

## 芒柄花黄素通过SphK1-S1P信号通路抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注后的炎症反应

黄保胜<sup>1</sup>, 王 星<sup>2</sup>, 李清泉<sup>1</sup>, 王天路<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属逸夫医院神经外科, 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>中国药科大学药学院药理系, 江苏 南京 211198)

**[摘要]** 目的:探讨芒柄花黄素(formononetin, FN)对大鼠局灶性脑缺血再灌注后炎症反应的治疗作用及其可能机制。方法:60只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、FN低中高剂量组(8、16、32 mg/kg)和尼莫地平组(12 mg/kg),每组10只,应用线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,并评价其神经功能缺损情况,缺血2 h再灌注24 h后处死动物,红四氮唑(TTC)染色观察脑梗死体积的变化,并测定各组缺血区脑组织炎症因子表达,同时测定各组缺血区脑组织核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和鞘氨醇激酶-1/1-磷酸鞘氨醇(SphK1/S1P)信号通路的表达变化。结果:FN各剂量组炎症因子表达均显著降低,且NF- $\kappa$ B和SphK1/S1P信号通路的激活均得到显著抑制。结论:FN对大鼠局灶性脑缺血再灌注后炎症反应保护作用机制可能与抑制SphK1/S1P信号通路表达有关。

**[关键词]** 芒柄花黄素;缺血再灌注;炎症;SphK1/S1P 信号通路

**[中图分类号]** R364.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)10-1239-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20171003

## Formononetin reduces inflammation in focal brain ischemia reperfusion rat via inhibiting sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway

Huang Baosheng<sup>1</sup>, Wang Xing<sup>2</sup>, Li Qingquan<sup>1</sup>, Wang Tianlu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Sir Run Run Hospital, NJMU, Nanjing 211166; <sup>2</sup> Pharmacology Department, College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effects of formononetin (FN) on the rats with inflammation after focal brain ischemia reperfusion injury. **Methods:** Sixty adult male SD rats were randomly subjected to either sham surgery, model, FN (8, 16, 32 mg/kg) or nimodipine group (12 mg/kg) for 2 h of brain ischemia and 24 h reperfusion with Longa's score analysis, each with 10. After 24 h of reperfusion, the cerebral infarction volume was determined by TTC staining, and the contents of inflammatory factors in ischemic brain tissue were assayed in each group. In addition, we also examined the changes of nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate (SphK1/S1P) signaling pathway in the ischemic brain tissue. **Results:** FN each dose group reduced the expression of inflammatory factors, with the inhibition of NF- $\kappa$ B and SphK1/S1P signal pathway significantly. **Conclusion:** The protective effects of FN on the rats with inflammation after focal brain ischemia reperfusion injury may be related to its inhibition of SphK1/S1P signal pathway.

**[Key words]** formononetin; ischemia reperfusion; inflammation; SphK1/S1P signaling pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1239-1242]

缺血性脑病具有高死亡、高复发等临床特点,是引起人类死亡的重要原因之一。近年来研究发现

缺血组织恢复灌注以后可以引起更严重的组织损伤,且严重程度和再灌注时间呈正相关,因此进行脑缺血与再灌注损伤的研究成为热点。相关研究表明,缺血再灌注后的急性炎症反应是组织继发性损伤的重要因素<sup>[1]</sup>。因此通过建立实验性大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究其发生机制,开发新的干预药物,具有十分重要的现实意义。

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81501059);中国药科大学中央高校基本科研业务费(ZJ16197);江苏省“科教强卫”工程青年医学人才基金(QNRC2016858);南京医科大学科技发展重点项目(2016NJMUZD035)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: timu62@126.com

在脑缺血/再灌注损伤模型中,核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)通过调控前炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )和 IL-6 的基因转录从而调控炎症,进而加重脑损伤<sup>[2]</sup>。鞘氨醇激酶-1 (SphK1)可催化合成 1-磷酸鞘氨醇(S1P)<sup>[3]</sup>, $\kappa$ B $\alpha$  抑制子(I $\kappa$ B $\alpha$ )和 I $\kappa$ B 激酶 $\beta$  (IKK $\beta$ )磷酸化可激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,而 SphK1/S1P 在其中起着重要的调控作用<sup>[4]</sup>,因此,SphK1/S1P 信号通路可能与大鼠局灶性脑缺血再灌注后炎症反应发生密切相关。

