

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.006

白藜芦醇抑制 ApoE^{-/-}小鼠动脉血管氧化应激及炎症损伤的作用研究*

李自立,马小峰,黄江伟

(南华大学附属南华医院心血管内科,湖南衡阳 421002)

[摘要] 目的 研究白藜芦醇抑制 ApoE^{-/-}小鼠动脉血管氧化应激及炎症损伤的作用。方法 选取 80 只 ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料饮食,制备动脉粥样硬化(AS)模型,并选取 10 只 C3H 小鼠做对照,给予白藜芦醇进行治疗,观察血脂及 AS 病变情况。结果 白藜芦醇各剂量组小鼠各时间点的总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、动脉硬化指数(AI)水平、主动脉脂质蓄积面积、凋亡细胞指数均显著低于模型组($P < 0.05$)。白藜芦醇各剂量组丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 及 IL-6 水平均显著低于模型组,超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)水平显著高于模型组($P < 0.05$)。白藜芦醇各剂量组 p-JAK1 及 p-STAT3 蛋白均显著低于模型组($P < 0.05$)。结论 白藜芦醇可能通过抑制 JAK1/STAT3 通路减轻 ApoE^{-/-}小鼠动脉血管内的氧化应激及炎症损伤。

[关键词] 动脉粥样硬化;白藜芦醇;氧化应激;JAK1;STAT3

[中图分类号] R972.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)22-2905-04

Effect of resveratrol on oxidative stress and inflammatory injury in ApoE^{-/-} mice arterial blood vessels*

LI Zili, MA Xiaofeng, HUANG Jiangwei

(Department of Cardiovascular Surgery, Affiliated Nanhua Hospital, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of resveratrol on oxidative stress and inflammatory injury of arterial blood vessels in ApoE^{-/-} mice. **Methods** Eighty ApoE^{-/-} mice were selected and given the high fat fodder for preparing the atherosclerotic model. Ten C3H mice were selected as the control and given resveratrol for conducting the treatment. Then the changes of blood flat and atherosclerosis lesion were observed. The levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) And glutathione (GSH), the expression of TNF- α , IL-1 and IL-6 and the expressions of IL-6, JAK1 and STAT3 proteins. **Results** The levels of TC, TG, LDL-C and AI, aortic lipid accumulation area and apoptotic cell index at each time point in the resveratrol doses groups were all significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). The levels of MDA, NO, TNF- α , IL-1 and IL-6 in the resveratrol doses groups were significantly lower than those in model group, while the levels of SOD and GSH were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). The levels of p-JAK1 and p-STAT3 proteins in the resveratrol doses groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol can alleviate the oxidative stress and inflammatory injury of arterial blood vessels in ApoE^{-/-} mice by inhibiting the JAK1/STAT3 pathway.

[Key words] resveratrol; atherosclerosis; oxidative stress; JAK1; STAT3

动脉粥样硬化(AS)的发病与低密度脂蛋白(LDL)、高血压、糖尿病、吸烟等因素刺激导致自由基生成增多及炎性因子的大量释放诱发的血管的炎症反应密切相关^[1-2]。白藜芦醇是一种天然的多酚类化合物,研究^[3-4]显示,其可显著减少活性氧簇的生成、减少动脉平滑肌细胞凋亡率,对抗动脉平滑肌细胞的氧化损伤,但其具体作用途径尚未见研究报道。本研究成功复制 AS 小鼠模型,观察了白藜芦醇对 AS 小鼠的疗效及其对 IL-6/STAT3 信号通路的影响,旨在

探讨白藜芦醇抗 AS 的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 ApoE^{-/-}小鼠及 C3H 小鼠,体质量(20±2)g,均购自广东省实验动物中心。小鼠饲养于 SPF 级动物实验室,室温保持在(24±0.2)℃,湿度保持在 45%左右,黑白 12 h 交替,环境安静,自由饮食水,每笼单笼饲养 6 只,适应性喂养 1 周后进入实验。

1.2 AS 小鼠模型的制备及分组 10 只 10 周龄雄性

C3H 小鼠设置为对照组,用普通饲料进行喂养。将 80 只 10 周龄 ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料饮食,4 周成功复制 AS 模型,采用随机数字表法分为模型组、白藜芦醇高剂量组、白藜芦醇低剂量组和辛伐他汀组,每组各 20 只。

