

· 实验研究 ·

**β-石竹烯通过激活 HSF1/HSP70 通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤**

左天睿,胡晴雯,刘京东,王 萱,邓 玲,董 志

(重庆医科大学药学院,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

**[摘要]** **目的:**探究 β-石竹烯(β-caryophyllene, BCP)通过激活热休克转录因子 1(heat shock factor 1, HSF1)/热休克蛋白 70(heat shock proteins 70, HSP70)通路减轻大鼠脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)损伤的机制。**方法:**将雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、BCP 低、中、高剂量组(204, 306, 408 mg·kg<sup>-1</sup>)、BCP(306 mg·kg<sup>-1</sup>) + Kribb11 组和 Kribb11 组。采用线栓法建立大鼠 CIR 模型,再灌注 24 h 后进行神经行为学评分;2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色法测定脑梗死体积;苏木精-伊红染色、尼式染色观察皮层神经元病理变化;蛋白印迹法检测大鼠脑皮层中 HSP70, HSF1, p-HSF1 和凋亡相关蛋白(Chop, Caspase 3, Bcl2, Bax)的蛋白表达;免疫荧光染色检测 p-HSF1 和 HSP70 蛋白表达;Tunel 染色检测细胞凋亡水平;化学比色法检测皮层组织中丙二醛(MDA)含量和总超氧化物歧化酶(SOD)及 Caspase 3 活性。**结果:**与模型组相比,BCP 组大鼠脑梗死体积明显降低( $P < 0.01$ ),组织中 HSF1, p-HSF1, HSP70 和 Bcl2 蛋白表达显著增加( $P < 0.01$ ),Bax, Chop, Caspase 3 蛋白表达均明显减少( $P < 0.01$ ),组织中 MDA 含量减少( $P < 0.01$ )和 SOD 的活性增加( $P < 0.01$ ),Caspase 3 酶活性显著降低( $P < 0.05$ ),细胞凋亡减少,从而改善了缺血再灌注损伤;与 BCP 组相比,BCP + Kribb11 组中 Kribb11 拮抗了 BCP 的疗效作用,HSF1, p-HSF1 和 HSP70 蛋白表达显著减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),组织氧化应激水平升高,皮层细胞死亡增多,CIR 损伤加重。**结论:**BCP 能够降低氧化应激水平,抑制细胞凋亡,从而改善大鼠 CIR 损伤,其机制可能与激活 HSF1/HSP70 通路有关。

**[关键词]** 脑缺血再灌注损伤;β-石竹烯;HSF1/HSP70 信号通路;氧化应激;凋亡**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)05-0513-09**β-Caryophyllene reduces cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by activating HSF1/HSP70 pathway**

ZUO Tian-rui, HU Qing-wen, LIU Jing-dong, WANG Xuan, DENG Ling, DONG Zhi

(Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether β-caryophyllene (BCP) can reduce cerebral ischemia-reperfusion injury (CIR) in rats via activating heat shock factor 1 (HSF1)/heat shock protein 70 (HSP70) pathway. **Methods:** Male SD rats were randomly assigned to the sham operation group, model group, BCP low, medium, and high dose groups (204, 306, 408 mg·kg<sup>-1</sup>), BCP (306 mg·kg<sup>-1</sup>) + Kribb11 intervention group, and Kribb11 intervention group. The suture method was used to create a rat model of CIR injury, and the neurobehavioral score was recorded 24 hours after the reperfusion. The volume of the cerebral infarct was measured using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining, and the pathological changes of cortical neurons were observed using hematoxylin-eosin staining and Nissl staining. Western blotting was applied to detect protein expressions of HSP70, HSF1, p-HSF1,

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金:重庆市基础研究与前沿探索专项(cstc2018jcyjAX0378);重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(20210121)**[作者简介]** 左天睿,男,硕士研究生,主要从事神经药理学研究。E-mail:405852908@qq.com。**[通讯作者]** 董志,男,博士,教授,主要从事神经药理学研究。E-mail:100798@cqmu.edu.cn。

Chop, Caspase 3, Bcl2, and Bax in rat brain cortex; immunofluorescence staining was used to detect protein expressions of p-HSF1 and HSP70; and Tunel staining to evaluate cell apoptosis level. Malondialdehyde level in cortical tissue (MDA), activities of total superoxide dismutase (SOD) and Caspase 3 were measured using a chemical colorimetric technique. **Results:** Compared to the model group, the  $\beta$ -caryophyllene administration group indicated a lower cerebral infarct volume in rats ( $P < 0.01$ ), a lower level of MDA and Caspase 3 activity in the tissue ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), a decreased expression of Bax, Chop, and Caspase 3 protein ( $P < 0.01$ ), a decreased occurrence of cell apoptosis, and increased protein expressions of HSF1, p-HSF1, HSP70, and Bcl 2 in the tissue ( $P < 0.01$ ), and substantially greater SOD activity in the tissue ( $P < 0.01$ ), reducing ischemia-reperfusion injury. Compared with the BCP group, Kribb11 in the BCP + Kribb11 group antagonized the curative effect of BCP, the protein expressions of HSF1, p-HSF1 and HSP70 were significantly reduced ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and tissue oxidation stress levels increased, cortical cell death increased, and ischemia-reperfusion injury aggravated. **Conclusion:** In rats,  $\beta$ -caryophyllene can alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by reducing oxidative stress and minimizing cell apoptosis, which is associated with the activation of the HSF1/HSP70 pathway.

