

基于 MAPK 信号通路探讨榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道屏障及肠道菌群的影响

黄月玥^{1,2}, 付 蕾¹, 王 萌¹, 韦熔煌¹, 黎咏怡², 姚 春^{1*}

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 榄香素对大鼠中动脉阻塞/再灌注 (MCAO/R) 大鼠肠道屏障及肠道菌群的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和榄香素低、中、高剂量组 (2.5、5、10 mg/kg), 除假手术组外均建立 MCAO/R 模型, 每组 12 只。给药 7 d 后, 评估各组大鼠神经功能缺损评分和脑梗死面积; 免疫荧光法检测脑组织 Iba1+/CD16+、Iba1+/CD206+ 的共表达; ELISA 法检测脑组织 TNF- α 、IL-17、IL-6、IFN- γ 水平; 蛋白免疫印迹法检测脑组织 MAPK 信号通路蛋白 (p-SAPK/JNK、p-ERK1/2、p-p38), 脑及结肠组织紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin) 表达。16S rRNA 测序分析检测大鼠肠道菌群组成及含量变化。**结果** 与模型组比较, 榄香素高剂量组神经功能缺损评分降低 ($P<0.01$), 脑梗死面积减少 ($P<0.01$), 脑组织 Iba-1+/CD16+ 阳性细胞数量降低 ($P<0.01$), Iba-1+/CD206+ 阳性细胞数量增加 ($P<0.01$), TNF- α 、L-17、IL-6、IFN- γ 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), p-SAPK/JNK、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 脑及结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。16S rRNA 测序的 Beta 多样性分析显示, 模型组大鼠肠道菌群分布偏离假手术组; 榄香素高剂量组肠道菌群分布趋向于假手术组。Alpha 多样性分析显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠大鼠肠道菌群 Shannon、ACE、Chao 指数均降低 ($P<0.05$); 榄香素高剂量组大鼠肠道菌群 Chao 指数升高 ($P<0.05$)。在科、纲、属水平上, 与假手术组比较, 模型组韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、芽孢杆菌纲 (Bacilli)、噬菌体 (Phascolarctobacterium) 相对丰度均升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 榄香素高剂量组上述菌群相对丰度均降低 ($P<0.05$)。**结论** 榄香素具有改善 MCAO/R 大鼠神经功能缺损, 减少脑梗死面积, 降低炎症反应, 改善肠道屏障, 恢复肠道菌群的作用, 其作用可能与调控 MAPK 信号通路表达有关。

关键词: 榄香素; 脑缺血再灌注; MAPK 信号通路; 16S rRNA 测序; 肠道菌群; 肠道屏障

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)08-2759-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.045

缺血性卒中占卒中病例的 87%, 其高死亡率和致残率与脑缺血后神经元的损伤程度密切相关^[1-2]。持续缺血与缺血再灌注损伤引发缺血核心区域的神经元死亡^[3]。溶栓治疗是目前治疗缺血性卒中最有效的方案, 但其治疗时间窗较窄且成功率低^[4]。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路是由一系列蛋白激酶和 MAPK 磷酸酶调节的通路, 调节机体应对外部刺激^[5]。MAPK 信号通路影响缺血性卒中的发病与病情发展, 参与炎症反应^[6]。炎症反应是缺血性卒中的关键病理机制, 能引发中枢神经系统损伤^[7]。缺血性卒中可通过 MAPK 信号通路介导肠道病理反应^[8]。MAPK 通路蛋白磷酸化导致炎性因子的释放, 破

坏肠道紧密连接结构并增加肠黏膜通透性, 影响肠道菌群稳态^[9]。

石菖蒲, 味辛、苦, 性温, 具有开窍醒神、益智消痰、活血祛瘀及理气止痛的功效, 对于脑卒中的防治具有显著疗效^[10]。石菖蒲挥发油作为石菖蒲的主要化学成分, 是评价石菖蒲质量的重要指标^[11]。石菖蒲挥发油可以促进神经元分化并具有神经保护作用^[12]。课题组前期研究发现, 石菖蒲挥发油中榄香素相对含量为 27.89%^[13]。而目前对于榄香素用于治疗脑卒中的机制研究尚无报道。因此, 本实验通过建立大鼠中动脉阻塞/再灌注 (MCAO/R) 大鼠模型, 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道屏障及肠道菌群的影响。

收稿日期: 2024-11-07

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302); 第七批自治区创新驱动发展专项资金项目 (桂科计字 [2022] 96 号); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (中医内科学) (zyyzdxk-2023166); 姚春桂派中医大师传承工作室项目 (GZY2024002); 广西中医药通阳散结法重点研究室项目 (2023 年)

作者简介: 黄月玥 (1996—), 女, 博士生, 从事中医药防治脑病的研究。Tel: 18377113758, E-mail: 2423165197@qq.com
* **通信作者:** 姚 春 (1965—), 女, 博士, 教授, 从事中医药防治疑难重症的研究。Tel: 17776698872, E-mail: gxtemuy@hotmail.com

1 材料

1.1 实验动物 60 只成年雄性 SD 大鼠，体质量 250 ~ 270 g，购买并饲养于广州中医药大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK（粤）2018-0034，实验动物使用许可证号 SYXK（粤）2018-0001]，环境温度 25 ℃，12 h/12 h 光/暗循环，给予足够且洁净的水和食物。动物实验规程遵循要求，并经广州中医药大学动物伦理委员会审批通过（伦理号 20200727002）。

