

七叶皂苷钠通过调节 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路抑制神经元细胞凋亡 改善蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤

李侑垚¹, 陈立刚², 孔睿², 梁国标²

(1. 锦州医科大学北部战区总医院研究生培养基地神经外科, 辽宁沈阳 121001;

2. 北部战区总医院神经外科, 辽宁沈阳 110016)

摘要:【目的】探讨七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血的治疗作用及机制。【方法】将C57BL/6J小鼠随机分为3组,包括假手术组(32只)、模型组(48只)、七叶皂苷钠组(38只)。模型组、七叶皂苷钠组小鼠采用颈内动脉穿刺法建立蛛网膜下腔出血模型。假手术组除不刺穿颈内动脉外接受相同的手术。造模结束1h后,七叶皂苷钠组小鼠给予一次性腹腔注射七叶皂苷钠2.8 mg/kg,假手术组和模型组小鼠给予一次性腹腔注射等体积生理盐水。观察其蛛网膜下腔出血评分,神经功能及血脑屏障变化情况;原位末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)标记(TUNEL)染色/神经元核抗原(NeuN)/免疫荧光染色法观察神经元凋亡的变化;蛋白免疫印迹法检测脑组织Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)、核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶1(HO-1)蛋白表达的变化。【结果】与假手术组比较,模型组SAH评分增加,Garcia评分和平衡木测试评分降低,脑含水量、伊文思蓝渗出量增加,脑组织Keap1蛋白表达水平降低,而Nrf2、HO-1蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,七叶皂苷钠组SAH评分降低,Garcia评分和平衡木测试评分升高,脑含水量、伊文思蓝渗出量减少,脑组织Keap1蛋白表达水平升高,而Nrf2、HO-1蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$)。【结论】七叶皂苷钠可通过调节Keap1/Nrf2/HO-1信号通路抑制神经元细胞凋亡改善小鼠蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤。

关键词: 七叶皂苷钠;蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;Keap1/Nrf2/HO-1通路;神经元凋亡;小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)04-0779-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.04.023

Sodium Aescinate Improves Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage through Regulating Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway to Inhibit Neurons Apoptosis

LI You-Cheng¹, CHEN Li-Gang², KONG Rui², LIANG Guo-Biao²

(1. Dept. of Neurosurgery, Postgraduate Training Base, General Hospital of Northern Theater Command, Jinzhou Medical

University, Shenyang 121001 Liaoning, China; 2. Dept. of Neurosurgery, General Hospital of Northern

Theater Command, Shenyang 110016 Liaoning, China)

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect and mechanism of sodium aescinate for subarachnoid hemorrhage in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into sham-operation group, model group, and sodium aescinate group. A subarachnoid hemorrhage mouse model was established by puncturing internal carotid in the model group and sodium aescinate group. Additionally, the sham-operation group was given the same operation except for no puncturing. On hour one after modeling, the sodium aescinate group was given one-time intraperitoneal injection of sodium aescinate of 2.8 mg/kg, and the sham-operation group and model group were given one-time intraperitoneal injection of the same volume of normal saline. After administration, SAH score, nerve function and blood-brain barrier changes were observed. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated biotin-16-dUTP nick-end labelling (TUNEL)/neuronal nuclear antigen (NeuN)/4',6-

收稿日期: 2020-02-07

作者简介: 李侑垚(1992-),男,硕士,医师;E-mail: zhangyujian8888@126.com

通讯作者: 梁国标,男,博士,主任医师;E-mail: liangguobiao6708@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81971133)

