

·基础研究·

基于TRPM2/Akt/GSK3 β 通路探讨24-乙酰泽泻醇A保护脑缺血再灌注损伤脑微血管内皮细胞的机制

李惠红¹, 邓云飞¹, 魏伟^{2,3}, 詹增土^{2,3}, 林丽斌¹, 薛偕华^{2,3,4*}

1 福建中医药大学康复医学院, 福建 福州 350122;

2 福建中医药大学附属康复医院, 福建 福州 350003;

3 福建省认知功能康复重点实验室, 福建 福州 350003;

4 福建省康复技术重点实验室, 福建 福州 350122

* 通信作者: 薛偕华, E-mail: f110015@fjtem.edu.cn

收稿日期: 2023-02-02; 接受日期: 2023-05-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82274620); 国家自然科学基金项目(82004436); 福建省卫生健康科研项目医学创新课题(2021CX041); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT90269)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.04005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的:**探讨24-乙酰泽泻醇A(24A)改善小鼠脑缺血再灌注后脑微血管内皮细胞(BMECs)损伤的作用机制。**方法:**将45只雄性10周龄C57BL/6小鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、24A组,每组15只。模型组、24A组采用20 min双侧颈总动脉结扎后再灌注的方法构建小鼠脑缺血再灌注损伤(CI/RI)模型,假手术组小鼠只分离颈总动脉和迷走神经,不结扎。24A组采用24A灌胃,剂量为30 mg/(kg·d);假手术组和模型组则给予等体积的生理盐水进行灌胃,3组均灌胃1次/d,连续干预7 d。分别采用神经功能缺损评分(mNSS)评估小鼠神经功能受损程度;采用新物体识别测试(NORT)和水迷宫(MWM)评价小鼠认知功能;采用免疫荧光法检测内皮细胞CD31表达;采用Western blot法检测脑组织闭锁小带蛋白1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-5(Claudin-5)、磷酸化核因子 κ B(p-NF- κ B)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、瞬时受体电位离子通道-2(TRPM2)、磷酸化苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)、磷酸化糖原合成酶激酶-3(p-GSK3 β)蛋白表达水平。**结果:**①神经功能:与假手术组比较,模型组mNSS在第1、3、5、7天均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,24A组第3、7天mNSS明显降低($P < 0.05$)。②认知功能:与假手术组比较,模型组NORT 1、24 h识别指数明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,24A组NORT 1、24 h识别指数明显升高($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组干预后第2~4天逃避潜伏期明显延长,穿越目标平台次数明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,24A组干预后第3、4天逃避潜伏期明显缩短,穿越目标平台次数明显增加($P < 0.05$)。③内皮细胞CD31、ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达:假手术组CD31荧光表达较为密集,呈现红色荧光;与假手术组比较,模型组CD31荧光表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,24A组CD31荧光表达明显升高($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达量明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,24A组ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达量明显升高($P < 0.05$)。④p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、TRPM2、p-Akt、p-GSK3 β 蛋白表达:与假手术组比较,模型组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、TRPM2表达明显增加,p-Akt、p-GSK3 β 表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,24A组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、TRPM2蛋白表达水平明显下降,p-Akt、p-GSK3 β 表达明显增加($P < 0.05$)。**结论:**24A可有效改善CI/RI小鼠的神经功能、认知功能,降低炎症反应,改善BMECs损伤,其机制可能与TRPM2/Akt/GSK3 β 通路的调控有关。

关键词 缺血性脑卒中;脑缺血再灌注;24-乙酰泽泻醇A;脑微血管内皮细胞;TRPM2/AKT/GSK3 β 通路

引用格式:李惠红,邓云飞,魏伟,等.基于TRPM2/Akt/GSK3 β 通路探讨24-乙酰泽泻醇A保护脑缺血再灌注损伤脑微血管内皮细胞的机制[J].康复学报,2023,33(4):317-324.

LI H H, DENG Y F, WEI W, et al. Protective mechanism of Alisol A 24-acetate on brain microvascular endothelial cells in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury by TRPM2/Akt/GSK3 β pathway [J]. Rehabil Med, 2023, 33(4): 317-324.
DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.04005

脑卒中是世界第二大死因,血管闭塞引起的缺血性脑卒中占脑卒中总数的85%。虽然早期溶栓治疗可恢复血流,降低患者的发病率和病死率,但恢复的血供会对脑组织造成二次损伤,称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia/reperfusion injury, CI/RI)^[1]。CI/RI过程中血脑屏障(blood brain barrier, BBB)受损明显。BBB是维持脑稳态的关键生物屏障,其核心组成部分是广泛存在于大脑微血管系统中的脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs),该细胞对缺血、缺氧敏感性高,在脑缺血再灌注后最先受累,引起BBB渗透性增加,外周免疫炎症因子和毒性分子渗入脑实质,介导CI/RI^[2-3]。BBB的损伤与认知功能障碍密切相关,因此,积极寻求改善BMECs的方法是当前治疗CI/RI后BBB损伤的一个重要方向。

