

黄连总生物碱减轻大鼠脑缺血再灌注引起的神经元损伤： 基于BDNF-TrkB通路

张晓敏¹, 李向阳², 曾 旋², 彭海博³, 魏妮娜³, 牛宪立^{1*}

1. 广东江门中医药职业学院基础医学院, 广东江门 529000

2. 广东省人民医院珠海医院即珠海市金湾中心医院, 广东珠海 519100

3. 遵义医科大学珠海校区生物工程学院, 广东珠海 519041

摘 要: **目的** 观察黄连总生物碱对脑缺血再灌注大鼠神经功能损伤后的影响。**方法** 运用SD大鼠建立大脑中动脉闭塞缺血(MCAO)模型,将45只健康雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、黄连总生物碱(高、中、低浓度)组,每组9只。予假手术组与模型组大鼠生理盐水灌胃,黄连总生物碱(高、中、低浓度)组采用不同浓度的黄连总生物碱灌胃。给药7 d后运用Longa的5分法评分标准对各组大鼠神经功能缺损评分,观察海马组织病理学改变及海马组织超氧化物歧化酶(SOD)的活力、丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量变化等情况,采用Western blotting检测各组大鼠海马区BDNF、TrkB蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比较,模型组的神经功能缺损评分显著提高($P<0.05$),血清中的SOD活力和GSH含量明显降低($P<0.05$),而MDA含量明显增加($P<0.05$);海马组织细胞排列混乱不规则,网状纤维遭到破坏,脑细胞肿胀坏死,形成胶质瘢痕,有明显的核固缩现象;BDNF蛋白、TrkB蛋白表达量明显减少($P<0.001$)。与模型组相比,黄连总生物碱治疗组用药7 d后大鼠神经功能缺损评分均明显降低($P<0.05$);海马神经元组织胶质瘢痕明显减小,病变程度得到明显改善;黄连总生物碱各剂量组中的SOD活力和GSH含量水平均显著提升($P<0.05$),MDA活力均显著降低($P<0.05$);且Western blotting检测发现高、中浓度组BDNF、TrkB蛋白表达量明显高于模型组($P<0.05$ 或 0.01)。**结论** 黄连总生物碱对海马区神经元细胞的保护作用,通过上调BDNF和其受体TrkB蛋白表达水平减轻神经元损伤。

关键词: 脑缺血再灌注; 黄连总生物碱; BDNF-TrkB信号通路

DOI: 10.20227/j.cnki.2096-3610.2025.02.009

Total alkaloids from *Coptis chinensis* mitigate neuronal damage induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats: involvement of the BDNF-TrkB pathway

ZHANG Xiaomin¹, LI Xiangyang², ZENG Xuan², PENG Haibo³, WEI Nina³, NIU Xianli^{1*}

1. Basic Medical Department, Guangdong Jiangmen Chinese Medical College, Jiangmen 529000, China

2. Zhuhai Hospital, Guangdong Provincial People's Hospital (Zhuhai Jinwan Central Hospital), Zhuhai 519100, China

3. Bioengineering Department, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of total alkaloids of *Coptis chinensis* on neurological function impairment following cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Methods** A model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established in 45 healthy male SD rats, which were randomly assigned into sham operation group, model group, and treatment groups with high, medium, and low concentrations of total alkaloids of *Coptis chinensis*, each with 9 rats. The sham operation group and model group rats were handled daily and administered saline intraperitoneally. The treatment groups were given different concentrations of total alkaloids of *Coptis chinensis* via gavage. After 7 days of treatment, the neurological deficit scores of the rats in each group were evaluated using the 5-point scoring system proposed by Longa,

收稿日期: 2024-09-10

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究基金(QZYY-2022-006号), 贵州省科学技术厅科技计划基金(黔科合基础-ZK[2022]一般602), 贵州省卫生健康委科学技术基金(gzkwj2021-011号), 广东省中医药局中医药科研(20232162), 遵义医科大学博士科研启动基金(F-ZH-011)

