

# 瑞马唑仑对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑神经的保护作用及其机制

段梅 刘佳 张静 孙晓丽 王士雷

(青岛大学附属医院麻醉科, 山东 青岛 266555)

**[摘要]** 目的 探讨瑞马唑仑对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑神经的保护作用及其机制。方法 将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,分别为假手术(Sham)组、脑缺血再灌注(I/R)组、I/R+瑞马唑仑(I/R+RE)组、I/R+RE+LY294002(I/R+RE+LY)组及 I/R+LY 组。采用神经功能缺损评分评估各组大鼠的神经功能障碍程度,随后获取各组大鼠动脉血及脑组织病理切片,使用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑对脑组织切片染色并计算各组大鼠的脑梗死体积比,采用酶联免疫吸附试验检测各组大鼠血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,采用免疫印迹实验检测各组大鼠脑组织中蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)、核因子  $\kappa$ -活化 B 细胞轻链增强子 p65(NF- $\kappa$ B p65)和磷酸化 NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)的相对表达量,再使用免疫荧光法检测各组大鼠脑组织细胞核内、外 p-NF- $\kappa$ B p65 的表达。结果 各组大鼠的脑梗死体积比、神经功能缺损评分,血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平, p-AKT、p-NF- $\kappa$ B p65 相对表达量以及 p-AKT/AKT、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值比较,差异均有显著性( $F=72.41\sim 654.90, P<0.05$ )。其中,与 Sham 组相比,I/R 组大鼠的脑梗死体积比、神经功能缺损评分,血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平,脑组织 p-NF- $\kappa$ B p65 相对表达量及 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均显著增高( $P<0.05$ );脑组织 p-AKT 相对表达量、p-AKT/AKT 比值显著下降( $P<0.05$ );免疫荧光法显示大鼠脑组织中 p-NF- $\kappa$ B p65 细胞核易位增多。与 I/R 组、I/R+RE+LY 组和 I/R+LY 组相比,I/R+RE 组大鼠的脑梗死体积比、神经功能缺损评分,血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平,脑组织 p-NF- $\kappa$ B p65 相对表达量和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均显著下降( $P<0.05$ );脑组织 p-AKT 相对表达量和 p-AKT/AKT 比值显著增高( $P<0.05$ );免疫荧光法显示脑组织中 p-NF- $\kappa$ B p65 细胞核易位减少。结论 瑞马唑仑可减轻脑 I/R 损伤引起的炎症反应,发挥脑神经保护的作用,其保护机制与其对 AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路的调控有关。

**[关键词]** 苯二氮草类;再灌注损伤;脑缺血;NF- $\kappa$ B;原癌基因蛋白质 c-akt;信号传导;细胞因子类;炎症

**[中图分类号]** R619.9;R743.31

**[文献标志码]** A

**PROTECTIVE EFFECT OF REMIMAZOLAM ON CEREBRAL NERVES IN A RAT MODEL OF CEREBRAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY AND ITS MECHANISM** DUAN Mei, LIU Jia, ZHANG Jing, SUN Xiaoli, WANG Shilei (Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266555, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the protective effect of remimazolam on cerebral nerves in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury and its mechanism. **Methods** A total of 50 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group (Sham group), cerebral ischemia/reperfusion group (I/R group), I/R+remimazolam (RE) group, I/R+RE+LY294002 (LY) group, and I/R+LY group. Neurological deficit score was used to evaluate the degree of neurological dysfunction. After arterial blood samples and brain tissue pathological sections were collected from the rats in each group, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining was performed for the brain tissue sections to calculate cerebral infarct volume ratio; ELISA was used to measure the serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Western blotting was used to measure the relative expression levels of protein kinase B (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT), nuclear factor-kappa B p65 (NF- $\kappa$ B p65), and phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65) in brain tissue, and then immunofluorescence assay was used to measure the expression level of p-NF- $\kappa$ B p65 inside and outside the nucleus of cells in brain tissue. **Results** There were significant differences between these groups in cerebral infarct volume ratio, neurological deficit score, the serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , the relative expression levels of p-AKT and p-NF- $\kappa$ B p65, p-AKT/AKT ratio, and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 ratio ( $F=72.41-654.90, P<0.05$ ). Compared with the Sham group, the I/R group had significant increases in cerebral infarct volume ratio, neurological deficit score, the serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , the relative expression level of p-NF- $\kappa$ B p65 in brain tissue, and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 ratio ( $P<0.05$ ) and significant reductions in the relative expression level of p-AKT in brain tissue and p-AKT/AKT ratio ( $P<0.05$ ), and immunofluorescence assay showed a significant increase in the nuclear translocation of p-NF- $\kappa$ B p65 in brain tissue. Compared with the I/R group, the I/R+RE+LY group, and the I/R+LY group, the I/R+RE group had significant reductions in cerebral infarct volume ratio, neurological deficit score, the serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , the relative expression level of p-NF- $\kappa$ B p65 in brain tissue, and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 ratio ( $P<0.05$ ) and sig-