diamidino-2-phenylindole (DAPI) immunofluorescence staining was used to observe the changes of neuronal apoptosis. Western blotting assay was used to detect the changes in expression of Kelch-like epichlorohydrin-associated protein1 (Keap1), nuclearfactor-E2-related factor2 (Nrf2) and hemeoxygenase1 (HO-1) in brain tissue. **Results** Compared with the sham-operation group, SAH score was enhanced in the model group, and modified Garcia score and beam balance score were reduced, brain water content and Evans blue extravasation were raised, the expression level of Keap1 in brain tissue was increased, and expression levels of Nrf2 and HO-1 were decreased (all $P < 0.05$). Compared with the model group, SAH score was lowered in the sodium aescinate group, and modified Garcia score and beam balance score were enhanced, brain water content and Evans blue extravasation were reduced, the expression level of Keap1 in brain tissue was decreased, and expression levels of Nrf2 and HO-1 were increased (all $P < 0.05$). **Conclusion** Sodium aescinate has effect on improving early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice through regulating Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway to inhibit neurons apoptosis.

Keywords: sodium aescinate; subarachnoid hemorrhage; early brain injury; Keap1/Nrf2/HO-1 pathway; neuron apoptosis; mice

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 具有相当高的死亡率和发病率^[1-2]。因此, 预防和减轻蛛网膜下腔出血后的脑损伤具有重要的意义。目前, 早期脑损伤 (early brain injury, EBI) 被指出可能是蛛网膜下腔出血患者的主要死亡原因^[3], 成为新的研究热点。天师栗, 是七叶树科植物天师栗 *Aesculus wilsonii* Rehd. 及七叶树 *A. chinensis* Bge. 的果实或种子, 通称娑罗子, 具有宽中、下气、杀虫的功效, 用于治疗胃寒疼痛, 脘腹胀满, 痞积虫痛, 痢疾, 疟疾。七叶皂苷钠是天师栗成熟种子的三萜皂苷的钠盐提取物。研究表明, 七叶皂苷钠具有抗炎、消肿、抗渗出, 改善微循环、增强血管张力收缩性, 抗氧化、清除自由基, 抗肿瘤, 神经保护等作用, 对软组织损伤、心脑血管疾病和渗出性疾病具有治疗价值^[4]。已有大量临床和实验研究表明, 七叶皂苷钠对脑损伤有修复作用^[5]。基于此, 本研究探讨七叶皂苷钠是否对蛛网膜下腔出血后的早期神经损伤发挥保护作用, 以期能为七叶皂苷钠临床治疗蛛网膜下腔出血提供依据。现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 18 ~ 22 g, 清洁级, 购自北部战区总医院实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (辽) 2014-0002。小鼠分笼饲养, 每笼 5 ~ 8 只, 饲养室温为 23 ~ 25 °C, 相对湿度 40% ~ 80%, 自由饮水进

食。本研究获北部战区总医院实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物、试剂与仪器 七叶皂苷钠购自山东绿叶制药有限公司 (批号: H20003239), 分子量 1 124.2。七叶皂苷钠用生理盐水使之充分溶解, 工作液浓度为 2.8 mg/kg, 现用现配^[6]。Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1)、血红素氧合酶 1 (HO-1) 等抗体 (美国 Abcam 公司); 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、 β -actin (美国 Santa Cruz 公司); 伊文思蓝 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒、放射免疫沉淀分析 (RIPA) 裂解液、原位末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 标记 (TUNEL) 染色试剂盒、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)、电化学发光 (ECL) 试剂盒 (碧云天公司); 神经元核抗原 (NeuN) 抗体 (美国 Abcam 公司); Alexa Fluor 594 荧光抗体 (美国 Sigma 公司)。ar-2130 型分析天平 (美国安泰克公司); dhg-9240a 型鼓风干燥箱 (上海精密科学仪器公司); rad3cell 型微量蛋白电泳仪 (美国北京伯乐分析生化仪器公司)。

1.3 分组、造模与给药 将小鼠随机分为 3 组, 包括假手术组 (32 只)、模型组 (48 只)、七叶皂苷钠组 (38 只)。参考文献 [3, 7] 采用颈内动脉穿刺法建立小鼠蛛网膜下腔出血模型。方法: 将小鼠用 10 g/L 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 仰卧位固定, 显露颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉, 结扎颈外动脉; 经颈外动脉向颈内动脉插入