1.2 药物与试剂 榄香素（纯度 98%，成都瑞芬思生物科技有限公司，批号 CAS487-11-6）。2，3，5-氯化三苯基四氮唑（2，3，5-Triphenyltetrazolium chloride，TTC）染液（美国 Sigma-Aldrich 公司，批号 T8877）；荧光山羊抗兔 488 二抗、荧光山羊抗鼠 568 二抗（美国 Life Technologies 公司，批号 A11034、A11031）；荧光兔抗山羊 594 二抗、离子化钙结合适配分子 1（ionized calcium-binding adapter molecule 1，Iba1）抗体、p38 MAPK 抗体、p-p38（英国 Abcam 公司，批号 ab150144、ab178847、ab170099、ab195049）；HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记山羊抗鼠二抗、应激活化蛋白激酶/氨基末端激酶（stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase，SAPK/JNK）、磷酸化 SAPK/JNK（p-SAPK/JNK）、Erk1/2、磷酸化 p44/42 MAPK（p-Erk1/2）抗体（美国 CST 公司，批号 7074、7076、9552、9255、4295、4370）；CD16/CD32 抗体（美国 BD 公司，批号 553142）；CD206 抗体（美国 R&D 公司，批号 WFT0320011）；肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor- α ，TNF- α ）、白细胞介素（interleukin）-17、IL-6、 γ 干扰素（interferon- γ ，IFN- γ ）ELISA 试剂盒（上海江莱生物科技有限公司，批号 JL13202、JL20879、JL20896、JL13241）；闭锁小带蛋白（zonula occludens-1，ZO-1）抗体（美国 Invitrogen 公司，批号 40-2200）；闭合蛋白（Occludin）抗体（美国 Santa Cruz 公司，批号 sc-133256）。1.3 仪器 CM1850 冰冻切片机、SP8 Falcon 激光共聚焦显微镜（德国 Leica 公司）；MULTISKAN FC 型酶标仪（美国赛默飞公司）；电泳仪、垂直板电泳槽、免疫印迹转膜设备、ChemiDoc™ XRS+System 化学发光成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；凝胶成像系统 Image Lab（德国 Menlo System 公司）；Illumina HiSeq 测序仪（美国 Illumina 公司）。

2 方法

2.1 模型建立、分组及给药 大鼠用异氟烷进行麻醉，以 2% 异氟烷维持麻醉，处以仰卧位，消毒后在颈部正中开口，钝性分离分离出颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉，并在远心端进行结扎并在距离颈外动脉距离颈总动脉分叉处剪一小口，将线栓从剪口位置推入，经颈内动脉插入指定位置后，2 h 后，移除线栓进行再灌注后，进行皮肤的缝合。假手术组大鼠不予进行插栓。

MCAO/R 术后造模成功的大鼠随机分为模型组和榄香素低、中、高剂量组。榄香素低、中、高剂量组在再灌注 24 h 后分别灌胃给予榄香素 2.5、5、10 mg/kg（榄香素用 2760

3% 吐温生理盐水配制，剂量根据课题组前期研究结果确定），假手术组和模型组灌胃给予等量 3% 吐温生理盐水，各组均连续灌胃给药 7 d。

2.2 改良神经功能缺失评分（mNSS） mNSS 评分可用于评价 MCAO/R 大鼠运动感觉、反射丧失、不正常运动和平衡木行走情况。运动感觉实验包括提尾实验、平地行走实验、位置觉实验、本体放置实验，共 5 分；反射丧失和不正常运动实验包括耳廓、角膜、惊恐反射及肌张力障碍实验各 1 分；平衡木实验根据大鼠四肢垂落及平衡时长评价为 0~6 分，0 分视为正常，18 分视为神经功能缺失严重。给药 7 d 后，对各组大鼠进行评分，其中假手术组、模型组各 9 只，榄香素低、中剂量组各 7 只，榄香素高剂量组 12 只。

2.3 16S rRNA 测序分析大鼠肠道菌群变化 给药 7 d 后，各组随机采集 6 只大鼠粪便。取质量合格的基因组 DNA 样品 30 ng 及对应的融合引物配制聚合酶链式反应（PCR）体系，设置 PCR 反应参数进行 PCR 扩增，使用 Agencourt AMPure XP 磁珠对 PCR 扩增产物进行纯化。PCR 扩增结束后进行浓度检测。附上标签，完成建库。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库的片段范围及浓度进行检测。16S rRNA 基因测序的 V3-V4 区使用正向引物 338F（5'-ACTCTCACCGGAGGCAGCAG-3'），反向引物 806R（5'-GGACATCHVGGGTWTTCTAA-3'）进行聚合酶链反应扩增。每个聚合酶链反应样品的扩增子被标准化为等摩尔量，并在 Illumina MiSeq 平台进行测序。

2.4 TTC 染色检测脑梗死面积 给药 7 d 后，取假手术组 6 只、模型组 7 只、榄香素低剂量组 6 只、中剂量组 7 只、高剂量组 9 只大鼠的全脑放置于 -20 ℃ 冰箱冰冻保存，20 min 后取出，沿冠状面将其切成 5 片 2 mm 的薄片，用 TTC 染液 37 ℃ 避光染色 20 min，取出脑组织并拍照，采用 Image J 图像分析软件计算脑梗死面积。

