

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2025.03.003

盐酸氟桂利嗪对脑出血大鼠氧化应激、炎症因子表达以及神经功能的影响及机制探索

王朝晨¹ 张浩¹ 崔健¹ 王钢¹ 雍晓莉^{2△}

(1 西安市第一医院神经外科 陕西 西安 710002; 2 西安长安医院神经内科 陕西 西安 710016)

摘要 目的: 研究盐酸氟桂利嗪对脑出血大鼠氧化应激、炎症因子表达以及神经功能的影响并对其作用机制进行初步探索。**方法:** 大鼠分成假手术组、模型组(脑出血大鼠模型)、低剂量治疗组(脑出血大鼠模型, 予 0.6 mg/kg 盐酸氟桂利嗪治疗)、中剂量治疗组(脑出血大鼠模型, 予 1.2 mg/kg 盐酸氟桂利嗪治疗)、高剂量治疗组(脑出血大鼠模型, 予 2.4 mg/kg 盐酸氟桂利嗪治疗)。干预后, 首先对各组大鼠进行神经功能评分, 随后测定脑组织含水量, 并分别用试剂盒检测脑组织中 SOD、MDA、GSH-PX 水平, 采用流式细胞术检测脑组织中神经细胞的凋亡水平, 采用 qRT-PCR 法检测脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的 mRNA 水平, 采用 Western blot 法检测脑组织中 Bax、Bcl-2、NF- κ Bp65 蛋白表达水平。**结果:** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分降低, 脑组织含水量升高, 脑组织中 SOD、GSH-PX 水平降低, MDA 水平升高, 细胞凋亡增多, TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平升高, Bax、NF- κ Bp65 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低。与模型组比较, 低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠神经功能评分升高, 脑组织含水量降低, 脑组织中 SOD、GSH-PX 水平升高, MDA 水平降低, 细胞凋亡减少, TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平降低, Bax、NF- κ Bp65 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高, 且其中以高剂量治疗组的干预效果最优。**结论:** 盐酸氟桂利嗪可改善脑出血大鼠脑组织的氧化应激、减少炎症因子释放、减少细胞凋亡, 进而降低脑组织含水量、改善大鼠神经功能, 其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 盐酸氟桂利嗪; 脑出血; 氧化应激; 炎症; NF- κ B 信号通路

中图分类号: R3; R743.34 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2025)03-419-09

Effects and Mechanisms of Flunarizine Hydrochloride on Oxidative Stress, Inflammatory Factor Expression, and Neurological Function in Rats with Cerebral Hemorrhage

WANG Zhao-chen¹, ZHANG Hao¹, CUI Jian¹, WANG Gang¹, YONG Xiao-li^{2△}

作者简介: 王朝晨(1991-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 神经外科, E-mail: 515346179@qq.com

△ 通讯作者: 雍晓莉(1990-), 女, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 神经病学, E-mail: 873754089@qq.com

(收稿日期: 2024-06-26)

(1 Neurosurgery Department, Xi'an No.1 Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710002, China;

2 Neurology Department, Xi'an Chang An Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710016, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to investigate the effects of Flunarizine hydrochloride on oxidative stress, expression of inflammatory factors, and neurological function in rats with cerebral hemorrhage, as well as to explore its preliminary mechanisms of action. **Methods:** Rats were divided into the sham surgery group, model group (rats with cerebral hemorrhage), low-dose treatment group (rats with cerebral hemorrhage, treated with 0.6 mg/kg of Flunarizine hydrochloride), medium-dose treatment group (rats with cerebral hemorrhage, treated with 1.2 mg/kg of Flunarizine hydrochloride), and high-dose treatment group (rats with cerebral hemorrhage, treated with 2.4 mg/kg of Flunarizine hydrochloride). After intervention, neurological function was first assessed using a neurological function score. Subsequently, brain tissue water content was measured, and the levels of SOD, MDA, and GSH-PX in brain tissue were detected using assay kits. Flow cytometry was used to evaluate neuronal apoptosis, qRT-PCR was performed to measure TNF- α , IL-6, and IL-1 β mRNA levels in brain tissue, and Western blotting was conducted to assess the protein expression levels of Bax, Bcl-2, and NF- κ Bp65 in brain tissue. **Results:** Compared with the sham surgery group, rats in the model group showed decreased neurological function scores, increased brain tissue water content, decreased SOD and GSH-PX levels, increased MDA levels, increased neuronal apoptosis, elevated mRNA levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , and increased protein expression levels of Bax and NF- κ Bp65, along with reduced Bcl-2 protein expression. In comparison to the model group, rats in the low-dose, medium-dose, and high-dose treatment groups exhibited improved neurological function scores, reduced brain tissue water content, increased SOD and GSH-PX levels, decreased MDA levels, reduced neuronal apoptosis, lowered mRNA levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , and decreased protein expression levels of Bax and NF- κ Bp65, while Bcl-2 protein expression was increased. Notably, the high-dose treatment group showed the most significant intervention effects. **Conclusion:** The Flunarizine hydrochloride ameliorates oxidative stress, reduces the release of inflammatory factors, and attenuates neuronal apoptosis in rats with cerebral hemorrhage, thereby lowering brain tissue water content and improving neurological function. The mechanism could be potentially associated with the inhibition of the NF- κ B signaling pathway.