**[收稿日期]** 2023-05-19; **[修订日期]** 2023-07-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81771415)

**[通讯作者]** 王士雷, Email: wshlei@aliyun.com

nificant increases in the relative expression level of p-AKT in brain tissue and p-AKT/AKT ratio ( $P < 0.05$ ), and immunofluorescence assay showed a significant reduction in the nuclear translocation of p-NF- $\kappa$ B p65 in brain tissue. **Conclusion** Remimazolam exerts a protective effect on cerebral nerves by alleviating inflammatory response caused by brain I/R injury, possibly by regulating the AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**[KEY WORDS]** Benzodiazepines; Reperfusion injury; Brain ischemia; NF-kappa B; Proto-oncogene proteins c-akt; Signal transduction; Cytokines; Inflammation

缺血性脑卒中是全球人群残疾和死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>,早期恢复缺血性脑卒中患者脑血流供应是其最有效治疗方法<sup>[2]</sup>。然而血流恢复过程会导致进一步的再灌注损伤,称之为脑缺血再灌注(I/R)损伤<sup>[3]</sup>。核因子 $\kappa$ -活化B细胞轻链增强子(NF- $\kappa$ B)是一种关键的核转录因子,在脑I/R损伤中被激活,通过增加促炎细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 $\beta$ 以及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的产生而放大炎症反应<sup>[4]</sup>。NF- $\kappa$ B p65是NF- $\kappa$ B家族的主要成员<sup>[5]</sup>,其磷酸化以及核易位是NF- $\kappa$ B途径激活的最直接的证据<sup>[6]</sup>。蛋白激酶B(PKB,也称AKT)是磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)的主要的下游靶标,磷酸化的AKT(p-AKT)是AKT的活性形式。研究表明,甘氨酸通过激活AKT抑制NF- $\kappa$ B p65/Hif-1 $\alpha$ 信号通路,从而减轻脑缺血诱导的炎症反应<sup>[7]</sup>。瑞马唑仑是一种新型苯二氮䓬类 $\gamma$ -氨基丁酸A受体激动剂,适用于诱导和维持成人的程序性镇静。研究表明在神经性疼痛的发作过程中,瑞马唑仑可以抑制NF- $\kappa$ B核易位,并减少促炎细胞因子的表达<sup>[8]</sup>。此外,瑞马唑仑可抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎性小体介导的炎症级联反应,减少神经元损伤,从而减轻脑I/R损伤<sup>[9]</sup>。然而,瑞马唑仑对脑I/R损伤的保护机制十分复杂且有待深入研究。本研究旨在观察瑞马唑仑对脑I/R损伤的保护作用,并探究AKT/NF- $\kappa$ B信号通路是否参与该过程。现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

雄性SD大鼠(体质量230~260g)购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,PI3K抑制剂LY294002购买于美国MedChemExpress公司,AKT、p-AKT、NF- $\kappa$ B p65及磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)抗体均购买于美国Cell Signaling Technology公司,IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自上海劲马生物科技有限公司。