2.5 免疫荧光法检测脑组织中 Iba1+/CD16+、Iba1+/CD206+ 的共表达 给药 7 d 后，麻醉灌流后取出完整脑组织，每组 3 只，用 4% 多聚甲醛固定，-30 ℃ 冰冻切片 20 μ m，经摊片、脱水、抗原修复、封闭、一抗孵育、二抗孵育、洗涤，最后用甘油封片，于荧光显微镜下观察并拍照。通过 Image J 软件分析平均荧光强度，并具体计算荧光强度值的均值。

2.6 ELISA 法检测脑组织中 TNF- α 、IL-17、IL-6、IFN- γ 水平 给药 7 d 后，取脑组织，每组 4 只，冰上研磨，超声粉碎组织，匀浆液 5 000 r/min 离心 10 min，取上清。按 ELISA 试剂盒说明书检测脑组织中 TNF- α 、IL-17、IL-6、IFN- γ 水平。

2.7 蛋白免疫印迹法检测脑组织各目的蛋白表达 给药 7 d 后，取梗死部位脑组织、结肠组织，每组 3 只。加入含蛋白酶抑制剂的组织裂解液，匀浆，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，提取总蛋白。制胶、上样、电泳、转膜后，5% 脱脂牛奶封闭 2 h，加一抗 SAPK/JNK（1：1 000）、p-

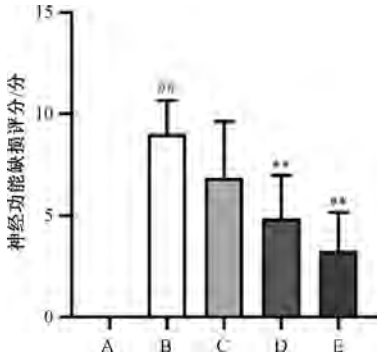
SAPK/JNK (1 : 1 000)、p44/42 MAPK (Erk1/2) (1 : 1 000)、p-Erk1/2 (1 : 1 000)、p38 (1 : 1 000)、p-p38 (1 : 1 000)、ZO-1 (1 : 1 000)、Occludin (1 : 500) 4 ℃ 孵育过夜,加相应二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 2 h。加 ECL 化学发光液进行显影,采集图片,使用 Image J 软件测量条带灰度值。

2.8 统计学分析 通过 Graphpad Prism 8 软件进行处理,实验数据以均数±标准误 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$) 表示,正态性检验采用 Shapiro-Wilk test 法,组间比较采用单因素方差分析,进一步多重比较采用 Tukey 法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 榄香素对 MCAO/R 大鼠神经缺损行为学评分的影响 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分升高 ($P<0.01$);与模型组比较,榄香素中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分降低 ($P<0.01$),见图 1。

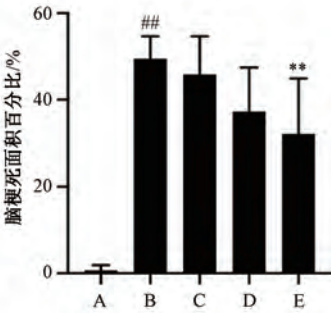
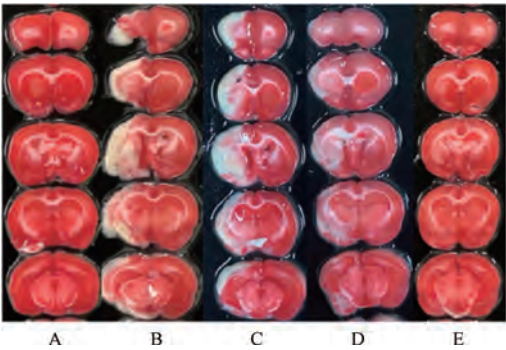
3.2 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑梗死面积的影响 与假手术组比较,模型组大鼠左侧局部缺血严重,左侧脑组织出



注: A 为假手术组, B 为模型组, C~E 分别为榄香素低、中、高剂量组。与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图 1 榄香素对 MCAO/R 大鼠神经功能的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=7\sim12$)

现明显的梗死灶,术后 7 d,大鼠脑梗死面增加 ($P<0.01$);与模型组比较,榄香素高剂量组大鼠脑梗死面积减少 ($P<0.01$),见图 2。



注: A 为假手术组, B 为模型组, C~E 分别为榄香素低、中、高剂量组。与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图 2 榄香素对 MCAO/R 大鼠梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6\sim9$)