瞬时受体电位离子通道2(transient receptor potential melastain 2, TRPM2)是一种四聚体Ca²⁺非选择性阳离子通道,介导脑缺血后Ca²⁺流入,在BMECs功能的调节中起着至关重要的作用。CI/RI介导TRPM2通道激活,在BBB的破坏中起着关键作用^[4]。蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)是细胞存活的主要调节因子,糖原合酶激酶(glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)是Akt下游靶分子, Akt通过磷酸化GSK3 β ,参与调节炎症反应及凋亡的过程。NF- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)是参与细胞存活和炎症启动的关键调节因子, Akt/GSK3 β 通路的激活下调NF- κ B的表达,减轻炎症反应^[5]。抑制TRPM2介导Akt/GSK3 β 的激活,可发挥抗炎、抗凋亡作用,减轻BBB破坏^[6]。可见TRPM2在CI/RI后BBB的损伤中发挥重要作用。

中药在缺血性脑卒中BBB的治疗中发挥着独特作用。中药泽泻是泽泻科常用的药用植物,现代药理学研究揭示了其具有降血压、降血脂、抗炎、抗氧化等功效,常用于治疗血管类疾病,其提取物具有抗炎和抗动脉粥样硬化等活性^[7]。24-乙酰泽泻醇A(Alisol A 24-Acetate, 24A)是泽泻的主要活性成分,课题组前期研究发现其具有抗炎、抗凋亡和保护紧密连接蛋白(tight junction proteins, TJs)等作用,但其对缺血性脑卒中BBB损伤的作用机制尚不明确。因此本研究进一步观察24A对CI/RI小鼠TRPM2/Akt/GSK3 β 通路的影响,以期探究其在CI/RI发生后保护BMECs的机制,为临床治疗CI/RI提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择10周龄SPF级雄性野生型C57BL/6小鼠45只,体质量20~25 g,由广东药康生物科技有限公司提供[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2020-0054],饲养于福建中医药大学实验动物中心[许可证号:SYXK(闽)2020-0002]。所有实验均已通过福建中医药大学动物实验伦理委员会审批(批准号:FJTCMIACUC2020091)。

1.2 主要实验仪器和试剂

Morris水迷宫、新物体识别测试系统(上海欣软信息科技有限公司);化学发光成像分析仪(美国BIO-RAD公司,型号:ChemiDocXRS+);24A(上海源叶生物科技有限公司,批号:B21765);BCA蛋白浓度测定试剂盒(赛默飞世尔科技公司);乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)(碧云天生物技术公司,ST066);闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)抗体(批号:21773-1-AP)、闭合蛋白(Occludin)抗体(批号:66378-1-Ig)均采购自Proteintech公司;紧密连接蛋白-5(Claudin-5)抗体(Proteintech公司,批号:66146-1-Ig);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)抗体(批号:Cat#Ab9722)、TRPM2抗体(批号:ab11168)均采购自英国Abcam公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体(批号:Cat#11948)、磷酸化核因子- κ B抗体(phosphorylation nuclear factor- κ B, p-NF- κ B)(批号:mAb#3033)、Akt抗体(批号:Cat#4691)、GSK3 β 抗体(批号:Cat#12456S)、p-Akt抗体(批号:Cat#4060)、p-GSK3 β 抗体(批号:Cat#9323S)均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组 45只SPF级雄性C57BL/6按随机数字表法分为假手术组、模型组、24A组,每组15只。

1.3.2 动物模型制备 模型组、24A组使用改良的双侧颈总动脉结扎术进行造模^[8]。根据体质量(0.3 mL/100 g)注射1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉,分离颈总动脉与迷走神经,5.0手术缝合线将双侧颈总动脉结扎20 min后松开恢复血流。假手术组小鼠只分离颈总动脉和迷走神经,不结扎。

1.3.3 干预方法 模型制备后,根据小鼠体质量进行灌胃。24A组给予30 mg/(kg·d) 24A灌胃干预;

假手术组和模型组则给予等体积的生理盐水进行灌胃。3组均灌胃1次/d,连续干预7 d。

1.3.4 观察指标

1.3.4.1 神经功能 分别于造模后第1、3、5、7天采用神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)评估小鼠神经功能受损程度。评估内容包括运动、感觉、平衡、反射和异常运动,总分18分。分值越高,提示神经功能损伤越严重。

