DOI:10.16016/j.1000-5404.202009067

β-石竹烯作用于 Notch1/NF-κB 信号轴对脑缺血再灌注损伤大鼠的改善作用

刘京东,陈 莎,王钰淳,刘胜伟,饶江燕,王 倩,邓 玲,王 萱,董 志 400016 重庆,重庆医科大学药学院,重庆市生物化学与分子药理重点实验室

[摘要] **目的** 探究 β-石竹烯(β-caryophyllene,BCP)对脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion,CIR)损伤大鼠的保护作用及相关机制。**方法** 将 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组,缺血再灌注组,β-石竹烯低、中、高剂量组(分别为 102、204、408 mg·kg^{-1}),Jagged1+BCP 对照组,Jagged1(Notch1 激动剂)组。模型组、β-石竹烯低、中、高剂量组及 Jagged1+BCP 对照组、Jagged1 组使用线栓法构建 SD 大鼠 CIR 模型,缺血 1.5 h,再灌注 48 h 后,进行脑缺血梗死体积测定以及神经行为学评分,用 Western blot 检测脑组织中 Notch1、NF-κB p65、NF-κB p-p65 及 Hes1 蛋白表达;HE 染色观察缺血侧海马中的细胞死亡数量;ELISA 法检测大鼠缺血侧海马中 TNF-α 及 IL1-β 的含量变化。**结果** 与模型组进行比较,BCP 给药组可明显改善大鼠神经功能缺失,减少缺血侧脑梗死体积,降低海马中 Notch1、NF-κB 及 Hes1 的蛋白表达量($P<0.05$),减少 TNF-α、IL-1β 的释放($P<0.05$),减少海马神经元细胞的死亡数。与 Jagged1 干预组比较,BCP 给药组 Notch1 的激动剂 Jagged1 可以拮抗 BCP 的治疗效果。**结论** BCP 能够减轻大鼠的脑缺血再灌注损伤,可能通过抑制 Notch1/NF-κB 减少炎性因子的释放,发挥其缺血性保护作用。

[关键词] 脑缺血再灌注损伤;β-石竹烯;炎症;Notch1/NF-κB
[中图法分类号] R743.31; R914.4; R966 [文献标志码] A

β-caryophyllene improves cerebral ischemia reperfusion injury in rats *via* Notch1/NF-κB signal axis

LIU Jingdong, CHEN Sha, WANG Yuchun, LIU Shengwei, RAO Jiangyan, WANG Qian, DENG Ling, WANG Xuan, DONG Zhi Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the protective effect of β-caryophyllene (BCP) on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) rats and related mechanism. **Methods** SD rats were randomized into sham operation group, I/R group, and low-, medium- and high-dose BCP groups (102, 204 and 408 mg·kg^{-1}), Jagged1 (Notch1 agonist, 50 mg·kg^{-1} in 3 h before I/R injury)+BCP group, and Jagged1 group. The treatments were given to the corresponding rats through intragastric infusion. In 7 d later, SD rat CIR model was established with suture-occlusion, with ischemia for 1.5 h followed by reperfusion for 48 h. The infarct volume and neurobehavioral score were measured; Western blotting was used to detect the cerebral protein levels of Notch1, NF-κB p65, NF-κB p-p65 and Hes1; HE staining was applied to observe the number of dead cells, and ELISA was employed to detect the changes of TNF-α and IL1-β contents in the ischemic hippocampus. **Results** BCP treatment could significantly improve the neurological deficit, reduce the infarct volume, down-regulate the protein levels of Notch1, NF-κB and Hes1 in the hippocampus ($P<0.05$), reduce the releases of TNF-α and IL-1β ($P<0.05$), and attenuate the death of hippocampal neuronal cells in the rats

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2018jcyjAX0378)
[通信作者] 董 志,E-mail:100798@cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

after cerebral I/R injury. Comparing the simple Jagged1 intervention group, Notch1 agonist, Jagged1, could antagonize the therapeutic effects of BCP. **Conclusion** BCP can attenuate cerebral I/R injury in rats, and exerts its protective effect probably through inhibiting Notch1/NF-κB signal axis to reduce the release of inflammatory factors.

[**Key words**] cerebral ischemia-reperfusion injury; β-caryophyllene; inflammation; Notch1/NF-κB

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2018jcyjAX0378). Corresponding author: DONG Zhi, E-mail: 100798@cqmu.edu.cn

脑缺血是一种常见的脑血管疾病,其发病的主要原因是脑部缺血,在短时间内不能恢复血液供应,如果能较快恢复供血,则可以起到治疗的效果[1]。若错过了这个较短的治疗时间窗,再恢复供血后则会加重大脑的功能性障碍和疾病损伤,即脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)损伤[2-4]。Notch信号通路是一条高度保守的信号通路,在细胞的自我更新、个体生长发育和一系列病理生理过程中起重要作用[5]。GIL-GARCLA 等[6]研究发现,在脑缺血后Notch1 上调,会激活 NF-κB,使促炎性细胞因子的释放及白细胞增加,加重炎症反应,其下游基因 Hes1 也会在脑下室高表达,促进炎性因子的释放,Jagged1 能够使 Notch1 表达增加,从而加重缺血性损伤[7-9]。目前关于 BCP 调控 Notch1 参与 CIR 调节的机制尚不明确,且缺乏 Hes1 作为直接参与调节的证据。