4-0尼龙线,进一步插入颅内颈内动脉,直到感觉到阻力,然后再推入5 mm,以穿透颈内动脉壁。假手术组接受除不刺穿颈内动脉外相同的手术。造模结束1 h后,七叶皂苷钠组小鼠给予一次性腹腔注射七叶皂苷钠2.8 mg/kg,假手术组和模型组小鼠给予一次性腹腔注射等体积生理盐水。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 神经功能评分 于蛛网膜下腔出血后24 h行盲法评定神经学评分,包括改良的Garcia评分和平衡木测试^[8]。改良的Garcia评分细则见表1。平衡木测试:将90 cm长、1 cm宽的圆柱形横木放在

2个平板中间,实验前将大鼠在两侧平板上分别放置10 s,然后把大鼠放在横木中间,观察其移动。根据步行距离进行评分:40 s内没有移动,且直接从横木上跌落,计0分;40 s内没有跌落,也没有移动,计1分;40 s内移动了22 cm(放置位置到平板的一半)并且停留在该位置至少25 s,计2分;40 s内移动了超过22 cm(放置位置到平板的一半)并且停留在该位置至少25 s,计3分;40 s内到达平板或者25 s内走完一半的距离没爬上平板,计4分;25 s内到达平板,计5分。计算连续次试验的平均得分。分数越高,表示神经功能越好。

表1 改良的Garcia评分标准

Table 1 Scoring Standards for modified Garcia

项目	0分	1分	2分	3分
自发活动(在笼内观察5 min)	无活动	很少活动,仅有位置变化	有活动,但接触笼子4个边缘少于3个	有活动,接触笼子4个边缘
四肢活动左右对称性	一侧肢体无活动	一侧肢体轻度活动	一侧肢体活动缓慢	双侧对称,与蛛网膜下腔出血前期无明显差别
四肢活动左右对称性(提起尾巴)	一侧肢体无活动,肢体无外展	一侧肢体轻微活动和外展	肢体有活动,比另一侧稍弱	肢体活动双侧对称,与蛛网膜下腔出血前期无明显差别
爬网能力		不能攀爬	一侧肢体稍弱	爬网能力正常,与蛛网膜下腔出血前期无明显差别
触碰一侧身体时反应		无反应	一侧反应稍弱	双侧对称
触碰胡须时反应		无反应	一侧反应稍弱	双侧对称

1.4.2 蛛网膜下腔出血分级 深度麻醉小鼠后取脑组织,进行蛛网膜下腔出血评分^[9]。将Willis动脉环和基底动脉环分为6段,根据蛛网膜下腔血凝块的多少,各节段评分0~3分。蛛网膜下腔出血分级分为3组:轻度,0~7分;中度,8~12分;重度:13~18分。

1.4.3 脑含水量 于蛛网膜下腔出血后24 h深麻醉小鼠取脑。取出后立即称湿质量,在10℃烘箱中烘干72 h后称干质量,计算脑含水量。公式^[10]:脑含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.4.4 伊文思蓝渗出法检测血脑屏障完整性 于蛛网膜下腔出血后24 h,经尾静脉注射伊文思蓝染料(20 g/L; 5 mL/kg)。60 min后深度麻醉小鼠,经心内灌注磷酸盐缓冲液(PBS)去除血管内伊文思蓝。取出大脑,称量脑组织加入PBS匀浆,以5 000×g离心40 min。将上清液与等体积的含有三氯乙酸和乙醇(1:3)的溶液混合,4℃孵育过夜,以15 000×g离心30 min,取上清液。用荧光分光光度计测定上清液中伊文思蓝的浓度。

