

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.22.007

# 田蓊苣对脑小血管病大鼠模型认知功能受损和神经细胞凋亡的影响\*

王 静<sup>1</sup> 蒋 锋<sup>2</sup> 杨云鹏<sup>1</sup> 李 娟<sup>1</sup> 李 豫<sup>1</sup> 任 蓓<sup>1Δ</sup>

(1 西安市人民医院(西安市第四医院)神经内科 陕西 西安 710004; 2 陕西省人民医院神经内一科 陕西 西安 710068)

**摘要 目的:**探讨田蓊苣对脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)大鼠模型认知功能受损和神经细胞凋亡的影响及机制。**方法:**将SD大鼠分为Sham组、CSVD组、低剂量田蓊苣组(L-Til组, 5 mg/kg/d)、中剂量田蓊苣组(M-Til组, 10 mg/kg/d)和高剂量田蓊苣组(H-Til组, 20 mg/kg/d)。通过同种系微栓子体外注入法建立CSVD大鼠模型,各组大鼠均治疗4周。治疗结束后对各组大鼠进行Morris水迷宫测试,分离海马组织并进行HE染色、TUNEL染色和尼氏染色。通过免疫组化染色或Western blot检测大鼠海马组织中Bax、Bcl2、cleaved caspase-3、VEGF和细胞核NF- $\kappa$ B p65的表达。使用相应试剂盒检测血清炎症指标(TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ )和氧化应激指标(SOD和MDA)水平。**结果:**与CSVD组比较,L-Til组、M-Til组和H-Til组的逃避潜伏期均缩短,而穿越平台次数均增加( $P<0.05$ )。与CSVD组比较,L-Til组、M-Til组和H-Til组大鼠海马组织TUNEL阳性率降低,而尼氏体光密度增加( $P<0.05$ );Bax和cleaved caspase-3的表达水平降低,Bcl2水平升高( $P<0.05$ )。与CSVD组比较,L-Til组、M-Til组和H-Til组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和MDA水平降低,SOD升高( $P<0.05$ )。与CSVD组比较,L-Til组、M-Til组和H-Til组大鼠海马组织中细胞核NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平降低,细胞质VEGF蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。**结论:**本研究证明田蓊苣可减轻CSVD大鼠的认知功能障碍并抑制神经细胞凋亡,田蓊苣对CSVD的治疗机制部分通过减少炎症和氧化应激、促进VEGF的表达和抑制NF- $\kappa$ B信号通路来实现。

**关键词:**脑小血管病;田蓊苣;认知功能;神经细胞凋亡;VEGF;NF- $\kappa$ B信号通路

**中图分类号:**R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)22-4235-07

## Effects of Tilianin on Cognitive Impairment and Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Small Vessel Disease\*

WANG Jing<sup>1</sup>, JIANG Feng<sup>2</sup>, YANG Yun-peng<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, REN Bei<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Neurology, Xi'an People's Hospital(Xi'an Fourth Hospital), Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of 1st Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect and mechanism of tericin on cognitive impairment and neuronal apoptosis in a rat model of cerebral small vessel disease (CSVD). **Methods:** SD rats were divided into Sham group, CSVD group, low-dose tilianin group (L-Til group, 5 mg/kg/d), middle-dose tilianin group (M-Til group, 10 mg/kg/d) and high-dose tilianin group (H-Til group, 20 mg/kg/d). The CSVD rat model was established by in vitro injection of the same germline microemboli, and the rats in each group were treated for 4 weeks. After the treatment, Morris water maze test was performed on the rats in each group, and the hippocampal tissue was separated and stained with HE, TUNEL and Nissl. The expressions of Bax, Bcl2, cleaved caspase-3, VEGF and nuclear NF- $\kappa$ B p65 in hippocampus were detected by immunohistochemical staining or Western blot. The levels of serum inflammatory indexes (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and oxidative stress indexes (SOD and MDA) were detected by corresponding kit. **Results:** Compared with that in the CSVD group, the escape latency decreased in L-Til group, M-Til group and H-Til group, and the number of crossing the platform increased ( $P<0.05$ ). Compared with that in the CSVD group, the positive rate of TUNEL decreased in hippocampus of L-Til group, M-Til group and H-Til group, while Nissl body optical density increased ( $P<0.05$ ); The expression levels of Bax and cleaved caspase-3 decreased, while Bcl2 increased ( $P<0.05$ ). Compared with that in the CSVD group, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MDA decreased in L-Til group, M-Til group and H-Til group, while SOD increased ( $P<0.05$ ). Compared with that in the CSVD group, the nuclear NF- $\kappa$ B p65 protein expression level decreased in hippocampus of L-Til group, M-Til group and H-Til group, while the cytoplasmic VEGF protein expression level increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** This study shows that tilianin can alleviate cognitive impairment and inhibit neuronal apoptosis in CSVD rats. The therapeutic mechanism of tilianin on CSVD is partly achieved by reducing inflammation and oxidative stress, promoting VEGF expression and inhibiting NF- $\kappa$ B signal pathway.