β-石竹烯(β-caryophyllene,BCP)是存在于许多天然植物中的一种倍半萜烯类化合物[10],具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗抑郁及减缓阿尔兹海默症症状的药理学特性。有相关研究表明[11-12],BCP 能通过调节大鼠的海马神经元凋亡与再生,减缓脑缺血再灌注所引起的神经系统中的损伤,从而起到对脑的保护作用。但是BCP 能否通过抑制 Notch1 信号的激活,发挥抗脑缺血再灌注损伤的作用仍然需要进一步探究。本实验首先构建大鼠脑缺血再灌注模型,进行 BCP 干预,观察CIR 损伤后的大鼠在神经功能等方面的变化以及该变化是否与 Notch1/NF-κB 信号通路有关,并探究其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 120 只,体质量 250~290 g,SPF 级,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号为 SYXK 渝 2018-0003。

1.2 试剂

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution,TTC)(17779,美国 Sigma-Aldrich 公司);Jagged1(MCE 公司,HY-P1846A);NF-κB p65(10745-1-AP)、β-actin(20536-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);NF-κB p-p65(AF2006,Affinity);Hes1(A11718)、Notch1(A16673,AB clonal);Western blot 试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司);ELISA 试剂盒(赛默飞生物);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

低温离心机(Thermo 公司,Heraeus Fresco 21);湿式转膜仪、垂直电泳槽(六一仪器厂,DYY-7C);酶标仪、凝胶成像系统(Universal Hood Ⅱ,Bio-Rad 公司),Nikon 正置显微镜(Eclipse C1);恒温摇床(跃进医疗器械)。

1.4 分组

将大鼠按随机数字表法分为 7 组,每组 15 只。假手术组:连续灌胃 7 d 生理盐水及甘油混合溶液,在造模时只进行血管分离,不进行插栓及缺血处理;模型组:连续灌胃 7 d 生理盐水及甘油混合溶液,使用线栓法构建 SD 大鼠 CIR 损伤模型,缺血 1.5 h,再灌注 48 h;β-石竹烯低、中、高剂量组分别以(102、204、408 mg·kg^{-1})连续灌胃 7 d 后使用线栓法构建 SD 大鼠 CIR 损伤模型,缺血 1.5 h,再灌注 48 h;BCP+Jagged 组:连续灌胃 7 d 204 mg·kg^{-1} BCP 用线栓法构建 SD 大鼠 CIR 损伤模型,缺血 1.5 h,再灌注 48 h,于建模前 3 h 腹腔注射 Jagged1 溶液(50 mg·kg^{-1})[13];Jagged1 组:续灌胃 7 d 生理盐水及甘油混合溶液,用线栓法构建 SD 大鼠 CIR 损伤模型,缺血 1.5 h,再灌注 48 h,于建模前 3 h 腹腔注射 Jagged1 溶液(50 mg·kg^{-1})。

1.5 大鼠脑缺血再灌注损伤模型制备

参考 LONGA 等[14]的方法,制备大鼠脑缺血再灌注模型:用 4%水合氯醛进行腹腔麻醉注射,以仰卧位固定,进行消毒,用棉签蘸去其口腔内多余液体,保持呼吸通畅。用手术剪剪开沿颈部中线剪开 1 个 2 cm 左右的切口。将大鼠皮肉分离,分离出颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery,ICA)及颈总动脉(common carotid artery, CCA),用缝合线将颈总动脉及颈外动脉结扎,用动脉夹暂时夹闭颈内动脉,用眼科手术剪在颈总结扎的远心端处钻 1 个小孔,将线栓(直径 0.36 mm)通过小孔插入颈总动脉,等线栓进入后再稍微固定,线栓经过颈总动脉进入到大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA),缺血 1.5 h 后,拔出线栓,使动脉血重新流通,将

大鼠伤口进行缝合后再灌注,假手术组手术步骤与之相同(除不插栓),手术后均放置于室温,自由饮水、进食。

1.6 神经行为学评分

大鼠脑缺血再灌注后,采用 LONGA 等[14]5 分制(0~4 分)对大鼠的神经功能缺失进行评分。0 分:活动正常,并无神经功能性障碍;1 分:提起尾巴时,对侧(左侧)前肢不能前伸;2 分:向缺血对侧转圈;3 分:无法承受对侧自身重量;4 分:没有自主运动或有意识障碍。分值越高,则说明动物的行为障碍越严重。

1.7 脑梗死体积测定

大鼠脑缺血再灌注后(以时间点为准),断头取脑,迅速置于-20 ℃冰箱中冷冻 30 min 左右取出,去掉嗅球、小脑,在冰盒上由前向后以 2.00 mm 厚连续 5 片冠状切片,将脑片放置于 2%的 TTC 染色液中 37 ℃避光染色 20 min,每 10 min 翻 1 次面。染色过后,正常脑组织呈现红色,而梗死区域呈现白色。将脑片放入 4%多聚甲醛中固定 4 ℃过夜,用滤纸吸去脑片上多余的多聚甲醛固定液,将其放置于黑色背景下,以相机拍摄,采用 Image-Pro Plus 5.0 软件测定脑梗死体积。

1.8 HE 染色

大鼠脑缺血再灌注后,心脏灌注,先从心尖以 PBS 灌入清洗后,再以 4%多聚甲醛从心尖灌入固定,然后断头取脑,样本保存于 4%多聚甲醛中,4 ℃过夜,然后脱水、蜡封、包埋,用切片机切成 5 μm 组织切片,4 ℃保存。做 HE 染色时,将切片用二甲苯脱蜡 2 次(每次 10 min),用无水乙醇脱水 2 次(每次 5 min),蒸馏水冲洗 3 次,于苏木精中浸泡 8 min,伊红中浸泡 5 min,乙醇逐级脱水,中性树胶封片,正置显微镜下观察、拍片。