作者简介: 张晓敏, 副主任护师, E-mail: 852109990@qq.com

通信作者: 牛宪立, 博士, 高级实验师, E-mail: nxl2016_gd@163.com

and the pathological changes in the hippocampal tissue were observed. The activities of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and reduced glutathione (GSH) in the hippocampal tissue were measured, and the expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tropomyosin Receptor Kinase B (TrkB) proteins in the hippocampal region was detected by Western blotting. **Results** Compared with the sham operation group, the neurologic deficit score of the model group was significantly increased ($P<0.05$), the activity of SOD and the content of GSH in serum were significantly decreased ($P<0.05$), while the content of MDA was significantly increased ($P<0.05$). The cells of hippocampus were disordered and irregularly arranged, the reticular fibers were destroyed, the brain cells were swollen and necrotic, and formed glial scar with obvious nuclear pyknosis, and the expression of BDNF protein and TrkB protein were obviously decreased ($P<0.001$). Compared with the model group, the neurologic deficit scores of rats in the total alkaloid treatment group were significantly decreased after 7 days ($P<0.05$), and the glial scar in the hippocampus was significantly reduced, the activities of SOD and GSH were significantly increased ($P<0.05$), and the activities of MDA were significantly decreased ($P<0.05$) in each dose group of total alkaloids of *Coptis chinensis* western blotting showed that the expression levels of BDNF and TrkB in the high and middle concentration groups were significantly higher than those in the model group ($P<0.001$). **Conclusion** The protective effect of total alkaloids of rhizoma *Coptidis* on hippocampal neurons can be alleviated by up-regulating the expression of BDNF and its receptor TrkB.

Key words: *Coptis chinensis*; cerebral ischemia-reperfusion; BDNF-TrkB signal pathway

脑缺血尤其是缺血性脑卒中发病率高,致残率和致死率居高不下,给社会和个人带来了沉重的负担。脑缺血损伤后氧供需失衡和糖代谢紊乱是导致患者致残的主要原因^[1]。脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体酪氨酸激酶受体B(TrkB)在神经细胞的发育、存活、增殖以及突触可塑性等方面起着至关重要的作用,该信号通路被广泛认为是治疗神经退行性疾病和神经损伤的潜在靶点。基于BDNF-TrkB信号通路的神经保护策略受到了广泛关注,BDNF-TrkB信号通路在神经保护和再生中的作用逐渐被揭示。该信号通路不仅参与神经细胞的存活和增殖,还通过调控基因表达和细胞代谢等多个方面,对神经细胞的抗衰老和突触可塑性起到关键作用^[2]。

黄连富含多种生物碱,如小檗碱(Berberine)、巴马汀(Palmatine)及黄连碱(Coptisine)等,具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化等多种药理作用,还具有降低血压、降血糖、扩张血管和抗肿瘤等作用,可以保护和修复损伤的神经细胞和组织的功能^[3],在中医临床中具有广泛的应用。推测黄连总生物碱可能通过影响神经细胞的生存环境、减少神经元损伤等途径来发挥神经保护作用。而BDNF-TrkB信号通路作为神经保护的重要机制之一,可能在此过程中发挥关键作用。因此本研究通过建造大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型^[4],探讨黄连总生物碱对海马神经元损伤后的神经保护作用,以明确黄连总生物碱在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料、试剂及动物

SPF级SD雄性大鼠,6月龄,体质量约220 g,由珠海市百试通生物科技公司提供(许可证号:SCXK[粤]2020-0054);黄连总生物碱由遵义医科大学珠海校区生物工程学院药学实验室提供,总纯度>95%;乌来糖(氨基甲酸乙酯)(国药集团化学试剂有限公司)、苏木色精(上海化学试剂厂)、还原型谷胱甘肽、丙二醛等(南京建成)。本实验已通过伦理审批,编号为[2021]2-068。