1.3 动物分组及给药 白藜芦醇高、低剂量组分别用 0.2 mL 30 g/L 和 15 g/L 的白藜芦醇进行灌胃,给药体积为每日 0.2 mL,同时继续给予高脂饮食。模型组每天给予 0.2 mL 生理盐水灌胃,继续高脂饮食。均于每日 9:00 灌胃给药,各组均给予相应的处理 14 周。

1.4 观察指标

1.4.1 血脂 实验进行 14 周后禁食水 12 h,摘取各组小鼠眼球并取约 1 mL 血液,离心后留取血清,全自动生化分析仪检测各组小鼠总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等变化情况。

1.4.2 主动脉根部病理形态学变化 干预 14 周后,用 10%水合氯醛麻醉并固定小鼠,在无菌操作下打开小鼠胸腔,分离胸主动脉,多聚甲醛固定、乙醇脱水,包埋,切片,进行苏木素-伊红(HE)染色操作,观察各组小鼠主动脉病理形态学变化。同时,用灭菌注射用水冲洗胸主动脉标本,进行油红染色,观察各组小鼠主动脉内中性 TG、脂质蛋白情况。

1.4.3 氧化应激指标水平变化 分离小鼠主动脉,在冰上采用 PBS 溶液制成 10%的匀浆液,4 °C 离心,

留取上清液,检测各组小鼠主动脉组织中丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽(GSH)水平变化。

1.4.4 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1、IL-6 的表达 分离小鼠主动脉,在冰上采用 PBS 溶液制成 10%的匀浆液,4 °C 离心,留取上清液,采用 ELISA 法检测各组小鼠主动脉组织中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的水平。

1.4.5 Western blot 法检测 IL-6、JAK1、STAT3 蛋白的表达 冰上分离各组检测小鼠的主动脉,采用蛋白裂解缓冲液提取总蛋白,并采用 Bradford 法进行蛋白定量。用 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,进行聚偏氟乙烯(PVDF)的转膜,封闭,放入相应的一抗和二抗,ECL 曝光,X 射线显影后,运用凝胶扫描成像系统进行分析及定量,以 β -actin 为内参。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件包进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dennett T3 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

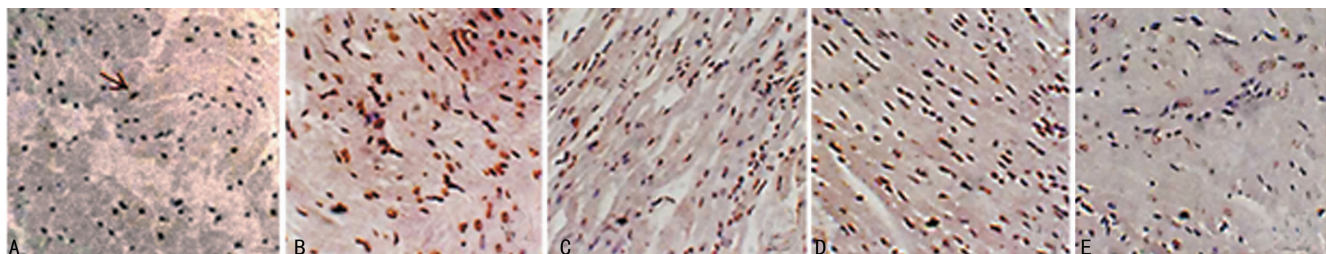
2 结 果

2.1 血脂水平比较 白藜芦醇各剂量组及辛伐他汀组各时间点 TC、TG、LDL-C、AI 水平显著低于模型组($P < 0.05$)。HDL-C 随着喂养时间的延长有逐渐增高的趋势,但与模型组同期比较差异无统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠血脂水平比较($\bar{x} \pm s, n=20$)