**Key words:** Cerebral small vessel disease; Tilianin; Cognitive function; Neuronal apoptosis; VEGF; NF- $\kappa$ B signaling pathway

\* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(2022JM-594)

作者简介:王静(1980-),女,副主任医师,研究方向:脑血管病诊治和研究,电话:18729290320,E-mail: wjing63151077@163.com

Δ 通讯作者:任蓓(1983-),女,副主任医师,E-mail: 12183406@qq.com

(收稿日期:2022-03-23 接受日期:2022-04-18)

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

Article ID: 1673-6273(2022)22-4235-07

## 前言

脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)是一种脑部小血管病变,也是导致老年认知障碍的主要原因<sup>[1]</sup>。CSVD的主要临床表现为腔隙性脑梗死、脑白质病变和脑出血,严重影响患者的生命安全<sup>[2,3]</sup>。因此,开发具有安全性高、疗效好的CSVD治疗药物具有重要意义。香青兰(*Dracocephalum moldavica* L.)是唇形科一年生草本植物,主要用于治疗心肌缺血、脑缺血等心脑血管疾病<sup>[4,5]</sup>。田蓯苣(Tilianin)是香青兰中的主要黄酮类活性成分,具有抗氧化、抗炎等多种药理作用<sup>[6-9]</sup>。以往的研究表明,田蓯苣可减轻心肌缺血再灌注损伤大鼠的心肌损伤<sup>[10]</sup>,主要是通过抑制心肌细胞凋亡、减少活性氧生成、增加心肌细胞中ATP的产生、保护线粒体的结构和功能等方面发挥作用<sup>[11]</sup>。最近,有文献报道,田蓯苣可抑制氧-葡萄糖剥夺(OGD)诱导的神经细胞凋亡,具有良好的神经保护作用<sup>[12]</sup>。因此,本课题组推测田蓯苣可能是一种治疗CSVD的潜在天然药物。药理学研究证实,血管病变引起的血脑屏障功能障碍是CSVD的主要病变特征<sup>[13]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)是一种参与血管病变的细胞生长因子,具有促进内皮细胞增殖、抑制细胞凋亡、维持神经细胞的存活等多种功能<sup>[14]</sup>。另外,NF- $\kappa$ B是与CSVD发病有关的经典促炎信号通路<sup>[15,16]</sup>。因此,本研究旨在考察田蓯苣对CSVD大鼠模型认知功能和神经细胞凋亡的影响,并从炎症、氧化应激、VEGF和NF- $\kappa$ B信号通路等角度来探讨田蓯苣对CSVD的治疗分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验试剂** 田蓯苣(ST9320,纯度:HPLC $\geq$  98%)、羧甲基纤维素钠(C8621)购自北京索莱宝科技有限公司。苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(C0105M)、TUNEL染色试剂盒(C1086)、尼氏染色液(C0117)、RIPA裂解缓冲液(P0013B)、BCA蛋白质分析试剂盒(P0010S)、BeyoECL Plus(P0018S)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒(PT516)和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )ELISA试剂盒(PI303)均购自碧云天生物技术研究。兔单克隆抗体一抗Bax(ab32503)、Bcl2(ab32124)、cleaved caspase-3(ab32042)、NF- $\kappa$ B p65(ab288751)、Lamin B1(ab194109)和 $\beta$ -actin(ab8226)以及山羊抗兔IgG H&L(HRP)(ab6721)和山羊抗兔IgG H&L二抗(HRP)(ab6721)均购自英国Abcam公司。小鼠单克隆抗体一抗VEGF(sc-7269)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。超氧化物歧化酶(SOD)(A001-3-2)和丙二醛(MDA)(A003-1-2)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

**1.1.2 实验动物** 雄性无特定病原体(SPF)级Sprague-Dawley(SD)大鼠(体重280~330 g;8周龄)由陕西省人民医院提供【SYXK(陕)2016-006】,将大鼠在恒定温度(23-24 $^{\circ}$ C)、湿度(50-55%)和12 h光照/黑暗循环的环境中饲养,可自由获取食物和水。

### 1.2 方法

**1.2.1 脑小血管病大鼠模型的制备** 按照文献所述同种系微栓子体外注入法构建CSVD大鼠模型<sup>[17,18]</sup>。首先制备自体血栓:采集大鼠左心室血样,80 $^{\circ}$ C干燥为血凝块,研磨并过200  $\mu$ m筛制成同种系微栓子。将同种系微栓子用生理盐水配成10 g/L的混悬液。1.5%戊巴比妥钠(3 mg/kg)麻醉大鼠,仰卧位固定,颈部正中切口,暴露左侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA),夹闭CCA近心端,结扎ECA远心端,将0.3 mL混悬液由ECA近心端逆行注入ICA。立即打开CCA恢复血流并结扎ECA近心端,缝合切口。建模成功标准:大鼠出现痫样发作、肢体瘫痪及异常运动。12只大鼠进行假手术,手术操作相同,但不注入微栓子,仅注入0.3 mL生理盐水。48只建模的大鼠共有43只建模成功,2只术中死亡,2只术后24 h内死亡,1只未建模成功。12只假手术组大鼠1只于术中死亡。

