

[9] 28(4) : 567-572.
Zaragoz C, Villaescusa L, Monserrat J, et al. Potential therapeutic anti-inflammatory and immunomodulatory effects of dihydroflavones, flavones, and flavonols[J]. *Molecules*, 2020, 25(4) : 1017.

[10] 彭荣越. 浅谈液质联用技术在中药质量控制中的应用[J]. 国际感染病学 (电子版), 2018, 7(4) : 84-85.

[11] Wang X, He X, Zhang C F, et al. Anti-arthritic effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89 : 887-893.

[12] 冯悦, 钟萌, 罗见春, 等. ¹⁸F-FDG PET/CT 技术监测雷公藤甲素对类风湿关节炎模型大鼠关节损伤的改善作用[J]. 中国药房, 2018, 29(22) : 3059-3062.

[13] 张晓攀, 李艳贞, 李珊珊, 等. 类风湿性关节炎治疗药物研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(10) : 1906-1910.

[14] Neumann E, Frommer K, Diller M, et al. Rheumatoide arthritis [J]. *Z Rheumatol*, 2018, 77(9) : 769-775.

[15] Pandolfi F, Franza L, Carusi V, et al. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15) : 5238.

[16] van Hamburg J P, Tas S W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2018, 87 : 69-81.

[17] Lee Y H, Bae S C. Associations between PTPRC rs10919563 A/G and FCGR2A R131H polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis [J]. *Rheumatol Int*, 2016, 36(6) : 837-844.

[18] Scherer H U, Hupl T, Burmester G R. The etiology of rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110 : 102400.

[19] 周静, 张弦, 钱海兵. 类风湿性关节炎发病机制的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(5) : 44-47.

体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

任敕宏¹, 李勇¹, 陈海¹, 陈吉军², 李红燕¹, 谢倩¹, 马荣¹, 李金秀¹, 王建^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川成都 611137; 2. 武汉天鹏医药有限公司, 湖北 武汉 430000)

摘要: **目的** 观察体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用。**方法** 采用改良线栓法制备短暂大脑中动脉阻塞 (tMCAO) 模型, 大鼠随机分为假手术组、模型组、溶剂组、尼莫地平组及体外培育牛黄 0.20、0.10、0.05 g/kg 组, 每组 12 只。术后 72 h, 评价神经功能和脑梗死体积, HE 染色观察脑组织病理损伤情况, ELISA 法检测大鼠血清 VEGF、Ang-1、bFGF 水平, 分子对接预测其可能机制, Western blot、免疫组化 (IHC) 法检测 p-PI3K、p-Akt、caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 *PI3K*、*Akt*、*caspase-3*、*Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达。**结果** 与溶剂组比较, 体外培育牛黄各剂量组大鼠神经功能评分、脑梗死率降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 海马区神经元与皮层的病理损伤改善, 血清 VEGF、Ang-1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。牛黄主要成分与 PI3K、Akt、caspase-3 的对接得分大于 100 分, 契合良好。体外培育牛黄能升高 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 降低 caspase-3、Bax 蛋白及 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 体外培育牛黄可能通过激活 PI3K/Akt 通路对脑缺血再灌注损伤大鼠起到神经保护作用。

关键词: 体外培育牛黄; 脑缺血再灌注; PI3K/Akt 信号通路; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)06-1989-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.041

脑卒中是目前人类主要的致残和致死原因^[1], 分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中, 其中缺血性脑卒中约占全部脑卒中的 80%^[2]。目前, 在《AHA/ASA 急性缺血性卒中

早期管理指南》中推荐静脉溶栓作为治疗缺血性脑卒中首选方案, 但受到溶栓 4.5 h 时间窗的限制, 且溶栓后会出

现脑缺血再灌注损伤^[3]。所以, 研发新药物以应对脑缺血

再灌注损伤已成为目前研究的热点。中药具有多成分、多靶点特点，不论单味药物还是复方，在临床治疗脑卒中均有广泛应用。

牛黄具有清热解毒、开窍醒神的功效，是中医治疗中风的常用中药之一。因天然牛黄难以获得，现有人工牛黄、培植牛黄、体外培育牛黄等替代品，其中体外培育牛黄与天然牛黄具有相似的成分与药理作用，是天然牛黄的理想替代品。药理研究发现，牛黄有促进血管新生、抗炎、抗凋亡、抗氧化等作用，具有治疗脑缺血再灌注损伤的潜力^[4]。但目前牛黄在脑缺血再灌注损伤方面的研究主要集中于含牛黄的复方以及牛黄的单体成分上，单独对体外培育牛黄改善脑缺血再灌注损伤的基础研究少见，故本研究首次从整体-组织-细胞-分子多层次，考察体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤的保护作用及调控 PI3K/Akt 通路的生物学机制，以揭示其“开窍醒神”的科学内涵，以期为临床用药提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 84 只，体质量 250~270 g，8~10 周龄，由斯贝福（北京）生物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号 SCXK（京）2019-0010，动物质量合格证号 110324200103134075，质量检测单位为苏州西山生物技术有限公司，饲养于成都中医药大学实验动物中心，温度 22~28 ℃，相对湿度 50%，通风良好，进食、饮水自由。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号 TCM-2016-312）。