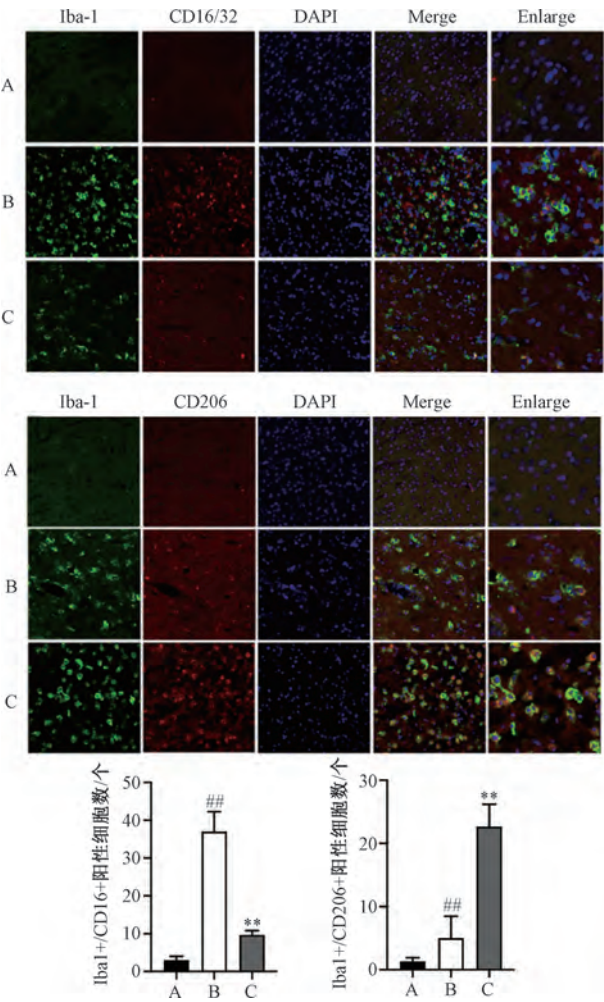
3.3 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑缺血半暗带 Iba1+/CD16+、Iba1+/CD206+共表达的影响 与假手术组比较,模型组 Iba1+/CD16+、Iba1+/CD206+阳性细胞数量均增加 ($P<0.01$);与模型组比较,榄香素高剂量组 Iba1+/CD16+的阳性细胞数量减少 ($P<0.01$), Iba1+/CD206+阳性细胞数量增加 ($P<0.01$),见图 3。以上结果表明,榄香素能够促进 MCAO/R 大鼠脑缺血半影区小胶质细胞 M2 的极化。

3.4 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑组织 TNF- α 、IL-17、IL-6、IFN- γ 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-17、IL-6、IFN- γ 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,榄香素中、高剂量组 TNF- α 、IL-17、IL-6、IFN- γ 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 4。

3.5 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑组织 MAPK 通路蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 p-SAPK/JNK、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,榄香素各剂量组 p-SAPK/JNK、p-p38 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),榄香素中高剂量组 p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P<0.05$),见图 5。

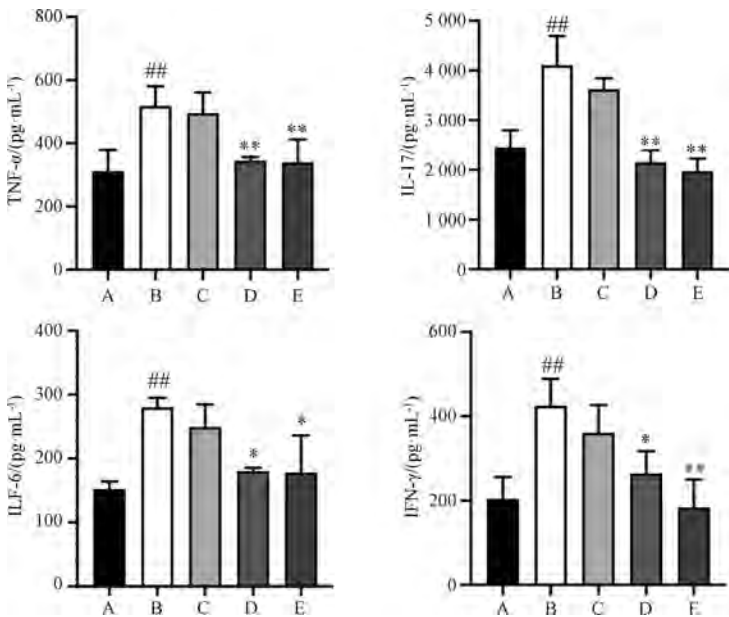
3.6 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑及结肠组织紧密连接蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑及结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,榄香素中、高剂量组大鼠脑组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达及结肠组织 ZO-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),榄香素高剂量组结肠组织 Occludin 蛋白表达升高 ($P<0.01$),见图 6~7。

3.7 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响 Beta多样性分析通过分析各类菌群在样品中的含量,计算出不同样本群落结构的相似性或差异性的多样性值,进而对不同菌群的结构进行比较。主坐标分析 (PCoA) 主成分 (PC) 分析显示,与假手术组比较,模型组大鼠样本聚类距离较远,表明 MCAO/R 造模会使大鼠肠道菌群结构出现明显改变;而榄香素组大鼠肠道菌群分布趋向于假手术组。非加权组平均法 (UPGMA) 聚类树分析显示,假手术组样本分支较聚集,模型组样本分支与假手术组距离较远,榄香素高剂量组样本分支更加接近假手术组,说明榄香素给药后 MCAO/R 大鼠肠道菌群结构具有向假手术组大



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为榄香素高剂量组。与假手术组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图 3 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑组织 Iba1+ /CD16+ 与 Iba1+ /CD206+ 免疫荧光共定位的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=3$)



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 分别为榄香素低、中、高剂量组。与假手术组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 4 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑组织 TNF-α、IL-17、IL-6、IFN-γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=4$)

