# 麻黄碱调节Keap1/Nrf2信号通路对脑缺血再灌注 模型小鼠神经细胞凋亡的影响

张哲 苏志伟 武萌萌\* (河北省中医院脑病一科,石家庄 050000)

摘要 该研究旨在探讨麻黄碱(EPH)调节Keap1/Nrf2信号通路对脑缺血再灌注(I/R)模型小鼠 神经细胞凋亡的影响。通过大脑中动脉闭塞(MCAO)建立脑I/R小鼠模型,将其分为model组、L-EPH 组、H-EPH组、H-EPH+ML385组,每组12只,另取12只健康大鼠作为假手术组。给药结束后评估 各组大鼠神经功能; TCC测量脑梗死面积; HE染色评估海马体病理损伤; Nissl染色观察海马体神经 元损伤情况; TUNEL染色检测脑组织神经元凋亡情况; 试剂盒测定丙二醛(MDA)含量和超氧化物 歧化酶(SOD)活性; qRT-PCR检测脑组织中Keap1、Nrf2 mRNA表达情况; Western blot检测脑组织 Keap1、Nrf2和凋亡相关蛋白Caspase-3、Bcl-2表达情况;免疫荧光染色定位Nrf2蛋白。研究结果发现, 与假手术组比较, model组I/R小鼠神经元损伤, 神经功能缺损评分升高、脑梗死面积增加、Nrf2 mRNA及蛋白表达水平均降低, Nissl体数量减少, 神经元凋亡率升高、Keap1 mRNA及蛋白表达水 平均升高, Caspase-3蛋白表达水平升高, Bcl-2蛋白表达水平降低(P<0.05); L-EPH和H-EPH组I/R小 鼠神经元损伤减轻,神经功能缺损评分下降、脑梗死面积减少、Nrf2mRNA及蛋白表达水平均降低, Nissl体数量增加,神经元凋亡率下降、Keapl mRNA及蛋白表达水平均升高, Caspase-3蛋白表达水 平降低, Bcl-2蛋白表达水平升高(P<0.05), H-EPH组优于L-EPH组(P<0.05); 而Nrf2抑制剂ML385的 加入抑制了Nrf2表达, 逆转了EPH对I/R小鼠的治疗作用(P<0.05)。总结可得, EPH能够抑制脑I/R小 鼠神经细胞凋亡,可能与调节Keap1/Nrf2通路有关。

关键词 麻黄碱; 脑缺血再灌注模型; 神经元凋亡; Keap1/Nrf2信号通路

# The Effect of Ephedrine on Neuronal Apoptosis in Cerebral Ischemia-Reperfusion Model Mice by Regulating the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway

ZHANG Zhe, SU Zhiwei, WU Mengmeng\*

(Department 1 Brain Disease, Hebei Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract** This study aimed to investigate the effect of EPH (ephedrine) on neuronal apoptosis in mice with cerebral I/R (ischemia-reperfusion) model by regulating the Keap1/Nrf2 signaling pathway. The mouse model of cerebral I/R was established by occlusion of the MCAO (middle cerebral artery) and grouped into model group, L-EPH group, H-EPH group, and H-EPH+ML385 group, with 12 mice in each group. Additionally, 12 healthy mice were included as the sham surgery group. After the administration, the neurological function of mice in each group

\*通信作者。Tel: 19931162646, E-mail: 695995331@qq.com

\*Corresponding author. Tel: +86-19931162646, E-mail: 695995331@qq.com

收稿日期: 2024-11-14 接受日期: 2024-12-05

河北省中医药管理局科研计划(批准号: 2020088)、河北省自然科学基金(批准号: H2022423382)、河北省中医药管理局科研计划(批准号: 2021101)和河 北省研究生创新资助项目(批准号: CXZZBS2023138)资助的课题

Received: November 14, 2024 Accepted: December 5, 2024

This work was supported by the Research Plan of Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Grant No.2020088), the Natural Science Foundation of Hebei Province (Grant No.H2022423382), the Research Plan of Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Grant No.2021101) and the Graduate Innovation Funding Project of Hebei Province (Grant No.CXZZBS2023138)

