

·论 著·

漆黄素在大鼠脑缺血再灌注损伤中的神经保护作用及可能机制

林俊瀚 林传琦 刘长远

[摘要] 目的 探讨漆黄素在大鼠脑缺血再灌注(I/R)损伤中的治疗效果和可能机制。方法 采用30只雄性SD大鼠建立脑I/R模型,将其分为五组:Sham组(假手术)、I/R组、FIS组(漆黄素+I/R)、SB203580组(SB203580+I/R)以及FIS+SB203580组(漆黄素+SB203580+I/R)。利用GEO数据库中的GSE202659和GSE131193数据集对脑I/R关键信号通路进行分析,筛选出关键的信号通路。检测比较各组的神经功能评分、大脑组织含水量、脑梗塞面积、神经元存活率、细胞凋亡和相关蛋白表达差异。结果 GEO生物信息学分析显示,筛选出p38 MAPK为共同的信号通路。与I/R组比较,FIS组脑梗死面积、细胞凋亡率、脑组织p-p38、Caspase-3和cleaved Caspase-3的表达水平明显降低(t 分别=-10.40、-6.74、-6.79、-8.78、-7.27, P 均<0.05),神经细胞计数和脑组织Bcl-2的表达水平明显升高(t 分别=3.06、5.11, P 均<0.05)。与FIS组比较,FIS+SB203580组脑梗死面积、脑组织p-p38、Caspase-3和cleaved Caspase-3的表达水平明显下降(t 分别=-3.85、-4.87、-4.57、-6.03, P 均<0.05)。结论 漆黄素通过下调p-p38的表达明显减轻了大鼠I/R损伤引起的神经元损伤,与SB203580联合使用可以增加这一疗效,这为治疗脑I/R损伤提供了新的思路。

[关键词] 漆黄素; 再灌注损伤; p38丝裂原活化蛋白激酶类; 神经元损伤; 大鼠

Neuroprotective effect and possible mechanism of Fisetin in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats LIN Junhan, LIN Chuanqi, LIU Changyuan. Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Key Laboratory of Pediatric Anesthesiology of Ministry of Education, Key Laboratory of Anesthesiology of Zhejiang Province, Wenzhou 325027, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect and possible mechanism of Fisetin in cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** A cerebral I/R model was established in 30 male SD rats, which were divided into five groups: Sham group (sham operation), I/R group, FIS group (Fisetin+I/R), SB203580 group (SB203580+I/R), and FIS +SB203580 group (Fisetin + SB203580+I/R). The key signaling pathways in cerebral I/R were analyzed using the GSE202659 and GSE131193 datasets in the GEO database to screen out the key signaling pathways. The scores of nerve function, water content of brain tissue, cerebral infarct area, neuronal survival rate, cell apoptosis and relative protein expression were detected and compared among all groups. **Results** GEO bioinformatics analysis showed that p38 MAPK was selected as a common signaling pathway. Compared with the I/R group, the cerebral infarction area, apoptosis rate, and the expression levels of p-p38, Caspase-3, and cleaved Caspase-3 in brain tissue in the FIS group were significantly decreased (t =-10.40, -6.74, -6.79, -8.78, -7.27, P <0.05), while the neuronal cell count and the expression level of Bcl-2 in brain tissue were significantly increased (t =3.06, 5.11, P <0.05). Compared with the FIS group, the cerebral infarction area and the expression levels of p-p38, Caspase-3, and cleaved Caspase-3 in brain tissue in the FIS + SB203580 group were significantly decreased (t =-3.85, -4.87, -4.57, -6.03, P <0.05). **Conclusion** Fisetin can significantly reduce the neuronal damage caused by I/R injury in rats by down-regulating the expression of p-p38, and the combination with

SB203580 can enhance this effect, which provides a new idea for the treatment of brain I/R injury.