### 1.2 分组及处理

所有大鼠在恒温25℃室内,12-12h昼夜条件

下适应性饲养1周。将大鼠随机分为5组(每组10只),分别为①假手术(Sham)组:使用异氟烷麻醉大鼠,但不阻塞其大脑中动脉;②I/R组:使用异氟烷麻醉大鼠,阻塞其大脑中动脉2h致脑缺血后再恢复大脑中动脉血流灌注24h,完成大鼠脑I/R损伤模型制备;③I/R+瑞马唑仑(I/R+RE)组:经大鼠腹腔注射16mg/kg瑞马唑仑以后,立即制备大鼠脑I/R损伤模型;④I/R+RE+LY294002(LY)组:经大鼠侧脑室注射50mmol/L LY294002 10 $\mu$ L,30min后经腹腔注射16mg/kg瑞马唑仑,立即制备大鼠脑I/R损伤模型;⑤I/R+LY组:经大鼠侧脑室注射50mmol/L LY294002 10 $\mu$ L,于30min后制备大鼠脑I/R损伤模型。

### 1.3 各组大鼠血清IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平分析

在大鼠脑I/R损伤模型制备完成以后,从各组大鼠当中分别取3只,每只于心脏左心室采血5~10mL,将血液室温静置2h以后离心取上清液,使用ELISA试剂盒测定各组大鼠血清中IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平。

### 1.4 各组大鼠神经功能缺损评分及脑梗死体积比的计算

从每组大鼠中随机选取3只大鼠,使用神经功能缺损评分量表<sup>[10]</sup>评估神经功能缺损情况。继而使用异氟烷麻醉大鼠,并迅速取出其大脑置于直径6cm小皿中,-20℃冰箱冷冻30min。再将大脑组织行2mm厚冠状切片,共切割5片,使用20g/L的2,3,5-三苯基四氮唑氯化物溶液染色。染色组织拍照后使用Image J软件分析缺血(白色)和正常(红色)区域,然后计算脑梗死体积比。脑梗死体积比=脑梗死总体积/脑组织总体积 $\times$ 100%。

### 1.5 免疫印迹实验检测各组大鼠脑组织中AKT、p-AKT、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65相对表达量

从每组大鼠中随机选取3只大鼠,使用含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的组织裂解液裂解其梗死脑组织,提取脑组织梗死区域总蛋白,测定总蛋白浓度。然后上样30 $\mu$ g蛋白到100g/L的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,通过湿法转移到PVDF膜上,并在室温下使用50g/L的脱脂奶粉密封PVDF

膜 1.5 h。之后向 PVDF 膜分别添加 NF-κB p65、p-NF-κB p65、AKT 一抗(1 : 1 000)和 p-AKT 一抗(1 : 2 000)、内参 β-actin(1 : 1 000),4 °C 下孵育过夜,再添加二抗室温孵育 1 h,滴加增强化学发光试剂,显影仪曝光各蛋白条带。以 β-actin 蛋白为内参照,并使用 Image J 软件分析 AKT、p-AKT、NF-κB p65、p-NF-κB p65 相对表达量;同时计算 p-AKT/AKT 和 p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值,分别表示 AKT 和 NF-κB p65 蛋白的活化程度。

**1.6 免疫荧光法检测各组大鼠脑组织细胞核内、外 p-NF-κB p65 表达**

从每组大鼠中随机选取 3 只大鼠,常规麻醉后处死,取整个脑组织以 40 g/L 多聚甲醛固定,切下纹状体切面脑组织,并以石蜡包埋制成 25 μm 厚冠状切片。切片以体积分数 0.005 曲拉通 X-100 渗透 10 min,再用体积分数 0.05 的山羊血清封闭 1 h,4 °C 下以稀释的一抗 p-NF-κB p65(1 : 50)孵育过夜。随后使用磷酸盐溶液洗涤并添加二抗,室温下避光孵育 2 h,以 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色细胞核并封片,最后使用共聚焦激光显微镜观察并拍照。

**1.7 统计学方法**

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,采用 Shapiro-Wilk 法检验数据是否正态分布,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 5 组大鼠脑梗死体积比及神经功能缺损评分比较**

