

# 杜鹃花总黄酮通过抑制 TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的作用

余孝海<sup>1</sup>,金宇<sup>1</sup>,孙敏琼<sup>1</sup>,郭欠影<sup>2</sup>,从辉<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探索杜鹃花总黄酮(TFR)通过抑制 TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 信号通路保护脑缺血再灌注(I/R)损伤的机制。方法 采用大脑中动脉闭塞术(MCAO)建立大鼠 I/R 模型,将造模成功大鼠随机分为假手术(Sham)、脑缺血再灌注(MCAO)和脑缺血再灌注术后 TFR 200 mg/kg 干预(TFR 200 mg/kg)组,制备 MCAO 大鼠模型,在脑缺血再灌注损伤手术后,TFR 200 mg/kg 组连续 14 d 给予 TFR(200 mg/kg)药物溶液。术后 14 d,依据大鼠神经功能评分,脑血流图观察脑血流情况,处死大鼠,苏木精-伊红(HE)染色观察脑组织细胞形态学变化,试剂盒检测大鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH 或 LD)和神经特异性烯醇化酶(NSE)两种酶活性;ELISA 试剂盒检测白细胞介素-1(IL-1)和 IL-6 水平,Western blot 和免疫组化同时检测大鼠脑组织中裂解型胱天蛋白酶 3(cleaved caspase-3)、caspase-8、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  蛋白的表达水平。结果 脑缺血再灌注处理后,MCAO 导致了大鼠神经功能异常,神经功能评分指数显著升高,脑组织病理形态学和脑血流量变化明显,脑组织中 cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  蛋白的表达水平显著增加,血清中 LDH、NSE、IL-1、IL-6 水平明显升高;TFR 200 mg/kg 组大鼠神经功能评分明显降低,脑组织病理损伤显著改善,脑组织中 cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  蛋白的表达以及血清中 LDH、NSE、IL-1、IL-6 水平降低。结论 TFR 可能通过抑制 TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 信号通路减轻脑缺血缺氧性损伤。

**关键词** 杜鹃花总黄酮;脑缺血再灌注;脑缺血缺氧性损伤;凋亡

**中图分类号** R 743.3;R 285.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1047-06  
**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.021

2024-04-30 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:2023AH053310);安徽省研究生教育质量工程项目(编号:2022xscx053);安徽医科大学国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:202310366037)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院病理科,合肥 230022

<sup>3</sup>安徽医科大学第一附属医院东城院区神经内科,合肥 231600

作者简介:余孝海,男,硕士,实验师;

郭欠影,女,博士,副教授,责任作者,E-mail:2681537503@qq.com

脑卒中是一种危害我国居民健康和生命的脑部疾病,是目前世界公认的全球第二大死亡原因,每年因此病亡人数为 550 万左右<sup>[1]</sup>,脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤是临床比较常见的病理学过程,其发病机制比较复杂。一般认为脑缺血发生时,脑部组织缺氧是导致细胞损伤甚至死亡的主要原因,再灌注过程再次加剧了组织的炎症反应和细胞凋亡的发生,加重脑组织坏死等,引发相关神经方面病变<sup>[2]</sup>。杜鹃花总黄酮(total flavones of rhododendron, TFR)主要成分包括金丝桃苷、槲皮素等黄酮类物质,黄酮属于多酚类化合物,豆科植物中普遍存在,在抗炎、抗氧化和抗凝血等方面起作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>显示,TFR 在减少脑梗死面积,减轻缺血再灌注损伤并发症方面有很好的效果,但是其抑制脑组织细胞凋亡,减轻脑组织的损伤机制还不甚清楚;该研究通过建立大脑中动脉闭塞术(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察 TFR 对脑缺血再灌注损伤的保护机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级雄性 8 周龄 SD 大鼠 18 只,体质量(250 $\pm$ 20)g[由安徽医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(皖)2022-001;动物伦理会批准编号:LLSC20231282]大鼠在动物室适应 3~5 d 后进行相关试验,实验室环境温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 55%~65%;自然光线明暗交替,所有动物均可自由饮水和进食。