was evaluated. TCC was applied to measure the area of cerebral infarction. HE staining was applied to evaluate pathological damage in the hippocampus. Nissl staining was applied to observe neuronal damage in the hippocampus. TUNEL staining was applied to detect neuronal apoptosis in brain tissue. The reagent kit was used to determine the content of MDA (malondialdehyde) and the activity of superoxide SOD (superoxide dismutase). qRT-PCR was applied to detect the expression of Keap1 and Nrf2 mRNA in brain tissue. Western blot was applied to detect the expression of Keap1, Nrf2 and apoptosis-related proteins Caspase-3 and Bcl-2 in brain tissue; and immunofluorescence staining was used to locate Nrf2 protein. The results showed that compared with the sham surgery group, the model group showed neuronal damage in I/R mice, increased neurological deficit score, increased cerebral infarction area, decreased Nrf2 mRNA and protein expressions levels, decreased Nissl body number, increased neuronal apoptosis rate, increased Keap1 mRNA and protein expressions levels, increased Caspase-3 protein expression levels, and decreased Bcl-2 protein expression levels (P < 0.05). The I/R mice in the L-EPH and H-EPH groups had alleviated neurological damage, decreased neurological deficit score, decreased cerebral infarction area, decreased Nrf2 mRNA and protein expressions levels, increased Nissl body number, decreased neuronal apoptosis rate, increased Keap1 mRNA and protein expressions levels, decreased Caspase-3 protein expression levels, and increased Bcl-2 protein expression levels (P < 0.05), the H-EPH group was superior to the L-EPH group (P < 0.05). The addition of Nrf2 inhibitor ML385 inhibited Nrf2 expression and reversed the healing effect of EPH on I/R mice (P<0.05). In summary, EPH can inhibit neuronal apoptosis in brain I/R mice, which may be related to regulating the Keap1/Nrf2 pathway.

**Keywords** ephedrine; cerebral ischemia-reperfusion model; neuronal apoptosis; Keap1/Nrf2 signaling pathway

脑卒中的发病率和患病率逐年上升,导致患者 致残率和死亡率很高,严重危害人类的生命健康。缺 血性卒中占所有脑血管意外的60%~80%,是临床上 最常见的一种脑血管病<sup>[1]</sup>。临床上应强调早诊断、 早治疗、早预防,诊疗原则包括溶栓、抗凝、抗血小板、 神经保护剂、减少纤维化、控制血压等[2]。研究表明, 早期溶栓(发病后6h内)是治疗缺血性卒中最有效的 方法。然而,大多数人就医时已经错过了最佳时机[3]。 缺血性脑卒中后,神经细胞功能损伤的程度取决于 组织灌注不足的程度,保护神经功能、积极干预缺 血性卒中的其他病理环节,对改善患者预后尤为重 要[4]。翅麻黄是一种属于麻黄科的药用植物,已被证 明具有重要的药用特性,包括抗菌、抗氧化、保肝、 保护心血管和抗癌作用。麻黄碱(ephedrine, EPH) 是翅麻黄的主要化学成分之一,具有中枢神经系统 保护、抗炎和抗氧化作用<sup>[5]</sup>。EPH可改善大脑动脉 闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)诱导 的大鼠神经功能障碍和脑组织损伤,抑制氧化应激 和神经炎症<sup>[6]</sup>。核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是保护细胞 免受氧化/亲电应激的关键转录因子之一,在生理正

常条件下,Nrf2与Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein-1,Keap1)结合,导致Nrf2处于 非活性和可降解状态。在自由基或亲电试剂的应激 条件下,Nrf2从Keap1-Nrf2复合物中释放出来,转移 到细胞核并与抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)结合,诱导下游II相解毒酶和抗氧化酶 的表达<sup>[7]</sup>。有研究表明,在MCAO诱导的大鼠模型中, 菊花提取物可通过调节Keap1/Nrf2通路抑制氧化应 激,改善神经功能缺损<sup>[8]</sup>。因此本研究通过MCAO构 建脑I/R小鼠模型,探究EPH对I/R损伤小鼠的神经细 胞凋亡的影响及其对Keap1/Nrf2信号通路的调节。

# 1 材料与方法

# 1.1 动物

60只雄性C57BL/6小鼠,体质量20~25g(8周龄), 购自山东艾茂达康生命科学有限公司,许可证号: SCXK(鲁)2023-0010,饲养环境温度为(22±2)°C、湿 度(65±5)%,光/暗周期12h,可自由进食和饮水。本研 究经河北省中医院伦理委员会批准[批准号:〔2024〕 伦审第(132)号],所有动物操作均按照委员会规定进 行。

#### 1.2 主要试剂

盐酸麻黄碱注射液(国药准字H31021863)购自 上海信谊金朱药业有限公司; Nrf2抑制剂 ML385(货 号: HY-100523)购自 MedChemExpress公司; HE(苏 木素-伊红)染色剂试剂盒(货号:G1120)、SYBR Green I(货号: SY1020)购自北京索莱宝科技有限 公司;去基因组与逆转录一管化三代预混液(货号: MR05101S)购自莫纳生物科技有限公司; TTC(货 号: 60508ES25)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号: 20328ES50)、蛋白提取试剂盒(货号:18700ES50)、 CL化学发光超敏显色试剂盒(货号: 36208ES60)购 自上海翌圣生物技术有限公司;蛋白质定量试剂盒 (BCA法, 货号: KTD3001)购自亚科因生物技术有限 公司; 尼氏(Nissl)染色液(货号: C0117)、Trizol(货 号: R0016)、一步法 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光, 货号: C1088)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号: S0131S)、总超氧化物歧 化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒 (货号: S0101S)购自上海碧云天生物技术有限公 司; Nrf2兔单抗(货号: 20733)、Keap1兔单抗(货 号: 8047)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)兔单抗(货号: 9662)、B细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)兔 单抗(货号: 3498)、β-Actin兔单抗(货号: 5125)、含 HRP抗兔IgG二抗(货号: 7074)、Nrf2大鼠单克隆抗 体(货号: 14596)和抗大鼠IgG二抗(货号: 4416)购自 Cell Signaling Technology公司。

