川芎嗪-灯盏乙素苷元孪药对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用及机制研究Δ

陈莉娜*，文金兰，张善惠，鲁　俊，赵福会，龙铁梅，董　莉，董永喜#（贵州医科大学药学院，贵阳　550025）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）15-1804-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.03

摘　要　目的　研究川芎嗪-灯盏乙素苷元孪药（TMSC4）对脑缺血再灌注损伤（CIRI）模型大鼠的保护作用及机制。**方法**　将105只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、灯盏乙素苷元组（0.7 mmol/kg）、川芎嗪组（0.7 mmol/kg）和TMSC4低、中、高剂量组（0.35、0.7、1.4 mmol/kg），每组15只。假手术组、模型组大鼠灌胃等体积生理盐水，其余各组大鼠灌胃相应药物，每天1次，连续14 d。除假手术组外，其余各组大鼠均采用线栓法建立CIRI模型。大鼠缺血2 h再灌注22 h后，测定大鼠脑指数及脑含水量；检测大鼠血清中白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（TNF-α）的水平，脑组织中超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽过氧化氢酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）的水平和大脑皮层神经细胞的凋亡情况以及B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、活化型胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3）蛋白表达水平。**结果**　与假手术组比较，模型组大鼠脑指数和脑含水量，血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平以及脑组织中MDA水平，神经细胞凋亡率，Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；脑组织中SOD、GSH-Px、CAT水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠上述指标水平均显著逆转（$P<0.05$），且TMSC4中、高剂量组的逆转作用显著优于灯盏乙素苷元组和川芎嗪组（$P<0.05$）。**结论**　TMSC4对CIRI模型大鼠具有保护作用，其作用机制可能与减轻炎症反应、氧化应激损伤，抑制神经细胞凋亡有关。

关键词　川芎嗪；灯盏乙素苷元；孪药；脑缺血再灌注损伤；神经保护；大鼠

Study on protective effects of twin drugs of tetramethylpyrazine-scutellarein on cerebral ischemia-reperfusion injury model rats and its mechanism

CHEN Lina, WEN Jinlan, ZHANG Shanhui, LU Jun, ZHAO Fuhui, LONG Tiemei, DONG Li, DONG Yongxi (School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the protective effects of twin drugs of tetramethylpyrazine-scutellarein (TMSC4) on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) model rats and its mechanism. **METHODS** One hundred and five SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, scutellarein group (0.7 mmol/kg), tetramethylpyrazine group (0.7 mmol/kg), and TMSC4 low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.35, 0.7, 1.4 mmol/kg), with 15 rats in each group. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, and other groups were given relevant drug intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. Except for sham operation group, all other groups were treated to establish the CIRI model using the thread occlusion method. After 2 hours of ischemia and 22 hours of reperfusion, the brain index and brain water content of the rats were measured. Serum levels of interleukin 1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF-α), the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in brain tissues, the situation of neuronal cell apoptosis, and the protein expressions of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and cleaved-caspase-3 were evaluated. **RESULTS** Compared with sham operation group, the brain index, brain water content, the serum levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α, the levels of MDA in brain tissues, the brain cell apoptosis and the protein expressions of Bax and cleaved-caspase-3 in model group were significantly increased ($P<0.05$); the levels of SOD, GSH-Px and CAT and the protein expression of Bcl-2 in brain tissues were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, the above indexes of rats were reversed significantly in administration groups ($P<0.05$), while the reverse effects of TMSC4 medium-dose and high-dose groups were significantly better than those of scutellarein group and tetramethylpyrazine group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** TMSC4 has a certain protective effect in CIRI model rats, the mechanism of which may be related to relieving inflammatory reaction and oxidative stress, inhibiting cell apoptosis.