Key words: Flunarizine hydrochloride; Cerebral hemorrhage; Oxidative stress; Inflammation; NF- κ B signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R3;R743.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2025)03-419-09

前言

随着人口老龄化的不断加剧,脑血管疾病发病率也明显升高,对人类的生命健康造成了

极大威胁^[1]。脑出血是一种脑实质中的非外伤性的出血,是脑卒中最为常见的第二种类型,营养神经、降颅压、调控血压等对症治疗以及外科手术治疗是目前临床上常见的脑出血治疗手段,但现阶段依旧缺乏特异的有效治疗途径^[2]。氧化应激、炎症、脑水肿等是脑出血发生后的重要病理生理机制,同样也是改善脑组织损伤的关键^[3]。盐酸氟桂利嗪是一种钙通道阻断剂,能够预防脑循环障碍引起的细胞病理损害,对脑血栓、脑动脉粥样硬化、脑出血等有改善作用^[4]。研究显示,盐酸氟桂利嗪治疗以后的脑出血患者脑水肿明显改善^[5]。盐酸氟桂利嗪处理可以促进脑出血大鼠体感诱发电位逐渐恢复,而且能够保护脑组织^[6]。盐酸氟桂利嗪治疗偏头痛大鼠的同时能够降低脑组织中 NF- κ B 信号通路激活水平^[7]。在缺血再灌注损伤模型中,NF- κ B 信号通路异常激活,盐酸氟桂利嗪可以显著抑制 NF- κ B 信号通路而发挥保护神经的作用^[8]。NF- κ B 信号通路具有多种功能,在细胞凋亡、自噬、炎症、氧化损伤、免疫调节等方面均有调控功能^[9]。既往实验报道已表明,NF- κ B 信号通路在脑出血后异常活化^[10]。由于目前尚不清楚盐酸氟桂利嗪对大鼠脑出血氧化应激、炎症以及 NF- κ B 信号通路激活水平的影响,因此本次实验构建脑出血大鼠模型,研究盐酸氟桂利嗪对出血后大鼠脑组织及神经功能的作用,为盐酸氟桂利嗪治疗脑出血的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雄性 SD 大鼠(SPF 级,体重 250 g~280 g)购自西安交通大学动物实验中心;Bax 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology;SOD 活性检测试剂盒、MDA 含量检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;Bcl-2 抗体购自上海雅吉生物科技有限公司;GSH-PX 活性检测试剂盒购自上海

百蕊生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术公司;NF- κ Bp65 抗体购自上海彩佑实业有限公司。

1.2 模型构建和分组处理

大鼠脑出血模型构建方法参照文献^[11],按照 350 mg/kg 剂量给予水合氯醛麻醉,将大鼠固定在脑立体定位仪中,然后把从大鼠的股动脉中抽取的自体血 50 μ L 注射到大鼠的右侧基底节内(深 5.8 mm,前卤后 0.2 mm,旁开 3.0 mm),注射后留针 10 min 防止血液流出,将针头取出,小心缝合头皮,把大鼠放在 37℃ 的恒温毯中直至大鼠完全苏醒,喂食进水。大鼠分成 5 组,分别为假手术组、模型组、低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组,每组 13 只,模型组、低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠按照脑出血模型构建方法造模,低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠在脑出血造模前 1 d 至造模成功后 2 d 分别给予 0.6、1.2、2.4 mg/kg^[6]的盐酸氟桂利嗪腹腔注射,每 1 d 注射 1 次。假手术组只用相同的方法插入针头,但不注射血液。造模过程中低剂量治疗组死亡 1 只,其余均造模成功。将假手术组、模型组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠随机淘汰 1 只,最后每组剩余 12 只。造模后 3 d,对全部各组大鼠进行神经功能评分,然后将大鼠麻醉后,断头取脑,6 只用于检测脑组织含水量,其余 6 只脑组织(血肿周围的脑组织)分成 4 部分,按照 1.4-1.8 中方法进行相关检测。伦理审批号: Cayy2022-7。

1.3 神经功能评分

神经功能评分用 Modified Garcia 方法评分,评分结果越低,证明神经损伤程度越严重。评分细则参见文献^[12]。

1.4 脑组织含水量检测

将取出的新鲜脑组织放在分析天平上称量

重量,记为脑湿重。将脑组织置于 80℃ 的烤箱内持续烘干,次日取出,待脑组织恢复为室温后称量脑组织重量,记为脑干重。脑组织含水量 = (脑湿重 - 脑干重) ÷ 脑湿重。