[Key words] Fisetin; reperfusion injury; p38 mitogen-activated protein kinases; neuronal damage; rats

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2025.003.004

作者单位:325027 浙江温州,温州医科大学附属第二医院育英儿童医院麻醉与围术期医学科、小儿麻醉学教育部重点实验室、浙江省麻醉学重点实验室

脑血管疾病,尤其是缺血性脑卒中,正严重威胁全球健康。虽然及时恢复缺血脑区的血流是关键,但再灌注过程可能导致脑组织损伤,即缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤^[1]。I/R损伤可能引发更严重的脑梗死,因此缺血性脑卒中的治疗复杂且挑战重重。I/R损伤的机制尚不完全明确,但可能与氧化应激、血脑屏障破坏、补体系统激活等多种因素相关^[2]。

漆黄素是一种类黄酮化合物,具有抗炎、抗氧化和抗凋亡的作用,并已被证实在神经系统疾病中具有保护作用,包括缺血性脑损伤和神经退行性疾病^[3]。因此,推测漆黄素可以作为治疗脑I/R损伤的潜在药物,其可能通过调节细胞信号传导通路、减轻神经炎症和抑制细胞凋亡来保护神经细胞。本次研究旨在通过生物信息学分析技术,探讨漆黄素在脑I/R损伤中的作用机制,并利用大数据筛选脑I/R损伤的可能机制,并验证漆黄素在其中的潜在作用靶点,为缺血性脑血管疾病的治疗提供新的策略。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验动物 2022年4月至2022年10月在温州医科大学动物实验室进行本次实验。选择30只健康4~5个月龄雄性SD大鼠,体重220~280 g,实验动物许可证号:SCXK(苏)2021-0013。饲养环境:自由进食和饮水,维持温度在20℃~28℃,湿度在50%~70%。

1.2 方法

1.2.1 I/R模型的建立 随机选取24只大鼠,使用1%的戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg,腹腔注射)进行麻醉。沿颈部中线切口,暴露和隔离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,使用微动脉夹暂时关闭颈内动脉,并结扎颈总动脉和颈外动脉的近端,通过在颈总动脉分叉处4 mm处的小切口将线插入颈内动脉并固定,维持阻塞2 h^[4]。整个过程中持续监测大鼠的直肠温度,保持在37℃。

1.2.2 分组处理 I/R模型建模成功的24只大鼠随机分为四组(每组6只):缺血再灌注组(I/R组)、漆黄素+I/R处理组(FIS组)、SB203580+I/R处理组(SB203580组)和漆黄素与SB203580联合处理组(FIS+SB203580组)。剩余的6只大鼠纳入Sham组,Sham组仅进行了模拟手术。五组大鼠均在造模前注射相应的药物或其溶剂。造模前,FIS组静脉注射漆黄素20 mg/kg,SB203580组

静脉注射SB203580 10 mg/kg, FIS+SB203580组静脉注射漆黄素20 mg/kg和SB203580 10 mg/kg, Sham组和I/R组作为对照,给予注射0.9%氯化钠溶液。

1.3 GEO数据库的生物信息学分析 数据集GSE202659和GSE131193从NCBI GEO检索获得。对正常组和I/R组的差异基因表达进行分析,确定差异表达的基因。然后,基于这些基因进行富集分析,旨在发现两个数据集中的共同信号通路,以指导后续动物实验设计^[5]。

1.4 观察指标

1.4.1 行为观察 大鼠的神经功能分析在再灌注后24 h内评估,分别选取在再灌注后2、6、12、24 h 4个时间点进行评估^[6]。评分如下:0分表示无神经损伤;1分表示轻微缺陷,表现为无法伸展对侧前爪;2分表示中等缺陷,表现为行走时向左侧转圈;3分表示明显缺陷,表现为休息时向左侧倾斜;4分表示严重损伤,表现为无法恢复意识。

1.4.2 测量大脑组织水分含量 在再灌注后24 h,大鼠被进行安乐死处理,取出部分大脑并立即称重(湿重)。随后,大脑在100℃下干燥24~48 h以获得干重。大脑水分含量的计算公式=(湿重-干重)/湿重×100%^[7]。

1.4.3 测量脑梗死面积 在再灌注24 h后,对大鼠进行安乐死处理,并将其部分大脑进行连续切片,厚度2 mm厚的冠状切片。切片在37℃的2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑溶液中染色12 min,在多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定过夜,固定好的脑片取出晾干,脑梗死区显示白色,正常脑组织显示红色。染色完成后,用Imaging J软件对切片进行成像,并根据这些图像确定梗死体积。