**[Key words]** cerebral ischemia-reperfusion injury;  $\beta$ -caryophyllene; HSF1/HSP70 signal pathway; oxidative stress; apoptosis

缺血性脑卒中是继癌症、心脏病后造成人类严重残疾和死亡的主要疾病之一,常见病因是脑内血管阻塞,组织缺氧,引起严重的神经系统功能障碍<sup>[1-2]</sup>。由于其治疗时间窗口较短,若错过最佳的溶栓时间,恢复血供后易导致更为严重的缺血再灌注损伤<sup>[2-3]</sup>。脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)损伤涉及许多复杂的病理过程,其中氧化应激是引起组织脂质过氧化、炎症和细胞凋亡发生的重要原因之一<sup>[4-6]</sup>。热休克蛋白 70(heat shock proteins 70, HSP70)属于热休克蛋白家族,是一种高度保守的多肽类应激蛋白。HSP70 在大脑缺血梗死区域中被显著诱导,其过度表达能够增加组织细胞对缺血缺氧的耐受性,同时清除氧自由基和脂质过氧化,减少氧化应激细胞损伤,恢复神经功能<sup>[4,7-9]</sup>。另外,其作用功能高度依赖于热休克转录因子 1(heat shock factor 1, HSF1)的调控<sup>[7,11-12]</sup>。在组织缺血、神经系统等疾病中,HSF1 参与了应激适应、促进细胞存活等重要过程<sup>[13-17]</sup>。近年来研究发现,HSF1/HSP70 通路与细胞氧化损伤、炎症发生紧密相关<sup>[11-13,18-19]</sup>。在脑卒中,HSF70 的信号转导可能通过干扰上游线粒体事件介导的 Caspase 依赖性途径和死亡受体介导的外在凋亡途径来促进细胞存活;同时抑制 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 活化进而中断下游炎症级联反应的发生,产生抗氧化、抗炎和抗凋亡的作用<sup>[4,7-9]</sup>。Sun 等<sup>[20]</sup>报道称,使用丙泊酚处理后的星形胶质细胞,能明显增加 HSF1 和 NRF2 的核转录水平,增加热休克蛋白表达,以此减轻氧糖剥夺引

起的血脑屏障损伤。

近年来,在中药和天然药物中寻找开发用于治疗缺血性脑卒中的药物一直受到广泛关注。 $\beta$ -石竹烯( $\beta$ -caryophyllene, BCP)是一种来源于丁香、肉桂等植物的天然植物油,属于双环倍半萜烯类,具有抗炎、抗氧化、抗焦虑的药理活性<sup>[21-22]</sup>。相关研究表明,在一些神经系统疾病中,BCP 能减少神经元的凋亡坏死和炎症的发生,产生神经保护作用<sup>[2,13-14]</sup>。本实验拟通过构建大鼠 CIR 模型,以 HSF1/HSP70 通路调控细胞氧化应激和凋亡水平为切入点,观察 BCP 对 CIR 损伤大鼠的改善作用及作用机制,为其防治提供新的思路和候选药物。

## 材料与方法

### 1 药物与试剂

BCP(日本 TCI 公司,批号:C0796,纯度 >90%); Kribb11(MCE 公司,批号:HY-100872);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,美国 Sigma 公司,批号:BCCC7515); HSF1 抗体(中国博奥森生物科技公司,批号:bs-3757R);p-HSF1 抗体(批号:DF2947)、HSP70 抗体(批号:AF5466)、Caspase 3 抗体(批号:AF6311)、Chop 抗体(批号:DF6025)、Bcl2 抗体(批号:BF9103)购自美国 Affinity 公司;Bax 抗体(批号:60267-1-Ig)、 $\beta$ -actin(批号:66009-1-Ig)购自中国三鹰生物技术公司;PAGE 凝胶快速制备凝胶试剂盒 10%(中国雅酶公司,批号:PG112);Caspase 3 活性检测试剂盒(货号:C1116)、丙二醛(MDA)检测试

剂盒(货号:S0131S)、总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(货号:S0109)购自中国碧云天生物技术公司。

## 2 仪器

Mini-protean tetra Cell 凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);低温离心机(美国 Thermo 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);正置显微镜(日本 Nikon 公司)。

## 3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 290 g,购自重庆医科大学实验动物中心,许可证号:SYX 渝 2018-003。

## 4 分组

根据前期研究,在 34 ~ 408 mg·kg<sup>-1</sup>浓度范围内,BCP 能有效减轻大鼠 CIR 损伤,且具有剂量依赖性,故本研究选取了 204,306,408 mg·kg<sup>-1</sup>这 3 种药物剂量。将 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组,模型组,BCP 低、中、高剂量组(204,306,408 mg·kg<sup>-1</sup>),BCP(306 mg·kg<sup>-1</sup>) + Kribb11(HSF1 抑制剂<sup>[20-21]</sup>)组,Kribb11 组,每组 17 只。BCP 低、中、高剂量组:造模前分别以各剂量的 BCP 溶液连续 7 d 灌胃(*ig*)给药(BCP 原液溶于 10% 的聚氧乙烷蓖麻油 + 生理盐水混合溶液)。模型组与假手术组:连续 7 d 给予等体积的溶剂(聚氧乙烷蓖麻油 + 生理盐水)*ig*。BCP + Kribb11 组:连续 7 d 以 306 mg·kg<sup>-1</sup> BCP 溶液 *ig* 给药,造模前 4 h 侧脑室注射 Kribb11 溶液(1 mmol·L<sup>-1</sup>, 10 μL)。Kribb11 组:连续 7 d 以等体积溶剂(聚氧乙烷蓖麻油 + 生理盐水)*ig*,造模前 4 h 侧脑室注射 Kribb11 溶液(1 mmol·L<sup>-1</sup>, 10 μL)。假手术组只进行麻醉和血管分离,其他各组采用大脑中动脉闭塞法(线栓法)构建大鼠 CIR 模型。

## 5 采用大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法构建大鼠 CIR 模型<sup>[2]</sup>

腹腔注射 4% 的水合氯醛麻醉大鼠后,暴露出右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。依次结扎颈总、颈外动脉,夹闭颈内动脉。将线栓从颈总动脉插入大脑中动脉处,固定。1.5 h 后取出线栓,缝合伤口,再灌注 24 h。术后大鼠出现明显神经行为学障碍(见图 3)和右侧半脑出现明显水肿,即为造模成功。假手术组除不插栓外,其余操作步骤与模型组相同。

## 6 神经行为学评分<sup>[25]</sup>

根据 Longa 评分法评判。0 分:大鼠活动正常;1 分:提尾后,对侧前肢无法伸直,蜷缩状;2 分:无法

直线行走,沿对侧转圈;3 分:无法正常行走,向对侧偏瘫;4 分:无法动弹,无自主活动。分值越高说明动物神经行为障碍越严重,1 ~ 4 分视为造模成功。

## 7 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色法测定脑梗死体积<sup>[2]</sup>

大鼠造模 24 h 后,取脑,放入 -20 °C 冷固。沿脑冠状面连续切 5 片,每片约 2 mm 厚。放入 2% 的 TTC 溶液中,37 °C 孵育 20 min。加入 4% 的多聚甲醛固定,4 °C 过夜拍照。采用 Image-J 软件分析梗死体积。