1.5 脑组织中 SOD、MDA、GSH-PX 水平检测

取出血肿周围的脑组织,分别按照 SOD 活性检测试剂盒(黄嘌呤氧化法)、MDA 含量检测试剂盒(硫代巴比妥酸法)、GSH-PX 活性检测试剂盒(比色法)分别检测脑组织中 SOD、MDA、GSH-PX 水平,检测步骤完全按照试剂盒说明书标准流程进行。

1.6 脑组织中神经细胞凋亡水平检测

采用组织流式细胞术检测细胞凋亡变化。检测步骤为:取血肿周围脑组织,匀浆,置于 300 目尼龙网,PBS 洗涤。细胞悬浮液 1000 rpm 离心 5 min,弃上清。70%乙醇固定。PBS 稀释,1000 rpm 离心 5 min,PBS 重悬。调整细胞密度 1×10^6 。滴加 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶(PI)。应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 脑组织中 Bax、Bcl-2、NF- κ Bp65 蛋白表达水平检测

用 Western blot 方法检测血肿周围脑组织中 Bax、Bcl-2、NF- κ Bp65 蛋白表达水平。取脑组织,用 PBS 洗涤 2 次,然后在组织中添加含有 PMSF 的 RIPA 裂解溶液,放在冰上裂解 20 min。4℃,12000 × g 离心 10 min。收集上清,即为裂解蛋白。用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度。在蛋白中加入 1/4 体积的 4× simple Buffer,混匀以后,放在 100℃ 煮沸 5 min。将洗涤干净的玻璃板放在胶架上,按照 10% 分离胶以及 5% 的浓缩胶配制 SDS-PAGE 凝胶。在每个样品孔中添加 40 μ g 蛋白样品。按照 20 mA 恒流在浓缩胶中电泳,肉眼看到 marker 分离以后,将电压升高到 120 V 继续在分离胶中电泳。等到样品进入到电泳槽的底部 1 cm 左右时,将电源关闭,取出凝胶。根据目的蛋白的分子量将需要的

胶条切下。把 PVDF 膜按照胶条的大小裁剪并标记,放在甲醇中活化 2 min,然后按照 200 mA 的恒流转膜 2 h。把 PVDF 膜取出,浸泡在 TBST 溶液中,添加 5% 的脱脂奶粉,于摇床室温孵育 1 h。将 PVDF 膜放在一抗孵育盒内,添加用 TBST 稀释以后的一抗溶液,在 4℃ 摇床孵育过夜。PVDF 膜放在二抗孵育盒内,添加用 TBST 稀释以后的二抗溶液,在室温中结合 2 h。将 ECL 显色试剂 A 和 B 混合,滴加到 PVDF 膜上,用 Image J 对蛋白条带进行半定量,内参为 GAPDH。二抗按照 1: 4000 稀释,Bax 抗体、Bcl-2 抗体、NF- κ Bp65 抗体分别按照 1: 800、1: 800、1: 600 稀释。

1.8 脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平检测

用 qRT-PCR 方法检测血肿周围的脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平。取脑组织,用 PBS 反复洗涤 2 次,然后添加 Trizol 试剂提取组织总 RNA。RNA 经过紫外分光光度计测定 A260/A280 的比值在 1.8~2.0 之间。取 1 μ g 的 RNA,添加 1 μ L 的 DNA Eraser、2 μ L 的 5× g DNA Eraser Buffer,最后添加 DEPC 水至 10 μ L,放在 42℃ 孵育 2 min,放在冰上,继续加入 5 μ L 的 5× Prime script buffer、1 μ L 的 Prime script RT Enzyme mix、1 μ L 的 RT prime mix,最后添加 DEPC 水至 20 μ L,放在 85℃ 孵育 5 s,37℃ 孵育 30 min,4℃ 保存。吸取 2 μ L 的 cDNA,添加 1 μ L 的上游以及下游引物、12.5 μ L 的 SYBR Fast qPCR mix,添加 DEPC 水至 25 μ L。PCR 反应程序为:95℃,2 min;95℃,45 s;58℃,1 min;68℃,2 min,共 35 个循环。内参为 GAPDH,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因表达水平。引物序列为:IL-1 β ,上游 5'-ATGGCAACTGTCC-CTGAACT-3',下游 5'-GTCATCATCCCACGAGT-CAC-3';IL-6,上游 5'-CTTGGGACTGAT-GTTGTTGAC-3',下游 5'-CTCTGAATGACTCTG-

GCTTTG-3'; TNF- α , 上游 5'-TGGTGGTTTGCTAC-GACG-3', 下游 5'-CTCCAGAACTCCAGGCGG-3'; GAPDH, 上游 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3', 下游 5'-AGGTGGAGGAGTGGGTGT-3'。