1.2 试剂与药物 体外培育牛黄（武汉天鹏医药有限公司，批号 19G502）。尼莫地平片（山西亚宝药业集团股份有限公司，批号 190312）；注射用青霉素钠（哈药集团制药总厂，批号 17121209-2）。水合氯醛、多聚甲醛、红四氮唑、吐温 80（成都市科隆化学品有限公司，批号 2018103001、2019052001、2019030101、2019070301）。苏木素染液（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号 G1004）；VEGF、Ang-1 试剂盒（天津博士德生物科技有限公司，批号 EK0540、EK1295）；bFGF 试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技有限公司，批号 19JD3XYP7Y）；兔抗 p-PI3K、PI3K 抗体（英国 Abcam 公司，批号 ab182651、ab191606）；兔抗 p-Akt、Akt 抗体（美国 CST 公司，批号 S473、C67E7）；兔抗 caspase-3、Bax、Bcl-2 抗体（美国 GeneTex 公司，批号 GTX110543、GTX109683、GTX100064）；兔抗 GAPDH 抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司，批号 AF7021）；TRIzol 试剂（北京雷根生物生物技术有限公司，批号 NR002）。

1.3 仪器 优普超纯水制造系统（四川优普超纯科技有限公司，型号 UPH-1-10T）；NanoZoomer S360 数字切片扫描仪（日本 Hamamatsu 公司，型号 C13210-01）；超低温冰箱、冷冻离心机（美国 Thermo 公司，型号 902-ULTS、ST16R）；全自动轮转式石蜡切片机（德国 Leica 公司，型号 RM2255）；电子分析天平（上海舜宇恒平科学仪器有限

公司，型号 JA5003）；激光散斑血流成像系统、微型手持颅钻（深圳市瑞沃德生命科技有限公司，型号 RFLSI III、78001）；高速组织研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司，型号 KZ-II）；气浴恒温振荡器（上海博迅医疗生物仪器股份有限公司，型号 THZ-92A）；酶标仪（南京华东电子信息科技股份有限公司，型号 DG5032）；电泳仪、荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司，型号 1658033、CFX connect）。

2 方法

2.1 剂量确定 2020 年版《中国药典》规定，体外培育牛黄用药剂量是 0.15~0.35 g。参照课题组前期方法^[5]，剂量应为 0.23 g/kg，取整处理后，高、中、低剂量分别为 0.20、0.10、0.05 g/kg。阳性药物选用尼莫地平，临床成人（60 kg）日用量为 120 mg，换算成大鼠为 0.012 g/kg。2.2 分组、造模与给药 84 只大鼠适应性喂养 3 d，第 4 天将按体质量随机分为假手术组、模型组、溶剂组、尼莫地平（0.012 g/kg）组及体外培育牛黄 0.20、0.10、0.05 g/kg 组，每组 12 只，其中 6 只用于药效实验，6 只用于机制研究。每天定时称定大鼠体质量，并按 10 mL/kg 灌胃给予相应药物，假手术组、模型组灌胃给予等体积生理盐水，溶剂组灌胃给予等体积 2% 吐温-80。在预防性给药第 3 天灌胃给药 30 min 后，采用改良线栓法^[6]制备大脑中动脉阻塞再灌注（tMCAO）模型，大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛（3.5 mL/kg）麻醉，待翻正反射消失后将其仰卧于手术台上，四肢固定，颈部正中切口，将线栓沿左侧颈总动脉向颈内动脉插入 20 mm，穿过大脑中动脉（MCA）起始端至大脑前动脉（ACA）近端，缺血 90 min 后抽出线栓，缝合伤口，假手术组仅进行皮肤切口和血管分离操作，不做线栓处理，剩余操作同其他组，期间采用激光散斑血流成像仪监测缺血侧半球造模前、缺血后、再灌注后脑血流量，以判定模型是否制备成功。

2.3 指标检测

2.3.1 神经功能评分 造模后 72 h，采用 Longa 评分^[7]、mNSS 评分^[8]评估大鼠神经缺损情况。其中 Longa 评分标准为无任何神经功能缺失体征计 0 分；未损伤侧前肢不能伸展计 1 分；向未损伤侧弧线行走或追尾转圈计 2 分；向未损伤侧倾斜或倾倒计 3 分；意识障碍，无自主行走计 4 分。mNSS 评分标准见表 1。

2.3.2 脑梗死率 造模完成后 72 h，末次灌胃给药 30 min 后麻醉大鼠，安乐死取脑，去除小脑、嗅球、脑干，将脑组织沿冠状面切成 5 片 2 mm 左右的薄片，2% TTC 染色，生理盐水清洗，4% 多聚甲醛溶液固定 24 h，拍照后采用 Image J 软件计算脑梗死率，公式为脑梗死率 = [（对侧正常脑组织体积-同侧正常脑组织体积）/2×对侧正常脑组织体积] ×100%。

2.3.3 HE 染色 大鼠麻醉后安乐死取脑，去除小脑、嗅球、脑干，将缺血侧皮层、海马区脑组织用 10% 福尔马林固定，石蜡包埋，切片后脱蜡脱水，进行 HE 染色，在光

表 1 mNss 神经功能评分

实验	评分内容	评分标准	评分/分
运动实验(6 分)	提尾实验(3 分)	前肢屈曲	1
		后肢屈曲	1
		头部在 30 s 内偏离垂直轴(>100 °)	1
		正常行走	0
感觉实验(8 分)	行走观察提尾实验(3 分)	不能直线行走	1
		向轻瘫侧转圈	2
		向轻瘫侧倾倒	3
		放置试验(视觉和触觉测试)	1
		本体感觉试验(深感觉)	1
		稳定平衡木	0
		紧抓平衡木边缘	1
		紧抱平衡木,一肢体从平衡木跌落	2
		紧抱平衡木,两肢体从平衡木跌落或在平衡木上旋转(>60 s)	3
		试图在平衡木上平衡但跌落(>40 s)	4
		试图在平衡木上平衡但跌落(>20 s)	5
		跌落/未尝试在平衡木上平衡(<20 s)	6
反射丧失和不正常运动(4 分)	耳廓反应(1 分)	接触外耳道时不摇头	1
		角膜反应(1 分)	1
		棉丝轻触角膜时不眨眼	1
		对快弹硬纸板的噪音没有运动反应	1
	不正常运动(1 分)	癫痫、肌阵挛、肌张力障碍	1

