

DOI:10.13350/j.cjpb.221008

• 论著 •

牛蒡子苷元抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路 对肺炎链球菌脑膜炎大鼠神经元凋亡的影响

冷晓雪¹, 李柏新^{2*}

(1. 中国医科大学附属盛京医院急诊科, 辽宁沈阳 110100; 2. 中国医科大学附属盛京医院康复中心)

【摘要】 **目的** 探讨牛蒡子苷元(ATG)抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路对肺炎链球菌脑膜炎大鼠神经元凋亡的影响。**方法** 通过脑内注射Ⅲ型肺炎链球菌建立脑膜炎大鼠模型,并随机分为模型组、ATG低(ATG-L)、中(ATG-M)、高(ATG-H)剂量组以及 ATG-H+重组高迁移率蛋白 B1(rHMGB1)组,另取正常大鼠为对照组,10只/组。治疗结束后,对各组大鼠进行神经系统评分;分离大鼠脑组织,检测其病理变化、含水量、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平以及神经元细胞凋亡,同时检测 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠神经系统评分显著下降($P<0.05$),脑组织含水量、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65水平及 TUNEL 荧光染色阳性细胞数量均显著增加(均 $P<0.05$);ATG-L组、ATG-M组、ATG-H组小鼠神经系统评分均较模型组显著增加(均 $P<0.05$),脑组织含水量、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、TUNEL 荧光染色阳性细胞数量、HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65均较对照组显著下降(均 $P<0.05$);ATG-H+rHMGB1组较 ATG-H组神经系统评分显著下降($P<0.05$),脑组织含水量、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65水平及 TUNEL 荧光染色阳性细胞数量均显著增加(均 $P<0.05$)。**结论** ATG可抑制肺炎链球菌脑膜炎大鼠神经元凋亡,减轻炎症反应,其机制可能与抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

【关键词】 牛蒡子苷元;肺炎链球菌脑膜炎;神经元凋亡;HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路

【中图分类号】 R378.996

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1150-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.;17(10):1150-1154,1159.]

Influence of arctigenin on neuronal apoptosis in rats with *Streptococcus pneumoniae* meningitis by inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway*

LENG Xiao-xue, LI Bai-xin (1. Department of Emergency, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110100, China; 2. Rehabilitation Center, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University)

【Abstract】 **Objective** To investigate the influence of arctigenin (ATG) on neuronal apoptosis in rats with *Streptococcus pneumoniae* meningitis by inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Methods** Rat models of meningitis were established by intracerebral injection of type III *S. pneumoniae* and were randomly grouped into model group, ATG low (ATG-L), medium (ATG-M), high (ATG-H) dose groups and ATG-H+ recombinant high mobility histone B1 (rHMGB1) group, and normal rats were taken as control group, with 10 rats/group. After the treatment, the rats in each group were scored for the nervous system; the rat brain tissue was isolated, and its pathological changes, water content, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and neuronal apoptosis were detected, and the expression levels of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway proteins were also detected. **Results** Compared with the control group, the neurological score of the model group (1.21 \pm 0.13 vs 5.00 \pm 0.00) was significantly decreased (all $P<0.05$), brain tissue water content (88.42 \pm 8.85 vs 53.24 \pm 5.33), IL-1 β (3864.57 \pm 386.49 vs 24.37 \pm 2.44), IL-6 (98.67 \pm 9.88 vs 22.34 \pm 2.24), TNF- α (2453.24 \pm 246.34 vs 12.35 \pm 1.26), HMGB1, TLR4, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 levels and the number of TUNEL positive cells (115.24 \pm 11.53 vs 5.37 \pm 0.55) were significantly increased (all $P<0.05$); Compared with the model group, the neurological scores of mice in the ATG-L (2.35 \pm 0.24), ATG-M (3.44 \pm 0.35), and ATG-H groups (4.25 \pm 0.43) were significantly increased (all $P<0.05$), brain water content (73.85 \pm 7.39, 64.24 \pm 6.43, 53.85 \pm 5.39), IL-1 β (2176.34 \pm 218.64, 1108.34 \pm 111.02, 102.37 \pm 10.28), IL-6 (68.49 \pm 6.85, 42.81 \pm 4.29, 26.37 \pm 2.64), TNF- α levels (1257.38 \pm 126.78, 672.15 \pm 67.53, 99.24 \pm 9.54), the number of TUNEL positive cells (75.34 \pm 7.55, 42.37 \pm 4.24, 22.04 \pm 2.21), HMGB1, TLR4, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 were significantly decreased compared with the control group (all $P<0.05$); Compared with the ATG-H group, the nervous system score of the ATG-H+rHMGB1 group (2.28 \pm 0.23) was