## 8 苏木精-伊红(HE)染色<sup>[2]</sup>

大鼠造模 24 h 后麻醉,暴露出心脏。将磷酸盐缓冲溶液(PBS)和 4% 多聚甲醛溶液从心尖灌注,完毕后断头取脑,放入 4% 多聚甲醛溶液中浸泡过夜。d 2 脱水,石蜡包埋,切片(5 μm 厚)。用 HE 染色,树脂封片。在正置显微镜下观察缺血侧脑组织病理学变化。拍照后进行统计分析,细胞存活率 = 正常状态的细胞数目/该视野下所有的细胞总数。

## 9 尼氏(Nissl)染色<sup>[17]</sup>

按照“8”项中制作石蜡包埋切片。烤片,脱蜡和水化后,用尼式染液染色,脱水,封片。标本于正置显微镜下观察拍照。计数,进行统计分析,神经元细胞损伤率 = (损伤神经元的数目/该视野下的神经元总数) × 100%。

## 10 Tunel 染色检测皮层组织的细胞凋亡水平<sup>[9]</sup>

按照“8”项中制作石蜡切片。脱蜡、抗原修复后,根据 Tunel 试剂盒说明书进行 Tunel 染色;切片置于湿盒,加入 proteinase K,37 °C 下反应 0.5 h。PBS 冲洗 3 次,滴加 Tunel 检测液,45 °C 孵育 2 h,避光。PBS 冲洗 3 次后封片。红色荧光为凋亡细胞,蓝色荧光为细胞核。

## 11 Westren blot 检测大鼠脑皮层组织中蛋白表达<sup>[21]</sup>

用蛋白裂解液(RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂 = 100:1:2)提取皮层组织蛋白。上样,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,切胶,湿转。5% BSA 溶液常温封闭 2 h。加入一抗(HSP70,HSF1,p-HSF1,1:1 000; Bcl2,1:2 000; Bax,1:10 000; Chop,Caspase 3,1:1 000; β-actin,1:5 000)4 °C 孵育过夜。孵育二抗,50 min;孵育三抗,30 min。用超敏化学发光液显影。用 Image lab 软件分析统计。

## 12 免疫荧光染色检测组织中 P-HSF1, HSP70 蛋白表达<sup>[2]</sup>

按照“8”项中制片。切片经脱蜡,抗原修复后。

10% 山羊血清室温封闭 1~2 h;加入 p-HSF1, HSP70 抗体(1:2 000), 4 ℃ 过夜;加入荧光二抗, 37 ℃ 避光孵育 1 h;加入 DAPI 染核, 避光孵育 5 min, 封片。在共聚焦显微镜下观察并拍摄。使用 Image-J 软件半定量分析目的蛋白的平均荧光强度, 平均荧光强度(相对荧光表达量) = 目标区域的荧光强度总和/该区域面积。

### 13 皮层组织中 Caspase 3 酶和 SOD 活性及 MDA 含量水平检测<sup>[21]</sup>

各组大鼠皮层组织中 Caspase 3, SOD 活性和 MDA 含量均采用试剂盒进行测定。各组样品匀浆后严格按照各检测盒说明书操作, 用酶标仪测定吸光度(OD)以计算出 Caspase 3, SOD 活性和 MDA 含量水平。

### 14 统计学分析

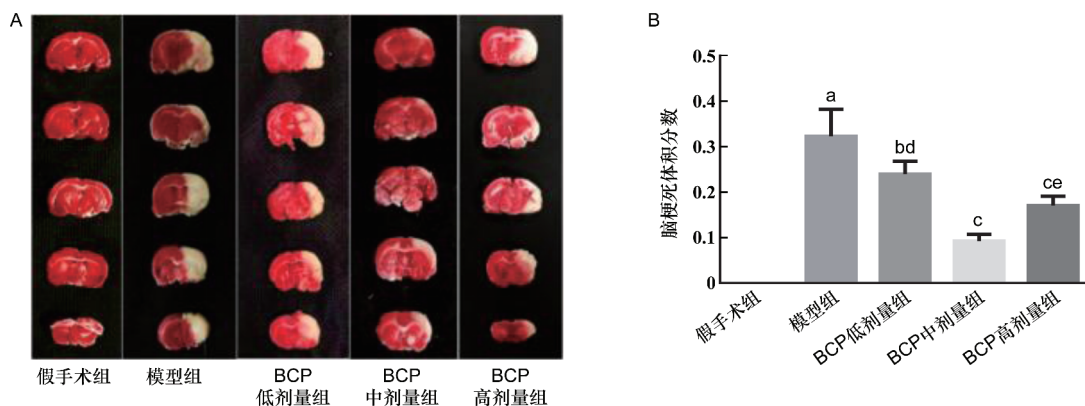
所有实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计学分析采

用 GraphPad Prism 6 软件处理, 各组组间数据进行单因素方差(one-way ANOVA)分析, Tukey's test 用于组间差异比较。 $P < 0.05$  为具有显著性差异,  $P < 0.01$  为具有极显著性差异。

## 结 果

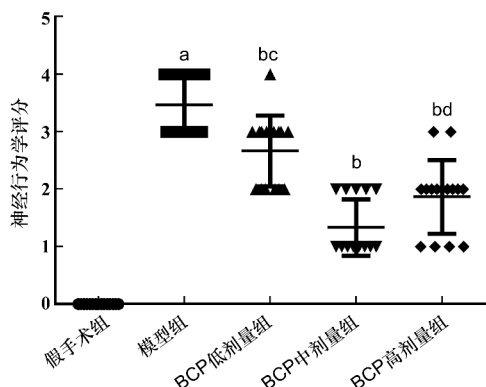
### 1 不同剂量 BCP 对大鼠脑梗死面积和神经功能的影响

与假手术相比, 模型组出现大面积的白色脑梗死区域( $P < 0.01$ ), 表现出较高的神经行为障碍( $P < 0.01$ )。与模型组相比, BCP 低、中、高剂量组都有不同程度的改善, 脑梗死体积显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 神经行为学评分降低( $P < 0.01$ ), 表明 BCP 的药效显著且具有剂量依赖性。其中, 以  $306 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 BCP 中剂量组效果最佳, 见图 1 和图 2。