1.9 Western blot 检测

大鼠脑缺血再灌注后,麻醉后断头取脑,取大鼠缺血侧海马组织,以液氮速冻,将其置于细胞裂解液中,加入磷酸酶抑制剂,低温下超声匀浆。12 000 r/min,4 ℃离心 15 min,分离上清液,加入上样缓冲液,200 ℃变性处理 10 min(样品置于-80 ℃保存)。上样,用 10% SDS-PAGE 进行分离,切胶,湿法转膜,5% BSA 封闭 3 h 后加入 1 抗(p65、p-p65、Hes1、Notch1,1∶1 000;β-actin,1∶2 000)于 4 ℃封闭过夜。用 TBST 洗 3 次,每次 5 min,采用三步法,生物素标记二抗(1∶5 000)结合,再结合辣根过氧化物酶标记的 streptavidin(1∶8 000)。用超敏化学发光液进行曝光显影。以 Image Lab 图像分析软件分析条带,计算蛋白相对表达量,用目的条带与内参 β-actin 光密度的比值作为蛋白相对表达量。

1.10 ELISA 检测海马组织中 TNF-α 和 IL-1β 的表达

每组取 4 只大鼠脑缺血再灌注后,麻醉处死后取出损伤侧海马组织,在低温下剪碎组织块,匀浆后按 ELISA 试剂盒的操作步骤进行。

1.11 免疫荧光检测海马中 Notch1 及 NF-κB 的表达

将大鼠用 4%水合氯醛进行腹腔注射麻醉,然后经冠状窦快速灌注 0.9%氯化钠清洗与 4%多聚甲醛固定。大脑立即取出,并依次通过磷酸缓冲盐以及含 30%蔗糖进行 12 h 的脱水。然后用冷冻切片机对样品进行切片,切片后放入 OCT-Freeze 中冷冻。冰冻切片在 10%山羊血清中于室温下孵育 2 h,避免非特异性免疫球蛋白的结合。封闭后,加入作为主要抗体的兔抗 Notch1 及 NF-κB 抗体(1∶2 000),4 ℃下孵育过夜。PBS 冲洗 3 遍后,用荧光山羊抗兔抗体在 37 ℃水浴加热条件下孵育 1 h。采用 4′,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)对细胞核进行染色。

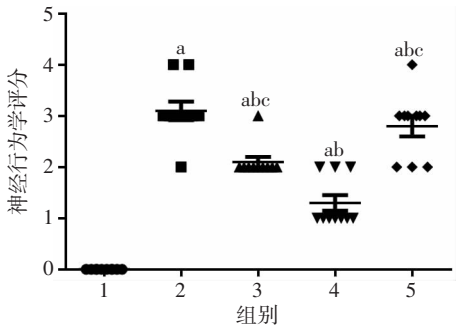
1.12 统计学分析

以 Graph Pad Prism 5 对结果进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 不同浓度 BCP 对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用

2.1.1 神经功能评分 缺血再灌注 48 h 后,与假手术组相比,缺血再灌注组的神经行为学评分升高,出现了比较严重的神经行为功能缺失;与缺血再灌注组相比,BCP(102、204、408 mg·kg^{-1})可以降低大鼠神经行为学评分($P<0.01$,图 1),表明 BCP 能减轻 CIR 诱导下的大鼠神经功能缺损。与假手术组相比,缺血再灌注 48 h 后,缺血再灌注组缺血侧半脑出现了大面积白色梗死区域,脑梗死体积显著升高;与缺血再灌注组相比,BCP(102、204、408 mg·kg^{-1})干预后可以缩小脑梗死范围($P<0.01$,图 2),BCP 能减缓缺血后脑梗死,均以 BCP 中剂量组(204 mg·kg^{-1})最佳。



1:假手术组;2:缺血再灌注组;3:BCP 低剂量组;4:BCP 中剂量组;5:BCP 高剂量组;a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 中剂量组比较

图 1 BCP 对 CIR 诱导的大鼠神经功能缺损的影响

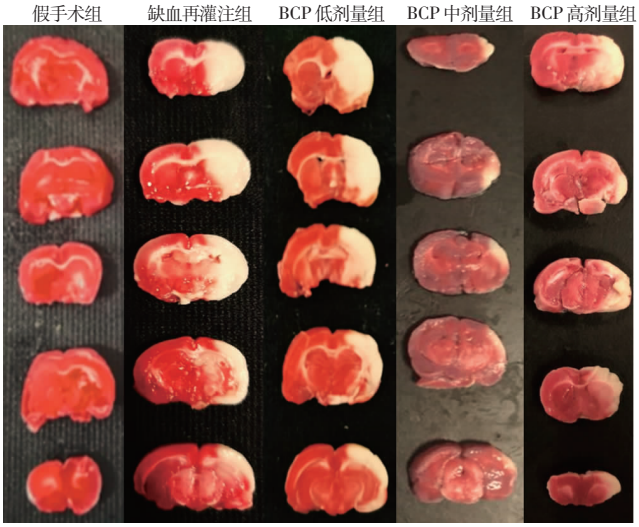
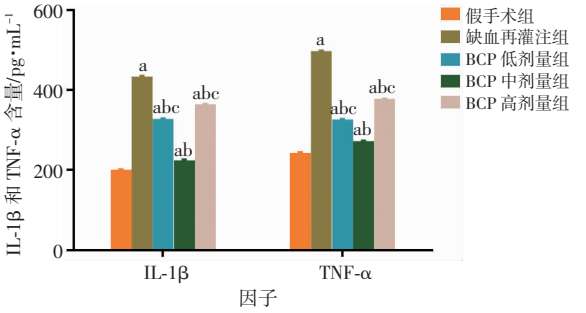