* **【通讯作者】** 李柏新, E-mail: liboxin8880@163.com

【作者简介】 冷晓雪(1984-), 女, 吉林磐石人, 护师, 主要从事呼吸机相关肺炎、感染、脓毒症等方面研究。E-mail: lengxiaoxue8886@163.com

obviously decreased ($P < 0.05$), the brain tissue water content (71.28 ± 7.13), levels of IL-1 β (2256.39 ± 225.71), IL-6 (59.37 ± 5.95), TNF- α (1684.37 ± 169.27), the number of TUNEL fluorescent (68.57 ± 6.88) staining positive cells, HMGB1, TLR4, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 were obviously increased ($P < 0.05$). **Conclusion** ATG can inhibit neuronal apoptosis and reduce inflammatory response in rats with *S. pneumoniae* meningitis, which may be related to the inhibition of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway.

【Key words】 Arctigenin; *Streptococcus pneumoniae* meningitis; neuronal apoptosis; HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway

细菌性脑膜炎是一种病死率较高的严重感染疾病,在发展中国家人群患病率高达 0.9%^[1]。肺炎链球菌是细菌性脑膜炎常见病原体,肺炎链球菌细菌性脑膜炎病死率在 10%—40%,大约 50%的患者在治疗后存在永久性神经损伤及后遗症,如癫痫^[2]。研究发现炎症是身体的一种保护性反应,有助于消灭细菌,但也会导致神经元退化^[3],因此细菌性脑膜炎的最佳治疗需要关注细菌毒素引起的相关神经元凋亡及炎症,但目前尚无有效药物治疗细菌性脑膜炎。牛蒡子苷元(Arctigenin, ATG)是中药牛蒡子的主要活性成分,具有抗病毒、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等药理作用^[4],但尚无用于治疗肺炎链球菌脑膜炎的报道。研究表明,炎症反应在细菌性脑膜炎的发病机制中具有重要作用^[5]。HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路是一种炎症信号通路, HMGB1 在细胞受到外界损伤时可从细胞核释放到细胞质, TLR4 作为 HMGB1 的识别受体,两者相互作用可使 NF- κ B 上调,从而导致产生和释放炎症性细胞因子,参与炎症性疾病的发生^[6]。Xu 等^[7]的研究表明 ATG 可通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路减弱小胶质细胞的过度活化和神经炎症,可作为治疗抑郁症的候选药物,但 ATG 能否通过 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路参与肺炎链球菌脑膜炎的发生发展尚不清楚。本研究旨在探讨 ATG 通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路对肺炎链球菌脑膜炎大鼠神经元凋亡的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株 III型肺炎链球菌由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 实验动物 63只4—5周龄Wistar大鼠,体重65—75g,由安领生物医药(深圳)有限公司提供。动物许可证号:SYXK(粤)2021-0268。大鼠在标准条件下(12/12h明暗循环、温度25℃、湿度55%的环境)饲养。实验前将大鼠适应性喂养1周,可自由获取食物、水。动物的饲养与建模均按照实验动物护理和使用指南进行,并经动物伦理委员会批准。

1.3 主要试剂和仪器 ATG由成都德思特生物技术有限公司提供;重组高迁移率蛋白B1(rHMGB1)由

江苏凯基生物技术股份有限公司提供;HE染色液由北京中山生物技术有限公司提供;TUNEL试剂盒由Roche公司提供;白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒由上海酶联生物科技有限公司提供;HMGB1、TLR4、p-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65一抗由Abcam公司提供。立体定位仪由美国Stoelting公司提供;CO₂培养箱由美国Thermo公司提供;光学显微镜由日本Olympus公司提供。

