穿心莲内酯调节Nrg-1/ErbB4信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡的影响Δ

邓　敏[1*]，禹　红[1]，周　祥[1]，孙海东[2#]（1.武汉市中医医院检验科，武汉　430000；2.武汉市中医医院脑病科，武汉　430000）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）21-2634-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.21.10

摘　要　目的　探讨穿心莲内酯（Andro）调节神经调节蛋白1（Nrg-1）/表皮生长因子受体4（ErbB4）信号通路对缺血性脑卒中（IS）大鼠神经元凋亡的影响。**方法**　采用线栓法建立IS大鼠模型。将60只造模成功的大鼠随机分为模型组（Model组，生理盐水）、Andro低剂量组（Andro-L组，50 mg/kg）、Andro高剂量组（Andro-H组，100 mg/kg）和Andro-H+Dacomitinib组（100 mg/kg Andro+7.5 mg/kg Nrg-1/ErbB4信号通路抑制剂Dacomitinib），每组15只；另取15只大鼠为Sham组（生理盐水）。灌胃给药/生理盐水，每天1次，连续7 d。给药结束后，评估大鼠神经功能；检测大鼠血清中乳酸脱氢酶（LDH）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-10、神经生长因子（NGF）水平；测定大鼠脑梗死面积；观察大鼠海马组织病理变化；检测大鼠海马神经元凋亡率和海马组织中丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）水平及基质金属蛋白酶9（MMP-9）、剪切型胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3）、Nrg-1蛋白表达水平和磷酸化ErbB4（p-ErbB4）/ErbB4比值。**结果**　与Model组比较，Andro-L组、Andro-H组大鼠Zea-Longa评分，逃避潜伏期，血清中LDH、TNF-α、IL-1β水平，脑梗死面积百分比，海马神经元凋亡率，海马组织中MDA水平和MMP-9、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著降低/缩短（$P<0.05$）；滞留时间、穿越平台次数，血清中IL-10、NGF水平，海马组织中CAT、SOD水平和Nrg-1蛋白表达水平、p-ErbB4/ErbB4比值均显著延长/增加/升高（$P<0.05$）；海马神经组织结构损伤程度明显降低。Dacomitinib可减弱高剂量Andro对IS大鼠神经元损伤的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　Andro可减轻IS大鼠炎症反应、氧化应激和海马组织损伤，改善神经功能；其作用机制可能与激活Nrg-1/ErbB4信号通路有关。

关键词　穿心莲内酯；缺血性脑卒中；Nrg-1/ErbB4信号通路；神经元凋亡；神经功能

Effect of andrographolide on neuronal apoptosis in ischemic stroke rats by regulating Nrg-1/ErbB4 signaling pathway

DENG Min[1], YU Hong[1], ZHOU Xiang[1], SUN Haidong[2]（1. Dept. of Clinical Laboratory, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China; 2. Dept. of Encephalopathy, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect of andrographolide (Andro) on the neuronal apoptosis in ischemic stroke (IS) rats by regulating the neuregulin-1 (Nrg-1)/epithelial growth factor receptor 4 (ErbB4) signaling pathway. **METHODS** The IS rat model was established using the suture method. Sixty successfully modeled rats were randomly divided into model group (physiological saline), Andro low-dose group (Andro-L group, 50 mg/kg), Andro high-dose group (Andro-H group, 100 mg/kg), and Andro-H+Dacomitinib group (100 mg/kg of Andro+7.5 mg/kg of Nrg-1/ErbB4 signaling pathway inhibitor Dacomitinib), with 15 rats in each group. Another 15 rats were chosen as the sham group (physiological saline). The rats were intragastrically administered medication/physiological saline once a day for 7 consecutive days. After medication, the neurological function of the rats was assessed; the levels of lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-10, and nerve growth factor (NGF) in the rat serum were detected; the infarct area of the rat brain was measured, and the pathological changes in the hippocampal tissue of the rats were observed. Moreover, the apoptosis rate of hippocampal neurons and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), cleaved-caspase-3, Nrg-1 protein expressions and phosphorylated ErbB4 (p-ErbB4)/ErbB4 ratio in the hippocampal tissue were detected. **RESULTS** Compared with the model group, the Zea-Longa score, the escape latency, the serum LDH, TNF-α, IL-1β levels, the percentage of cerebral infarction area, the hippocampal neuron apoptosis rate, the MDA level and MMP-9, cleaved-caspase-3 protein expression levels in the hippocampal tissue in the Andro-L and Andro-H groups were significantly reduced/shortened ($P<0.05$). The dwelling time, the number of platform crossings, the serum IL-10, NGF levels, the CAT, SOD levels, the Nrg-1 protein expression level and p-ErbB4/ErbB4 ratio in the hippocampal tissue were significantly extended/increased ($P<0.05$); the degree of hippocampal neural tissue damage was significantly reduced. Dacomitinib could significantly weaken the improvement effect of high-dose Andro on neuronal injury in IS rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Andro can reduce the