#### 1.3 主要仪器

仪器包括:DYY-7C电泳仪(北京六一仪器厂)、 Heraeus Fresco 21高速低温离心机(ThermoFisher Scientific公司)、FM0530多色荧光和化学发光成像 系统(美国Protein Simple公司)、GX53型显微镜(上 海巴贯仪器科技有限公司)、SYD-K4080A型组织切 片机(沈阳誉德电子仪器有限公司)、LightCycler 96 仪器(Roche公司)。

#### 1.4 方法

1.4.1 MCAO模型 利用大脑中动脉闭塞(MCAO)构建脑 I/R小鼠模型<sup>[9]</sup>:将小鼠腹腔注射戊巴比妥(80 mg/kg)麻醉,颈部中部纵行切口,分离双侧颈总动脉,用手术结扎双侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),全脑缺血 20 min后,通过去除双侧动脉的结扎来诱导再灌注。在此过程中,用加热手术平台维持小鼠体温在(37±0.5)℃。另选择12只正常小鼠记为假手

术组, 假手术组小鼠除CCA闭塞外, 其余手术操作相同。所有操作均遵循无菌原则。

1.4.2 实验动物分组 将48只造模成功的雄性SD 小鼠随机分为model组、L-EPH组、H-EPH组、H-EPH+ML385组,每组12只,造模后立即给药,将L-EPH 组、H-EPH组以5 mg/kg、10 mg/kg的剂量进行胃内 给药<sup>[10]</sup>,假手术组和model组灌胃等量的PBS(含5% DMSO),H-EPH+ML385组灌胃10 mg/kg的EPH,并通 过腹膜内注射30 mg/kg ML385,给药28天<sup>[11]</sup>。

1.4.3 神经功能检测 给药结束后,由一名不知情的观察者对所有小鼠进行神经功能评分<sup>[9]</sup>,分值范围从0(脑死亡)到100(最佳),分别从意识、嗅觉、视觉和听觉、呼吸、反射、定向等方向进行评估。

14.4 TTC测量脑梗死面积 使用TTC染色测定脑 梗死面积,将冠状脑切片(1 mm厚)在37 °C下浸入2% TTC溶液中20 min。使用ImageJ软件分析脑梗死面积。 1.4.5 HE染色 将海马体用4%甲醛于4 °C固定24 h,常 规脱水、透明、石蜡包埋,制成切片。将切片(5 μm)于 二甲苯中脱蜡10 min、无水乙醇浸泡5 min、95%乙醇 浸泡2 min、80%乙醇浸泡1 min、75%乙醇浸泡1 min、 蒸馏水水洗2 min。苏木精溶液常温染色15 min,伊红 溶液常温复染5 min。95%乙醇浸泡2 min,100%乙 醇浸泡2 min,二甲苯石碳酸浸泡1 min,二甲苯透明 2 min,封片后于显微镜下观察。

1.4.6 Nissl染色 将海马体石蜡切片(20 μm)用二 甲苯脱蜡,无水乙醇浸泡5 min,90%乙醇浸泡2 min, 70%乙醇浸泡2 min,蒸馏水浸泡2 min,然后放入染色 液,37 ℃染色10 min。用蒸馏水冲洗两次后,在95% 乙醇中脱水2 min,换用新鲜的95%乙醇再脱水2 min。 二甲苯透明5 min,换用新鲜的二甲苯再透明5 min。 用中性树脂封片、观察。

1.4.7 TUNEL染色 脑组织切片常规脱蜡和水 化,在20 μg/mL蛋白酶K中于室温下孵育20 min,洗 涤,在3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中室温孵育10 min。PBS清洗后,与 TUNEL检测液在37 °C下黑暗中孵育1 h,封片液封 片后在显微镜下观察。

1.4.8 氧化应激因子检测 从梗死周围区域采集新鲜 组织样本进行匀浆,分别使用MDA和SOD检测试剂 盒检测MDA含量和SOD活性。

 1.4.9 qRT-PCR检测脑组织中*Keap1、Nrf2* mRNA 表达情况 使用Trizol试剂从组织样本中分离总
RNA。使用MonScript RT III预混液进行逆转录。 使用 SYBR Green在 PCR 仪器上测定基因表达。以  $\beta$ -actin为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>计算mRNA表达。引物由 北京擎科生物科技股份有限公司合成, Keap1上游引 物为: 5'-GAT ATG AGC CAG AGC GGG AC-3',下 游引物为: 5'-CAT ACA GCA AGC GGT TGA GC-3'; Nrf2上游引物为: 5'-AAA ATC ATT AAC CTC CCT GTT GAT-3',下游引物为: 5'-CGG CGA CTT TAT TCT TAC CTC TC-3';  $\beta$ -actin上游引物为: 5'-TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3',下游引物为: 5'-CCT CGT AGA TGG GCA CAG T-3'<sup>[12]</sup>。

