

· 基础研究 ·

舒脑欣滴丸对脑缺血再灌注大鼠肠道炎症微环境及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响肖杰^{1, 2, 3} 杨立基^{1, 2, 3} 赵琳娜^{1, 2} 刘小芹^{1, 2} 姜萌萌^{1, 2} 张军平^{1, 2} 徐士欣^{1, 2}

摘要 目的 研究对脑缺血再灌注大鼠肠道炎症微环境的影响及相关机制。方法 选择 48 只 SD 大鼠, 采用线栓法制备短暂性大脑中动脉闭塞 (tMCAO) 大鼠模型。32 只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组和中药组, 每组 16 只。另设 16 只 SD 大鼠为假手术组。脑缺血再灌注 24 h 后中药组给予舒脑欣滴丸 [45 mg/(kg·d)] 连续灌胃 7 天, 假手术组和模型组给予等体积生理盐水。术后第 1、3、7、14、21 天进行足失误神经行为学评价。第 7、21 天, HE 染色观察脑和结肠组织形态学变化; RT-PCR 检测结肠中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-10、转化生长因子- β (TGF- β) mRNA 表达水平; 免疫荧光染色观察结肠中 Toll 样受体 4 (TLR4) 蛋白表达变化; Western Blot 检测结肠 TLR4、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65)、磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65)、核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α) 蛋白表达量。结果 与假手术组比较, 模型组各个时间点足失误评分均升高 ($P < 0.05$), 病理结果显示模型组缺血半暗带皮质区和结肠的炎性浸润和病理损伤增加; 模型组第 7 天时, 结肠 IL-6、TNF- α 、IL-10 mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), TGF- β mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), TLR4、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 第 21 天时, 结肠 IL-6 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药组第 14 天和 21 天足失误评分明显降低 ($P < 0.05$), 缺血半暗带皮质区和结肠的炎性浸润和病理损伤减少; 中药组第 7 天结肠中 TNF- α 、IL-10 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 第 21 天结肠中 IL-6 mRNA 表达亦降低 ($P < 0.05$); 第 7 天 TLR4、p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。结论 舒脑欣滴丸可以改善脑缺血再灌注大鼠运动功能并减轻大脑病理损伤, 其分子机制可能是通过影响 TLR4/NF- κ B 信号通路调节肠道炎症微环境, 从而发挥神经保护作用。

关键词 舒脑欣滴丸; 脑缺血再灌注; 肠道炎症微环境; TLR4/NF- κ B 信号通路

Effect of Shunaoxin Dropping Pill on the Microenvironment of Intestinal Inflammation and TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in Cerebral Ischemia-Reperfusion Rats

XIAO Jie^{1, 2, 3}, YANG Li-ji^{1, 2, 3}, ZHAO Lin-na^{1, 2}, LIU Xiao-qin^{1, 2}, JIANG Meng-meng^{1, 2}, ZHANG Jun-ping^{1, 2}, and XU Shi-xin^{1, 2}
1 Medical Experimental Center, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300381); 2 National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin (300381); 3 Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (301617)

ABSTRACT Objective To study the effect of Shunaoxin Dropping Pill (SNXDP) on intestinal inflammatory microenvironment and its related mechanisms in cerebral ischemia reperfusion rats. **Methods** Forty-eight SD rats were selected, and transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) rat model was established by suture occlusion method. Totally successfully modeled 32 rats were randomly divided into the model group and the Chinese medicine (CM) group according to the random digit table, with 16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81774059); 天津市自然科学基金重点项目 (No. 19JCZDJC37100)

作者单位: 1. 天津中医药大学第一附属医院医学实验中心 (天津 300381); 2. 国家中医针灸临床医学研究中心 (天津 300381); 3. 天津中医药大学研究生院 (天津 301617)