1.9 统计学分析

利用软件 SPSS 21.0 统计分析实验数据, 数据用均数 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 多组差异比较采用单因素方差分析, 并采用 Tukey 进行事后比较, 方差不齐则采用 Welch's 方差分析及 Games-Howell 事后比较; $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 盐酸氟桂利嗪改善脑出血大鼠神经功能评分和脑水肿

与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分降低, 脑组织含水量升高; 与模型组比较, 低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠神经功能评分升高, 脑组织含水量降低, 且其中以高剂量治疗组的神经功能评分最高且脑组织含水量最低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠神经功能评分和脑组织含水量

Table 1 Neurological function scores and brain tissue water content in rats after treatment with flunarizine hydrochloride

Groups	Modified Garcia score	Brain tissue water content
Sham surgery group	17.83 $\pm$ 0.39	0.71 $\pm$ 0.03
Model group	5.25 $\pm$ 0.62*	0.83 $\pm$ 0.03*
Low-dose treatment group	8.33 $\pm$ 0.89* [#]	0.77 $\pm$ 0.01* [#]
Medium-dose treatment group	13.33 $\pm$ 1.07* ^{#&}	0.74 $\pm$ 0.02 [#]
High-dose treatment group	15.92 $\pm$ 1.51* ^{#&Δ}	0.71 $\pm$ 0.01 ^{#&Δ}

Note: Compared with the sham surgery group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, [#] $P < 0.05$;

Compared with the low-dose treatment group, [&] $P < 0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, ^{Δ} $P < 0.05$.

2.2 盐酸氟桂利嗪改善脑出血大鼠氧化应激

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 SOD、GSH-PX 水平降低, MDA 水平升高; 与模型组比较, 低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂

量治疗组大鼠脑组织中 SOD、GSH-PX 水平升高, MDA 水平降低, 且其中以高剂量治疗组的 SOD、GSH-PX 水平最高且 MDA 水平最低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠脑组织 SOD、MDA、GSH-PX 水平

Table 2 SOD, MDA and GSH-PX levels in rat brain tissue after treatment with flunarizine hydrochloride

Groups	SOD (U/mg)	GSH-PX (U/mg)	MDA (nmol/mg)
Sham surgery group	196.05 $\pm$ 13.01	271.91 $\pm$ 21.82	5.29 $\pm$ 0.38
Model group	101.24 $\pm$ 9.37*	164.85 $\pm$ 13.17*	12.49 $\pm$ 1.01*
Low-dose treatment group	124.90 $\pm$ 9.52* [#]	182.86 $\pm$ 14.06*	9.65 $\pm$ 0.58* [#]
Medium-dose treatment group	156.56 $\pm$ 12.39* ^{#&}	204.16 $\pm$ 12.74* [#]	7.58 $\pm$ 0.79* ^{#&}
High-dose treatment group	182.58 $\pm$ 14.55 ^{#&Δ}	243.53 $\pm$ 20.00 ^{#&Δ}	5.81 $\pm$ 0.44 ^{#&Δ}

Note: Compared with the sham surgery group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, [#] $P < 0.05$;

Compared with the low-dose treatment group, [&] $P < 0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, ^{Δ} $P < 0.05$.

2.3 盐酸氟桂利嗪抑制脑出血大鼠神经细胞凋亡

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中神经细胞凋亡水平升高, Bax 蛋白表达水平升高,

Bcl-2 蛋白表达水平下降;与模型组比较,低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠脑组织神经细胞凋亡水平降低,Bax 蛋白表达水平降低,Bcl-2 蛋白表达水平升高,且其中以高剂

