

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.10.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220314.1454.002.html\(2022-03-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220314.1454.002.html(2022-03-15))鸡血藤总黄酮对卒中大鼠 Notch/NF- κ B 通路及吞咽功能障碍的影响

张菁华,刘胜贤,李景丽,刘 宁

(天津市北辰区中医医院脑病三科,天津 300400)

[摘要] **目的** 从果蝇双翅边缘缺刻同源基因(Notch)/核转录因子- κ B(NF- κ B)通路,分析鸡血藤总黄酮缓解卒中后大鼠吞咽功能障碍的可能机制。**方法** 取 SD 雄性大鼠,用线栓法短暂性阻塞大脑中动脉 90 min 建立卒中后吞咽困难模型,随机分为假手术组、模型组、鸡血藤总黄酮组(20 g/kg)、Notch 通路激活剂(Jagged1)组(25 ng/kg)、鸡血藤总黄酮+Jagged1 组(20 g/kg+25 ng/kg),每组 12 只。术后第 2 天开始给药,各组连续给药 14 d,每天 1 次。末次给药 30 min 后,用生物信号采集系统记录大鼠吞咽次数及吞咽反应时间;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 P 物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)水平;免疫组织化学法检测孤束核延髓组织 SP 阳性表达水平;TUNEL 染色观察孤束核延髓组织神经细胞凋亡情况;Western blot 检测孤束核延髓组织 Notch、多毛/增强分裂因子(Hes1)、p-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65、促凋亡基因(Bax)蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠吞咽中枢神经凋亡及损伤严重,吞咽次数减少,SP 阳性表达、CGRP 表达降低,脑梗死体积、吞咽反应时间增加,吞咽中枢神经组织中 Notch/NF- κ Bp65 活化介导的促凋亡活性升高($P<0.05$)。鸡血藤总黄酮组大鼠可减轻吞咽中枢神经凋亡及损伤,抑制吞咽中枢神经组织中 Notch/NF- κ Bp65 活化介导的促凋亡活性升高,增加吞咽次数、SP 阳性表达,缩短吞咽反应时间,改善吞咽功能障碍($P<0.05$)。Notch 通路激活剂-Jagged1 处理可促进吞咽中枢神经组织中 Notch/NF- κ Bp65 活化介导的促凋亡反应进一步活化,加重吞咽中枢神经凋亡及损伤,减少吞咽次数及 SP 阳性表达,并减弱鸡血藤总黄酮发挥的上述作用($P<0.05$)。**结论** 鸡血藤总黄酮可抑制吞咽中枢神经凋亡及损伤,缓解卒中后吞咽困难障碍的发展,且其抑制作用可能与抑制 Notch/NF- κ B 通路活化有关。

[关键词] 鸡血藤总黄酮;卒中;吞咽功能障碍;果蝇双翅边缘缺刻同源基因/核转录因子- κ B 通路**[中图法分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)10-1631-07Effects of total flavonoids of caulis spatholobus on Notch/NF- κ B pathway and swallowing dysfunction in rats with stroke

ZHANG Jinghua, LIU Shengxian, LI Jingli, LIU Ning

(Third Department of Encephalopathy, Beichen District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300400, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the possible mechanism of the total flavonoids of caulis spatholobus to alleviate the swallowing dysfunction in stroke rats from the Drosophila double-wing edge notch homologous gene (Notch)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. **Methods** The SD male rats were taken to establish the post-stroke dysphagia model by using the suture method to temporarily occlude the middle cerebral artery for 90 min, and randomly divide into the sham operation group, model group, Caulis Spatholobus total flavonoids group (20 g/kg), Notch pathway activator (Jagged1) group (25 ng/kg), Caulis Spatholobus total flavonoid+Jagged1 group (20 g/kg+25 ng/kg), 12 cases in each group. The drug was given on postoperative 2 d for continuous 14 d, once daily. At 30 min after the last administration, the times of swallowing and the time of swallowing reaction were recorded by the biological signal acquisition system; the levels of serum substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the immunohistochemistry was used to detect the positive expression level of SP in the medulla tissue of nucleus tractus solitarius; the TUNEL staining was used to observe the neuronal apoptosis in the medulla tissue