**1.2 主要的仪器及试剂** 激光散斑血流成像系统购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;电泳仪购自美国伯乐公司;TDZ4-WS 低速台式离心机购自湖南湘仪仪器公司;TGL-I6H 型高速离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司;Olympus CHL2FM3 型倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;SuperMax-3100 多功能酶标仪购自上海闪谱公司;石蜡包埋机购自金华华速公司。TFR 购自合肥久诺医药公司;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自合肥诺卓科技有限公司;分子

蛋白 Marker 购自武汉塞维尔生物科技有限公司;肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)- $\alpha$  抗体购自博奥森生物公司; caspase8 antibody 购自江苏亲科生物公司;cleaved caspase-3 antibody 购自成都正能生物公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;神经特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-6 购自江苏江莱公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验模型的制备及分组** 大鼠在适应动物室 4 d 饲养后,进行本轮实验分组,将 18 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术(Sham)组、脑缺血再灌注(MCAO)组和脑缺血再灌注 TFR 干预(TFR 200 mg/kg)组,每组 6 只。禁食 1 d 造模,饮水自由。根据大鼠体重,按照 40 mg/kg 的用量,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,大鼠呈仰卧位姿势,四肢用固定夹固定,粗剪刀剪去大鼠颈部的毛发,暴露表皮。用碘伏消毒,在正中方向剪开纵向切口(约 2 cm),暴露后分离颈部皮肤,分别游离出右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉并穿线,保持迷走神经和气管的完整,用 5.0 的手术缝合线分别结扎右侧颈总动脉和颈外动脉两血管,小动脉夹夹闭颈内动脉远心端,在分叉处(约 5 mm)剪一小切口,将线栓从右侧颈总动脉插入颈内动脉,松开动脉夹,将线栓向前推入约 1 cm,切口处线栓用丝线固定。缺血 2 h 后,拔出线栓,检查有无出血,再用碘伏消毒一次,颈部缝合完整。大鼠清醒后继续放回笼内饲养,24 h 后继续实验。为避免实验动物损伤,手术时间控制在 25 min 以内,出血量要少。TFR(200 mg/kg)采用术后立即灌胃给药,Sham、MCAO 组大鼠给予同剂量生理盐水<sup>[3]</sup>。

**1.3.2 脑血流量的检测** 将大鼠麻醉后利用立体定位仪固定头部位置,先剪去头部毛发,露出头部皮肤,剪开头部皮肤,露出骨十字形状,颅骨通过打磨以后,放置在激光散斑探头下方,调整相关参数,电脑获得的实时图像在大鼠右侧脑区域。在 Pim-Softv1.4 软件下实时分别记录右侧脑区域在缺血前,缺血 2 h 后,给药 14 d 后的脑血流量变化,每个时间点记录 3 s。

**1.3.3 采用 Zea-Longa 评分** 实验期间,根据改良的 Zea-Longa 标准<sup>[5]</sup>对神经功能相关指标进行评

分:0 分,无行为障碍;1 分,左前肢内收;2 分,不能完全伸展向瘫痪侧转圈;3 分,身体向对侧倾倒;4 分,不能自主行走并伴有意识障碍。

**1.3.4 血清相应指标的检测** 缺血再灌注 14 d 后,用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,颈动脉取血置于试管(已加入抗凝剂)中,静置 30 min(37 °C 烘箱),4 °C 离心(3 000 r/min, 10 min),取上清液,置于 EP 管中并密封, -80 °C 冰箱保存。严格按照 LDH、NSE、IL-1、IL-6 说明书的方法测定吸光度(absorbance, A)值