芒柄花黄素(formononetin, FN)主要来源于黄芪、甘草、葛根等豆科植物,是广泛存在于自然界中的一种植物雌激素,已有研究表明 FN 可通过降低大脑皮质 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的含量改善小鼠全脑缺血再灌注损伤<sup>[5]</sup>。但对其保护脑缺血再灌注损伤的具体机制的研究仍很匮乏。且 FN 可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 的表达改善细胞凋亡<sup>[6]</sup>。本文作者通过大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,观察 FN 对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中 SphK1/S1P 信号通路的影响,探讨 FN 抗缺血性脑损伤的作用机制,为其开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

FN(纯度 $\geq$ 98%,成都曼思特生物科技有限公司),尼莫地平(天津中央药业有限公司),IL-1 $\beta$  和 IL-6 ELISA 试剂盒(ABL 公司,德国),TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国),S1P ELISA 试剂盒(EBI 公司,美国),抗体 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\beta$ 、IKK $\beta$ 、NF- $\kappa$ B (Cell Signaling 公司,美国),抗体 SphK1 (Abcam 公司,美国),HRP 标记的 GAPDH (上海康成生物工程有限公司),抗体 Histone H1 和 HRP 标记的二抗(Santa Cruz 公司,美国),红四氮唑(TTC,上海宝曼生物科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯;雄性清洁级 SD 大鼠,体重(200 $\pm$ 20)g(上海西普尔-必凯实验动物有限公司),动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备和分组

雄性清洁级 SD 大鼠 60 只,随机分成 6 组(每组 10 只),即假手术组、模型组、FN 低中高剂量组(8、16、32 mg/kg)和尼莫地平组(12 mg/kg),用药量按体表面积公式计算,灌胃量为 10 mL/kg,假手术组和模型组分别给予等量的生理盐水,每天 1 次,连续 7 d,末次给药 2 h 后按 Longa 法制作右侧大脑动脉栓塞模型<sup>[7]</sup>,缺血 2 h 再灌注 24 h 后处死动物进行

实验。假手术组仅分离动脉不夹闭。

#### 1.2.2 行为缺陷及神经功能评分标准

大鼠缺血 2 h 再灌注 22 h 后,按文献标准<sup>[7]</sup>对大鼠神经功能进行评分,分数越高,动物的行为障碍越重。

#### 1.2.3 脑组织 TTC 染色

动物麻醉后,在冰盘上迅速断头取脑,-20 °C 冰箱中速冻 30 min,将新鲜大脑切成 5~6 片,迅速将切片置于 2%TTC 中,避光放入 37 °C 温箱中染色 30 min,期间翻动脑片数次,使其染色均匀,然后对染色后的脑片进行拍照分析。

#### 1.2.4 ELISA 法测定脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 S1P 水平

缺血 2 h 再灌注 24 h 后处死动物,于冰台上快速分离出缺血侧脑组织(右脑),以冷 PBS 溶液配成 10%脑组织匀浆,4 °C、12 000 g 离心后,取上清,按照试剂盒说明书测定上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 S1P 水平。

#### 1.2.5 Western blot 法测定脑组织中炎症信号通路相关蛋白表达

采用 RIPA 裂解液提取大鼠缺血侧脑组织(右脑)全蛋白,用于 I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\beta$ 、IKK $\beta$ 、SphK1 和 GAPDH 蛋白表达分析。按照胞浆和核蛋白提取试剂盒方法提取大鼠缺血侧脑组织(右脑)胞浆(用于 NF- $\kappa$ B 和 GAPDH 的蛋白表达分析)和核蛋白(用于 NF- $\kappa$ B 和 Histone H1 的蛋白表达分析)。