通讯作者: 徐士欣, Tel: 022-27987795, E-mail: xushixin@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220707.056

rats in each group. Another 16 SD rats were selected as a sham operation group. After 24 h cerebral ischemia reperfusion, rats in the CM group were intragastrically administered with SNXDP ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Rat in the sham operation group and model group were given equal volume of normal saline. The medication lasted for 7 successive days. Neurobehavioral evaluation of foot failure was performed at day 1, 3, 7, 14, and 21. On day 7 and 21, HE staining was used to observe the histomorphological changes of brain and colon tissues. The expression of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-10, and transforming growth factor- β (TGF- β) mRNA in colon were detected by RT-PCR. The expression of toll-like receptor 4 (TLR4) protein in colon was observed by immunofluorescence staining; the expression of TLR4, nuclear factor-kappaB P65 (NF- κ B p65), phospho-NF-kappaB p65 (p-NF- κ B p65), I kappaB alpha ($I\kappa B\alpha$), and phosphorylation of I kappaB alpha (p-I $\kappa B\alpha$) protein in colon were determined by Western Blot. **Results** Compared with the sham operation group, foot fault score increased at all time points in the model group ($P < 0.05$). The pathological results showed that inflammatory infiltration and pathological damage in the ischemic penumbra cortex and colon were increased in the model group. The expression of IL-6, TNF- α , and IL-10 mRNA in colon increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the expression of TGF- β mRNA decreased ($P < 0.01$), the expression of TLR4, p-NF- κ B p65, and p-I $\kappa B\alpha$ protein increased at day 7 ($P < 0.01$), the expression of IL-6 mRNA in colon increased at day 21 in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the foot fault score was significantly lower in the CM group ($P < 0.05$), and the inflammatory infiltration and pathological injury of ischemic penumbra cortex and colon were decreased at day 14 and 21. The expression of TNF- α and IL-10 mRNA in colon decreased at day 7 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression of IL-6 mRNA in colon decreased at day 21 ($P < 0.05$), the expression of TLR4, p-NF- κ B p65, and p-I $\kappa B\alpha$ protein decreased at day 7 in the CM group ($P < 0.01$). **Conclusion** SNXDP can improve motor function and relieve pathological brain injury in cerebral ischemia reperfusion rats, and its molecular mechanism may be to regulate intestinal inflammatory microenvironment by affecting TLR4/ NF- κ B signaling pathway, thus exerting neuroprotective effect.

KEYWORDS Shunaoxin Dropping Pill; cerebral ischemia reperfusion; intestinal inflammatory microenvironment; TLR4/ NF- κ B signaling pathway

急性缺血性中风以其高致死率和高致残率成为全球性的公共卫生问题^[1]。有研究证实中风后肠道炎症微环境通过“肠-脑轴”可以直接影响神经功能的恢复^[2]。舒脑欣滴丸是古方佛手散的现代制剂,由川芎、当归两味药物组成,功擅理气活血、化痰止痛,临床上用于治疗中风疗效确切,但仍需要深入研究其作用机制^[3]。本研究旨在观察舒脑欣滴丸对脑缺血再灌注大鼠肠道炎症微环境的影响并探讨其作用机制。

材料与方法

1 动物 选择 64 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 220~240 g,8 周龄,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物许可证号: SCXK(京)2020-0004。饲养室内温度(21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 5)%,明暗周期各 12 h,且自由饮食饮水,实验前大鼠适应性饲养 3 天,大鼠造模前 12 h 禁水不禁食。本实验经天津中医药大学实验动物使用与管理委员会批准(No.TCM-LAEC2019038)。

2 药物 舒脑欣滴丸购自天津中医药大学第一附属医院(天津中新药业公司第六中药厂,42 mg/丸,批号: 678022)。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: Toll 样受体 4 (Toll-like receptor4, TLR4) 抗体(批号: 19811-1-AP)、核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor kappa B alpha, $I\kappa B\alpha$) 抗体(批号: 10268-1-AP), Proteintech 公司; 核因子 κ B p65 (nuclear factor kappa B p65, NF- κ B p65) 抗体(批号: A2547), ABclonal 公司; 磷酸化核因子 κ B p65 (phosphorylated nuclear factor kappa B p65, p-NF- κ B p65) 抗体(批号: 3033T), CST 公司; 磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 α (phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B alpha, p-I $\kappa B\alpha$) 抗体(批号: ab133462), Abcam 公司; 荧光二抗(批号: SA00003-2), 武汉三鹰生物技术有限公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(批号: P0131), Beyotime 公司; BCA 蛋白质定量试剂盒(批号:

AR1110)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号: AR0138)、特超敏 ECL 化学发光即用型底物(批号: AR1196)、HRP Conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit IgG (H+L)(批号: BA1054), Boster 公司; RNA 提取试剂盒(批号: R6812-01), Omega 公司; Proteinase K(批号: CW2572L)、HiFiScript cDNA Synthesis Kit(批号: CW2569M)、ULtraSYBR Mixture(批号: CW0957H), Cwbio 公司。

主要仪器: TP1020 型全自动脱水机、RM2135 型石蜡切片机、UC-7 型冰冻切片机(德国 Leica 公司); IX73P1F 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 165-8004 型电泳系统、1703930 转膜系统(美国 Bio-Rad 公司); Chemstudio 型凝胶成像系统(德国 AnalytikJena 公司); ProFlex 型梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司); LightCycler96 型实时定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

4 动物分组及干预方法 选择 48 只 SD 大鼠, 经 3% 异氟烷麻醉后, 采用 zea-Longa 线栓法^[4]改良制作短暂性大脑中动脉梗塞模型, 大鼠取仰卧位固定于鼠板, 行颈正中纵行切口后, 显露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA), 将 CCA、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和迷走神经钝性分离, 在 CCA 和 ECA 近心端处结扎血管, 动脉夹夹闭 ICA 近心端, 距离 ECA 和 ICA 分岔口 3 mm 的 CCA 处插入线栓, 松开动脉夹, 并通过颈内动脉向前推进, 以阻断大脑中动脉的起始处, 线栓插入长度约 17 mm, 缺血 90 min 后再灌注。于再灌注 24 h 后采用 Longa 评分, 评分为 1~3 分表示造模成功, 评分为 0 分和 4 分则剔除实验, 32 只造模成功, 造模成功率为 67%。将造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组和中药组, 每组 16 只。另选择 16 只 SD 大鼠为假手术组, 假手术只分离血管, 不进行血管结扎和线栓插入。每组分为 2 个亚组: 7 天亚组(n=6)和 21 天亚组(n=10)。再灌注 24 h 后给药, 中药组给予舒脑欣滴丸本研究根据人与大鼠体表面积折算法^[5]得出大鼠的临床等效剂量为 45 mg/(kg·d), 相当于 70 kg 成人所服剂量的 6.3 倍。临用前舒脑欣滴丸以 4.5 mg/mL 的浓度配比溶于 0.9% 浓度的氯化钠溶液, 按 45 mg/(kg·d) 剂量连续灌胃 7 天, 其余组灌胃等体积生理盐水。术后 3 天内模型组死亡 3 只大鼠, 中药组死亡 2 只大鼠, 术后第 10 天模型组死亡 1 只大鼠, 死亡原因均为颅底出血, 其后无大鼠死亡, 根据实验中动物死亡情况再次造模补齐各组数量。

5 检测指标及方法

5.1 动物行为学评价 术后第 1、3、7、14、21 天采用足失误测试^[6]评估大鼠神经功能障碍, 评分越高, 肢体障碍越重。将大鼠放置在长 120 cm, 梯级相距 4 cm 的梯子上爬行, 使用三级评分记录大鼠左前爪的下落深度: 0 分正常, 1 分为轻微滑动, 2 分为全滑。每组样本量为 10。

5.2 样本采集 于术后 7 天和 21 天, 3% 异氟烷麻醉大鼠, 纵向切开腹腔, 腹主动脉取血后, 左心室灌注 300 mL 预冷的生理盐水后, 再灌注 300 mL 遇冷的 4% 多聚甲醛, 迅速取结肠和完整脑, 浸泡于 4% 多聚甲醛, 用于本实验病理检测。用于分子生物学检测的样本, 采集时只进行生理盐水灌注, 采集完成后储存于 -80 °C 冰箱待用。

5.3 HE 染色 取浸泡在 4% 多聚甲醛固定液内的结肠和脑组织, 全自动脱水机脱水、石蜡包埋、切片(8 μm), 常规步骤进行 HE, 中性树脂封片。显微镜下观察组织病理改变并采集图片。每组样本量为 3。

5.4 RT-PCR 检测结肠细胞因子 mRNA 表达 依据说明书提取总 RNA, 检测浓度后采用 cDNA 反转录试剂盒进行逆转录, 反应条件: 42 °C 50 min, 85 °C 5 min, 4 °C 保持。然后进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C, 10 min; (95 °C, 10 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 32 s) × 40; 95 °C, 10 s; 65 °C, 60 s; 97 °C, 1 s; 37 °C, 30 s。以 GAPDH 为内参基因, 检测 IL-6、TNF-α、IL-10、TGF-β 的 mRNA 表达, 用 2^{-ΔΔCt} 法分析整理数据。引物序列如表 1。