1.3.4.2 认知功能 分别于实验动物干预结束后采用新物体识别(novel object recognition test, NORT)实验、水迷宫(Morris water maze, MWM)实验评价小鼠认知功能。

(1)NORT实验 测试前24 h,先将小鼠放入旷场实验装置内自由运动5 min,适应环境。测试时在2个角落放入2个相同的物体A和B,采用摄像机和电脑记录小鼠运动轨迹及探索物体的时间。1 h后将物体B替换为物体C进行测试。24 h后再次测试,方法同上。

识别指数=新物体探索次数/(新物体+旧物体)探索次数 $\times 100\%$

(2)MWM实验 MWM实验主要分为训练阶段和测试阶段。摄像机记录实验全过程小鼠的运动轨迹、速度等数据。①训练阶段:实验前1~4 d记录小鼠进入目标平台所需的时间为逃避潜伏期。②测试阶段:实验第5天将第3象限中的平台撤去,记录60 s小鼠通过第3象限目标平台的次数。

1.3.4.3 内皮细胞CD31表达水平检测 采用免疫荧光法检测内皮细胞CD31表达水平。具体方法如下:用3%戊巴比妥钠深度麻醉小鼠,0.9% NaCl溶液和4%多聚甲醛溶液经心内灌注,脑组织石蜡包埋,冠状面切片。选择4 μm 厚度切片用预热的

EDTA抗原修复液修复15 min,冷却2~3 h至室温。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后,用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱孵育1 h。随后滴加一抗CD31(1:500)覆盖脑组织,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日滴加相对应的二抗避光37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后取出,PBS洗净后,滴加含4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)的抗淬灭封片剂5~10 min,盖玻片封片,共聚焦显微镜下拍照观察,随机选取皮层3个不重叠的视野,每组选3张切片。

1.3.4.4 全脑组织蛋白表达量检测 采用Western blot检测3组小鼠全脑组织ZO-1、Occludin、Claudin-5、p-NF- κB 、IL-1 β 、TNF- α 、TRPM2、p-Akt、p-GSK3 β 的蛋白表达量。提取蛋白后BCA定量试剂盒测定蛋白浓度,配制10%分离胶进行电泳,100 mA、4 $^{\circ}\text{C}$ 转膜,常温封闭2 h,一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,次日二抗常温孵育1 h,滴加ECL化学发光液与凝胶成像系统拍照,计算灰度值得出蛋白表达量。

1.4 统计学分析

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料符合正态分布,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析,若方差齐,两两比较采用LSD- t 法;若方差不齐,两两比较则采用Games-Howell法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组mNSS比较

与假手术组同一时间点比较,模型组mNSS在第1、3、5、7日均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组同一时间点比较,24A组第3、7天mNSS明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3组mNSS比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	第1天	第3天	第5天	第7天
假手术组	8	3.00 \pm 0.71	2.50 \pm 1.12	1.75 \pm 0.66	1.88 \pm 0.78
模型组	8	6.75 \pm 1.09 ¹⁾	6.25 \pm 0.66 ¹⁾	5.25 \pm 0.66 ¹⁾	5.13 \pm 0.78 ¹⁾
24A组	8	6.75 \pm 1.09	5.00 \pm 0.71 ²⁾	4.50 \pm 1.00	3.38 \pm 0.86 ²⁾

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.05$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham surgery group at the same time, 1) $P<0.05$; compared with the model group at the same time, 2) $P<0.05$.

2.2 3组认知功能比较

与假手术组比较,模型组NORT 1、24 h识别指数均明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,24A组NORT 1、24 h识别指数均明显

升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图1、表2。与假手术组比较,模型组干预后第2~4天逃避潜伏期明显延长,穿越目标平台次数明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,24A组干

预后第3、4天逃避潜伏期明显缩短,穿越目标平台次数明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图2、表3。