图 2　TTC 染色检测 BCP 对 CIR 损伤后大鼠脑梗死体积的影响

2.1.2　BCP 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马中 Notch1、NF-κB p65 及 Hes1 蛋白表达的影响　　缺血再灌注后,假手术组中大鼠 Notch1、Hes1 及 p-NF-κB p65 的表达量较低。缺血再灌注组中,Notch1、Hes1 及 p-NF-κB p65 蛋白的表达量明显上升($P<0.01$,图 3),大鼠 Notch1 及 p-NF-κB p65 的蛋白表达量明显上调。BCP 干预后,这几种蛋白的表达量有所下降,其中以 BCP 中剂量组最为明显。

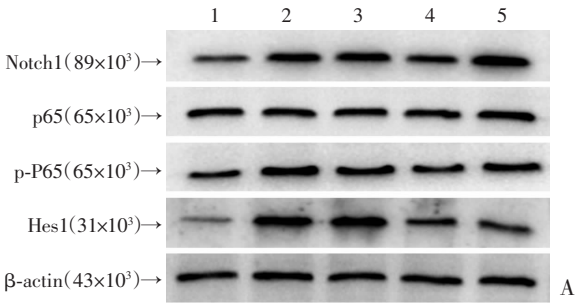
2.1.3　BCP 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马神经元形态结构的影响　　显微镜下可以看到假手术组大鼠,右侧大脑的海马神经细胞结构完整,排列比较密集,细胞呈现圆形或者椭圆形,而缺血再灌注组中右侧大脑的海马神经细胞大量坏死、萎缩,分布极其不均,胞核破碎甚至消失。与缺血再灌注组相比,BCP 干预组中海马神经细胞的死亡数目及萎缩数目有所减少,其中 BCP 中剂量组减少数目最多,见图 4。

2.1.4　BCP 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马组织中炎症因子的影响　　与假手术组相比,缺血再灌注组脑缺血再灌注后大鼠海马组织中的 IL1-β 及 TNF-α 水平大幅升高。与缺血再灌注组相比,BCP 干预组中 IL1-β 及 TNF-α 明显下降($P<0.01$,图 5),提示 BCP 能降低脑缺血再灌注缺血侧海马中 IL1-β 及 TNF-α 的水平,起到保护作用,其中 BCP 中剂量组较明显。

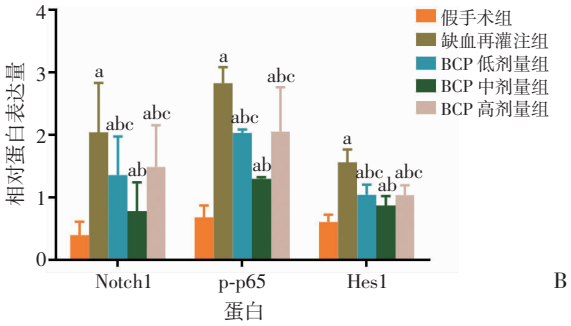


a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 中剂量组比较

图 5　BCP 对脑缺血再灌注损伤后大鼠海马组织中 TNF-α 和 IL-1β 的影响



A



B

A:Western blot 检测 Notch1、p-p65、Hes1 的表达　1:假手术组;2:缺血再灌注组;3:BCP 低剂量组;4:BCP 中剂量组;5:BCP 高剂量组;B:半定量分析　a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 中剂量组比较

图 3　BCP 对脑缺血再灌注损伤后大鼠大脑海马的 Notch1、Hes1 及 p-p65 蛋白水平的变化

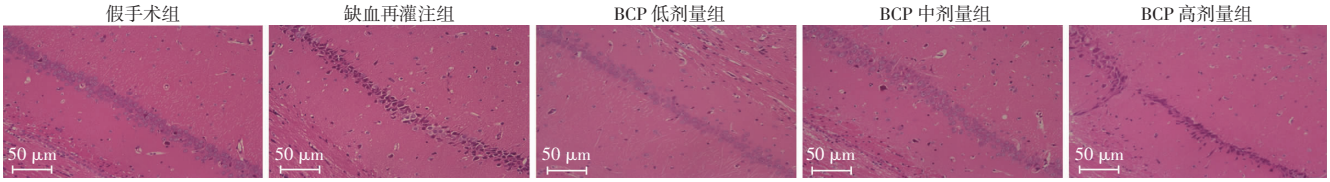
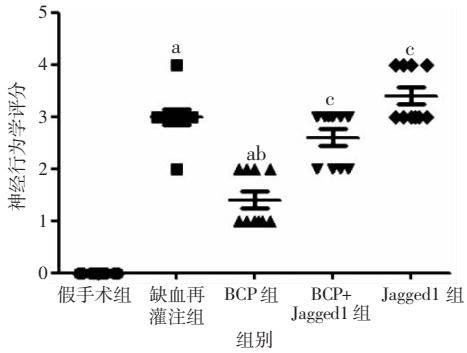