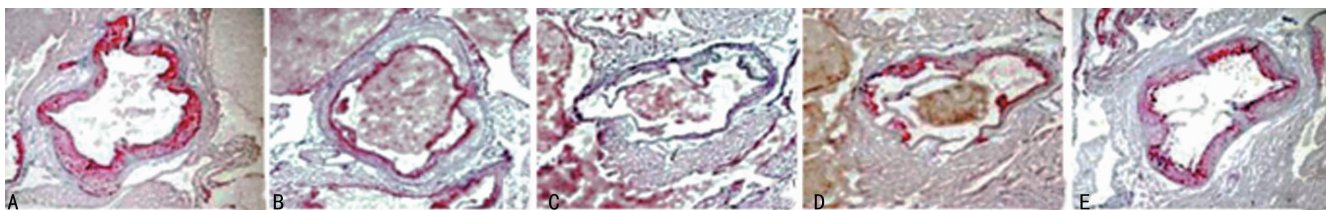
| 给药时间(周) | 组别 | TC(mmol/L) | TG(mmol/L) | HDL-C(mmol/L) | LDL-C(mmol/L) | AI |
|---------|----------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 | 对照组 | 1.87 \pm 0.55 | 1.53 \pm 0.41 | 1.71 \pm 0.27 | 0.87 \pm 0.42 | 0.51 \pm 0.18 |
| | 模型组 | 2.17 \pm 0.22 | 1.41 \pm 0.29 | 2.11 \pm 0.21 | 0.86 \pm 0.34 | 0.43 \pm 0.21 |
| | 辛伐他汀组 | 2.32 \pm 0.31 | 1.46 \pm 0.35 | 1.74 \pm 0.23 | 0.80 \pm 0.31 | 0.46 \pm 0.17 |
| | 白藜芦醇低剂量组 | 2.14 \pm 0.16 | 1.37 \pm 0.22 | 1.92 \pm 0.26 | 0.88 \pm 0.17 | 0.42 \pm 0.14 |
| | 白藜芦醇高剂量组 | 2.35 \pm 0.31 | 1.39 \pm 0.32 | 2.15 \pm 0.24 | 0.86 \pm 0.43 | 0.39 \pm 0.21 |
| 4 | 对照组 | 2.31 \pm 0.19 | 1.55 \pm 0.38 | 3.57 \pm 0.19 | 1.66 \pm 0.22 | 0.51 \pm 0.23 |
| | 模型组 | 8.79 \pm 2.66* | 2.87 \pm 1.54* | 2.65 \pm 1.21 | 4.23 \pm 1.02* | 2.25 \pm 0.17* |
| | 辛伐他汀组 | 6.26 \pm 2.97 Δ | 2.17 \pm 1.76 $\#$ | 3.21 \pm 0.27 | 3.23 \pm 1.25 $\#$ | 0.94 \pm 0.19 $\#$ |
| | 白藜芦醇低剂量组 | 6.84 \pm 4.36 $\#$ | 2.25 \pm 1.57 $\#$ | 3.27 \pm 1.22 | 3.24 \pm 1.33 $\#$ | 1.13 \pm 0.22 $\#$ |
| | 白藜芦醇高剂量组 | 6.57 \pm 2.04 $\#$ | 2.48 \pm 1.72 $\#$ | 2.93 \pm 2.31 | 3.09 \pm 1.37 $\#$ | 0.91 \pm 0.31 $\#$ |
| 8 | 对照组 | 2.97 \pm 0.48 | 1.49 \pm 0.36 | 3.88 \pm 0.45 | 3.91 \pm 0.76 | 0.62 \pm 0.22 |
| | 模型组 | 9.13 \pm 1.88* | 3.13 \pm 1.26* | 2.51 \pm 1.31 | 7.84 \pm 1.93* | 3.75 \pm 1.14* |
| | 辛伐他汀组 | 6.42 \pm 1.95 Δ | 2.42 \pm 0.91 $\#$ | 3.72 \pm 0.23 $\#$ | 6.23 \pm 1.86 $\#$ | 1.74 \pm 0.66 Δ |
| | 白藜芦醇低剂量组 | 7.03 \pm 2.75 $\#$ | 2.87 \pm 1.57 | 3.19 \pm 1.74 | 6.49 \pm 0.77 Δ | 2.05 \pm 0.54 $\#$ |
| | 白藜芦醇高剂量组 | 6.93 \pm 2.16 $\#$ | 2.63 \pm 1.22 | 2.86 \pm 2.35 | 6.07 \pm 1.21 $\#$ | 1.43 \pm 0.51 Δ |
| 12 | 对照组 | 3.17 \pm 0.21 | 1.65 \pm 0.23 | 3.57 \pm 0.22 | 4.35 \pm 0.76 | 0.91 \pm 0.34 |
| | 模型组 | 10.03 \pm 2.46* | 4.37 \pm 0.66* | 2.46 \pm 0.87 | 8.81 \pm 1.22* | 3.75 \pm 0.55* |
| | 辛伐他汀组 | 7.55 \pm 2.79 Δ | 3.16 \pm 1.85 $\#$ | 3.13 \pm 0.71 | 6.46 \pm 2.34 Δ | 2.24 \pm 1.17 $\#$ |
| | 白藜芦醇低剂量组 | 7.93 \pm 2.07 $\#$ | 3.31 \pm 2.13 $\#$ | 3.22 \pm 0.87 | 6.85 \pm 1.88 $\#$ | 2.34 \pm 0.56 $\#$ |
| | 白藜芦醇高剂量组 | 7.45 \pm 2.17 Δ | 3.23 \pm 1.61 $\#$ | 3.07 \pm 0.65 | 6.31 \pm 1.21 $\#$ | 2.19 \pm 0.81 $\#$ |