镜(×40,×200)下观察大脑皮层损伤情况,半定量评分标准为无病变计 0 分;病变面积小于 10%计 1 分;10%~30%计 2 分;30%~50%计 3 分;大于 50%计 4 分。采用 Image J 软件对 200 倍镜下海马 CA1 区神经元进行细胞计数。

2.3.4 ELISA 法检测大鼠血清 VEGF、bFGF、Ang-1 水平 大鼠麻醉后腹主动脉取血,在 4 ℃下静置 30 min,3 500 r/min 离心 5 min,小心吸取上层血清,置于-80 ℃超低温冰箱中保存,依据相关 ELISA 试剂盒说明书检测血清血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生产素-1(Ang-1)水平。

2.4 分子对接 从 RCSB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中获得牛黄与缺血性脑卒中共同靶点蛋白的晶体结构,将其主要成分与靶点蛋白晶体结构导入 Discovery Studio

3.5 软件,采用 Clean Protein 对晶体蛋白结构进行优化处理

后,逐一与配体分子在 Lipdock 模式下进行分子对接,运行后记录各配体分子与靶点蛋白结合的一致性得分。

2.5 RT-qPCR 法检测 *PI3K*、*Akt*、*caspase-3*、*Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达 称取大鼠缺血侧皮层脑组织 50 mg,TRIzol 法提取总 RNA, RNA 反转录合成 cDNA 后备用,从美国生物技术信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中检索并下载大鼠磷脂酰激醇 3-激酶(*PI3K*)、蛋白激酶 B(*Akt*)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(*caspase-3*)、B 淋巴细胞瘤-2 基因相关蛋白(*Bax*)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(*Bcl-2*)基因全序列,采用引物软件(Primer Premier)进行设计和筛选,由北京擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表 2。荧光定量 PCR 反应条件为 95 ℃预变性 2 min, 95 ℃变性 10 s, 55 ℃退火延伸 30 s,共 40 个循环,采用 2^{-ΔΔCT}法计算目的基因的相对表达。

表 2 引物序列

基因	序列(5'→3')	退火温度/℃	G-C/%	NCBI 参考序列
<i>Akt</i>	正向 CGTGTGGCAAGATGTGTATGA	55.10	47.60	NM_033230.3
	反向 CACACTCCATGCTGTCATCTTGA	57.20	47.80	
<i>Bcl-2</i>	正向 CTGCTGGACAACATCGCTCT	57.60	55.00	NM_016993.2
	反向 GCATGCTGGGGCCATATAGT	57.80	55.00	
<i>Bax</i>	正向 AGAGGTCTTCTTCCGTGTGG	56.80	55.00	NM_017059.2
	反向 TGATCAGCTCGGGCACTTTAG	57.30	52.40	
<i>caspase-3</i>	正向 GGAACGCGAAGAAAAGTGACC	56.90	52.40	NM_012922.2
	反向 AGTCCATCGACTTGCTTCCA	56.20	50.00	
<i>PI3K</i>	正向 AAACAAATGACCCTTCCTCAGC	55.40	45.50	NM_001371300.1
	反向 GAGGTTGTCTCTCTCAGAACC	57.20	54.50	

2.6 Western blot 法检测 PI3K、Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达 取大鼠缺血侧皮层脑组织 50 mg,提取总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测样品蛋白浓度,依次用

PBS、5×Loading Buffer 稀释,SDS-PAGE 电泳后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭 2 h,在 4 ℃下与一抗孵育过夜,TBST 洗涤后孵育二抗,加入增强