图 4　HE 染色观察 BCP 对脑缺血再灌注损伤后大鼠大脑海马神经元形态结构的影响

2.2　BCP 对 Notch1/NF-κB 信号轴的影响

2.2.1　神经功能评分　缺血再灌注 48 h 后,缺血再灌注组的神经行为学评分升高,脑梗死体积扩大,而 BCP 干预后有所缓解,与 BCP 组相比,BCP+Jagged1 组及 Jagged1 组神经行为学评分升高($P<0.01$,图 6);与 BCP 组相比,BCP+Jagged1 组及 Jagged1 组脑梗死体积增加($P<0.01$,图 7),说明 BCP 可通过抑制 Notch1/NF-κB 通路对缺血性脑损伤起到保护作用。



a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 组比较

图 6　BCP 对 CIR 诱导的大鼠神经功能缺损的影响

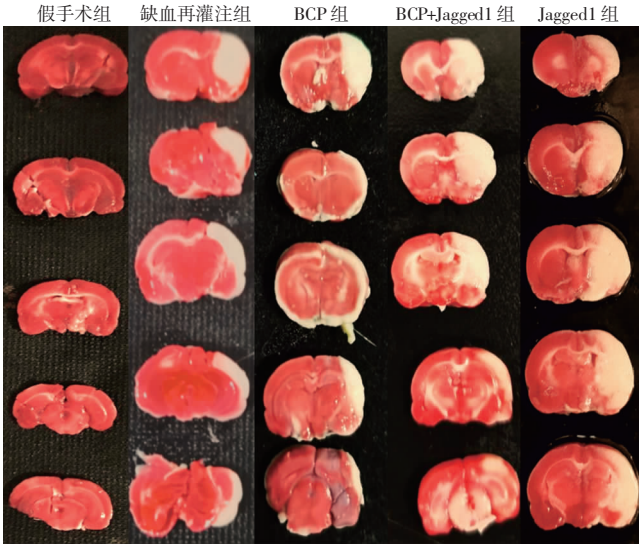
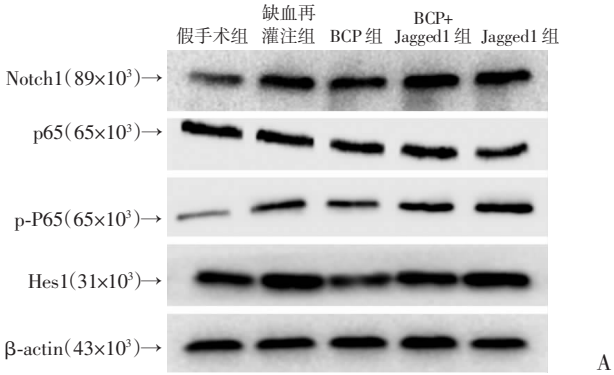
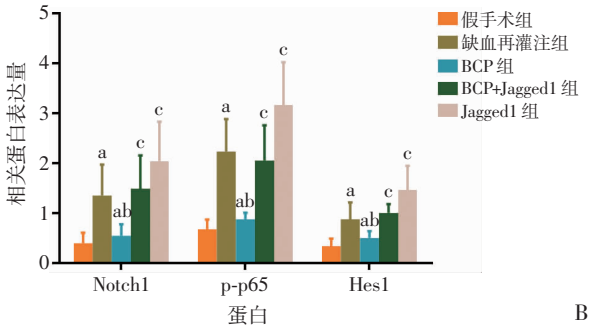


图 7　TTC 染色检测 BCP 对 CIR 损伤后大鼠脑梗死体积的影响

2.2.2　BCP 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马中 Notch1、NF-κB p65 及 Hes1 蛋白表达的影响　缺血再灌注后,假手术组中大鼠 Notch1、Hes1 及 p-NF-κB p65 的表达量很低。缺血再灌注组、BCP+Jagged1 组及 Jagged1 组中,Notch1、Hes1 及 p-NF-κB p65 蛋白的表达量明显上升,而在 BCP 组,这几种蛋白的表达量有所下降($P<0.01$,图 8、9),说明 BCP 能抑制 Notch1 及其相关蛋白的表达。