1.4.5 TUNEL/NeuN/DAPI三色免疫荧光染色法观察神经元细胞凋亡 将脑组织切片用蛋白酶37℃消化15 min, PBS水洗,滴加TDT+DIGUTP混合液,37℃孵育2 h, PBS水洗;滴加封闭液置室温孵育30 min,滴加抗地高辛抗体+NeuN抗体混合液4℃孵育过夜。PBS洗后滴加荧光二抗37℃孵育30 min。最后以DAPI复染细胞核,显微镜下观察。计数TUNEL和NeuN阳性细胞数。

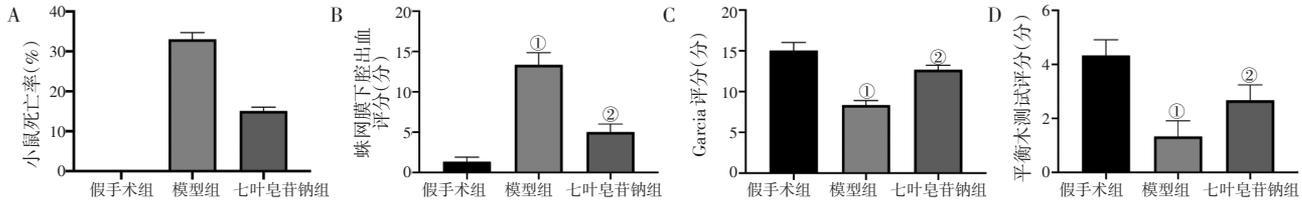
1.4.6 蛋白免疫印迹法检测脑组织Keap1、Nrf2、HO-1表达 于蛛网膜下腔出血后24 h取小鼠左侧大脑半球,加入RIPA裂解液提取蛋白,用BCA试剂盒进行蛋白定量。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,并转移到硝酸纤维素膜上,分别与Keap1、Nrf2、HO-1、β-actin等一抗共同置于4℃孵育过夜,再以二抗室温处理1 h。用ECL试剂盒将电泳条带可视化,用ImageJ软件分析电泳条带的灰度值。以β-actin为内参,以目的蛋白的灰度值与β-actin灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.5 统计方法 采用 Graph Pad Prism 5 软件和 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用单因素方差分析, 然后进行 Tukey 事后检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七叶皂苷钠对蛛网膜下腔出血小鼠死亡率、出血量及神经功能的影响 图 1-A 结果显示, 假手术组小鼠死亡率为 0% (0/32), 模型组小鼠死亡率为 33.33% (16/48), 七叶皂苷钠组为 15.79% (6/38), 表明七叶皂苷钠干预后明显降低了蛛网膜

下腔出血小鼠的死亡率。图 1-B 结果显示, 模型组小鼠蛛网膜下腔出血评分较假手术组显著增加 ($P < 0.05$), 七叶皂苷钠组小鼠蛛网膜下腔出血评分较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 表明七叶皂苷钠可减少蛛网膜下腔出血小鼠的出血量。对蛛网膜下腔出血后 24 h 小鼠神经功能进行评估, 结果如图 1-C、D 所示, 模型组 Garcia 评分和平衡木测试评分较假手术组显著降低, 而七叶皂苷钠组 Garcia 评分和平衡木测试评分较模型组升高 ($P < 0.05$), 提示七叶皂苷钠能够促进蛛网膜下腔出血小鼠神经功能的恢复。



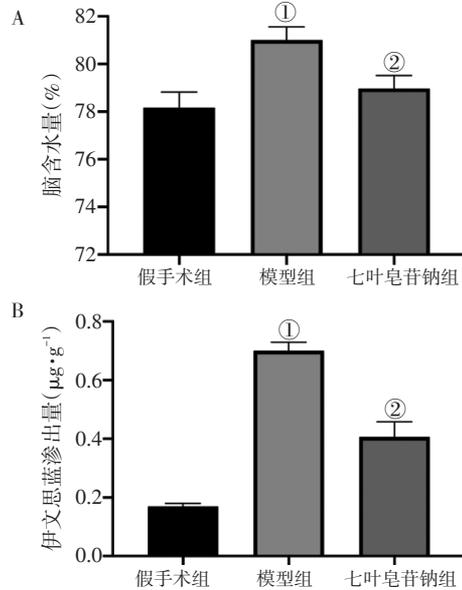
A. 小鼠死亡率; B. 蛛网膜下腔出血评分; C. Garcia 评分; D. 平衡木测试评分
① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图 1 七叶皂苷钠对蛛网膜下腔出血小鼠死亡率、出血量及神经功能的影响

