(350 mg/kg 体重),仰卧位固定,分离右侧颈总动脉(right common carotid artery, RCCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),结扎 ECA, RCCA 用丝线打活结暂时阻断,用动脉夹夹闭 ICA 远心端后,于 RCCA 剪开切口,插入直径为 0.24 mm 的尼龙线,致使大脑中动脉阻塞缺血。假手术组只分离 RCCA 结扎 ECA,不插尼龙线。模型组在缺血 1.5 h 后轻轻抽出尼龙线,使之退出到颈总动脉剪口处即可。缺血后 6 h 再次灌胃给予受试药物,模型组、假手术组给予等量纯净水。室温维持(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。然后进行神经行为评分:缺血后 6 h,参考 Koizumi J 方法^[4],进行行为学评分,提起鼠尾后两前肢向前平伸并无其他神经缺损症状的为 0 分;提起鼠尾后左肩内收且无其他症状的为 1 分;推动大鼠向左侧,左肢无力并向左侧偏行的评为 2 分;具有 2 分症状并有向左转圈行走的评为 3 分。缺血后 24 h 再次评

分 1 次。神经功能缺损评分 ≥ 2 分为模型成功。

5.2 TLR2 免疫荧光染色观察 每组 8 只,心脏灌注固定后取大鼠右侧脑组织,以海马区为中心取材,组织经 10% 中性甲醛固定后脱水、透明、石蜡包埋,常规切片 3 μm ,脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭 10 min,滴加 TLR2 (1:200) 一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, PBS 洗 3 次,加山羊抗小鼠 DYLIGHT594 二抗室温 30 min, PBS 洗 4 次,无淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察。

5.3 ERK、p-ERK、p38、p-p38 水平检测 采用 Western blot 实验。每组取右侧大脑半暗带区和核心区脑组织,加入细胞裂解液 (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4; NaCl 150 mol/L, 1% NP-40, 0.1% SDS) 中,按 100:1 的比例加入复合磷酸酶抑制剂和复合蛋白酶抑制剂。匀浆后超声,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$,离心 10 min,取上清,BCA 法进行蛋白定量。总蛋白中加入 Loading Buffer,煮沸变性 5 min,进行 10% SDS-PAGE 电泳,转膜。牛奶封闭 1 h, TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;加入 ERK (1:2 000)、p-ERK (1:1 000)、p38 (1:2 000)、p-p38 (1:1 000)、GAPDH (1:3 000) 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗,室温下孵育 30 min。TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;ECL 化学发光剂显影,使用 Bio-RAD Gel Doc XR 加凝胶成像系统扫描分析。ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白水平用该条带灰度与 GAPDH 的比值表示。

5.4 脑组织 IL-6、IL-1 β 表达测定 每组 8 只,取 0.1 g 右侧大脑顶叶,按 1:10 加入生理盐水,冰上超声破碎,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min,取上清。标准品按照 ELISA 试剂盒说明书浓度梯度配制,样品

每孔均加 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,甩板后不洗直接加 A 液孵育 30 min,洗液洗 5 次,每次 3 min,加 B 液继续孵育 30 min,洗液洗 5 次,每次 3 min,加显色液 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min,加终止液,450 nm 处检测 OD 值,根据标准曲线计算 IL-6、IL-1 β 浓度。

5.5 血清 IL-6、IL-1 β 测定 腹主动脉取血,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$,离心 15 min,取上清。后续实验与脑组织 IL-6、IL-1 β 测定方法相同。