1.2 实验方法

1.2.1 脑缺血再灌注模型的建造 大鼠在造模前8 h进水不进食,经麻醉(巴比妥钠溶液,200 mg/kg,腹腔注射)后,根据史海燕等^[4]造模方法,大鼠颈中部切口,找到右侧颈总动脉分叉处结扎近心端,采用止血钳将其颈内动脉夹闭,造成大鼠中动脉(MCA)局灶性脑缺血,1 h后松开止血钳,实现局灶性脑缺血再灌注。消毒缝合,直到大鼠恢复活动,观察侧肢体行走障碍,进行神经功能评分,以确定模型制备成功。

1.2.2 实验组动物神经功能评价 采用Longa等制定的6级5分法对模型大鼠的神经功能进行综合评估。依照Longa的5分法评分标准^[5],包含0~5分,得分越高则表明神经功能缺损越严重,但神经功能缺损过于轻或严重都不用于实验。1~3分者视为造模成功,纳入实验,见表1。

1.2.3 实验分组和处理 采用45只健康雄性SD大鼠,随机分5组,每组9只。除假手术组外,采用大

表1 Longa的5分法评分标准

表现	分数
无神经损伤	0
提尾的时候对侧前肢内收屈曲(轻度神经损伤)	1
爬行时向对侧旋转(中度神经损伤)	2
站立或爬行时,向对侧倾倒(重度神经损伤)	3
无自主活动伴意识障碍	4
死亡	5

鼠线栓法建立MCAO模型^[6],建模成功后随机分为:模型组,黄连总生物碱高质量浓度(10.0 g/L)组,中浓度(5.0 g/L)组,低浓度(2.5 g/L)组。假手术组只切开颈部,不做大脑中动脉阻塞。治疗组用黄连总生物碱灌胃,而模型组和假手术组给予生理盐水。根据人和大鼠的等效剂量的关系进行折算,每只大鼠每天灌胃两次,每次灌胃2 mL,连续用药7 d。在最后一次灌胃以后,进水不进食,12 h后颈椎脱臼处死大鼠,并取脑组织,-20℃存放备用^[7-8]。

1.2.4 测定SOD活力以及MDA、GSH的含量 将大鼠颈椎脱臼法处死后将其血液采集于含肝素钠的ET管中,离心5 min后取其上清液,并根据SOD、MDA、GSH试剂盒的使用说明书操作,用酶标仪于540 nm处测量吸光度(A),根据标准曲线计算含量^[9]。

1.2.5 组织切片制备及HE染色分析 将大鼠脑组织采用4%的多聚甲醛进行固定,脱水,石蜡浸蜡,并将其包埋并作成切片备用。组织切片经二甲苯溶液脱蜡,经苏木素染色5~8 min,伊红25 s复染,脱水透明和封固^[10]。

1.2.6 Western blotting检测BDNF与其受体TrkB蛋白水平的表达 分离大鼠海马组织,用蛋白提取试剂盒对组织蛋白进行提取后,BCA法测定蛋白含量,Western blotting实验检测BDNF、TrkB蛋白^[11]表达。经电泳分离蛋白、转膜、封闭、加抗、曝光。最后应用Imagej2x分析软件分析条带灰度,进行半定量比较分析。

1.3 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用Graphpad Prism 9.5软件进行,各组数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内两两比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄连总生物碱对大鼠脑缺血后神经功能评分的影响

依据SD大鼠MCAO模型的构建完成,给药7 d

后进行Longa的5分法对各组大鼠进行神经功能评分,与假手术组比较,模型组评分显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,通过黄连总生物碱治疗后各剂量组神经功能评分均有降低,其中高剂量组降低最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表2。

表2 各组大鼠的Longa法评分结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$,分)

组别	分数
假手术组	0
模型组	3.12 ± 0.47^a
黄连高浓度组(10.0 g/L)	2.09 ± 0.31^{ab}
黄连中浓度组(5.0 g/L)	2.36 ± 0.42^{acd}
黄连低浓度组(2.5 g/L)	2.79 ± 0.24^{acde}

与假手术组比较:^a $P < 0.05$;与模型组比较:^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与黄连高浓度组比较:^d $P < 0.01$;与黄连中浓度组比较:^e $P < 0.01$ 。