2 方法

2.1 肺炎链球菌培养 将III型肺炎链球菌接种于血琼脂糖培养基,并置于5%CO₂培养箱培养,然后培养于肉汤中,反复吹打混匀。于对数生长期收集细菌,离心后调整菌液浓度为10⁷cfu/mL,将菌液保存于4℃冰箱备用。

2.2 模型大鼠的制备及分组 造模方法参考文献[8]。随机选取53只大鼠为造模组,大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉。大鼠剪去毛发,固定于定位仪上,切开大鼠头部皮肤、筋膜,利用微量注射器从小脑延髓池穿刺,抽取20 μ L脑脊液,然后注射20 μ L肺炎链球菌菌液。另取10只健康大鼠作为对照组,按上述操作但仅注入20 μ L无菌生理盐水。造模24h后麻醉大鼠,抽取脑脊液,培养后确认感染菌为肺炎链球菌,即造模成功^[9]。造模过程中大鼠死亡3只,其余均符合造模标准。将造模后的50只大鼠随机分组,记为模型组、ATG低(ATG-L)、中(ATG-M)、高(ATG-H)剂量组以及ATG-H+rHMGB1组,其中ATG-L组、ATG-M组、ATG-H组分别以12.5、25、50mg/kg ATG灌胃干预^[10],ATG-H+rHMGB1组以50mg/kg ATG灌胃干预,同时以尾静脉注射8 μ g/kg rHMGB1干预^[11]。对照组用等量生理盐水灌胃。小鼠每天干预一次,连续干预4d。

2.3 神经系统评分 大鼠治疗结束后,使用神经系统评分系统评估疾病的严重程度^[12]:仰卧时无法直立记为1分;仰卧时30s内可转身记为2分;自主运动减少记为3分;仰卧时5s内可转身记为4分;正常活动记为5分。分值越低,表示大鼠受损越严重。

2.4 标本收集 将大鼠麻醉,取出全脑,其中右脑分成2份,一份用于ELISA及Western blot检测,另一份经4%多聚甲醛固定后用于HE染色及TUNEL检

测。左脑用于含水量测定。

2.5 含水量测定 左脑组织置于冰浴中,快速取出后用滤纸吸干表面的水渍和血渍,准确称重后置于烘箱中干燥 24 h 至重量不再变化,称量干重。根据公式计算脑组织含水量: $[(\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重}] \times 100\%$ 。脑组织含水量反映脑水肿程度。

2.6 ELISA 检测脑组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 取部分右脑组织在磷酸盐缓冲液中匀浆,并以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按照 ELISA 说明书检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.7 HE 染色观察脑组织病理变化 大鼠脑组织经 4%多聚甲醛固定后脱水、石蜡包埋、切片(厚度 5 μm);二甲苯脱蜡,水洗;用苏木精染色 5 min,自来水冲洗;伊红染色 2 min,经常规脱水、透明后封片,在光学显微镜下观察脑组织病理变化。

2.8 TUNEL 检测脑组织中神经元细胞凋亡 取 4%多聚甲醛固定的大鼠脑组织用石蜡包埋,制备 5 mm 厚切片并置于载玻片上,按试剂盒操作说明书方法进行 TUNEL 荧光测定,PBS 缓冲液洗涤后,滴加 DAPI 复染细胞核,常温孵育 2 min,封片后于倒置显微镜下观察并拍照,统计 TUNEL 荧光染色阳性细胞数量。

2.9 Western blot 检测脑组织中 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达水平 取大鼠脑组织,经 PBS 溶液洗涤后在含蛋白酶抑制剂的缓冲液中裂解以提取总蛋白并测定蛋白质浓度。将蛋白质样品与加样缓冲液混合,煮沸 5 min,经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转膜并封闭 1 h;加入 HMGB1、TLR4、p-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65、 β -actin 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗涤;加入相应二抗,孵育后洗涤;加入 ECL 试剂显色后观察蛋白反应条带,采用 ImageJ 软件分析各蛋白表达水平。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),多组间比较采用单因素方差分析,并进一步作 SNK- q 检验;两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 ATG 对大鼠神经系统评分的影响

大鼠神经系统评分见表 1。模型组大鼠神经系统评分较对照组显著降低($P < 0.05$),ATG-L 组、ATG-M 组、ATG-H 组神经系统评分较模型组显著升高(均 $P < 0.05$),ATG-H+rHMGB1 组神经系统评分较 ATG-H 组显著降低($P < 0.05$)。