Δ**基金项目** 武汉市中医药科研项目（No.WZ22C67）

＊**第一作者** 主管技师。研究方向：免疫学检验的临床应用。E-mail：lrxxl3@163.com

＃**通信作者** 主治医师。研究方向：针灸及中药治疗脑血管疾病及神经系统疾病。E-mail：dl5vi6b@163.com

inflammatory response, oxidative stress, and hippocampal tissue damage in IS rats, and promote neurological function. Its mechanism of action may be related to the activation of Nrg-1/ErbB4 signaling pathway.

KEYWORDS andrographolide; ischemic stroke; Nrg-1/ErbB4 signaling pathway; neuronal apoptosis; neurological function

缺血性脑卒中（ischemic stroke，IS）是一种血管堵塞或动脉狭窄引起的脑血管疾病。轻度IS患者会出现神经功能障碍，失去自理能力，影响正常生活，给家庭带来巨大负担；重度IS患者可能死亡[1]。目前IS的发病机制尚不完全清楚，但有研究显示与炎症、神经元凋亡、氧化应激等有关[2]。目前临床治疗IS的主要措施是静脉溶栓和手术取栓再辅以药物进行治疗，但风险较大，效果较差[3]。因此，探究IS的发生机制，开发新的药物对治疗IS具有重要意义。

穿心莲内酯（andrographolide，Andro）是植物穿心莲的活性成分，临床用于抗病毒、抗菌、抗炎、抗肿瘤、治疗心脑血管疾病等，目前临床上常见的含Andro的口服药品有穿心莲内酯胶囊、穿心莲内酯分散片、穿心莲内酯滴丸，注射用药品有莲必治注射液、炎琥宁注射液、穿琥宁注射剂等[4]。有研究表明，Andro可减轻缺血再灌注损伤小鼠的炎症和神经损伤，促进神经元增殖[5]。另有研究表明，Andro可减轻慢性脑缺血大鼠的炎症和神经损伤，改善其学习和记忆功能[6]。由此可见，Andro可降低炎症、减轻脑缺血神经损伤、改善神经功能，但其具体作用机制尚不明确。研究显示，神经调节蛋白1（regulating the neuregulin-1，Nrg-1）/表皮生长因子受体4（epithelial growth factor receptor 4，ErbB4）信号通路在神经发育和细胞增殖、分化等过程中发挥着重要作用，激活Nrg-1/ErbB4信号通路可减少癫痫小鼠神经元死亡[7]。基于此，本研究通过建立IS大鼠模型，探讨Andro是否可通过调节Nrg-1/ErbB4信号通路来降低IS大鼠神经元凋亡，进而改善神经损伤，为Andro的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

GX53型显微镜购自上海巴贯仪器科技有限公司；YP-96A型酶标仪购自山东优云谱光电科技有限公司；SYD-K4080A型组织切片机购自沈阳誉德电子仪器有限公司；WTY-31型荧光显微镜购自深圳微特视界科技有限公司；UV-6100S型紫外分光光度计购自江苏盛奥华环保科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有：Andro对照品（纯度＞99%，批号DC0036，成都乐美天医药科技有限公司），Nrg-1/ErbB4信号通路抑制剂Dacomitinib标准品（纯度＞99.6%，批号HY-13272，美国MCE公司），乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-10、神经生长因子（nerve growth factor，NGF）酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒（批号分别为YT-H11299、YT-R20639、YT-R20828、YT-R20039、YT-R20172，天津越腾生物技术有限公司），丙二醛（malonaldehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、TUNEL试剂盒和TTC染液（批号分别为A003-1-2、A001-1-2、A007-2-1、G002-2-2、D025-1-1，南京建成生物工程研究所），基质金属蛋白酶9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）、剪切型胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3）、Nrg-1、ErbB4、磷酸化（p-ErbB4）、β-肌动蛋白（β-actin）一抗及辣根过氧化酶（HRP）标记的免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号分别为ab58803、ab214430、ab191139、ab19391、ab1109273、ab179467、ab302644，英国Abcam公司）。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级SD雄性大鼠，共80只，6～7周龄，体重190～210 g，购自湖北贝恩特生物科技有限公司，动物生产许可证号为SCXK（鄂）2021-0027。动物在实验室[环境温度（22±2）℃、相对湿度（60±5）%、12 h光/12 h暗循环]适应性饲养7 d，饲养期间自由摄食和饮水。本实验在湖北贝恩特生物科技有限公司进行，并已通过该公司动物伦理委员会审核批准（批件号为2023-12158）。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