KEYWORDS　tetramethylpyrazine; scutellarein; twin drugs; cerebral ischemia-reperfusion injury; neuroprotective effect; rat

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81960630）；贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目（No.gzwkj2021-448）；贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目（No.黔教合KY字〔2021〕164）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：先导化合物结构优化及生物活性。电话：0851-88416153。E-mail：2693189089@qq.com

＃**通信作者**　副教授，硕士生导师，博士。研究方向：天然活性产物结构修饰。电话：0851-88416153。E-mail：dongyx01@163.com

脑卒中可分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中（即“脑梗死”），后者约占80%～85%，其已成为威胁人类生命的重大疾病[1]。缺血性脑卒中发病机制复杂，涉及氧化应激、谷氨酸释放、细胞凋亡、能量代谢障碍和钙离子超载等[2]。当脑血管出现血栓时，正常的循环受阻，导致缺血性脑卒中产生。因此，治疗缺血性脑卒中的首要任务就是溶栓，但当脑血流量供应恢复时，反而会引起脑缺血再灌注损伤，从而产生炎症和大量活性氧，进而导致神经元损伤，加重脑梗死[3]。

川芎嗪（tertramethylpyrazine，TMP）是伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 干燥根茎中的生物碱单体（结构见图1A），具有改善脑缺血、抗氧化的作用，但存在生物利用度低、半衰期短、代谢快等缺点，因此，其临床应用受到限制[4－5]。灯盏乙素（scutellarin，SC）是菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus*（Vant.）Hand-Mazz. 干燥全草的主要活性成分，临床主要用于治疗缺血性脑卒中、冠心病以及心绞痛等，其被小肠吸收的形式为灯盏乙素苷元（SC-Ag，其结构见图1B），但SC和SC-Ag均存在稳定性差、水溶性差、口服生物利用度低等问题[6]。孪药是将两个相同或不同的药物经共价键连接缀合生成的新杂交分子，在体内代谢生成两种以上具协同作用的药物，增强活性或产生新的药理活性。本课题组前期研究中以天然氨基酸为链接子，设计合成得到一系列TMP/SC-Ag孪药，且与TMP或SC-Ag相比，上述系列孪药均表现出良好的抗氧化损伤作用及抗凝血活性[7－8]，其中孪药化合物4（TMSC4，结构见图1C）能改善中动脉阻断局灶性脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia-reperfusion injury，CIRI）模型大鼠的行为学特征、降低脑梗死体积比[8]，但其神经保护作用及机制尚不清楚。因此，本文进一步研究孪药TMSC4对CIRI模型大鼠的神经保护作用及机制，以期为缺血性脑卒中治疗药物的开发提供参考。

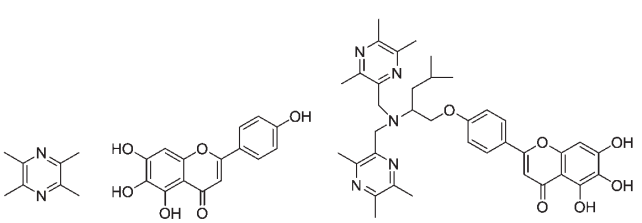


图1　TMP、SC-Ag、TMSC4的结构式

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用主要仪器有ReadMax1500型酶标仪（上海闪谱生物科技公司），DYY-6C型电泳仪系统（北京六一生物科技有限公司），ChemiDocXRS$^+$型凝胶成像系统（美国Thermo Fisher Scientific公司），TGL16M型离心机（湖南凯达科学仪器有限公司），ZA305AS型分析天平（上海赞维衡器有限公司），JP-NCS3000W型超声波细胞破碎仪（上海继谱电子科技有限公司）。

1.2　主要药品及试剂

TMSC4、SC-Ag由本实验室自制[8]（经高效液相色谱法检测，纯度均大于96%）；TMP（批号11032-118，纯度≥99%）购于深圳市丽晶生化科技有限公司；过氧化氢酶（catalase，CAT）试剂盒（批号20190415）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）试剂盒（批号20190321）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）试剂盒（批号20190315）、谷胱甘肽过氧化氢酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）试剂盒（批号20190218）均购于南京建成生物工程研究所；细胞裂解液（批号20190723）、BCA蛋白试剂盒（批号20190618）均购于上海炎熙生物科技有限公司；兔源B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）抗体、兔源Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）抗体以及肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6的酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为20190619、20190412、20190109、20190115、20190202）均购于北京索莱宝科技有限公司；兔源GAPDH单克隆抗体（批号00105831）购于武汉三鹰生物技术有限公司；兔源活化型胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3）抗体（批号ab1908）购于美国Abcam公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗（批号20000576）购于美国CST公司。

