

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.12.006

# 苏合香丸调节 cAMP-PKA 信号通路对急性期脑梗死大鼠神经炎症和神经元凋亡的影响 \*

张金峰<sup>1</sup> 鲍莎莎<sup>1</sup> 张晨星<sup>1</sup> 鲍 备<sup>2</sup> 耿文婧<sup>3△</sup>

(1 石家庄市人民医院脑病科 河北 石家庄 050000; 2 石家庄市人民医院急诊科 河北 石家庄 050000;

3 石家庄市人民医院中医科 河北 石家庄 050000)

**摘要 目的:**探讨苏合香丸调节环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)信号通路对急性期脑梗死大鼠神经炎症和神经元凋亡的影响。**方法:**将 SD 大鼠分为模型组、假手术组、苏合香丸低剂量组(2.5 mL/kg)、苏合香丸中剂量组(5 mL/kg)、苏合香丸高剂量组(10 mL/kg)、尼莫地平组(2 mg/kg)、SQ22536(cAMP 抑制剂)组(2.13 mg/kg)、苏合香丸高剂量 +SQ22536 组(10 mL/kg+2.13 mg/kg),每组 24 只。除假手术组大鼠仅分离动脉,其它组大鼠均需构建急性期脑梗死模型。建模成功后,进行给药处理,给药一天一次,持续 2 周。Zea-Longa 评分法检测神经功能;干湿重法检测大鼠脑组织含水量;2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC)染色测定脑梗死体积;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠脑组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1β、cAMP 水平;苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠神经元病理变化;TUNEL 染色检测神经元凋亡;蛋白质印迹(western blot)检测大鼠脑组织中裂解的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、p-PKA 蛋白表达。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠神经功能评分、神经元凋亡率、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平、脑梗死体积、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达、脑组织含水量升高,cAMP、p-PKA 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),脑组织海马 CA1 区病理损伤严重。与模型组比较,苏合香丸低剂量组、苏合香丸中剂量组、苏合香丸高剂量组、尼莫地平组大鼠神经功能评分、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平、脑组织含水量、神经元凋亡率、脑梗死体积、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低,cAMP、p-PKA 蛋白表达升高( $P<0.05$ ),脑组织海马 CA1 区病理损伤减轻,SQ22536 组对应指标变化趋势与上述相反( $P<0.05$ );SQ22536 减弱了高剂量苏合香丸对急性期脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡的抑制作用。**结论:**苏合香丸可能通过激活 cAMP/PKA 通路抑制急性期脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡。

**关键词:**苏合香丸;cAMP-PKA 信号通路;急性期脑梗死;神经炎症;神经元凋亡**中图分类号:**R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)12-2237-07

# Effect of Suhexiang Pill on Regulation the cAMP-PKA Signal Pathway on Neuroinflammation and Neuron Apoptosis in Rats with Acute Cerebral Infarction\*

ZHANG Jin-feng<sup>1</sup>, BAO Sha-sha<sup>1</sup>, ZHANG Chen-xing<sup>1</sup>, BAO Be<sup>2</sup>, GENG Wen-jing<sup>3△</sup>

(1 Department of Neurology, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, 050000, China;

2 Department of Emergency, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, 050000, China;

3 Department of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, 050000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of Suhexiang Pill on regulating the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling pathway on neuroinflammation and neuronal apoptosis in rats with acute cerebral infarction. **Methods:** SD rats were divided into model group, sham surgery group, low-dose Suhexiang pill group (2.5 mL/kg), medium dose Suhexiang pill group (5 mL/kg), high-dose Suhexiang pill group (10 mL/kg), nimodipine group (2 mg/kg), SQ22536 (cAMP inhibitor) group (2.13 mg/kg), and high-dose Suhexiang pill+SQ22536 group (10 mL/kg+2.13 mg/kg), with 24 rats in each group. Except for the sham operated group where only the arteries were isolated, all other groups of rats were required to construct acute cerebral infarction models. After successful modeling, medication treatment was performed once a day for 2 weeks. Zea Longa scoring method was used to detect neural function; Dry wet weight method was used to detect the water content of rat brain tissue; Measure the volume of cerebral infarction with 2,3,5-triphenyltetrazole chloride (TTC) staining; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor-α (TNF-α), Interleukin(IL)-6, IL-1β, CAMP level in rat brain tissue; Hematoxylin eosin (HE) staining was used to detect pathological changes in rat neurons; TUNEL staining was used to detect neuronal apoptosis; Western blot was used to detect the expression of cleaved aspartate spe-

\* 基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2023380)