选取65只大鼠建立IS模型。将大鼠麻醉并固定，在颈部剃毛消毒后切开一个口，分离左侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉，将颈总动脉和颈外动脉近心端结扎，夹闭颈内动脉，将线栓插入颈总动脉延伸直至进入颈内动脉，然后结扎左侧大脑中动脉，缺血2 h；取出线栓恢复供血，缝合伤口并消毒[8]。术后24 h采用Zea-Longa法对大鼠进行评分，得分1～3分为造模成功[8]。造模成功的大鼠共61只，将其中60只大鼠（去掉评分最低的1只）随机分为模型组（Model组）、Andro低剂量组（Andro-L组）、Andro高剂量组（Andro-H组）和Andro-H+Dacomitinib组，每组15只。另取15只大鼠作为Sham组，仅切开颈部皮肤后就缝合伤口并消毒。

造模24 h后，Andro-L组、Andro-H组大鼠分别灌胃50、100 mg/kg的Andro[5]，Andro-H+Dacomitinib组大鼠灌胃100 mg/kg的Andro和7.5 mg/kg的Dacomitinib[9]，Sham组和Model组大鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续7 d。

2.2 大鼠神经功能评估

给药结束后24 h进行Zea-Longa评分[8]：0分——无异常；1分——提尾时左侧前肢弯曲；2分——行走时追尾或向左侧划圈；3分——行走时向左侧倾倒；4分——完全不能行走。

Zea-Longa评分后进行Morris水迷宫实验：制作1个

高60 cm、直径150 cm的圆形水池，用2个相互垂直的挡板将水池分为4块，分别标记为1、2、3、4区域，水池中央放1个距离水平面1 cm、直径12 cm的圆台。前5 d对大鼠进行训练，置大鼠于平台上适应2 min后，将大鼠随机放于任意一个区域，记录其游至平台的时间，如120 s内仍未游至平台，则将大鼠引导至平台并且停留10 s。训练结束后撤掉平台，把大鼠从1、2、3、4任意区域放入水池，记录大鼠逃避潜伏期（寻找、游至原平台位置所需时间）、目标象限滞留时间以及穿越平台次数。

2.3 样本采集

神经功能评分结束后，注射3%的戊巴比妥钠将大鼠麻醉，腹主动脉取血1 mL，以3 000 r/min离心10 min，收集上层血清；取血后，断头处死大鼠，取出完整脑组织，冷冻保存，备测。

2.4 血清中LDH、TNF-α、IL-1β、IL-10、NGF水平测定

取“2.3”项下血清，按照相应ELISA试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪检测血清中LDH、TNF-α、IL-1β、IL-10、NGF水平。

2.5 脑梗死面积测定

采用TTC染色法测定。各组分别取5只大鼠的脑组织，置于−20 ℃冰箱中冷冻20 min，然后进行冠状切片，用1%TTC溶液染色，37 ℃避光孵育30 min，拍照，采用Image Pro Plus 6.0软件分析脑梗死面积。

2.6 海马组织病理形态学变化观察

采用HE染色法观察。从各组剩余10只大鼠中另取5只大鼠的脑组织，用4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋后切取含有海马完整结构的脑切片，经苏木精和伊红依次染色后，采用显微镜观察大鼠海马组织形态，并拍照。

2.7 海马神经元凋亡检测

采用TUNEL法检测。取“2.6”项下脑切片，按照TUNEL试剂盒说明书方法操作，采用荧光显微镜观察并拍照，以Image J软件分析细胞凋亡情况（凋亡细胞呈绿色）。

2.8 海马组织中MDA、SOD、CAT水平检测

称取每组最后5只大鼠的海马组织，加入9倍体积冰生理盐水，低温匀浆，以3 000 r/min离心10 min，取上清液，按照试剂盒说明书方法操作，采用紫外分光光度计测定大鼠海马组织中MDA、SOD、CAT水平。

2.9 海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3、Nrg-1、ErbB4蛋白表达检测

采用Western blot法检测。定量称取“2.8”项下匀浆组织溶液，按蛋白提取试剂盒方法提取组织中的总蛋白，采用BCA试剂盒检测总蛋白浓度。以热水浴将蛋白变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（电压120 V，电泳时间60 min），然后电转至聚偏二氟乙烯膜上（电流400 mA，转膜时间90 min），5%脱脂奶粉室温封闭2 h；加入MMP-9、cleaved-caspase-3、Nrg-1、ErbB4、p-ErbB4、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 500），4 ℃孵育过夜；磷酸盐缓冲液洗涤3次，加入二抗（稀释比例为1∶5 000），常温孵育2 h。采用ECL试剂显色，拍照，用Image Pro Plus 6.0软件分析蛋白条带灰度值。以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平，并计算p-ErbB4/ErbB4比值。