*: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, Δ : $P < 0.01$, 与模型组比较



A: 对照组; B: 模型组; C: 辛伐他汀组; D: 白藜芦醇低剂量组; E: 白藜芦醇高剂量组

图 1 白藜芦醇对高脂血症小鼠动脉内膜组织病理学的影响



A: 对照组; B: 模型组; C: 辛伐他汀组; D: 白藜芦醇低剂量组; E: 白藜芦醇高剂量组

图 2 各组小鼠动脉内壁厚度的影响

表 2 白藜芦醇对高脂血症小鼠动脉内斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

| 组别 | 斑块面积(μm^2) | 凋亡指数(%) |
|----------|-------------------------|---------------|
| 对照组 | 0 | 0 |
| 模型组 | 314.55 ± 79.24* | 39.88 ± 5.97* |
| 辛伐他汀组 | 97.08 ± 44.76# | 29.87 ± 3.46# |
| 白藜芦醇低剂量组 | 112.35 ± 46.09# | 30.97 ± 4.01# |
| 白藜芦醇高剂量组 | 87.65 ± 37.99# | 27.69 ± 3.65# |

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与模型组比较

2.2 组织病理学变化 干预 14 周后, 对照组小鼠主动脉结构正常。模型组主动脉内膜增厚, 管腔狭窄, 管腔内可见斑块形成并向管腔内突出, 内膜增厚处可见大量泡沫细胞、胆固醇结晶和炎性细胞排列紊乱, 内皮细胞明显缺损, 弹力板断裂, 厚薄不均。各给药组小鼠的动脉内膜病理情况明显好转, 见图 1。

2.3 油红染色变化 模型组血管内壁增厚, 染色加深, 而各给药组动脉内膜厚度变薄, 染色较淡。模型组主动脉脂质蓄积面积显著多于对照组 ($P < 0.05$)。而各给药组显著少于模型组 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 TUNEL 染色法检测主动脉粥样硬化斑块内细胞凋亡情况 模型组小鼠主动脉管腔内可见大量的红色颗粒 (即凋亡细胞核), 位置、大小与斑块一致。各给药组主动脉管腔中仅见少量红色颗粒。模型组凋亡细胞指数显著高于对照组 ($P < 0.05$)。而各给药组凋亡细胞指数显著低于模型组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.5 氧化应激水平比较 各给药组 MDA、NO 水平显著低于模型组, SOD 和 GSH 水平高于模型组 ($P < 0.05$)。而各给药组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 白藜芦醇对高脂血症小鼠氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

| 组别 | MDA($\mu\text{mol/L}$) | NO($\mu\text{mol/L}$) | SOD(kU/L) | GSH(mg/L) |
|----------|--------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| 对照组 | 28.74 ± 2.33 | 70.93 ± 12.51 | 27.14 ± 3.46 | 14.22 ± 1.98 |
| 模型组 | 56.76 ± 3.57* | 90.75 ± 9.74* | 15.78 ± 3.51* | 8.08 ± 1.45* |
| 辛伐他汀组 | 36.58 ± 2.93# | 65.66 ± 8.17# | 21.68 ± 2.83# | 10.97 ± 2.46# |
| 白藜芦醇低剂量组 | 39.14 ± 2.76# | 76.74 ± 8.54# | 20.57 ± 4.47# | 11.36 ± 2.47# |
| 白藜芦醇高剂量组 | 35.54 ± 2.88# | 67.45 ± 7.83# | 23.55 ± 4.21# | 12.55 ± 2.66# |