作者简介:张金峰(1981-),男,硕士,副主任医师,研究方向:脑梗死,E-mail: zhangjinfeng\_01@sina.com

△ 通讯作者:耿文婧(1983-),女,本科,副主任医师,研究方向:中医治疗脑梗死,E-mail: 13739730080@163.com

(收稿日期:2023-12-06 接受日期:2023-12-30)

cific cysteine protease-3 (Cleaved Caspase-3), Bcl-2 related X protein (Bax), and p-PKA protein in rat brain tissue. **Results:** Compared with the sham surgery group, neurological function score, neuronal apoptosis rate, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 levels, cerebral infarction volume, Bax, Cleaved Caspase-3 protein expression, and brain tissue water content increased in model group, the expression of cAMP and p-PKA proteins was reduced ( $P<0.05$ ), and the pathological damage to the CA1 region of the hippocampus in brain tissue was severe. Compared with the model group, the low-dose Suhexiang pill group, medium dose Suhexiang pill group, high-dose Suhexiang pill group, nimodipine group of rat neurological function score, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 level, brain tissue water content, neuronal apoptosis rate, cerebral infarction volume, Bax, Cleaved Caspase-3 protein expression decreased, CAMP and p-PKA protein expression increased ( $P<0.05$ ), alleviation of pathological damage in hippocampal CA1 region of brain tissue, the trend of changes in corresponding indicators in the SQ22536 group was opposite to the above ( $P<0.05$ ); SQ22536 weakened the inhibitory effect of high-dose Suhexiang Pill on neuroinflammation and neuronal apoptosis in rats with acute cerebral infarction. **Conclusion:** Suhexiang Pill may inhibit neuroinflammation and neuronal apoptosis in rats with acute cerebral infarction by activating the cAMP/PKA pathway.

**Key words:** Suhexiang Pill; cAMP-PKA signal pathway; Acute cerebral infarction; Neuroinflammation; Neuronal apoptosis

**Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 Document code: A**

**Article ID:** 1673-6273(2024)12-2237-07

## 前言

脑梗死，又称缺血性卒中，是全世界致残和死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。研究证实，神经元凋亡、神经炎症参与着脑梗死的发生、发展<sup>[2,3]</sup>。因此，有效控制炎症反应和神经元凋亡对于改善脑梗死十分重要。苏合香丸是由麝香、朱砂、苏合香、安息香、水牛角、冰片、沉香、檀香、丁香等 15 味中药组成的中成药，已有研究报道，苏合香丸可用于治疗缺血性卒中<sup>[4,5]</sup>，但具体机制尚不完全明确。相关研究显示，激活环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)信号通路可改善局灶性脑梗死小鼠神经功能<sup>[6]</sup>，但苏合香丸改善急性期脑梗死大鼠是否与调控 cAMP/PKA 信号通路有关尚不明确。因此，本研究主要探究苏合香丸调节 cAMP-PKA 信号通路对急性期脑梗死大鼠神经炎症和神经元凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，192 只，体重 250-260 g，由河北医科大学提供，使用许可证号 SYXK(冀)2020-002。

### 1.2 主要试剂及仪器

苏合香丸(3 g/丸，批号 20221003)购自北京同仁堂股份有限公司，经生理盐水稀释成 0.63 g/mL 后用于后续实验；尼莫地平购自上海信裕生物科技有限公司；TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自北京普非生物科技有限公司；cAMP 抑制剂 SQ22536 购自上海西格生物科技有限公司；酶联免疫吸附测定(ELISA)大鼠 cAMP、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6、IL-1 $\beta$ ，上述试剂盒均购自上海威奥生物科技有限公司；裂解的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)、辣根过氧化物酶(HRP)、兔源一抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、GAPDH、p-PKA、PKA 标记的羊抗兔二抗均购自英国 Abcam 公司。ST-360 型酶标仪购自科华仪器设备有限公司，PTT-FA/JA 技术型分析天平购自深圳市康初源有限公司；CX53 型光学显微镜购自日本奥林巴斯公司；DMi8-M 荧光显微镜购自德国徕卡公司；DYCP-31DN 型蛋白电泳仪购自北京六一仪器厂。

### 1.3 急性期脑梗死模型大鼠的构建<sup>[7]</sup>

2%戊巴比妥钠麻醉大鼠，暴露颈部，分离并结扎右侧颈总动脉、颈外动脉，夹闭颈内动脉，在颈总动脉切一个切口并插入线栓，同时在颈外动脉游离端连同线栓一起结扎但不扎紧，再将线栓插入颈内动脉 18 mm 处，2 h 后拔出线栓，造模成功标志为大鼠左侧肢体疼痛感消失、行走时身体向左侧倾倒、左上肢伸展困难。

### 1.4 实验分组

按照随机数字表法将 SD 大鼠随机分为假手术组、尼莫地平组、模型组、苏合香丸低、中、高剂量三组、苏合香丸高剂量+SQ22536 组、SQ22536 组，每组 24 只。除假手术组大鼠仅分离动脉，其它组大鼠均需按照 1.3 所述方法构建急性期脑梗死模型。建模成功后，根据前期预实验结果及参考文献进行给药处理，苏合香丸低剂量组、苏合香丸中剂量组、苏合香丸高剂量组大鼠分别需灌胃 2.5 mL/kg 苏合香丸、5 mL/kg 苏合香丸、10 mL/kg 苏合香丸，且均需腹腔注射等体积的生理盐水；尼莫地平组<sup>[8]</sup>大鼠需腹腔注射 2 mg/kg 尼莫地平且还需灌胃等体积的生理盐水；SQ22536 组<sup>[9]</sup>大鼠需腹腔注射 2.13 mg/kg SQ22536 且还需灌胃等体积的生理盐水；苏合香丸高剂量+SQ22536 组大鼠需灌胃 10 mL/kg 苏合香丸且腹腔注射 2.13 mg/kg SQ22536，给药一天一次，持续 2 周。