2.10 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.1软件进行数据的统计分析。满足正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析和SNK-q检验进行组间比较。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 Andro对大鼠神经功能的影响

与Sham组比较，Model组大鼠Zea-Longa评分、逃避潜伏期均显著升高/延长（$P<0.05$），滞留时间、穿越平台次数均显著缩短/减少（$P<0.05$）。与Model组比较，Andro-L组、Andro-H组大鼠Zea-Longa评分、逃避潜伏期均显著降低/缩短（$P<0.05$），滞留时间、穿越平台次数均显著延长/增加（$P<0.05$），且Andro-H组上述指标的变化较Andro-L组更明显（$P<0.05$）。与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠Zea-Longa评分、逃避潜伏期均显著升高/延长（$P<0.05$），滞留时间、穿越平台次数均显著缩短/减少（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠神经功能评估结果比较（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	Zea-Longa评分/分	水迷宫实验		
		逃避潜伏期/s	滞留时间/s	穿越平台次数/次
Sham组	0	12.36±1.57	49.24±5.51	14.82±1.74
Model组	2.90±0.37[a]	38.14±3.62[a]	17.61±2.27[a]	5.23±0.62[a]
Andro-L组	2.10±0.28[b]	30.72±3.48[b]	26.58±3.49[b]	8.46±0.91[b]
Andro-H组	1.20±0.16[bc]	19.53±2.29[bc]	38.12±4.35[bc]	11.37±1.48[bc]
Andro-H+Dacomitinib组	2.30±0.32[d]	32.68±3.71[d]	24.73±2.86[d]	7.54±0.87[d]

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Andro-L组比较，$P<0.05$；d：与Andro-H组比较，$P<0.05$。

3.2 Andro对大鼠血清中LDH、TNF-α、IL-1β、IL-10、NGF水平的影响

与Sham组比较，Model组大鼠血清中LDH、TNF-α、IL-1β水平均显著升高（$P<0.05$），IL-10、NGF水平均显著降低（$P<0.05$）；与Model组比较，Andro-L组和Andro-H组大鼠血清中LDH、TNF-α、IL-1β水平均显著降低（$P<0.05$），IL-10、NGF水平均显著升高（$P<0.05$），且Andro-H组上述指标的变化较Andro-L组更明显（$P<0.05$）；与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠血清中LDH、TNF-α、IL-1β水平均显著升高（$P<0.05$），IL-10、NGF水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

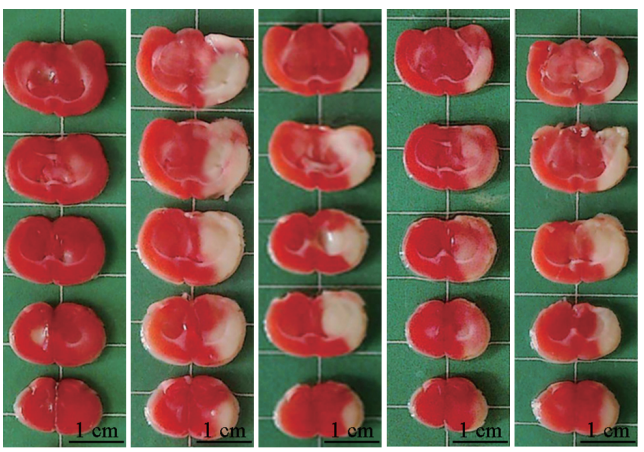
表2 各组大鼠血清中LDH、TNF-α、IL-1β、IL-10、NGF水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	LDH/(U/mL)	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)	NGF/(pg/mL)
Sham组	2.14±0.38	43.26±5.81	28.51±3.74	95.47±12.63	513.72±64.81
Model组	9.46±1.56[a]	184.57±24.76[a]	131.46±17.83[a]	20.52±2.86[a]	172.53±23.67[a]
Andro-L组	6.97±1.12[b]	136.42±17.53[b]	94.27±13.68[b]	46.84±6.71[b]	268.31±35.42[b]
Andro-H组	4.28±0.67[bc]	79.83±11.27[bc]	56.82±7.46[bc]	72.38±9.42[bc]	384.26±47.54[bc]
Andro-H+Dacomitinib组	7.35±1.24[d]	145.78±19.13[d]	102.39±14.57[d]	41.26±5.54[d]	251.48±32.19[d]

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Andro-L组比较，$P<0.05$；d：与Andro-H组比较，$P<0.05$。