鼠恢复的趋势。结果见图 8。

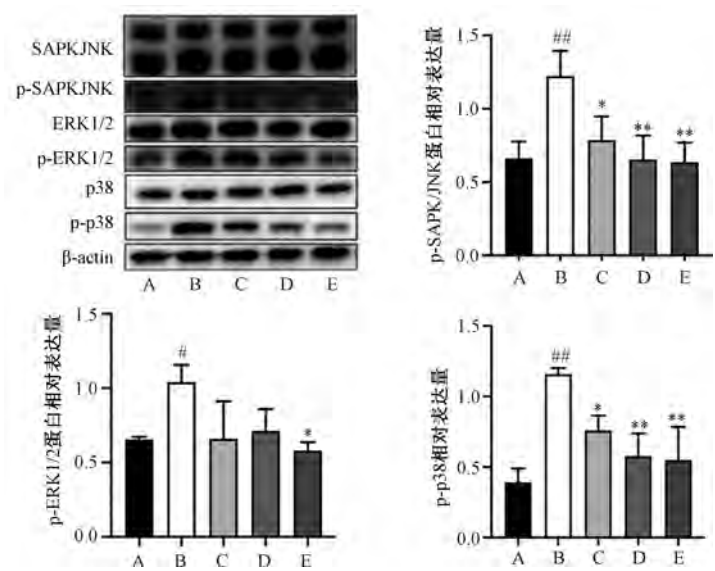
3.8 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响 Alpha 多样性分析采用 Shannon 指数、ACE 指数、Chao 指数描述，分别反映样本微生物群落的丰富度和多样性，指数越高，微生物群落的丰富度和多样性越高。与假手术组比较，模型组大鼠肠道菌群 Shannon 指数、ACE 指数、Chao 指数均降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，榄香素高剂量组大鼠肠道菌群 Chao 指数升高 ($P<0.05$)，见图 9。

3.9 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道菌群物种差异的影响 为了确定各组之间具有差异的细菌类群，在组间进行了物种差异分析。在科水平、纲水平、属水平上，与假手术组比较，模型组韦荣氏球菌科 (*Veillonellaceae*)、拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、噬菌体 (*Phascolarctobacterium*) 相对丰度均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，榄香素高剂量组韦荣氏球菌科 (*Veillonellaceae*)、拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、噬菌体 (*Phascolarctobacterium*) 相对丰度均降低 ($P<0.05$)，见图 10。

4 讨论

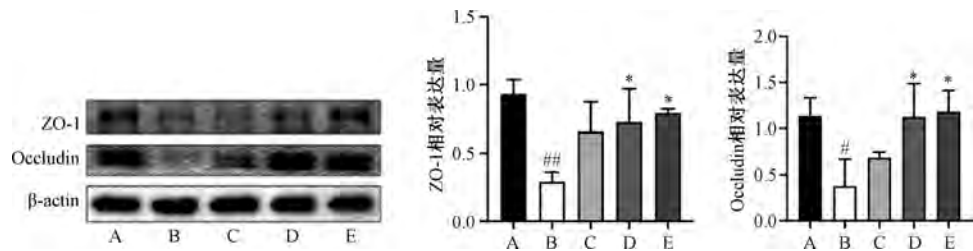
石菖蒲广泛应用于临床脑卒中治疗，能够改善神经炎症，具有神经保护作用^[14]。榄香素作为石菖蒲的成分之一，与缺血性脑卒中之间的关系尚无报道。本实验结果显示，MCAO/R 大鼠连续灌胃榄香素 7 d 后，神经功能缺损评分降低，脑梗死面积缩小，证实榄香素对缺血性脑卒中导致的脑缺血/再灌注损伤具有保护作用。

炎症反应影响缺血性卒中的病理过程和预后^[15]。MAPK 信号通路在缺血性卒中的发生、发展中发挥重要作用^[16]。研究表明，在缺血性卒中，MAPK 信号通路调控小胶质细胞促炎 M1 表型的极化^[17]。小胶质细胞是中枢神经系统参与炎症反应的主要细胞^[18]。小胶质细胞分为 M1、



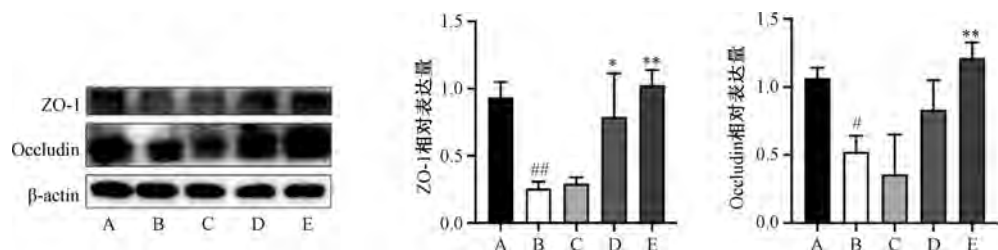
注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 分别为榄香素低、中、高剂量组。与假手术组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 5 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑组织 p-SAPK/JNK、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=3$)



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 分别为榄香素低、中、高剂量组。与假手术组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。

图 6 榄香素对 MCAO/R 大鼠脑组织紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=3$)



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 分别为榄香素低、中、高剂量组。与假手术组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 7 榄香素对 MCAO/R 大鼠结肠组织紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=3$)