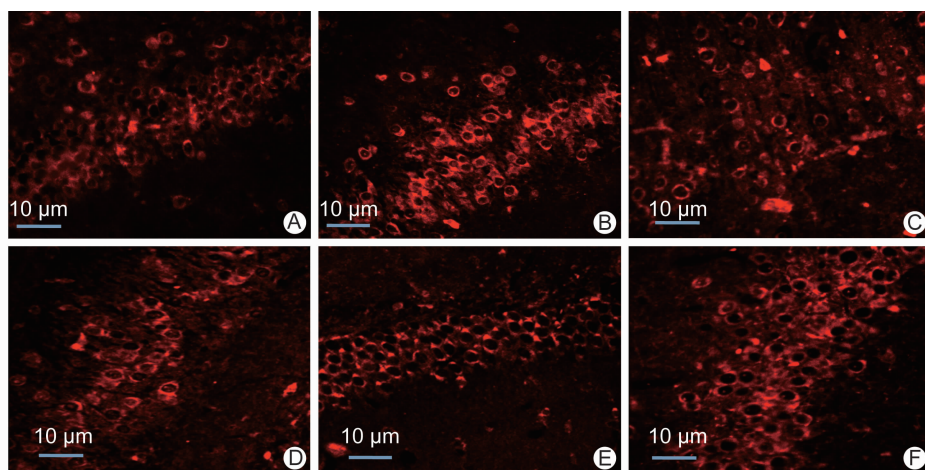
6 统计学方法 采用统计学软件 SPSS 11.5 分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠脑组织海马区 TLR2 表达比较 (图 1) 与假手术组比较,模型组 TLR2 表达明显增高,红色荧光强度增高;达纳康组与冠脉通片高、中、低剂量组 TLR2 表达均下调,以冠脉通片高剂量组最优。

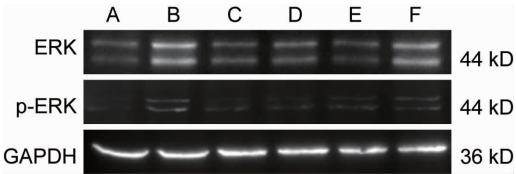
2 各组大鼠脑组织 ERK、p-ERK、p38、p-p38 表达比较 (图 2 - 5) 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 ERK、p-ERK、p38、p-p38 表达均增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);达纳康与冠脉通片各剂量组 ERK、p-ERK、p38、p-p38 表达下调,以冠脉通片中、高剂量组为优 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各组大鼠血清及脑组织中 IL-6、IL-1 β 表达比较 (表 1) 模型组大鼠血清及脑组织中 IL-6、IL-1 β 的表达高于假手术组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);达纳康组较模型组 IL-6、IL-1 β 表达下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,冠脉通片中、高剂量组 IL-6 表达均下调,冠脉通片各剂量组 IL-1 β 表



注:A 为假手术组,B 为模型组,C 为达纳康组,D 为冠脉通片高剂量组,E 为冠脉通片中剂量组,F 为冠脉通片低剂量组

图 1 各组脑组织海马区 TLR2 表达 (DYLIGHT594 染色, $\times 200$)



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为达纳康组，D 为冠脉通片低剂量组，E 为冠脉通片中剂量组，F 为冠脉通片高剂量组；图 3 同

图 2 各组大鼠 ERK 和 p-ERK 的表达

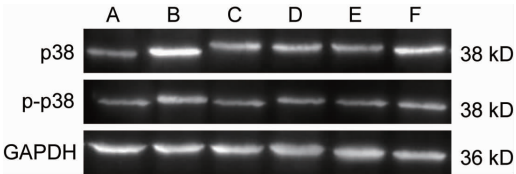
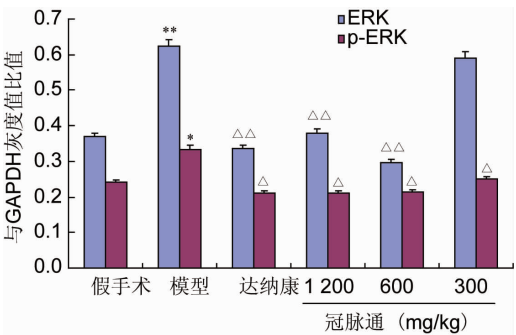