### 1.5 Zea-Longa<sup>[10]</sup>评分法评估大鼠神经功能

4 分：有行走障碍。3 分：行走时有向左侧倾倒的趋势。2 分：行走时有向左侧转圈的趋势。1 分：提尾时左侧前肢不能自主伸展。0 分：无神经功能缺损症状。末次给药后进行神经功能评估。

### 1.6 标本采集

神经功能检测完成后，每组选取 6 只大鼠测定脑组织含水量，每组选取 6 只大鼠测定脑梗死体积，收集每组剩余大鼠(12 只)的脑梗死组织分为两部分，一部分储存在 -80℃ 中用于蛋白质印迹(western blot)、ELISA 实验；另一部分固定于 4% 多聚甲醛中用于 TUNEL 染色、苏木素-伊红(HE)。

### 1.7 检测方法

1.7.1 2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC)染色测定大鼠脑梗死体积 将大鼠脑组织切割成冠状脑切片(2 mm 厚)，用 2% TTC

染色后将其固定在 4% 多聚甲醛中。24 h 后观察脑切片梗死情况, 使用 Image-Pro Plus 软件评估脑梗死体积。脑梗死体积(%)=(梗死体积 / 大脑总体积)× 100%。

**1.7.2 干湿重法检测大鼠脑组织含水量** 每组选取 6 只大鼠, 麻醉大鼠并断头取脑, 记录脑湿重 W1 和脑干重 W2(脑组织在 65°C 下烘箱中干燥 48 h 后的重量)。脑组织含水量 (%)=(W1-W2)/W1× 100%。

**1.7.3 ELISA 检测大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、cAMP** 大鼠脑组织匀浆中 cAMP、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平按照试剂盒说明书操作步骤测定。

**1.7.4 TUNEL 染色检测大鼠脑组织神经元凋亡** 取 1.7.1 中的石蜡切片, 经脱水后, 向每个切片加入 50  $\mu$ L TUNEL 反应混合物, 孵育 60 min 后再加入 DAPI 染色 10 min, 利用荧光显微镜观察神经元凋亡情况。

**1.7.5 HE 染色检测大鼠脑组织海马 CA1 区病理变化** 将大鼠脑组织切成 5  $\mu$ m 厚的石蜡切片, 在光学显微镜下拍照。

**1.7.6 蛋白质印迹 (western blot) 检测大鼠脑组织中 p-PKA、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达** 从大鼠脑组织中提取蛋白质 (使用 RIPA 裂解缓冲液)。取 30  $\mu$ g 蛋白质样品通过 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭后, 加入一抗 Bax、Cleaved Caspase-3、p-PKA、PKA、GAPDH, 均为 1:2000 的比例稀释, 4°C 孵育过夜, 加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:3000)孵育 1 h, 经显影、定影后, 使用 Image J 软件对目标条带进行扫描和定量分析。

## 1.8 统计学分析

使用 SPSS 软件(25.0 版)进行统计学分析, 数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用单因素方差分析用于多组数据间的整体比较, 进一步两两比较采用 SNK-q 检验,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 神经功能评分

模型组大鼠神经功能评分比尼莫地平组、苏合香丸低中高剂量三组更高, 且苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, SQ22536 组大鼠神经功能评分升高( $P < 0.05$ ); 与苏合香丸高剂量组比较, 苏合香丸高剂量 +SQ22536 组大鼠神经功能评分升高( $P < 0.05$ ), 模型组大鼠神经功能评分高于假手术组( $P < 0.05$ ); 见表 1。

### 2.2 脑组织含水量、脑梗死体积

模型组大鼠脑组织含水量高于假手术组, 脑梗死体积大于假手术组( $P < 0.05$ ); 苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组大鼠脑组织含水量低于模型组, 脑梗死体积小于模型组, 且苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, SQ22536 组大鼠脑组织含水量升高, 脑梗死体积增加( $P < 0.05$ ); 与苏合香丸高剂量组比较, 苏合香丸高剂量 +SQ22536 组大鼠脑梗死体积增加, 脑组织含水量升高( $P < 0.05$ ), 见图 1 和表 2。

### 2.3 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平的影响

与模型组比较, 尼莫地平组、苏合香丸低中高剂量三组大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平降低, 且尼莫地平组、苏合香丸低中高剂量三组两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );

表 1 神经功能评分( $\bar{x} \pm s$ , n=24)

Groups	Neurological function score (score)	
Sham surgery group	0.00± 0.00	
Model group	2.92± 0.34*	
Low-dose Suhexiang pill group	2.31± 0.25 <sup>#</sup>	
Medium dose Suhexiang pill group	1.79± 0.21 <sup>#&amp;</sup>	
High-dose Suhexiang pill group	1.05± 0.12 <sup>#&amp;@</sup>	
Nimodipine group	1.03± 0.11 <sup>#&amp;@</sup>	
SQ22536 group	3.41± 0.15 <sup>#</sup>	
High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group	2.09± 0.12 <sup>△</sup>	
F	824.1	
P	<0.000	

Note: Compare with high-dose Suhexiang pill group, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ ; Compare with model group, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ; Compare with Sham surgery group, <sup>\*P < 0.05; Compare with medium dose Suhexiang pill group, <sup>@P < 0.05; Compare with low-dose Suhexiang pill group, <sup>#P < 0.05.</sup></sup></sup>