5.5 免疫荧光化学染色及图像分析 取术后第 7 天结肠组织多聚甲醛固定过夜、蔗糖脱水、OCT 包埋、冰冻切片(8 μm)。0.2% Triton-100 透膜 10 min, 10% 山羊血清封闭 1 h, 一抗 TLR4

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物	长度 (bp)
GAPDH	上游: 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	264
	下游: 3'-AGTGGCAGTGATGGCATGGACT-5'	
IL-6	上游: 5'-GTCCGGAGAGGAGACTTAC-3'	163
	下游: 3'-ACAGTGCATCATCGCTGTT-5'	
TNF-α	上游: 5'-CTGTGCCTCAGCCTCTTCTC-3'	126
	下游: 3'-ACTGATGAGAGGGAGCCCAT-5'	
IL-10	上游: 5'-TTCCCTGGGAGAGAAGCTGA-3'	144
	下游: 3'-ATGGCCTTGATAGACCTTTGT-5'	
TGF-β	上游: 5'-CACTCCCGTGGCTTCTAGTG-3'	145
	下游: 3'-GGACTGGCGAGCCTTAGTT-5'	

(1:200) 避光孵育过夜后, 加荧光二抗 (1:200) 避光孵育 1 h, 以含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液标记细胞核并封片, 荧光显微镜观察并采集图片。

5.6 蛋白免疫印迹检测结肠组织中 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、p-IκBα 蛋白表达 取冻存于 -80℃ 的术后第 7 天结肠组织, 称定约 100 mg 于研钵内, 用液氮研磨后加入混有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上静置 15 min, 离心 30 min (4℃、3 000 r/min) 取上清。依据说明书进行蛋白定量及变性。常规电泳、转膜、室温封闭 1.5 h, 一抗 (1:1 000) 4℃ 下孵育过夜, 1×TBST 洗涤 3 次, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 1×TBST 洗涤 3 次后加 ECL 显影液, 以 β-action 为内参, 用凝胶成像系统采集并分析图片。

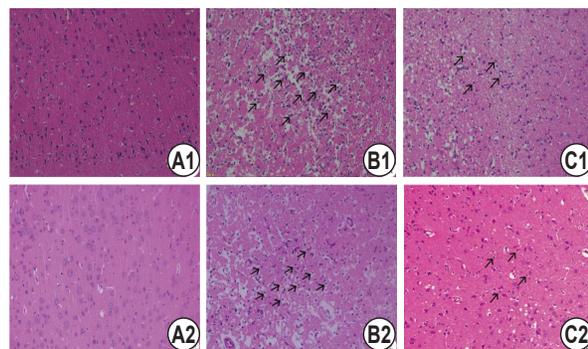
6 统计学方法 使用 SPSS 20.0 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。足部障碍采用重复测量方差分析, 各组数据需满足正态性和球形度检验, 其余实验数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠肢体功能障碍评分比较 (表 2) 假手术组大鼠各个时间点均无肢体功能障碍, 评分为 0; 与假手术组比较, 模型组大鼠各时点失误评分增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 造模后第 1、3、7 天, 中药组评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 14、21 天时中药组评分降低 ($P < 0.05$)。

2 HE 染色结果

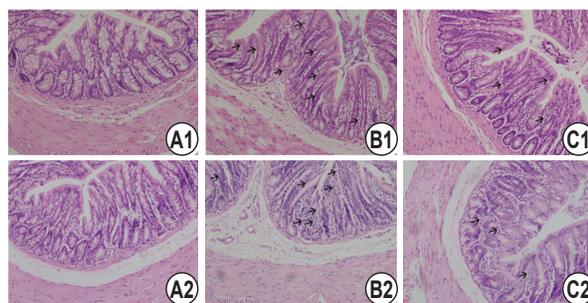
2.1 脑组织 HE 染色结果 (图 1) 在不同时间点, 假手术组大鼠皮质区均结构完整, 神经元排列整齐, 胞核居中, 染色清晰, 胞质饱满。模型组大鼠第 7 天时可见脑组织损伤严重, 神经元变性和坏死, 核固缩, 排列紊乱, 胞浆染色变深; 第 21 天时神经元数量减少, 核固缩加重。与模型组比较, 中药组大鼠第 7 天脑组织损伤程度减轻, 神经元变性程度减轻; 第 21 天时大鼠缺血半暗带损伤有明显修复, 神经元细胞明显增加。