of nucleus tractus solitarius; Western blot was used to detect the protein expression levels of Notch, hirsutism/enhanced mitotic factor (Hes1), p-NF- κ Bp65, NF- κ Bp65 and apoptosis promoting gene (Bax) in the medulla tissue of nucleus tractus solitarius. **Results** Compared with the sham operation group, the rat swallowing central nervous apoptosis and damage were serious, the swallowing frequency was decreased, the SP positive expression and CGRP expression were decreased, the volume of cerebral infarction and swallowing response time increased, and the pro-apoptotic activity mediated by Notch/NF- κ Bp65 activation in swallowing central nerve tissue were increased ($P < 0.05$). The rats in the caulis spatholobus total flavonoids group could reduce the apoptosis and damage of the swallowing central nervous, inhibit the increase in the pro-apoptotic activity mediated by Notch/NF- κ Bp65 activation in the swallowing central nervous tissue, increase the swallowing frequency and the SP positive expression, shorten the swallowing reflex time and improve the swallowing dysfunction ($P < 0.05$). The Notch pathway activator-Jagged1 treatment could promote the further activation of the pro-apoptotic response mediated by Notch/NF- κ Bp65 activation in the swallowing central nervous tissue, aggravate the apoptosis and damage of the swallowing central nerve, reduce the frequency of swallowing and the SP positive expression, and attenuate the total flavonoids of caulis spatholobus to play the above-mentioned effects ($P < 0.05$). **Conclusion** The total flavonoids of caulis spatholobus can inhibit the apoptosis and damage of the swallowing central nervous, and alleviate the development of dysphagia after stroke, moreover its inhibitory effect may be related to the inhibition of the activation of the Notch/NF- κ B pathway.

[Key words] total flavonoid of caulis spatholobus; stroke; swallowing dysfunction; *Drosophila* double-wing margin nicked homologous gene/nuclear transcription factor- κ B pathway

缺血性卒中具有高致死率和高致残率^[1]。近半数卒中患者均有吞咽困难症状^[2]。吞咽困难可引起肺炎、营养不良及脱水等并发症,增加卒中病死率,延长患者住院时间并影响康复进程^[3]。因此采取积极有效措施防治吞咽困难的发生,对卒中患者康复具有重要意义。吞咽是一种复杂的神经调节,卒中所引起的任何与吞咽运动相关的皮质、皮质纤维、脑干或相关神经核团的损伤都可能导致吞咽困难的发生^[4]。研究发现,果蝇双翅边缘缺刻同源基因(*drosophila* double-wing margin nicked homologous gene, Notch)/核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路可参与调控脑损伤后脑室下区的神经细胞生存及组织损伤修复过程^[5]。但 Notch/NF- κ B 通路对卒中后吞咽神经中枢的影响报道较少。中药鸡血藤归肝、肾经,具有补血活血、通络强筋骨的功效,常用于调理月经不调、麻木瘫痪、风湿痹痛等^[6],总黄酮为鸡血藤中的活性成分之一^[7]。有研究报道鸡血藤总黄酮对缺血组织损伤有一定保护作用^[8],且对脊髓损伤有一定治疗作用^[9]。基于此,笔者推测鸡血藤总黄酮可能通过调控 Notch/NF- κ B 通路对卒中后吞咽中枢神经损伤有一定改善作用,本研究建立卒中吞咽困难大鼠模型,对此进行验证,以期对鸡血藤总黄酮的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级同遗传背景 SD 雄性大鼠 60 只,体重 200~220 g,由广东省医学实验动物中心提供,生产许

可证号为 SCXK(粤)2018-0002。所有大鼠于本院动物房中饲养,自然光照,自由饮食、饮水,温度 25℃,相对湿度 50%,噪音低于 80 分贝,保持动物房环境及鼠笼清洁、透气。本研究经医院伦理委员会批准,实验动物符合 3R 原则。

1.2 仪器与试剂

鸡血藤总黄酮(货号 B20527,规格 20 mg,纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;Notch 通路激活剂(Jagged1,货号 HY-P1846)购自美国 R&D Systems 公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,货号 0765)购自上海研卉生物科技有限公司;Notch、多毛/增强分裂因子(Hes1)、p-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65、促凋亡基因(Bax)等抗体(货号 ab8925、ab108937、ab76302、ab16502、ab32503)等均购自美国 Abcam 公司;P 物质(substance P, SP)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(货号 CSB-E08361)购自上海振誉生物科技有限公司;血清降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP, 货号 YS-E8537)购自上海研生实业有限公司;SP 免疫组织化学抗体(货号 ab203329)购自美国 Abcam 公司;BCA 蛋白定量试剂盒和胰蛋白酶(货号 P0768、P0231)均购自美国 Pierce 公司。手动轮转式切片机(型号 RM2125RTS)购自德国 Leica 公司;光学显微镜(型号 SMZ745)购自日本尼康公司;蛋白电泳仪、半干转膜仪(型号 1659001、Trans-Blot SD)购自美国 Bio-Rad 公司;化学发光仪(型号 GIS-500)购自杭州米欧仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 模型建立及分组