2 ATG 对大鼠脑组织含水量的影响

大鼠脑组织含水量测定结果见表 2。模型组大鼠脑组织含水量较对照组显著增加($P < 0.05$);ATG-L

组、ATG-M 组、ATG-H 组脑组织含水量较模型组显著降低(均 $P < 0.05$);ATG-H+rHMGB1 组大鼠脑组织含水量较 ATG-H 组显著升高($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠神经系统评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Comparison of neurological scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	评分(分) Grade (points)
对照组	5.00 \pm 0.00
模型组	1.21 \pm 0.13 ^a
ATG-L 组	2.35 \pm 0.24 ^b
ATG-M 组	3.44 \pm 0.35 ^{b,c}
ATG-H 组	4.25 \pm 0.43 ^{b,c,d}
ATG-H+rHMGB1 组	2.28 \pm 0.23 ^e
<i>F</i>	271.967
<i>P</i>	0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 ATG-L 组比较,^c $P < 0.05$;与 ATG-M 组比较,^d $P < 0.05$;与 ATG-H 组比较,^e $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠脑组织含水量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Comparison of water content in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	含水量(%) Water content(%)
对照组	53.24 \pm 5.33
模型组	88.42 \pm 8.85 ^a
ATG-L 组	73.85 \pm 7.39 ^b
ATG-M 组	64.24 \pm 6.43 ^{b,c}
ATG-H 组	53.85 \pm 5.39 ^{b,c,d}
ATG-H+rHMGB1 组	71.28 \pm 7.13 ^e
<i>F</i>	37.903
<i>P</i>	0.000

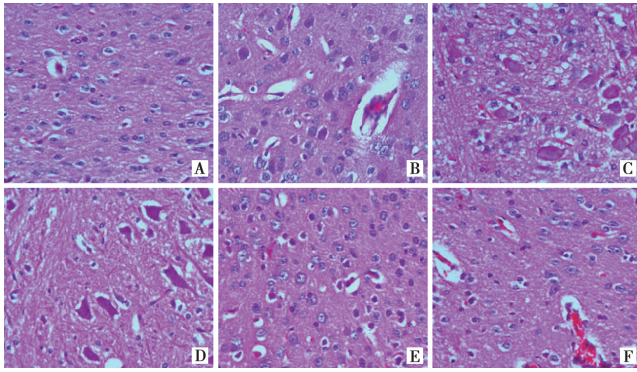
注:a 与对照组比较, $P < 0.05$;b 与模型组比较, $P < 0.05$;c 与 ATG-L 组比较, $P < 0.05$;d 与 ATG-M 组比较, $P < 0.05$;e 与 ATG-H 组比较, $P < 0.05$ 。

3 ATG 对大鼠脑组织病理变化的影响

大鼠脑组织病理变化见图 1。对照组大鼠脑组织无明显异常变化;模型组大鼠脑组织出现大量炎性细胞浸润,形态发生显著改变,如细胞皱缩,血管出现腔隙;ATG-L 组、ATG-M 组、ATG-H 组大鼠脑组织病理现象得到改善,血管出现腔隙变窄,炎性细胞浸润减少,其中 ATG-H 组趋于正常;ATG-H+rHMGB1 组炎性细胞浸润依然存在,病理现象较为严重。

4 ATG 对大鼠脑组织细胞凋亡的影响

大鼠脑组织细胞凋亡情况见图 2 和表 3。模型组大鼠出现脑组织细胞凋亡现象,TUNEL 荧光染色阳性细胞数量较对照组显著增加($P < 0.05$);ATG-L 组、ATG-M 组和 ATG-H 组 TUNEL 荧光染色阳性细胞数量较模型组显著降低(均 $P < 0.05$);ATG-H+rHMGB1 组 TUNEL 荧光染色阳性细胞数量较 ATG-H 组显著升高($P < 0.05$)。



A 对照组 B 模型组 C ATG-L组 D ATG-M组 E ATG-H组 F ATG-H+rHMGB1组

图1 大鼠脑组织病理变化(HE, 400×)