图 3 各组大鼠 p38 和 p-p38 的表达



注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；图 5 同

图 4 各组 ERK、p-ERK 与 GAPDH 灰度比值

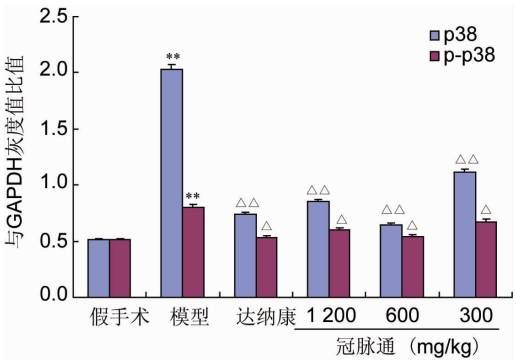


图 5 各组 p38、p-p38 与 GAPDH 灰度比值

达亦下调，差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

脑缺血再灌注损伤的机制比较复杂，涉及能量代谢障碍、局部酸中毒、炎症介质释放、自由基损伤、细胞内钙离子超载、兴奋性氨基酸的毒性作用等一系列的级联反应，其中炎症是引起组织损伤的重要因素^[1]。炎症介质释放会被细胞膜上及膜内的 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 识别，启动天然免疫应答^[5]。其中 TLR2 通路是脑内重要的免疫分子，它被其相应配体激活后促使前炎症因子产物释放和其后的免疫应答反应发生，进而激活 MAPK 通路^[6]。从而 ERK-MAPK 与 p38-MAPK 通路被活化，其蛋白磷酸化，转入细胞核，引发多种基因及细胞因子的表达^[7]。ERK 是细胞受外界刺激时决定命运的关键性因素，它能促进细胞增殖或凋亡，或决定细胞向终末期分化，同时，ERK 与细胞炎症反应密切相关，它参与应急刺激、细菌产物、炎症介质等引起的细胞反应^[8]。p38 是炎症损伤中重要的蛋白之一，p38 通路的激活可产生 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等炎症因子，加重组织的损伤^[9]。

本实验结果表明 TLR2 在模型组表达增加，TLR2 通路被激活，其下游 ERK 蛋白及 p-ERK 的表达均增加，p38 和 p-p38 的表达也较假手术组增高，炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的分泌增多，提示 TLR2 - MAPK - ERK 通路与 TLR2 - MAPK - p38 通路参与了脑缺血再灌注损伤。冠脉通片各组均不同程度地下调了 TLR2 及其通路中 ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白和炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 表达，以中剂量组 (600 mg/kg) 和高剂量组 (1 200 mg/kg) 为优。

综上，TLR2 - MAPK - ERK 通路与 TLR2 - MAPK - p38 通路参与了脑缺血再灌注损伤，冠脉通片可能通过下调 TLR2 及通路 ERK、p-ERK、p38、p-p38 蛋白和细胞因子 IL-1 β 与 IL-6 表达实现了对神经元的保护作用。

表 1 各组大鼠血清及脑组织 IL-6 与 IL-1 β 表达比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	药量	n	血清		脑组织	
			IL-6	IL-1 β	IL-6	IL-1 β
假手术	—	8	64.26 $\pm$ 18.54	40.12 $\pm$ 6.69	395.24 $\pm$ 50.84	154.57 $\pm$ 7.90
模型	—	8	211.86 $\pm$ 37.20 *	91.43 $\pm$ 13.08 *	871.58 $\pm$ 49.20 *	251.86 $\pm$ 15.86 *
达纳康	20 mg/kg	8	144.77 $\pm$ 48.45 Δ	50.64 $\pm$ 4.99 $\Delta\Delta$	551.78 $\pm$ 27.60 $\Delta\Delta$	179.79 $\pm$ 35.84 $\Delta\Delta$
冠脉通片高剂量	1 200 mg/kg	8	85.13 $\pm$ 41.60 $\Delta\Delta$	41.85 $\pm$ 18.04 $\Delta\Delta$	497.36 $\pm$ 23.35 $\Delta\Delta$	192.05 $\pm$ 31.30 $\Delta\Delta$
冠脉通片中剂量	600 mg/kg	8	116.44 $\pm$ 39.97 Δ	48.62 $\pm$ 21.73 $\Delta\Delta$	508.55 $\pm$ 24.63 $\Delta\Delta$	199.25 $\pm$ 17.12 $\Delta\Delta$
冠脉通片低剂量	300 mg/kg	8	207.38 $\pm$ 103.81	78.17 $\pm$ 10.42 Δ	739.64 $\pm$ 57.49 Δ	212.51 $\pm$ 6.12 Δ