**1.3.5 HE 染色** 大鼠经 4% 多聚甲醛灌注取脑后,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液烧瓶中固定保存,经过脱水机脱水,二甲苯清洗、包埋形成蜡块、机器切成薄片(约 4  $\mu$ m)。按照步骤(脱蜡 - 染色 - 0.3% 盐酸分化 - 氨水稀释 - 水洗等)进行 HE 染色,选用中性树胶封片,显微镜下观察并截图。

**1.3.6 Western blot 检测相关蛋白的活性** 在冰盘上剪取脑组织,取正常侧和梗死侧的皮层脑组织用 RIPA 裂解液裂解,放入蛋白裂解缓冲液,研磨后 12 000 r/min 离心 15 min,利用 BCA 法测定蛋白浓度并配平,经过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转至 PVDF 膜上,封闭孵育一抗,一抗包括鼠抗  $\beta$ -actin 抗体(1 : 1 000 稀释)、兔抗 TNF- $\alpha$  抗体、兔抗 caspase-8 和 c-caspase-3 抗体(1 : 1 000 稀释),冰箱孵育过夜(4 °C)。室温孵育兔二抗(1 : 10 000 稀释 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG)2 h, ECL 法曝光显示条带,使用 ImageJ 软件分析灰度值。

**1.3.7 免疫组化实验** 石蜡切片烘烤 2 h 融蜡,肝组织切片脱蜡,将切片在柠檬酸钠抗原修复液中沸腾 8 min,用山羊血清封闭 30 min,4 °C 孵育一抗过夜;切片冲洗干净,二抗孵育 60 min;滴加 DAB 显色工作液,再次冲洗干净,苏木精染液中染色,脱色至透明,中性树胶封片固定,观察并采集相应图片。

**1.4 统计学处理** 利用 SPSS 26.0 分析实验数据计量结果,计量结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示;多组间相互比较采用单因素方差分析,统计图采用 Prism 8.0.2 绘制,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组间大鼠的神经功能评分** Sham 组大鼠各方面表现正常,与 Sham 组相比, MCAO 组各时间段大鼠功能评分异常,神经评分指标升高( $P < 0.01$ ),

差异有统计学意义;与 MCAO 组相比,TFR 200 mg/kg 组逆转了 MCAO 引起的神经评分指标的升高( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义。结果提示,TFR (200 mg/kg)可以减轻大鼠由 I/R 所致的神经功能异常,见表 1。

**2.2 TFR 对大鼠脑血流量的影响** Sham 组术前、术中、术后血流平稳,无明显变化,与 Sham 组相比,MCAO 组术后 14 d,脑血流“无复流现象”明显( $P < 0.01$ ),差异有统计学意义;与 MCAO 组相比,TFR 200 mg/kg 组逆转脑血流“无复流现象”,血流部分恢复( $P < 0.01$ );结果提示,TFR (200 mg/kg)可以减轻大鼠由 I/R 所致的脑血流下降,见图 1。

表 1 TFR 200 mg/kg 对大鼠脑神经功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	评分		
	1 d	7 d	14 d
Sham	0	0	0
MCAO	3.67 ± 0.47**	3.16 ± 0.68**	2.50 ± 0.50**
TFR 200 mg/kg	2.83 ± 0.37#	2.33 ± 0.47#	1.67 ± 0.47#

与 Sham 组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与 MCAO 组比较:#  $P < 0.05$