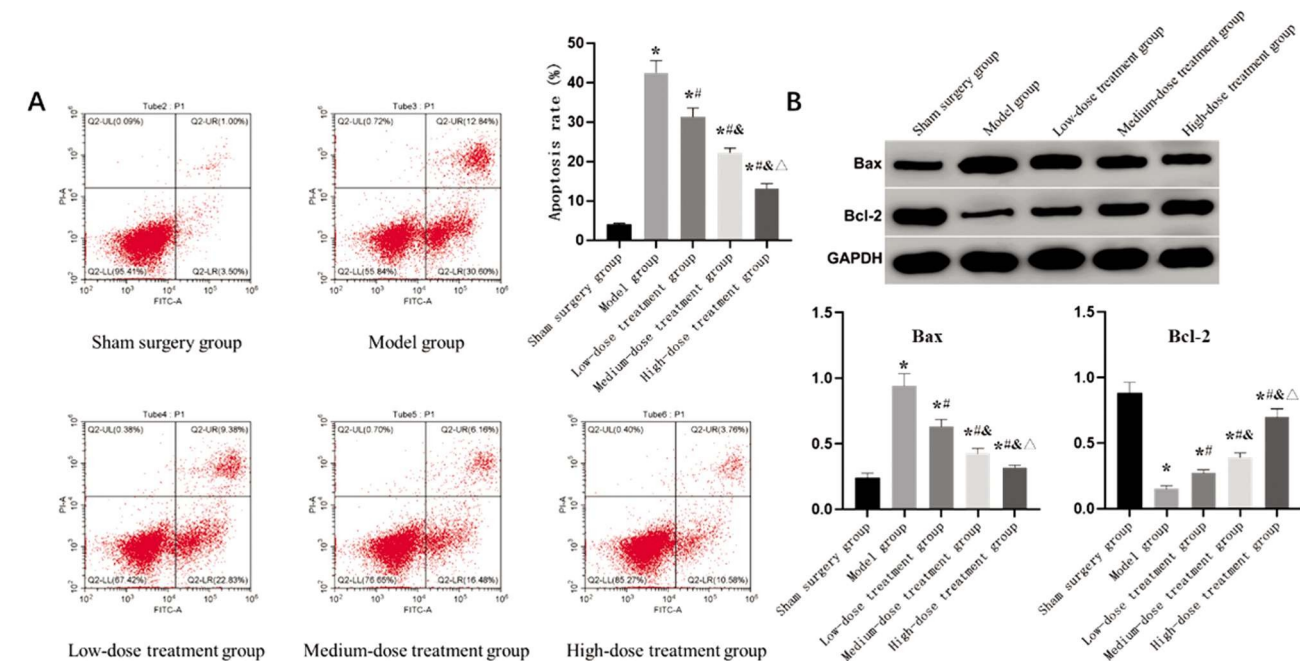


图 1 Western blot 测定盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠脑组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达

Fig.1 Western blot detection of Bax and Bcl-2 protein expression in rat brain tissue after treatment with flunarizine hydrochloride

Note: Compared with the sham surgery group, $*P<0.05$; Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$; Compared with the low-dose treatment group, $^{\&}P<0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, $^{\Delta}P<0.05$.

表 3 盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠脑组织神经细胞凋亡率和 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平

Table 3 Neurocyte apoptosis rate and, Bax and Bcl-2 protein expression levels in rat brain tissue after treatment with flunarizine hydrochloride

Groups	Cell apoptosis rate(%)	Bax	Bcl-2
Sham surgery group	4.02 ± 0.24	0.24 ± 0.03	0.89 ± 0.08
Model group	42.44 ± 3.12*	0.94 ± 0.09*	0.15 ± 0.02*
Low-dose treatment group	31.30 ± 2.21* [#]	0.63 ± 0.05* [#]	0.27 ± 0.02* [#]
Medium-dose treatment group	22.21 ± 1.20* ^{#&}	0.43 ± 0.04* ^{#&}	0.39 ± 0.03* ^{#&}
High-dose treatment group	13.06 ± 1.28* ^{#&Δ}	0.32 ± 0.02* ^{#&Δ}	0.70 ± 0.06* ^{#&Δ}

Note: Compared with the sham surgery group, $*P<0.05$; Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$; Compared with the low-dose treatment group, $^{\&}P<0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, $^{\Delta}P<0.05$.

2.4 盐酸氟桂利嗪抑制脑出血大鼠脑组织炎症因子表达

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达水平升高;与模型组比较,低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量

治疗组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达水平均降低,且其中以高剂量治疗组最低 ($P<0.05$),见表 4。

2.5 盐酸氟桂利嗪抑制脑出血大鼠脑组织中 NF- κ B 信号通路激活

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 NF- κ Bp65 蛋白水平均降低,且其中以高剂量治疗组最低($P<0.05$),见图 2 和表 5。

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 NF- κ Bp65 蛋白水平升高;与模型组比较,低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组大鼠脑

表 4 盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠脑组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达水平

Table 4 mRNA expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in rat brain tissue after treatment with flunarizine hydrochloride

Groups	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA	IL-1 β mRNA
Sham surgery group	1.01 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.10
Model group	2.68 $\pm$ 0.30*	3.20 $\pm$ 0.23*	1.86 $\pm$ 0.12*
Low-dose treatment group	2.13 $\pm$ 0.16* [#]	2.35 $\pm$ 0.13* [#]	1.46 $\pm$ 0.12* [#]
Medium-dose treatment group	1.54 $\pm$ 0.12* ^{#&}	2.04 $\pm$ 0.11* ^{#&}	1.25 $\pm$ 0.10* ^{#&}
High-dose treatment group	1.18 $\pm$ 0.11 ^{#&Δ}	1.48 $\pm$ 0.13* ^{#&Δ}	1.04 $\pm$ 0.09 ^{#&Δ}

Note: Compared with the sham surgery group, * $P<0.05$; Compared with the model group, [#] $P<0.05$; Compared with the low-dose treatment group, [&] $P<0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, ^{Δ} $P<0.05$.