A: TTC 染色; B: 脑梗死体积分数的统计分析( $\bar{x} \pm s, n = 4$ ); 与假手术组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ ; 与 BCP 中剂量组比较, d:  $P < 0.01$ , e:  $P < 0.05$

图 1 不同浓度的 BCP 对大鼠脑梗死体积的影响



与假手术组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, b:  $P < 0.01$ ; 与 BCP 中剂量组比较, c:  $P < 0.01$ , d:  $P < 0.05$

图 2 不同浓度的 BCP 对大鼠神经功能损伤的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

### 2 不同剂量 BCP 对大鼠脑损伤侧皮层组织形态的影响

通过 HE 染色观察皮层组织形态。假手术组中, 皮层细胞轮廓清晰、排列规整。与假手术组相比, 模型组中细胞排列紊乱、核固缩深染、周围组织空泡化、细胞大量死亡。与模型组相比, 低、中、高剂量组中细胞死亡减少、核固缩和组织间质水肿得到改善, 其中  $306 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 BCP 中剂量组疗效最明显, 见图 3。

结合“1”和“2”项的实验结果, 为保证药物具有足够有效的治疗作用及安全性, 选取 BCP  $306 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  作为最佳有效剂量进行后续生化指标的检测。

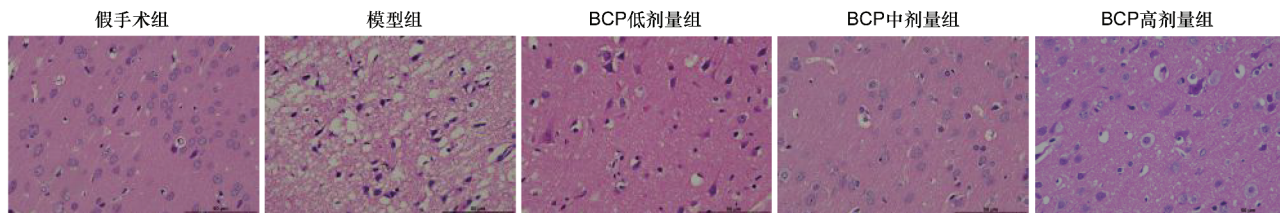
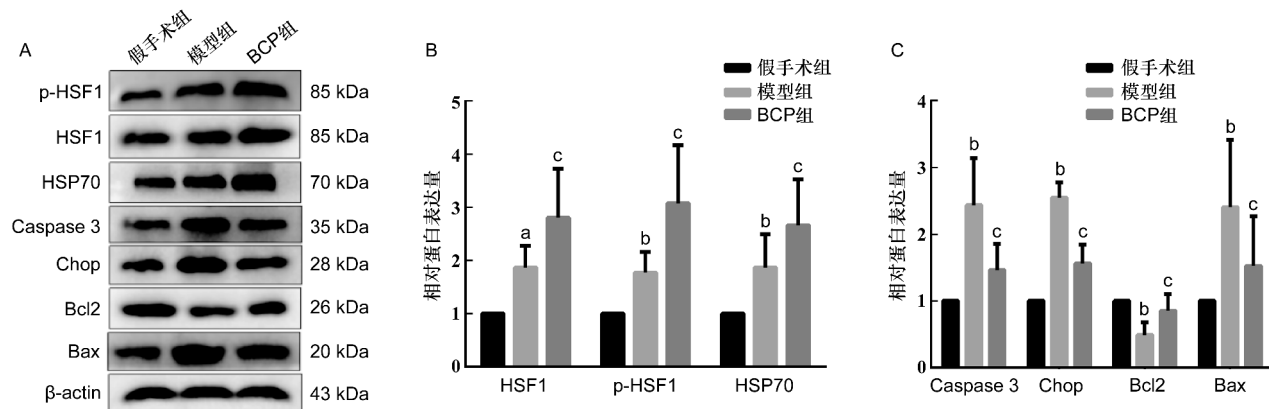


图3 各组大鼠皮层中组织形态的变化(×400)

### 3 BCP对大鼠缺血侧皮层组织中 HSF1, p-HSF1, HSP70 及凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与假手术组相比,模型组中 HSF1, p-HSF1 及 HSP70 蛋白表达增高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 凋亡相关蛋白 Chop, Bax, Caspase 3

蛋白表达显著增高( $P < 0.01$ ), Bcl2 蛋白表达下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,BCP 组( $306 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )中 HSF1, p-HSF1, HSP70 蛋白表达进一步显著增高( $P < 0.01$ ), Chop, Bax, Caspase 3 蛋白表达显著下降( $P < 0.01$ ), Bcl2 蛋白表达增高( $P < 0.01$ ), 见图4。



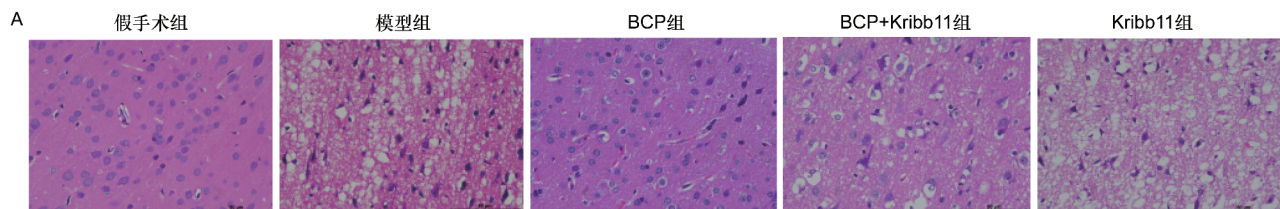
A: Western blot 检测蛋白表达; B, C: 蛋白相对表达量的统计分析( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ ); 与假手术组比较, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, c:  $P < 0.01$