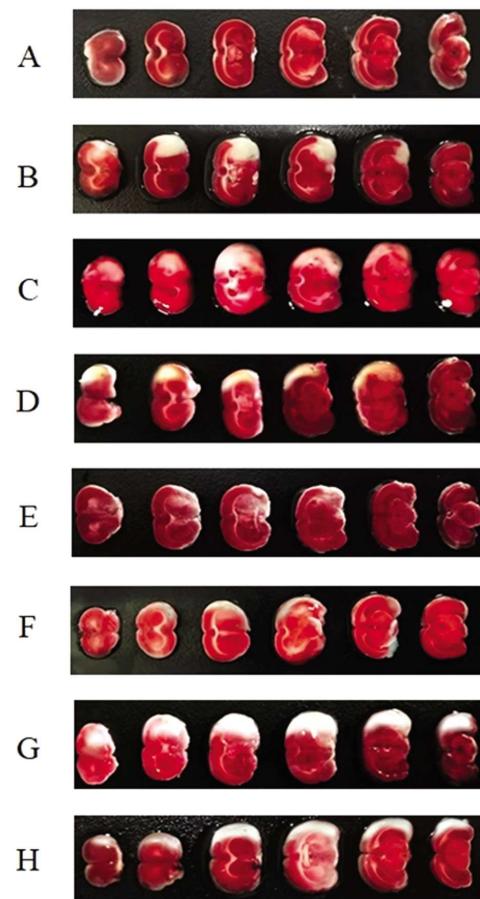


图 1 TCC 染色检测各组大鼠脑梗死

Fig.1 TCC staining detection of cerebral infarction in each group of rats

Note: A: Sham surgery group; B: Model group; C: Low-dose Suhexiang pill group; D: Medium dose Suhexiang pill group; E: High-dose Suhexiang pill group; F: Nimodipine group; G: SQ22536 group; H: High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group.

对比模型组,IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平在 SQ22536 组大鼠脑组织中升高( $P<0.05$ );与苏合香丸高剂量组比较,苏合香丸高剂量 +SQ22536 组大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平升高

( $P<0.05$ )。模型组大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平高于假手术组( $P<0.05$ )。见表 3。

表 2 脑梗死体积、脑组织含水量比较( $\bar{x}\pm s$ ,n=6)Table 2 Comparison of cerebral infarction volume, brain tissue water content ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

Groups	Brain tissue water content(%)	Cerebral infarction volume(%)
Sham surgery group	72.23 $\pm$ 3.21	0.00 $\pm$ 0.00
Model group	87.54 $\pm$ 3.14*	35.52 $\pm$ 1.25*
Low-dose Suhexiang pill group	83.34 $\pm$ 2.34 <sup>#</sup>	30.38 $\pm$ 1.18 <sup>#</sup>
Medium dose Suhexiang pill group	79.72 $\pm$ 2.04 <sup>#&amp;</sup>	24.46 $\pm$ 1.05 <sup>#&amp;</sup>
High-dose Suhexiang pill group	74.43 $\pm$ 2.01 <sup>#&amp;@</sup>	16.88 $\pm$ 0.82 <sup>#&amp;@</sup>
Nimodipine group	74.55 $\pm$ 1.98 <sup>#&amp;@</sup>	16.72 $\pm$ 0.79 <sup>#&amp;@</sup>
SQ22536 group	92.25 $\pm$ 3.32 <sup>#</sup>	41.46 $\pm$ 2.31 <sup>#</sup>
High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group	80.88 $\pm$ 2.78 <sup>a</sup>	28.83 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>
F	40.89	648.5
P	<0.000	<0.000

Note: Compare with high-dose Suhexiang pill group, <sup>a</sup>  $P<0.05$ ; Compare with model group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ ; Compare with Sham surgery group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ; Compare with medium dose Suhexiang pill group, <sup>@</sup> $P<0.05$ ; Compare with low-dose Suhexiang pill group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .

表 3 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,n=6)Table 3 Comparison of TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , and IL-6 levels ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

Groups	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Sham surgery group	36.67 $\pm$ 1.72	72.23 $\pm$ 2.51	53.36 $\pm$ 2.13
Model group	87.72 $\pm$ 3.79*	156.68 $\pm$ 6.33*	182.29 $\pm$ 6.58*
Low-dose Suhexiang pill group	75.58 $\pm$ 3.66 <sup>#</sup>	121.24 $\pm$ 5.27 <sup>#</sup>	163.35 $\pm$ 5.77 <sup>#</sup>
Medium dose Suhexiang pill group	63.35 $\pm$ 2.72 <sup>#&amp;</sup>	101.66 $\pm$ 3.83 <sup>#&amp;</sup>	133.43 $\pm$ 4.19 <sup>#&amp;</sup>
High-dose Suhexiang pill group	47.72 $\pm$ 2.19 <sup>#&amp;@</sup>	85.56 $\pm$ 2.65 <sup>#&amp;@</sup>	79.92 $\pm$ 2.89 <sup>#&amp;@</sup>
Nimodipine group	46.93 $\pm$ 2.08 <sup>#&amp;@</sup>	86.71 $\pm$ 2.72 <sup>#&amp;@</sup>	80.81 $\pm$ 2.97 <sup>#&amp;@</sup>
SQ22536 group	98.86 $\pm$ 3.72 <sup>#</sup>	204.45 $\pm$ 7.87 <sup>#</sup>	211.77 $\pm$ 9.32 <sup>#</sup>
High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group	68.82 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>	113.35 $\pm$ 4.29 <sup>a</sup>	158.87 $\pm$ 6.31 <sup>a</sup>
F	343.6	500.3	625.1
P	<0.000	<0.000	<0.000

Note: Compare with high-dose Suhexiang pill group, <sup>a</sup>  $P<0.05$ ; Compare with model group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ ; Compare with Sham surgery group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ; Compare with medium dose Suhexiang pill group, <sup>@</sup> $P<0.05$ ; Compare with low-dose Suhexiang pill group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .

## 2.4 海马 CA1 区病理损伤

假手术组大鼠海马 CA1 区神经元排列规则,结构清晰,染色良好,表明无组织病理学变化。与假手术组相比,模型组大鼠海马 CA1 区核皱缩、深染且神经元排列紊乱。与模型组相比,尼莫地平组、苏合香丸低中高剂量三组大鼠脑组织海马 CA1 区神经元损伤减轻,SQ22536 组大鼠脑组织海马 CA1 区神经元损伤严重;与苏合香丸高剂量组比较,苏合香丸高剂量 +SQ22536 组大鼠脑组织海马 CA1 区神经元损伤加剧,见图 2。

## 2.5 神经元凋亡

模型组大鼠脑组织神经元凋亡率高于假手术组( $P<0.05$ );

苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组大鼠脑组织神经元凋亡率低于模型组,且苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与苏合香丸高剂量组比较,苏合香丸高剂量 +SQ22536 组大鼠脑组织神经元凋亡率升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,SQ22536 组大鼠脑组织神经元凋亡率升高( $P<0.05$ )。见图 3 和表 4。

## 2.6 Bax、Cleaved Caspase-3 及 cAMP-PKA 通路相关蛋白表达

模型组大鼠脑组织中 Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达比假手术组更高,cAMP、p-PKA 蛋白表达更低( $P<0.05$ );苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组大鼠脑组织中 Bax、Cleaved

Caspase-3 蛋白表达比模型组更低,cAMP、p-PKA 蛋白表达更高,且苏合香丸低中高剂量三组、尼莫地平组两两比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ );SQ22536 组大鼠脑组织中 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达比模型组更高,cAMP、p-PKA 蛋白

表达更低( $P<0.05$ );与苏合香丸高剂量组相比,苏合香丸高剂量 +SQ22536 组大鼠脑组织中 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高,cAMP、p-PKA 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),见图 4 和表 5。

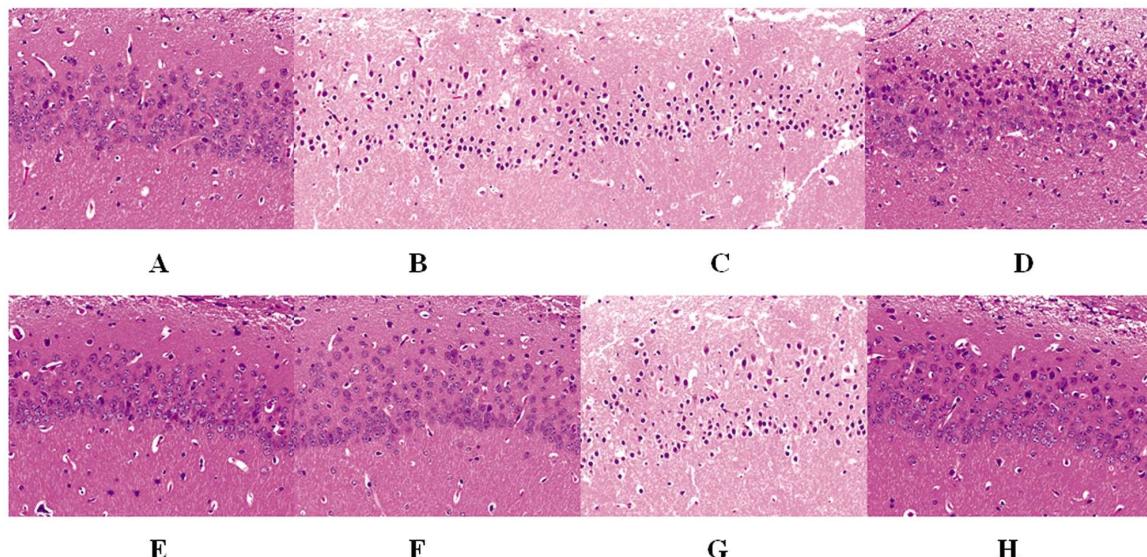


图 2 HE 染色检测各组大鼠脑组织海马 CA1 区病理变化( $\times 200$ )

Fig.2 HE staining detection of pathological changes in hippocampal CA1 region of rat brain tissue in each group ( $\times 200$ )

Note: A: Sham surgery group; B: Model group; C: Low-dose Suhexiang pill group; D: Medium dose Suhexiang pill group; E: High-dose Suhexiang pill group; F: Nimodipine group; G: SQ22536 group; H: High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group.