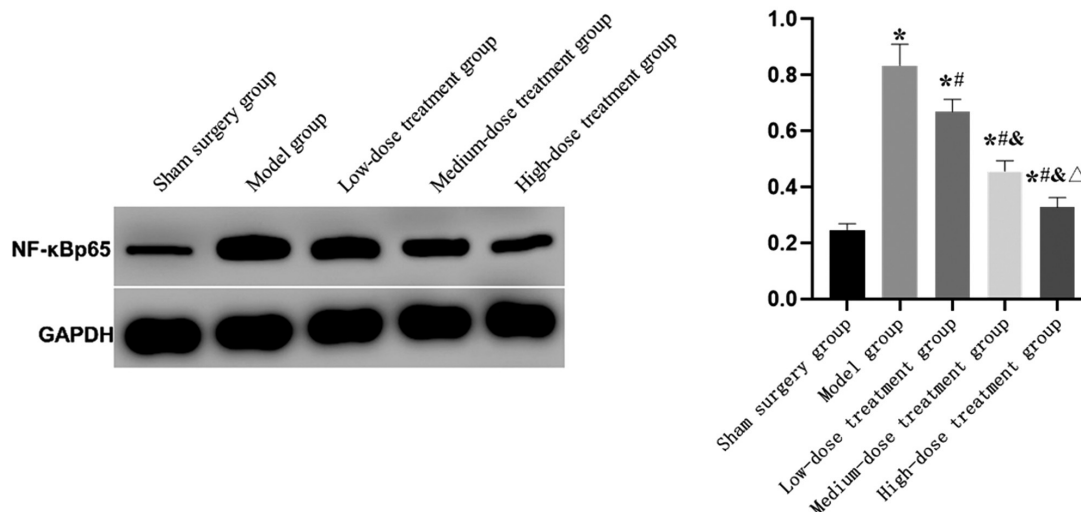


图 2 Western blot 检测盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠脑组织中 NF- κ Bp65 蛋白表达

Fig.2 Western blot detection of NF- κ Bp65 protein expression in rat brain tissue after treatment with flunarizine hydrochloride

Note: Compared with the sham surgery group, * $P<0.05$; Compared with the model group, [#] $P<0.05$; Compared with the low-dose treatment group, [&] $P<0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, ^{Δ} $P<0.05$.

表 5 盐酸氟桂利嗪治疗后大鼠脑组织中 NF- κ Bp65 蛋白表达水平

Table 5 Expression levels of NF- κ Bp65 protein in rat brain tissue after treatment with flunarizine hydrochloride

Groups	NF- κ Bp65
Sham surgery group	0.25 $\pm$ 0.02
Model group	0.84 $\pm$ 0.08*
Low-dose treatment group	0.67 $\pm$ 0.04* [#]
Medium-dose treatment group	0.46 $\pm$ 0.04* ^{#&}
High-dose treatment group	0.33 $\pm$ 0.03* ^{#&Δ}

Note: Compared with the sham surgery group, * $P<0.05$; Compared with the model group, [#] $P<0.05$; Compared with the low-dose treatment group, [&] $P<0.05$; Compared with the medium-dose treatment group, ^{Δ} $P<0.05$.

3 讨论

盐酸氟桂利嗪能够抑制过多的钙离子进入细胞内,进而有效预防细胞由于钙离子超载而引起的功能损伤,临床上盐酸氟桂利嗪可以用于治疗偏头痛^[7]。近些年来,国内外有很多关于盐酸氟桂利嗪改善脑血管疾病的报道,其对脑血栓的形成、脑缺血、脑栓塞、脑血管痉挛等有改善作用^[4]。盐酸氟桂利嗪对急性脑梗死有明显的治疗效果,可以增加血管内的血流速度、减少脑梗死面积^[4]。盐酸氟桂利嗪治疗后的脑出血患者的神经功能损伤明显改善,患者的交流、社交、情感、社会参与等综合能力大大提高^[13]。盐酸氟桂利嗪还能够促进脑出血血肿吸收,并且降低死亡率^[5]。本实验发现,盐酸氟桂利嗪治疗后的脑出血大鼠模型神经功能明显改善,大鼠脑组织含水量明显降低,提示盐酸氟桂利嗪具有改善大鼠脑出血的作用,这与上面的研究报道结果相一致,均提示盐酸氟桂利嗪有保护脑组织的功能。