1.4.4 尼氏染色及神经元计数 大脑组织被制作成石蜡切片以进行尼氏染色。自视交叉后2 mm行冠状切片,通过双盲对组织切片进行染色并在高倍光学显微镜下观察拍照。使用Image J软件计算正常神经元的数量。

1.4.5 TUNEL染色和凋亡细胞计数 采用TUNEL染色,首先,对石蜡切片进行脱蜡、水化并浸入胰蛋白酶内消化40 min。再加TUNEL反应混合物在37℃孵育1 h,清洗,DAPI避光复染细胞核20 min,抗荧光淬灭液封片,最后荧光显微镜观察,在大脑组织的3个随机区域对凋亡细胞进行计数。

1.4.6 Western blot法检测相关蛋白表达 所有大鼠脑组织蛋白样本在RIPA缓冲液中制备,并使用牛血清白蛋白作为标准进行定量。蛋白质通过SDS-PAGE分离,转移到膜上,并与一抗和二抗孵育。使用增强化学发光试剂检测蛋白质表达,使用Image J软件进行定量分析。

1.5 统计学方法 采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析。使用Shapiro-Wilk检验进行正态分布检验。正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;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。非正态分布数据以中位数和四分位数表示,比较采用Kruskal-Wallis H 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEO生物信息学分析见封二图1

由封二图1可见,差异基因表达分析识别出492和517个差异表达基因,筛选标准为 $P<0.05$ 和绝对值 $\log_2FC>0.5$ 。基因富集分析显示Sham组和I/R组同时涉及p38 MAPK信号通路。

2.2 五组大鼠在I/R损伤后2、6、12、24 h的神经功能评分比较见图1

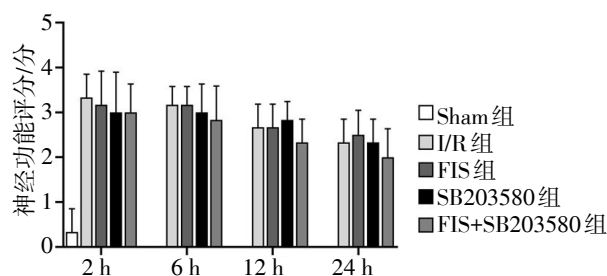


图1 五组大鼠在脑I/R损伤后2、6、12、24 h的神经功能评分比较

由图1可见,Sham组在I/R损伤后6、12、24 h的神经功能评分分别为0(0,0)、0(0,0)、0(0,0)分。在I/R损伤2、6、12、24 h时,I/R组、FIS组、SB203580组和FIS+SB203580组的神经功能评分均高于Sham组(Z 分别=3.49、3.19、2.90、2.85; 3.59、3.56、3.19、2.83; 3.33、3.33、3.75、2.48; 3.27、3.68、3.27、2.58, P 均 <0.05)。但I/R组、FIS组、SB203580组和FIS+SB203580组之间的神经功能评分比较,差异均无统计学意义(H 分别=3.34、4.97、5.49、7.27, P 均 >0.05)。

2.3 五组大鼠大脑水分含量和脑梗死面积比较见图2、3

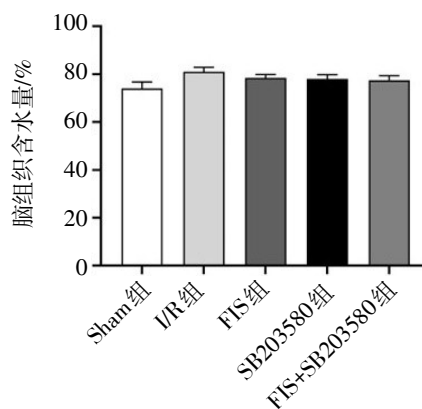


图2 五组大鼠大脑水分含量比较

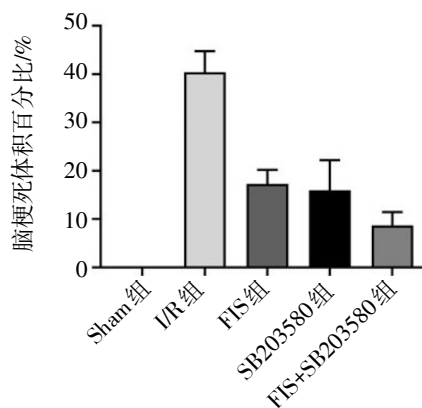


图3 五组大鼠大脑梗死面积比较

由图2可见,Sham组大鼠大脑组织含水量最低,I/R组、FIS组、SB203580组和FIS+SB203580组的大脑水分含量均高于Sham组,差异均有统计学意义(t 分别=6.02、3.81、3.45、2.90, P 均 <0.05)。