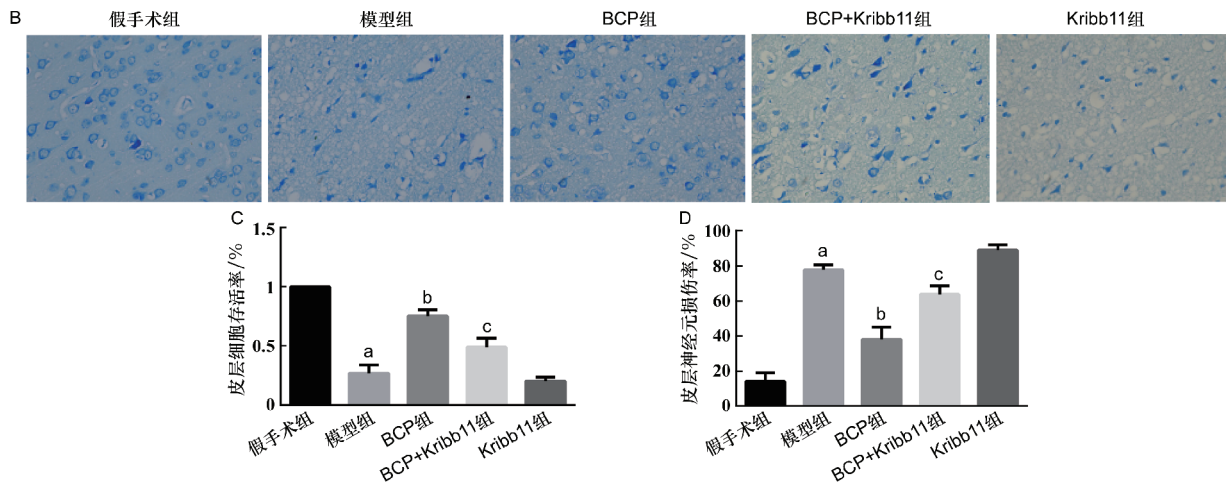
图4 各组皮层组织中相关蛋白表达水平

### 4 HSF1 抑制剂联合 BCP 对缺血侧皮层组织病理形态结构的影响

HE 染色结果显示:与假手术组相比,模型组皮层区细胞大量死亡、核固缩和空泡样现象严重;与模型组相比,BCP 组正常细胞数目明显增多、损伤程度较轻;与 BCP 组相比, Kribb11 + BCP 组中细胞核固缩现象加重、细胞死亡增多、空泡样明显;与模型组相比, Kribb11 组皮层区组织损伤、细胞死亡更为严

重,见图5A。Nissl 染色结果显示:假手术组大鼠皮层区细胞轮廓清晰形态正常,尼氏小体和胞核清晰可见。与假手术相比,模型组皮层区尼氏体大量减少、细胞轮廓不清、间隙增大、核固缩严重;与模型组比较,BCP 组尼氏体增多、细胞损伤明显减轻;与 BCP 组相比,BCP + Kribb11 组中尼氏小体减少、组织间隙增大、细胞损伤加重,见图5B。提示 BCP 对 CIR 损伤的保护作用能被 HSF1 抑制剂 Kribb11 部分逆转。





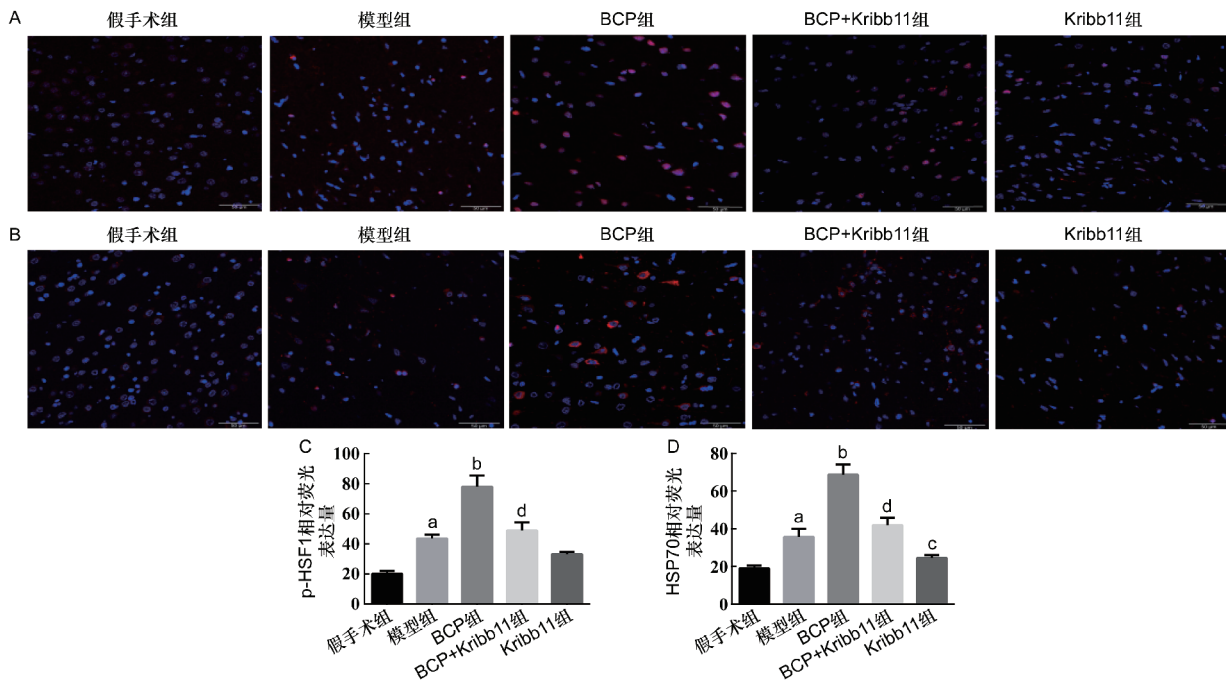
A: HE 染色; B: Nissl 染色; C: 皮层细胞存活率统计分析(HE,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); D: 皮层神经元损伤率统计分析(Nissl,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); 与假手术组相比, a:  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, b:  $P < 0.01$ ; 与 BCP 组相比, c:  $P < 0.01$

图 5 各组大鼠皮层的组织病理变化和神经元结构变化( $\times 400$ )