1.3　实验动物

实验动物为健康雄性SD大鼠，共105只，体重（230±20）g，由贵州医科大学实验动物中心提供，动物生产许可证号为SCXK（黔）2018-0001。本研究经贵州医科大学动物实验伦理委员会批准（批准号1900112）。

2　方法

2.1　分组、给药及造模

将105只大鼠随机分为假手术组、模型组、SC-Ag组（0.7 mmol/kg）、TMP组（0.7 mmol/kg）和TMSC4低、中、高剂量组（0.35、0.7、1.4 mmol/kg），每组15只。假手术组、模型组大鼠灌胃等体积生理盐水，其余各组大鼠灌胃相应药物，各组剂量均参考文献[7－9]设置，每天1次，连续14 d。末次给药30 min后，除假手术组外，其余各组均采用线栓法使大鼠脑中动脉栓塞以建立CIRI大鼠模型[10－11]。按照Zea Longa 5级4分制法的评分标准对大鼠神经功能进行评分：无明显神经症状，两前肢均显示正常力量，可伸直，计0分；不能完全伸展患侧前爪，计1分；向患侧旋转，但在休息时正常，计2分；行走时向患侧倾倒，计3分；不能自行行走或意识丧失，计4分。当造模大鼠神经功能评分为2～3分，则表明造模成功[12]。本研究造模成功率为80%（即造模的组别分别造模成功12只）。

2.2 样本采集

各组大鼠缺血2 h再灌注22 h后（栓塞2 h后进行再灌注，大鼠神经功能缺失明显，脑组织坏死程度适中，有利于后续研究[13]），麻醉，腹主动脉取血，置于采血管中室温下静置1 h后，离心取上清液置于 －80 ℃保存备用；同时分离各组大鼠缺血侧脑组织，进行脑指数及脑含水量的测定。

2.3 大鼠脑指数及脑含水量的测定

各组取6只大鼠的缺血侧脑组织，去除嗅球、小脑和低位脑干后，称定脑湿重，然后置于90 ℃条件下烘干至恒重，即得脑干重。脑指数＝脑湿重/体重×100，脑含水量＝（脑湿重－脑干重）/脑湿重×100%。

2.4 大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平的检测

采用ELISA法进行检测。取各组大鼠血清样品适量，按试剂盒说明书方法测定大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平。

2.5 大鼠脑组织中SOD、MDA、GSH-Px、CAT水平的检测

采用比色法进行检测。取各组剩余6只大鼠的脑组织以冠状切面切成2片，取其中一片脑组织，加入适量生理盐水在冰浴条件下充分研磨，以3 000 r/min离心10 min，收集上清液；取部分上清液（剩余部分进行Western blot实验）按试剂盒说明书方法测定大鼠脑组织中SOD、MDA、GSH-Px、CAT水平。

2.6 大鼠大脑皮层神经细胞凋亡的检测

采用TUNEL法进行检测。取“2.5”项下剩余的一份冠状切片，按照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书方法操作进行脑组织染色，采用荧光显微镜进行观察，棕黄色颗粒为阳性染色，表明神经细胞凋亡。每个图片随机选取3个高倍视野，计算凋亡率，凋亡率（%）＝阳性染色细胞平均光密度值/总细胞平均光密度×100%。