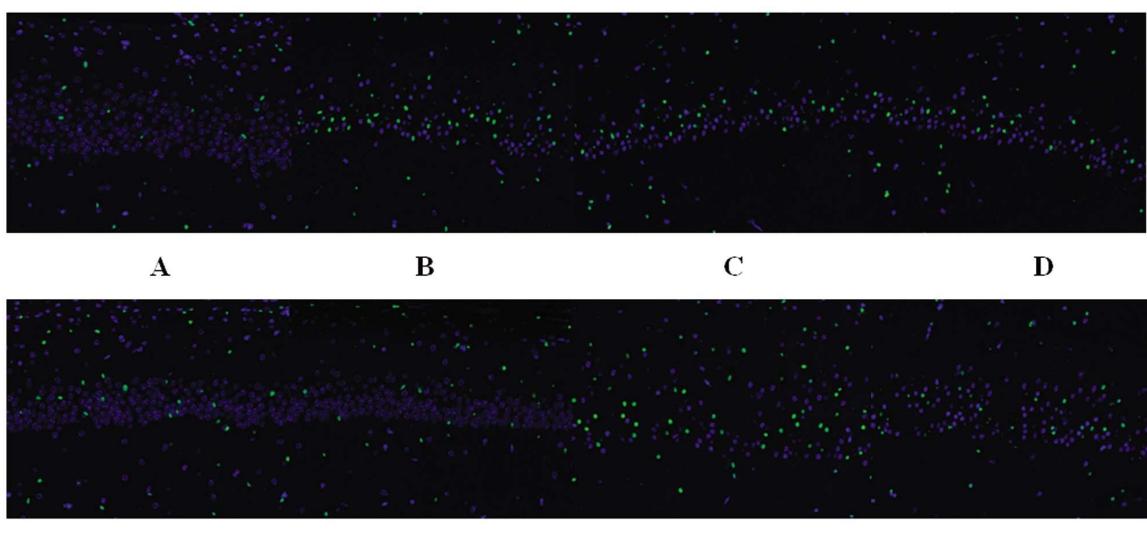


图 3 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织神经元凋亡( $\times 200$ )

Fig.3 TUNEL staining detection of neuronal apoptosis in brain tissue of rats in each group ( $\times 200$ )

Note: A: Sham surgery group; B: Model group; C: Low-dose Suhexiang pill group; D: Medium dose Suhexiang pill group; E: High-dose Suhexiang pill group; F: Nimodipine group; G: SQ22536 group; H: High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group.

### 3 讨论

西医虽然通过介入、溶栓、手术治疗等手段治疗脑梗死取得一定的临床效果,但仍然有部分患者治疗效果一般<sup>[11]</sup>。近年来,越来越多的研究显示了中医药在治疗脑梗死过程中具有副作用小,疗效好的特点,如黄芪赤风汤可以通过改善脑组织病理变化,减少炎症反应,从而发挥治疗脑梗死作用<sup>[12,13]</sup>;白杨素

可减轻急性脑梗死大鼠神经功能损伤<sup>[14]</sup>。因此,寻找安全和更有效的药物来改善脑梗死具有重要的意义。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 是常用于评估炎症的细胞因子,其水平与机体炎症程度呈正比<sup>[15,16]</sup>。本研究利用线拴法成功构建了急性期脑梗死大鼠模型,结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织含水量、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平、脑梗死体积、神经功能评分升高,海马 CA1 区病理损伤严重,表明模型组大鼠神经功能异常,存在炎

表 4 神经元凋亡率( $\bar{x} \pm s$ , n=6)Table 4 Neuronal apoptosis rate ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Groups	Neuronal apoptosis rate (%)
Sham surgery group	6.22± 0.18
Model group	32.28± 1.53*
Low-dose Suhexiang pill group	27.72± 1.18#
Medium dose Suhexiang pill group	21.14± 1.05##&
High-dose Suhexiang pill group	10.26± 0.58##@
Nimodipine group	11.06± 0.61##@
SQ22536 group	39.22± 1.86#
High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group	24.45± 1.37#
F	594.7
P	<0.000

Note: Compare with high-dose Suhexiang pill group, <sup>△</sup> P<0.05; Compare with model group, <sup>#</sup>P<0.05; Compare with Sham surgery group, <sup>\*</sup>P<0.05; Compare with medium dose Suhexiang pill group, <sup>@</sup>P<0.05;

\*P<0.05; Compare with low-dose Suhexiang pill group, <sup>##</sup>P<0.05.

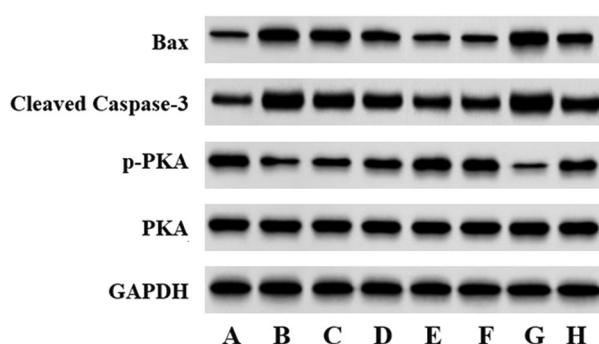


图 4 western blot 检测脑组织中 Bax、Cleaved Caspase-3、p-PKA 蛋白表达

Fig.4 Western blot detection of Bax, Cleaved Caspase-3, and p-PKA protein expression in brain tissue

Note: A: Sham surgery group; B: Model group; C: Low-dose Suhexiang pill group; D: Medium dose Suhexiang pill group; E: High-dose Suhexiang pill group; F: Nimodipine group; G: SQ22536 group; H: High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group.