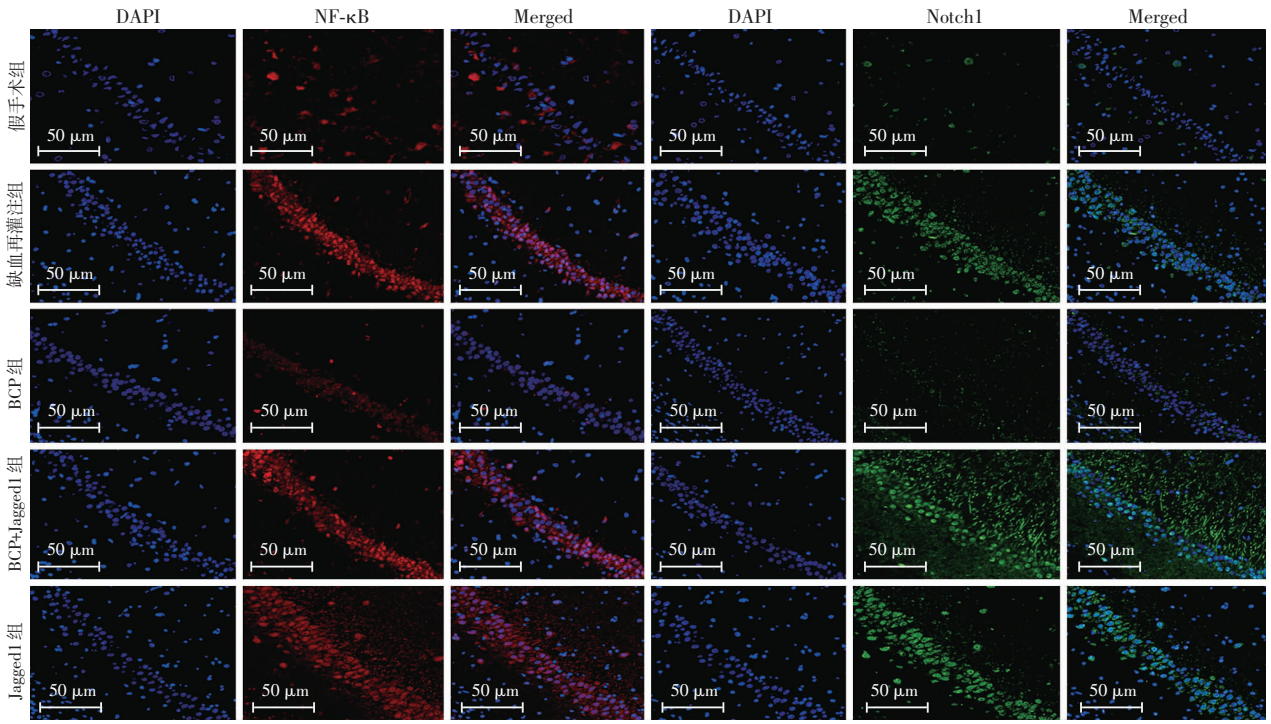


A:Western blot 检测 Notch1、p-p65、Hes1 的表达;B:半定量分析　a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 组比较

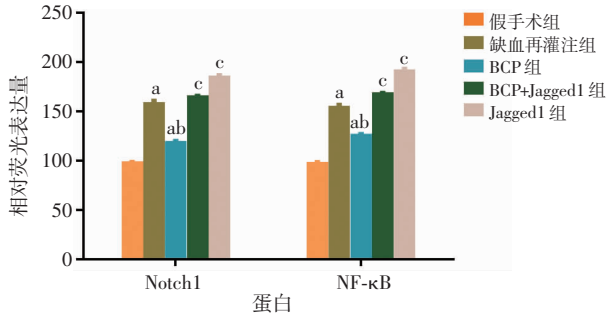
图 8　BCP 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马 Notch1、Hes1 及 p-p65 蛋白水平的影响

2.2.3　BCP+Jagged1 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马神经元形态结构的影响　BCP 干预后海马神经细胞的死亡数目及萎缩数目有所减少,而加入 Jagged1 后,神经细胞的损伤又会加重,坏死、萎缩的细胞数目大量增加,见图 10。

2.2.4　BCP 对 CIR 损伤后大鼠大脑海马组织中炎症因子的影响　BCP 干预组中 IL1-β 及 TNF-α 明显下降,增加 Jagged1 后,TNF-α 及 IL-1β 的释放又会增加($P<0.01$,图 11)。而在单独的 Jagged1 组中,其表达量更高,提示 BCP 能抑制 Notch1/NF-κB 通路来减少炎性因子的释放。



A



B

A:Notch1、p-P65 免疫荧光染色;B:相对荧光表达量分析　a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 组比较

图 9　免疫荧光染色观察相关蛋白在大鼠海马的表达

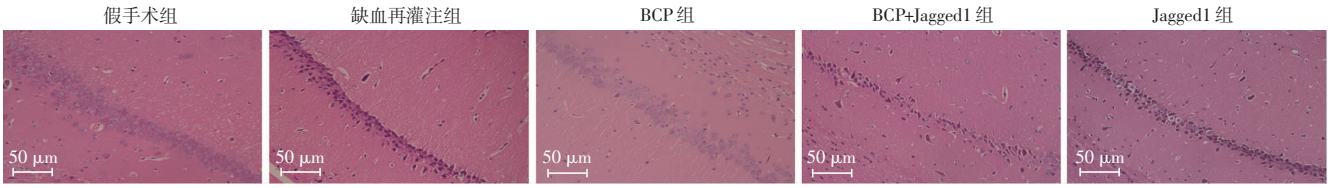
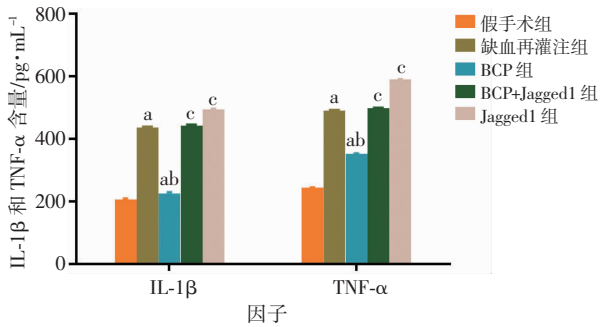


图 10　HE 染色观察 BCP+Jagged1 对脑缺血再灌注损伤后大鼠大脑海马神经元形态结构的影响



a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;c:$P<0.01$,与 BCP 组比较

图 11　BCP 对脑缺血再灌注损伤后大鼠海马组织中 TNF-α 和 IL-1β 的影响

3　讨论

脑缺血再灌注损伤是一个复杂的病理生理过程。脑缺血损伤后,缺血区域的神经细胞坏死,会释放大量的细胞因子[15-17]。在这些因素的驱使下,缺血部分的脑组织中小胶质细胞被激活,白细胞浸润,释放更多的炎性介质,加重了脑损伤,使得神经元的死亡加重。本实验结果显示,β-石竹烯能有效地减少大鼠脑缺血损伤所诱导的神经细胞死亡及相关炎症反应,达到保护作用。

Notch 基因首次被 Morgan 在果蝇体内发现[18-21],由于其缺失会导致果蝇翅边缘出现缺口,因而得名,是一种可以对细胞增殖和凋亡反复调节的信号,与细胞