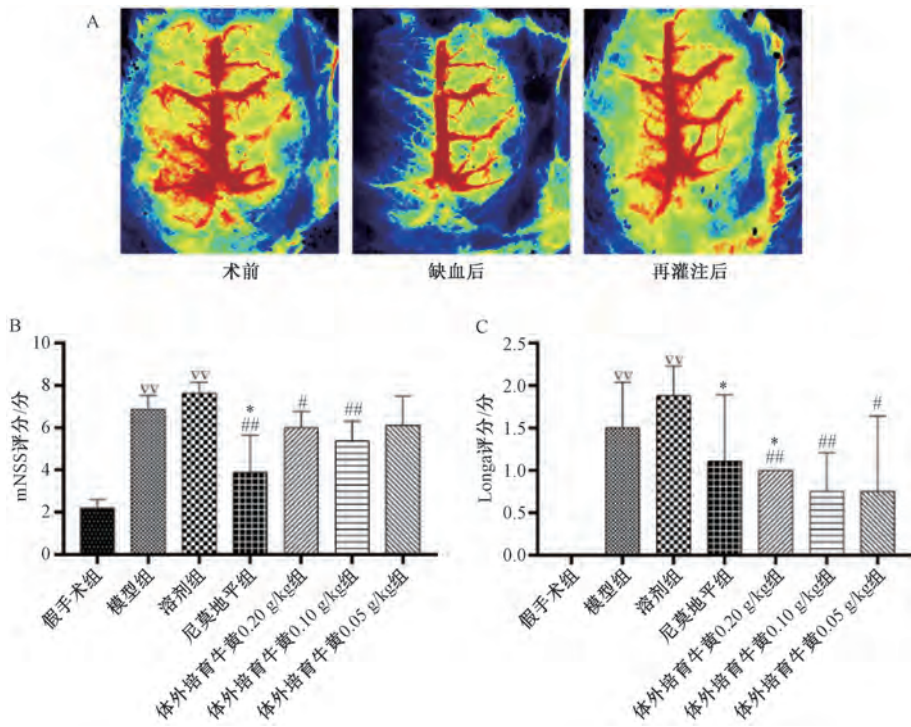
化学发光试剂，在 ChemiDoc 成像系统中显影成像。

2.7 免疫组织化学法检测 PI3K、Akt、caspase-3 蛋白表达 石蜡切片脱蜡水化后修复抗原，山羊血清封闭，在 4℃ 下与一抗孵育过夜，PBS 洗涤，孵育二抗，DAB 显色后常规脱水、透明、封片，在 200、400 倍视野下观察目标蛋白表达，采用 Image J 图像分析软件进行半定量分析。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠神经功能评分的影响 由图 1A 可知，模型制备成功。由图 1B~1C 可知，与假手术组比较，模型组、溶剂组大鼠 mNSS、Longa 评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，尼莫地平组大鼠 mNSS、Longa 评分降低 ($P<0.05$)；与溶剂组比较，体外培育牛黄 0.20、0.10 g/kg 组 mNSS、Longa 评分降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，体外培育牛黄 0.05 g/kg 组大鼠 Longa 评分降低 ($P<0.01$)。

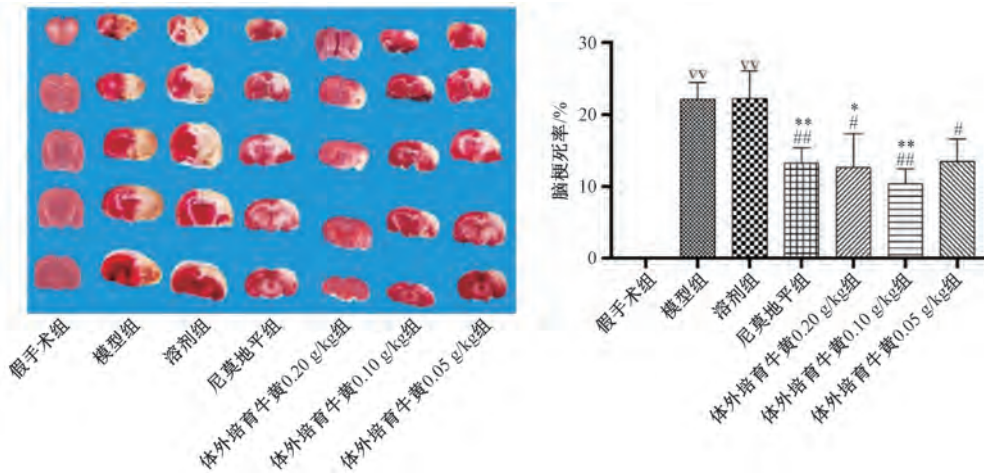


注：与假手术组比较，∇∇ $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ；与溶剂组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 1 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

3.2 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠脑梗死率的影响 与假手术组比较，模型组、溶剂组大鼠脑梗死率升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，尼莫地平组和体外培育牛黄 0.20、

0.10 g/kg 组大鼠脑梗死率降低 ($P<0.01$)；与溶剂组比较，尼莫地平组和体外培育牛黄各剂量组大鼠脑梗死率降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 2。