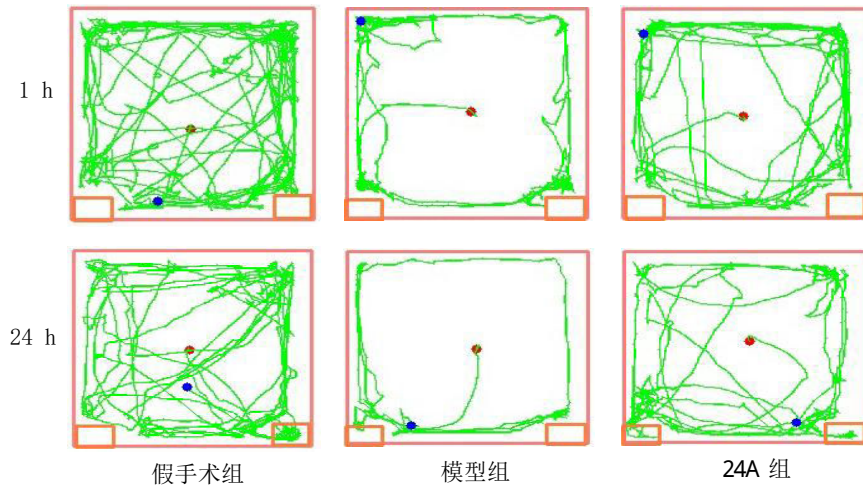


图1 3组NORT轨迹图

Figure 1 NORT track in three groups

表2 3组NORT识别指数比较($\bar{x}\pm s$)
Table2 Comparison of NORT recognition index in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	1 h识别指数/%	24 h识别指数/%
假手术组	8	70.11±7.40	68.98±7.50
模型组	8	42.42±5.83 ¹⁾	28.05±6.54 ¹⁾
24A组	8	57.95±4.96 ²⁾	58.98±2.52 ²⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham surgery group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

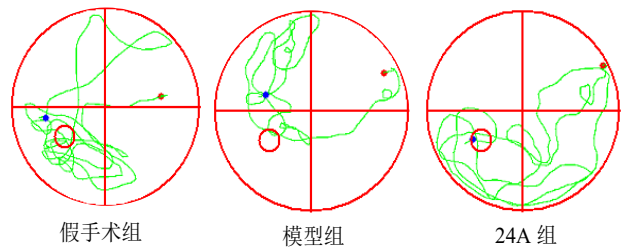


图2 3组MWM测试轨迹图

Figure 2 MWM test track in three groups

表3 3组MWM结果和穿越目标平台次数比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of result of MWM and frequency of target platform crossings in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	逃避潜伏期/s				穿越目标平台次数/次
		第1天	第2天	第3天	第4天	
假手术组	8	59.16±1.64	34.71±12.72	16.56±6.62	10.74±2.24	5.25±1.98
模型组	8	58.97±1.04	52.77±6.21 ¹⁾	46.17±9.28 ¹⁾	28.28±12.00 ¹⁾	1.25±1.20 ¹⁾
24A组	8	58.46±1.44	48.48±7.40	25.82±5.78 ²⁾	17.56±6.05 ²⁾	3.75±1.20 ²⁾

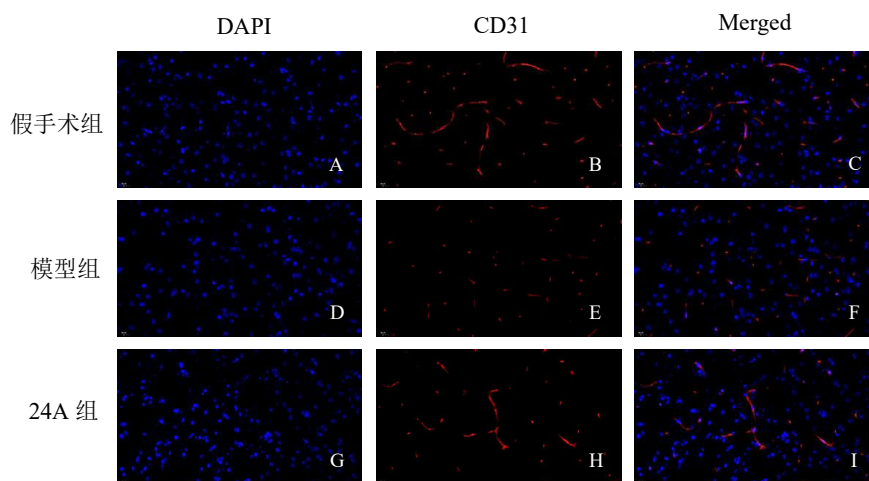
注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.05$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham surgery group at the same time, 1) $P<0.05$; compared with the model group at the same time, 2) $P<0.05$.

2.3 3组CD31、ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达水平比较

假手术组CD31荧光表达较为密集,呈现红色荧光;与假手术组比较,模型组CD31荧光表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,24A组CD31荧光表

达明显升高($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达量明显下降($P<0.05$);与模型组比较,24A组ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达量明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图3、图4、表4。



注:A、D、G为DAPI表达;B、E、H为CD31表达;C、F、I为DAPI和CD31叠加图。
Note: A, D and G represent the expression of DAPI; B, E and H represent the expression of CD31;
C, F and I represent the superposition of DAPI and CD31.