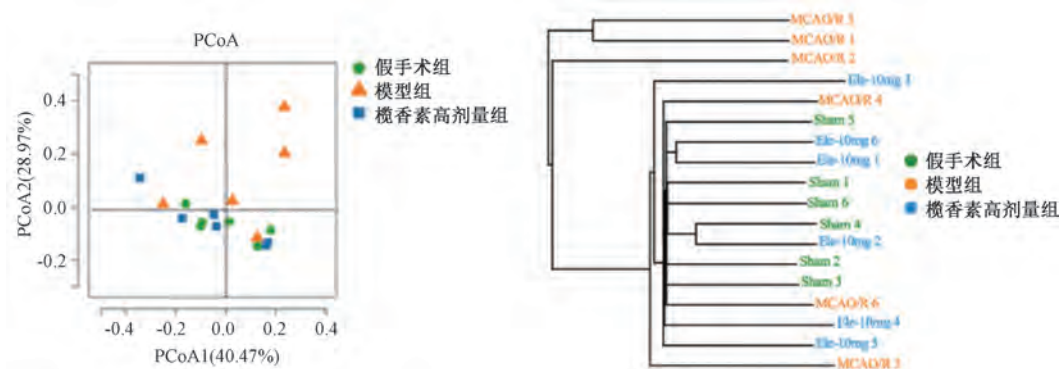
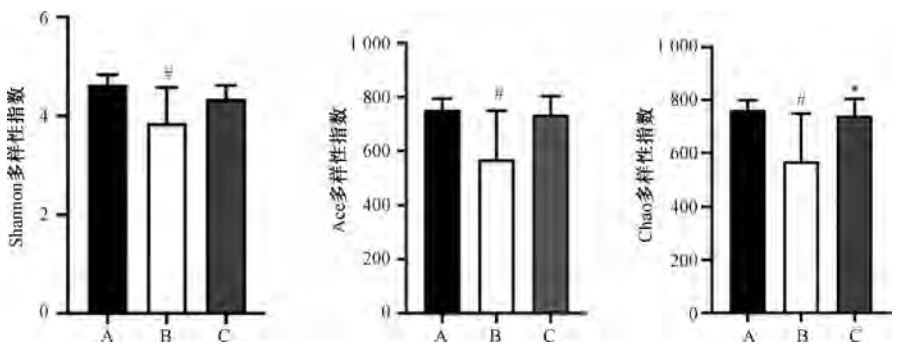
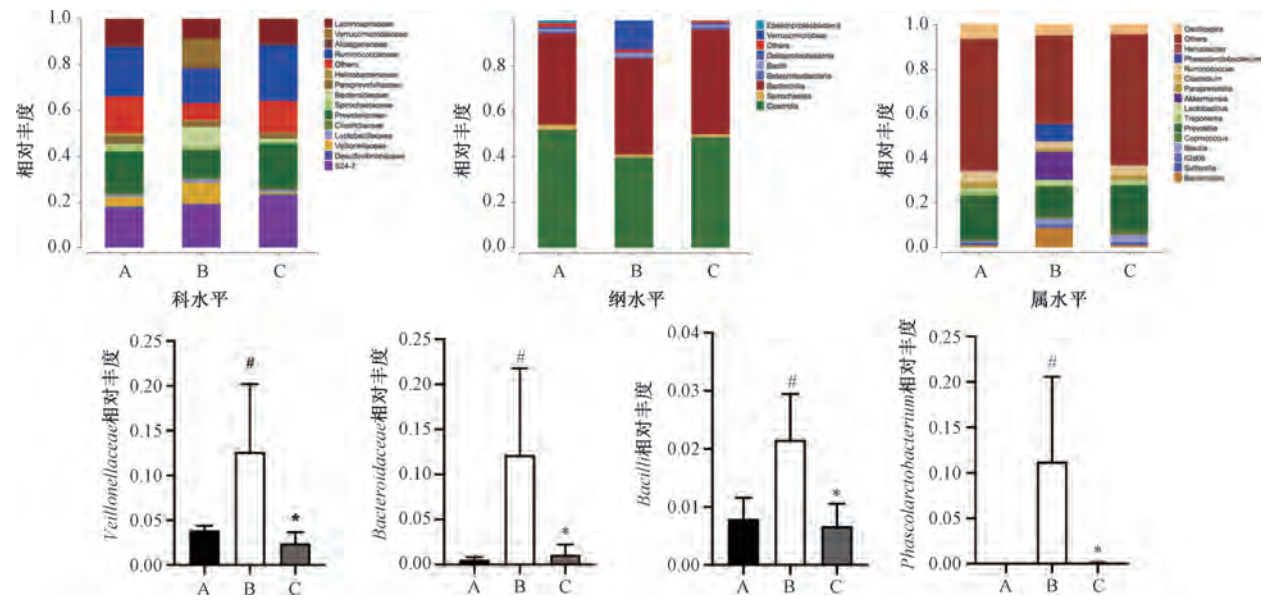


图 8 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为榄香素高剂量组。与假手术组比较，# $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ 。

图 9 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6$)



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为榄香素高剂量组。与假手术组比较，# $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ 。

图 10 榄香素对 MCAO/R 大鼠肠道菌群物种差异的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=4$)

M2 表型，M1 表型促进炎症反应，M2 表型能够改善神经炎症^[19]。CD16 和 CD206 分别是小胶质细胞 M1 和 M2 的表型标志物^[20]。TNF- α 、IL-17、IL-6 与 IFN- γ 是缺血性脑卒中的关键炎症因子。TNF- α 是一种促炎因子，引起神经毒性^[21]。促炎性 IL-17、IL-6 细胞因子可介导的缺血后炎症^[22-23]。炎症介质 IFN- γ 参与缺血性脑卒中发生后血脑屏障的破坏过程^[22]。研究提示，抑制 MAPK 信号通路有助于改善化小鼠结肠炎症，并通过提高紧密连接蛋白（ZO-1、Occludin）表达来恢复肠道屏障^[24]。紧密连接蛋白能够调节和限制病原体通过细胞旁途径通过，其破坏将导致感染和炎症^[25]。研究证实，MAPK 信号通路在紧密连接蛋白破坏中被激活^[26]。本研究发现，榄香素降低脑内 p-SAPK/JNK、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达，并提高脑及结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达，降低了 Iba-1+/CD16+ 阳性细胞数量，增加了 Iba-1+/CD206+ 阳性细胞数量。同时，榄香素降低了促炎细胞因子 TNF- α 、IL-17、IL-6 与 IFN- γ 的表达。表明榄香素能降低炎症反应，改善血脑屏障与肠道屏障，对 MCAO/R 导致的神经损伤与肠屏障损伤具有保护作用。