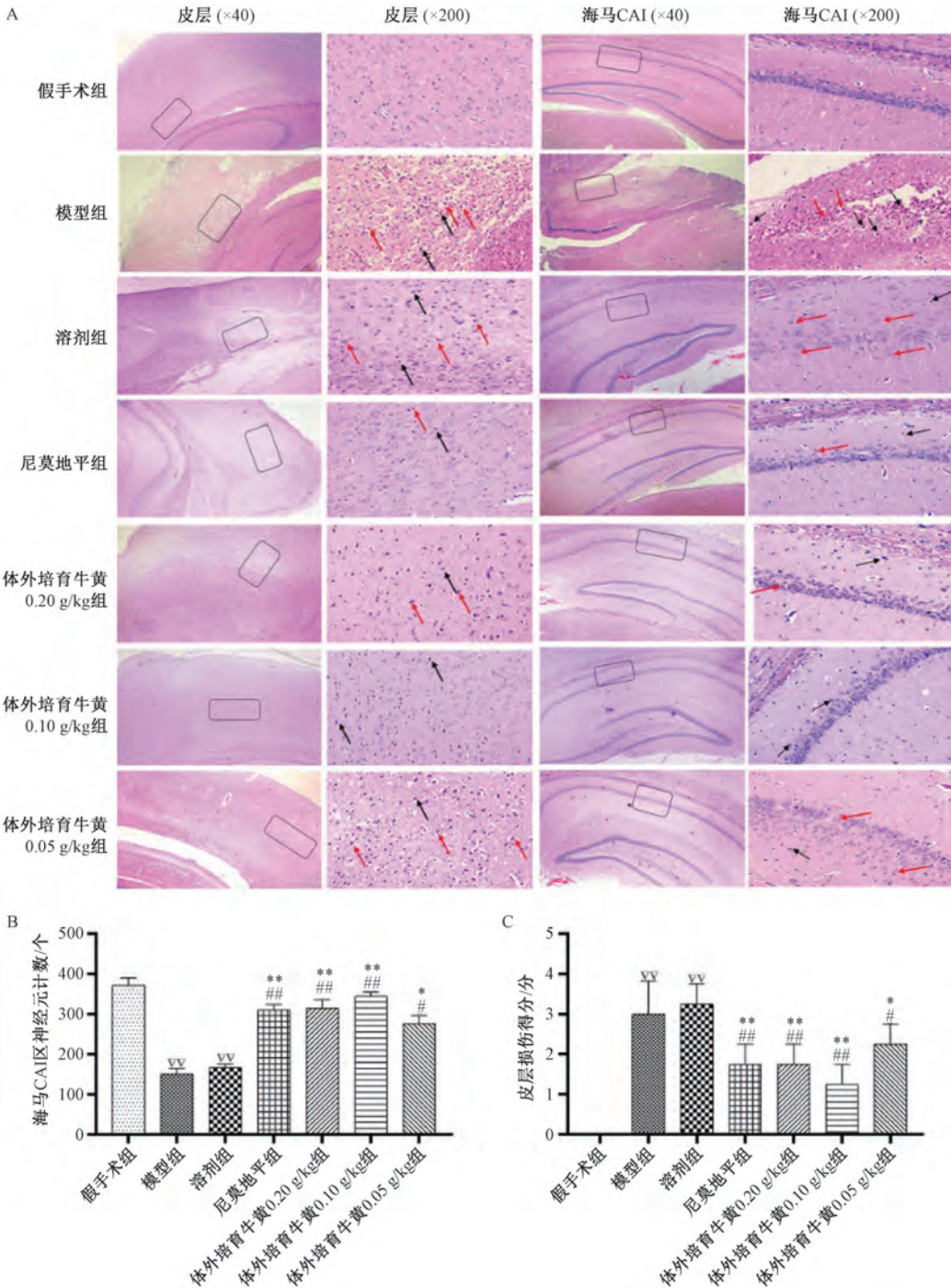


注：与假手术组比较，∇∇ $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与溶剂组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 2 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠脑梗死率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.3 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠海马和皮层区脑组织病理的影响 如图 3A 所示,除假手术组外,各组大鼠大脑皮层区以及海马区均可见不同程度的损伤;模型组、溶剂组大鼠皮层区神经元与周围组织间隙增宽、海马区神经元坏死溶解,结构疏松呈丝网状,其液化坏死面积、炎细胞浸润以及变性坏死的程度均大于各给药组;尼莫地平组、体外培育牛黄各剂量组大鼠海马、皮层区组织损伤明显改善。如图 3B~3C 所示,与假手术组比较,模型组、溶剂组大鼠

脑皮层损伤评分升高 ($P<0.01$),神经元计数降低 ($P<0.01$);与模型组比较,尼莫地平组和体外培育牛黄各剂量组大鼠脑皮层损伤降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),海马 CA I 区神经元计数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与溶剂组比较,尼莫地平组和体外培育牛黄各剂量组脑皮层的损伤评分降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),海马 CA I 区神经元计数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

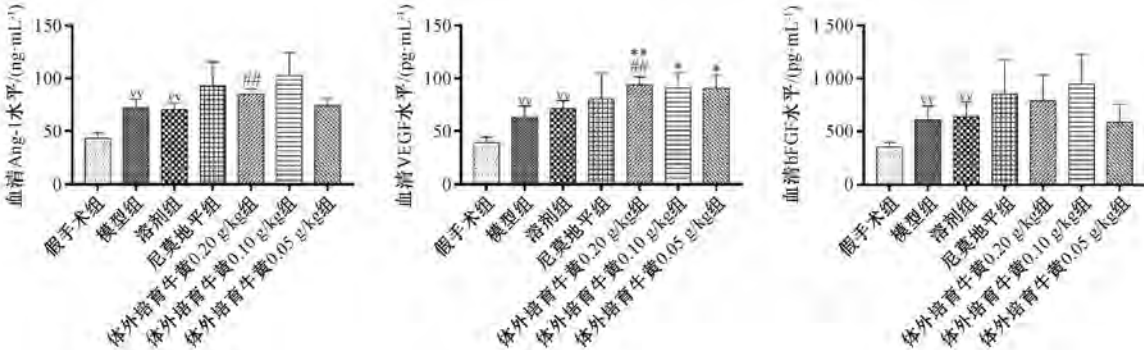


注:黑色箭头处为神经元固缩,红色箭头处为神经元坏死。与假手术组比较,▽▽ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与溶剂组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

图 3 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠海马、皮层脑组织形态的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.4 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠血清 Ang-1、VEGF、bFGF 水平的影响 与假手术组比较,模型组与溶剂组大鼠血清 Ang-1、VEGF、bFGF 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与溶剂组比较,体外培育牛黄 0.20 g/kg 组大鼠血清 VEGF、Ang-1 水平升高 ($P<0.01$),见图 4。由此可知,体外培育

牛黄 0.10 g/kg 组大鼠在神经功能、脑梗死率、缺血侧脑组织病理损伤情况方面的改善程度优于体外培育牛黄 0.20 g/kg 组,而在调节血清中相关因子水平方面后者作用更佳,故将体外培育牛黄 0.20、0.10 g/kg 组大鼠纳入机制研究。



注:与假手术组比较,▽▽ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与溶剂组比较,## $P<0.01$ 。

图 4 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠血清 Ang-1、VEGF、bFGF 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.5 牛黄主要成分与靶点蛋白分子对接 PI3K、Akt、caspase-3 为 PI3K/Akt 信号通路上 3 个关键靶点蛋白,故本研究选择三者与牛黄主要成分进行对接。对接得分越高,提示两者结合的可能性越大,药理作用越强,对接后的一致性得分及分子对接效果 2D、3D 图见表 3、图 5。由表 3

可知,牛黄主要成分胆酸、胆红素等与 PI3K、Akt、caspase-3 对接得分均大于 100 分,契合良好。由图 5 可知,牛黄各成分可通过 sigma 键、共价键、范德华力、碳氧双键等与靶点蛋白结合,从而发挥相应的药理作用。

表 3 分子对接得分 (分)

蛋白	晶体	牛黄主要成分					
		胆红素	胆酸	牛磺胆酸	胆固醇	牛磺酸	鹅去氧胆酸
PI3K	3o5z	156.51	85.60	166.51	91.54	52.30	88.03
	3i5s	136.63	88.61	111.54	91.11	56.41	93.00
	5u2c	154.38	111.04	126.16	103.24	40.65	109.99
	5oy4	143.38	136.29	166.58	132.25	50.49	130.96
	5u28	111.10	107.92	103.26	103.24	51.38	107.87
	6cu6	174.35	133.65	158.64	143.01	71.62	160.07
Akt	4gah	165.12	120.75	157.59	130.35	47.36	115.46
	3qkk	146.59	116.11	148.19	122.49	49.59	112.79
caspase-3	4jqw	130.49	100.87	114.52	99.70	41.81	99.46
	6n2m	150.11	102.11	116.51	92.52	45.05	103.69
	6efk	138.60	108.23	137.17	102.31	45.85	99.62