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为中药组; A1~C1 为第 7 天 HE 染色; A2~C2 为第 21 天 HE 染色; 箭头指向为神经元核固缩

图 1 各组大鼠第 7、21 天脑缺血半暗带变化 (HE, ×200)

2.2 各组结肠 HE 染色结果比较 (图 2) 假手术组大鼠结肠黏膜结构完整, 肠腺排列整齐, 无炎性细胞浸润。模型组在第 7、21 天均可见明显的肠黏膜破坏、局部肠腺排列紊乱和炎性细胞浸润。与模型组比较, 第 7 天中药组肠黏膜损伤程度减轻, 肠腺紊乱有所恢复, 有少量炎性细胞浸润; 第 21 天结肠病理恢复更加明显。



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为中药组; A1~C1 为第 7 天 HE 染色; A2~C2 为第 21 天 HE 染色; 箭头指向为炎性细胞浸润

图 2 各组大鼠第 7、21 天结肠变化 (HE, ×200)

3 各组大鼠结肠 IL-6、TNF-α、IL-10、TGF-β mRNA 表达比较 (表 3) 与假手术组比较, 模型组术后第 7 天结肠 IL-6、TNF-α、IL-10 mRNA 表达均升高 ($P < 0.01, P < 0.05$), TGF-β mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), 第 21 天结肠 IL-6 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组在术后第 7 天 TNF-α 和 IL-10 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 第 21 天结肠 IL-6 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠足失误评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	大鼠足失误评分				
		第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	10	1.20 ± 0.79*	1.20 ± 0.79*	1.30 ± 0.67*	1.40 ± 0.70*	1.30 ± 0.82*
中药	10	1.10 ± 0.88	0.90 ± 0.99	0.80 ± 0.79	0.80 ± 0.63 [△]	0.70 ± 0.67 [△]

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

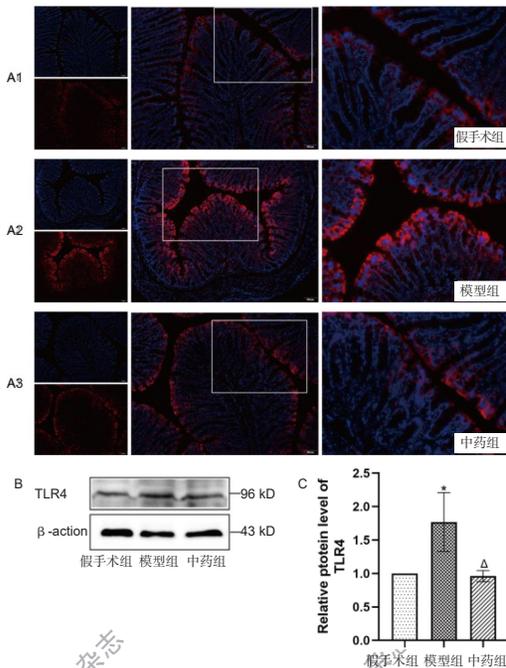
表 3 各组大鼠结肠炎性因子 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	IL-6 mRNA	TNF- α mRNA	IL-10 mRNA	TGF- β mRNA
假手术	6	第 7 天	1.03 \pm 0.19	1.04 \pm 0.27	1.06 \pm 0.19	1.12 \pm 0.25
		第 21 天	1.03 \pm 0.26	1.07 \pm 0.24	0.96 \pm 0.18	1.08 \pm 0.26
模型	6	第 7 天	2.27 \pm 0.66**	1.80 \pm 0.61*	1.90 \pm 0.60**	0.21 \pm 0.04**
		第 21 天	1.65 \pm 0.20**	1.53 \pm 0.34	1.32 \pm 0.43	1.43 \pm 0.35
中药	6	第 7 天	2.13 \pm 0.76*	1.18 \pm 0.17 Δ	0.99 \pm 0.20 $\Delta\Delta$	0.31 \pm 0.12**
		第 21 天	1.28 \pm 0.24 Δ	1.10 \pm 0.43	1.19 \pm 0.44	1.62 \pm 0.46