近年来，肠道菌群在神经系统疾病中的作用逐渐突显^[27]。研究证实了缺血性卒中患者和动物模型的肠道菌群组成发生了变化^[28-29]。因此，本研究采用 16S rRNA 测序探讨榄香素对 MCAO/R 大鼠模型的作用是否与调控肠道菌群组成及功能有关。结果显示，MCAO/R 大鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数均降低，说明 MCAO/R 降低了菌群丰度和多样性，与其他动物研究的结果一致^[30]。榄香素干预后大鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数提高，Beta 多样性分析显示肠道菌群结构具有向假手术组大鼠恢复的趋势，表明榄香素能维持肠道菌群稳态并恢复其丰富性和多样性。韦荣氏球菌科（*Veillonellaceae*）可以激活 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4, TLR4）信号通路并释放炎症因子^[31]。研究发现 *Veillonella infantium* 可介导的神经炎症，引起认知功能障碍^[32]。拟杆菌科（*Bacteroidaceae*）在肠道微生物群中占主导地位^[33]。芽孢杆菌纲（*Bacilli*）可侵入大脑，其中诺卡氏菌的含量可参与对脑脓肿的诊断^[34]。噬菌体（*Phascolarctobacterium*）与结肠直肠癌具有正相关关系，其在慢性疲劳综合征/脊髓炎患者的粪便中的相对含量增

加^[35-36]。榄香素干预降低了韦荣氏球菌、拟杆菌科、芽孢杆菌纲与噬菌体的丰度。这些结果均表明榄香素可改善MCAO/R 大鼠肠道菌群的失调。

综上所述，榄香素可改善 MCAO/R 大鼠神经功能缺损，减少脑梗死面积，降低炎症反应，改善肠道屏障，恢复肠道菌群，其作用与 MAPK 信号通路相关。本研究为缺血性脑卒中的治疗提供新的靶点与治疗策略。

参考文献：

[1] Cserép C, Pósai B, Dénes Á. Shaping neuronal fate: functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions[J]. *Neuron*, 2021, 109(2): 222-240.

[2] Ajoolabady A, Wang S, Kroemer G, *et al.* Targeting autophagy in ischemic stroke: from molecular mechanisms to clinical therapeutics[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107848.

[3] She Y, Shao L, Zhang Y, *et al.* Neuroprotective effect of glycosides in Buyang Huanwu Decoction on pyroptosis following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112051.

[4] Wu X, Li L, Zhang L, *et al.* Inhibition of thioredoxin-1 with siRNA exacerbates apoptosis by activating the ASK1-JNK/p38 pathway in brain of a stroke model rats[J]. *Brain Res*, 2015, 1599: 20-31.

[5] Gugliandolo A, Silvestro S, Sindona C, *et al.* MiRNA: involvement of the MAPK pathway in ischemic stroke. A promising therapeutic target[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(10): 1053.

[6] Yue J, López J M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2346.

[7] Hu X, Zhang H, Zhang Q, *et al.* Emerging role of STING signalling in CNS injury: inflammation, autophagy, necroptosis, ferroptosis and pyroptosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 242.

[8] Liu X M, Chen Q H, Hu Q, *et al.* Dexmedetomidine protects intestinal ischemia-reperfusion injury *via* inhibiting p38 MAPK cascades[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: 104444.

[9] Liu J, Wei Y, Jia W, *et al.* Chenodeoxycholic acid suppresses AML progression through promoting lipid peroxidation *via* ROS/p38 MAPK/DGAT1 pathway and inhibiting M2 macrophage polarization[J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102452.

[10] Xu A, Wen Z H, Su S X, *et al.* Elucidating the synergistic effect of multiple chinese herbal prescriptions in the treatment of post-stroke neurological damage[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 784242.

[11] Limón I D, Mendieta L, Díaz A, *et al.* Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta₍₂₅₋₃₅₎ [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 453(2): 98-103.

[12] Lam K Y, Chen J, Lam C T, *et al.* Asarone from *Acori tatarinowii* Rhizoma potentiates the nerve growth factor-induced neuronal differentiation in cultured PC12 cells: a signaling

mediated by protein kinase A[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163337.

[13] Huang Y, Li Y, Guan D, *et al.* *Acorus tatarinowii* oils exert protective effects on microglia-mediated inflammatory injury *via* restoring gut microbiota composition in experimental stroke rats[J]. *Brain Res Bull*, 2024, 213: 110990.

[14] Yan L, Mahady G, Qian Y, *et al.* The essential oil from *Acori tatarinowii* Rhizome (the dried rhizome of *Acorus tatarinowii* Schott) prevents hydrogen peroxide-induced cell injury in PC12 cells: a signaling triggered by CREB/PGC-1 α activation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4845028.