3.6 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠脑组织 PI3K、Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,溶剂组大鼠缺血侧脑组织中 PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),caspase-3、Bax mRNA 表达和 Bax/

Bcl-2 比值升高 ($P<0.01$);与溶剂组比较,体外培育牛黄 0.20、0.10 g/kg 组大鼠 caspase-3、Bax mRNA 表达降低 ($P<0.01$),体外培育牛黄 0.10 g/kg 组大鼠 PI3K mRNA 表达升高 ($P<0.01$),Bax/Bcl-2 比值降低 ($P<0.01$),见表 4。

表 4 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠脑组织 PI3K、Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	PI3K	Akt	caspase-3	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
假手术组	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.37	1.00±0.31	1.00±0.07	0.99±0.25
溶剂组	0.44±0.07▽	0.47±0.10▽▽	5.86±1.13▽▽	1.61±0.11▽▽	0.57±0.01▽▽	2.83±0.21▽▽
体外培育牛黄 0.20 g/kg 组	3.10±0.37	0.56±0.20	1.12±0.05##	0.80±0.22##	0.28±0.06	2.87±0.46
体外培育牛黄 0.10 g/kg 组	3.12±0.05##	0.43±0.04	1.11±0.48##	0.51±0.11##	0.64±0.22	0.88±0.39##

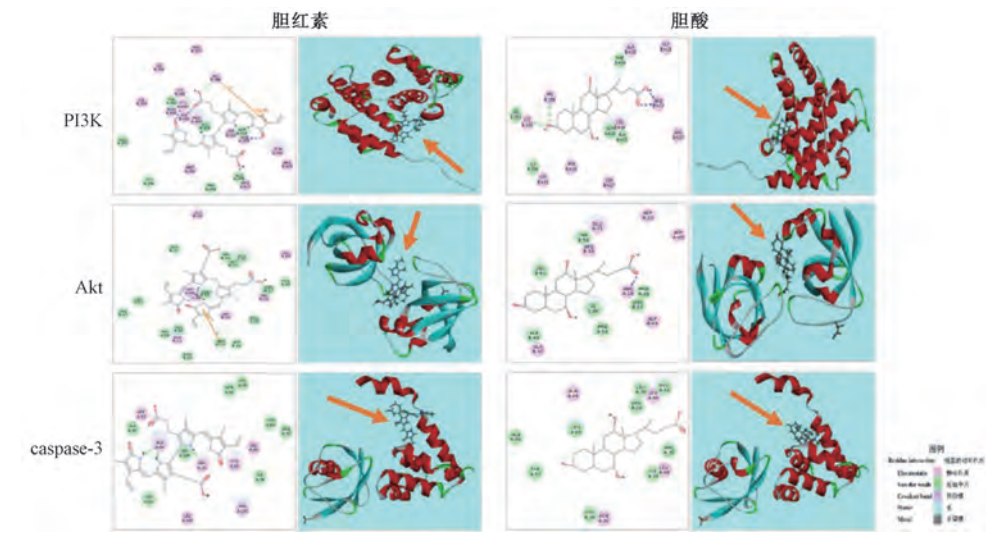
注:与假手术组比较,▽ $P<0.05$,▽▽ $P<0.01$;与溶剂组比较,## $P<0.01$ 。

3.7 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠缺血侧脑组织 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响 如图 6 所示,与假手术组比较,溶

剂组大鼠缺血侧脑组织中 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),Bax、caspase-3 蛋白表达和 Bax/

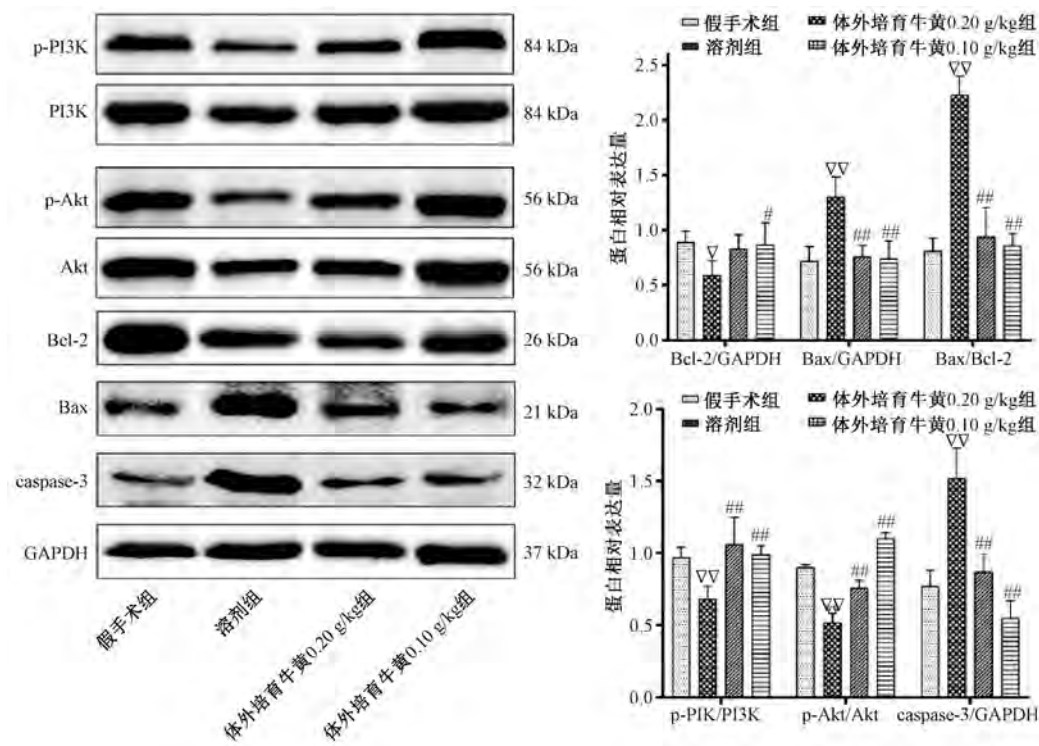
Bcl-2 比值升高 ($P<0.01$)；与溶剂组比较，体外培育牛黄 0.20、0.10 g/kg 组大鼠 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，caspase-3、Bax 蛋白表达和 Bax/Bcl-2 比值降低