将大鼠分为假手术组、模型组、鸡血藤总黄酮组(20 g/kg)、Jagged1 组(25 ng/kg)、鸡血藤总黄酮+Jagged1 组(20 g/kg+25 ng/kg),每组 12 只。除假手术组外其余各组均参考文献[10]用线栓法短暂性阻塞大脑中动脉 90 min 建立卒中后吞咽困难模型。将大鼠禁食不禁水 12 h 后用 3%戊巴比妥钠麻醉,固定于鼠板上,颈部备皮,于颈中线做约 1.5 cm 纵向切口,钝性分离并暴露颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,用提前消过毒的尼龙线线栓结扎颈总动脉、颈外动脉近心端,并在颈总动脉靠近颈外动脉、颈内动脉分叉处预留活结,用动脉夹夹闭颈内动脉。用 2 mL 注射器针头辅助尼龙线线栓插入颈总动脉,拔出针头,继续插入线栓,松开颈内动脉动脉夹,使线栓于分叉处进入颈内动脉 18~20 mm,于远心端预留活结处结扎颈总动脉,用于固定线栓。逐层缝合切口,留置于外的线栓尾端用油性笔涂黑,并给予大鼠 4 万单位青霉素腹腔注射,取侧卧位放置于保温毯上。计时 90 min 后将线栓拔出约 1 cm,剪去拔出部分的线栓,完成手术(术中无死亡)。假手术组除不插入线栓外,其余手术过程与模型组相同。

术后第 2 天开始干预给药,鸡血藤总黄酮及 Jagged1 参考文献[9,11]设置剂量,并用生理盐水及磷酸盐缓冲溶液稀释成浓度为 2 g/mL、2.5 ng/mL 的溶液,按 10 mL/kg 的剂量给药,鸡血藤总黄酮+Jagged1 组注射鸡血藤总黄酮溶液的同时给予 Jagged1 溶液,假手术组、模型组均经腹腔注射等量生理盐水及磷酸盐缓冲溶液。连续给药 14 d,每天 1 次,末次给药 30 min 后取材,进行后续试验。

1.3.2 大鼠吞咽次数及吞咽反应时间检测

各组大鼠末次给药 30 min 后,用戊巴比妥钠麻醉,于颈部中线切长约 1 cm 的切口,暴露二腹肌前腹,将张力转换器一端连接二腹肌前腹,另一端与生物信号转换器相连。经大鼠口腔插入直径约 0.5 mm 软管直达舌根部,用微量注射泵以 3 μ L/s 的速度注入蒸馏水 30 s,停止 1 min 后再次注射,重复此操作 3 次,用生物信号采集系统记录吞咽次数及从蒸馏水刺激开始至第 1 次吞咽发生的时间即吞咽反应时间。

1.3.3 大鼠脑梗死体积检测

各组大鼠测完吞咽次数及吞咽反应时间后,立即取腹主动脉血 3 mL,离心分离后取血清,置于一 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存,备用。用 4%多聚甲醛经心脏灌注取脑,各组均随机取 6 只大鼠脑组织标本,去除小脑和间脑组织,剥离孤束核所在部位的延髓组织,剪取部分置于一 80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用,其余孤束核延髓组织置于 4%多聚甲醛中固定备用。剩余 6 只大鼠取完整脑组织,置于一 20 $^{\circ}$ C 中冰冻待组织冻硬后,在冰上将大脑由前

向后做冠状切片。放入质量分数为 2%的 TTC 染液中,37 $^{\circ}$ C 避光染色 20 min,隔 10 min 翻动 1 次。红色为正常组织,白色为梗死灶。染色完成后,于质量分数为 4%的多聚甲醛中固定,4 $^{\circ}$ C 过夜后拍照。用 Image J 1.41 软件统计每个脑片梗死面积及正常组织面积,并计算梗死体积百分比: $V\%=(A_1+A_2+\dots+A_n)/(B_1+B_2+\dots+B_n)$,A 为每个脑片梗死区域面积,B 为每个脑片梗死侧大脑半球面积,n 为脑片序号。

1.3.4 大鼠血清神经肽 SP、CGRP 水平检测

取 1.3.3 中-20 $^{\circ}$ C 保存的血清组织于 4 $^{\circ}$ C 条件下解冻后,按 ELISA 试剂盒说明书检测 SP、CGRP 水平。

1.3.5 大鼠孤束核延髓组织神经细胞凋亡检测及 SP 阳性表达检测

取 1.3.3 中 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 的孤束核延髓组织,经常规脱水、透明、石蜡包埋后切成 5 μ m 切片,取部分切片并经脱蜡、脱水、3% H_2O_2 灭活,按 TUNEL 试剂盒说明书进行染色、孵育、封闭、苏木素复染、封片后,于显微镜下观察切片中神经细胞凋亡情况(细胞核染成棕褐色颗粒者为凋亡细胞),细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。取剩余部分切片,进行脱蜡、水化、抗原修复后,加入一抗抗体(SP,1:500)室温孵育过夜,TBST 漂洗后,加入羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育 2 h,TBST 漂洗后,加 DAB 显色剂,苏木精溶液复染、透明、封片后于 400 倍光镜下拍照,每个切片随机取 5 个视野,采用 Image Pro Plus 5.0 图像分析系统分析孤束核区域积分光密度值及图像面积,计算阳性反应物质平均光密度,结果以 5 个视野阳性表达的平均光密度值表示。