3.3 Andro对大鼠脑梗死面积的影响

与Sham组（脑梗死面积百分比为0）比较，Model组大鼠脑梗死面积百分比[(36.73±4.28)%]显著升高（$P<0.05$）；与Model组比较，Andro-L组和Andro-H组大鼠脑梗死面积百分比[分别为(28.62±3.51)%、(19.54±2.37)%]均显著降低（$P<0.05$），且Andro-H组的变化较Andro-L组更明显（$P<0.05$）；与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠脑梗死面积百分比[(29.47±3.78)%]显著升高（$P<0.05$）。结果见图1。



A　B　C　D　E

A：Sham组；B：Model组；C：Andro-L组；D：Andro-H组；E：Andro-H+Dacomitinib组。

图1　各组大鼠的脑组织TTC染色结果

3.4 Andro对大鼠海马组织形态变化的影响

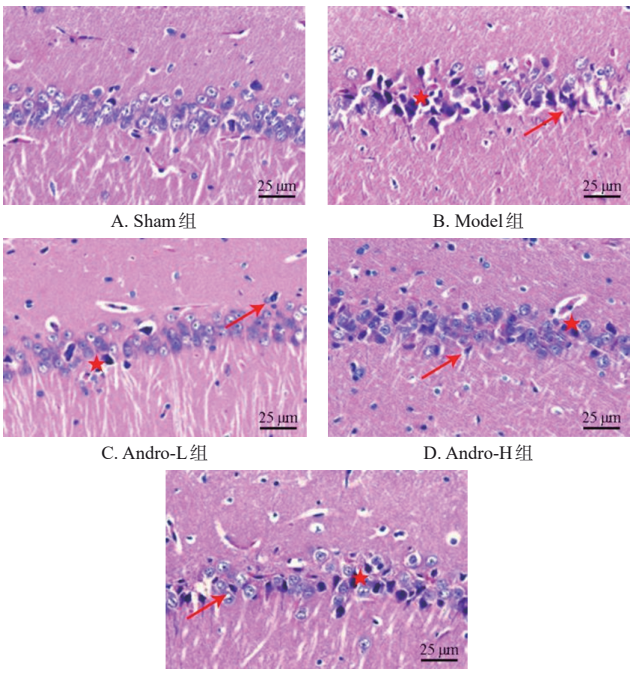
Sham组大鼠海马组织结构完整；与Sham组比较，Model组大鼠部分海马神经元间隙增大、稀疏且排列杂乱，细胞核皱缩且有破裂现象，有较多神经元死亡；与Model组比较，Andro-L组和Andro-H组大鼠海马组织结构损伤程度明显减轻；与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠海马组织结构损伤程度加重。结果见图2。

3.5 Andro对大鼠海马神经元凋亡的影响

与Sham组[神经元凋亡率为(3.72±0.56)%]比较，Model组大鼠海马神经元凋亡率[(42.38±5.47)%]显著升高（$P<0.05$）；与Model组比较，Andro-L组和Andro-H组大鼠海马神经元凋亡率[分别为(30.64±3.72)%、(19.64±2.31)%]均显著降低（$P<0.05$），且Andro-H组上述指标的变化较Andro-L组更明显（$P<0.05$）；与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠海马神经元凋亡率[(32.86±3.94)%]显著升高（$P<0.05$）。结果见图3。

3.6 Andro对大鼠海马组织中MDA、SOD、CAT水平的影响

与Sham组比较，Model组大鼠海马组织中MDA水平显著升高（$P<0.05$），SOD、CAT水平均显著降低（$P<0.05$）；与Model组比较，Andro-L组和Andro-H组大鼠海马组织中MDA水平均显著降低（$P<0.05$），SOD、CAT水平均显著升高（$P<0.05$），且Andro-H组上述指标的变化较Andro-L组更明显（$P<0.05$）；与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠海马组织中MDA水平显著升高（$P<0.05$），SOD、CAT水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。