Figure 1 Effects of sodium aescinate on mortality, subarachnoid hemorrhage and nerve function in mice with subarachnoid hemorrhage

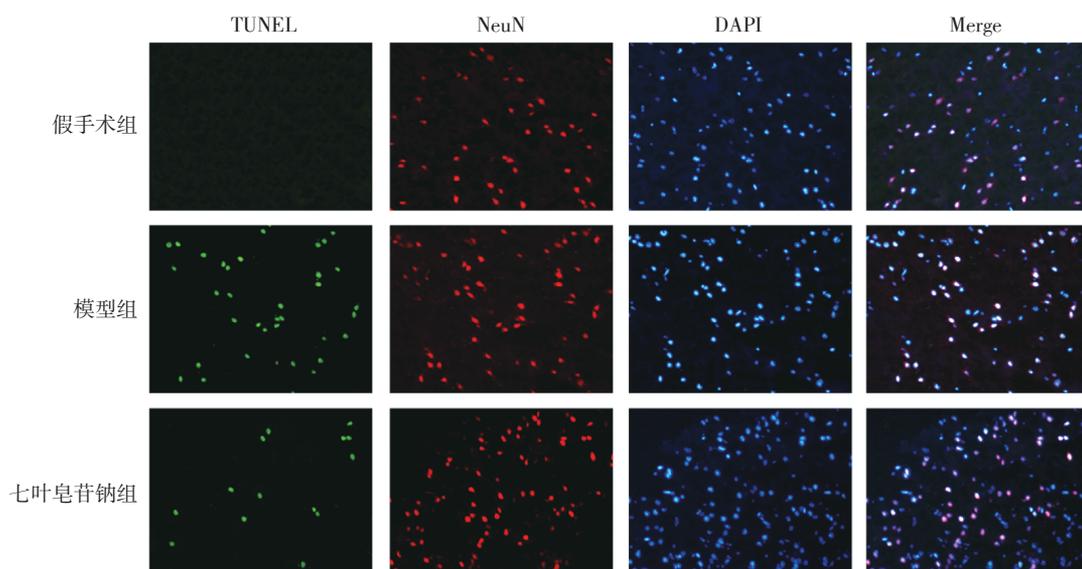
2.2 七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障的影响 图 2-A 结果显示, 模型组小鼠蛛网膜下腔出血后 24 h 脑含水量较假手术组显著增加, 七叶皂苷钠组脑含水量较模型组显著减少。表明七叶皂苷钠给药后可显著减少小鼠蛛网膜下腔出血引起的脑水肿。图 2-B 结果显示: 与假手术组比较, 模型组小鼠脑组织伊文思蓝渗出量增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 七叶皂苷钠组脑组织伊文思蓝渗出量减少 ($P < 0.05$)。表明小鼠蛛网膜下腔出血后 24 h 全脑血脑屏障完整性被破坏, 七叶皂苷钠可减轻脑水肿, 对全脑血脑屏障有保护作用。

2.3 七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡的影响 采用 TUNEL/NeuN/DAPI 三色免疫荧光染色法观察七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡的影响, “NeuN” 标志神经元细胞, “TUNEL” 染色显示凋亡细胞, “Merge” 表示神经元细胞凋亡, 如图 3 所示。图 4 结果表明, 模型组蛛网膜下腔出血小鼠神经元凋亡阳性细胞数目增加, 而七叶皂苷钠干预后神经元凋亡阳性细胞数