1.3.6 Western blot 法检测孤束核延髓组织 Notch、Hes1、p-NF- κ Bp65/NF- κ Bp65、Bax 蛋白表达

取 1.3.3 中-80 $^{\circ}$ C 保存的孤束核延髓组织于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中解冻后,用组织匀浆器匀浆,离心分离后取上清液,用蛋白提取试剂盒及蛋白定量 BCA 试剂盒提取并检测蛋白总浓度。取 50 μ g 蛋白上样,进行电泳和转膜反应,TBST 溶液清洗后,加入 5%脱脂牛奶室温下封闭 1 h,TBST 溶液清洗 3 次后,加入一抗[Notch、Hes1、p-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65、Bax、 β -actin(内参)],除内参抗体稀释倍数为 1:2 000 外,其余抗体均为 1:1 000。4 $^{\circ}$ C 摇床室温孵育过夜,TBST 振荡后加入 HRP 羊抗兔二抗(稀释倍数 1:2 000),37 $^{\circ}$ C 摇床室温孵育 1 h,TBST 清洗 3 次后,采用增强化学发光法显色,以化学发光仪观察条带并拍照,并以 Image-J 软件分析各组蛋白相对表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件对实验数据进行统计分析。

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠吞咽次数及吞咽反应时间比较

与假手术组相比,模型组大鼠吞咽次数减少($P < 0.05$),吞咽反应时间增加($P < 0.05$)。与模型组相比,Jagged1 组大鼠吞咽次数减少($P < 0.05$),吞咽反应时间增加($P < 0.05$);鸡血藤总黄酮组大鼠吞咽次数增加($P < 0.05$),吞咽反应时间减少($P < 0.05$)。鸡血藤总黄酮+Jagged1 组大鼠吞咽次数、吞咽反应时间与鸡血藤总黄酮组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠吞咽次数及吞咽反应时间比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)		
组别	吞咽次数 (次/秒)	吞咽反应时间 (s)
假手术组	16.71±1.26	2.71±0.26
模型组	9.31±0.85 ^a	5.29±0.55 ^a
Jagged1 组	3.93±0.38 ^b	7.93±0.72 ^b
鸡血藤总黄酮组	12.38±1.05 ^b	3.38±0.31 ^b
鸡血藤总黄酮+Jagged1 组	9.06±0.78 ^c	5.12±0.49 ^c

^a: $P < 0.05$,与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$,与模型组比较; ^c: $P < 0.05$,与鸡血藤总黄酮组比较。

2.2 大鼠血清 SP、CGRP 水平比较

与假手术组相比,模型组大鼠血清 SP、CGRP 水平降低($P < 0.05$)。与模型组相比,Jagged1 组大鼠血清 SP、CGRP 水平降低($P < 0.05$),鸡血藤总黄酮组大鼠血清 SP、CGRP 水平升高($P < 0.05$)。鸡血藤总黄酮+Jagged1 组大鼠血清 SP、CGRP 水平与鸡血藤总黄酮组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 大鼠脑梗死体积比较

与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死体积增大($P < 0.05$)。与模型组相比,Jagged1 组大鼠脑梗死体积增大($P < 0.05$),鸡血藤总黄酮组脑梗死体积缩

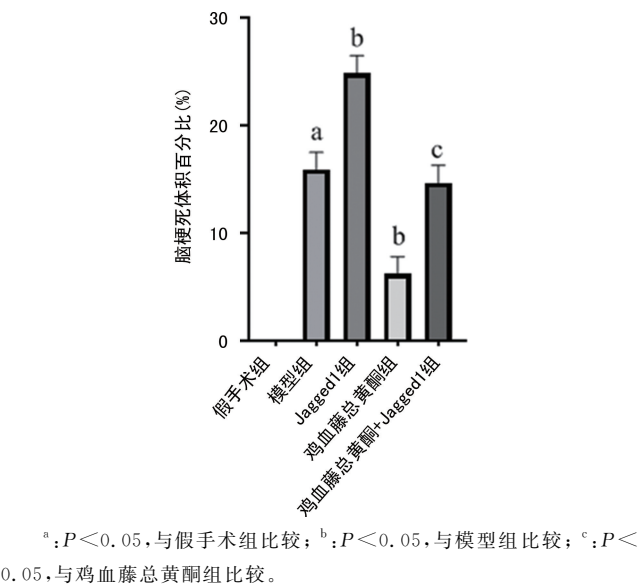
小($P < 0.05$)。鸡血藤总黄酮+Jagged1 组脑梗死体积与鸡血藤总黄酮组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.4 大鼠孤束核延髓组织神经细胞凋亡情况