A. Sham组　B. Model组

C. Andro-L组　D. Andro-H组

E. Andro-H+Dacomitinib组

注：五角星所指为神经元；箭头所指为细胞核皱缩、破裂。

图2　各组大鼠海马组织形态观察的显微图（HE染色）

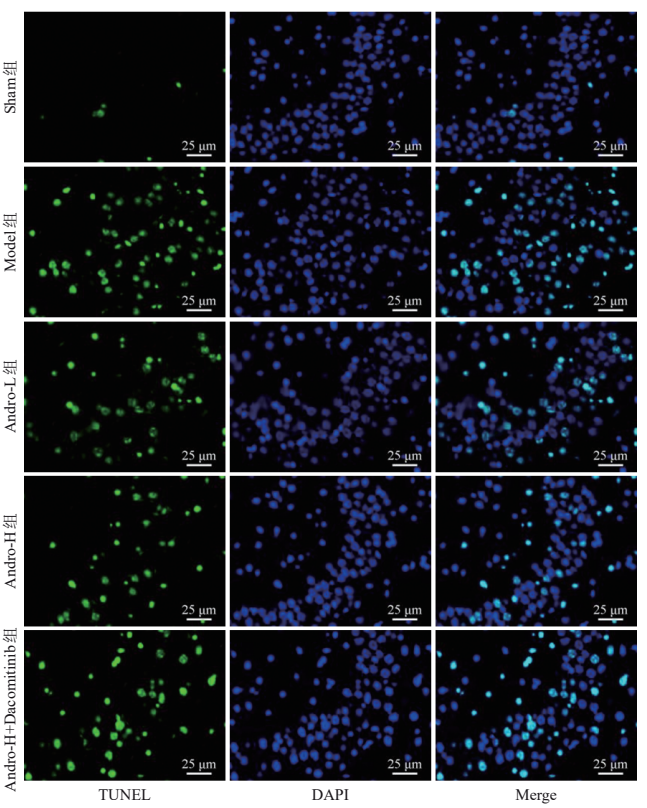


图3　各组大鼠海马神经元凋亡检测的显微图（TUNEL染色）

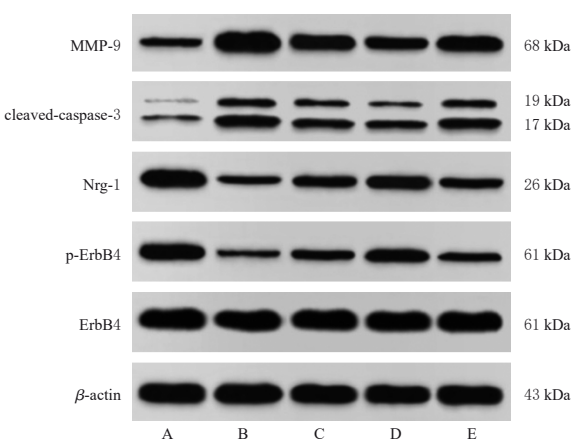
表3　各组大鼠海马组织中MDA、SOD、CAT水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)	CAT/(U/mg)
Sham组	2.16±0.28	139.61±16.47	94.52±13.16
Model组	8.34±1.12[a]	51.23±6.82[a]	23.70±2.91[a]
Andro-L组	6.47±0.78[b]	82.46±10.51[b]	46.39±5.74[b]
Andro-H组	4.29±0.56[bc]	107.95±13.68[bc]	72.41±8.62[bc]
Andro-H+Dacomitinib组	6.82±0.89[d]	73.81±9.26[d]	41.27±5.38[d]

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Andro-L组比较，$P<0.05$；d：与Andro-H组比较，$P<0.05$。

3.7　Andro对大鼠海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3、Nrg-1、ErbB4蛋白表达的影响

与Sham组比较，Model组大鼠海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），Nrg-1蛋白表达水平和p-ErbB4/ErbB4比值均显著降低（$P<0.05$）；与Model组比较，Andro-L组和Andro-H组大鼠海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），Nrg-1蛋白表达水平和p-ErbB4/ErbB4比值均显著升高（$P<0.05$），且Andro-H组上述指标的变化较Andro-L组更明显（$P<0.05$）；与Andro-H组比较，Andro-H+Dacomitinib组大鼠海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），Nrg-1蛋白表达水平和p-ErbB4/ErbB4比值均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表4。



A：Sham组；B：Model组；C：Andro-L组；D：Andro-H组；E：Andro-H+Dacomitinib组。

图4　各组大鼠海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3、Nrg-1、p-ErbB4、ErbB4蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠海马组织中MMP-9、cleaved-caspase-3、Nrg-1蛋白表达水平和p-ErbB4/ErbB4比值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	MMP-9/β-actin	cleaved-caspase-3/β-actin	Nrg-1/β-actin	p-ErbB4/ErbB4
Sham组	0.36±0.05	0.17±0.03	0.97±0.12	0.87±0.11
Model组	1.13±0.14[a]	0.78±0.10[a]	0.31±0.05[a]	0.26±0.04[a]
Andro-L组	0.85±0.11[b]	0.59±0.08[b]	0.53±0.07[b]	0.48±0.07[b]
Andro-H组	0.62±0.08[bc]	0.41±0.06[bc]	0.76±0.09[bc]	0.70±0.09[bc]
Andro-H+Dacomitinib组	0.94±0.12[d]	0.65±0.08[d]	0.48±0.06[d]	0.43±0.05[d]

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Andro-L组比较，$P<0.05$；d：与Andro-H组比较，$P<0.05$。