注：与假手术组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

参 考 文 献

- [1] 廖维靖. 脑缺血损伤的病理生理机制—损伤级联反应[J]. 国外医学·脑血管疾病分册, 1998, 6(4): 197-202.
- [2] An H, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells[J]. Immunology, 2002, 106(1): 38-45.
- [3] 张翠香, 刘建勋, 李丹, 等. 冠脉通片对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌酶及心肌细胞凋亡的影响[J]. 中医杂志, 2014, 55(20): 1760-1763.
- [4] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema, a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Stroke, 1986, 13(8): 1-8.
- [5] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 805-820.
- [6] Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll like receptor (TLR)2 and TLR4[J]. J Biol Chem, 2002, 277(17): 15028-15034.
- [7] 王巧云, 刘凤, 吴峰阶, 等. 人参皂苷 Rg1 对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠海马 P-ERK1/2 与 P-JNK 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 229-235.
- [8] Jung JY, Yoo CI, Kim HT, et al. Role of mitogen activated protein kinase (MAPK) in troglitazone induced osteoblastic cell death[J]. Toxicology, 2007, 234(12): 73-82.
- [9] Zou LY, Qin HY, He YT, et al. Inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase attenuates cerebral ischemic injury in Swedish mutant amyloid precursor protein transgenic mice[J]. Neural Regen Res, 2012, 7(14): 1088-1094.

(收稿:2014-01-01 修回:2015-03-14)

第十八届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会征文通知

中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会主办,兰州军区兰州总医院承办,甘肃省医学会外科学专业委员会、甘肃省中西医结合学会大肠肛门病专业委员会、《中华胃肠外科杂志》、《结直肠肛门外科杂志》协办的第十八届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会将于2015年9月4—6日在甘肃省兰州市召开。现征文如下。

征文内容 (1)大肠肛门病基础研究的新动态、新进展、新成果;(2)结直肠肛门肿瘤的多学科治疗理念;(3)中西医结合治疗排便障碍性疾病及炎性肠病的临床疗效及经验;(4)中西医结合治疗肛周疾病的新方法、新经验;(5)微创技术在结直肠外科领域的应用优势;(6)快速康复理念在结直肠肛门外科的应用;(7)便秘的临床基础及外科治疗;(8)内镜下结直肠疾病的治疗进展;(9)中医药在肛门外科的治疗优势;(10)大肠肛门病护理的新技术、新经验。

征文要求 (1)文章:针对征文内容的相关论著、综述、短篇、个案等中英文稿件均可,以 Word 文档格式保存,一般不超过 4 000 字。注明作者姓名、通信地址、工作单位、E-mail、联系电话。(2)手术录像:手术录像时间不超过 10 分钟,采用 MPG 或 WMA 格式;录像注明术者、工作单位、病例相关信息。(3)图片展览:1~4 张图片,以结直肠肛门良性疾病、恶性肿瘤、功能性疾病为主题。可以为罕见疾病、诊治方法、手术方式等;附简要文字说明。图片要求:对焦清晰、尺寸不小于 800×600 px,分辨率不低于 300dpi,格式为 jpg、tif、png。

投稿方式 (1)登陆 www.2015cscaim.com 可在线投稿;(2)E-mail: xyjh2015@163.com ;(3)联系人:徐明(13919917550)、吴伟强(15117202099)、宋枫(13919760144);(4)地址:兰州军区兰州总医院(甘肃省兰州市七里河区南滨河路 333 号)。

截稿时间 2015 年 8 月 15 日。