**1.2.2 动物分组及治疗** 11只进行假手术的大鼠作为假手术组(Sham组,n=11)。43只CSVD建模成功的大鼠随机分为CSVD模型组(CSVD,n=10)、低剂量田蓯苣组(L-Til组,n=11)、中剂量田蓯苣组(M-Til组,n=11)和高剂量田蓯苣组(H-Til组,n=11)。将田蓯苣用0.5%羧甲基纤维素钠配置成不同浓度的田蓯苣溶液。Sham组和CSVD组大鼠灌胃2 mL的0.5%羧甲基纤维素,L-Til组、M-Til组和H-Til组大鼠分别灌胃2 mL的5 mg/kg/d、10 mg/kg/d和20 mg/kg/d的田蓯苣溶液。各组大鼠均灌胃4周。田蓯苣使用浓度参考文献<sup>[19-21]</sup>所述浓度进行设置,目前报道的文献中田蓯苣在大鼠中的应用浓度范围为1.5~40 mg/kg/d。

**1.2.3 Morris水迷宫实验** 按照文献<sup>[18]</sup>所述方法,通过Morris水迷宫实验评价大鼠的认知功能。Morris水迷宫是一个圆形水池,直径180 cm、高42 cm,水深35 cm,水温为22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C。圆形水池设置4个象限,第一象限中心放置直径12 cm的逃逸平台,平台距水面2 cm。定位航行实验中,通过北京智鼠多宝DB001 Morris水迷宫视频分析系统记录大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)。空间探索实验中,记录大鼠在1 min内的穿越平台次数。

**1.2.4 海马组织HE染色** 实验结束后,取各组大鼠海马组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切片至5  $\mu$ m厚。切片行HE染色。每个切片随机选择5个视野进行观察。

**1.2.5 海马组织TUNEL染色** 将各组海马组织切片70 $^{\circ}$ C烤片2 h,脱蜡、水化后在蛋白酶K溶液中37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。然后与TUNEL工作液37 $^{\circ}$ C孵育1 h。DAPI染色15 min后,在荧光显微镜下观察切片并计算TUNEL阳性率。

**1.2.6 海马组织尼氏染色** 将各组海马组织切片70 $^{\circ}$ C烤片2 h,脱蜡、水化后用尼氏体染色液染色5 min。95%乙醇分色5 min。然后脱水、透明、封片、光学显微镜下观察切片,用Image-Pro Plus 6.0软件分析尼氏体光密度值。

**1.2.7 海马组织免疫组化染色** 海马组织石蜡切片脱蜡,3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡10 min进行抗原修复,5%牛血清白蛋白37 $^{\circ}$ C封闭30 min,将切片分与兔单克隆抗体一抗Bax、Bcl2和cleaved

caspase-3 在 4℃ 下过夜孵育,一抗稀释度均为 1:200。然后将切片与山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(稀释度为 1:200)在 37℃ 孵育 30 min。然后,加入 SABC 复合体在 37℃ 孵育 30 min,用 DAB 显色、苏木精复染、脱水、封片。最后,用奥林巴斯 BX40 显微镜观察载玻片。胞膜/胞浆呈棕色颗粒染色的细胞为阳性。每个切片随机选择 5 个视野,计算阳性细胞百分率。

**1.2.8 海马组织 Western blot 检测分析** 收集各组大鼠海马组织,用预冷 RIPA 裂解缓冲液裂解组织。用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度。10% SDS-PAGE 分离等量蛋白质(25 μg)。然后,将其转移到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶封闭膜 2 小时,然后在 4℃ 下与兔单克隆抗体一抗 Bax(稀释度为 1:1000)、Bcl2(稀释度为 1:1000)、cleaved caspase-3(稀释度为 1:1000)、NF-κB p65(稀释度为 1:5000)、Lamin B1(稀释度为 1:2000)和 β-actin(稀释度为 1:2000)以及小鼠单克隆抗体一抗 VEGF(稀释度为 1:2000)孵育过夜。然后将膜与山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(稀释度为 1:3000)室温孵育 1 h。使用 BeyoECL Plus 孵育膜 3 min,并用 ImageJ 软件对蛋白质条带进行分析。Lamin B1 和 β-actin 分别作为细胞核蛋白和细胞质蛋白内参。

**1.2.9 血清炎症和氧化应激指标测定** 从每只大鼠眼眶静脉丛采血 0.5 mL,并在 4℃ 下以 2000 r/min 离心 10 min 后获得血清。使用相应试剂盒测定血清炎症指标(TNF-α 和 IL-1β)和氧化应激指标(SOD 和 MDA)。

### 1.3 统计学分析

本研究使用 SPSS21.0 软件分析数据,结果均以平均值±标准差表示。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验数据的正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 田蓟苷可恢复 CSVD 大鼠的认知缺陷

Morris 水迷宫实验中,各组大鼠的逃避潜伏期和穿越平台次数差异有统计学意义。与 Sham 组比较,CSVD 组大鼠的逃避潜伏期延长,穿越平台次数减少( $P<0.05$ )。与 CSVD 组比较,L-Til 组、M-Til 组和 H-Til 组的大鼠逃避潜伏期均缩短,穿越平台次数均增加( $P<0.05$ )。见图 1。