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与模型组比较

表 4 白藜芦醇对高脂血症小鼠炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

| 组别 | TNF- α ($\mu\text{mol/L}$) | IL-1($\mu\text{mol/L}$) | IL-6(kU/L) |
|----------|-------------------------------------|---------------------------|---------------|
| 对照组 | 35.09 ± 4.57 | 47.57 ± 3.46 | 16.07 ± 3.55 |
| 模型组 | 97.22 ± 10.95* | 247.32 ± 14.68* | 57.71 ± 6.09* |
| 辛伐他汀组 | 47.86 ± 6.51# | 97.83 ± 9.11# | 24.57 ± 2.92# |
| 白藜芦醇低剂量组 | 46.23 ± 7.08# | 109.24 ± 11.33# | 27.44 ± 2.79# |
| 白藜芦醇高剂量组 | 39.07 ± 4.17# | 79.43 ± 8.09# | 20.15 ± 4.93# |

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与模型组比较

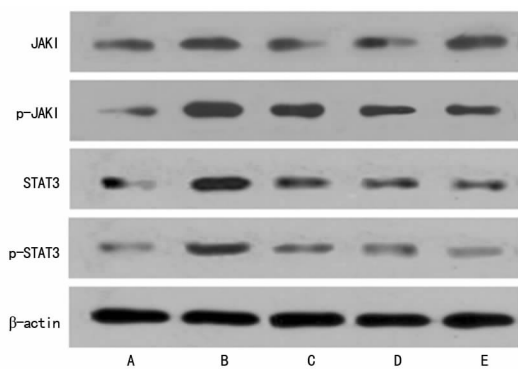
2.6 TNF- α 、IL-1、IL-6 的表达水平比较 各给药组 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$), 且尤以白藜芦醇高剂量组降低最明显, 结果见表 4。

2.7 JAK1、p-JAK1、STAT3 及 p-STAT3 蛋白的表达 白藜芦醇高、低剂量组 p-JAK1 及 p-STAT3 蛋白显著低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3 及表 5。

表 5 白藜芦醇对高脂血症小鼠 STAT3 信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

| 组别 | JAK1 | p-JAK1 | STAT3 | p-STAT3 |
|----------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| 对照组 | 0.157±0.023 | 0.097±0.017 | 0.133±0.045 | 0.139±0.034 |
| 模型组 | 0.188±0.042 | 0.348±0.055* | 0.165±0.037 | 0.394±0.055* |
| 辛伐他汀组 | 0.176±0.028 | 0.323±0.034# | 0.139±0.041 | 0.328±0.035# |
| 白藜芦醇低剂量组 | 0.217±0.033 | 0.226±0.028# | 0.176±0.018 | 0.231±0.042# |
| 白藜芦醇高剂量组 | 0.175±0.018 | 0.182±0.019# | 0.178±0.026 | 0.191±0.025# |

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与模型组比较



A: 对照组; B: 模型组; C: 辛伐他汀组; D: 白藜芦醇低剂量组; E: 白藜芦醇高剂量组

图 3 各组 JAK1、p-JAK1、STAT3 及 p-STAT3 蛋白的表达

3 讨论

白藜芦醇提取自中药虎杖中的一类多酚类物质, 药理学研究证实, 其具有调节脂质代谢、抗炎、抗氧化及抗血管平滑肌细胞增殖的作用。ApoE^{-/-}小鼠是基因敲除小鼠, 通过高脂饲料饮食, 可复制出 AS 小鼠模型, 与人类 AS 的病理极为相似^[6]。本研究显示, 给予高脂饲料饮食后, 模型组小鼠 TC、TG、LDL-C、AI 水平逐渐升高, 组织病理学观察及 TUNEL 染色法均可见动脉内膜粥样斑块形成, 提示 AS 小鼠模型复制成功。而给予白藜芦醇治疗后, 小鼠的血脂水平显著下降, 动脉内膜病理情况及主动脉脂质蓄积面积均显著好转, 提示白藜芦醇可显著降低 AS 小鼠的血脂水平, 减轻 AS 病变程度, 降低斑块面积, 延缓 AS 病变进程。