2.2 ELISA检测海马组织中SOD、MDA和GSH的影响

大鼠脑缺血再灌注24 h后,与假手术组比较,模型组的SOD活力和GSH含量明显降低($P < 0.05$),而MDA含量明显增加($P < 0.05$);与模型组相比,黄连总生物碱治疗后能使SOD活力升高和GSH含量提升($P < 0.05$),MDA活力降低($P < 0.05$),且随剂量增加,作用明显增强。说明黄连总生物碱各治疗组对大鼠脑缺血再灌注损伤是具有一定的保护和恢复作用(表3)。

2.3 黄连总生物碱对脑缺血后海马组织病理学改变的影响

大鼠的脑组织HE染色具体情况,如下图1所示。假手术组的大鼠海马区脑细胞形态结构清晰,脑细胞排列紧密有序,细胞核圆形,细胞轮廓清晰;与假手术组比较,模型组的脑细胞排列混乱不规则,网状纤维遭到破坏,脑细胞肿胀坏死,形成胶质瘢痕,有明显的核固缩现象;给予黄连总生物碱治疗后胶质瘢痕明显减小,脑组织病变的程度明显降低。

2.4 黄连总生物碱对脑缺血后海马BDNF、TrkB蛋白表达的影响

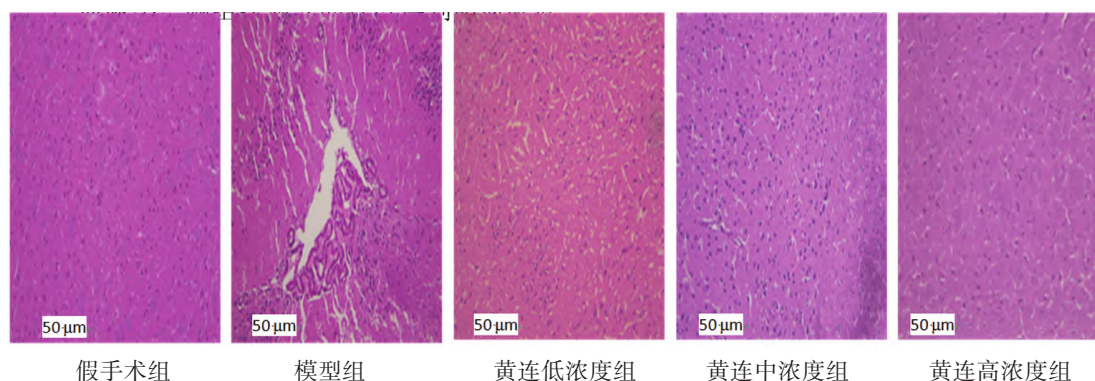
研究结果显示,与假手术组相比,模型组BDNF蛋白、TrkB蛋白表达量明显减少($P < 0.05$ 或 0.01)。与模型组相比,黄连总生物碱给予治疗后,高浓度给药组和中浓度给药组BDNF、TrkB蛋白表达量比模型组明显升高($P < 0.05$ 或 0.01),见图2。

表3 各组大鼠血浆上清液SOD、MDA、GSH的含量的结果

($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	SOD活力/U mgprot ⁻¹	MDA含量/nmol mgprot ⁻¹	GSH含量/nmol mgprot ⁻¹
假手术组	20.77 ± 1.06	0.63 ± 0.11	30.70 ± 0.91
模型组	14.12 ± 0.73 ^a	2.37 ± 0.41 ^a	18.52 ± 1.41 ^a
黄连高浓度组	19.07 ± 0.60 ^{ab}	0.83 ± 0.10 ^{ab}	27.97 ± 0.91 ^{ab}
黄连中浓度组	16.89 ± 0.85 ^{acd}	1.65 ± 0.08 ^{acd}	24.61 ± 1.23 ^{acd}
黄连低浓度组	15.33 ± 0.91 ^{acde}	1.87 ± 0.08 ^{acde}	21.12 ± 1.09 ^{acde}