5 组大鼠的脑梗死体积比分别为 0、(24.58 ± 0.52)%、(6.22 ± 0.70)%、(22.23 ± 1.52)%和(26.28 ± 0.96)%,各组间比较差异具有显著性( $F = 537.30, P < 0.05$ );5 组大鼠的神经功能缺损评分则分别为 0、(3.73 ± 0.25)、(1.77 ± 0.25)、(3.37 ± 0.15)以及(4.10 ± 0.10)分,各组间比较差异具有显著性( $F = 271.30, P < 0.05$ )。其中与 Sham 组相比,I/R 组大鼠的脑梗死体积比及神经功能缺损评分显著增高( $P < 0.05$ );与 I/R 组相比,I/R+RE 组大鼠脑梗死体积比和神经功能缺损评分显著下降( $P < 0.05$ );与 I/R+RE 组相比,I/R+RE+LY 组和 I/R+LY 组大鼠脑梗死体积比和神经功能缺损评分均显著增高( $P < 0.05$ )。

**2.2 5 组大鼠血清促炎细胞因子 IL-6、IL-1β、TNF-**

**α 水平比较**

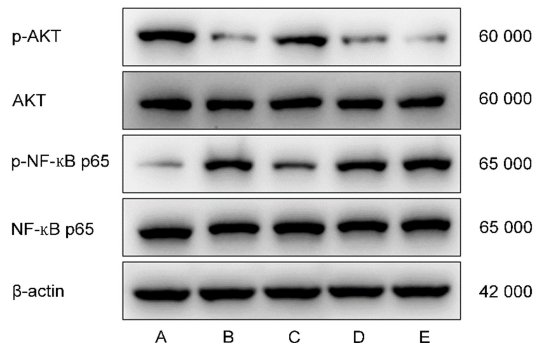
ELISA 检测结果显示,5 组大鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平比较差异均有显著性( $F = 72.41 \sim 209.30, P < 0.05$ ),其中与 Sham 组比较,I/R 组大鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 的水平均显著增高( $P < 0.05$ );与 I/R 组比较,I/R+RE 组大鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均显著下降( $P < 0.05$ );与 I/R+RE 组比较,I/R+RE+LY 组、I/R+LY 组大鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均显著增高( $P < 0.05$ )。见表 1。

**表 1 各组大鼠的血清中 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平比较 ( $\rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}, n=3, \bar{x} \pm s$ )**

组别	IL-6	IL-1β	TNF-α
Sham 组	79.22 ± 11.96	93.79 ± 3.60	65.96 ± 2.50
I/R 组	143.70 ± 2.92	160.50 ± 5.39	121.20 ± 1.70
I/R+RE 组	101.40 ± 4.55	112.60 ± 4.90	81.27 ± 4.54
I/R+RE+LY 组	135.40 ± 4.74	146.20 ± 6.36	110.70 ± 1.58
I/R+LY 组	151.90 ± 1.38	171.50 ± 8.66	130.50 ± 4.61

**2.3 5 组大鼠脑组织 AKT、p-AKT、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 相对表达量比较**

免疫印迹实验的结果表明,各组大鼠脑组织中 p-AKT、p-NF-κB p65 相对表达量和 p-AKT/AKT、p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值均有显著差异( $F = 313.30 \sim 654.90, P < 0.05$ ),其中与 Sham 组相比较,I/R 组大鼠 p-AKT 相对表达量和 p-AKT/AKT 比值显著降低( $P < 0.05$ ),p-NF-κB p65 相对表达量以及 p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值则显著性增高( $P < 0.05$ )。与 I/R 组、I/R+RE+LY 组和 I/R+LY 组相比,I/R+RE 组大鼠 p-AKT 相对表达量和 p-AKT/AKT 比值均显著增高( $P < 0.05$ ),p-NF-κB p65 相对表达量和 p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值均显著降低( $P < 0.05$ )。见图 1、表 2。