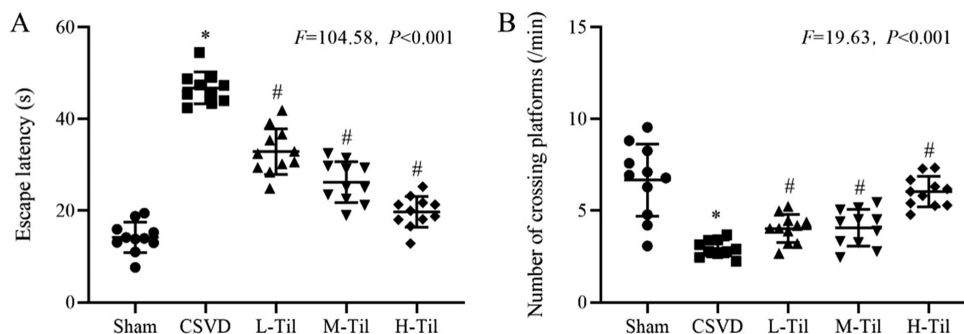


图 1 各组大鼠的 Morris 水迷宫实验

Fig.1 Morris water maze test of rats in each group

Note: A: escape latency; B: times of crossing the platform; compared with sham group, \* $P<0.05$ ; compared with CSVD group, # $P<0.05$ .

### 2.2 田蓟苷可减少 CSVD 大鼠海马神经细胞凋亡

HE 染色结果显示,Sham 组大鼠海马区神经细胞形态正常。CSVD 组大鼠海马区出现神经细胞神经核固缩、变形、空泡化和肿胀。L-Til 组、M-Til 组和 H-Til 组大鼠的海马区神经细胞形态较 CSVD 组逐渐好转。见图 2A。

TUNEL 染色和尼氏染色结果显示,各组大鼠海马组织 TUNEL 阳性率和尼氏体光密度差异有统计学意义( $P<0.001$ )。与 Sham 组比较,CSVD 组大鼠海马组织的 TUNEL 阳性率增加,尼氏体光密度降低( $P<0.05$ )。与 CSVD 组比较,L-Til 组、M-Til 组和 H-Til 组大鼠海马组织的 TUNEL 阳性率降低,尼氏体光密度增加( $P<0.05$ )。见图 2。

免疫组化染色和 Western blot 结果均显示,各组的 Bax、Bcl2 和 cleaved caspase-3 的阳性率和蛋白相对表达量差异均有统计学意义( $P<0.001$ )。与 Sham 组比较,CSVD 组大鼠海马组织中 Bax 和 cleaved caspase-3 的表达水平升高,Bcl2 水平降低( $P<0.05$ )。与 CSVD 组比较,L-Til 组、M-Til 组和 H-Til 组大鼠海马组织中 Bax 和 cleaved caspase-3 的表达水平降低,Bcl2 水平升高( $P<0.05$ )。见表 1、图 3 和图 4。

### 2.3 田蓟苷可减轻 CSVD 大鼠的炎症和氧化应激

ELISA 测定结果显示,各组大鼠的血清炎症指标(TNF-α 和 IL-1β)和氧化应激指标(SOD 和 MDA)差异均有统计学意义( $P<0.001$ )。与 Sham 组比较,CSVD 组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 MDA 水平升高,SOD 水平降低( $P<0.05$ )。与 CSVD 组比较,L-Til 组、M-Til 组和 H-Til 组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 MDA 水平降低,SOD 水平升高( $P<0.05$ )。见表 2。

### 2.4 田蓟苷对 CSVD 大鼠海马组织中 VEGF 和 NF-κ B 蛋白表达的影响

各组大鼠海马组织中细胞核 NF-κB p65 和细胞质 VEGF 蛋白表达水平差异有统计学意义( $F=360.318, P<0.001; F=444.556, P<0.001$ )。与 Sham 组比较,CSVD 组大鼠海马组织中细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平升高,细胞质 VEGF 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。与 CSVD 组比较,L-Til 组、M-Til 组和 H-Til 组大鼠海马组织中细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平降低,而细胞质 VEGF 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。见图 5。