与假手术组比较:^a $P < 0.05$;与模型组相比:^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与黄连高浓度组比较:^d $P < 0.01$;与黄连中浓度组比较:^e $P < 0.01$ 。

图1 大鼠脑组织HE染色图($\times 200$)

3 讨论

脑缺血再灌注损伤是一个多因素诱导、多环节参与的复杂病理过程,通常发生发展与脑内重要边缘系统结构-海马区域神经细胞的萎缩和坏死有重要关系^[12-13]。与正常人的大脑海马体积相比,脑缺血患者海马体积明显缩小,且缩小程度与缺血持续时间呈正相关^[14]。因此,如果能够激活海马区内源性神经前体细胞,促进成年脑神经元再生,将有可能是脑缺血再灌注损伤治疗的一个突破性变革^[15]。谷氨酸是中枢神经系统主要的兴奋性神经递质,在信息传递中起重要作用。当脑组织发生缺血再灌注时,通常会有伴有神经兴奋性毒性、氧化应激、细胞凋亡等机制引起脑组织损伤,并产生了大量的细胞氧化自由基。由于SOD和GSH都具有清除内源性氧化自由基的能力,保护细胞免受氧化损伤,因此可以通过其SOD和GSH的活性指标来反应机体对自由基的清除能力。MDA则是脂质氧化反应的代谢产物,能够很好地反应细胞的损伤程度^[16]。有研究显示BDNF与TrkB结合形成信号复合体进入细胞,调控多条信号通道与谷氨酸的释放有关。BDNF短时间作用于皮层神经元时,依赖钙离子通道途径,在谷氨酸转运体的参与下,促进谷氨酸短暂且快速释放;脑缺血后,谷氨酸摄取障碍,细胞外谷氨酸含量升高,过量的谷氨酸堆积会活化细胞表

面受体,激活钙离子通道,使 Ca^{2+} 内流导致细胞内钙超载,最终导致神经元凋亡;胞外谷氨酸含量升高,谷氨酸\胱氨酸转运体系的动态平衡被破坏,使具有抗氧化作用的谷胱甘肽水平急剧下降,活性氧含量不断上升引起神经元凋亡^[17]。许多研究证明中药提取物中的生物碱类化合物具有抑制 Ca^{2+} 内流或是拮抗Glu受体基因的表达,从而达到缓解脑缺血再灌注损伤^[18]。本研究结果显示,脑缺血再灌注损伤后,SOD的活力和GSH含量水平明显降低,黄连总生物碱各治疗组中SOD活力和GSH含量水平均得到显著提升($P < 0.05$);脑缺血后大鼠的MDA水平明显增加($P < 0.05$),给药治疗后MDA水平得到明显改善。BDNF在神经系统的发育、功能维持和神经元的形成等方面起着重要作用,它是脑内分布最广的神经营养因子。许多实验证明上调BDNF的表达能显著改善动物神经功能状态、缩小梗死体积,如Wolf等^[19]于脑室内注入BDNF,显著缩小局灶脑缺血大鼠脑皮质梗死体积;可能通过上调BDNF-TrkB-CREB通路蛋白,增强突触可塑性,减轻脑缺血再灌注损伤大鼠的认知障碍^[20]。因此研究药物提高内源BDNF蛋白和其受体TrkB蛋白表达可作为治疗脑缺血的途径之一。本研究发现黄连总生物碱可以显著降低脑缺血再灌注大鼠脑组织的梗死面积,其可能是黄连总生物碱有促进脑缺