症反应。Cleaved Caspase-3、Bax 作为凋亡相关标志物,具有促进细胞凋亡的作用<sup>[17,18]</sup>。本研究也发现,模型组大鼠脑组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达、神经元凋亡率比假手术组高,表明脑梗死大鼠存在大量神经元凋亡。

表 5 B ax、Cleaved Caspase-3、cAMP、p-PKA 蛋白表达( $\bar{x} \pm s$ , n=6)Table 5 Expression of Bax, Cleared Caspase-3, cAMP, and p-PKA proteins ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Groups	cAMP( nmol/L )	Bax/GAPDH	Cleaved Caspase-3/GAPDH	p-PKA/PKA
Sham surgery group	13.36± 0.57	0.29± 0.02	0.35± 0.03	0.95± 0.05
Model group	5.78± 0.23*	0.97± 0.08*	1.26± 0.11*	0.31± 0.03*
Low-dose Suhexiang pill group	7.38± 0.37#	0.81± 0.07#	1.04± 0.08#	0.52± 0.05#
Medium dose Suhexiang pill group	9.27± 0.29##&	0.64± 0.05##&	0.85± 0.09##&	0.73± 0.07##&
High-dose Suhexiang pill group	11.58± 0.42##@	0.39± 0.03##@	0.52± 0.04##@	0.91± 0.08##@
Nimodipine group	11.67± 0.44##@	0.37± 0.04##@	0.53± 0.04##@	0.92± 0.08##@
SQ22536 group	3.57± 0.16#	1.36± 0.14#	1.83± 0.18#	0.13± 0.01#
High-dose Suhexiang pill+SQ22536 group	8.66± 0.32△	0.73± 0.06△	0.92± 0.08△	0.68± 0.05△
F	471.4	154.3	157.8	167.6
P	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000

Note: Compare with high-dose Suhexiang pill group, <sup>△</sup> P<0.05; Compare with model group, <sup>#</sup>P<0.05; Compare with Sham surgery group, <sup>\*</sup>P<0.05; Compare with medium dose Suhexiang pill group, <sup>@</sup>P<0.05; Compare with low-dose Suhexiang pill group, <sup>##</sup>P<0.05.

苏合香丸具有开窍醒神,抗脑损伤之功效。据报道,苏合香丸能有效改善脑梗死症状,并降低炎症反应<sup>[19]</sup>;苏合香丸治疗急性脑梗死的效果显著<sup>[20]</sup>;苏合香丸对脑梗死急性期的临床疗效显著<sup>[21]</sup>。以上研究表明苏合香丸对急性期脑梗死具有很好的治疗作用。本研究也显示,苏合香丸可呈剂量依赖性地抑制急性期脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡,表明苏合香丸对急性期脑梗死的治疗作用可能与抑制神经炎症反应及神经元凋亡有关。

细胞内 cAMP 水平升高可导致 PKA 磷酸化从而阻断细胞内的炎症反应<sup>[22,23]</sup>。据报道,激活 cAMP-PKA 信号通路可对脑

卒中大鼠中发挥神经保护作用<sup>[24]</sup>;激活 cAMP/PKA 通路可减轻大鼠新生儿缺氧缺血性脑损伤后的神经炎症<sup>[25]</sup>;激活 cAMP/PKA 通路抑制了缺氧缺血新生大鼠神经细胞凋亡<sup>[26]</sup>;激活 cAMP/PKA 信号通路可促进脑卒中后小鼠运动功能恢复<sup>[27]</sup>。以上研究表明激活 cAMP/PKA 通路可抑制神经炎症、神经元凋亡等病理过程。本研究显示,与模型组比较,SQ22536 组大鼠脑组织中 cAMP、p-PKA 蛋白表达降低,神经炎症及神经元凋亡现象严重,脑组织神经元病理损伤严重,表明 cAMP/PKA 通路参与了急性期脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡过程。此外,本研究还发现,苏合香丸可上调急性期脑梗死大鼠脑组织

中 cAMP/p-PKA 蛋白表达，推测苏合香丸可能通过激活 cAMP/PKA 通路抑制脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡。为了验证该推测，本研究在高剂量苏合香丸作用的基础上再加上 cAMP 抑制剂 SQ22536 干预，结果显示，SQ22536 减弱了高剂量苏合香丸对急性期脑梗死大鼠神经元凋亡、神经炎症的抑制作用，证实了可能通过激活 cAMP/PKA 通路，苏合香丸可抑制急性期脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡。