4　讨论

IS是一种致死率较高的脑血管疾病，IS患者脑部供血出现障碍，引起脑组织细胞缺血性死亡，造成患者神经功能障碍或死亡[10]。Andro是一种从天然中药中提取的二萜类化合物，具有抗炎和改善神经损伤的功能，可通过减轻炎症和氧化应激改善脑微血管内皮细胞通透性，减少细胞凋亡，对缺血性脑血管疾病具有一定治疗效果[11]。姜燕强等[12]研究显示，Andro可减轻脑出血大鼠脑水肿，改善神经功能。

IS发生时脑组织区域细胞因缺血缺氧导致神经元大量死亡，进而造成神经功能障碍；cleaved-caspase-3为凋亡蛋白，可激活细胞凋亡程序，促进细胞凋亡[13]。本研究结果显示，Model组大鼠海马组织中cleaved-caspase-3蛋白表达、神经元凋亡率和脑梗死面积百分比较Sham组均显著升高，这提示IS造成大鼠神经元大量死亡；Andro干预后可降低IS大鼠海马组织中cleaved-caspase-3蛋白表达和减少神经元凋亡。

TNF-α、IL-1β为炎症因子，可造成缺血区域脑组织炎性损伤，还可通过血液循环造成全身炎症；IL-10是一种炎症抑制因子，可抑制炎症因子合成和分泌，降低炎性损伤[14]；LDH在细胞正常代谢过程中发挥重要作用，当细胞膜结构破损或细胞死亡时，LDH会从细胞中排出进入血液，其是细胞损伤的标志物[15]。NGF是一种神经生长因子，可促进神经元生长、发育、分化和成熟，维持神经系统正常功能，加快神经系统损伤修复[16]。本研究结果显示，Andro干预后可降低IS大鼠炎症因子（TNF-α、IL-1β）表达和LDH水平，提高抗炎因子（IL-10）表达和NGF水平，减轻炎性损伤。

氧化应激是IS发生发展的重要因素之一，IS发生时可造成氧自由基大量积累，对脑组织造成氧化损伤。MMP-9是一种基质蛋白酶，可降解细胞外基质和微血管基底膜，造成脑组织内皮细胞和基底膜损伤，诱发血管性脑水肿和出血，促进IS发展[17]。本研究结果显示，Andro干预后可降低IS大鼠海马组织中氧化损伤产物MDA含量和MMP-9蛋白表达，提高抗氧化酶CAT、SOD活性，减轻脑损伤；并且，Andro干预后可改善海马组织形态和神经功能。这提示Andro可减轻IS大鼠炎症反应、氧化应激和神经组织损伤，改善其神经功能。

Nrg-1/ErbB4信号通路可参与神经递质受体的调节过程，其中Nrg-1是一种重要的中枢神经系统调节因子，可以激活ErbB4使其磷酸化，磷酸化的ErbB4进一步参与突触形成与发育、神经元增殖和分化过程[18]。研究显示，激活Nrg-1/ErbB4信号通路可降低睡眠剥夺大鼠神经元凋亡，改善其突触超微结构和神经损伤[19]；激活Nrg-1/ErbB4信号通路可减轻创伤性脑损伤小鼠脑水肿，改善其运动功能[20]。本研究结果显示，Model组大鼠海马组织中Nrg-1蛋白表达水平和p-ErbB4/ErbB4比值降低，提示Nrg-1/ErbB4信号通路被抑制。Andro干预后可提高IS大鼠海马组织中Nrg-1蛋白表达水平和

p-ErbB4/ErbB4比值，提示其激活了Nrg-1/ErbB4信号通路。为进一步验证Andro的作用靶点，本研究在高剂量Andro干预的同时用Nrg-1/ErbB4信号通路抑制剂Dacomitinib进行干预，结果显示，Dacomitinib可降低高剂量Andro对IS大鼠神经元凋亡的改善作用。

综上所述，Andro可能是通过激活Nrg-1/ErbB4信号通路来减轻IS大鼠炎症反应、氧化应激和海马组织损伤，进而改善其神经功能。但IS发生机制复杂，涉及信号通路较多，本研究只探究了Nrg-1/ErbB4信号通路，后续还需探讨Andro改善IS的其他作用通路。

参考文献

[1] DAVE K M, STOLZ D B, MANICKAM D S. Delivery of mitochondria-containing extracellular vesicles to the BBB for ischemic stroke therapy[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2023, 20(12): 1769-1788.

[2] SHI G S, QIN Q L, HUANG C, et al. The pathological mechanism of neuronal autophagy-lysosome dysfunction after ischemic stroke[J]. Cell Mol Neurobiol, 2023, 43(7): 3251-3263.

[3] BINDER N F, EL AMKI M, GLÜCK C, et al. Leptomeningeal collaterals regulate reperfusion in ischemic stroke and rescue the brain from futile recanalization[J]. Neuron, 2024, 112(9): 1456-1472.e6.