2.7 大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取适量“2.5”项下的脑组织匀浆，加入组织裂解液适量，然后采用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白变性，然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，分离蛋白，转膜，封闭；分别加入Bax（稀释度为1∶1 000）、Bcl-2（稀释度为1∶1 000）、cleaved-caspase-3（稀释度为1∶500）、GAPDH（稀释度为1∶10 000）一抗，4 ℃孵育过夜；加入二抗（稀释度为1∶15 000）孵育2 h；以ECL发光剂显影，采用凝胶成像系统进行分析，并通过Image J软件分析蛋白灰度值，以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示其表达水平。实验重复3次。

2.8 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 TMSC4对CIRI模型大鼠脑指数及脑含水量的影响

与假手术组比较，模型组大鼠脑指数和脑含水量均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠脑指数和脑含水量均显著降低（$P<0.05$）；与SC-Ag组或TMP组比较，TMSC4中、高剂量组大鼠脑指数和脑含水量均显著降低（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠脑指数、脑含水量及神经细胞凋亡率的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	脑指数	脑含水量/%	凋亡率/%
假手术组	0.38±0.02	70.58±6.25	5.28±0.71
模型组	0.70±0.11[a]	83.27±9.43[a]	33.49±5.01[a]
SC-Ag组	0.53±0.04[b]	76.39±5.84[b]	16.49±2.03[b]
TMP组	0.60±0.07[b]	79.47±7.38[b]	20.17±1.25[b]
TMSC4低剂量组	0.62±0.06[b]	81.18±6.34[b]	23.84±3.94[bc]
TMSC4中剂量组	0.49±0.05[bcd]	74.36±7.24[bcd]	12.19±1.87[bcd]
TMSC4高剂量组	0.41±0.03[bcd]	71.90±5.09[bcd]	8.60±1.63[bcd]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与SC-Ag组比较，$P<0.05$；d：与TMP组比较，$P<0.05$。

3.2 TMSC4对CIRI模型大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平的影响

与假手术组比较，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$）；与SC-Ag组或TMP组比较，TMSC4中、高剂量组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
假手术组	35.58±6.91	18.69±4.63	55.63±7.08
模型组	102.83±15.26[a]	52.61±8.69[a]	113.56±16.11[a]
SC-Ag组	65.54±8.41[b]	33.92±7.05[b]	76.82±8.03[b]
TMP组	76.06±5.39[b]	39.05±6.63[b]	83.59±8.17[b]
TMSC4低剂量组	88.95±9.72[b]	40.27±7.05[b]	87.36±7.81[b]
TMSC4中剂量组	59.95±7.35[bcd]	27.65±6.93[bcd]	70.81±7.54[bcd]
TMSC4高剂量组	50.47±8.61[bcd]	22.73±4.97[bcd]	63.72±6.59[bcd]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与SC-Ag组比较，$P<0.05$；d：与TMP组比较，$P<0.05$。

3.3 TMSC4对CIRI模型大鼠脑组织中SOD、MDA、GSH-Px、CAT水平的影响

与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中SOD、GSH-Px、CAT水平均显著降低（$P<0.05$），MDA水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠脑组织中SOD、GSH-Px、CAT水平均显著升高（$P<0.05$），MDA水平均显著降低（$P<0.05$）；与TMP组比较，TMSC4低剂量组大鼠脑组织中GSH-Px水平显著升高（$P<0.05$）；与SC-Ag组或TMP组比较，TMSC4中、高剂量组大鼠脑组织中SOD、GSH-Px、CAT水平均显著升高，MDA水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

表3　各组大鼠脑组织中SOD、MDA、GSH-Px、CAT水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	SOD/(U/mg)	MDA/(μmol/g)	GSH-Px/(U/mg)	CAT/(U/mg)
假手术组	149.75±6.52	4.84±0.63	17.46±2.07	3.56±0.52
模型组	87.54±13.89[a]	9.67±1.47[a]	8.58±1.14[a]	1.81±0.59[a]
SC-Ag组	118.58±9.54[b]	7.31±1.05[b]	13.72±0.75[b]	2.55±0.56[b]
TMP组	105.42±9.63[b]	7.98±0.63[b]	10.41±1.02[b]	2.26±0.35[b]
TMSC4低剂量组	110.75±8.38[b]	7.72±0.91[b]	12.85±0.94[bc]	2.38±0.38[b]
TMSC4中剂量组	125.67±8.47[bcd]	6.59±0.76[bcd]	14.98±0.86[bcd]	2.96±0.62[bcd]
TMSC4高剂量组	138.06±9.75[bcd]	6.01±0.94[bcd]	16.63±1.59[bcd]	3.21±0.43[bcd]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与TMP组比较，$P<0.05$；d：与SC-Ag组比较，$P<0.05$。