图3 3组CD31免疫荧光表达水平比较($\times 200$)

Figure 3 Comparison of immunofluorescence expression of CD31 in three groups ($\times 200$)

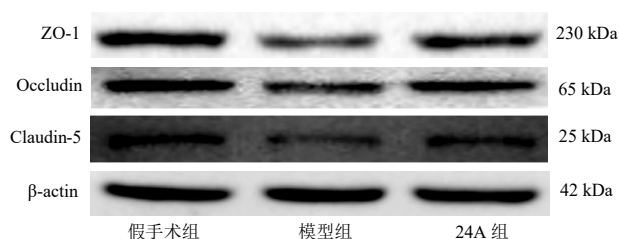


图4 3组ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白条带图

Figure 4 Protein band figure of ZO-1, Occludin and Claudin-5 in the three groups

表4 3组ZO-1、Occludin、Claudin-5蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of protein expression of ZO-1, Occludin and Claudin-5 in the three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ZO-1	Occludin	Claudin-5
假手术组	3	0.96 \pm 0.09	1.01 \pm 0.08	1.05 \pm 0.02
模型组	3	0.51 \pm 0.03 ¹⁾	0.52 \pm 0.08 ¹⁾	0.59 \pm 0.08 ¹⁾
24A组	3	0.85 \pm 0.06 ²⁾	0.83 \pm 0.04 ²⁾	0.95 \pm 0.06 ²⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham surgery group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

2.4 3组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平比较

与假手术组比较,模型组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平均明显上升,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,24A组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平均明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图5、表5。

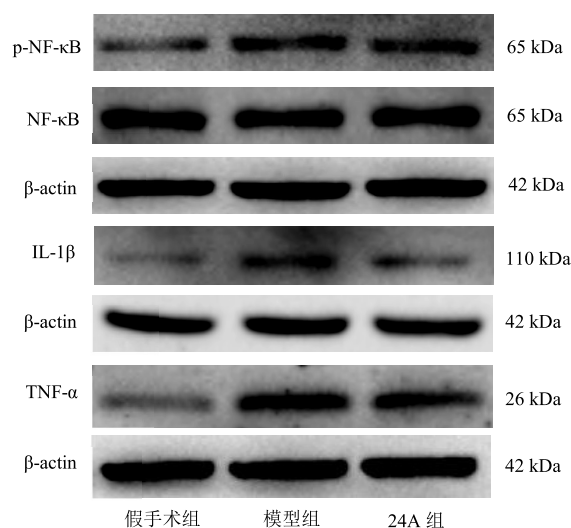


图5 3组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白条带图

Figure 5 Protein band figure of p-NF- κ B, IL-1 β and TNF- α in the three groups

表5 3组p-NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of p-NF- κ B, IL-1 β and TNF- α protein expression in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	p-NF- κ B	IL-1 β	TNF- α
假手术组	3	1.05 \pm 0.16	1.05 \pm 0.14	0.92 \pm 0.10
模型组	3	2.01 \pm 0.09 ¹⁾	1.80 \pm 0.11 ¹⁾	1.56 \pm 0.20 ¹⁾
24A组	3	1.62 \pm 0.09 ²⁾	1.40 \pm 0.09 ²⁾	1.11 \pm 0.17 ²⁾

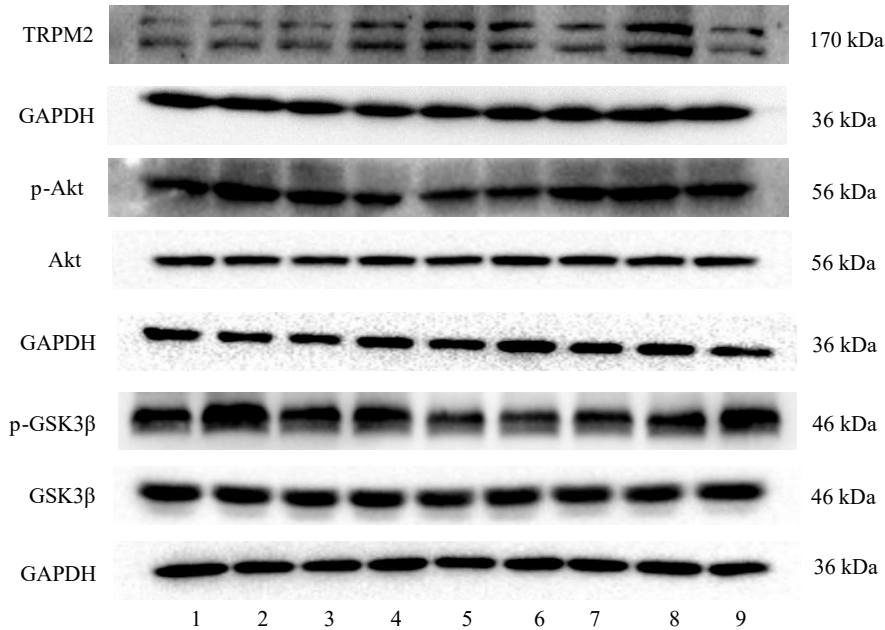
注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham surgery group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