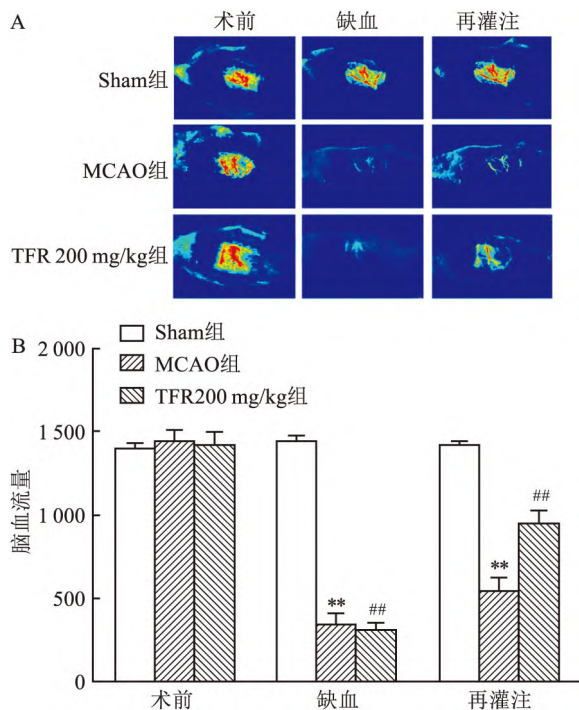


图 1 TFR (200mg/kg) 对大鼠脑血流量的影响

A: TFR (200mg/kg) 对大鼠脑血流量的影响;B: 大鼠脑血流量的半定量分析;与 Sham 组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与 MCAO 组比较:##  $P < 0.01$

**2.3 HE 染色观察大鼠脑组织的病理变化** Sham 组在显微镜下脑组织细胞结构大小规整、形态正常、

核仁清晰、排列整齐有序,细胞无明显变性及坏死;与 Sham 组相比,MCAO 组大鼠可见神经元细胞出现炎性聚集、形态无序、细胞萎缩、空泡化明显,神经纤维崩解、细胞坏死等( $P < 0.01$ );而 TFR 200 mg/kg 组大鼠脑组织病理学有所改善,TFR 200 mg/kg 组部分细胞变性、神经元固缩,大脑组织细胞变性、坏死明显减少,神经元结构大体正常,细胞坏死程度得到明显改善( $P < 0.01$ ),见图 2。

**2.4 大鼠血清 LDH、NSE、IL-1 和 IL-6 水平的变化** 与 Sham 组相比,MCAO 组大鼠血清中 LDH、NSE、IL-1 和 IL-6 水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),术后 14 d 给药 TFR (200 mg/kg)后显著逆转了由 MCAO 造成的 LDH、NSE、IL-1 和 IL-6 水平的升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );结果提示 TFR (200 mg/kg)可以缓解大鼠脑损伤,见图 3。

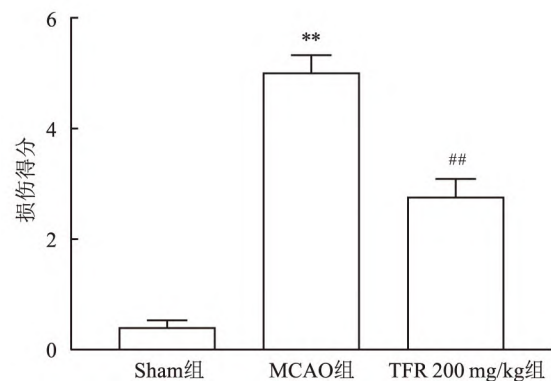
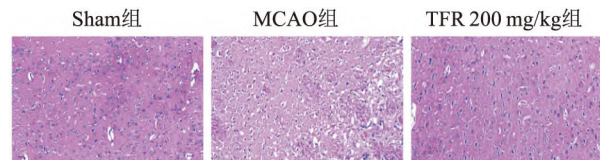


图 2 TFR (200 mg/kg) 对大鼠脑组织细胞的影响 HE × 200  
与 Sham 组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与 MCAO 组比较:##  $P < 0.01$

**2.5 TFR 处理对大鼠脑组织中 cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平的影响** Western blot 和免疫组化结果显示,与 Sham 组相比,MCAO 模型组大鼠脑组织蛋白 cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  的蛋白表达上调,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MCAO 模型组相比,TFR 200 mg/kg 组大鼠脑组织中 cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  的蛋白表达有所下调( $P < 0.01$ )。结果提示 TFR 可抑制脑缺血/再灌注诱导的炎性因子和凋亡相关蛋白的表达,见图 4。