($P<0.01$)，体外培育牛黄 0.10 g/kg 组大鼠 Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。



注：箭头处为分子对接中配体分子与靶蛋白的结合位点。

图 5 PI3K、Akt、caspase-3 与配体分子对接效果 2D、3D 图



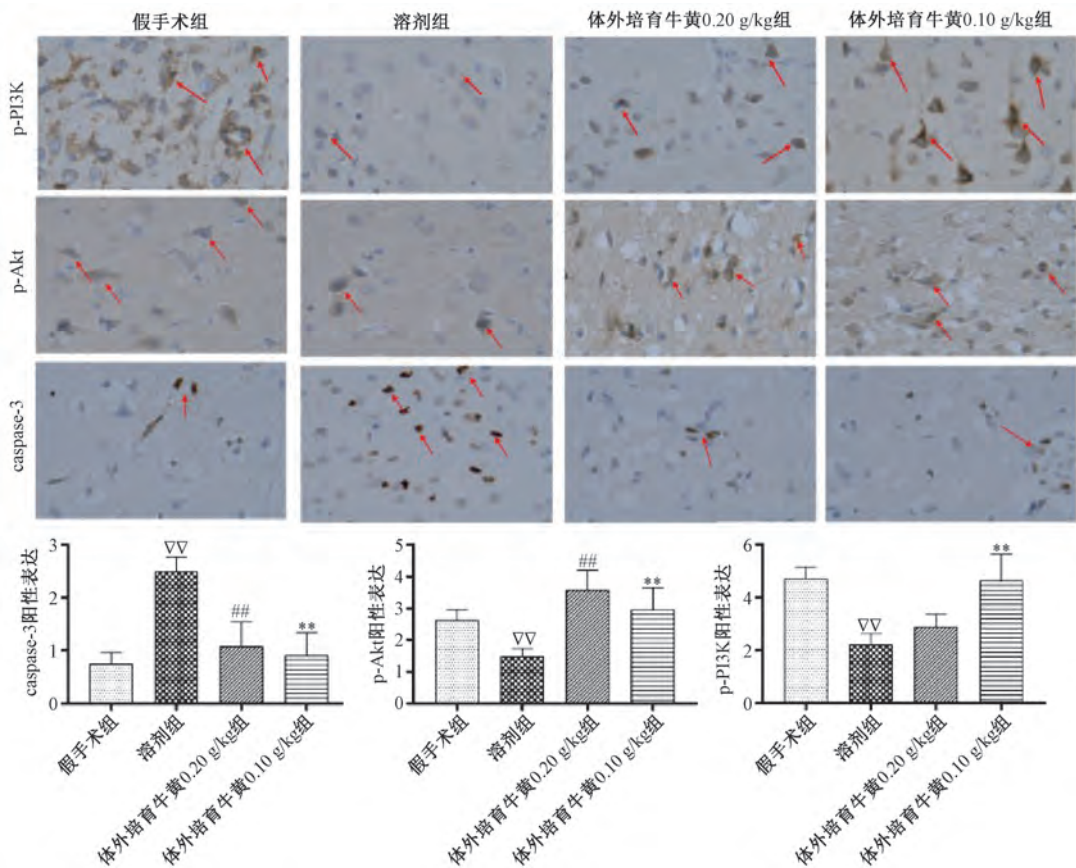
注：与假手术组比较， $\nabla P<0.05$ ， $\nabla\nabla P<0.01$ ；与溶剂组比较， $\#P<0.05$ ， $\#\#P<0.01$ 。

图 6 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠缺血侧脑组织 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$ ， $n=3$)

如图 7 所示，与假手术组比较，溶剂组大鼠缺血侧脑组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与溶剂组比较，体外培育牛黄 0.20、0.10 g/kg 组大鼠 p-Akt 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，caspase-3 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，体外培育牛黄 0.10 g/kg 组大鼠 p-PI3K 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

4 讨论

脑缺血再灌注损伤是一个迅速而复杂的级联反应过程，是更为严重的脑功能障碍，其机制主要有能量代谢障碍与周围缺氧去极化、自由基与氧化应激损伤、钙离子超载、兴奋性氨基酸毒性、炎症反应、细胞凋亡等^[9]，上述环节相互影响、彼此重叠，最终导致神经组织损伤。