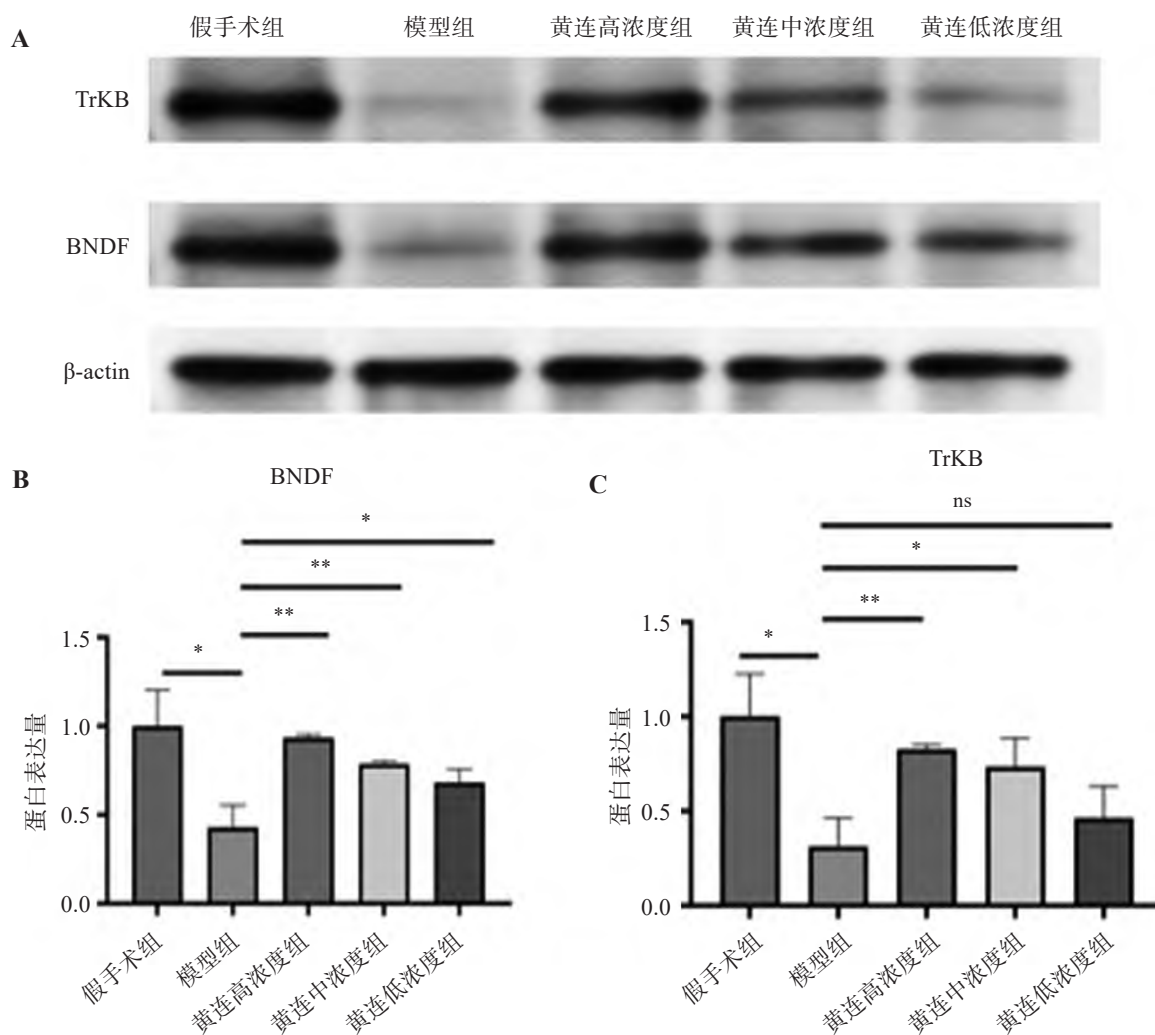


图2 大鼠脑组织BDNF、TrkB蛋白表达水平

A. 不同浓度黄连总生物碱对BDNF、TrkB蛋白电泳图; B. 黄连总生物碱对BDNF蛋白表达; C. 黄连总生物碱对TrkB蛋白表达。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, ns组间比较均 $P > 0.05$ 。

血后神经的重塑有关。黄连总生物碱给药后,和模型组相比,升高脑缺血大鼠血清中的SOD活力和GSH含量水平,降低MDA的含量,同时BDNF、TrkB蛋白表达量均有所提高。