A~E 依次为 Sham 组、I/R 组、I/R+RE 组、I/R+RE+LY 组、I/R+LY 组

**图 1 各组大鼠脑组织 AKT、p-AKT、NF-κB p65、p-NF-κB p65 免疫印迹实验结果**



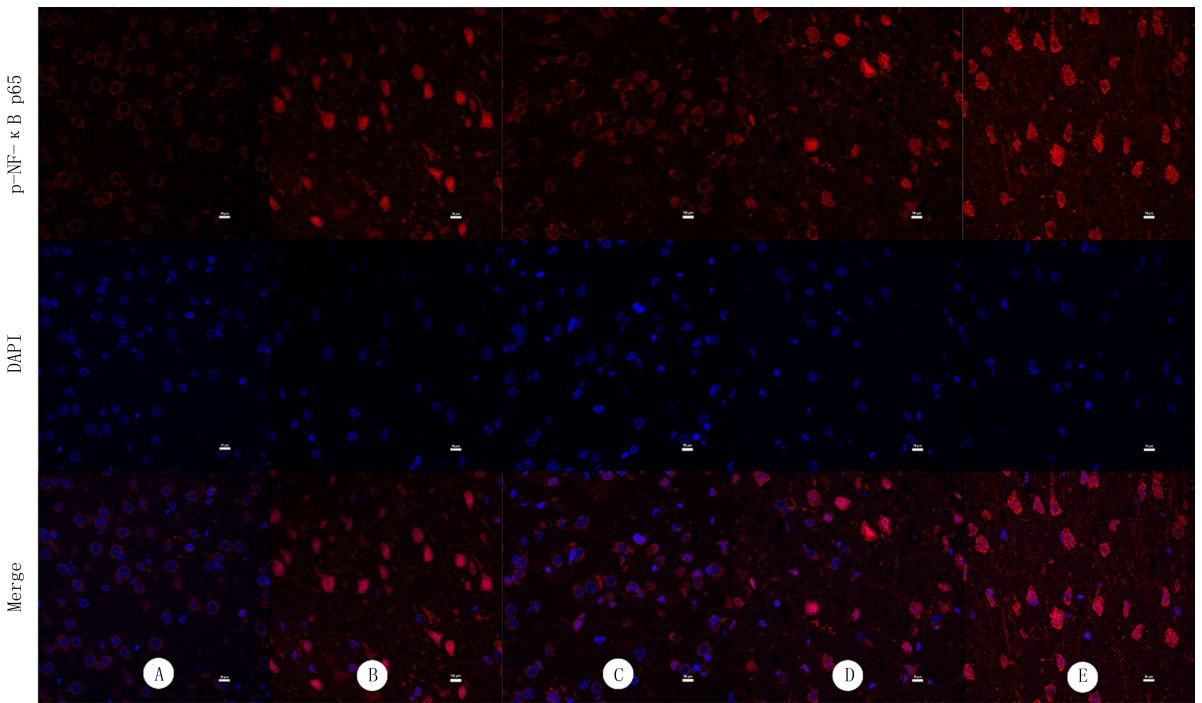
### 2.4 5 组大鼠脑组织细胞核内、外 p-NF-κB p65 的表达比较

免疫荧光实验结果显示, Sham 组大鼠 p-NF-κB p65 主要表达于细胞质, 并且荧光强度较低。与 Sham 组相比, I/R 组大鼠 p-NF-κB p65 从细胞质转

移到细胞核, 荧光强度增高; 与 I/R 组相比, I/R+RE 组大鼠 p-NF-κB p65 从细胞核转移到细胞质, 荧光强度降低; 与 I/R+RE 组相比, I/R+RE+LY 组、I/R+LY 组大鼠 p-NF-κB p65 均主要表达于细胞核, 且荧光强度增高。见图 2。

表 2 各组大鼠脑组织 AKT、p-AKT、NF-κB p65、p-NF-κB p65 相对表达量及 p-AKT/AKT、p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值比较 (n=3, x±s)

组别	AKT	p-AKT	NF-κB p65	p-NF-κB p65	p-AKT/AKT	p-NF-κB p65/NF-κB p65
Sham 组	0.87±0.01	0.80±0.02	1.14±0.01	0.26±0.01	0.92±0.03	0.23±0.01
I/R 组	0.85±0.01	0.28±0.01	1.12±0.01	0.82±0.02	0.32±0.02	0.74±0.02
I/R+RE 组	0.89±0.06	0.62±0.02	1.15±0.02	0.50±0.01	0.69±0.04	0.43±0.01
I/R+RE+LY 组	0.88±0.03	0.32±0.02	1.12±0.01	0.81±0.03	0.36±0.03	0.72±0.03
I/R+LY 组	0.87±0.02	0.22±0.02	1.12±0.04	0.89±0.01	0.25±0.02	0.79±0.03