### 5 HSF1 抑制剂联合 BCP 对 HSF1/HSP70 通路的影响

免疫荧光结果显示,假手术组中 p-HSF1, HSP70 的红色荧光微弱;与假手术相比,模型组中红色荧光

有所增强;与模型组相比,BCP 组中 p-HSF1, HSP70 的红色荧光明显增强;而与 BCP 组相比,BCP + Kribb11 组中 p-HSF1, HSP70 的红色荧光明显减弱;同时, Kribb11 组的荧光强度低于模型组,见图 6。



A: 免疫荧光检测 p-HSF1 的表达水平, B: 免疫荧光检测 HSP70 的表达水平; 红色荧光分别为 p-HSF1, HSP70 蛋白, 蓝色荧光为细胞核; C ~ D: p-HSF1 和 HSP70 的相对荧光表达量统计分析( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); 与假手术组相比, a:  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.05$ ; 与 BCP 组相比, d:  $P < 0.01$

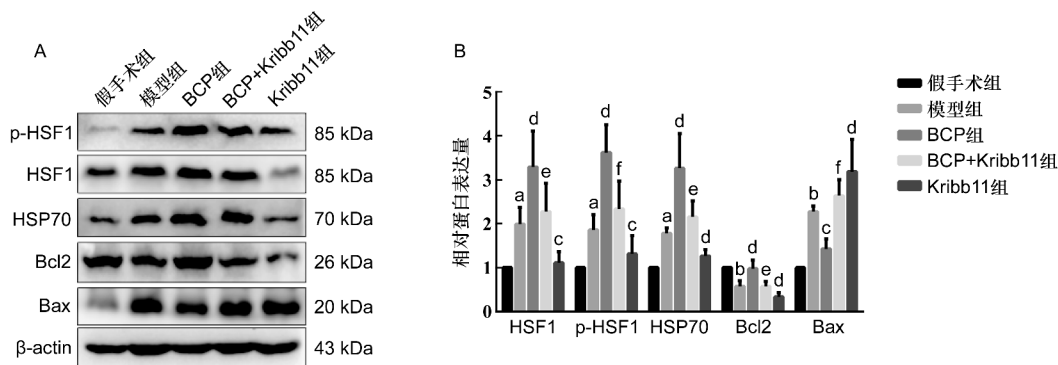
图 6 各组皮层组织中 p-HSF1 和 HSP70 的蛋白表达( $\times 400$ )

Western blot 结果显示,与 BCP 组相比, Kribb11 + BCP 组中 p-HSF1, HSP70, HSF1 蛋白表达明显降低

( $P < 0.01, P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达明显增加( $P < 0.01$ ), Bcl2 蛋白表达明显减少( $P < 0.05$ ), 见图 7。

提示在 CIR 损伤中, HSF1 可以激活 HSP70 的表达, BCP 可能通过激活 HSF1/HSP70 通路调控下游凋亡

蛋白表达。



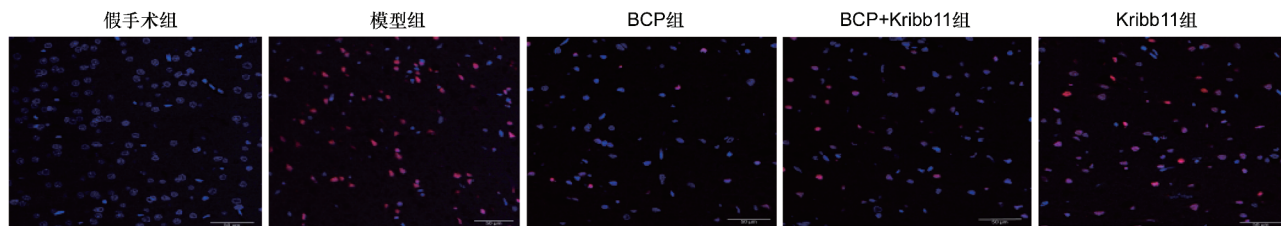
A: Western blot 检测相关蛋白表达; B: 蛋白相对表达量统计分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ); 与假手术组比较, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ ; 与 BCP 组比较, e:  $P < 0.05$ , f:  $P < 0.01$

图 7 各组皮层组织中相关蛋白的表达水平

### 6 BCP 对大鼠脑缺血侧皮层中细胞凋亡的影响

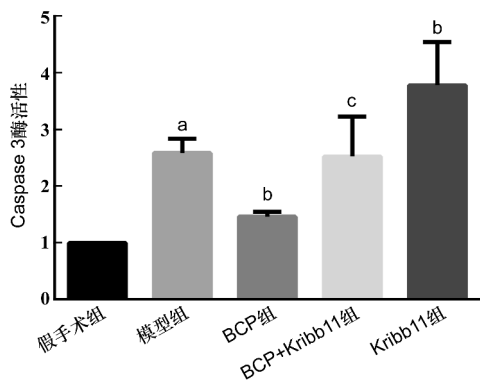
Tunel 染色结果显示, 与假手术组相比, 模型组中 Tunel 阳性细胞数量明显增加, 细胞大量凋亡; 与模型组相比, BCP 组中阳性细胞数量下降, 细胞凋亡减少。与 BCP 组相比, BCP + Kribb11 组中阳性细胞数增多, 细胞凋亡加重, 见图 8。Caspase 3 酶活性检

测显示, 与假手术组相比, 模型组中 Caspase 3 活性显著增高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, BCP 给药组中 Caspase 3 酶的活性降低 ( $P < 0.05$ )。与 BCP 组相比, Kribb11 加入后, BCP + Kribb11 组中 Caspase 3 酶活性反而增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 9。以上提示 BCP 可能通过激活 HSF1/HSP70 通路发挥抗凋亡作用。



红色荧光: Tunel 阳性; 蓝色荧光: 细胞核

图 8 各组皮层组织中细胞凋亡水平 ( $\times 400$ )