由图3可见,Sham组没有脑梗死,I/R组、FIS组、SB203580组和FIS+SB203580组的大脑梗死面积均大于Sham组,差异均有统计学意义(t 分别=18.16、7.76、7.17、3.90, P 均 <0.05)。FIS组、SB203580组和FIS+SB203580组的梗死面积均小于I/R组,FIS+SB203580组梗死面积均小于FIS组和SB203580组,差异均有统计学意义(t 分别=-10.40、-10.99、-14.25、-3.85、-3.27, P 均 <0.05)。

2.4 五组大鼠的NISSL染色和神经元计数比较见封二图2

由封二图2A可见,脑组织海马区NISSL染色显示,Sham组存在数量较多、体积较大、结构清晰的神经元,且观察到更多的深蓝色NISSL小体。I/R组的神经元出现明显萎缩,细胞间隙增加,并且神经元数量减少。FIS组、SB203580组和FIS+SB203580组细胞间隙相对致密,神经元细胞较多。

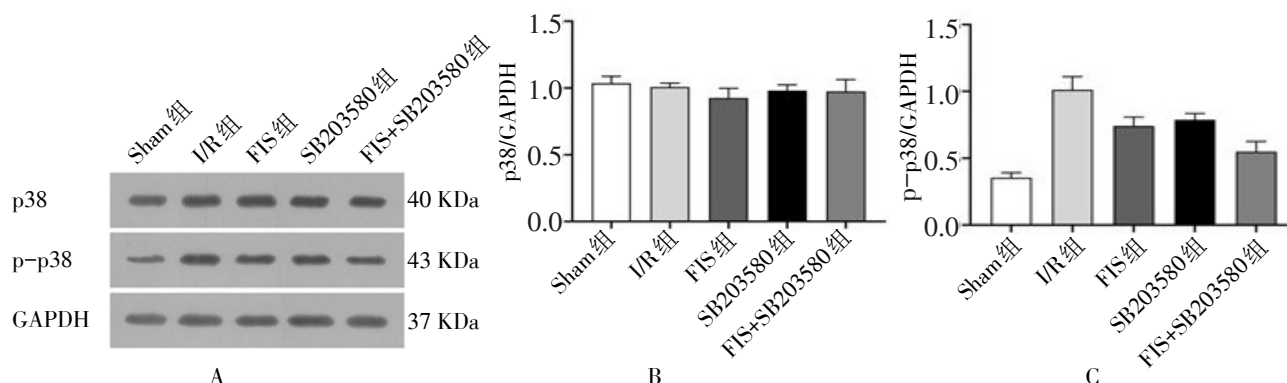
由封二图 2B 可见,与 Sham 组相比,I/R 组、FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组中的神经元表现出明显的萎缩、细胞间隙增加和神经元数量减少(t 分别=-8.79、-5.73、-5.59、-4.77, P 均 <0.05)。与 I/R 组相比, FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组神经元数量明显增加(t 分别=3.06、3.19、4.02, P 均 <0.05),而这三组间神经元计数比较,差异均无统计意义(t 分别=-0.96、-0.83、-0.13, P 均 >0.05)。

2.5 五组大鼠的 TUNEL 染色和凋亡细胞计数比较

见图封三图 3

由封三图 3 可见, TUNEL 染色的结果显示, Sham 组几乎没有凋亡细胞,明显少于 I/R 组、FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组(t 分别=-21.27、-14.53、-13.44、-11.05, P 均 <0.05)。I/R 组的凋亡细胞比例较高,明显高于 FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组(t 分别=6.74、7.83、10.21, P 均 <0.05),且 FIS+SB203580 组凋亡细胞计数小于 FIS 组,差异有统计学意义($t=-3.48$, $P<0.05$)。