## 3 讨论

随着中国人口老龄化,CSVD 因其高发病率、复发率、致残率和死亡率已经成为当今社会的一种主要经济负担。CSVD 与

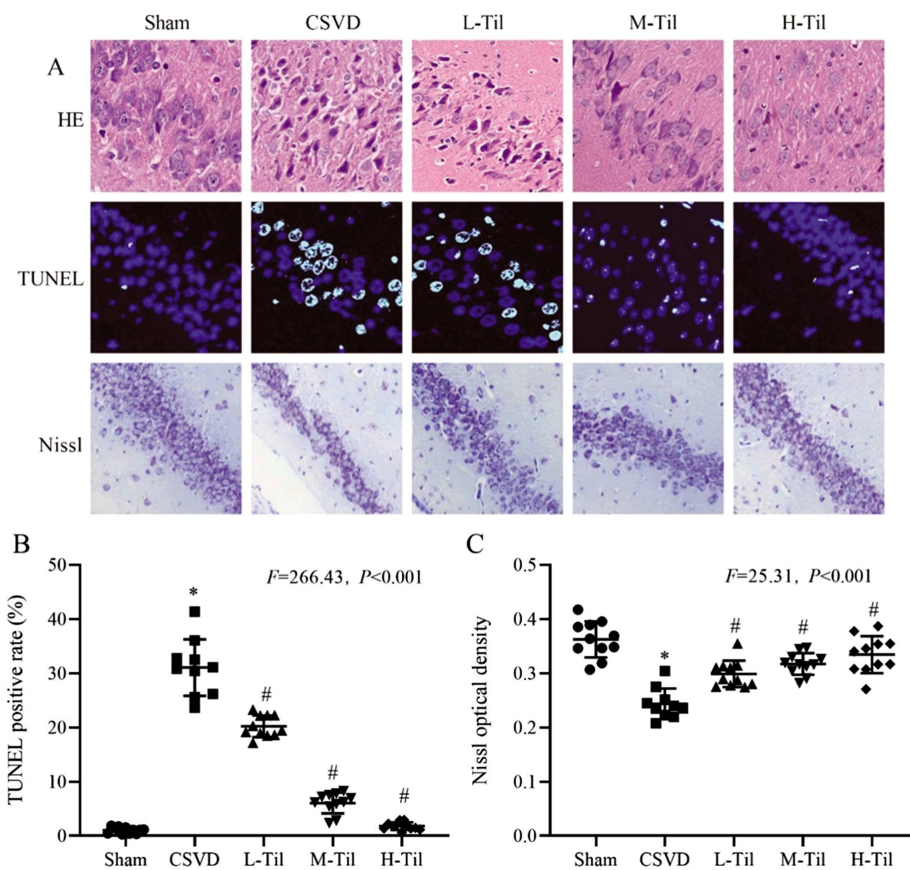


图2 各组大鼠海马组织 HE 染色、TUNEL 染色和尼氏染色

Fig.2 HE staining, TUNEL staining and Nissl staining of hippocampal tissue in each group

Note: A: staining image, magnification:  $\times 400$ ; B: TUNEL positive rate;

C: Nissl body optical density; compared with sham group, \* $P<0.05$ ; compared with CSVD group, # $P<0.05$ .

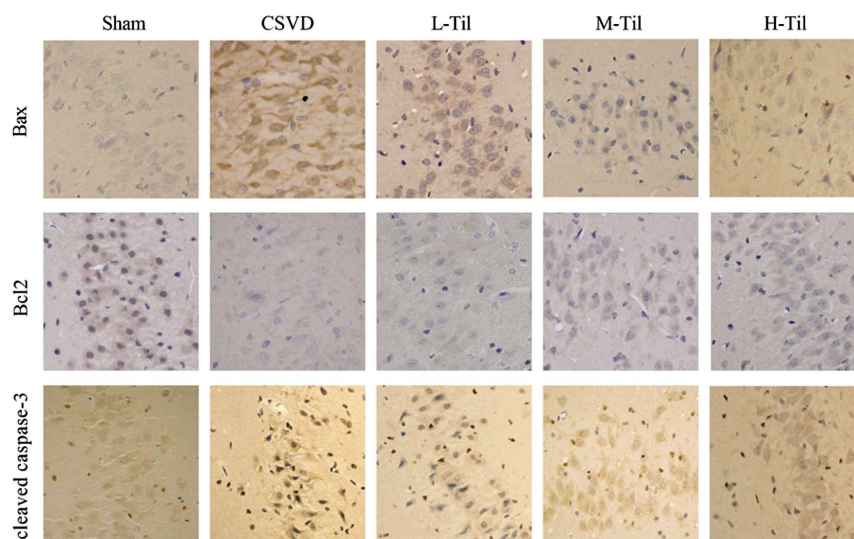


图3 各组大鼠海马组织 Bax、Bcl2 和 cleaved caspase-3 的免疫组化染色

Fig.3 Immunohistochemical staining of Bax, Bcl2 and cleaved caspase-3 in hippocampus of rats in each group

Note: Magnification:  $\times 400$

许多疾病的发生密切相关,包括中风、认知和情感障碍、身体机能退化等<sup>[22]</sup>,目前,与 CSVD 相关的发病率也在增加<sup>[23]</sup>。本研究中,Morris 水迷宫实验、HE 染色、TUNEL 染色和尼氏染色结果证实田蓯苣可以剂量依赖性方式减轻 CSVD 大鼠的认知功能障碍、抑制神经细胞凋亡并减轻海马损伤。在其他研究中,Li

等<sup>[24]</sup>研究显示,田蓯苣抑制了 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导的多巴胺能神经元 MES23.5 细胞系的凋亡。Jiang 等<sup>[12]</sup>报道,田蓯苣恢复了氧-葡萄糖剥夺诱导的神经细胞中的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例,从而减轻了线粒体功能障碍并抑制了神经细胞凋亡。结合前人研究结果可知,田蓯苣可能对于多种神经

表 1 各组大鼠海马组织 Bax、Bcl2 和 cleaved caspase-3 的免疫组化染色阳性率检测

Table 1 Detection of positive rates of immunohistochemical staining for Bax, Bcl2 and cleaved caspase-3 in hippocampus of rats in each group

| Groups      | Bax          | Bcl2         | cleaved caspase-3 |
|-------------|--------------|--------------|-------------------|
| Sham group  | 5.10±0.64    | 18.05±1.99   | 5.53±1.25         |
| CSVD group  | 17.51±1.86 * | 4.80±0.64 *  | 21.13±3.58 *      |
| L-Til group | 11.44±1.84 # | 7.96±1.99 #  | 13.17±2.21 #      |
| M-Til group | 8.60±1.61 #  | 11.43±2.23 # | 7.71±2.71 #       |
| H-Til group | 5.77±1.16 #  | 16.94±3.24 # | 6.16±1.83 #       |
| <i>F</i>    | 119.811      | 25.306       | 75.716            |
| <i>P</i>    | <0.001       | <0.001       | <0.001            |

Note: compared with Sham group, \* $P<0.05$ ; compared with CSVD group, # $P<0.05$ .