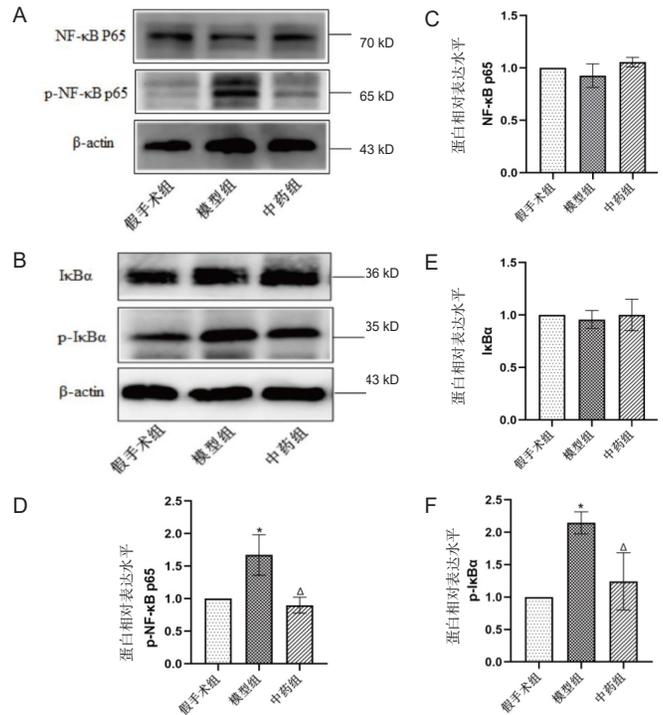
注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 各组结肠 TLR4 蛋白表达及分布 (图 3) TLR4 蛋白在肠黏膜表面和隐窝处表达。第 7 天, 假手术组结肠中 TLR4 蛋白阳性表达较少, 荧光强度较弱; 模型组结肠黏膜表面和隐窝处 TLR4 蛋白阳性表达增加, 荧光强度增高; 中药组结肠黏膜表面和隐窝处 TLR4 蛋白阳性表达减少, 荧光强度较弱。与假手术组比较, 模型组 TLR4 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$); 中药组蛋白表达量较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。

5 各组大鼠结肠中 NF- κ B p65、I κ B α 蛋白及其磷酸化水平比较 (图 4) 第 7 天时, 各组间结肠中 NF- κ B p65 和 I κ B α 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组结肠 p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 蛋白表达量较假手术组升高 ($P < 0.01$); 中药组结肠 p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 蛋白表达量较模型组降低 ($P < 0.01$)。



注: A1~A3 为 TLR4 免疫荧光染色; B 为蛋白电泳图; C 为 TLR4 蛋白表达量比较; 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。
图 3 各组大鼠第 7 天结肠 TLR4 免疫荧光染色及蛋白相对表达比较 ($\times 100$)



注: A~B 为蛋白电泳图; C~F 为蛋白表达量比较; 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 4 各组大鼠结肠 p65、p-p65、I κ B α 、p-I κ B α 蛋白相对表达比较

讨论

缺血性脑卒中属中医学“中风”范畴, 是以突然昏仆, 不省人事, 口眼歪斜, 语言蹇涩, 半身不遂等为主要临床表现的疾病。中医学认为缺血性脑卒中多责之于气血逆乱, 瘀血阻滞。舒脑欣滴丸为中药滴丸制剂, 由当归、川芎二药组成, 当归性温味甘辛, 既养血活血又能止痛; 川芎辛温香燥, 走而不守, 上至巅顶, 下达血海, 充分确保大脑的血液供应, 两药合用理气活血、化瘀止痛, 充分改善脑供血不足所致的脑损伤, 因此, 临床可用于治疗缺血性脑卒中 [3, 7-9]。

炎症反应是缺血性脑卒中的长期病理过程, 是继发性脑损伤的重要原因。脑缺血后大量损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns,