2.6 五组大鼠的 p38 和 p-p38 蛋白表达比较见图 4



注:A:p38和p-p38的蛋白条带;B:p38蛋白定量图;C:p-p38蛋白定量图。

图4 五组大鼠大脑组织中p38和p-p38蛋白表达水平比较

由图4可见, Western blot 检测结果显示,五组间 p38 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($F=2.72$, $P>0.05$)。与 Sham 组相比, I/R 组、FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组的 p-p38 蛋白表达水平明显更高(t 分别=16.57、9.78、10.95、4.91, P 均 <0.05)。与 I/R 组相比, FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组的 p-p38 表达明显水平减少(t 分别=-6.79、-5.62、-11.67, P 均 <0.05)。与 FIS 组和 SB203580 组相比, FIS+SB203580 组的 p-p38 蛋白表达水平进一步下降(t 分别=-4.87、-6.04, P 均 <0.05)。

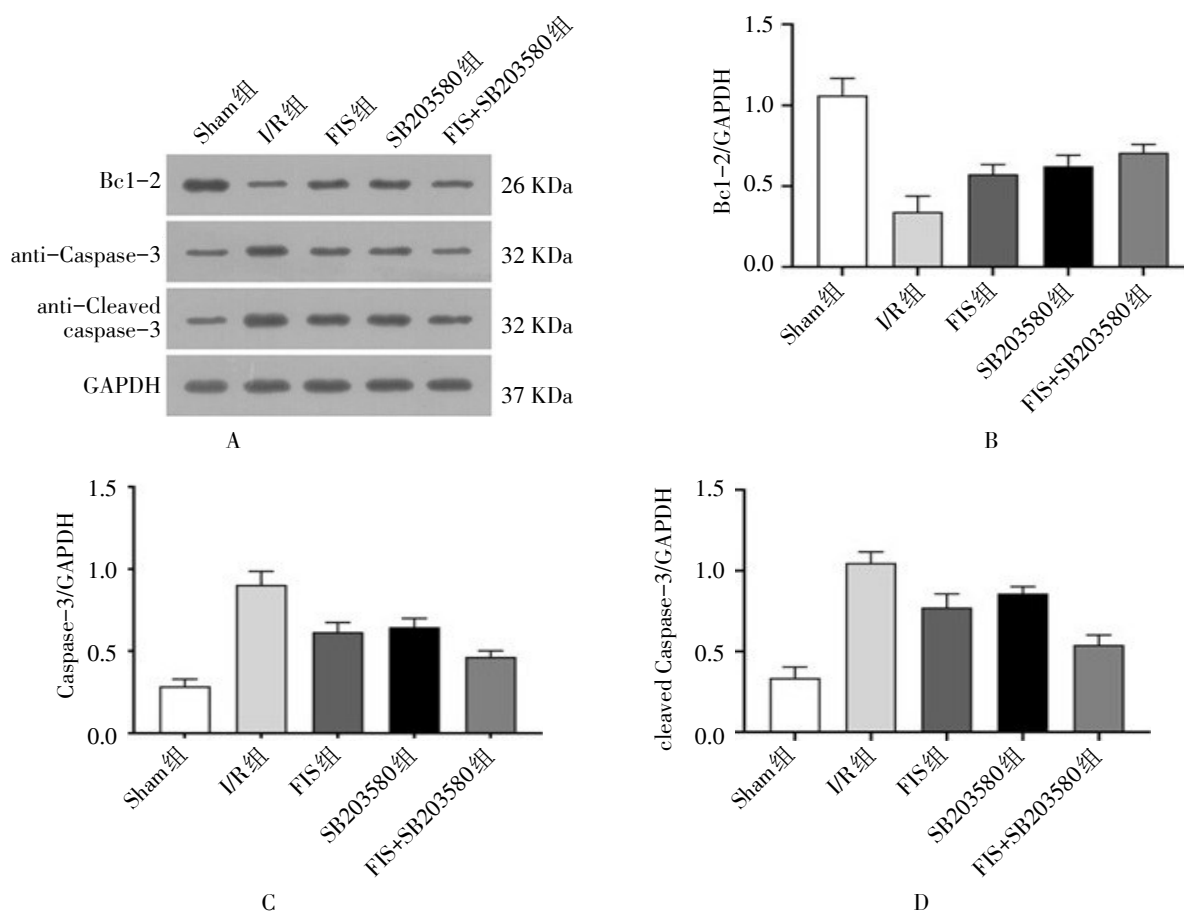
2.7 五组大鼠的凋亡相关蛋白的表达比较见图 5

由图 5 可见, Western blot 检测结果显示,与 Sham 组相比, I/R 组、FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组的 Bcl-2 蛋白表达均明显降低(t 分别=-15.74、-10.63、-9.53、-7.69, P 均 <0.05);与 I/R 组相比, FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组 Bcl-2 表达蛋白表达水平明显升高(t 分别=5.11、6.20、8.04, P 均 <0.05)。与 Sham 组相比, I/R 组、FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组的 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平升高(t 分别=18.82、10.04、10.96、5.47; 18.68、11.41、13.71、5.38,