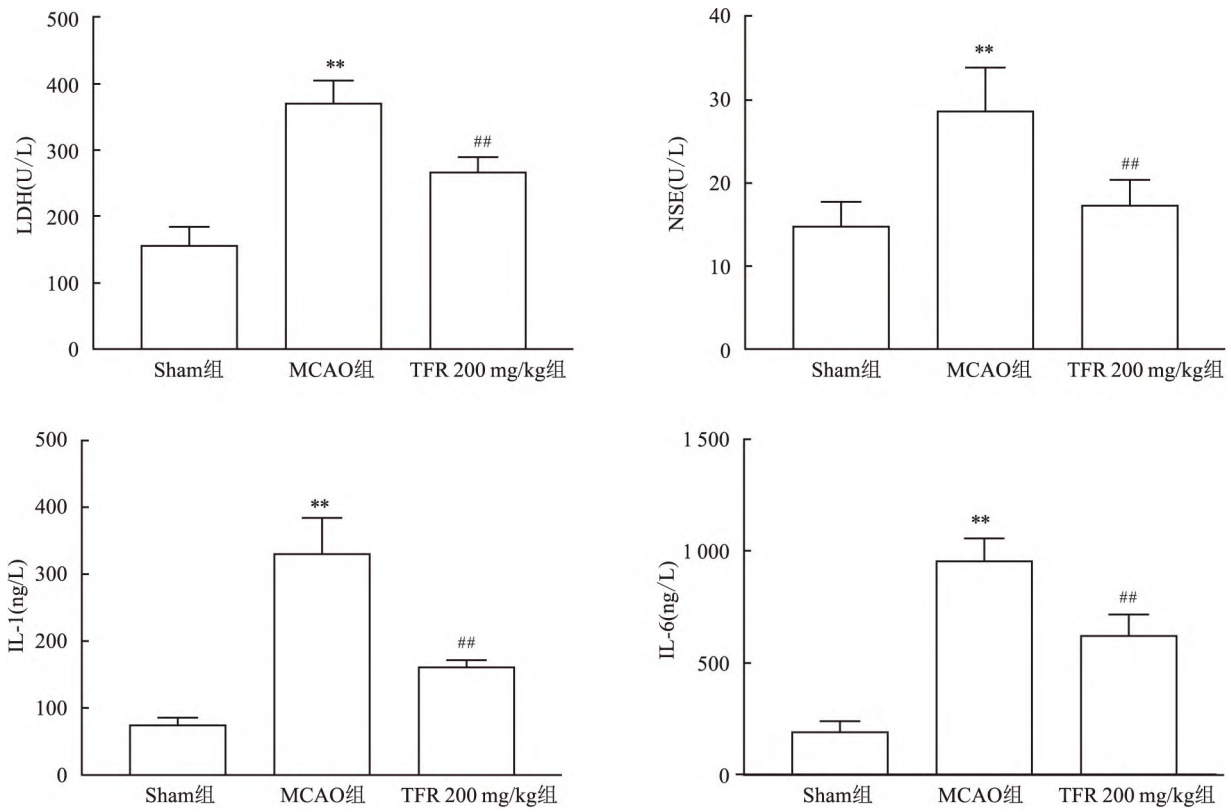


图3 TFR(200 mg/kg)对大鼠血清中LDH、NSE、IL-1和IL-6的影响  
与Sham组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与MCAO组比较: ##  $P < 0.01$