1.4.10 Western blot检测脑组织Keap1、Nrf2、Caspase-3和Bcl-2蛋白表达情况 从小鼠梗死周围区 域脑组织提取蛋白,BCA测定蛋白浓度,10% SDS-PAGE分离蛋白,将蛋白电转印到PVDF膜上,与针对 Nrf2、Keap1、Caspase-3、Bcl-2和β-actin的一抗(稀 释比1:1 000)在4°C下孵育过夜。然后与二抗稀释比 (稀释比1:1 000)在室温(22~25)°C下孵育1h。使用 ECL试剂盒可视化蛋白质条带,并使用ImageJ软件 进行分析,条带灰度值根据β-actin水平标准化。

1.4.11 免疫荧光染色检测蛋白定位 将大脑切片 与 Nrf2抗体在4°C下孵育过夜。然后将切片与山羊 抗兔二抗在室温(22~25)°C下孵育1h。最后,将切 片与DAPI在室温(22~25)°C下孵育5 min。使用共聚 焦荧光显微镜检测荧光信号。

#### 1.5 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 25.0进行分析。数据以 平均值±标准差(x±s)表示。组间数据比较采用单因 素方差分析,两组间比较采用 SNK-q检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

#### 2.1 各组小鼠神经功能评估

与假手术组相比, model组小鼠神经功能缺损评 分升高(P<0.05); 与model组相比, L-EPH组神经功能 缺损评分降低(P<0.05); 与L-EPH组相比, H-EPH组 神经功能缺损评分降低(P<0.05); 与H-EPH组相比, H-EPH+ML385组神经功能缺损评分升高(P<0.05), 见表1。

#### 2.2 各组小鼠梗死面积测量

与假手术组相比, model组脑梗死面积增加 (P<0.05); 与model组相比, L-EPH组脑梗死面积减少 (P<0.05); 与L-EPH组相比, H-EPH组脑梗死面积减 少(P<0.05); 与H-EPH组相比, H-EPH+ML385组脑梗 死面积增加(P<0.05), 见图1与表2。

#### 2.3 各组小鼠海马体病理变化

海马CA1区HE染色可见假手术组小鼠海马CA1区锥体细胞排列3~4层,细胞结构完整,细胞核大而规则。Model组CA1区锥体细胞遭到广泛破坏,神经元细胞皱缩,核染色质固缩;EPH低剂量病理变化有所减轻,部分锥体细胞形态正常;H-EPH组病理变化明显减轻,大部分锥体细胞形态正常; H-EPH+ML385组大量锥体细胞缩小,核固缩,见图2。

#### 2.4 各组小鼠海马组织Nissl染色

假手术组海马组织Nissl体数量较多; model组中 Nissl体数量减少(P<0.05); 与model组相比, L-EPH组、 H-EPH组Nissl体数量增加(P<0.05), 且H-EPH组多于 L-EPH组(P<0.05); 与H-EPH组相比, H-EPH+ML385 组Nissl体数量减少(P<0.05), 见图3与表3。

Table 1     Comparison of neurological deficit scores			
分组	评分		
Groups	Score		
Sham operation group	7.53±1.42		
Model group	58.56±6.13*		
L-EPH group	46.36±4.62 <sup>#</sup>		
H-EPH group	34.84±3.72 <sup>#&amp;</sup>		
H-EPH+ML385 group	52.21±5.26 <sup>@</sup>		
F	236.454		
Р	0.000		

表1 神经功能缺损评分比较

\*P<0.05,与假手术组相比; \*P<0.05,与model组相比; \*P<0.05,与L-EPH组相比; @P<0.05,与H-EPH组相比。n=12。

\*P<0.05 compared with Sham operation group; "P<0.05 compared with model group; "P<0.05 compared with L-EPH group; "P<0.05 compared with H-EPH group, n=12.

#### 2.5 各组小鼠神经细胞凋亡率比较

假手术组神经细胞凋亡较少, model组与之相比 神经细胞大量凋亡(P<0.05); L-EPH组比model组的 神经细胞凋亡率降低(P<0.05); H-EPH组神经细胞凋 亡率较L-EPH组降低(P<0.05); 与H-EPH组相比, H-EPH+ML385组神经细胞凋亡率升高(P<0.05), 见图 4与表4。

#### 2.6 氧化应激水平测定

与假手术组比较,model组小鼠脑组织中MDA 含量升高、SOD含量降低(P<0.05);与model组比较, L-EPH组脑组织中MDA含量降低、SOD含量升高 (P<0.05),与L-EPH组比较,H-EPH组脑组织中MDA 含量降低、SOD含量升高(P<0.05);与EPH高剂量 比较,H-EPH+ML385组脑组织中MDA含量升高、