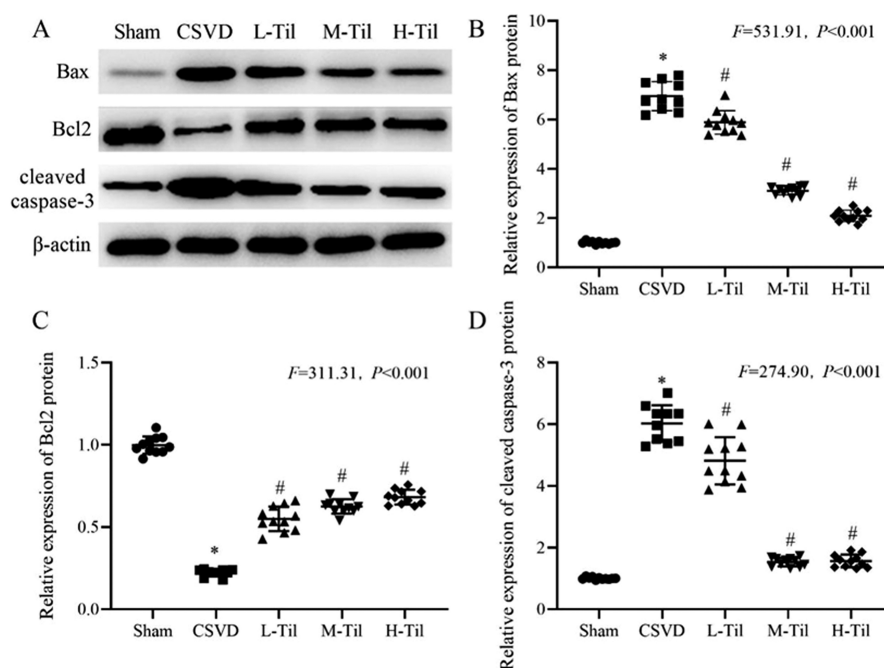


图 4 各组大鼠海马组织 Bax、Bcl2 和 cleaved caspase-3 的 Western blot 检测结果

Fig.4 Western blot detection results of Bax, Bcl2 and cleaved caspase-3 in hippocampus of rats in each group

Note: A: representative bands of Western blot; B-D: relative protein expression levels of Bax, Bcl2 and cleaved caspase-3; compared with sham group, \* $P<0.05$ ; compared with CSVD group, # $P<0.05$ .

表 2 各组大鼠血清炎症指标(TNF-α 和 IL-1β)和氧化应激指标(SOD 和 MDA)水平

Table 2 Serum inflammatory indexes (TNF-α and IL-1β) and oxidative stress indexes (SOD and MDA) levels of rats in each group

| Groups      | TNF-α (ng/L)   | IL-1β (ng/L)   | SOD (U/g)      | MDA (mmol/g) |
|-------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| Sham group  | 321.97±19.32   | 624.65±37.48   | 263.76±15.83   | 2.34±0.14    |
| CSVD group  | 433.87±52.06 * | 811.65±97.40 * | 187.07±22.45 * | 11.05±1.33 * |
| L-Til group | 375.65±45.08 # | 709.66±85.16 # | 213.65±25.64 # | 7.65±0.92 #  |
| M-Til group | 339.86±37.38 # | 644.75±70.92 # | 222.08±24.43 # | 6.35±0.70 #  |
| H-Til group | 332.04±26.56 # | 637.09±50.97 # | 231.09±18.49 # | 4.77±0.38 #  |
| <i>F</i>    | 15.20          | 12.34          | 17.47          | 175.82       |
| <i>P</i>    | <0.001         | <0.001         | <0.001         | <0.001       |

Note: compared with sham group, \* $P<0.05$ ; compared with CSVD group, # $P<0.05$ .

损伤具有保护和治疗作用,尤其是对于 CSVD。

CSVD 对大脑造成损害的机制很复杂,多种危险因素可导致 CSVD 的发生,CSVD 发生后,脑内氧化 - 抗氧化失衡及炎

症的加剧可进一步诱导神经细胞凋亡并破坏血脑屏障 [25]。因此,抗氧化和抗炎治疗是 CSVD 的经典治疗途径。田蓟苷的抗氧化和抗炎作用已经被大量报道[6-9]。本研究也显示,田蓟苷剂