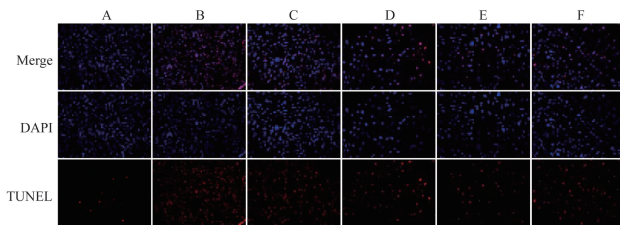
A Control group B model group C ATG-L group D ATG-M group E ATG-H group F ATG-H+rHMGB1 group

Fig.1 Pathological changes of rat brain (HE, 400×)

表3 各组大鼠脑组织 TUNEL 阳性细胞数量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 3 Comparison of the number of TUNEL positive cells in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Groups	TUNEL 阳性细胞数(个) Number of TUNEL positive cells (cells number)
对照组	5.37±0.55
模型组	115.24±11.53 ^a
ATG-L组	75.34±7.55 ^b
ATG-M组	42.37±4.24 ^{b,c}
ATG-H组	22.04±2.21 ^{b,c,d}
ATG-H+rHMGB1组	68.57±6.88 ^e
F	365.634
P	0.000

注:a与对照组比较, $P<0.05$;b与模型组比较, $P<0.05$;c与ATG-L组比较, $P<0.05$;d与ATG-M组比较, $P<0.05$;e与ATG-H组比较, $P<0.05$ 。



A 对照组 B 模型组 C ATG-L组 D ATG-M组 E ATG-H组 F ATG-H+rHMGB1组

图2 大鼠脑组织中神经元细胞凋亡变化

A Control group B model group C ATG-L group D ATG-M group E ATG-H group F ATG-H+rHMGB1 group

Fig.2 Changes of neuronal cell apoptosis in rat brain

5 ATG 对大鼠脑组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响

大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 检测结果见表4。IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平模型组较对照组显著增加(均 $P<0.05$), ATG-L 组、ATG-M 组、ATG-H 组较模型组显著降低($P<0.05$), ATG-H+rHMGB1 组较 ATG-H 组显著升高($P<0.05$)。

表4 各组大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 变化比较($\bar{x} \pm s, \text{pg}/100 \text{mg}$)

Table 4 Comparison of changes of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, \text{pg}/100 \text{mg}$)

组别 Groups	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组($n=10$)	24.37±2.44	22.34±2.24	12.35±1.26
模型组($n=10$)	3864.57±386.49 ^a	98.67±9.88 ^a	2453.24±246.34 ^a
ATG-L组($n=10$)	2176.34±218.64 ^b	68.49±6.85 ^b	1257.38±126.78 ^b
ATG-M组($n=10$)	1108.34±111.02 ^{b,c}	42.81±4.29 ^{b,c}	672.15±67.53 ^{b,c}
ATG-H组($n=10$)	102.37±10.28 ^{b,c,d}	26.37±2.64 ^{b,c,d}	99.24±9.54 ^{b,c,d}
ATG-H+rHMGB1组($n=10$)	2256.39±225.71 ^e	59.37±5.95 ^e	1684.37±169.27 ^e
F	500.050	235.018	494.503
P	0.000	0.000	0.000

注:a与对照组比较, $P<0.05$;b与模型组比较, $P<0.05$;c与ATG-L组比较, $P<0.05$;d与ATG-M组比较, $P<0.05$;e与ATG-H组比较, $P<0.05$ 。

6 ATG 对大鼠脑组织中 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达水平的影响

大鼠脑组织中 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路蛋白检测结果见图3和表5。模型组大鼠脑组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 较对照组显著增加(均 $P<0.05$); ATG-L 组、ATG-M 组、ATG-H 组脑组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 较模型组显著降低(均 $P<0.05$); ATG-H+rHMGB1 组大鼠脑组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 较 ATG-H 组显著升高(均 $P<0.05$)。