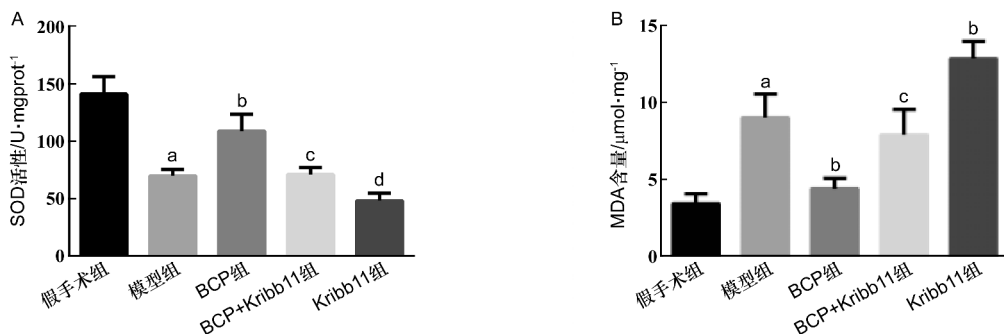
与假手术组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, b:  $P < 0.05$ ; 与 BCP 组比较, c:  $P < 0.05$

图 9 各组皮层组织中 Caspase 3 酶活性水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 7 BCP 对大鼠缺血侧皮层中氧化应激水平的影响

SOD 活性和 MDA 含量检测结果显示, 与假手术组相比, 模型组的 SOD 活性显著下降 ( $P < 0.01$ ), MDA 含量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, BCP 组中 SOD 活性增加 ( $P < 0.01$ ), MDA 含量减少 ( $P < 0.01$ ); 在 Kribb11 联合干预后, 现象发生逆转, 与 BCP 组相比, BCP + Kribb11 组中 SOD 活性下降 ( $P < 0.01$ ), MDA 含量增加 ( $P < 0.01$ ); 而与模型组相比, Kribb11 组的氧化应激水平更高, 见图 10。以上提示 BCP 可能通过激活 HSF1/HSP70 通路来发挥抗氧化作用。





A: SOD 活性检测( $\bar{x} \pm s, n=5$ ); B: MDA 含量测定( $\bar{x} \pm s, n=5$ ); 与假手术组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, b:  $P < 0.01$ ; 与 BCP 组比较, d:  $P < 0.01$

图 10 各组皮层组织中氧化应激水平(SOD 活性和 MDA 含量)

## 讨 论

缺血性脑卒中是一种严重的神经系统疾病,发病率高,致残致死率高。脑血管快速再灌注后易发生更严重的 CIR 损伤,加重病情,给临床治疗带来困难<sup>[1-2]</sup>。目前临床上还没有明确的药物用于治疗 CIR 损伤。BCP 是来源于许多天然植物(丁香叶、肉桂叶、樟树等)的油状液体,属于双环倍半萜烯类。研究发现,其在 CIR 损伤、阿尔茨海默病等神经系统疾病中具有明显的神经保护作用<sup>[5,21-22]</sup>。然而其在 CIR 损伤中的具体机制及作用靶点尚未完全清楚。本实验通过造模前给予不同剂量 BCP 干预证明 BCP 能显著减少大鼠脑梗死体积,降低神经行为障碍,改善缺血侧皮层组织的病理损伤,表明 BCP 对 CIR 损伤具有明显的改善作用且具有剂量依赖性。

CIR 损伤涉及的许多复杂病理过程中氧化应激是引起组织脂质过氧化、炎症和细胞凋亡发生的重要原因之一<sup>[5-6]</sup>。当发生 CIR 损伤时,机体氧化应激水平增高,产生大量的氧自由基和活性氧(ROS),体内的氧化与抗氧化作用失衡引起组织损伤,如触发 DNA 损伤、脂质过氧化,线粒体紊乱、炎症因子释放等导致细胞凋亡坏死,引起严重的神经功能障碍<sup>[6,10]</sup>。因此,降低细胞内氧化应激水平是减缓 CIR 所致的神经损伤的一种重要治疗手段。本研究对 BCP 在 CIR 损伤所致的氧化损伤是否具有改善作用进行了相关探究,脂质过氧化物 MDA 和抗氧化酶 SOD 是常见的内源性生化指标,反映机体的氧化应激水平<sup>[10]</sup>。结果表明 BCP 处理后,皮层组织中 SOD 活性增高、MDA 含量降低、神经元死亡数量减少,减轻了 CIR 后组织的氧化损伤。

研究表明,HSF1/HSP70 通路的激活在心血管、

组织缺血等疾病具有抗氧化抗凋亡的作用<sup>[11,13,18-19]</sup>。HSF1 是生物体内高度保守的转录因子,参与细胞存活、抗炎、抗氧化等过程<sup>[12-17]</sup>。在神经疾病中,神经元损伤与 HSF1 降解有关<sup>[15-16]</sup>。生理条件下,HSF1 在胞质内表达量低,以非活性单体形式存在;应激后,HSF1 激活形成三聚体促进核易位,同时发生磷酸化等蛋白修饰(如 ser326 位点利于核因子的活化和转录),随后与 DNA 上一些反应元件结合,诱导热休克蛋白、Snail 等下游基因的表达<sup>[7,26]</sup>。HSP70 作为分子伴侣蛋白,是分布最广和研究最多的热休克蛋白。在脑梗死及附近区域受到 HSF1 转录调控,被显著诱导上调<sup>[7-9]</sup>。HSP70 基因敲除的小鼠在 MCAO/R 后,梗死面积增加,神经损伤加重<sup>[7]</sup>;在 CIR 模型小鼠中静脉注射(*iv*)外源性重组 HSP70 后,减少了梗死体积和大脑皮质损伤,同时促进神经生长<sup>[9]</sup>。大量研究表明,HSP70 是脑卒中的令人兴奋的治疗靶点,过表达后能够维持线粒体膜稳态,降低氧自由基水平和  $Ca^{2+}$  超载,抑制凋亡小体释放和炎症的发生,对脑损伤有神经保护作用<sup>[7-9,11]</sup>。最近研究发现,在脑缺血中上调 HSF1/HSPB1(与 HSP70 同属于 HSPs 家族)通路可减轻由脂质过氧化造成的神经元铁死亡的发生<sup>[17]</sup>。

Zhang 等<sup>[24]</sup>报道称,HSP70 信号转导的激活受到上游 PI3K/AKT 通路的调控;同时在大鼠 CIR 损伤中,BCP 能够通过激活 PI3K/Akt 通路来减轻神经损伤<sup>[24]</sup>。为进一步探究 BCP 的保护作用与 HSF1/HSP70 信号通路的关系,本研究以 HSF1 抑制剂 Kribb11 作为阴性对照药物,进行了后续实验,结果显示,与模型组相比,Kribb11 组中抑制了 HSF1, p-HSF1 和 HSP70 蛋白表达,细胞氧化水平和组织损伤更严重。提示 CIR 损伤与 HSF1/HSP70 通路具