A~E 依次为 Sham 组、I/R 组、I/R+RE 组、I/R+RE+LY 组、I/R+LY 组, 60 倍

图 2 各组大鼠脑组织细胞 p-NF-κB p65 免疫荧光染色结果

### 3 讨 论

脑 I/R 损伤涉及机体一系列复杂的病理生理变化, 如兴奋毒性、氧化应激、能量代谢紊乱、炎症反应和细胞凋亡等<sup>[11]</sup>。其中炎症反应在脑 I/R 损伤过程中起重要作用<sup>[12]</sup>。因此, 抑制炎症反应是开发新的脑 I/R 损伤治疗方法的关键<sup>[13]</sup>。瑞马唑仑是一种新型苯二氮䓬类短效镇静剂, 已经被证明在脑 I/R 损伤中具有抗炎作用<sup>[9]</sup>, 但其确切的抗炎机制尚未完全明了。本研究使用脑 I/R 损伤大鼠模型研究瑞马唑仑产生脑神经保护作用的机制, 结果表明瑞马唑仑通过减轻炎症反应保护脑 I/R 损伤, 其

抗炎作用很大程度上是由 AKT/NF-κB 信号通路介导的。

本研究首先评估了瑞马唑仑的脑神经保护作用。在实验动物的脑 I/R 损伤模型中, 脑梗死体积比和神经功能缺损评分是评估脑 I/R 损伤进展的主要参数, 且神经功能缺损评分与脑梗死体积比相关<sup>[14]</sup>。因此, 本研究通过测量脑梗死体积比和神经功能缺损评分评估瑞马唑仑的体内疗效, 结果表明瑞马唑仑能够显著降低脑梗死体积比和神经功能缺损评分, 对脑 I/R 损伤具有保护作用。

其次, 本研究观察到瑞马唑仑在脑 I/R 损伤中具有抗炎作用。炎症细胞因子是脑 I/R 损伤后炎

症反应和神经元损伤的关键驱动因素<sup>[15]</sup>。在 I/R 损伤期间,大脑皮质免疫细胞激活,产生并释放过量促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6<sup>[16]</sup>。I/R 中各种复杂因素导致血脑屏障被破坏,上述促炎细胞因子进入血液循环,血清和脑脊液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平升高,使得小胶质细胞活化,促进巨噬细胞和中性粒细胞聚集并向大脑缺血区域浸润,从而进一步破坏脑组织和加速神经元丢失<sup>[17]</sup>。据报道,血清及脑脊液中 IL-6 水平升高与 I/R 损伤所致的神经系统恶化相关<sup>[18-19]</sup>。本研究使用 ELISA 试剂盒,测定各组大鼠血清促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平,结果显示与 I/R 组相比,I/R+RE 组促炎细胞因子水平显著降低,表明瑞马唑仑通过减轻脑 I/R 时炎症反应发挥脑神经保护作用。

最后,本研究探讨了瑞马唑仑在脑 I/R 损伤中的抗炎机制。NF- $\kappa$ B 是炎症中重要的二聚转录因子家族,p65-p50 异二聚体是 NF- $\kappa$ B 最常见的种类,而具有多功能结构域的 p65 是 NF- $\kappa$ B 最重要的亚基<sup>[20]</sup>。脑 I/R 期间,缺氧、过量活性氧和炎症介质诱导 p65 磷酸化,使其从细胞质易位进入细胞核,并特异性结合炎性细胞因子的启动子,从而诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达,导致神经元死亡<sup>[21]</sup>。既往研究表明,PI3K/AKT 的激活对脑 I/R 具有脑神经保护作用,且 PI3K/AKT 激活可抑制 NF- $\kappa$ B 通路活化<sup>[22]</sup>。根据报道,咪达唑仑(化合物结构与瑞马唑仑类似)能够上调神经元细胞中 P-AKT 的表达<sup>[23]</sup>,瑞马唑仑能够下调神经性疼痛和胶质瘤中 NF- $\kappa$ B 的表达<sup>[8,24]</sup>。本研究通过免疫印迹检测了各组大鼠脑组织中 AKT、p-AKT、NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 的表达水平,并使用免疫荧光法检测了各组大鼠脑组织细胞核内、外 p-NF- $\kappa$ B p65 的表达,结果表明,脑 I/R 损伤以后,瑞马唑仑上调了脑组织中 p-AKT 表达水平,下调了 p-NF- $\kappa$ B p65 表达水平,并使得 p-NF- $\kappa$ B p65 从细胞核转移到细胞质,减少了其细胞核内的表达。为了阐明 AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路是否参与瑞马唑仑在脑 I/R 损伤中的抗炎作用,本研究使用 LY294002 抑制 PI3K/AKT 的功能,结果显示,LY294002 能够下调脑组织中 p-AKT 表达水平,上调 p-NF- $\kappa$ B p65 表达水平,增加了 p-NF- $\kappa$ B p65 的细核内表达,并逆转了瑞马唑仑的脑神经保护作用 and 抗炎作用。这些结果表明,AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路在瑞马唑仑对脑 I/R 损伤的脑神经保护和抗炎作用中起着重要作用。