假手术组大鼠孤束核延髓组织几乎无神经细胞凋亡。模型组大鼠可见孤束核延髓组织中神经细胞凋亡率升高($P < 0.05$)。与模型组比较,Jagged1 组神经细胞凋亡率升高($P < 0.05$),鸡血藤总黄酮组神经细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。鸡血藤总黄酮+Jagged1 组神经细胞凋亡率与鸡血藤总黄酮组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2、3。

表 2 各组大鼠血清 SP、CGRP 水平比较 ($n=12, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)		
组别	SP	CGRP
假手术组	146.79±14.21	12.35±1.26
模型组	97.31±9.81 ^a	6.31±0.55 ^a
Jagged1 组	63.03±6.32 ^b	3.93±0.32 ^b
鸡血藤总黄酮组	122.38±12.21 ^b	9.05±0.91 ^b
鸡血藤总黄酮+Jagged1 组	99.54±9.52 ^c	6.43±0.69 ^c

^a: $P < 0.05$,与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$,与模型组比较; ^c: $P < 0.05$,与鸡血藤总黄酮组比较。



^a: $P < 0.05$,与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$,与模型组比较; ^c: $P < 0.05$,与鸡血藤总黄酮组比较。

图 1 各组大鼠脑梗死体积比较($n=6$)

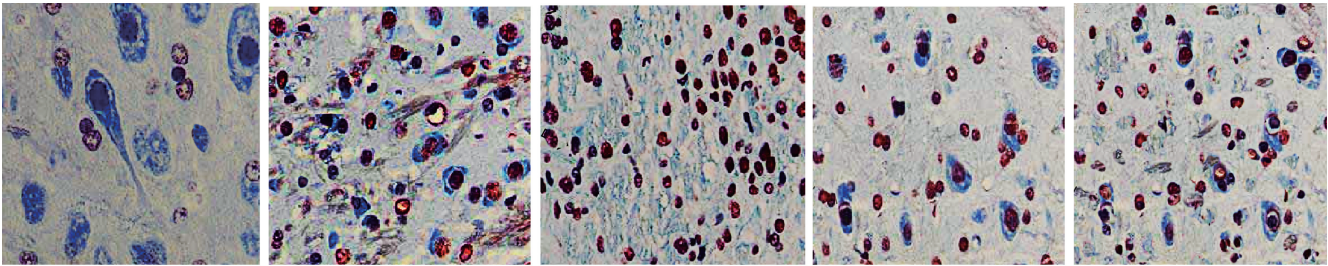


图 2 各组大鼠孤束核延髓组织 TUNEL 染色($\times 400$)

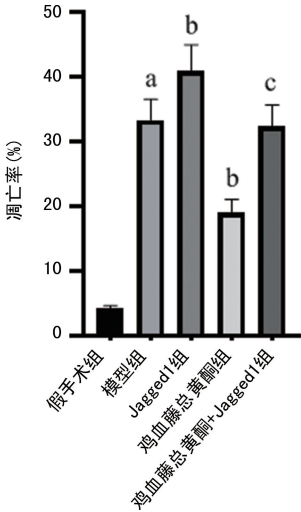
2.5 各组大鼠孤束核延髓组织 SP 阳性表达情况

假手术组大鼠孤束核延髓组织 SP 呈强阳性表

达。模型组大鼠孤束核延髓 SP 阳性表达水平降低($P<0.05$)。与模型组相比,Jagged1 组孤束核延髓 SP 阳性表达水平降低($P<0.05$),鸡血藤总黄酮组孤束核延髓 SP 阳性表达水平升高($P<0.05$)。鸡血藤总黄酮+Jagged1 组 SP 阳性表达水平与鸡血藤总黄酮组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4、图 5。

2.6 各组大鼠延髓孤束核组织 Notch、Hes1、p-NF-κBp65/NF-κBp65、Bax 蛋白表达比较

与假手术组相比,模型组大鼠孤束核延髓组织 Notch、Hes1、p-NF-κBp65/NF-κBp65、Bax 蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,Jagged1 组大鼠孤束核延髓组织 Notch、Hes1、p-NF-κBp65/NF-κBp65、Bax 蛋白表达升高($P<0.05$),鸡血藤总黄酮组大鼠孤束核延髓组织 Notch、Hes1、p-NF-κBp65/NF-κBp65、Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。鸡血藤总黄酮+Jagged1 组大鼠上述指标与鸡血藤总黄酮组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6、7。



^a: $P<0.05$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较;^c: $P<0.05$,与鸡血藤总黄酮组比较。