DAMP) 从大脑释放至体循环, 诱导外周免疫反应, 引发炎症, 导致继发性脑损伤^[10, 11]。外周免疫器官由淋巴结、脾脏、黏膜相关淋巴组织组成, 肠道是人体最大的外周免疫器官^[12], 通过“肠-脑轴”与中枢神经系统紧密相连。研究表明, 中风会改变肠道免疫稳态, 加剧神经功能缺损^[13, 14]。有研究者发现, 调控肠道免疫稳态, 减少肠道促炎细胞因子释放, 能够促进缺血性脑卒中神经功能恢复^[15]。因此, 调节肠道炎症微环境是改善缺血性脑卒中预后的有效靶点。

本研究用舒脑欣滴丸干预脑缺血再灌注大鼠, 结果显示在连续 7 天治疗后中药组能改善脑缺血所致的神经功能障碍, 减轻脑缺血皮质区和结肠部位炎细胞浸润。既往的研究表明, 缺血性中风发生后, 肠道在感受到压力情况下会释放 IL-6、TNF- α 等炎症因子, 促使炎症反应的发生。这些炎症因子最早可在中风后的 2 h 迅速增加, 并持续 7 天, 不仅增加肠道屏障功能障碍, 而且影响包括大脑在内的其他器官和组织^[16, 17]。为了进一步研究舒脑欣滴丸对中风模型大鼠肠道炎症微环境的影响, 本实验检测了结肠中细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-10、TGF- β mRNA 表达水平。结果表明, 中风模型组早期诱导了结肠 IL-6、TNF- α 、IL-10 mRNA 的产生。IL-6 和 TNF- α 是经典的促炎因子, 在中风模型肠道中发现 IL-6、TNF- α mRNA 表达增加^[18, 19]。IL-10 是一种多效的抗炎因子, 在本研究中, 模型组肠道中 IL-10 mRNA 表达升高, 可能是中风后肠道免疫过度激活所致。在中风早期经舒脑欣滴丸干预能显著降低 TNF- α 和 IL-10 mRNA 至假手术组水平; 缺血后期舒脑欣滴丸进一步降低 IL-6 mRNA 表达。该结果说明舒脑欣滴丸给药在中风后 7 天可调控肠道炎症微环境, 其抗炎作用可维持至术后 21 天。当前“肠-脑轴”相关研究处在初级阶段, 中风后肠道炎症的相关探究较少, 仍需进一步研究。

为了探讨舒脑欣干预肠道炎症的可能机制, 本研究进一步观察了 TLR4 的表达和定位, 以及 NF- κ B 相关蛋白的表达。由于模型组早期诱导了肠道炎症, 且舒脑欣给药在第 7 天可调控肠道炎症微环境, 因此本研究选择第 7 天时检测 TLR4/NF- κ B 相关通路。TLR4 是 Toll 样受体中的一种, 是联系天然免疫反应和适应性免疫反应的主要纽带, 在肠上皮细胞和免疫细胞均有表达^[20]。中风导致的肠道微生物群紊乱、菌群易位及内毒素释放是引起肠道炎症和免疫反应的重要因素^[21]。菌群易位导致抗原表位暴露, LPS 释放可以通过 MyD88 依赖性和非依赖性途径触发 TLR4/NF- κ B 通路^[22]。NF- κ B p65 是 NF- κ B 亚基

的一种, 其同源或异源二聚体是 NF- κ B 最常见的亚基形式^[23]。生理条件下, NF- κ B 与抑制蛋白 I κ B α 结合处于失活状态^[24, 25]。当受到刺激后信号通路激活, I κ B α 被 IKK 磷酸化修饰导致其后续的泛素化降解, p65 进入细胞核与 DNA 特定结构域结合, 启动转录进程^[26]。肠道 TLR4/NF- κ B 通路激活可以导致下游促炎性因子的产生, 如 IL-6、TNF- α 等, 并进一步加重局部炎症反应^[22]。本研究发现, 中风模型组激活了 TLR4/NF- κ B 信号通路, 舒脑欣能显著降低 TLR4、p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 蛋白表达水平, 提示舒脑欣滴丸对 TLR4/NF- κ B 信号通路有一定的抑制作用。

综上所述, 本研究表明舒脑欣滴丸可以改善神经功能, 减轻肠道炎症反应, 其作用机制与调控 TLR4/NF- κ B 通路有关。舒脑欣滴丸是否能够通过“肠-脑轴”调控中风后神经炎症以及其作用机制, 值得进一步深入研究, 此外, 本实验治疗药物舒脑欣滴丸以临床等效剂量给药, 并未进行量效研究, 今后仍待进一步探究其与缺血性脑卒中的量效关系。