脑出血发病机制较为复杂,其与脑组织中一系列损伤反应有关,其中氧化损伤、细胞凋亡、炎症等均是引起脑出血所致脑损伤的重要机制^[14]。脑组织中的氧化应激水平与抗氧化酶活性有关,SOD和GSH-PX是存在于机体内的主要抗氧化酶,其活性降低后可以促进氧自由基的积累,过量的氧自由基可以将脂质过氧化造成氧化损伤,而MDA作为脂质过氧化的产物,其表达水平越高提示氧化损伤程度越高^[15]。另外,氧化应激还可以诱导细胞内凋亡相关蛋白的表达,进而发挥促细胞凋亡作用^[16],其中Bax和Bcl-2作为Bcl-2蛋白家族成员,二者在细胞凋亡中分别发挥了促进作用和抑制作用^[17]。很多研究证明,炎症在脑出血损伤中发挥促进作用,脑出血以后,各种原因引起的炎症细胞激活导致炎症因子如TNF- α 、IL-6、IL-1 β 释放,从

而一方面进一步诱导细胞凋亡,另一方面促进脑组织氧化损伤^[18,19]。本实验结果显示,盐酸氟桂利嗪治疗以后的脑出血大鼠模型脑组织中SOD和GSH-PX水平升高、MDA水平降低,脑组织中细胞凋亡水平降低,Bax蛋白表达水平降低,Bcl-2蛋白表达水平升高,TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA水平降低,这说明盐酸氟桂利嗪改善大鼠脑出血的作用机制与抑制氧化应激和炎症反应以及减少细胞凋亡有关。

研究报道显示,盐酸氟桂利嗪在改善缺血再灌注损伤的同时还可以降低脑组织中NF- κ B信号通路的激活程度^[8]。NF- κ B是在哺乳动物体内发现的转录调节因子,在几乎所有的细胞中均有表达,能够被多种因子刺激激活,进而激活下游信号分子从而参与炎症、细胞凋亡、细胞衰老、细胞运动等多种生理、病理过程^[20]。既往研究发现,NF- κ B信号通路在脑损伤中过度激活,在脑出血小鼠模型中,NF- κ Bp65的蛋白表达水平升高,抑制NF- κ B信号则可减少脑组织含水量、降低炎症因子如TNF- α 、IL-1 β 的水平^[21]。脑出血中NF- κ B信号通路的激活与细胞凋亡的程度有关^[22]。NF- κ Bp65是NF- κ B信号通路的关键亚单位,其表达水平的高低反映了NF- κ B信号通路的激活水平^[23]。本实验发现,脑出血大鼠模型中NF- κ Bp65蛋白表达水平升高,并且盐酸氟桂利嗪能够降低脑组织中NF- κ Bp65蛋白的表达水平,提示盐酸氟桂利嗪对脑出血病情的改善机制可能与NF- κ B信号通路有关。

总而言之,盐酸氟桂利嗪能够抑制脑出血大鼠脑组织的氧化应激水平及炎症因子释放,可减少细胞凋亡,进而改善大鼠脑出血所致脑损伤,且该作用可能与盐酸氟桂利嗪可降低NF- κ B信号通路激活水平有关。本实验为研究盐酸氟桂利嗪对脑出血所致损伤的保护机制奠定了基础,为盐酸氟桂利嗪治疗脑出血的临床应

用提供了基础实验依据。然而,本研究没有分析研究盐酸氟桂利嗪通过何种分子靶向机制进而影响了脑出血所致脑细胞损伤,因此仍存在一定的局限性,对此将在以后的实验中进行分析。

参 考 文 献 (References)