### 1.3 统计学方法

实验结果用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用 SPSS15.0 软件进行单因素方差分析,用 LSD 法进行两两比较, $P\leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能的影响

假手术组大鼠无明显行为障碍,评分为 0,与假手术组相比,模型组大鼠评分显著上升( $P<0.001$ ),而 FN 低( $P<0.01$ )、中、高剂量组( $P<0.001$ )和尼莫地平组( $P<0.001$ )与模型组相比,神经功能均有不同程度的改善(表 1)。

### 2.2 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 TTC 染色的影响

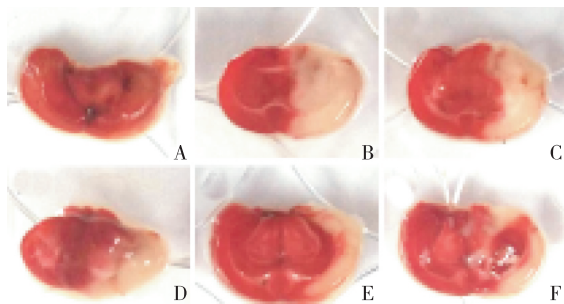
从 TTC 染色结果可知,假手术组脑片呈均匀一致红染,而模型组右侧大脑半球可见明显的白色失染梗死灶区,梗死面积具有显著差异,表明造模成功,而 FN 低、中、高剂量组和尼莫地平组可不同程度缓解脑部梗死区域(表 1、图 1)。

表 1 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能及脑梗死体积的影响

Table 1 Effect of FN on neurological deficit score and cerebral infarction volume after focal brain ischemia reperfusion injury in rats

组别	神经功能评分(分)	脑梗死体积百分比(%)
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	2.65±0.54 <sup>###</sup>	29.32±2.68 <sup>###</sup>
FN 组(8mg/kg)	1.88±0.59 <sup>**</sup>	21.16±2.51 <sup>*</sup>
FN 组(16mg/kg)	1.23±0.46 <sup>**</sup>	18.41±3.41 <sup>**</sup>
FN 组(32mg/kg)	0.98±0.31 <sup>***</sup>	15.88±1.96 <sup>***</sup>
尼莫地平组	1.17±0.62 <sup>***</sup>	16.37±2.09 <sup>***</sup>

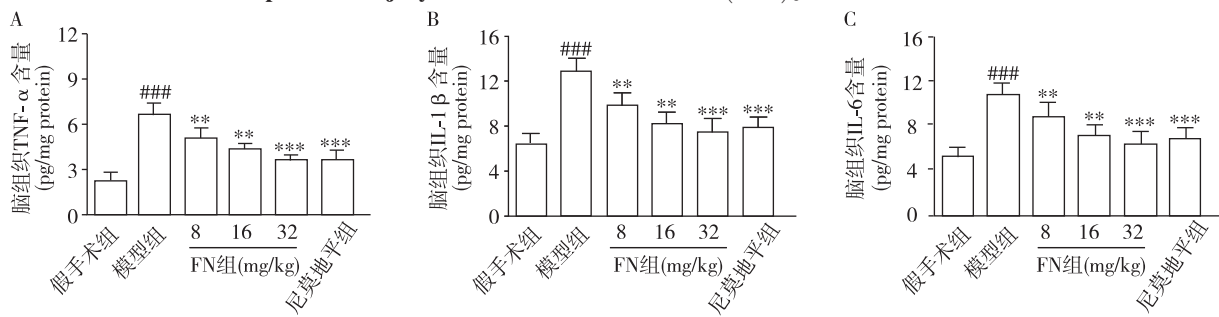
与假手术组比较, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ,  $n = 8$ 。



A: 假手术组; B: 模型组; C、D、E: FN 低、中、高剂量组(8、16、32 mg/kg); F: 尼莫地平组。

图 1 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 TTC 染色的影响

Figure 1 Effect of FN on brain TTC staining after focal brain ischemia reperfusion injury in rats



与假手术组比较, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ,  $n = 8$ 。

图 2 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平的影响

Figure 2 Effect of FN on brain TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels after focal brain ischemia reperfusion injury in rats