图1 TTC染色各组小鼠脑梗死区域 Fig.1 TTC staining of cerebral infarction area in each group of mice

#### 表2 梗死面积测量情况 Table 2 Measurement of infarct area

分组	梗死面积/%
Groups	Infarct size /%
Sham operation group	$0.00{\pm}0.00$
Model group	37.24±3.88*
L-EPH group	28.67±3.12 <sup>#</sup>
H-EPH group	20.34±2.36 <sup>#&amp;</sup>
H-EPH+ML385 group	33.12±3.54@
F	152.063
P	0.000

\*P<0.05,与假手术组相比; <sup>#</sup>P<0.05,与model组相比; <sup>&</sup>P<0.05,与L-EPH组相比; <sup>@</sup>P<0.05,与H-EPH组相比。n=6。

\*P<0.05 compared with Sham operation group; <sup>#</sup>P<0.05 compared with model group; <sup>&</sup>P<0.05 compared with L-EPH group; <sup>@</sup>P<0.05 compared with H-EPH group. n=6.



黑色箭头指示神经元细胞损伤。 Black arrows indicate neuronal cell damage.

图2 各组小鼠海马体组织HE染色

Fig.2 HE staining of hippocampal tissue of mice in each group



图3 小鼠海马Nissl染色 Fig.3 Nissl staining of mouse hippocampus

Table 3	Number of Nissl bodies in the hippocampus of mice in each group
分组	Nissl体个数/个
Groups	Nissl body number /pcs
Sham operation group	113.97±14.75
Model group	53.24±8.67*
L-EPH group	78.67±11.44 <sup>#</sup>
H-EPH group	96.42±9.68 <sup>#&amp;</sup>
H-EPH+ML385 group	69.36±7.26 <sup>@</sup>
ç.	22.308

	表3	各组小鼠海马Nissl体数量	
Table 3	Number of Nissl	bodies in the hippocampus of mice i	n each group

\*P<0.05, 与假手术组相比; #P<0.05, 与model组相比; \*P<0.05, 与L-EPH组相比; @P<0.05, 与H-EPH组相比。n=6。 \*P<0.05 compared with Sham operation group; "P<0.05 compared with model group; &P<0.05 compared with L-EPH group; @P<0.05 compared with H-EPH group. n=6.

0.000

#### SOD含量降低(P<0.05), 见表5。

# 2.7 脑组织中Keap1、Nrf2 mRNA表达

与假手术组比较, model组小鼠中Keap1 mRNA 表达水平升高, Nrf2 mRNA表达水平降低 (P<0.05); 与model组比较, L-EPH组小鼠中Keap1 mRNA表达 水平降低, Nrf2 mRNA表达水平升高(P<0.05); 与 L-EPH组比较, H-EPH组小鼠中Keapl mRNA表达水 平降低, Nrf2 mRNA表达水平升高(P<0.05); 与EPH 高剂量比较, H-EPH+ML385组小鼠中Nrf2 mRNA表 达水平降低(P<0.05), 见表6。

# 2.8 脑组织中Keap1、Nrf2、Caspase-3和Bcl-2 蛋白表达

与假手术组比较, model组Keap1、Caspase-3蛋 白表达水平升高, Nrf2、蛋白表达水平降低(P<0.05); 与model组比较, L-EPH组Keap1、Caspase-3蛋白表 达水平降低, Nrf2、Bcl-2蛋白表达水平升高(P<0.05); 与L-EPH组比较, H-EPH组Keap1、Caspase-3蛋白表 达水平降低, Nrf2、Bcl-2蛋白表达水平升高(P<0.05); 与EPH高剂量比较, H-EPH+ML385组Caspase-3蛋 白表达水平升高, Nrf2、Bcl-2蛋白表达水平降低 (P<0.05), 见图5与表7。

## 2.9 脑组织免疫荧光染色定位Nrf2蛋白

相对于model组, L-EPH组和H-EPH组Nrf2被激 活并易位到细胞核; 与L-EPH组和H-EPH组相比, H-EPH+ML385组Nrf2表达水平明显降低。

### 3 讨论

脑卒中包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中。其 中,缺血性脑卒中占绝大多数,约占所有脑卒中事件 的70%<sup>[4]</sup>。脑缺血部位分为缺血核心区和缺血半暗 影区。缺血核心区葡萄糖和氧气供应几乎完全停 止,导致所有细胞发生不可逆损伤,坏死死亡。缺血 半暗影区尚可从血流中获得少量葡萄糖和氧气供应, 使细胞不至于立刻死亡[13]。若能及时恢复血流,脑 细胞功能可能恢复,但仍会造成I/R损伤,导致自由基 的释放,神经元的损伤,进一步加重脑组织损伤[14]。

EPH是一种植物生物碱,作为 $\alpha$ 和 $\beta$ 肾上腺素能激 动剂,在刺激中枢神经系统、升高血压和扩张支气管方 面起着经典的作用<sup>[15]</sup>。EPH通过调控Akt/GSK3β/Nrf2 通路抑制 MCAO 大鼠促炎细胞因子产生、NLRP3 炎症小体活化和神经缺损,从而减轻脑缺血损伤<sup>116]</sup>。 EPH治疗通过抑制NF-кB通路相关蛋白表达和炎症反