综上所述,瑞马唑仑对脑 I/R 损伤具有保护作

用,其保护机制可能与 AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路介导的抗炎作用相关。

**伦理批准和动物权利声明:**本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学医学部伦理委员会的审核批准(文件号 AHQU-MAL2021-1105)。所有实验过程均遵照美国国立卫生院出版的《实验动物合理和使用指南》的条例进行。

**作者声明:**段梅、刘佳、王士雷参与了研究设计;段梅、刘佳、张静、孙晓丽、王士雷参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

- [1] LAKHAN S E, KIRCHGESSNER A, HOFER M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Therapeutic approaches [J]. *J Transl Med*, 2009,7:97.
- [2] LU C X, WANG C Y, XIAO H X, et al. Ethyl pyruvate: A newly discovered compound against ischemia-reperfusion injury in multiple organs[J]. *Pharmacol Res*, 2021,171:105757.
- [3] BARTHEL D, DAS H. Current advances in ischemic stroke research and therapies [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020,1866(4):165260.
- [4] ZHANG W, SONG J K, LI W, et al. Salvianolic acid D alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing the cytoplasmic translocation and release of HMGB1-triggered NF- $\kappa$ B activation to inhibit inflammatory response [J]. *Mediators Inflamm*, 2020,2020:9049614.
- [5] WANG Y L, ZHANG J J, HAN M, et al. SMND-309 promotes neuron survival through the activation of the PI3K/Akt/CREB-signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2016,54(10):1982-1990.
- [6] LIU H X, WU X, LUO J N, et al. Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF- $\kappa$ B phosphorylation [J]. *Front Immunol*, 2019,10:2408.
- [7] LIU R, LIAO X Y, PAN M X, et al. Glycine exhibits neuroprotective effects in ischemic stroke in rats through the inhibition of M1 microglial polarization via the NF- $\kappa$ B p65/hif-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2019,202(6):1704-1714.
- [8] XIE H Y, LU F, LIU W L, et al. Remimazolam alleviates neuropathic pain via regulating bradykinin receptor B1 and autophagy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021,73(12):1643-1651.
- [9] SHI M, CHEN J, LIU T X, et al. Protective effects of remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2022,16:413-423.
- [10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20(1):84-91.
- [11] DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ M A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view [J]. *Trends Neurosci*, 1999,22(9):391-397.

and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.)[J]. *Phytother Res*, 2006,20(7):519-530.

[11] EDDIN L B, JHA N K, GOYAL S N, et al. Health benefits, pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of  $\alpha$ -bisabolol[J]. *Nutrients*, 2022,14(7):1370.

[12] OLIVEIRA F S, FREITAS T S, CRUZ R P D, et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of  $\alpha$ -bisabolol,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\alpha$ -bisabolol/ $\beta$ -cyclodextrin complex[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017,92:1111-1118.

[13] BELLIO P, FAGNANI L, NAZZICONE L, et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay[J]. *MethodsX*, 2021,8:101543.

[14] FILIPE G A, BIGOTTO B G, BALDO C, et al. Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria[J]. *J Appl Microbiol*, 2022,133(3):1534-1542.

[15] NING H Q, WANG S T, LI Y Q, et al. The cell structure damage and embden-meyerhof-parnas pathway inhibition of *Listeria monocytogenes* induced by glycinin basic peptide[J]. *Microb Pathog*, 2021,152:104635.