综上，苏合香丸可能通过激活 cAMP/PKA 通路抑制急性期脑梗死大鼠神经炎症及神经元凋亡。但苏合香丸对急性期脑梗死大鼠的调节作用可能还涉及其它通路，本研究尚未深入探讨，这将是下一步研究的重点。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Steinsson OA, Kjartansson O, Valdimarsson EM. Heilablóðpurð heiladrep: Faraldsfræði, orsakir og einkenni [Cerebral ischemia/infarction - epidemiology, causes and symptoms] [J]. Laeknabladid, 2014, 100(5): 271-279.
- [2] Yu Z, Su G, Zhang L, et al. Icaritin inhibits neuroinflammation in a rat cerebral ischemia model by regulating microglial polarization through the GPER-ERK-NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Mol Med, 2022, 28(1): 142.
- [3] 林影, 李建红, 卢宏全, 等. 微小 RNA-199a 鞭向调控沉默信息调节因子 1 对脑梗死大鼠神经元凋亡的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(6): 26-32.
- [4] 单萍, 姚汉云, 王莉, 等. 基于网络药理学和分子对接的苏合香丸治疗缺血性卒中的机制探究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1294-1311.
- [5] 张晓凡, 朱志强, 裴辉, 等. 苏合香丸对重型颅脑损伤患者临床疗效及对炎症因子的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2023, 32(8): 1107-1110.
- [6] Wang YL, Zhu XL, Sun MH, et al. Effects of astaxanthin on axonal regeneration via cAMP/PKA signaling pathway in mice with focal cerebral infarction [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23 (3 Suppl): 135-143.
- [7] 马辉, 孙正启, 李岩松. 七十味珍珠丸干预脑梗死模型大鼠软脑膜微循环及胶质瘢痕的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(28): 4462-4467.
- [8] 焦光美, 单海雷, 张晓璇, 等. 舒血宁注射液对急性脑梗死大鼠脑组织的保护作用及其机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(3): 557-562, 675.
- [9] 汪雪峰, 陈锋, 宋顺德, 等. 腺苷酸环化酶抑制剂和激动剂在脂多糖诱导的急性肺损伤中的作用 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10): 1410-1414.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] Zhao Y, Zhang X, Chen X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review)[J]. Int J Mol Med, 2022, 49(2): 15.
- [12] 刘舒毓, 王秋月, 刘树民. 黄芪赤风汤对脑梗死大鼠模型的治疗作用及对脑组织 ZO-1、Claudin-5、P-gp、MRP1 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 26-33.
- [13] 李雅丽, 孙亚斌, 武建国. 黄芪赤风汤合独活寄生汤加减治疗缺血性卒中恢复期的临床研究 [J]. 国际中医中药杂志, 2023, 45(3): 289-292.
- [14] 张焕丽, 张振, 王春燕, 等. 白杨素对急性脑梗死大鼠神经功能的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(20): 2822-2825.
- [15] 唐南, 席春华, 张玲玲, 等. 天丹通络胶囊联合丁苯酞软胶囊治疗急性脑梗死的疗效及对炎症因子和脑血流动力学的影响[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(1): 142-145, 86.
- [16] Tripathy AS, Vishwakarma S, Trimbake D, et al. Pro-inflammatory CXCL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6: biomarkers of SARS-CoV-2 infection[J]. Arch Virol, 2021, 166(12): 3301-3310.
- [17] Wan M, Yin K, Yuan J, et al. YQFM alleviated cardiac hypertrophy by apoptosis inhibition and autophagy regulation via PIK/AKT/mTOR pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 44(285): 114835.
- [18] Dhlamini Q, Wang W, Feng G, et al. FGF1 alleviates LPS-induced acute lung injury via suppression of inflammation and oxidative stress [J]. Mol Med, 2022, 28(1): 73-86.
- [19] 郭晓芳, 范田, 许瑞丽. 苏合香丸联合阿加曲班治疗急性脑梗死的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(6): 1334-1337.
- [20] 曾路. 苏合香丸联合血塞通注射液治疗急性脑梗死的效果及对血流变学指标、氧化应激反应水平的影响[J]. 中国医学创新, 2021, 18(29): 53-57.
- [21] 李春雷, 张峰, 黄川锋. 血塞通注射液联合苏合香丸治疗脑梗死急性期的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32 (15): 1350-1352, 1366.
- [22] Hu X, Yan J, Huang L, et al. INT-777 attenuates NLRP3-ASC inflammasome-mediated neuroinflammation via TGR5/cAMP/PKA signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Brain Behav Immun, 2021, 35(91): 587-600.
- [23] 张旭, 刘建梁, 张秀红, 等. 针刺对缺氧缺血性脑损伤大鼠脑神经功能及 5-HT1A/cAMP/PKA 信号通路的影响机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(17): 3221-3225.
- [24] Jiang Y, Yang S, Tao J, et al. Opposing needling promotes behavior recovery and exerts neuroprotection via the cAMP/PKA/CREB signal transduction pathway in transient MCAO rats[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2060-2070.
- [25] Yu S, Doycheva DM, Gamdzik M, et al. Activation of MC1R with BMS-470539 attenuates neuroinflammation via cAMP/PKA/Nurr1 pathway after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 26.
- [26] Yu L, Liu S, Zhou R, et al. Atorvastatin inhibits neuronal apoptosis via activating cAMP/PKA/p-CREB/BDNF pathway in hypoxic-ischemic neonatal rats[J]. FASEB J, 2022, 36(4): e22263.
- [27] Gao X, Zhang X, Cui L, et al. Ginsenoside Rb1 Promotes Motor Functional Recovery and Axonal Regeneration in Post-stroke Mice through cAMP/PKA/CREB Signaling Pathway [J]. Brain Res Bull, 2020, 45(154): 51-60.