图4 小鼠脑组织TUNEL染色 Fig.4 TUNEL staining of mouse brain tissue

表4	各组小	、鼠神经细胞凋亡率比较	
----	-----	-------------	--

Table 4	Comparison	of neuronal	anontosis	rates in	each groun	of mice
Table 4	Comparison	of neuronal	apoptosis	Tates III	cach group	or mice

分组	凋亡率/%
Groups	Apoptosis rate /%
Sham operation group	2.14±0.24
Model group	42.26±4.58*
L-EPH group	35.78±3.81 <sup>#</sup>
H-EPH group	27.36±2.92 <sup>#&amp;</sup>
H-EPH+ML385 group	38.69±4.05 <sup>@</sup>
F	128.913
Р	0.000

\**P*<0.05, 与假手术组相比; <sup>#</sup>*P*<0.05, 与model组相比; <sup>&</sup>*P*<0.05, 与L-EPH组相比; <sup>@</sup>*P*<0.05, 与H-EPH组相比。*n*=6。 \**P*<0.05 compared with Sham operation group; <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with model group; <sup>&</sup>*P*<0.05 compared with L-EPH group; <sup>@</sup>*P*<0.05 compared with

H-EPH group. n=6.

应,显著减轻MCAO大鼠的脑I/R损伤,具有神经保护特性,是一种新型的抗脑I/R损伤的潜在抗炎剂<sup>[17]</sup>。本研究同样利用MCAO法建立脑I/R模型小鼠,结果发

现,模型小鼠神经损伤严重,缺损评分降低,脑梗死 面积增加,神经细胞凋亡率提高,而经EPH处理后,I/ R小鼠的神经功能缺损评分降低,脑梗死面积减少,

Table 5 Comparison of MIDA and SOD levels in brain tissue of mice in each group				
分组	MDA /umol·mg <sup>-1</sup>	SOD /II·ma <sup>-1</sup>		
Groups	WDA/µmor mg	SOD / O ling		
Sham operation group	2.47±0.11	18.37±1.95		
Model group	11.24±0.69*	7.26±0.85*		
L-EPH group	8.36±0.48* <sup>#</sup>	10.34±1.12* <sup>#</sup>		
H-EPH group	5.75±0.31 <sup>#&amp;</sup>	13.52±1.43 <sup>#&amp;</sup>		
H-EPH+ML385 group	9.54±0.49 <sup>@</sup>	8.98±1.02 <sup>@</sup>		
F	335.952	64.945		
Р	0.000	0.000		

#### 表5 各组小鼠脑组织MDA、SOD水平比较 Table 5 Comparison of MDA and SOD levels in brain tissue of mice in each group

\*P<0.05, 与假手术组相比; <sup>#</sup>P<0.05, 与model组相比; <sup>&</sup>P<0.05, 与L-EPH组相比; <sup>@</sup>P<0.05, 与H-EPH组相比。n=6。

\*P<0.05 compared with Sham operation group; "P<0.05 compared with model group; "P<0.05 compared with L-EPH group; "P<0.05 compared with H-EPH group, n=6.

Table 6 Comparison of Ke	<i>eap1</i> and <i>Nrf2</i> mRNA expression in brain t	issues of mice in each group	
分组	Keanl	Nref 2	
Groups	Keupi	11172	
Sham operation group	$1.04{\pm}0.11$	1.06±0.12	
model group	3.37±0.36*	$0.41 \pm 0.06*$	
L-EPH group	2.89±0.31*#	0.56±0.08* <sup>#</sup>	
H-EPH group	2.38±0.26 <sup>#&amp;</sup>	0.73±0.09 <sup>#&amp;</sup>	
H-EPH+ML385 group	2.41±0.26 <sup>@</sup>	$0.49{\pm}0.07^{@}$	
F	60.914	53.302	
Р	0.000	0.000	

#### 表6 各组小鼠脑组织*Keap1、Nrf2* mRNA表达比较 ble 6 Comparison of *Keap1* and Nrf2 mRNA expression in brain tissues of mice in each group

\*P<0.05,与假手术组相比; #P<0.05,与model组相比; \*P<0.05,与L-EPH组相比; @P<0.05,与H-EPH组相比。n=6。

\*P<0.05 compared with Sham operation group; "P<0.05 compared with model group; "P<0.05 compared with L-EPH group; "P<0.05 compared with H-EPH group, n=6.



A: 假手术组; B: model组; C: L-EPH组; D: H-EPH组; E: H-EPH+ML385组。

A: Sham operation group; B: model group; C: L-EPH group; D: H-EPH group; E: H-EPH+ML385 group.