A. 脑含水量; B. 伊文思蓝渗出量
① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

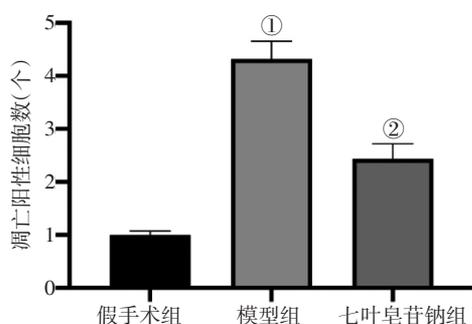
图 2 七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障的影响
Figure 2 Effects of sodium aescinate on blood-brain barrier in mice with subarachnoid hemorrhage



注: TUNEL 标记细胞核示绿色; DAPI 标记细胞核示蓝色; NeuN 标记细胞核示红色; Merge 为 TUNEL/NeuN/DAPI 叠加后

图3 各组小鼠脑组织 TUNEL/NeuN/DAPI 三色荧光染色图像比较

Figure 3 Comparison of TUNEL/NeuN/DAPI immunofluorescence staining images in various groups of mice



① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图4 七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡的影响

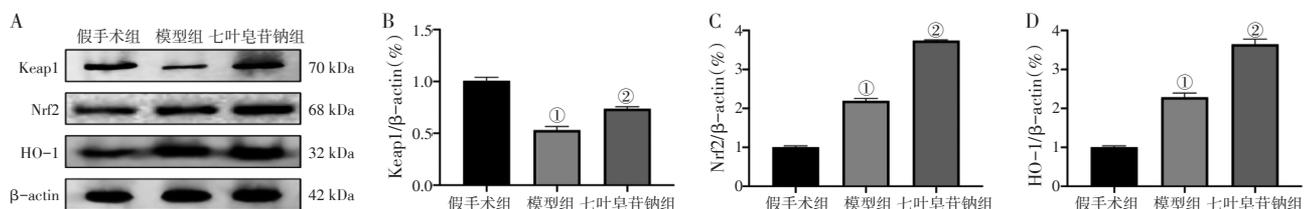
Figure 4 Effects of sodium aescinate on the apoptosis of nerve cells in mice of subarachnoid hemorrhage

目减少, 表明七叶皂苷钠能够抑制小鼠蛛网膜下腔出血后神经元细胞的凋亡, 具有保护神经的作用。

2.4 七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后脑组织 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路的影响 图5结果显示, 与假手术组比较, 模型组小鼠脑组织 Keap1 蛋白表达水平降低, 而 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 七叶皂苷钠小鼠脑组织 Keap1 蛋白表达水平升高, 而 Nrf2、HO-1 表达水平降低(均 $P < 0.05$)。表明七叶皂苷钠可能通过调节小鼠脑组织 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路蛋白减轻蛛网膜下腔出血。

3 讨论

早期脑损伤通常发生在蛛网膜下腔出血后 72 h 内, 在决定蛛网膜下腔出血患者预后中发挥关键作用^[11-12]。与血管痉挛损伤机制不同, 早期脑损伤可在蛛网膜下腔出血后立即对脑组织造成损伤^[13]。早期脑损伤的可能机制包括颅内压 (intracranial



A. Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白免疫印迹电泳条带; B. Keap1 相对表达量; C. Nrf2 相对表达量; D. HO-1 相对表达量

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图5 七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后脑组织 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路的影响

Figure 5 Effects of sodium aescinate on Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway in mice with subarachnoid hemorrhage

pressure, ICP)升高, 脑血流量(cerebral blood flow, CBF)降低, 脑灌注压(cerebral perfusion pressure, CPP)降低, 脑氧合下降, 血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏, 脑水肿和神经细胞死亡等^[14]。本研究结果表明, 七叶皂苷钠给药能够显著改善蛛网膜下腔出血小鼠血脑屏障损伤及神经功能缺损, 减轻蛛网膜下腔出血后早期脑损伤。