注：红色箭头处为蛋白阳性表达。与假手术组比较, ∇∇*P*<0.01；与溶剂组比较, ##*P*<0.01。

图 7 体外培育牛黄对 tMCAO 大鼠缺血侧脑组织 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

牛黄首载于《神农本草经》，是中医治疗中风的常用药物，疗效显著。传统中医使用的牛黄多为天然牛黄，但因天然牛黄药源紧缺、价格昂贵，故现代临床中常使用体外培育牛黄替代天然牛黄^[10]。研究发现，体外培育牛黄可恢复血管性痴呆大鼠认知功能障碍并降低 Bax/Bcl-2 值^[11]，并通过抑制线粒体介导的细胞凋亡对脑缺血再灌注大鼠发挥脑保护作用^[12]。临床研究也发现，在西医常规治疗的基础上口服体外培育牛黄可促进中风合并意识障碍患者的意识恢复，改善患者神经功能评分及血脂血液流变学指标^[13-14]。尼莫地平是一种钙离子拮抗剂，具有改善脑血流的作用^[15]，临床常用于缺血性脑卒中的治疗。本研究以尼莫地平作为阳性药，发现体外培育牛黄可改善大鼠 tMCAO 造模后 72 h 的神经功能评分，降低 tMCAO 造模后 72 h 脑梗死率，并减少皮层以及海马 CA I 区液化坏死面积、炎症细胞浸润以及变性坏死的程度，提示体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤大鼠具有脑保护作用，也为临床应用提供了科学支撑。

课题组前期采用网络药理学方法发现牛黄的脑保护作用可能与甾体激素的生物合成、代谢通路、神经活性配体-受体相互作用有关^[16]，而 PI3K/Akt 信号通路是细胞内经典的通路，与激素合成调节、葡萄糖代谢关系密切^[17-18]。故本研究进一步采用分子对接预测机制，发现牛黄主要成分

分与 PI3K/Akt 信号通路契合良好，牛黄的脑保护作用可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。PI3K/Akt 信号通路可通过对细胞增殖、分化、凋亡、葡萄糖转运的调控在多种缺血-再灌注损伤的保护中发挥着重要作用^[19-20]。

基于此，课题组进一步通过动物实验开展机制研究，结果显示，tMCAO 大鼠灌胃给予体外培育牛黄后可以升高 VEGF、Ang-1 水平并通过促进血管新生，从而发挥脑保护作用；还可以升高大鼠缺血侧脑组织中 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达，降低 caspase-3、Bax 蛋白及 mRNA 表达，激活 PI3K/Akt 通路，通过抑制凋亡来发挥脑保护作用，这可能是牛黄“开窍醒神”的生物学机制之一。

本研究首次发现体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护机制与激活 PI3K/Akt 信号通路、抗凋亡有关。采用多种研究技术，从整体-组织-细胞-分子多层次，揭示了牛黄“开窍醒神”功效的科学内涵，故具有重要的学术意义和实用价值。然而中药具有多成分多靶点的特点，PI3K/Akt 信号通路涉及到细胞的增殖、分化及存活等各方面，与神经发生、血管新生关系密切，除 PI3K/Akt 信号通路外，体外培育牛黄的脑保护作用是否还与其他机制，或是否与调控 PI3K/Akt 信号通路的其他蛋白相关？这将是课题组今后深入研究的方向。

参考文献：

[1] Rust R. Insights into the dual role of angiogenesis following

stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40 (6): 1167-1171.

[2] Rai A T, Seldon A E, Boo S H, *et al.* A population-based incidence of acute large vessel occlusions and thrombectomy eligible patients indicates significant potential for growth of endovascular stroke therapy in the USA[J]. *J Neurointerv Surg*, 2017, 9(8): 722-726.

[3] Catanese L, Tarsia J, Fisher M. Acute ischemic stroke therapy overview[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 541-558.

[4] 向道春, 张程亮, 刘 东. 牛黄及其代用品治疗神经系统疾病的研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(6): 576-579.

[5] 文 静. 开窍药对永久性局灶性脑缺血模型大鼠神经血管单元的保护机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.

[6] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, *et al.* Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Nosotchu*, 1986, 8: 1-7.

[7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[8] Chen J, Li Y, Wang L, *et al.* Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *J Neurol Sci*, 2001, 189(1-2): 49-57.

[9] Yu Z J, Xu Y, Peng W, *et al.* Calculus bovis: A review of the traditional usages, origin, chemistry, pharmacological activities and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112649.

[10] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局要求加强含牛黄等药材中成品品种的监督管理[J]. 中国药房, 2013, 24(3): 288.

[11] Zhong X M, Ren X C, Lou Y L, *et al.* Effects of *in vitro* cultured calculus bovis on learning and memory impairments of hyperlipemia vascular dementia rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 390-397.

[12] Lu F B, Wang L F, Chen Y Y, *et al.* *In vitro* cultured calculus bovis attenuates cerebral ischaemia-reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis and protecting mitochondrial function in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113168.

[13] 刘晓燕, 彭凯润, 杨红军, 等. 体外培育牛黄治疗急性脑梗死临床疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (5): 66-67.

[14] 张新奇, 明淑萍, 刘 玲. 体外培育牛黄对急性中风伴意识障碍患者的影响[J]. 数理医药学杂志, 2015, 28(2): 216-217.

[15] Albanna W, Weiss M, Conzen C, *et al.* Systemic and cerebral concentration of nimodipine during established and experimental vasospasm treatment [J]. *World Neurosurg*, 2017, 102: 459-465.

[16] 陈 海, 李红燕, 王 建, 等. 基于网络药理学分析牛黄治疗缺血性脑卒中的作用机制[J]. 医药导报, 2021, 40 (6): 768-772.

[17] Srinivasan S, Nawaz Z. E3 ubiquitin protein ligase, E6-associated protein (E6-AP) regulates PI3K-Akt signaling and prostate cell growth [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809 (2): 119-127.

[18] 孙冠聪, 焦 丹, 谢忠奎, 等. PI3K/AKT 通路在动物葡萄糖代谢中的研究进展 [J]. 生命科学, 2021, 33 (5): 653-666.

[19] 吴胜男, 张 露, 樊红莲, 等. PI3K/Akt 通路在内啡肽-1 后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(6): 870-875.

[20] Manning B D, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network[J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.