P 均 <0.05);与 I/R 组相比, FIS 组、SB203580 组和 FIS+SB203580 组的 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平明显下降(t 分别=-8.78、-7.86、-13.35; -7.27、-4.97、-13.30, P 均 <0.05);此外, FIS+SB203580 组的 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平明显低于 FIS 组和 SB203580 组(t 分别=-4.57、-5.49; -6.03、-8.33, P 均 <0.05)。

3 讨论

脑 I/R 是一种常见的临床疾病,其特点是脑血流的中断和恢复,由于大脑对缺氧的高度敏感性,使这一临床疾病治疗上面临巨大挑战。脑缺血触发一系列复杂的反应,而来自再灌注的继发性损伤则通过释放神经毒素、放大炎症反应和扰乱脑微环境来加剧这一状况,这些都会明显影响患者的预后^[8]。本次研究对 GEO 数据库中两个脑 I/R 数据集进行了差异和富集分析,识别出 p38 MAPK 信号通路在脑 I/R 发病中的重要作用。鉴于目前已知的漆黄素的治疗效力,漆黄素可能通过降低 I/R 大鼠脑组织中 p38 的表达水平达到其神经保护功效,本次研究结果显示, FIS 组相比 I/R 组,脑水肿和梗塞面积显著减小,且神经功能评分提高,表明漆黄素在



注:A: Bcl-2、Caspase-3和cleaved Caspase-3的蛋白条带;B: Bcl-2蛋白定量图;C: Caspase-3蛋白定量图;D: cleaved Caspase-3蛋白定量图。

图5 五组大鼠大脑组织中凋亡相关蛋白表达水平比较

减轻大脑水肿和梗塞面积方面有积极作用,这与漆黄素抗炎特性的研究报道相一致^[9]。漆黄素与SB203580的联合使用进一步增强了其治疗效果,这表现为梗死面积的更大幅度减少,从而突出了在I/R损伤治疗中两种药物治疗效力相辅相成。

本次研究TUNEL染色显示,FIS组相比I/R组神经元凋亡明显减少,这表明漆黄素具有抗凋亡的能力。凋亡是缺血性脑卒中病理生理学中的一个基本过程,涉及激活半胱氨酸蛋白酶家族的蛋白质。本次研究结果显示,FIS组相比I/R组中Caspase-3和cleaved Caspase-3的表达降低,这表明漆黄素的神经保护作用可能也包括抑制凋亡途径,与之前在多种细胞模型中报道的漆黄素抗凋亡效果一致^[10]。此外,漆黄素处理组中Bcl-2表达的上调证实了其在抑制凋亡中的作用。