NeuN蛋白能够特异性结合神经核^[15], 且广泛存在于脊椎动物神经系统各个部位的成熟神经细胞核内, 更重要的是它在这些物种体内高度保守且在神经细胞生长的特殊阶段稳定表达^[16], 故常直接被用作神经细胞的特异性标记物, 同时也是直接评价神经细胞丢失、死亡以及量化治疗效应的可信标记物^[17]。NeuN蛋白表达的高低可明确反映神经细胞数量的变化。本研究结果表明七叶皂苷钠能够减轻小鼠蛛网膜下腔出血早期脑损伤神经元细胞的凋亡, 提示七叶皂苷钠对小鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤可能具有修复作用。

Keap1-Nrf2/ARE通路是近年新发现的机体抵抗外界氧化和化学等刺激的防御性转导通路^[18]。越来越多的证据表明, Nrf2调控的基因产物在中枢神经系统疾病中具有保护作用。在非应激条件下, Nrf2失活, 并被Keap1(Nrf2的抑制蛋白)隔离在细胞质中^[19]; 然而, 当暴露于各种刺激时, 复合物被分离, 游离的Nrf2随后移位到细胞核并与抗氧化相关元件(ARE)结合, 导致各种抗氧化和解毒基因的表达, 如HO-1^[17-18]。HO-1被认为是细胞氧化应激过程中一个非常敏感的指标^[20]。HO-1与其催化血红素降解生成的产物胆红素和CO一道, 组成了机体重要的内源性保护系统, 广泛参与抗炎与多种急慢性氧化应激损伤。多种生长因子、氧化刺激因素、抗氧化药物等能上调HO-1的表达^[21]。而HO-1催化血红素的降解产物CO、胆红素和铁蛋白可发挥细胞保护作用^[22]。本研究结果表明, 七叶皂苷钠可明显上调蛛网膜下腔出血小鼠脑组织Keap1蛋白表达, 下调Nrf2、HO-1的表达, 提示七叶皂苷钠可能通过调节小鼠脑组织Keap1/Nrf2/HO-1信号通路减轻蛛网膜下腔出血。

综上所述, 七叶皂苷钠可以有效改善蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤, 其机制可能与调节Keap1/Nrf2/HO-1信号通路从而抑制神经元细胞凋亡有关。提示七叶皂苷钠可能是一种治疗蛛网膜

下腔出血早期脑损伤的潜在药物。

参考文献:

- [1] CHENG C, JIANG L, YANG Y, et al. Effect of APOE gene polymorphism on early cerebral perfusion after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(6): 446-450.
- [2] TURAN N, HEIDER R A, ZAHARIEVA D, et al. Sex differences in the formation of intracranial aneurysms and incidence and outcome of subarachnoid hemorrhage: review of experimental and human studies[J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7: 12-19.
- [3] YATSUSHIGE H, OSTROWSKI R P, TSUBOKAWA T, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85: 1436-1448.
- [4] 郑学燕, 李新南. 七叶皂苷钠的研究进展[J]. *国际医药卫生导报*, 2017, 23(20): 3303-3304.
- [5] 熊艳, 李海池, 彭银, 等. 婆罗子中七叶皂苷类成分的最新研究进展[J]. *中药材*, 2016, 39(5): 1195-1199.
- [6] WANG Y K, HAN J, XIONG W J, et al. Evaluation of *in vivo* antioxidant and immunity enhancing activities of sodium aescinate injection liquid[J]. *Molecules*, 2012, 17(9), 10267-10275.
- [7] 王健豪. 牛磺熊脱氧胆酸对蛛网膜下腔出血早期脑损伤的保护作用及其相关机制[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [8] SUZUKI H, HASEGAWA Y, WANQIU CHEN M S, et al. Recombinant osteopontin in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(5): 650-660.
- [9] GARCIA J H, WAGNER S, LIU K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634.
- [10] ENDO H, NITO C, KAMADA H, et al. Akt/GSK3beta survival signaling is involved in acute brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2006, 37(8): 2140-2146.
- [11] CHEN S, FENG H, SHERCHAN P, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115: 64-91.
- [12] FUJII M, YAN J, ROLLAND W B, et al. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research[J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(4): 432-446.
- [13] KUSAKA G, ISHIKAWA M, NANDA A, et al. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(8): 916-925.
- [14] CAHILL J, ZHANG J H. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction?[J]. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl): S86-87.
- [15] DUAN W, ZHANG Y P, HOU Z, et al. Novel insights into NeuN: From neuronal marker to splicing regulator[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 1637-1647.
- [16] SHEN C C, YANG Y C, CHIAO M T, et al. Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic

- stroke[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2010, 7(1): 6-14.
- [17] SUGAWARA T, LEWÉN A, NOSHITA N, et al. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(1): 85-98.
- [18] CHOI B H, KANG K S, KWAK M K. Effect of redox modulating Nrf2 activators on chronic kidney disease[J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12727-12759.
- [19] TKACHEV V O, MENSCHIKOVA E B, ZENKOV N K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76(4): 407-422.
- [20] JEONG YH, PARK JS, KIM DH, et al. Arctigenin increases hemoxygenase-1 gene expression by modulating PI3K/AKT signaling pathway in rat primary astrocytes[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 22(6): 497-502.
- [21] LI Y H, YU S L, GAN X G, et al. Externalization of phosphatidylserine via multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein in oxalate-treated renal epithelial cells: implications for calcium oxalate urolithiasis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48(2): 175-181.
- [22] YANG C, ZHANG X, FAN H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia[J]. *Brain Res*, 2009, 1282(12): 133-141.

【责任编辑：侯丽颖】

重楼皂苷Ⅶ对裸鼠胰腺癌的治疗作用及机制研究

夏天¹, 韩海霞¹, 冯伟², 方丽君², 付霞²

(1. 应城市人民医院急诊科, 湖北应城 432400; 2. 武汉市第六医院江汉大学附属医院急诊科, 湖北武汉 430015)

摘要:【目的】观察重楼皂苷Ⅶ对裸鼠胰腺癌的治疗作用及其机制。【方法】以人胰腺癌细胞AsPC-1皮下注射裸鼠构建胰腺癌移植瘤模型。将胰腺癌移植瘤裸鼠随机分为5组, 即对照组, 重楼皂苷Ⅶ低、中、高剂量组和5-氟尿嘧啶组, 对应给药治疗。给药结束后, 测量移植瘤体积、质量; 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的d UTP缺口末端标记(TUNEL)法测定移植瘤组织细胞凋亡情况; 蛋白免疫印迹法检测移植瘤组织Caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白表达水平。【结果】与对照组比较, 重楼皂苷Ⅶ低、中、高剂量组和5-氟尿嘧啶组移植瘤体积、质量显著降低, TUNEL阳性表达细胞比例显著升高, 移植瘤组织Caspase-3、Bax蛋白水平显著升高, Bcl-2蛋白水平显著降低(均 $P < 0.01$)。【结论】重楼皂苷Ⅶ可有效抑制胰腺癌裸鼠移植瘤的生长, 其机制可能与抑制肿瘤细胞凋亡有关。

关键词: 重楼皂苷Ⅶ; 胰腺癌; 细胞凋亡; Caspase-3; Bax; Bcl-2; 裸鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)04-0785-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.04.024

收稿日期: 2019-11-13

作者简介: 夏天(1976-), 男, 主治医师; E-mail: xt78988@163.com

基金项目: 湖北省科技厅科研计划项目(编号: 2015BCE079)