图5 Western blot检测Keap1、Nrf2、Caspase-3和Bcl-2蛋白表达情况

Fig.5 Western blot detection of Keap1, Nrf2, Caspase-3, Bcl-2 protein expression

Nissl体数量减少,神经元凋亡被EPH抑制,且高剂量 EPH的治疗效果更优。本研究证实了EPH对小鼠的脑I/R损伤同样具有神经保护作用,与前人研究<sup>[16-17]</sup> 相符。EPH的抗炎与抗凋亡的调节可能相辅相成, 本研究结果为EPH对脑I/R损伤的保护作用补充了 依据。

Nrf2是一种重要的内源性抗氧化蛋白,由 Keah1、Keah2、Keah3、Keah4、Keah5和Keah6 六个特征结构域组成,参与调控多种内源性抗氧化 元件的转录和翻译。生理条件下,Keap1与Nrf2的

Table 7	Comparison of Keap1 and	Nrf2 protein expression i	n brain tissue of mice in e	ach group	
分组	V con 1	N.#£?	Cosposo 2	Pal 2	
Groups	Keapi	INITZ	Caspase-5	DCI-2	
Sham operation group	0.26±0.04	$0.81{\pm}0.09$	$0.43 \pm 0.05$	1.06±0.11	
Model group	$0.72{\pm}0.08*$	0.24±0.04*	1.12±0.12*	0.41±0.05*	
L-EPH group	$0.60{\pm}0.08^{\#}$	$0.37{\pm}0.05^{\#}$	0.96±0.11 <sup>#</sup>	$0.55{\pm}0.06^{\#}$	
H-EPH group	$0.47{\pm}0.05^{\#\&}$	0.51±0.06 <sup>#&amp;</sup>	0.79±0.09 <sup>#&amp;</sup>	0.69±0.08 <sup>#&amp;</sup>	
H-EPH+ML385 group	$0.46{\pm}0.05$	0.31±0.04 <sup>@</sup>	0.99±0.11@	$0.48{\pm}0.06^{@}$	
F	45.804	87.621	43.335	70.606	
Р	0.000	0.000	0.000	0.000	

	表7	各组小鼠脑组织Keap1、Nrf2蛋白表达比较
Table 7	Comparison of Ke	an1 and Nrf2 protein expression in brain tissue of mice in each group

\*P<0.05,与假手术组相比;\*P<0.05,与model组相比;\*P<0.05,与L-EPH组相比;@P<0.05,与H-EPH组相比。n=6。

\*P<0.05 compared with Sham operation group; <sup>#</sup>P<0.05 compared with model group; <sup>@</sup>P<0.05 compared with L-EPH group; <sup>@</sup>P<0.05 compared with H-EPH group. n=6.





Keah2和Keah6结构域结合,通过泛素化复合物依赖 的途径降解Nrf2,使Nrf2处于休眠状态。在可逆的 脑I/R损伤中, Keap1被降解, 失去对Nrf2的抑制作用, 使Nrf2激活。活化的Nrf2与Maf蛋白形成异二聚体, 并与ARE结合,进而上调下游抗氧化蛋白如HO-1、 GSH和NQO1的表达,进而通过加速清除自由基来 减轻氧化应激。此外,活化的Nrf2还通过其Neh4 和Neh5结构域与环腺苷5'-单磷酸(cyclic adenosine 5'-monophosphate, cAMP)-反应元件结合蛋白(responsive element binding protein, CREB)结合, 增强 CREB的磷酸化来调节神经元的存活,从而减轻脑 I/R后的神经元损伤<sup>[18-20]</sup>。据报道,新型双香豆素化 合物COM3通过干扰Keap1的结构来激活Nrf2的核 转录,平衡内源性氧化还原活性并恢复线粒体功能, 从而防止氧葡萄糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)诱导的神经元损伤和小 鼠脑I/R损伤<sup>[21]</sup>。另外, 白藜芦醇在脑I/R损伤期间通 过miR-450b-5p/Keap1/Nrf2通路对小胶质细胞M2极 化发挥神经保护作用<sup>[22]</sup>。在小鼠MCAO/R模型和原 代皮质神经元的OGD/R诱导下,缺血皮质组织和原 代神经元中观察到miR-139-5p下调、叉头框转录因 子O1和Keap1上调、Nrf2抗氧化通路失活<sup>[23]</sup>。因此, 本研究检测Keap1/Nrf2通路蛋白的表达情况,结果 发现, model组小鼠Keap1表达较假手术组升高, Nrf2 表达水平降低,与LIU等<sup>[22]</sup>研究结果一致;EPH可降 低I/R小鼠脑组织Keap1表达水平,促进Nrf2表达;而 在EPH高剂量基础上加入Nrf2抑制剂ML385后, Nrf2 表达被抑制,且ML385逆转了EPH对I/R小鼠的治疗 作用,表明EPH可能通过调节Keap1/Nrf2信号通路, 减轻脑I/R小鼠神经元损伤。

综上所述, EPH可能通过调节Keap1/Nrf2通路 改善脑I/R小鼠的神经损伤,抑制神经元凋亡。本研 究结果可能为开发脑卒中治疗的药物和治疗靶点提 供依据,有助于脑卒中患者的预后治疗。

#### 参考文献 (References)

- AMIN O S M, SHEIKHBZENI A S, SIDDIQ A N. Relationship of QTc interval prolongation with acute ischemic stroke [J]. Med Arch, 2020, 74(3): 195-8.
- [2] SEYEDSAADAT S M, NEUHAUS A A, PEDERSON J M, et al. Location-specific ASPECTS paradigm in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2020, 41(11): 2020-6.