表5 各组大鼠脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

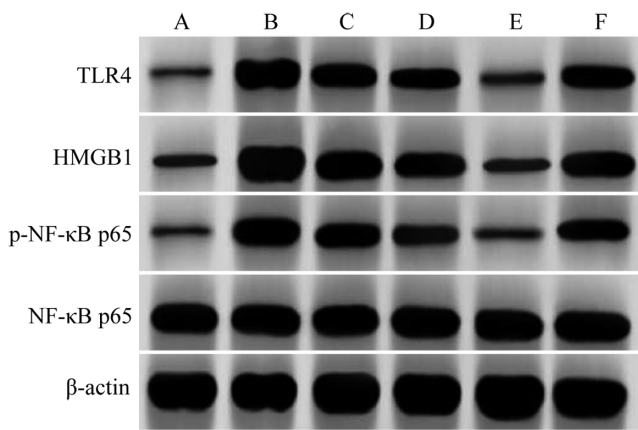
Table 5 Comparison of expression levels of HMGB1, TLR4, P-NF- κ B P65 and NF- κ B P65 in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Groups	HMGB1/ β -actin	TLR4/ β -actin	p-NF- κ B p65/ NF- κ B p65
对照组	0.16±0.02	0.28±0.03	0.22±0.03
模型组	0.86±0.09 ^a	1.02±0.11 ^a	1.08±0.11 ^a
ATG-L组	0.64±0.07 ^b	0.75±0.08 ^b	0.76±0.08 ^b
ATG-M组	0.42±0.05 ^{b,c}	0.51±0.06 ^{b,c}	0.55±0.06 ^{b,c}
ATG-H组	0.19±0.02 ^{b,c,d}	0.31±0.04 ^{b,c,d}	0.26±0.03 ^{b,c,d}
ATG-H+rHMGB1组	0.59±0.06 ^e	0.68±0.07 ^e	0.67±0.07 ^e
F	224.402	162.501	217.833
P	0.000	0.000	0.000

注:a与对照组比较, $P<0.05$;b与模型组比较, $P<0.05$;c与ATG-L组比较, $P<0.05$;d与ATG-M组比较, $P<0.05$;e与ATG-H组比较, $P<0.05$ 。

讨论

肺炎链球菌是细菌性脑膜炎的主要病原体,而肺炎球菌性脑膜炎是一种相对罕见且严重的侵袭性肺炎球菌疾病,通常会导致患者死亡,即使经过最佳治疗,病死率也很高,而且伴有频繁的长期后遗症^[13]。本研究通过大鼠脑内注射肺炎链球菌菌液建立肺炎链球菌性脑膜炎大鼠模型,24 h 后麻醉大鼠,抽取脑脊液,经培养确认感染菌为肺炎链球菌,模型制备成功。



A 对照组 B 模型组 C ATG-L组 D ATG-M组 E ATG-H组 F ATG-H+rHMGB1组

图3 Western blot 检测大鼠脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF-κB p65、NF-κB p65 表达水平

A Control group B model group C ATG-L group D ATG-M group E ATG-H group F ATG-H+rHMGB1 group

Fig.3 Expression levels of HMGB1, TLR4, p-NF-κB p65 and NF-κB p65 in rat brain tissue detected by Western blot

ATG 是从草药牛蒡子中分离出来的有效生物活性成分,包括神经保护作用、抗抑郁、抗炎等作用^[14]。如在 IL-1 β 诱导的人骨关节炎软骨细胞和骨关节炎小鼠模型研究中,ATG 能显著降低促炎介质的水平,可用作治疗骨关节炎的潜在药物^[15]。在二氧化硅诱导的肺损伤研究中,ATG 可通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路抑制 NLRP3 炎症小体的激活以及 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- α 、TGF- β 的分泌,从而减少氧化应激、炎症和纤维化^[16]。Yuan 等^[17] 研究发现 ATG 可预防脂多糖诱导的神经元突触损伤,减轻认知障碍及神经炎症,是神经炎症及相关疾病的潜在药物。本研究结果表明肺炎链球菌性脑膜炎模型大鼠神经系统评分下降,脑组织含水量、炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)水平及神经元细胞凋亡数(TUNEL 荧光染色阳性细胞)显著升高。经不同剂量的 ATG 治疗后,模型大鼠神经系统评分增加,脑组织含水量、炎症因子水平及神经元细胞凋亡数显著下降,并呈现剂量依赖性,表明 ATG 可抑制促炎细胞因子的水平以及神经元凋亡。