2.5 3组 TRPM2、p-Akt、p-GSK3β 蛋白表达比较

与假手术组比较,模型组 TRPM2 表达明显增加 ($P<0.05$), p-Akt、p-GSK3β 表达明显下降,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$);与模型组比较,24A 组

TRPM2 表达明显下降 ($P<0.05$), p-Akt、p-GSK3β 表达明显增加,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图6、表6。



注:1~3为假手术组;4~6为模型组;7~9为24A组。

Note: 1-3 are the sham surgery group; 4-6 are the model group; 7-9 are the 24A group.

图6 3组 TRPM2、p-Akt、p-GSK3β 蛋白条带图

Figure 6 Protein band figure of TRPM2, p-Akt and p-GSK3β in three groups

表6 3组 TRPM2、p-Akt、p-GSK3β 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of protein expression of TRPM2, p-Akt and p-GSK3β in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TRPM2	p-AKT	p-GSK3β
假手术组	3	0.40±0.01	0.88±0.05	0.97±0.09
模型组	3	0.74±0.06 ¹⁾	0.48±0.04 ¹⁾	0.36±0.06 ¹⁾
24A组	3	0.53±0.06 ²⁾	0.78±0.05 ²⁾	0.62±0.07 ²⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham surgery group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

3 讨论

3.1 24A 可改善 CI/RI 小鼠神经功能和认知功能

本研究结果显示,与模型组比较,24A 组小鼠 mNSS 评分明显降低, NORT 1、24 h 识别指数均明显升高, MWM 逃避潜伏期缩短, 穿越目标平台次数增加, 提示 24A 可改善小鼠的神经功能、认知功能。这可能和以下因素有关:① 脑血流再灌注损伤过程中 BBB 通透性增加可能会介导血管危险因素引起的

认知功能损害^[9]。BBB 结构的完整是维持正常认知行为能力的生理基础^[10], 药物干预可能通过改善 BBB 而改善认知功能。维持 BMECs 正常结构和功能及 TJs 完整是维持 BBB 结构稳定性的核心。CD31 在内皮细胞间连接处高度富集, 为内皮细胞主要标志物, 能够反映脑微血管生成程度^[11]。Claudin-5、Occludin 和 ZO-1 是具有不同的分子结构和生理功能的 TJs, 分布于 BMECs 细胞膜表面, 协同合作, 共同维持 BBB 的结构和功能。24A 干预后 CD31、Claudin-5、Occludin 和 ZO-1 表达量有所上升, 提示 24A 可减少 CI/RI 后 BMECs 和 TJs 的破坏, 保护 BBB 完整性^[12]。② 有研究显示, 减少炎症因子表达可保护 BMECs 和 TJs。脑缺血再灌注过程中产生大量的炎症因子是 BMECs 功能障碍的核心分子机制。NF-κB 是 CI/RI 后炎症级联反应的起始因子, 缺血导致 NF-κB 蛋白表达量明显增加, 触发下游 TNF-α 和 IL-1β 等细胞因子的表达, 进而放大炎症效应^[13]。24A 减少 CI/RI 后磷酸化 NF-κB、IL-1β、TNF-α 的产

生,提示24A减少炎症因子的释放,保护BMECs和TJs,与先前研究发现减少炎症相关因子NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 表达能改善氧糖剥夺/复氧后BMECs损伤的结果一致^[14]。