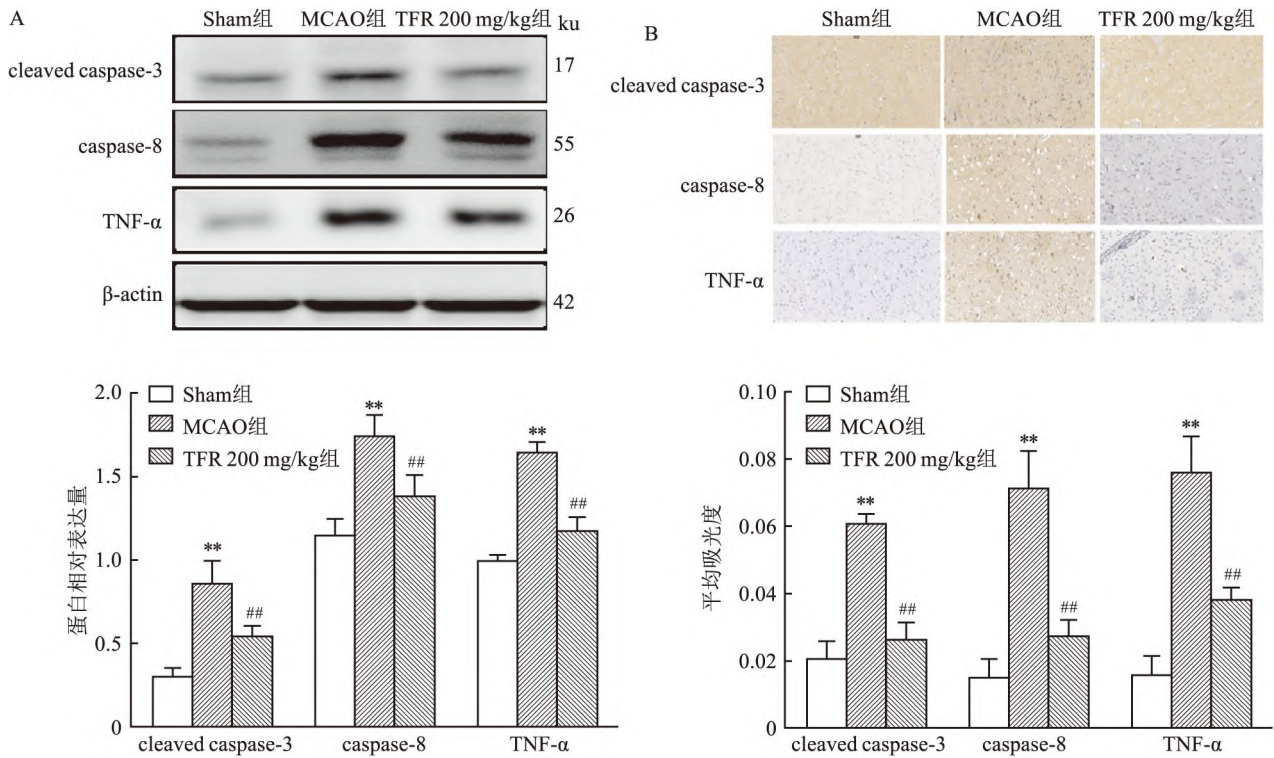


图4 TFR处理对大鼠脑组织中cleaved caspase-3、caspase-8、TNF-α蛋白表达水平的影响

A: Western blot 检测大鼠脑组织中 TNF-α、caspase-8 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平及半定量分析; B: 免疫组化(×200)分别检测大鼠脑组织中 TNF-α、caspase-8 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平及半定量分析; 与 Sham 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MCAO 组比较: ##  $P < 0.01$