图 3 各组大鼠孤束核延髓组织中神经细胞凋亡率比较($n=6$)

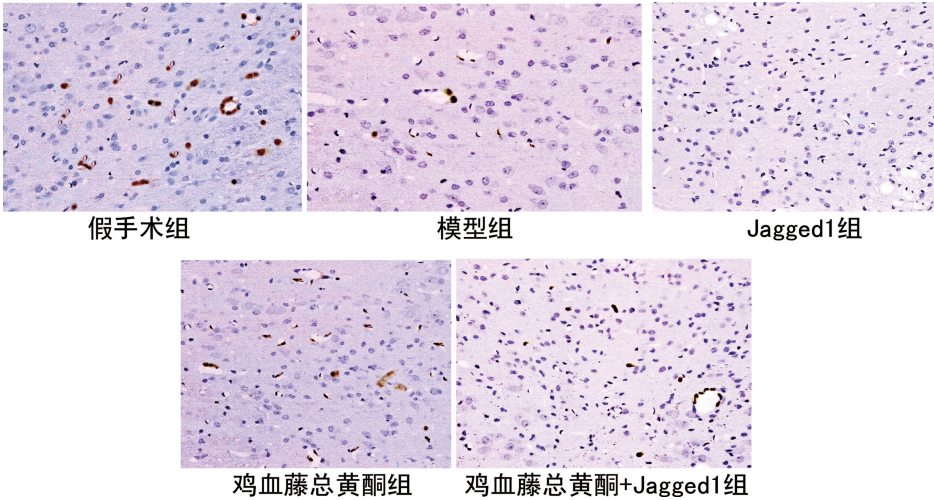
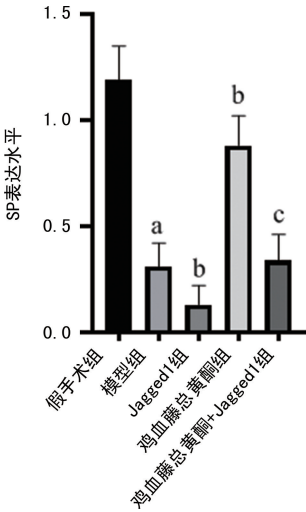
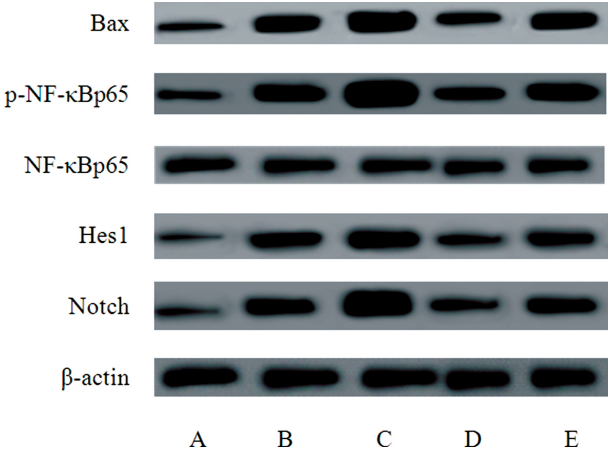


图 4 各组大鼠孤束核延髓组织 SP 免疫染色($\times 200$)



^a: $P<0.05$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较;^c: $P<0.05$,与鸡血藤总黄酮组比较。

图 5 各组大鼠孤束核延髓组织中 SP 表达水平比较($n=6$)



A:假手术组;B:模型组;C:Jagged1 组;D:鸡血藤总黄酮组;E:鸡血藤总黄酮+Jagged1 组。

图 6 各组大鼠孤束核延髓组织 Notch、Hes1、p-NF-κBp65、NF-κBp65、Bax 蛋白表达免疫印迹图

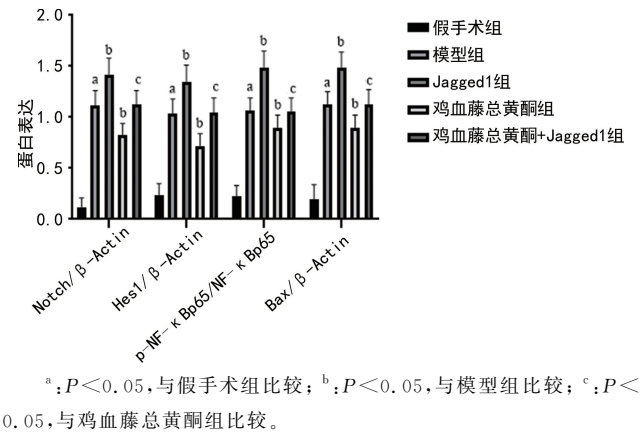


图 7 各组大鼠孤束核延髓组织 Notch、Hes1、p-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65、Bax 蛋白表达比较 (n=6)