研究^[7-8]发现氧化应激反应参与了 AS 的病变过程。当患者发生 AS 的早期, 动脉内膜发生局部氧化及抗氧化酶活性的改变, 动脉内膜的氧化应激反应产生大量的氧自由基, 攻击动脉内皮细胞, 加重内膜的炎性损伤, 加速 AS 的病变进程。MDA 是细胞被自由基攻击后的最终产物, 其水平在一定程度上反映了氧自由基的代谢状况及组织被自由基攻击的氧化程度^[9]。NO 是由内皮细胞产生的一种氧自由基, 正常情况下可对内皮细胞产生保护作用, 而在 AS 过程中, NO 可发生过量表达, 引起血管内皮功能障碍, 损伤动脉内膜系统^[10]。GSH 和 SOD 是机体自由基的主要

清除系统, 维持着人体氧化系统与还原系统的动态平衡, 当 AS 病变过程中, 机体的自由基增多, GSH 和 SOD 可被大量消耗。本研究结果显示, 模型组小鼠 MDA、NO 水平显著高于对照组, 总 SOD 活性和 GSH 水平显著低于正常组。提示 AS 病变进程中存在着活跃的氧化应激反应, 促进了 AS 的进程。而给予药物治疗后, MDA 和 NO 水平显著降低, 总 SOD 活性和 GSH 含量显著增高。说明白藜芦醇可显著改善一定程度上抑制了机体的氧化应激水平, 提高血管内皮的抗氧化能力, 延缓 AS 病变进程, 疗效与辛伐他汀相当。

IL-6/STAT3 信号通路参与了 AS 的进程^[11]。研究显示^[12], 在 AS 病变中, 内皮细胞受损, 导致血管内皮细胞等多种细胞分泌炎性因子, 促进 AS 的发生发展。IL-6 作为急性期炎性反应的诱导因子, 促进 STAT3 的磷酸化并转移至细胞核内, 促进其下游 TNF- α 、IL-6 等多种炎症因子的激活, 介导并促进细胞的炎性损伤。同时, TNF- α 还可调节巨噬细胞对 IL-6 的分泌, IL-1 亦可促进成纤维细胞合成和分泌 IL-6, 上述信号分子共同参与了血管内皮细胞的炎性损伤进程, 加速了 AS 的病变。本研究结果显示, 在 AS 过程中, 机体的 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 水平上调, JAK/STAT3 信号被激活, 启动相关炎性因子的表达, 促进 AS 的发展。而给予白藜芦醇治疗后, 各项指标均显著改善, 说明白藜芦醇可能通过抑制 JAK1/STAT3 通路减轻 ApoE^{-/-} 小鼠动脉血管内的氧化应激及炎性损伤。

参考文献

- [1] 卢克红, 潘旭东, 马爱军, 等. 半乳糖凝集素-3 与脑动脉粥样硬化广泛程度及大动脉粥样硬化型卒中中预后的关系[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(7): 531-535.
- [2] 常琦, 金萍, 张晓玲, 等. 动脉粥样硬化早期干预与预防冠心病中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 12(9): 2367-2369.
- [3] 李佳军, 韩金良, 田玉顺. 白藜芦醇及其衍生物药理作用的研究现状[J]. 药学研究, 2017, 36(3): 161-163.
- [4] 胡洵, 庄晓东, 周莹. 白藜芦醇对过氧化氢诱导人动脉平滑肌细胞的影响及其机制[J]. 广州医学院(下转第 2912 页)

MLC 水平明显增高,而 MC 组较模型组 p-MLC 有明显下降趋势,且细胞存活率、GAP-43 的表达及轴突长度测定较模型组均有明显增高,说明米诺环素可能通过调节 MLCP/MLC 信号通路,调节细胞内 MLC 的磷酸化水平,进而缓解氧糖剥夺/复氧对 PC12 细胞的损伤作用并促进轴突再生。模型组较 MC 组 p-MLC 表达明显增高,GAP-43 表达明显减少,且神经突长度明显缩短,说明 Calyculin A 可能阻断了米诺环素与 MLCP/MLC 信号通路的相互作用。因此,笔者认为 MLCP/MLC 信号通路可能与米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤后神经轴突再生密切相关。