### 3 讨论

脑卒中在成年人中发病率很高,常伴有感觉、视觉和运动行为的障碍,是造成永久残疾的原因之一。脑缺血/再灌注是脑部缺血后又恢复供血的过程,恢复供血进一步引起脑损伤,造成如氧化应激、炎症小体激活、线粒体功能障碍和细胞凋亡等<sup>[6]</sup>。本实验显示 MCAO 导致大鼠神经功能评分指数显著升高,脑组织形态学和脑血流变化明显,cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  蛋白的表达水平显著增加、血清中 LDH、NSE、IL-1、IL-6 水平明显升高;TFR (200 mg/kg) 给药处理可以显著降低 cleaved caspase-3、caspase-8、TNF- $\alpha$  蛋白的表达以及 LDH、NSE、IL-1、IL-6 水平,减轻脑组织细胞凋亡,结果提示:TFR 可能通过抑制 TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 信号通路保护脑缺血缺氧性损伤。再灌注 14 d 后,血流减少主要是:大量的白细胞黏附在血管内皮细胞上,造成嵌顿、堵塞微循环血管的情况,导致出现“无复流现象”;微血管血液流变学改变:同时中性粒细胞聚集黏附在血管内皮细胞上,加剧嵌顿、堵塞微循环血管,更易形成“无复流现象”,组织缺血、缺氧现象加重;同时微血管通透性增高:缺血可损伤内皮细胞、使间隙增大,同时激肽等炎症因子可使微血管通透性增高,引发组织液向外部渗透,也可以导致血液浓缩,加重“无复流现象”。TNF- $\alpha$  作为起始细胞因子,诱导 IL-1 $\beta$  的进一步释放,导致脑组织细胞的损伤<sup>[7]</sup>;TNF- $\alpha$  还可以通过激活 caspase-8 和 caspase-1 凋亡通路的活化来起作用,TNF- $\alpha$  与 TNFR1 胞外区结合形成三聚体,三聚体与 FADD 形成复合体,激活 caspase-8 启动 caspase-3、caspase-6、caspase-7 诱导凋亡<sup>[8-9]</sup>。LDH、NSE 是存在于细胞内的酶,当脑缺血/再灌注发生时,细胞膜会随之破裂,细胞内的酶如 LDH 和 NSE 释放到血清中,随着乳酸大量累积,LDH 含量升高不断分解乳酸形成新的化合物,NSE 对神经细胞特异性特别高,是神经细胞受损的标志,血清中 LDH 和 NSE 水平与缺血脑组织损伤程度成正相关;脑组织损伤引起一系列炎症反应,促使炎症细胞因子的分泌,释放炎症因子,此过程是脑缺血性损伤的路径<sup>[10-11]</sup>。血清中 IL-6 是一种标志性介质,与患脑血管疾病的风险息息相关,其升高表明脑损伤风险增高。研究<sup>[12-14]</sup>表明 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等炎症介质在内皮细胞起作用,炎症介质的释放会

加重脑组织损伤。

综上所述,脑缺血再灌注损伤后会引发炎症、凋亡反应,TFR 可能通过抑制脑组织 TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 信号通路保护脑缺血缺氧性损伤,减少炎症介质 IL-1、IL-6 释放和细胞凋亡相关蛋白 caspase-8/caspase-3 的表达,抑制细胞凋亡。TFR 的作用机制为多通道、多靶点,推测或许其他信号通路也参与了保护脑缺血缺氧性损伤,其相互作用的机制还有待于探究。

### 参考文献

- [1] Ly L D, Ly D D, Nguyen N T, et al. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake relieves palmitate-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> overload in MIN6 cells [J]. Mol Cells, 2020, 43(1): 66-75.
- [2] 陈子龙. 缺血性脑卒中合并勃起功能障碍患者中医证素调查及中医治疗的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2022.
- [3] 盛菊. 内皮源性 CSE 产生的 H2S 介导杜鹃花总黄酮抑制神经细胞中 RhoA-ROCK 通路保护脑缺血缺氧性损伤的实验研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2024.
- [4] 赫玉香, 陆嘉珺, 王书凡, 等. 杜鹃花总黄酮对急性脑缺血/再灌注损伤大鼠 STIM-Orai 调控的 G 蛋白偶联 SOCE 通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(12): 1736-42.
- [5] Yang K, Zhou Y, Zhou L, et al. Synaptic plasticity after focal cerebral ischemia was attenuated by Gap26 but enhanced by GAP-134[J]. Front Neurol, 2020, 11(26): 1-10.
- [6] Guo P, Jin Z, Wu H, et al. Effects of irisin on the dysfunction of blood-brain barrier in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. Brain Behav, 2019, 9(10): e1425.
- [7] 姜晨晨, 施磊, 赵欣雅, 等. 映山红花总黄酮减轻缺血性脑损伤的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 455-64.
- [8] Zhang E, Phan P, Zhao Z. Cellular nanovesicles for therapeutic immunomodulation: A perspective on engineering strategies and new advances[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2023, 13(5): 1789-827.
- [9] Liu Y Y, Li Y, Wang L, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate microglia phenotypes: a promising treatment for acute central nervous system injury[J]. Neural Regeneration Research, 2023, 18(8): 1657-65.
- [10] 陈明, 石鹏, 夏明燕, 等. GIV 对脑缺血/再灌注损伤模型中神经炎症反应的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(1): 54-9.
- [11] 罗耀文, 程俊凯, 张敏, 等. D-阿洛糖下调半乳糖凝集素-3 抑制 AMPK/mTOR 通路减轻脑缺血再灌注损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(9): 1467-73.
- [12] Das S S, Singh S K, Verma P, et al. Mitigating inflammation using advanced drug delivery by targeting TNF- $\alpha$  in lung diseases [J]. Future Med Chem, 2022, 14(2): 57-60.