### 3 讨论

本研究表明大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中脑组织 SphK1/SIP 信号通路被激活, 而 FN 可以抑制它的激活。

本研究中, 与假手术组相比, 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中神经功能评分显著增加, 右侧大脑半球可见明显的白色失染梗死灶区, 脑组织中炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 表达升高, 而 FN 改善

了大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中这些生理和病理指标的异常表达。因此, 目前的结果表明, FN 可显著改善大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中脑组织的炎症病理变化。而本实验深入研究 FN 在此模型中脑组织保护作用是否和其调控肝 SphK1/SIP 信号通路有关。

2.3 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织炎症因子的影响  
与假手术组相比, 局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著上升( $P < 0.001$ ), FN(低、中剂量: $P < 0.01$ ; 高剂量: $P < 0.001$ )和尼莫地平( $P < 0.001$ )可以显著降低局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平(图 2)。

2.4 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 NF- $\kappa$ B 激活的影响  
模型组与假手术组相比, 局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 而 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\beta$  和 NF- $\kappa$ B(核蛋白)蛋白表达水平显著升高( $P < 0.001$ ); FN 低( $P < 0.01$ )、中、高剂量组( $P < 0.001$ )和尼莫地平组( $P < 0.001$ )与模型组相比, 异常表达的 I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\beta$  和 NF- $\kappa$ B 均有不同程度的改善, 但是各组之间 NF- $\kappa$ B(胞浆蛋白)蛋白表达水平没有显著变化(图 3)。

2.5 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1/SIP 信号通路的影响  
模型组与假手术组相比, 局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1 蛋白表达水平和 SIP 含量显著上升( $P < 0.001$ ), 而 FN 低( $P < 0.01$ )、中、高剂量组( $P < 0.001$ )和尼莫地平组( $P < 0.001$ )可以显著降低两者的表达(图 4)。

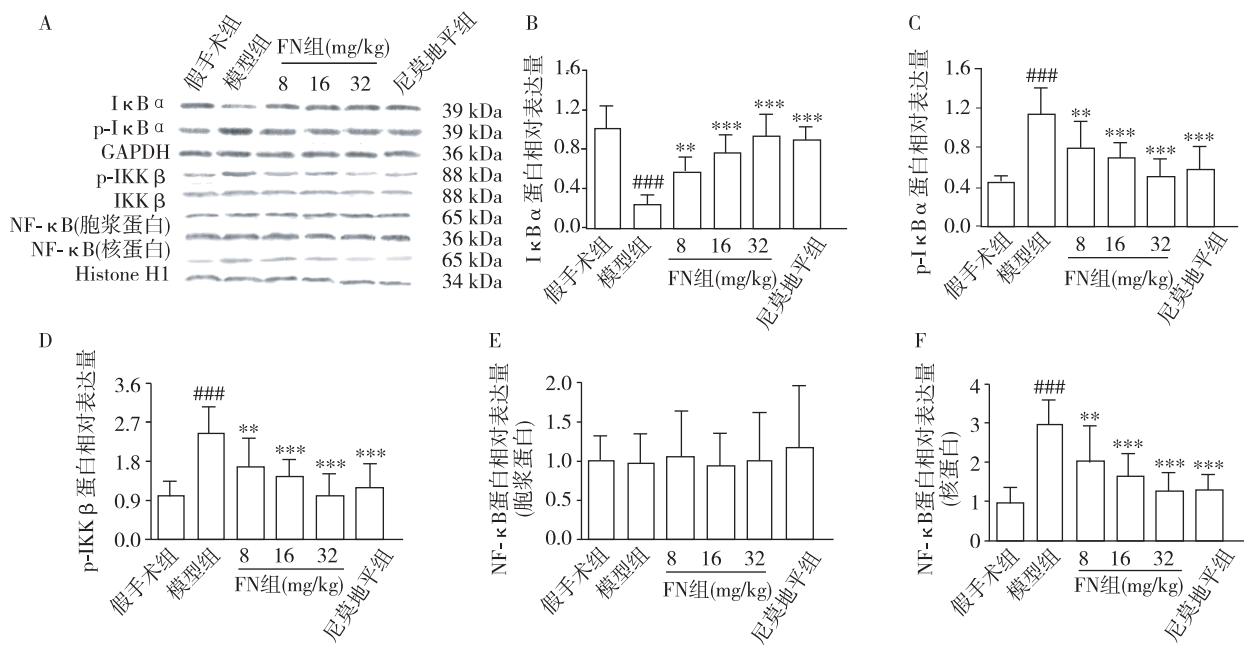
2.6 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1/SIP 信号通路的影响