的增殖、分化、凋亡以及细胞再生都有着密切联系。在肺纤维化,心肌缺血中,Notch1 基因都扮演着非常重要的角色[21-22]。在脑缺血时,会瞬时激活 γ-分泌酶,海马中的 Notch1 水平会升高,Notch1 会引起 NF-κB 中 p50/p65 二聚体中 p65 亚基增加,从而加重白细胞的浸润,升高 IL1-β、IL-6、TNF-α[23-24]等炎性因子的表达水平,加剧神经元的炎症过程。Hes1 作为 Notch1 下游靶基因,已被证实其表达水平可以很好地反映 Notch1 的表达[25]。NF-κB 在介导细胞增殖分化、细胞炎症、凋亡和免疫应答中起着关键作用[26-28],主要由 p65 和 p50 组成。本实验中通过检测 Notch1、NF-κB 及 Hes1 蛋白含量以及 TNF-α 及 IL-1β 等炎性因子的含量发现,在缺血再灌注损伤的大鼠海马中,Notch1、NF-κB、Hes-1 的蛋白含量等会大幅升高,使用 BCP 干预后下降明显,且随着其药物浓度的增高,呈现较明显的药物依赖性,证明 BCP 可以通过抑制 Notch1/NF-κB 信号的激活,从而发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

BCP 是一种已经被证实的 CB2 受体激动剂,具有抗炎、抗凋亡、抗癌等药理活性,本课题组已有研究[10]证明 BCP 可以抑制 PI3K/AKT 通路,保护小鼠的脑缺血再灌注损伤,PI3K/AKT 通路[29]的抑制会抑制 Notch1 的表达,减轻脑损伤。也有相关实验证明[30-31],Notch1 信号激活后会加重心肌缺血损伤,将其抑制后会起到保护作用。本实验中还使用 Jagged1 作为对照,将其与 β-石竹烯组进行对比,证明 β-石竹烯是通过抑制 Notch1 信号的激活,从而起到抗脑缺血再灌注损伤作用。本实验中,在脑缺血再灌注时,明显发现缺血再灌注组中大鼠的神经功能缺失,脑梗死体积较为严重,相关蛋白的表达量也较高。选择在连续给 β-石竹烯(102、204、408 mg·kg^{-1})7 d 后做缺血再灌注 48 h,发现 BCP 能显著减少大鼠的脑梗死体积,恢复神经功能,降低缺血区神经细胞的死亡,降低海马中 Notch1、NF-κB、Hes1 蛋白的表达,减轻炎症反应,对大鼠脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用,其中在本实验中给药剂量为 204 mg·kg^{-1} 时效果最佳,而 BCP+Jagged1 及 Jagged1 组也说明了在 Jagged1 的干预下,Notch1 的表达会增加,加重其损伤,而 BCP 可以拮抗这种效果,起到一个脑缺血的保护作用。

综上,本研究初步证实 BCP 可以下调 Notch1 蛋白的表达,从而抑制 Notch1/NF-κB 信号通路的激活,初步验证 BCP 的抗炎效果与该通路具有相关性,起到一个缺血再灌注的保护作用,且这种作用效果与药物浓度有相关性。提出了 BCP 与 Notch1 之间的直接调控关系,但该调控过程中是否有其他相关蛋白参与,需要进一步的研究。

参考文献:

[1] LI H Z, CHEN J F, LIU M, *et al*. Effect of hyperbaric oxygen on the permeability of the blood-brain barrier in rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 1725-1730. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.025.

[2] YANG M, LV Y, TIAN X, *et al*. Neuroprotective effect of β-caryophyllene on cerebral ischemia-reperfusion injury *via* regulation of necroptotic neuronal death and inflammation: *in vivo* and *in vitro*[J]. Front Neurosci, 2017, 11: 583. DOI: 10.3389/fnins.2017.00583.

[3] ZHAO Y J, NAI Y, LI S Y, *et al*. Retigabine protects the blood-brain barrier by regulating tight junctions between cerebral vascular endothelial cells in cerebral ischemia-reperfusion rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 12: 8509-8518. DOI: 10.26355/eurrev_201812_16552.

[4] CHEN L, HUANG K, WANG R, *et al*. Neuroprotective effects of cerebral ischemic preconditioning in a rat middle cerebral artery occlusion model: the role of the notch signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8168720. DOI: 10.1155/2018/8168720.

[5] MUKHERJEE M, DERISO J, OTTERPOHL K, *et al*. Endogenous notch signaling in adult kidneys maintains segment-specific epithelial cell types of the distal tubules and collecting ducts to ensure water homeostasis[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(1): 110-126. DOI: 10.1681/asn.2018040440.

[6] GIL-GARCÍA B, BALADRÓN V. The complex role of NOTCH receptors and their ligands in the development of hepatoblastoma, cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma[J]. Biol Cell, 2016, 108(2): 29-40. DOI: 10.1111/boc.201500029.

[7] HE Y, ZHANG M, WU Y, *et al*. Aberrant activation of Notch-1 signaling inhibits podocyte restoration after islet transplantation in a rat model of diabetic nephropathy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 950. DOI: 10.1038/s41419-018-0985-z.

[8] ZHAO H, CHEN Z, XIE L J, *et al*. Suppression of TLR4/NF-κB signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(5): 4311-4319. DOI: 10.1007/s12035-017-0552-0.

[9] YU L M, LI Z, DONG X, *et al*. Polydatin protects diabetic heart against ischemia-reperfusion injury *via* Notch1/Hes1-mediated activation of pten/Akt signaling[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2018, 2018: 1-18. DOI: 10.1155/2018/2750695.

[10] ZHANG Q, AN R D, TIAN X C, *et al*. B-caryophyllene pretreatment alleviates focal cerebral ischemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signaling pathway[J]. Neurochem Res, 2017, 42(5): 1459-1469. DOI: 10.1007/s11064-017-2202-3.

[11] 李明航, 田晓翠, 安瑞娣, 等. 全反式维甲酸通过作用于 JNK/P38 MAPK 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注引起的血脑屏障损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(1): 112-118.