[4] 江楠，马欣. 近20年穿心莲内酯的药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2024，5(3)：57-71.
JIANG N, MA X. Research progress on the pharmacological effects of andrographis lactone in recent 20 years[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2024, 5(3): 57-71.

[5] LI Y, XIANG L L, MIAO J X, et al. Protective effects of andrographolide against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Int J Mol Med, 2021, 48(4): 186.

[6] WANG D P, YIN H, LIN Q, et al. Andrographolide enhances hippocampal BDNF signaling and suppresses neuronal apoptosis, astroglial activation, neuroinflammation, and spatial memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(10): 1277-1284.

[7] PETERSON A R, GARCIA T A, FORD B D, et al. Regulation of Nrg-1-ErbB4 signaling and neuroprotection by exogenous neuregulin-1 in a mouse model of epilepsy[J]. Neurobiol Dis, 2021, 161: 105545.

[8] 赵卓琳，吴蛟，马英，等. 丹酚A调控CD147-MMPs通路对大鼠缺血性脑卒中后神经的保护作用[J]. 中国老年学杂志，2023，43(21)：5281-5285.
ZHAO Z L, WU J, MA Y, et al. Protective effect of salvianolic acid A on nerve after ischemic stroke in rats by regulating CD147-MMPs pathway[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(21): 5281-5285.

[9] KANDEEL S, ESTFANOUS R S. Histomorphological and immunohistochemical study of dacomitinib-induced ileal mucositis in rats with the possible protection by baicalin[J]. J Microsc Ultrastruct, 2022, 11(3): 135-144.

[10] YAN K Q, WU Q S, YANG J. Blood pressure variability may be a new predictor for the occurrence and prognosis of ischemic stroke[J]. Chin Med Sci J, 2023, 38(3): 242-249.

[11] WANG D P, KANG K, SUN J, et al. URB597 and andrographolide improve brain microvascular endothelial cell permeability and apoptosis by reducing oxidative stress and inflammation associated with activation of Nrf2 signaling in oxygen-glucose deprivation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4139330.

[12] 姜燕强，陈俊丽，陈利平，等. 穿心莲内酯对脑出血大鼠脑水肿及AQP4、NKCC1表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2022，20(11)：1974-1980.
JIANG Y Q, CHEN J L, CHEN L P, et al. Effect of andrographolide on cerebral edema and the expression of AQP4 and NKCC1 in rats with cerebral hemorrhage[J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2022, 20(11): 1974-1980.

[13] ZHENG Z, HOU F, HE G D, et al. Carvedilol reduces the neuronal apoptosis after ischemic stroke by modulating activator of transcription 3 expression *in vitro*[J]. Dev Neurosci, 2023, 45(2): 94-104.

[14] RZESZOTARSKA E, SOWINSKA A, STYPINSKA B, et al. IL-1β, IL-10 and TNF-α polymorphisms may affect systemic lupus erythematosus risk and phenotype[J]. Clin Exp Rheumatol, 2022, 40(9): 1708-1717.

[15] SUN X H, LIU Z F, ZHOU L, et al. Escin avoids hemorrhagic transformation in ischemic stroke by protecting BBB through the AMPK/Cav-1/MMP-9 pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 120: 155071.

[16] EROGLU E, UNEL C C, HARMANCI N, et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate ameliorates functional and structural abnormalities in cisplatin-induced peripheral neuropathy[J]. J Trace Elem Med Biol, 2022, 70: 126909.

[17] YOUNIS N S, MOHAMED M E. Anethole pretreatment modulates cerebral ischemia/reperfusion: the role of JNK, p38, MMP-2 and MMP-9 pathways[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(3): 442.

[18] VAPARANTA K, JOKILAMMI A, PAATERO I, et al. STAT5b is a key effector of Nrg-1/ERBB4-mediated myocardial growth[J]. EMBO Rep, 2023, 24(5): e56689.

[19] 谢光璟，徐波，夏婧，等. 基于Nrg-1/ErbB4信号通路研究安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马神经元损伤及突触微环境的保护作用[J]. 中国中药杂志，2024，6(3)：1-12.
XIE G J, XU B, XIA J, et al. Study on the protective effect of Anmeidan on hippocampal neuron injury and synaptic microenvironment in sleep deprived rats based on Nrg-1/ErbB4 signaling pathway[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 6(3): 1-12.

[20] DENG W K, LUO F, LI B M, et al. Nrg-1-ErbB4 signaling promotes functional recovery in a murine model of traumatic brain injury via regulation of GABA release[J]. Exp Brain Res, 2019, 237(12): 3351-3362.

（收稿日期：2024-06-21　修回日期：2024-09-20）
（编辑：林　静）