3.2 24A保护BMECs可能与调控TRPM2/Akt/GSK3 β 通路有关

本研究结果显示,与模型组比较,24A组TRPM2表达水平明显降低,p-Akt、p-GSK3 β 表达水平明显升高,提示24A可能通过调控TRPM2/Akt/GSK3 β 通路保护BMECs和TJs。可能与以下因素有关:①TRPM2介导趋化因子产生,募集炎症因子至损伤部位,破坏TJs,参与缺血后内皮细胞的破坏^[15-16],其激活介导ZO-1的降解^[17]。本研究显示,24A干预后,抑制TRPM2表达,进而降低炎症因子水平,减轻BMECs损伤,这与先前研究发现抑制TRPM2可减少炎症因子产生和细胞凋亡,保护BMECs的结果一致^[18]。②Akt/GSK3 β 通路激活可上调ZO-1和Claudin-5的表达,减轻脑缺血再灌注导致的BBB损伤^[19]。Akt/GSK3 β 通路参与负调控NF- κ B,从而抑制炎症的加剧^[20],减轻脑缺血再灌注期间BBB的损伤。此外,TRPM2激活可使Akt的磷酸化受抑制,促凋亡因子GSK3 β 增多,促进内皮细胞凋亡^[21]。24A干预后,TRPM2表达减少,而磷酸化的Akt和磷酸化GSK3 β 表达明显升高,这有助于发挥抗炎作用,保护BBB,这与HUANG等^[21]研究结果一致。

4 小结

24A可能通过调控TRPM2/Akt/GSK3 β 通路减轻炎症反应,抑制BMECs损伤和TJs降解,从而改善BBB破坏,发挥脑保护作用,进而改善CI/RI导致的认知障碍。但本研究尚未从分子生物学角度进一步揭示24A作用于TRPM2的确切机制,有待今后进一步探索。

参考文献

- [1] SUN K, FAN J Y, HAN J Y. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
- [2] PAGE S, MUNSELL A, AL-AHMAD A J. Cerebral hypoxia/ischemia selectively disrupts tight junctions complexes in stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2016, 13(1): 16.
- [3] GAO J Q, WANG P, YAN J W, et al. Shear stress rescued the neuronal impairment induced by global cerebral ischemia reperfusion via activating PECAM-1-eNOS-NO pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 631286.
- [4] MIYANOHARA J, KAKAE M, NAGAYASU K, et al. TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(14): 3520-3533.
- [5] XU H, ZHANG G B, DENG L. Kukoamine A activates Akt/GSK-3 β signaling pathway to inhibit oxidative stress and relieve myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Cir Bras*, 2022, 37(4): e370407.
- [6] TURLOVA E, FENG Z P, SUN H S. The role of TRPM2 channels in neurons, glial cells and the blood-brain barrier in cerebral ischemia and hypoxia [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(5): 713-721.
- [7] WANG K, ZHANG B B, SONG D Z, et al. Alisol A alleviates arterial plaque by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway in ApoE-deficient mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 580073.
- [8] ZHU L R, WANG L, JU F R, et al. Transient global cerebral ischemia induces rapid and sustained reorganization of synaptic structures [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(8): 2756-2767.
- [9] ZHANG X, YEUNG P K K, MCALONAN G M, et al. Transgenic mice over-expressing endothelial endothelin-1 show cognitive deficit with blood-brain barrier breakdown after transient ischemia with long-term reperfusion [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2013, 101: 46-54.
- [10] DONG B B, YANG Y Y, ZHANG Z S, et al. Hemopexin alleviates cognitive dysfunction after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *BMC Anesthesiol*, 2019, 19(1): 13.
- [11] LIAO D Y, SUNDLOV J, ZHU J Q, et al. Atomic level dissection of the platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) homophilic binding interface: implications for endothelial cell barrier function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(2): 193-204.
- [12] SHIN J A, YOON J C, KIM M, et al. Activation of classical estrogen receptor subtypes reduces tight junction disruption of brain endothelial cells under ischemia/reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 92: 78-89.
- [13] MENG Q T, CHEN R, CHEN C, et al. Transcription factors Nrf2 and NF- κ B contribute to inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1731-1740.
- [14] HAO Z Y, ZHANG Z Y, ZHAO Y H, et al. Baicalin reduces immune cell infiltration by inhibiting inflammation and protecting tight junctions in ischemic stroke injury [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(2): 355-372.
- [15] HECQUET C M, MALIK A B. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(4): 619-625.
- [16] BUELOW B, SONG Y M, SCHARENBERG A M. The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(36): 24571-24583.
- [17] WANG T, WANG L C, MORENO-VINASCO L, et al. Particulate

matter air pollution disrupts endothelial cell barrier via calpain-mediated tight junction protein degradation [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2012, 9:35.

- [18] HUANG J, ZHANG R L, WANG S W, et al. Methamphetamine and HIV-tat protein synergistically induce oxidative stress and blood-brain barrier damage via transient receptor potential melastatin 2 channel [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:619436.
- [19] CAI H, HUANG L Y, HONG R, et al. *Momordica charantia* exosome-like nanoparticles exert neuroprotective effects against ischemic brain injury via inhibiting matrix metalloproteinase 9 and

activating the AKT/GSK3 β signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:908830.