LI M H, TIAN X C, AN R D, *et al*. Trans retinoic acid attenuates blood-brain barrier injury caused by cerebral ischemia-reperfusion in rats by acting on JNK/P38MAPK signaling pathway[J]. Chin J Pathophysiol, 35(1):112-118.

[12] TIAN X, PENG J, ZHONG J, *et al*. B-caryophyllene protects in vitro neurovascular unit against oxygen-glucose deprivation and re-oxygenation-induced injury [J]. J Neurochem, 2016, 139(5): 757-768. DOI:10.1111/jnc.13833.

[13] DONG J, YANG W H, HAN J Q, *et al*. Effects of Notch signaling components from breast cancer cells treated in culture with resveratrol[J]. Res Vet Sci, 2020, 132: 369-378. DOI:10.1016/j.rvsc.2020.07.017.

[14] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91. DOI:10.1161/01.str.20.1.84.

[15] 刘亭,宋菲,陆定艳,等.辛芍组方抗脑缺血再灌注损伤的抗氧化、抗凋亡机制研究[J].中国中药杂志,2018,43(17):3519.
LIU T, SONG F, LU D Y, *et al*. Antioxidant and anti-apoptotic mechanism of Xinshao recipe against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Traditional Chin Med, 2018,43(17):3519.

[16] 刘刚, 门运政, 童旭辉, 等. 线粒体融合与裂变在右美托咪定减轻小鼠脑缺血再灌注损伤中的作用及其机制[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(4): 463-468.
LIU G, MEN Y Z, TONG X H, *et al*. Role of mitochondrial fusion and fission in protective effects of dexmedetomidine against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. J South Med Univ, 2020, 40(4): 463-468.

[17] 黄优, 陈海云, 何超明, 等. 丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤中氧化应激炎性通路的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(2): 201-205.
HUANG Y, CHEN H Y, HE C M, *et al*. Effects of butylphthalide on oxidative stress inflammatory pathway of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2020, 41(2): 201-205.

[18] ZHANG Y M, CHEN S X, DAI Q F, *et al*. Effect of acupuncture on the notch signaling pathway in rats with brain injury[J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(7): 537-544. DOI:10.1007/s11655-015-1969-9.

[19] CHEN L, ZHANG J, LYU Z, *et al*. Positive feedback loop between mitochondrial fission and Notch signaling promotes survivin-mediated survival of TNBC cells[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11): 1050. DOI: 10.1038/s41419-018-1083-y.

[20] LIU W J, JIANG H F, REHMAN F U, *et al*. Lycium barbarum polysaccharides decrease hyperglycemia-aggravated ischemic brain injury through maintaining mitochondrial fission and fusion balance[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(7): 901-910. DOI:10.7150/ijbs.18404.

[21] REN C, YAO Y, HAN R, *et al*. Cerebral ischemia induces angiogenesis in the peri-infarct regions via Notch1 signaling activation[J]. Exp Neurol, 2018, 304: 30-40. DOI:10.1016/j.expneurol.2018.02.013.

[22] YU B, SONG B. Notch 1 signalling inhibits cardiomyocyte apoptosis in ischaemic postconditioning[J]. Heart Lung Circ, 2014, 23(2): 152-158. DOI:10.1016/j.hlc.2013.07.004.

[23] LIN N Y, BEYER C, GIESSL A, *et al*. Autophagy regulates TNFα-mediated joint destruction in experimental arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(5): 761-768. DOI:10.1136/annrheumdis-2012-201671.

[24] BEN P, ZHANG Z, ZHU Y, *et al*. L-Theanine attenuates cadmium-induced neurotoxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation [J]. Neurotoxicology, 2016, 57: 95-103. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.09.010.

[25] PEKER K, ÖKESLI S, KıYıCı A, *et al*. The effects of ketamine and lidocaine on free radical production after tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in adults[J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2019, 25(2): 111-117. DOI:10.5505/tjtes.2018.63439.

[26] WU W J, ZHONG W, LANG B, *et al*. Thrombopoietin could protect cerebral tissue against ischemia-reperfusion injury by suppressing NF-κB and MMP-9 expression in rats [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(12): 1341-1348. DOI:10.7150/ijms.27543.

[27] KHAN M A, KHAN M J. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-κB pathways by suppressing COX-2 activity[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(sup1): 1149-1158. DOI:10.1080/21691401.2018.1446968.

[28] LIU L, CHARVILLE G W, CHEUNG T H, *et al*. Impaired notch signaling leads to a decrease in p53 activity and mitotic catastrophe in aged muscle stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(4): 544-556.e4. DOI:10.1016/j.stem.2018.08.019.

[29] PENG X C, ZHOU J R, LI B, *et al*. Notch1 and PI3K/Akt signaling blockers DAPT and LY294002 coordinately inhibit metastasis of gastric cancer through mutual enhancement [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85(2): 309-320. DOI:10.1007/s00280-019-03990-4.

[30] TAO C Y, HU X, LI H, *et al*. White matter injury after intracerebral hemorrhage: pathophysiology and therapeutic strategies[J]. Front Hum Neurosci, 2017, 11: 422. DOI: 10.3389/fnhum.2017.00422.

[31] WEI L L, CHEN Y, YU Q Y, *et al*. Patchouli alcohol protects against ischemia/reperfusion-induced brain injury *via* inhibiting neuroinflammation in normal and obese mice [J]. Brain Res, 2018, 1682: 61-70. DOI:10.1016/j.brainres.2017.12.039.

(**收稿**:2020-09-28;**修回**:2020-10-27)

(编辑 张 维)