[16] CORDEIRO L, FIGUEIREDO P, SOUZA H, et al. Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against *Staphylococcus aureus*[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(12):4531.

[17] CHENG F, MO Y N, CHEN K Y, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics indicates changes in MRSA

exposed to terpinen-4-ol[J]. *BMC Microbiol*, 2021,21(1):305.

[18] 周静,杜航,吴芳草,等. 松油烯-4-醇体外抑制痤疮主要致病菌作用研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018,13(2):160-163,167.

[19] ABUGHAZAL T, SCHELZ Z, VIDÁCS L, et al. Antimicrobial, multidrug resistance reversal and biofilm formation inhibitory effect of *origanum majorana* extracts, essential oil and monoterpenes[J]. *Plants*, 2022,11:1432.

[20] 邱海荣. 红没药醇和姜醇的协同抗炎性研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.

[21] CUTRO A C, CASTELLI M V, LÓPEZ S N, et al. Chemical composition of *Schinus areira* essential oil and antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Prod Res*, 2021,35(17):2931-2936.

[22] HANEY E F, TRIMBLE M J, HANCOCK R E W. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria[J]. *Nat Protoc*, 2021,16(5):2615-2632.

[23] LEE A S, DE LENCASTRE H, GARAU J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018,4:18033.

[24] FORRER M, KULIK E M, FILIPPI A, et al. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis[J]. *Arch Oral Biol*, 2013,58(1):10-16.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第349页)

[12] PETROVIC-DJERGOVIC D, GOONEWARDENA S N, PINSKY D J. Inflammatory disequilibrium in stroke[J]. *Circ Res*, 2016,119(1):142-158.

[13] LAMBERTSEN K L, FINSEN B, CLAUSEN B H. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? [J]. *Acta Neuropathol*, 2019,137(5):693-714.

[14] KASNER S E. Clinical interpretation and use of stroke scales [J]. *Lancet Neurol*, 2006,5(7):603-612.

[15] WANG D X, LIU F, ZHU L Y, et al. FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages[J]. *J Neuroinflammation*, 2020,17(1):257.

[16] WICHA P, TOCHARUS J, JANYOU A, et al. Hexahydrocurcumin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury, attenuates inflammation, and improves antioxidant defenses in a rat stroke model [J]. *PLoS One*, 2017,12(12):e0189211.

[17] ANRATHER J, IADECOLA C. Inflammation and stroke: An overview[J]. *Neurotherapeutics*, 2016,13(4):661-670.

[18] OTO J, SUZUE A, INUI D, et al. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients[J]. *J Anesth*, 2008,22(3):207-212.

[19] GAO Y, FANG X B, TONG Y, et al. TLR4-mediated

MyD88-dependent signaling pathway is activated by cerebral ischemia-reperfusion in cortex in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2009,63(6):442-450.

[20] TAN L W, LI J S, WANG Y Y, et al. Anti-neuroinflammatory effect of alantolactone through the suppression of the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways[J]. *Cells*, 2019,8(7):739.

[21] WILLIAMS A J, HALE S L, MOFFETT J R, et al. Delayed treatment with MLN519 reduces infarction and associated neurologic deficit caused by focal ischemic brain injury in rats via antiinflammatory mechanisms involving nuclear factor- $\kappa$ B activation, gliosis, and leukocyte infiltration[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003:75-87.

[22] LV H, LI J, CHE Y Q. CXCL8 gene silencing promotes neuroglial cells activation while inhibiting neuroinflammation through the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B-signaling pathway in mice with ischemic stroke[J]. *J Cell Physiol*, 2019,234(5):7341-7355.

[23] CHONG W S, HYUN C L, PARK M K, et al. Midazolam protects B35 neuroblastoma cells through Akt-phosphorylation in reactive oxygen species derived cellular injury[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2012,62(2):166-171.

[24] XU W, HU J M, LIU W W, et al. Remimazolam inhibits glioma cell growth and induces apoptosis through down-regulation of NF- $\kappa$ B pathway[J]. *IUBMB Life*, 2021,73(2):341-348.

(本文编辑 范睿心 厉建强)