- [13] Wang Q, Song L J, Ding Z B, et al. Advantages of Rho-associated kinases and their inhibitor fasudil for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(12): 2623 – 31.
- [14] Guo Y, Wang B, Wang T, et al. Biological characteristics of IL-6 and related intestinal diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1): 204 – 19.

## The total flavonoids of rhododendron alleviate rat brain ischemia-reperfusion injury by inhibiting the TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 signaling pathway

Yu Xiaohai<sup>1</sup>, Jin Yu<sup>1</sup>, Sun Minqiong<sup>1</sup>, Guo Qianying<sup>2</sup>, Cong Hui<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>*School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

<sup>2</sup>*Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

<sup>3</sup>*Dept of Neurology, East Campus, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 231600)*

**Abstract Objective** To explore the mechanism by which total flavones of rhododendron (TFR) protect against cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury by inhibiting the TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 signaling pathway.

**Methods** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) method was used to establish the rat I/R model. Rats were randomly divided into Sham surgery, MCAO, and post-I/R intervention with TFR 200 mg/kg (TFR 200 mg/kg) groups. After establishing the MCAO rat model, rats in the TFR 200 mg/kg group were administered TFR (200 mg/kg) solution for 14 consecutive days following I/R injury surgery. Hematoxylin-Eosin (HE) staining was used to observe neurological function scoring, cerebral blood flow assessment, histological examination of brain tissue, assay kits were used to detect lactate dehydrogenase (LDH) and neuron-specific enolase (NSE) activities in rat serum. ELISA assay kits was used to measure interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) levels, and Western blot and immunohistochemistry were conducted to detect the expression levels of cleaved caspase-3, caspase-8, and TNF- $\alpha$  proteins in rat brain tissue 14 days post-surgery. **Results** After cerebral ischemia-reperfusion treatment, MCAO resulted in abnormal neurological function in rats, significantly increased neurological function scoring index, obvious changes in cerebral tissue histomorphology and cerebral blood flow, significant upregulation of cleaved caspase-3, caspase-8, and TNF- $\alpha$  protein expression levels in brain tissue, and significant elevation of LDH, NSE, IL-1, and IL-6 levels in serum. Rats in the TFR 200 mg/kg group showed significantly reduced neurological function scoring, significant improvement in cerebral tissue pathological damage, decreased expression levels of cleaved caspase-3, caspase-8, and TNF- $\alpha$  proteins in brain tissue, as well as decreased levels of LDH, NSE, IL-1, and IL-6 in serum. **Conclusion** TFR may alleviate cerebral ischemic hypoxic injury by inhibiting the TNF- $\alpha$ /caspase-8/caspase-3 signaling pathway.

**Key words** total flavones of rhododendron; cerebral ischemia-reperfusion; cerebral ischemic hypoxic injury; apoptosis