利益冲突: 本文作者声明不存在任何与本稿件相关的利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 编写组中国脑卒中防治报告.《中国脑卒中防治报告 2019》概要[J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(5): 272-281.
- [2] Arya A, Hu B. Brain-gut axis after stroke[J]. Brain Circulation, 2018, 4(4): 165-173.
- [3] 张军平, 徐媛媛, 徐士欣, 等. 舒脑欣滴丸治疗急性缺血性中风 73 例临床观察[J]. 中医杂志, 2013, 54(9): 758-761.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [6] Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination[J]. J Neurosci Methods, 2002, 115(2): 169-179.
- [7] 陈静, 林彦琛, 单娜娜, 等. 舒脑欣滴丸对脑梗死病

人肢体功能恢复的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14 (9): 1027-1029.

[8] 徐士欣, 张军平, 朱亚萍, 等. 舒脑欣滴丸对急性缺血性中风患者血清补体 C3、C4 及炎症指标的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31 (9): 1968-1970.

[9] 李立凤, 刘津翠, 熊湘明, 等. 舒脑欣滴丸治疗血虚血瘀型慢性脑供血不足的临床观察 [J]. 天津中医药, 2015, 32 (4): 201-204.

[10] Carmichael ST. The 3Rs of stroke biology: radial, relayed, and regenerative [J]. Neurotherapeutics, 2016, 13 (2): 348-359.

[11] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation [J]. Nat Med, 2011, 17 (7): 796-808.

[12] Kagnoff MF. Immunology of the intestinal tract [J]. Gastroenterology, 1993, 105 (5): 1275-1280.

[13] Benakis C, Brea D, Caballero S, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma \delta$ T cells [J]. Nat Med, 2016, 22 (5): 516-523.

[14] Singh V, Roth S, Llovera G, et al. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke [J]. J Neurosci, 2016, 36 (28): 7428-7440.

[15] Dou Z, Rong X, Zhao E, et al. Neuroprotection of resveratrol against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice through a mechanism targeting gut-brain axis [J]. Cell Mol Neurobiol, 2019, 39 (6): 883-898.

[16] Cheng Y, Zan J, Song Y, et al. Evaluation of intestinal injury, inflammatory response and oxidative stress following intracerebral hemorrhage in mice [J]. Int J Mol Med, 2018, 42 (4): 2120-2128.

[17] Hang CH, Shi JX, Li JS, et al. Expressions of intestinal NF-kappaB, TNF-alpha, and IL-6 following traumatic brain injury in rats [J]. J Surg Res, 2005, 123 (2): 188-193.

[18] Cheng Y, Zan J, Song Y, et al. Evaluation of intestinal injury, inflammatory response and oxidative stress following intracerebral hemorrhage in mice [J]. Int J Mol Med, 2018, 42 (4): 2120-2128.

[19] Wen SW, Shim R, Ho L, et al. Advanced age promotes colonic dysfunction and gut-derived lung infection after stroke [J]. Aging Cell, 2019, 18 (5): e12980.

[20] Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17 (5): 263-278.

[21] Kurita N, Yamashiro K, Kuroki T, et al. Metabolic endotoxemia promotes neuroinflammation after focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40 (12): 2505-2520.

[22] Ungaro R, Fukata M, Hsu D, et al. A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis [J]. Am J Physiol-Gastr L, 2009, 296 (6): 1167-1179.

[23] Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology [J]. Cell Res, 2011, 21 (2): 223-244.

[24] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling [J]. Cell, 2008, 132 (3): 344-362.

[25] Nennig SE, Schank JR. The role of NF-kB in drug addiction: beyond inflammation [J]. Alcohol and Alcoholism, 2017, 52 (2): 172-179.

[26] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: ablossoming of relevance to human pathobiology [J]. Cell, 2017, 168 (1-2): 37-57.

(收稿: 2021-10-11 在线: 2022-10-08)
责任编辑: 白 霞

中國中西醫結合雜誌

中國中西醫結合雜誌

中國中西醫結合雜誌

中國中西醫結合雜誌

中國中西醫結合雜誌