[15] Anrather J, Iadecola C. Inflammation and stroke: an overview[J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13(4): 661-670.

[16] Liang L, Stone R C, Stojadinovic O, *et al.* Integrative analysis of miRNA and mRNA paired expression profiling of primary fibroblast derived from diabetic foot ulcers reveals multiple impaired cellular functions[J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(6): 943-953.

[17] Wang R, Zhang W. Isoliquiritigenin regulates microglial M1/M2 polarisation by mediating the P38/MAPK pathway in cerebral stroke[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(6): 828-836.

[18] Nayak D, Roth T L, McGavern D B. Microglia development and function[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 367-402.

[19] Jiang C T, Wu W F, Deng Y H, *et al.* Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(5): 2006-2018.

[20] Wendimu M Y, Hooks S B. Microglia phenotypes in aging and neurodegenerative diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2091.

[21] Shen Q Q, Wang W, Wu H, *et al.* The effect of edaravone combined with DL-3-N-butylphthalide on the levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, neuron-specific enolase and effect in patients with acute cerebral infarction[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2022, 73(3): 371-376.

[22] Zhang W, Cheng C, Han Q, *et al.* Flos *Abelmoschus manihot* extract attenuates DSS-induced colitis by regulating gut microbiota and Th17/Treg balance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109162.

[23] Rasmussen R, Bache S, Stavngaard T, *et al.* Plasma Levels of IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, IFN γ , and TNF α are not associated with delayed cerebral ischemia, cerebral vasospasm, or clinical outcome in patients with subarachnoid hemorrhage[J]. *World Neurosurg*, 2019, 128: e1131-e1136.

[24] Ran X, Li Y, Chen G, *et al.* Farrerol ameliorates TNBS-induced colonic inflammation by inhibiting ERK1/2, JNK1/2, and NF- κ B signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2037.

[25] Chen M L, Ge Z, Fox J G, *et al.* Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(12): 6581-6589.

[26] Peerapen P, Thongboonkerd V. P38 MAPK mediates calcium oxalate crystal-induced tight junction disruption in distal renal

tubular epithelial cells[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1041.

[27] Bonnechère B, Amin N, van Duijn C. The role of gut microbiota in neuropsychiatric diseases—creation of an atlas-based on quantified evidence[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 831666.

[28] Li N, Wang X, Sun C, *et al*. Change of intestinal microbiota in cerebral ischemic stroke patients[J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 191.

[29] Chidambaram S B, Rathipriya A G, Mahalakshmi A M, *et al*. The influence of gut dysbiosis in the pathogenesis and management of ischemic stroke[J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1239.

[30] Zhang S, Chen Q, Jin M, *et al*. Notoginsenoside R1 alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway through microbiota-gut-brain axis[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155530.

[31] Zhai Q, Wu H, Zheng S, *et al*. Association between gut microbiota and NAFLD/NASH: a bidirectional two-sample Mendelian randomization study[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1294826.

[32] Ma X, Kim J K, Shin Y J, *et al*. Lipopolysaccharide-producing *Veillonella infantium* and *Escherichia fergusonii* cause vagus nerve-mediated cognitive impairment in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 118: 136-148.

[33] Beller Z W, Wesener D A, Seebeck T R, *et al*. Inducible CRISPR-targeted “knockdown” of human gut *Bacteroides* in gnotobiotic mice discloses glycan utilization strategies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(39): e2311422120.

[34] Bactor N, Aronowitz P. Nocardia brain abscess in a patient with diabetes: a case report[J]. *J Med Case Rep*, 2023, 17(1): 336.

[35] Bucher-Johannessen C, Senthakumaran T, Avershina E, *et al*. Species-level verification of *Phascolarctobacterium* association with colorectal cancer[J]. *mSystems*, 2024, 9(10): e0073424.

[36] Lupo G F D, Rocchetti G, Lucini L, *et al*. Potential role of microbiome in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7043.

药事管理暨中药科学监管栏目征稿公告

国家药监局发布的《关于促进中药传承创新发展的实施意见》提出，鼓励运用现代科学技术和传统中医药研究方法，深入开展中药监管科学研究。根据国家中药科学监管大会精神的新要求，进一步加强药品监管和政策法规的研究。《中成药》期刊即日起，增设药事管理栏目，以满足相关领域读者阅读学习和作者撰稿交流的需要，特发布征稿公告。

- (一) 征稿稿件的内容：
- (1) 与药事管理暨中药监管科学相关的政策与法规，如药监政策法规、卫生政策法规、医疗保险政策、医药产业政策等的研究与解读。

(2) 药事管理法规在药品研制、生产、流通、使用等领域应用的理论探讨和实践经验总结。

(3) 药事管理技术方法的介绍与效果评价。

(4) 中药科学监管工作发展的展望及其他相关内容等。
- (二) 征稿要求：
- (1) 文稿主题明确、内容精练、文字通顺。

(2) 文稿内容应具备思想性、科学性、新颖性、逻辑性、实用性、伦理性。

(3) 文稿书写格式请参阅国家有关科技论文的标准，一般不要超过 6000 字。
- 投稿：请登陆 <http://www.zcyjjournal.com> 或 <http://zcyu.cbpt.cnki.net> 进行线上投稿。
- 联系地址：上海市黄浦区福州路 107 号 206 室《中成药》编辑部
- 邮编：200002
- 电话：(021) 63213275
- E-mail：zcy.med@foxmail.com
- QQ：1242130380