模型组与假手术组相比, 局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1 蛋白表达水平和 SIP 含量显著上升( $P < 0.001$ ), 而 FN 低( $P < 0.01$ )、中、高剂量组( $P < 0.001$ )和尼莫地平组( $P < 0.001$ )可以显著降低两者的表达(图 4)。

2.7 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1/SIP 信号通路的影响

模型组与假手术组相比, 局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1 蛋白表达水平和 SIP 含量显著上升( $P < 0.001$ ), 而 FN 低( $P < 0.01$ )、中、高剂量组( $P < 0.001$ )和尼莫地平组( $P < 0.001$ )可以显著降低两者的表达(图 4)。

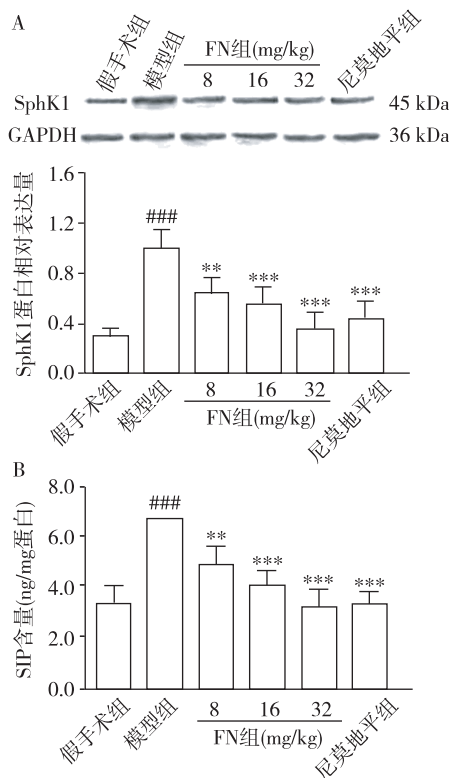
NF- $\kappa$ B 通过调控前炎症细胞因子(如 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ )的转录介导脑缺血再灌注中的脑损伤<sup>[28-9]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  的降解及 IKK $\beta$  的磷酸化可引起 NF- $\kappa$ B 转录激活, 导致 NF- $\kappa$ B 二聚体进入细胞核中, 从而调控



与正常组比较,###*P*<0.001;与模型组比较,\*\**P*<0.01,\*\*\**P*<0.001,*n*=8。

图 3 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 NF-κB 信号通路的影响

Figure 3 Effect of FN on brain NF-κB signaling pathway after focal brain ischemia reperfusion injury in rats



与正常组比较,###*P*<0.001;与模型组比较,\*\**P*<0.01,\*\*\**P*<0.001,*n*=8。

图 4 FN 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 SphK1/S1P 信号通路的影响

Figure 4 Effect of FN on brain SphK1/S1P signaling pathway after focal brain ischemia reperfusion injury in rats

胞膜上催化合成 SIP<sup>[11]</sup>, SphK1 及其合成产物 SIP 直接参与 NF-κB 调控炎症的过程中<sup>[12]</sup>,而局部过度炎症反应是造成再灌注损伤的重要原因之一<sup>[9,13-14]</sup>,且已有研究表明 SphK1/S1P 信号通路可能是改善脑缺血再灌注炎症反应所致脑损伤的潜在靶点<sup>[15]</sup>。本研究发现脑缺血再灌注可以诱导大鼠脑组织 SphK1-S1P 信号通路激活,促使脑组织 NF-κB 转录激活,进而引起脑组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的过表达,导致大鼠脑组织炎症和损伤。FN 显著抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中脑组织 S1P 和 SphK1 蛋白的过表达,表明 FN 可能通过脑组织 SphK1/S1P 信号通路调控大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中脑组织炎症和损伤,提示了 FN 脑保护作用的新机制。