3.4　TMSC4对CIRI模型大鼠大脑皮层神经细胞凋亡的影响

假手术组大鼠大脑皮层中可见到少量棕黄色颗粒；与假手术组比较，模型组大鼠大脑皮层中棕黄色颗粒数量明显增多，神经细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠大脑皮层中棕黄色颗粒数量明显减少，神经细胞凋亡率均显著降低（$P<0.05$）；与SC-Ag组或TMP组比较，TMSC4中、高剂量组大鼠大脑皮层中棕黄色颗粒数量明显减少，神经细胞凋亡率均显著降低（$P<0.05$）。结果见表1、图2（TMSC4低剂量组图略）。

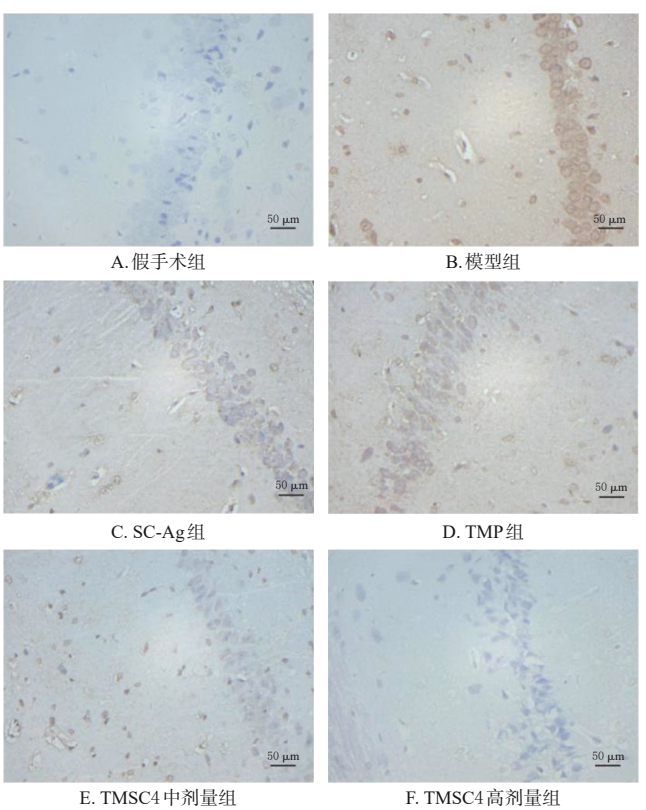


图2　各组大鼠脑组织中大脑皮层神经细胞凋亡图

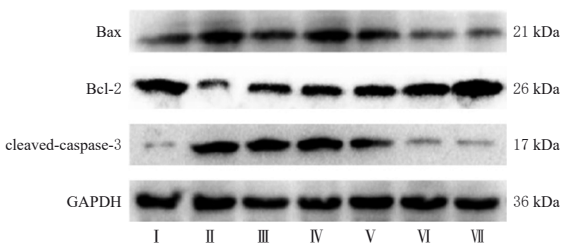
3.5　TMSC4对CIRI模型大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白表达的影响

与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠脑组织中Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与SC-Ag组比较，TMSC4低剂量组大鼠脑组织中cleaved-caspase-3蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；TMSC4中、高剂量组大鼠脑组织中Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与TMP组比较，TMSC4各剂量组大鼠脑组织中上述指标表达水平均显著逆转（$P<0.05$）。结果见表4、图3。