- [20] LI L, MCBRIDE D W, DOYCHEVA D, et al. G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats [J]. *Exp Neurol*, 2015, 272:135-144.
- [21] HUANG S, TURLOVA E, LI F Y, et al. Transient receptor potential melastatin 2 channels (TRPM2) mediate neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice [J]. *Exp Neurol*, 2017, 296:32-40.

Protective Mechanism of Alisol A 24-Acetate on Brain Microvascular Endothelial Cells in Mice with Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by TRPM2/Akt/GSK3 β Pathway

LI Huihong¹, DENG Yunfei¹, WEI Wei^{2,3}, ZHAN Zengtu^{2,3}, LIN Libin¹, XUE Xiehua^{2,3,4*}

¹ College of Rehabilitation Medical, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² The Affiliated Rehabilitation of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China;

³ Key Laboratory of Cognitive Rehabilitation of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350003, China;

⁴ Key Laboratory of Rehabilitation Technology of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: XUE Xiehua, E-mail: fl10015@fjtc.edu.cn

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of Alisol A 24-acetate (24A) on improving brain microvascular endothelial cells (BMECs) injury after cerebral ischemia reperfusion in mice. **Methods:** A total of 45 10-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into sham surgery group, model group and 24A group, with 15 cases in each group. The model group and the 24A group were treated with 20 min bilateral common carotid artery ligation followed by reperfusion to establish a cerebral ischemia reperfusion injury (CI/RI) model, but the common carotid artery and vagus nerve were separated without ligation in the sham surgery group. The 24A group was given 24A through intragastric administration with the dosage of 30 mg/(kg·d), and the sham surgery group and the model group were given equal volume of normal saline through intragastric administration. All three groups were given intragastric administration once a day, for seven consecutive days. Modified neurological severity score (mNSS) was used to evaluate neurological deficit; novel object recognition test (NORT) and Morris water maze (MWM) were used to evaluate the cognitive function; immunofluorescence was used to detect the expression of CD31 in cortex; Western blot was used to detect zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, Claudin-5, phosphorylated nuclear factor kappa-B (p-NF- κ B), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), transient receptor potential melastatin-2 (TRPM2), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), phosphorylated glycogen synthetase kinase-3 β (p-GSK3 β) protein expression levels. **Results:** (1) Neurological function: compared with the sham surgery group, mNSS in the model group significantly increased at the 1st, 3rd, 5th and 7th day ($P<0.05$); compared with the model group, mNSS in the 24A group significantly decreased at the 3rd and 7th day ($P<0.05$). (2) Cognitive function: compared with the sham surgery group, the NORT recognition index at 1st and 24th hour in the model group was significantly lower ($P<0.05$); compared with the model group, the 1-hour and 24-hour NORT recognition index in the 24A group significantly increased ($P<0.05$). Compared with the sham surgery group, the escape latency of the model group significantly prolonged and the number of times of crossing the platform significantly reduced from day 2 to day 4 after intervention ($P<0.05$); compared with the model group, the escape latency of the 24A group was significantly shortened from day 3 to day 4 after intervention, and the number of platform-site crossovers was significantly increased ($P<0.05$). (3) The expression of CD31, ZO-1, Occludin, Claudin-5 protein: the fluorescence expression of CD31 in the sham surgery group was dense and showed red fluorescence; compared with the sham surgery group, the fluorescence expression of CD31 in the model group significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, CD31 fluorescence expression in 24A group significantly increased ($P<0.05$). Compared with the sham group, ZO-1, Occludin and Claudin-5 protein expression levels in the model group significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, protein expression levels of ZO-1, Occludin and Claudin-5 in the 24A group significantly increased ($P<0.05$). (4) Protein expression of p-NF- κ B, IL-1 β , TNF- α , TRPM2, p-Akt, p-GSK3 β : compared with the sham surgery group, the expression levels of p-NF- κ B, IL-1 β , TNF- α and TRPM2 in the model group significantly increased, while the expression levels of p-Akt and p-GSK3 β significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression levels of p-NF- κ B, IL-1 β , TNF- α and TRPM2 of the 24A group significantly decreased, while the expression levels of p-Akt and p-GSK3 β significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** 24A can effectively improve the neurological function and cognitive function, reduce inflammatory response and ameliorate BMECs damage of CI/RI mice, which may be related to the regulation of TRPM2/Akt/GSK3 β pathway.

KEY WORDS ischemic stroke; cerebral ischemia reperfusion; Alisol A 24-acetate; brain microvascular endothelial cells; TRPM2/Akt/GSK3 β pathway

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.04005