3 讨 论

大脑中动脉及其分支的血栓栓塞是导致卒中发生的主要原因之一,中动脉线栓阻塞法是动物卒中模型的常见造模方法^[12]。吞咽属于神经调节行为,大脑左侧及右侧半球损伤均可引起孤束核组织神经的损伤,在神经受到刺激或损伤后,中枢端和外周端神经末梢释放 SP、CGRP 等神经肽,产生和传递感觉^[13-14]。研究显示,SP 水平是维持吞咽反射的重要因子,SP 水平降低与吞咽反射减弱关系密切,CGRP 可减少大鼠脑组织神经元凋亡,对缺血神经元具有保护作用^[15-16]。本研究用线栓阻断大脑中动脉血供 90 min,14 d 后检测到大鼠吞咽次数显著少于假手术组,吞咽反应时间及脑梗死体积明显多于假手术组,与文献^[10]结果一致,提示卒中吞咽困难造模成功。另外,本研究观察到模型大鼠伴随吞咽中枢孤束核组织神经细胞凋亡、血清 SP、CGRP 水平降低及孤束核组织中 SP 阳性表达降低,提示抑制孤束核组织神经细胞凋亡可能有利于改善吞咽困难。

中医将卒中后吞咽困难归属于“中风”“喑俳”“喉痹”等范畴,认为卒中后吞咽困难病位在脑,病变常涉及肝、脾、肾等,风、痰、火、瘀及肝脏阴阳失调等是卒中后吞咽困难发生、发展的主要病理因素^[17-18]。研究证实,中药鸡血藤归肝、肾经,是一种传统的活血化瘀药,可广泛应用于冠心病、脑梗死、肢体动脉硬化闭塞症等,且其造血和活血作用对麻木瘫痪、风湿痹痛等有一定缓解作用^[7]。本研究结果显示,鸡血藤总黄酮组大鼠脑梗死体积、吞咽反应时间、吞咽中枢神经细胞凋亡率明显少于模型组,与吞咽传递相关的神经递质 SP、CGRP 水平及 SP 阳性表达、吞咽次数均显著高于模型组,提示鸡血藤总黄酮对卒中后吞咽中枢神经损伤有一定改善作用。

本研究还发现,模型组大鼠吞咽中枢组织 Notch 及其靶基因 Hes1、p-NF- κ Bp65、Bax 表达异常升高,给予 Jagged1 激活 Notch 信号后,大鼠脑梗死体积增

加、吞咽中枢神经细胞凋亡、吞咽次数减少、吞咽反应时间延长及吞咽传递神经递质释放及表达减少进一步加重。WANG 等^[19]发现神经细胞损伤后 Notch 信号通路处于激活状态,阻断 Notch 信号可促进神经干细胞分化为神经元。Notch 信号通路激活可提高靶基因 Hes1 表达和 NF- κ B 蛋白磷酸化水平,上调 Bax 等促凋亡基因表达,加重神经元损伤^[20-21]。另外,研究显示,抑制 Notch 信号通路激活对缺血性卒中起脑保护作用^[19]。本研究结果显示,鸡血藤总黄酮可抑制大鼠吞咽中枢组织 Notch、Hes1、Bax 蛋白表达及 NF- κ Bp65 磷酸化水平,明显缓解脑梗死及吞咽困难障碍,然而上述作用可被 Jagged1 逆转,推测鸡血藤总黄酮可能通过抑制 Notch/NF- κ B 通路,减轻中枢神经凋亡,进而抑制卒中后吞咽困难障碍的发展。

综上所述,鸡血藤总黄酮可能通过抑制 Notch/NF- κ B 通路,抑制吞咽中枢神经凋亡及损伤,缓解卒中后吞咽困难障碍的发展。但卒中吞咽中枢神经的调节作用复杂,可能涉及其他通路,鸡血藤总黄酮缓解卒中后吞咽困难障碍发展的其他分子生物学机制有待后续深入研究。

参考文献

[1] RENNERT R C, WALI A R, STEINBERG J A, et al. Epidemiology, natural history, and clinical presentation of large vessel ischemic stroke[J]. Neurosurgery, 2019, 85(1): S4-8.

[2] DE COCK E, BATENS K, HEMELSOET D, et al. Dysphagia, dysarthria and aphasia following a first acute ischaemic stroke; incidence and associated factors[J]. Eur J Neurol, 2020, 10(1): 1471-1485.

[3] KIM J M, LEE Z, HAN S, et al. Treatment of Ramsay-Hunt's syndrome with multiple cranial nerve involvement and severe dysphagia: a case report[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(17): 591-598.

[4] KIM H, SUH Y. Changes in the dysphagia and nutritional status of patients with brain injury [J]. J Clin Nurs, 2018, 27(8): 1581-1588.