综上所述,本研究发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 米诺环素对 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤具有保护作用,可明显提高损伤细胞的存活率,显著促进缺血缺氧/复氧之后神经突的生长,其机制可能为米诺环素促进受损的 PC12 细胞中 MLCP/MLC 信号通路激活,使得 MLC 磷酸化水平降低,同时促进 GAP-43 表达增加,进而促进轴突再生及突触网络的重建。本研究发现,米诺环素对氧糖剥夺/复氧损伤的 PC12 细胞神经突生长的促进作用与 MLCP/MLC 信号通路的激活密切相关,揭示了米诺环素促进 PC12 细胞神经突生长潜在的细胞和分子机制,为将来的临床应用提供了理论基础。未来的研究可进一步探索 MLCP/MLC 信号通路激活靶点,为新型药物的研究提供理论依据。

参考文献

- [1] TAO T, XU G H, SI C C, et al. Minocycline promotes axonal regeneration through suppression of RGMA in rat MCAO/reperfusion model[J]. *Synapse*, 2013, 67(4): 189-198.
- [2] LAMPL Y, BOAZ M, GILAD R, et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study[J]. *Neurology*, 2007, 69(14): 1404-1410.
- [3] 陶涛,秦新月,冯金洲,等. 米诺环素对 PC12 细胞缺氧缺糖损伤后神经突生长的影响[J]. *重庆医学*, 2015, 44(5): 605-607.
- [4] WALSH M P, COLE W C. The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries[J]. *J Cereb Blood Flow Metabolism*, 2013, 33(1): 1-12.
- [5] 陶涛,秦新月,马勋泰,等. ERK1/2 通路介导米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺后血红素加氧酶-1 的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(1): 117-120.
- [6] HAHN J N, KAUSHIK D K, MISHRA M K, et al. Impact of minocycline on extracellular matrix metalloproteinase inducer, a factor implicated in multiple sclerosis immunopathogenesis[J]. *J Immunol*, 2016, 197(10): 3850-3860.
- [7] PLANE J M, SHEN Y, PLEASURE D E, et al. Prospects for minocycline neuroprotection[J]. *Arch Neurol*, 2010, 67(12): 1442-1448.
- [8] SONG Y, WEI E Q, ZHANG W P, et al. Minocycline protects PC12 cells from ischemic-like injury and inhibits 5-lipoxygenase activation[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(14): 2181-2184.
- [9] CHEN X, CHEN S, JIANG Y, et al. Minocycline reduces oxygen-glucose deprivation-induced PC12 cell cytotoxicity via matrix metalloproteinase-9, integrin $\beta 1$ and phosphorylated Akt modulation[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(8): 1391-1396.
- [10] FUJITA A, HATTORI Y, TAKEUCHI T, et al. NGF induces neurite outgrowth via a decrease in phosphorylation of myosin light chain in PC12 cells [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(16): 3599-3602.
- [11] AIGNER L, ARBER S, KAPFFHAMMER J P, et al. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice[J]. *Cell*, 1995, 83(2): 269-278.
- [12] HONER W G, FALKAI P, CHEN C, et al. Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(4): 1247-1255.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-05-08)

(上接第 2908 页)

- 学报, 2013, 41(4): 1-4.
- [5] 秦丽,关莉,林锐珊,等. 白藜芦醇通过调节 iNOS 抑制 C57BL/6J 小鼠动脉粥样硬化的机制探讨[J]. *中国病理生理杂志*, 2015(9): 1601-1605.
 - [6] 张彦,马双陶,杨永健. 糖尿病合并动脉粥样硬化小鼠模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(2): 186-189.
 - [7] 刘季晨. 血清淀粉样 P 物质对巨噬细胞炎症反应以及氧化应激的影响及机制[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
 - [8] 刘应柯,张玉峰,刘尚岭,等. 脂脉宁对动脉粥样硬化家兔氧化应激反应及 LDL-R, VCAM-1 基因表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 214-217.
 - [9] 徐能全,邱启祥,周小龙,等. 下丘脑-垂体轴反馈调节方式对内皮细胞 MDA 代谢和 NOS 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(8): 742-743, 751.
 - [10] 赵彦,赵美丽,林爱翠,等. 长收缩运动对动脉粥样硬化兔血管内皮生长因子与一氧化氮的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2016, 38(10): 726-729.
 - [11] 赵洪宇,蒋梦会,曹久妹,等. IL-6/STAT3 通路对 THP-1 单核细胞环氧化酶 2 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(3): 251-255, 260.
 - [12] 姜红菊,李润智,杜修文,等. 宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠炎症因子和 As 斑块的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(12): 1214-1218.

(收稿日期:2018-01-11 修回日期:2018-05-25)