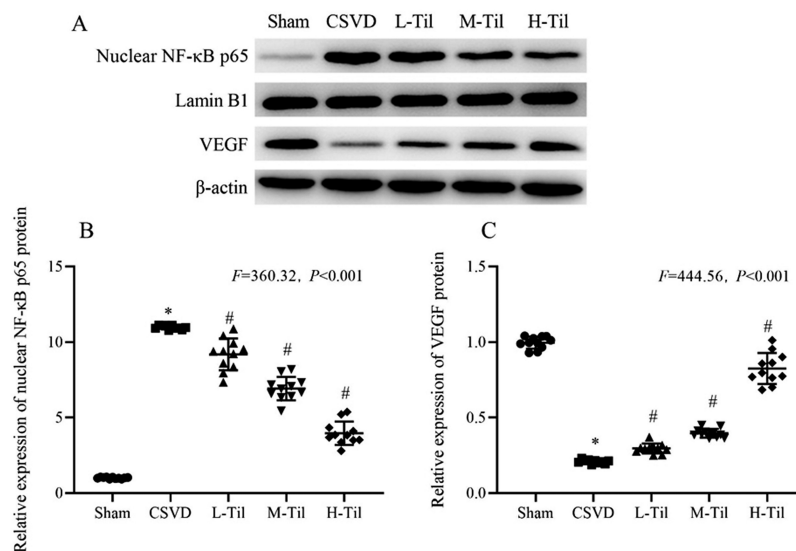


图 5 各组大鼠海马组织 NF-κB p65 和 VEGF 的 Western blot 检测结果

Fig.5 Western blot detection results of NF-κB p65 and VEGF in the hippocampus of rats in each group

Note: A: representative bands of Western blot; B: relative protein expression of NF-κB p65 in nucleus;

C: relative protein expression of VEGF; compared with sham group, \* $P<0.05$ ; compared with CSVD group, # $P<0.05$ .

量依赖性地抑制了 CSVD 大鼠血清炎症指标 (TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ) 和氧化损伤指标 (MDA) 的水平, 并升高了抗氧化酶 (SOD) 的水平。此外, 据报道, 田蓯苣降低了 MPP<sup>+</sup> 诱导的多巴胺能神经元 MES23.5 细胞系中炎症细胞因子 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  以及氧化应激相关酶锰超氧化物歧化酶和 CAT 的水平<sup>[24]</sup>。Jiang 等<sup>[21]</sup>报道, 田蓯苣改善了血管性痴呆大鼠的空间认知障碍和神经变性, 抑制了氧化应激和炎症。结合上述报道可知, 田蓯苣的脑保护作用与其抗氧化和抗炎作用密切相关。

VEGF 重要的神经营养和保护因子, 可促进新生血管的生成和血管重塑<sup>[26]</sup>。VEGF 对中枢神经系统的影响一直是学生研究的重点。先前的一项研究表明, CSVD 大鼠 VEGF 表达的变化趋势与细胞凋亡的趋势相反<sup>[14]</sup>。这表明当 VEGF 表达升高时, 细胞凋亡水平降低, 相反, 当 VEGF 减少时, 细胞凋亡会增加<sup>[27]</sup>。多项研究报道了提高 VEGF 的表达水平可降低 CSVD 大鼠的神经损伤并减轻认知功能障碍<sup>[28,29]</sup>。本研究也显示, 田蓯苣剂量依赖性地提高了 CSVD 大鼠海马区 VEGF 的表达, 从而促进了血管生成。其他文献也报道田蓯苣可调节血管生成相关的细胞信号转导途径<sup>[6]</sup>。

NF- $\kappa$ B 是与 CSVD 发病有关的经典促炎信号通路, NF- $\kappa$ B 被激活后发生核转位, 其在细胞核中调节多项下游促炎基因的表达, 从而引起过度的炎症反应<sup>[15,16]</sup>。本研究显示, 田蓯苣剂量依赖性地抑制了 CSVD 大鼠海马区 NF- $\kappa$ B p65 的核转位, 从而抑制了该通路介导的炎症反应。其他文献报道, 田蓯苣通过减弱 CaMKII 依赖性线粒体介导的细胞凋亡和 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路对缺血性脑损伤发挥神经保护作用<sup>[12]</sup>。田蓯苣通过 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路改善血管性痴呆大鼠的认知功能障碍和神经元损伤<sup>[21]</sup>。因此, 田蓯苣对多种神经炎症的抑制作用是通过调节 NF- $\kappa$ B 信号通路来实现的。

综上所述, 本研究首次证明田蓯苣可减轻 CSVD 大鼠的认知功能障碍并抑制神经细胞凋亡, 田蓯苣对 CSVD 的治疗机制部分通过减少炎症和氧化应激、促进 VEGF 的表达和抑制