表4　各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白相对表达量结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Bcl-2	Bax	cleaved-caspase-3
假手术组	1.26±0.21	0.28±0.02	0.06±0.01
模型组	0.33±0.03[a]	1.17±0.20[a]	1.18±0.08[a]
SC-Ag组	0.82±0.09[b]	0.60±0.03[b]	0.78±0.09[b]
TMP组	0.71±0.06[b]	0.89±0.05[b]	0.86±0.15[b]
TMSC4低剂量组	0.85±0.05[bc]	0.66±0.04[bc]	0.54±0.08[bcd]
TMSC4中剂量组	0.98±0.11[bcd]	0.43±0.04[bcd]	0.39±0.07[bcd]
TMSC4高剂量组	1.16±0.18[bcd]	0.32±0.03[bcd]	0.29±0.06[bcd]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与TMP组比较，$P<0.05$；d：与SC-Ag组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：SC-Ag组；Ⅳ：TMP组；Ⅴ：TMSC4低剂量组；Ⅵ：TMSC4中剂量组；Ⅶ：TMSC4高剂量组。

图3　各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白表达的电泳图

4　讨论

本课题组前期研究发现，利用氨基酸将SC-Ag与TMP连接起来的孪药TMSC4的溶解性较SC-Ag好，并可显著降低血浆中纤维蛋白原含量，改善大鼠缺血再灌注损伤后的神经行为特征，减少脑梗死体积[8]。因此，本研究进一步探讨TMSC4对CIRI模型大鼠的保护作用及其机制。

炎症因子IL-1β、TNF-α和IL-6的产生和释放会进一步加重炎症反应和脑损伤[14]，抑制这些炎症因子的释放可减轻CIRI。本研究结果显示，TMSC4能够降低大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平，这说明TMSC4可通过减轻炎症反应，改善模型大鼠CIRI。

相关研究表明，抗氧化剂的消耗和过量的自由基产生会导致CIRI[15]。SOD是一种内源性抗氧化酶，可保护机体免受氧化损伤；而GSH-Px和CAT为主要的抗氧化剂，可清除过氧化氢以及其他过氧化物，其中CAT对清除过氧化氢起着关键作用[16]；MDA的积累能够直接反映CIRI脂质过氧化的程度[17]。因此，测定大鼠脑组织中

SOD、CAT、GSH-Px和MDA的水平可以反映氧化应激的严重程度。本研究结果显示，TMSC4可升高大鼠脑组织中的SOD、GSH-Px、CAT水平，降低MDA水平，这表明TMSC4可减轻模型大鼠脑组织的氧化应激损伤。

缺血性、兴奋性中毒和创伤性脑损伤实验模型中程序性细胞死亡的重要调节因子是Bcl-2和caspase家族。当神经细胞缺血后，凋亡蛋白Bax会导致细胞色素C从线粒体中释放，激活caspase-9，进一步激活caspase-3，激活的caspase-3（即cleaved-caspase-3）是细胞凋亡的关键执行因子，通过降解凋亡抑制蛋白和细胞骨架蛋白等导致细胞凋亡[18]。Bax（促凋亡成员）和Bcl-2（抗凋亡成员）属于Bcl-2蛋白家族，是一对拮抗蛋白；Bcl-2蛋白通过与Bax蛋白结合形成复合物来抑制细胞凋亡[19]。本研究结果显示，TMSC4可通过下调大鼠脑组织中Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平，上调Bcl-2蛋白表达水平，抑制神经细胞凋亡，从而起到神经保护作用。

中、高剂量TMSC4与TMP、SC-Ag比较发现，可明显降低炎症因子水平、提高抗氧化能力，这说明TMSC4对CIRI模型大鼠的保护作用较SC-Ag、TMP更显著。

综上所述，TMSC4对CIRI模型大鼠具有保护作用，其作用机制可能与减轻炎症反应、氧化应激损伤，抑制神经细胞凋亡有关。

参考文献

[1] ZHOU M G, WANG H D, ZENG X Y, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-1158.