研究表明 HMGB1/TLR4 轴是神经炎症的重要启动子,与创伤性脑损伤、神经炎症、癫痫发生和认知功能障碍等有关,而 NF- κ B 为 TLR4 下游的重要信号分子,可促进炎症性细胞因子如 IL-1 β 的产生,加快疾病病情的发展^[18]。Fang 等^[19] 的研究证明,在肺炎链球菌脑膜炎, HMGB1 表达上调促进了星形胶质细胞中 GFAP、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达,加重了脑组织的病理损伤。Zhang 等^[12] 研究发现地奥美汀可通过抑制 NF- κ B 表达减少神经炎症和神经元凋亡。本研究结果显示模型组大鼠脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 显著增加,表明肺炎链球菌性脑膜炎

发生可能与 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路激活有关。经不同剂量的 ATG 治疗后, HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 水平下降,大鼠脑组织病理现象得到改善,炎症因子及细胞凋亡被抑制,推测 ATG 可能通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路发挥上述作用。而在联合使用 rHMGB1 后逆转了 ATG 对肺炎链球菌性脑膜炎大鼠的保护作用,表明 ATG 可通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路降低炎症反应和神经元凋亡。

综上所述,ATG 能改善肺炎链球菌性脑膜炎大鼠脑组织病理变化,减轻炎症反应,抑制神经元凋亡,其机制可能与抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路有关。

【参考文献】

[1] Yang R, Zhang H, Xiong Y, et al. Molecular diagnosis of central nervous system opportunistic infections and mortality in HIV-infected adults in Central China[J]. AIDS Res Ther, 2017(14):24.

[2] Tabusi M, Thorsdottir S, Lysandrou M, et al. Neuronal death in pneumococcal meningitis is triggered by pneumolysin and RrgA interactions with β -actin [J]. PLoS Pathog, 2021, 17 (3): e1009432.

[3] Amor S, Puentes F, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases[J]. Immunology, 2010, 129(2):154-169.

[4] Zhao J, Chen Y, Dong L, et al. Arctigenin protects mice from thioglycollate-induced acute peritonitis[J]. Pharmacol Res Perspect, 2020, 8(5):e00660.

[5] Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis[J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(3):557-591.

[6] Wang L, Botchway BOA, Liu X. The Repression of the HMGB1-TLR4-NF- κ B signaling pathway by safflower yellow may improve spinal cord injury[J]. Front Neurosci, 2021, 15:803885. [7] Xu X, Piao HN, Aosai F, et al. Arctigenin protects against depression by inhibiting microglial activation and neuroinflammation via HMGB1/TLR4/NF- κ B and TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathways [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(22):5224-5245.

[8] 余舒莹, 祝晓飞, 严俊. 水通道蛋白 4 在大鼠肺炎链球菌脑膜炎模型中的表达变化[J]. 中国现代医生, 2021, 59(2):38-42.

[9] 刘心洁, 王玉珍, 胡瑞梅, 等. 基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 对肺炎链球菌性脑膜炎模型大鼠的脑保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(2):156-161.

[10] 冯芹, 孙宝存, 夏文凯. 牛蒡子苷元对自发性糖尿病 GK 大鼠合并高血压大血管病变的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5):957-962.

[11] Zhai Y, Zhu Y, Liu J, et al. Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein B1 group (HMGB1)/toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) Signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2020(26):e918617.

[12] Zhang Y, Jiang Y, Lu D. Diosmetin sSuppresses neuronal apoptosis and inflammation by modulating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in a rat model of pneumococcal meningitis [J]. Med Sci Monit, 2019(25):2238-2245. (下转 1159 页)