有相关性,抑制 HSF1 激活会加重缺血再灌注诱导的氧化损伤。BCP 预处理后,与模型组相比,HSF1, p-HSF1, HSP70 蛋白表达显著增加,而凋亡相关蛋白表达减少,组织氧化应激和细胞凋亡水平减少;联用 HSF1 抑制剂 Kribb11 阻断 HSF1 信号通路后, Kribb11 拮抗了 BCP 对缺血再灌注损伤的保护作用和抗氧化效应,逆转了相关通路蛋白表达,组织中氧化应激水平增高,细胞凋亡增多,脑缺血损伤加重。以上结果共同说明 BCP 能降低氧化应激水平,减少细胞凋亡,从而改善缺血所致的氧化损伤,可能与激活 HSF1/HSP70 通路有关。

综上所述,本研究探讨了 BCP 在大鼠 CIR 损伤中新的靶点与作用机制,初步证实 BCP 能通过激活 HSF1/HSP70 通路来产生抗氧化和抗凋亡作用,从而改善大鼠 CIR 损伤。BCP 未来或许会成为临床上一种高效治疗 CIR 损伤的新型药物。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] CAMPBELL BCV, DE SILVA DA, MACLEOD MR, *et al.* Ischaemic stroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 70.
- [2] 刘京东, 陈莎, 王钰淳, 等.  $\beta$ -石竹烯作用于 Notch1/NF- $\kappa$ B 信号轴对脑缺血再灌注损伤大鼠的改善作用[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(3): 218-225.
- [3] CHENG YJ, DONG Z, LIU S. B-Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB<sub>2</sub> receptor activation and the PPAR $\gamma$  pathway[J]. *Pharmacology*, 2014, 94(1-2): 1-12.
- [4] JIANG YB, HE RY, SHI YJ, *et al.* Plasma exosomes protect against cerebral ischemia/reperfusion injury via exosomal HSP70 mediated suppression of ROS[J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117987.
- [5] LIU SW, LIU JD, WANG YC, *et al.* Differentially expressed genes induced by  $\beta$ -caryophyllene in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2021, 273: 119293.
- [6] SEKERDAG E, SOLAROGLU I, GURSOY-OZDEMIR Y. Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(9): 1396-1415.
- [7] KIM JY, HAN Y, LEE JE, *et al.* The 70-kDa heat shock protein (Hsp70) as a therapeutic target for stroke[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(3): 191-199.
- [8] LUO LL, LI YF, SHAN HM, *et al.* L-glutamine protects mouse brain from ischemic injury via up-regulating heat shock protein 70[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(9): 1030-1041.
- [9] DEMYANENKO S, NIKUL V, RODKIN S, *et al.* Exogenous recombinant Hsp70 mediates neuroprotection after photothrombotic stroke[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 26(1): 103-114.
- [10] SU XT, WANG L, MA SM, *et al.* Mechanisms of acupuncture in the regulation of oxidative stress in treating ischemic stroke[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7875396.
- [11] YAO MM, ZHAO ZM, WEI L, *et al.* HSF1/HSP pathway in the Hippocampus is involved in SIRT1-mediated caloric restriction-induced neuroprotection after surgery in aged mice[J]. *Exp Gerontol*, 2019, 119: 184-192.
- [12] HUANG C, LU X, TONG LJ, *et al.* Requirement for endogenous heat shock factor 1 in inducible nitric oxide synthase induction in murine microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 189.
- [13] LIU W, XIA F, HA Y, *et al.* Neuroprotective effects of HSF1 in retinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(4): 965-977.
- [14] JIN YT, LI CY, XU DW, *et al.* Jagged1-mediated myeloid Notch1 signaling activates HSF1/Snail and controls NLRP3 inflammasome activation in liver inflammatory injury[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(12): 1245-1256.
- [15] KIM E, SAKATA K, LIAO FF. Bidirectional interplay of HSF1 degradation and UPR activation promotes tau hyperphosphorylation[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(7): e1006849.
- [16] GOMEZ-PASTOR R, BURCHFIELD ET, NEEF DW, *et al.* Abnormal degradation of the neuronal stress-protective transcription factor HSF1 in Huntington's disease[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14405.
- [17] 饶政清, 梅志刚, 葛金文, 等. 脑泰方调控细胞铁转运抑制铁死亡保护脑卒中缺血损伤的机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6552-6560.
- [18] ZHENG XB, XU F, LIANG H, *et al.* SIRT1/HSF1/HSP pathway is essential for exenatide-alleviated, lipid-induced hepatic endoplasmic Reticulum stress[J]. *Hepatology*, 2017, 66(3): 809-824.
- [19] REN ZK, DONG ZH, XIE P, *et al.* PNU282987 inhibits amyloid- $\beta$  aggregation by upregulating astrocytic endogenous  $\alpha$ B-crystallin and HSP-70 via regulation of the  $\alpha$ 7AChR, PI3K/Akt/HSF-1 signaling axis[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 201-208.
- [20] SUN X, YIN YH, KONG LC, *et al.* The effect of propofol on hypoxia-modulated expression of heat shock proteins: potential mechanism in modulating blood-brain barrier permeability[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 462(1-2): 85-96.
- [21] YANG M, LV YJ, TIAN XC, *et al.* Neuroprotective effect of  $\beta$ -caryophyllene on cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of necroptotic neuronal death and inflammation; *in vivo* and *in vitro*[J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 583.
- [22] CHENG YJ, DONG Z, LIU S. B-Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB<sub>2</sub> receptor activation and the PPAR $\gamma$  pathway[J]. *Pharmacology*, 2014, 94(1-2): 1-12.
- [23] GERTSCH J, LEONTI M, RADUNER S, *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid[J]. *PNAS*, 2008, 105(26): 9099-9104.
- [24] ZHANG Q, AN RD, TIAN XC, *et al.* B-caryophyllene pretreatment alleviates focal cerebral ischemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(5): 1459-1469.
- [25] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [26] YOON YJ, KIM JA, SHIN KD, *et al.* KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(3): 1737-1747.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-06-20