NF- $\kappa$ B 信号通路来实现的。这些结果说明田蓯苣可能是治疗 CSVD 的一种潜在天然药物。

#### 参考文献 (References)

- [1] Kwon HM, Lynn MJ, Turan TN, et al. Frequency, risk factors, and outcome of coexistent small vessel disease and intracranial arterial stenosis: results from the stenting and aggressive medical management for preventing recurrent stroke in intracranial stenosis (SAMMPRIS) trial[J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(1): 36-42
- [2] Chojdak-Lukasiewicz J, Dziadkowiak E, Zimny A, et al. Cerebral small vessel disease: A review [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2021, 30(3): 349-356
- [3] Li T, Huang Y, Cai W, et al. Age-related cerebral small vessel disease and inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 932
- [4] Deepa P, Bae HJ, Park HB, et al. Dracocephalum moldavica attenuates scopolamine-induced cognitive impairment through activation of hippocampal ERK-CREB signaling in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112651
- [5] Jin M, Yu H, Jin X, et al. Dracocephalum moldavica L. extracts protect H9c2 cardiomyocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and oxidative stress[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8379358
- [6] Akanda MR, Uddin MN, Kim IS, et al. The biological and pharmacological roles of polyphenol flavonoid tilianin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 842: 291-297
- [7] Wang Y, Wang Y, Wang X, et al. Tilianin-loaded reactive oxygen species-scavenging nano-micelles protect H9c2 cardiomyocyte against hypoxia/reoxygenation-induced injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018, 72(1): 32-39
- [8] Yao J, Li Y, Jin Y, et al. Synergistic cardioprotection by tilianin and syringin in diabetic cardiomyopathy involves interaction of TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 and PGC1 $\alpha$ /SIRT3 pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107728
- [9] Zhang R, Lu M, Zhang S, et al. Renoprotective effects of Tilianin in diabetic rats through modulation of oxidative stress via Nrf2-Keap1



- pathway and inflammation via TLR4/MAPK/NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106967
- [10] Wang Y, Yuan Y, Wang X, et al. Tiliandin post-conditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial protection and inhibition of apoptosis [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 4490-4499
- [11] Yuan Y, Cao W, Hong Y, et al. Tiliandin pretreatment prevents myocardial ischemia-reperfusion injury via preservation of mitochondrial function in rat heart [J]. *Phytomedicine*, 2017, 34: 106-114
- [12] Jiang H, Fang J, Xing J, et al. Tiliandin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 21(6): 233-245
- [13] Bridges LR, Andoh J, Lawrence AJ, et al. Blood-brain barrier dysfunction and cerebral small vessel disease (arteriolosclerosis) in brains of older people [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(11): 1026-1033
- [14] Zampetti A, Gnarr M, Borsini W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-a) in Fabry disease: association with cutaneous and systemic manifestations with vascular involvement [J]. *Cytokine*, 2013, 61(3): 933-939
- [15] Tang S, Yan LR, Ma ZG, et al. Influences of the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway on memory function and inflammatory factors in rats with cerebral small vessel disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6264-6271
- [16] Zhang Y, Wu R, Gu C, et al. A study on role and mechanism of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in cognitive impairment induced by cerebral small vascular disease [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2019, 72(2): 201-210
- [17] 肖云月, 徐艳, 魏欣, 等. 粒细胞集落刺激因子对脑小血管病大鼠神经保护机制的研究 [J]. *中国临床神经科学*, 2016, 24(1): 1-6
- [18] 刘恒, 孙凡, 徐倩倩, 等. 黄芩苷对脑小血管病模型大鼠认知功能及脑内血管内皮生长因子和内皮抑素表达水平的影响 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2019, 45(5): 1080-1085
- [19] Guo X, Cao W, Yao J, et al. Cardioprotective effects of tiliandin in rat myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3): 2227-2233
- [20] Zeng C, Jiang W, Zheng R, et al. Cardioprotection of tiliandin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: Role of the apoptotic signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193845
- [21] Jiang H, Ashraf GM, Liu M, et al. Tiliandin ameliorates cognitive dysfunction and neuronal damage in rats with vascular dementia via p-CaMKII/ERK/CREB and ox-CaMKII-dependent MAPK/NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6673967-667384
- [22] Arba F, Quinn T, Hankey GJ, et al. Cerebral small vessel disease, medial temporal lobe atrophy and cognitive status in patients with ischaemic stroke and transient ischaemic attack [J]. *Eur J Neurol*, 2017, 24(2): 276-282
- [23] Pavlovic AM, Pekmezovic T, Tomic G, et al. Baseline predictors of cognitive decline in patients with cerebral small vessel disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 42(3): 37-43
- [24] Li J, Xu S. Tiliandin attenuates MPP (+)-induced oxidative stress and apoptosis of dopaminergic neurons in a cellular model of Parkinson's disease [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(4): 293-299
- [25] Jiang S, Ma X, Chen Y, et al. Effects of ginkgo diterpene lactone on brain inflammation and oxidative stress in rats with cognitive impairment of cerebral small vessel disease [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(6): 6382-6390
- [26] Ahmed-Jushuf F, Jiwa NS, Arwani AS, et al. Age-dependent expression of VEGFR2 in deep brain arteries in small vessel disease, CADASIL, and healthy brains [J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 42: 110-115
- [27] Lee SC, Lee KY, Kim YJ, et al. Serum VEGF levels in acute ischaemic strokes are correlated with long-term prognosis [J]. *Eur J Neurol*, 2010, 17(1): 45-51
- [28] 渠泽平, 杨丙飞, 格日乐图, 等. 远隔缺血预适应对脑小血管病患者认知功能障碍及血管内皮生长因子表达水平的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2021, 24(8): 675-679
- [29] 王茹, 刘楠, 赵弘轶, 等. 有氧运动对脑小血管病大鼠血脑屏障损伤的改善作用 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(5): 417-421