- [3] KARASZEWSKI B, JABŁOŃSKI B, ŻUKOWICZ W. The salvageable brain in acute ischemic stroke. The concept of a reverse mismatch: a mini-review [J]. Metab Brain Dis, 2020, 35(2): 237-40.
- [4] TIEDT S, BRANDMAIER S, KOLLMEIER H, et al. Circulating metabolites differentiate acute ischemic stroke from stroke mimics [J]. Ann Neurol, 2020, 88(4): 736-46.
- [5] WANG J Z, ZELT J G E, KAPS N, et al. Does quantification of [<sup>11</sup>C]*meta*-hydroxyephedrine and [<sup>13</sup>N]ammonia kinetics improve risk stratification in ischemic cardiomyopathy [J]. J Nucl Cardiol, 2022, 29(2): 413-25.
- [6] HUANG L, ZHAO B, LI Q, et al. Ephedrine alleviates middle cerebral artery occlusion-induced neurological deficits and hippocampal neuronal damage in rats by activating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4136-49.
- [7] SUN Y, XU L, ZHENG D, et al. A potent phosphodiester Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor as the efficient treatment of Alzheimer's disease [J]. Redox Biol, 2023, 64(1): 102793.
- [8] ZHANG Z, PANG X, WEI Y, et al. Neuroprotective effects of *Chrysanthemum morifolium* on cerebral ischemia-reperfusion injury contributes to the oxidative stress suppression and related Keap1/Nrf2 pathway [J]. Brain Inj, 2023, 37(4): 269-81.
- [9] JIN Z, GUO P, LI X, et al. Neuroprotective effects of irisin against cerebral ischemia/reperfusion injury via Notch signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120(1): 109452.
- [10] TIAN H, WANG L, FU T. Ephedrine alleviates bleomycininduced pulmonary fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and restraining NF-κB signaling [J]. J Toxicol Sci, 2023, 48(10): 547-56.
- [11] CHEN Y, HE W, WEI H, et al. Srs11-92, a ferrostatin-1 analog, improves oxidative stress and neuroinflammation via Nrf2 signal following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(6): 1667-77.
- [12] SUN Y Y, ZHU H J, ZHAO R Y, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice [J]. Redox Biol, 2023, 66(1): 102852.
- [13] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies [J]. Exp Neurol, 2021, 335(1): 113518.
- [14] JOLUGBO P, ARIËNS R A S. Thrombus composition and efficacy of thrombolysis and thrombectomy in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2021, 52(3): 1131-42.
- [15] GAD M Z, AZAB S S, KHATTAB A R, et al. Over a century since ephedrine discovery: an updated revisit to its pharmacological aspects, functionality and toxicity in comparison to its herbal extracts [J]. Food Funct, 2021, 12(20): 9563-82.
- [16] LI Q, WU J, HUANG L, et al. Ephedrine ameliorates cerebral ischemia injury via inhibiting NOD-like receptor pyrin domain 3 inflammasome activation through the Akt/GSK3β/NRF2 pathway [J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(12): S540-52.
- [17] SHI C, LI J, LI J. Ephedrine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through NF-κB signaling pathway [J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(6): 994-1002.
- [18] SUN Y, YANG X, XU L, et al. The role of Nrf2 in relieving cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Curr Neuropharmacol, 2023,

21(6): 1405-20.

- [19] QI Z, TONG Y, LUO H, et al. Neuroprotective effect of a Keap1-Nrf2 protein-protein inter-action inhibitor on cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Bioorg Chem, 2023, 132(1): 106350.
- [20] ZHANG W, SONG J K, YAN R, et al. Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(8): 1259-72.
- [21] WANG J, ZHANG W, LÜ C, et al. A novel biscoumarin compound ameliorates cerebral ischemia reperfusion-induced mito-

chondrial oxidative injury via Nrf2/Keap1/ARE signaling [J]. Neuropharmacology, 2020, 167(1): 107918.

- [22] LIU J, CHEN J, ZHANG J, et al. Mechanism of resveratrol improving ischemia-reperfusion injury by regulating microglial function through microRNA-450b-5p/KEAP1/Nrf2 pathway [J]. Mol Biotechnol, 2023, 65(9): 1498-507.
- [23] YAO Y, HU S, ZHANG C, et al. Ginsenoside Rd attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by exerting an anti-pyroptotic effect via the miR-139-5p/FoxO1/Keap1/Nrf2 axis [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 105(1): 108582.