- [1] Agudelo Higueta NI, White BP, Franco-Paredes C, et al. An update on prevention of malaria in travelers[J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2021(8):20499361211040690.
- [2] Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, et al. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(13):1163-1171.
- [3] Cooper RA, Kirkman L. Can repurposing drugs play a role in malaria control? [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(12):e20211512.
- [4] Patel PN, Tolia N. Structural vaccinology of malaria transmission-blocking vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2021, 20(2):199-214.
- [5] Chen G, Du JW, Nie Q, et al. *Plasmodium yoelii* 17XL infection modified maturation and function of dendritic cells by skewing Tregs and amplifying Th17[J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1):266.
- [6] Komiyama YS, Nakae T, Matsuki A, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2006, 177(1):566-573.
- [7] Chen Y, Thai P, Zhao YH, et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19):17036-17043.
- [8] Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2000, 9(8):589-593.
- [9] Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T, et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants[J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(4):724-735.
- [10] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011(11):519-531.
- [11] Davidson MG, Alonso MN, Yuan R, et al. Th17 cells induce Th1-polarizing monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2013, 191(3):1175-1187.
- [12] Wang J, Sun W, Bond A, et al. A positive feedback loop between th17 cells and dendritic cells in patients with endplate inflammation[J]. *Immunol Invest*, 2019, 48(1):39-51.
- [13] 陈光, 曹钰, 郑丽, 等. 约氏疟原虫感染早期 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺调节性 T 细胞的作用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(11):827-830.
- [14] 陈光, 刘蕾, 王芳芳, 等. 疟疾感染过程中 Tregs 对 DCs 免疫功能的抑制作用与机理[J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31(5):427-431.
- [15] Ponichtera HE, Stadecker MJ. Dendritic cell expression of the C-type lectin receptor CD209a: A novel innate parasite-sensing mechanism inducing Th17 cells that drive severe immunopathology in murine schistosome infection [J]. *Exp Parasitol*, 2015(158):42-47.
- [16] Dann SM, Mantney CF, Le C, et al. IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*[J]. *Exp Parasitol*, 2015(156):68-78.
- [17] Li Y, Wei C, Xu H, et al. The Immunoregulation of Th17 in host against intracellular bacterial infection [J]. *Mediat Inflamm*, 2018(2018):6587296.
- [18] Wu Y, Wang QH, Zheng L, et al. *Plasmodium yoelii*: distinct CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice[J]. *Exp Parasitol*, 2007(115):301-304.
- [19] Germain RN, Robey EA, Cahalan MD. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system [J]. *Science*, 2012, 336(6089):1676-1681.
- [20] van Panhuys N. Studying dendritic cell-t cell interactions under in vivo conditions[J]. *Methods Mol Biol*, 2017(1584):569-583.
- [21] Block MS, Dietz AB, Gustafson MP, et al. Th17-inducing autologous dendritic cell vaccination promotes antigen-specific cellular and humoral immunity in ovarian cancer patients[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):5173.
- [22] Zheng K, Jia J, Yan S, et al. Paeoniflorin ameliorates ulcerative colitis by modulating the dendritic cell-mediated TH17/Treg balance[J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(6):1705-1716.

【收稿日期】 2022-04-22 【修回日期】 2022-07-12

(上接 1154 页)

- [13] Regev-Yochay G, Reisenberg K, Katzir M, et al. Pneumococcal meningitis in adults after introduction of PCV7 and PCV13, Israel, July 2009-June 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(7):1275-1284.
- [14] Wei L, Xue Z, Lan B, et al. Arctigenin exerts neuroprotective effect by ameliorating cortical activities in experimental autoimmune encephalomyelitis *in vivo* [J]. *Front Immunol*, 2021(12):691590.
- [15] Tang S, Zhou W, Zhong X, et al. Arctigenin prevents the progression of osteoarthritis by targeting PI3K/Akt/NF- κ B axis: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7):4183-4193.
- [16] Liu X, Wang J, Dou P, et al. The ameliorative effects of arctiitin and arctigenin on the oxidative injury of lung induced by silica via TLR-4/NLRP3/TGF- β ? signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021(2021):5598980.
- [17] Yuan Q, Wu Y, Wang G, et al. Preventive effects of arctigenin from *Arctium lappa* L against LPS-induced neuroinflammation and cognitive impairments in mice[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(6):2039-2052.
- [18] Sun Z, Nyanzu M, Yang S, et al. VX765 Attenuates pyroptosis and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways to improve functional outcomes in TBI mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020(2020):7879629.
- [19] Fang X, Wang H, Zhuo Z, et al. miR-141-3p inhibits the activation of astrocytes and the release of inflammatory cytokines in bacterial meningitis through down-regulating HMGB1[J]. *Brain Res*, 2021(1770):147611.

【收稿日期】 2022-06-22 【修回日期】 2022-09-07