本次研究也阐明了p38 MAPK通路在I/R损伤中的重要作用。在应激反应中被激活的p38 MAPK

涉及细胞死亡和存活过程。相较I/R组,漆黄素处理组中的p-p38表达减少,表明漆黄素可能通过调节这一通路发挥其保护效果,为漆黄素的神经保护提供了实验数据支持,并为使用p38 MAPK抑制剂作为辅助治疗开辟了新的探索途径。在探究漆黄素和SB203580联合治疗潜力时,本次深入研究了它们的分子交互作用及对关键靶点的调控。p38 MAPK通路在细胞应激反应中起着关键作用,包括脑I/R,它被认为能够促进神经元凋亡和炎症反应^[11]。本次研究结果,FIS+SB203580组相较FIS组有更少的脑梗死面积和凋亡细胞,表明漆黄素与SB203580联合使用,在抗凋亡和抗炎症方面相得益彰,通过降低促凋亡蛋白的表达和提高抗凋亡蛋白的表达,有效地抑制凋亡。另外,有研究报道,它们在减少氧化应激方面的作用也进一步促进了神经元的生存和恢复^[12]。

本次研究的局限性在于使用的大鼠模型,啮齿

动物和人脑血管系统存在差异;其次研究主要集中在急性I/R损伤上,未探讨漆黄素治疗的长期效果。

综上所述,本次研究为漆黄素在大鼠脑I/R损伤模型中的神经保护效果提供了充分证据。然而,进一步研究仍然需要克服当前的局限性,以验证这些结果在临床中的适用性。

参考文献

- 1 Jurcau A, Simion A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: From pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1):14.
- 2 何娅,胡春婷,陈松盛,等.大鼠脑缺血再灌注后MMP-9、MMP-2表达与脑水肿的关系[J]. *温州医学院学报*, 2013, 43(3):181-183,186.
- 3 Kumar RM, Kumar H, Bhatt T, et al. Fisetin in cancer: Attributes, developmental aspects, and nanotherapeutics[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(2):196.
- 4 Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, et al. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Exp Brain Res*, 1992, 89(1):67-78.
- 5 Du J, Yuan Z, Ma Z, et al. KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(9):2441-2447.
- 6 Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, et al. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT / enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 2006, 98(6):1718-1731.
- 7 Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats[J]. *Life Sci*, 2002, 71(6):655-665.
- 8 Stegner D, Klaus V, Nieswandt B. Platelets as modulators of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2505.
- 9 Liu L, Gan S, Li B, et al. Fisetin alleviates atrial inflammation, remodeling, and vulnerability to atrial fibrillation after myocardial infarction[J]. *Int Heart J*, 2019, 60(6):1398-1406.
- 10 Khatoon S, Agarwal NB, Samim M, et al. Neuroprotective effect of Fisetin through suppression of IL-1R/TLR axis and apoptosis in pentylenetetrazole-induced kindling in mice[J]. *Front Neurol*, 2021, 12:689069.
- 11 Cheng CY, Huang HC, Kao ST, et al. Angelica sinensis extract promotes neuronal survival by enhancing p38 MAPK-mediated hippocampal neurogenesis and dendritic growth in the chronic phase of transient global cerebral ischemia in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278:114301.
- 12 Loh KP, Huang SH, DE silva R, et al. Oxidative stress: Apoptosis in neuronal injury[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3(4):327-337.

(收稿日期 2024-05-06)

(本文编辑 高金莲)

(上接第197页)

和跟踪观察。特殊情况下抗肿瘤药物循证医学证据采纳根据依次是:其他国家或地区药品说明书中已注明的用法,国际权威学会或组织发布的诊疗规范、临床诊疗指南,国家级学协会发布的经国家卫生健康委员会认可的诊疗规范、临床诊疗指南和临床路径等。

6 重视药物相关性不良反应

抗肿瘤药物的相关性不良反应发生率较高,也容易产生罕见的不良反应,因此抗肿瘤药物不良反应报告尤为重要。医疗机构应当建立药品不良反应、药品损害事件监测报告制度,并按照国家有关

规定向相关部门报告。医疗机构应当将抗肿瘤药物不良反应,尤其是新型抗肿瘤药物不良反应报告纳入医疗质量考核体系,定期分析和报告新型抗肿瘤药物不良反应的动态和趋势。临床医师、护理人员和临床药师应当密切随访患者的用药相关毒性,并及时上报不良反应,尤其是严重的和新发现的不良反应。

摘自国卫办医政函[2025]2号国家卫生健康委办公厅关于印发新型抗肿瘤药物临床应用指导原则(2024年版)的通知