[5] JOUR G, ANDEEN N K, AL-ROHIL R, et al. Novel enriched pathways in superficial malignant peripheral nerve sheath tumours and spindle/desmoplastic melanomas [J]. J Pathol, 2018, 244(1): 97-106.

[6] 刘静, 王晓静, 戴忠, 等. 鸡血藤研究进展[J]. 中国药事, 2019, 33(2): 76-82.

- [7] 周柳芳,黄照河,杨彩艳,等. 鸡血藤提取物抗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 微创医学,2020,15(2):216-219.
- [8] 李丽,王林萍. 鸡血藤总黄酮对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 中成药,2015,37(10):2303-2306.
- [9] 刘仰斌,张志花,陈亚运,等. 鸡血藤总黄酮对坐骨神经损伤大鼠机械痛敏影响的实验研究[J]. 医学研究与教育,2015,32(1):7-11.
- [10] SUGIYAMA N, NISHIYAMA E, NISHIKAWA Y, et al. A novel animal model of dysphagia following stroke[J]. *Dysphagia*, 2014, 29(1):61-67.
- [11] 吴绍军,刘俊才,左银龙,等. Notch 信号通路在膝骨关节炎软骨细胞凋亡中的作用研究[J]. 华西医学,2018,33(9):115-120.
- [12] 周雨濛,张卓伯,刘锡茜,等. 局灶性脑缺血动物模型的建立及神经功能评价[J]. 生物医学工程与临床,2018,22(4):473-476.
- [13] MUSCHTER D, FLEISCHHAUER L, TAHERI S, et al. Sensory neuropeptides are required for bone and cartilage homeostasis in a murine destabilization-induced osteoarthritis model[J]. *Bone*, 2020, 133(1):115-128.
- [14] MARCHEZAN J, BECKER M, SCHWARTSMANN G, et al. A placebo-controlled crossover trial of gastrin-releasing peptide in childhood autism[J]. *Clin Neuropharmacol*, 2017, 40(3):108-112.
- [15] GUILLEN-SOLA A, SOLER N B, MARCO E, et al. Effects of prophylactic swallowing exercises on dysphagia and quality of life in patients with head and neck cancer receiving (chemo) radiotherapy: the redyor study, a protocol for a randomized clinical trial[J]. *Trials*, 2019, 20(1):503-509.
- [16] KRAMER D J, RISSO D, KOSILLO P, et al. Combinatorial expression of grp and neurod6 defines dopamine neuron populations with distinct projection patterns and disease vulnerability[J]. *eNeuro*, 2018, 5(3):152-158.
- [17] 房芳芳,王孝文,鞠学红,等. 脑卒中后吞咽障碍的发生机制及康复治疗研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(31):103-106.
- [18] 王昭凤,周义杰. 脑卒中后吞咽困难的中医治疗进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(5):191-193.
- [19] WANG J, YE Z, ZHENG S, et al. Lingo-1 shRNA and Notch signaling inhibitor DAPT promote differentiation of neural stem/progenitor cells into neurons[J]. *Brain Res*, 2016, 16(34):34-44.
- [20] 杨德民,杨文佳,唐鹏,等. 丙酮酸乙酯通过 Notch1 和 NF- κ B 信号修复大脑中动脉闭塞诱导的神经损伤[J]. 神经疾病与精神卫生, 2018, 18(12):860-864.
- [21] 温艺超,陈伟燕,谢富华,等. DAPT 阻断 Notch 通路对动脉粥样硬化型缺血性脑卒中大鼠的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11):119-124.

(收稿日期:2021-10-08 修回日期:2022-03-12)

(上接第 1630 页)

- et al. Berberine inhibits gluconeogenesis in skeletal muscles and adipose tissues in streptozotocin-induced diabetic rats via LKB1-AMPK-TORC2 signaling pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3):530-538.
- [17] HOLLSTEIN P E, EICHNER L J, BRUN S N, et al. The AMPK-related kinases SIK1 and SIK3 mediate key tumor-suppressive effects of LKB1 in NSCLC[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(11):1606-1627.
- [18] SID V, WU N, SARNA L K, et al. Folic acid supplementation during high-fat diet feeding restores AMPK activation via an AMP-LKB1-dependent mechanism[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015, 309(10):R1215-1225.
- [19] LI D, LIU F, WANG X, et al. Apple polyphenol extract alleviates high-fat-diet-induced hepatic steatosis in male C57BL/6 mice by targeting LKB1/AMPK pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(44):12208-12218.
- [20] XI P, DU J, LIANG H, et al. Intraventricular injection of LKB1 inhibits the formation of diet-Induced obesity in rats by activating the AMPK-POMC neurons-sympathetic nervous system axis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(1):54-66.

(收稿日期:2021-10-16 修回日期:2022-03-11)