[2] OZONER B, YUCELI S, AYDIN S, et al. Effects of pycnogenol on ischemia/reperfusion-induced inflammatory and oxidative brain injury in rats[J]. Neurosci Lett, 2019, 704: 169-175.

[3] GUO L, HUANG Z X, HUANG L J, et al. Surface-modified engineered exosomes attenuated cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting the delivery of quercetin towards impaired neurons[J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 141.

[4] QIAN W D, XIONG X J, FANG Z Y, et al. Protective effect of tetramethylpyrazine on myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 107501.

[5] LI G L, LI G L, TIAN Y F, et al. A novel ligustrazine derivative T-VA prevents neurotoxicity in differentiated PC12 cells and protects the brain against ischemia injury in CIRI rats[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21759-21774.

[6] WU D R, CHEN J, LUO K K, et al. Design, synthesis and evaluation of novel scutellarin and scutellarein-N, N-bis-substituted carbamate-l-amino acid derivatives as potential multifunctional therapeutics for Alzheimer's disease [J]. Bioorg Chem, 2022, 122: 105760.

[7] WU S X, LIU M J, WEN J L, et al. Hybrid molecules of scutellarein and 3, 5, 6-trimethylpyrazine-2-formic acid linked with polar amino acid for ischemic stroke[J]. Med Chem Res, 2022, 31(6): 916-924.

[8] 刘明吉，吴淑霞，雷丹丹，等. 川芎嗪灯盏乙素苷元抗缺血性脑卒中孪药的合成及活性研究[J]. 中国新药杂志，2021，30(3)：267-273.

[9] DONG Y X, DONG L, CHEN J L, et al. Synthesis and biological evaluation of N-alkyl-1, 4-dihydroquinoline prodrugs of scutellarin methyl ester as neuroprotective agents[J]. Med Chem Res, 2018, 27(4): 1111-1121.

[10] 徐芳琴，郭超，王婧雯. 山柰酚对脑缺血/再灌注损伤的体内外保护作用机制研究[J]. 中国药房，2022，33(17)：2065-2071.

[11] 汪继涛，刘天龙，李玉文. Z-没药甾酮联合11-羰基-β-乙酰乳香酸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的改善作用研究[J]. 中国药房，2019，30(24)：3354-3359.

[12] YIN L H, TANG T, LIN Y J, et al. Functional connectivity of ipsilateral striatum in rats with ischemic stroke increased by electroacupuncture[J]. J Integr Neurosci, 2022, 21(6): 162.

[13] 马贤德，孙宏伟，柴纪严，等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究[J]. 中华中医药学刊，2009，27(6)：1200-1201.

[14] LIU M, XU Z P, WANG L, et al. Cottonseed oil alleviates ischemic stroke injury by inhibiting the inflammatory activation of microglia and astrocyte[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 270.

[15] CHOUCHANI E T, PELL V R, GAUDE E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS[J]. Nature, 2014, 515(7527): 431-435.

[16] SAMARGHANDIAN S, AZIMI-NEZHAD M, FARKHONDEH T, et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney[J]. Biomedecine Pharmacother, 2017, 87: 223-229.

[17] WANG L F, SUN J, YI Q D, et al. Protective effect of polyphenols extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats[J]. Molecules, 2012, 17(8): 8886-8897.

[18] LI Z X, XIAO G X, WANG H Y, et al. A preparation of *Ginkgo biloba* L. leaves extract inhibits the apoptosis of hippocampal neurons in post-stroke mice via regulating the expression of Bax/Bcl-2 and caspase-3[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114481.

[19] YANG L, TAO Y W, LUO L L, et al. Dengzhan Xixin injection derived from a traditional Chinese herb *Erigeron breviscapus* ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via modulation of mitophagy and mitochondrial apoptosis[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 288: 114988.

（收稿日期：2023-02-07　修回日期：2023-06-17）

（编辑：唐晓莲）