综上所述, FN 能够降低局灶性脑缺血再灌注模型中大鼠神经功能评分及脑组织中炎症因子的表达,对局灶性脑缺血再灌注大鼠具有脑保护作用,可能是通过抑制 SphK1/S1P 信号通路,从而抑制 NF-κB 信号通路的激活,进而改善大鼠局灶性脑缺血再灌注模型炎性反应对脑组织的损伤,改善脑部功能。

[参考文献]

[1] Wang L, Liu XH, Chen H, et al. Picoside II protects rat kidney against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation by the TLR4/NF-κB pathway[J].

(下转第 1256 页)

炎症的表达<sup>[10]</sup>。TNF-α 激活可促使 SphK1 易位到细



- ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15): 2941–2948
- [16] Silver IA, Deas J, Erecińska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts *in vitro*: effects of 45S5 bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(2): 175–185
- [17] Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4847–4855
- [18] Cerrutti M, Sahai N. Silicate biomaterials for orthopaedic and dental implants[J]. *Rev Mineral Geochem*, 2006, 64(1): 283–313
- [19] Nayab SN, Jones FH, Olsen I. Effects of Calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4717–4727
- [20] Marom R, Shur I, Solomon R, et al. Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(1): 41–48
- [收稿日期] 2016–12–28

(上接第 1242 页)

- Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1253–1258
- [2] Lan L, Tao J, Chen AZ, et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF-kappa B pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1): 75–80
- [3] Huang J, Huang K, Lan T, et al. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the activation of the SphK1-S1P signaling pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 365(2): 231–240
- [4] Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2[J]. *Nature*, 2010, 465(731): 1084–1088
- [5] 吴虹, 蔡俊杰, 侯敏, 等. 芒柄花黄素对脑缺血再灌注损伤小鼠炎症反应的作用[J]. *四川医学*, 2012, 33(4): 594–595
- [6] Wang Y, Zhu Y, Gao L, et al. Formononetin attenuates IL-1 $\beta$ -induced apoptosis and NF- $\kappa$ B activation in INS-1 cells[J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10052–10064
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91
- [8] Luo Y, Yang YP, Liu J, et al. Neuroprotective effects of madecassoside against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Brain Res*, 2014, 1565: 37–47
- [9] Zhang P, Liu X, Zhu Y, et al. Honokiol inhibits the inflammatory reaction during cerebral ischemia reperfusion by suppressing NF- $\kappa$ B activation and cytokine production of glial cells[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 123–127
- [10] Sari AN, Korkmaz B, Serin MS, et al. Effects of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKK $\beta$ /I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(9): 741–756
- [11] Baker DA, Gilkeson GS. Impact of sphingosine kinase on inflammatory pathways in fibroblast-like synoviocytes[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011, 10(6): 464–471
- [12] Theiss AL. Sphingosine-1-phosphate: Driver of NF $\kappa$ B and STAT3 persistent activation in chronic intestinal inflammation and colitis-associated cancer[J]. *JAKSTAT*, 2013, 2(3): e24150
- [13] Sladojevic N, Stamatovic SM, Keep RF, et al. Inhibition of junctional adhesion molecule-A/LFA interaction attenuates leukocyte trafficking and inflammation in brain ischemia/reperfusion injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 67: 57–70
- [14] Liu Z, Li P, Zhao D, et al. Anti-inflammation effects of *Cordyceps sinensis* mycelium in focal cerebral ischemic injury rats[J]. *Inflammation*, 2011, 34(6): 639–644
- [15] Lv M, Zhang D, Dai D, et al. Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate regulates the expression of interleukin-17A in activated microglia in cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(7): 551–562
- [收稿日期] 2016–11–05