综上所述,黄连总生物碱可能通过激活BDNF-TrkB信号通路,改善缺血后大鼠神经功能损伤,清除细胞氧化自由基,改善了海马区细胞的微环境。本研究揭示了黄连总生物碱对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,也为脑缺血相关疾病的治疗提供了新思路和重要的理论依据。

参考文献:

- [1] FAN X, CHEN H, XU C, et al. S1PR3, as a core protein related to ischemic stroke, is involve in the regulation of blood-brain barrier damage [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 834948.
- [2] 袁洁, 高静, 苏凯奇, 等. 电针对脑缺血再灌注损伤诱导的

学习记忆障碍大鼠BDNF/TRKB/CREB信号通路和海马突触可塑性的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(9): 843-851.

- [3] TOMASSONI D, LANARI A, SILVESTRELLI G, et al. Nimodipine and its use in ce-rebrovascular disease: evidence from recent preclinical and controlled clinical studies[J]. Clin Exp Hypertens, 2008, 30(8): 744-766.
- [4] 史海燕, 史振国, 张超, 等. 益气化痰醒脑汤对急性脑缺血模型大鼠脑组织病理学、神经细胞凋亡及氧化应激损伤的影响[J]. 中国中医技, 2022, 29(3): 363-366.
- [5] YANG Y, ZHAO H, WANG H. Qualitative and qualitative analysis of four different polarity fractions from Huang-Lian-Jie-Du-Decoction by HPLC-DAD-ESIMS/MS and their related neuroprotective effect [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2013(4): 1003-1057.
- [6] 付琳, 付强, 李冀, 等. 黄连化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(2): 87-92.
- [7] 宋珏, 路通, 谢林, 等. 黄连解毒汤的药动学-药效学相关性研究[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2042-2046.

- [8] 张荣媛, 尚爱佳, 段秋华, 等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间血清 SOD 和 MDA 的变化[J]. 军医进修学院学报, 2007(6): 428-429.
- [9] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2006, 9(5): 469.
- [10] 吴敏, 王阶. 黄连有效成分小檗碱抗动脉粥样硬化机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2103-2106.
- [11] KAZERANI H R, FURMAN B L. Comparison of urethane/chloralose and pentobarbitone anaesthesia for examining effects of bacterial lipopolysaccharide in mice [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2006, 20(4): 379-384.
- [12] 卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 等. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1356-1360.
- [13] WON S J, KIM J E, GIORDANO F C S, et al. Assessment at the single-cell level identifies neuronal glutathione depletion as both a cause and effect of Ischemia-reperfusion oxidative stress [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(18): 7143-7152.
- [14] THIELEN P, MEHOKE T, GLEASON J, et al. Exploration of the molecular basis of blast injury in a biofidelic model of traumatic brain injury[J]. *Shock Waves*, 2018, 28(1): 115-126.
- [15] 张立娟, 张蕾, 顾良臻, 等. 缺血性脑损伤谷氨酸兴奋性毒性发生机制及中药调控作用研究进展[J]. 山东中医杂志, 2022, 41(8): 907-914.
- [16] 岳璐, 周天豹, 闫向丽, 等. 中药黄酮类化合物改善脑缺血再灌注损伤的作用及其机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 269-279.
- [17] 袁洁, 高静, 苏凯奇, 等. 电针对脑缺血再灌注损伤诱导的学习记忆障碍大鼠 BDNF/TRKB/CREB 信号通路和海马突触可塑性的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(9): 843-851.
- [18] JING Z, FEIYUE S, et al. Novel insight into the therapeutical potential of flavonoids from traditional chinese medicine against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Frontiers in pharmacology*, 2024, 15: 1352760-1352760.
- [19] WOLF R, SCHABIT Z. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats[J]. *JCBFM*, 1997, 17: 500-506.
- [20] WU P, YAN X, ZHANG Y, et al. The protective mechanism underlying total flavones of *Dracocephalum* (TFD) effects on rat cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *J Toxicol Environ Health*, 2018, 81(21): 1108-1115.

(责任编辑: 李阳飞)