- [1] WAZIRY R, HOFMAN A, GHANBARI M, et al. Biological aging for risk prediction of first-ever intracerebral hemorrhage and cerebral infarction in advanced age [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2022, 31 (8): 106568.
- [2] MAGID-BERNSTEIN J, GIRARD R, POLSTER S, et al. Cerebral hemorrhage: pathophysiology, treatment, and future directions [J]. *Circ Res*, 2022, 130 (8): 1204-1229.
- [3] ZILLE M, FARR TD, KEEP RF, et al. Novel targets, treatments, and advanced models for intracerebral haemorrhage [J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103880.
- [4] 姚银萍, 傅锋. 参麦注射液联合盐酸氟桂利嗪治疗脑梗死后血管性痴呆的临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11): 2813-2816.
- [5] 段红利, 何晓英, 张光伟, 等. 盐酸氟桂利嗪与鼠神经生长因子治疗脑出血的效果分析 [J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(8): 83-86.
- [6] 李玲, 陈康宁, 杨海松, 等. 盐酸氟桂利嗪对实验性脑出血大鼠体感诱发电位的影响 [J]. *临床神经电生理学杂志*, 2006, 15(6): 356-358, 365.
- [7] 王蓉飞, 于生元. 氟桂利嗪对偏头痛模型大鼠中脑导水管周围灰质区 NF- κ B 蛋白表达的影响 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2011, 17(2): 107-110.
- [8] 魏东, 万琪, 李珂, 等. 氟桂利嗪对缺血再灌注后 PC12 细胞质钙离子浓度和核转录因子表达影响的研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2004, 6(5): 338-340.
- [9] DUROCHER M, KNEPP B, YEE A, et al. Molecular correlates of hemorrhage and edema volumes following human intracerebral hemorrhage implicate inflammation, autophagy, mRNA splicing, and T cell receptor signaling [J]. *Transl Stroke Res*, 2021, 12 (5): 754-777.
- [10] DENG S, CHEN X, LEI Q, et al. AQP2 promotes astrocyte activation by modulating the TLR4/NF κ B-p65 pathway following intracerebral hemorrhage [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 847360.
- [11] LI X, CAO R, LU H, et al. Cerebral hemorrhage therapy by targeting VEGF and HGF in a preclinical trial in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15 (5): 3093-3098.
- [12] 黄骏. 阿托伐他汀对大鼠脑出血后 AQP-4 表达影响的研究 [D]. 西南医科大学, 2016.
- [13] 全燕辉. 盐酸氟桂利嗪胶囊联合神经生长因子治疗脑出血的临床疗效分析 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2019, 40(10): 1254-1255.
- [14] WANG JA, TONG ML, ZHAO B, et al. Parthenolide ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(1): 153-160.
- [15] LI W, LI W, LENG Y, et al. Ferroptosis is involved in diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress [J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(2): 210-225.
- [16] LI Q, SUN Y, LIU B, et al. ACT001 modulates the NF- κ B/MnSOD/ROS axis by targeting IKK β to inhibit glioblastoma cell growth [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2020, 98(2): 263-277.
- [17] AMGALAN D, GARNER TP, PEKSON R, et al. A small-molecule allosteric inhibitor of BAX protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(3): 315-328.
- [18] DIKALOVA AE, PANDEY A, XIAO L, et al. Mitochondrial deacetylase Sirt3 reduces vascular dysfunction and hypertension while Sirt3 depletion in essential hypertension is linked to vascular inflammation and oxidative stress [J]. *Circ Res*, 2020, 126 (4): 439-452.

- 2000206.
- [21] Patolia S, Tamae Kakazu M, Chami HA, et al. Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes in the Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis among Patients with Interstitial Lung Disease [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2020, 17(11): 1455-1467.
- [22] Shang L, Gu X, Du S, et al. for CAP-China Network. The efficacy and safety of therapeutic lung lavage for exogenous lipid pneumonia: A systematic review[J]. *Clin Respir J*, 2021, 15(2): 134-146.
- [23] 雷雪超, 李峰, 梁国彩. 纤维支气管镜肺泡灌洗对重症肺炎伴呼吸衰竭患者临床疗效、肺功能及炎性因子的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2022, 34(1): 69-71.
- [24] 程春生, 李纲. 纤维支气管镜肺泡灌洗对重症肺炎伴呼吸衰竭患者炎性反应介质因子的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2022, 34(1): 69-71.
- [25] Pitre T, Lupas D, Ebeido I, et al. Prognostic factors associated with mortality in acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Respir Med*, 2024, 222: 107515.
- [26] Ferreyro BL, Angriman F, Munshi L, et al. Association of Noninvasive Oxygenation Strategies With All-Cause Mortality in Adults With Acute Hypoxemic Respiratory Failure: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. *JAMA*, 2020, 324(1): 57-67.
- [27] Ervin JN, Rentes VC, Dibble ER, et al. Evidence-Based Practices for Acute Respiratory Failure and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review of Reviews [J]. *Chest*, 2020, 158(6): 2381-2393.
- [28] Fahey AC, O'Connell M, Cornally N, et al. High flow nasal cannula versus noninvasive ventilation in the treatment of acute hypercapnic respiratory failure: A systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Respir J*, 2023, 17(11): 1091-1102.
- [29] Ruzsics I, Matrai P, Hegyi P, et al. Noninvasive ventilation improves the outcome in patients with pneumonia-associated respiratory failure: Systematic review and meta-analysis [J]. *J Infect Public Health*, 2022, 15(3): 349-359.
-
- (上接第 427 页)
- [19] BONA N, PEZZARINI E, BALBI B, et al. Oxidative stress, inflammation and disease activity biomarkers in lupus nephropathy [J]. *Lupus*, 2020, 29(3): 311-323.
- [20] ZHAO QH, LIN LP, GUO YX, et al. Matrix metalloproteinase-13, NF- κ B p65 and interleukin-1 β are associated with the severity of knee osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(6): 3620-3626.
- [21] WU X, FU S, LIU Y, et al. NDP-MSH binding melanocortin-1 receptor ameliorates neuroinflammation and BBB disruption through CREB/Nr4a1/NF- κ B pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 192.
- [22] 刘宗超, 饶明俐, 周官恩. 实验性脑出血中 NF- κ B 的动态表达及其与凋亡的关系 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2007, 24(3): 288-290, 387.
- [23] WANG H, XU Y, XU A, et al. PKC β /NF- κ B pathway in diabetic atrial remodeling [J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76(4): 637-653.