

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.02.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221108.1719.006.html\(2022-11-09\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221108.1719.006.html(2022-11-09))

## $\beta$ -细辛醚对氧糖剥夺/复糖复氧诱导星形胶质细胞损伤的保护作用及机制研究\*

卢志刚, 卢青, 丁运宇, 高志远

(湖北民族大学附属荆门市第一人民医院神经内科, 湖北荆门 448000)

**[摘要]** **目的** 探讨石菖蒲有效成分  $\beta$ -细辛醚对氧糖剥夺/复糖复氧损伤星形胶质细胞的保护作用及机制。**方法** 将星形胶质细胞分为 5 组: 对照组、模型组、 $\beta$ -细辛醚 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组、核因子-E2 相关因子 2 (Nrf2) 抑制剂 (ML385, 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组、 $\beta$ -细辛醚 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + ML385 (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组。CCK-8 检测细胞存活率, 流式细胞术测定细胞凋亡水平, 以 DCFH-DA 法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平, 试剂盒检测细胞氧化应激因子 [谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 及超氧化物歧化酶 (SOD)] 及炎症因子 [核因子- $\kappa\text{B}$  亚基 p65 (NF- $\kappa\text{B}$  p65)、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  和 IL-18] 的水平, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 Nrf2、血红素氧化酶-1 (HO-1) mRNA 的表达水平, Western blot 检测 Nrf2、醌氧化还原酶-1 (NQO-1)、HO-1 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组、ML385 组及  $\beta$ -细辛醚 + ML385 组细胞凋亡率、LDH、ROS、MDA、NF- $\kappa\text{B}$  p56、IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平明显升高, 细胞存活率、Nrf2、NQO-1、HO-1、SOD、GSH-Px 明显下降 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚 + ML385 组细胞凋亡率、LDH、ROS、MDA、NF- $\kappa\text{B}$  p56、IL-1 $\beta$  和 IL-18 明显下降, Nrf2、NQO-1、HO-1、SOD、GSH-Px 明显升高, ML385 组上述指标则相反 ( $P < 0.05$ )。与 ML385 组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚 + ML385 组细胞存活率、Nrf2、NQO-1、HO-1、SOD、GSH-Px 明显下降, Nrf2、NQO-1、HO-1、SOD、GSH-Px 明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论**  $\beta$ -细辛醚可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧诱导的星形胶质细胞氧化应激及炎症损伤以起到保护作用。

**[关键词]**  $\beta$ -细辛醚; 脑缺血再灌注损伤; 氧化应激; 炎症反应; 星形胶质细胞**[中图分类号]** R285**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)02-0161-06

## Protection effect and mechanism of $\beta$ -asarone on astrocyte injury induced by oxygen/glucose deprivation and reintroduction\*

LU Zhigang, LU Qing, DING Yunyu, GAO Zhiyuan

(Department of Neurology, Affiliated Jingmen Municipal First People's Hospital, Hubei Minzu University, Jingmen, Hubei 448000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of  $\beta$ -asarone, the effective component of acorus tatarinowii, on the astrocytes damaged by oxygen and glucose deprivation and reoxygenation. **Methods** The astrocytes were divided into the five groups: the control group, model group,  $\beta$ -asarone (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) group, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor (ML385, 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) group, and  $\beta$ -asarone (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + ML385 (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) group. The cell survival rate was detected by CCK-8, the cell apoptosis level was determined by flow cytometry, and the intracellular reactive oxygen species (ROS) level was detected by DCFH-DA method. The levels of oxidative stress factors [glutathione peroxidase (GSH-PX), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD)] and inflammatory factors [nuclear factor  $\kappa\text{B}$  subunit p65 (NF- $\kappa\text{B}$  p65), interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18] were detected by the kit, the real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of Nrf2 and heme oxidase-1 (HO-1), and Western blot was used to detect the protein expressions of Nrf2, quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) and HO-1. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate, LDH, ROS, MDA, NF- $\kappa\text{B}$  P56, IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in the model group, ML385 group and  $\beta$ -asarone + ML385 group were significantly increased, while the cell survival rate, Nrf2, NQO-1, HO-1, SOD and GSH-Px were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the apoptosis rate, LDH, ROS, MDA, NF- $\kappa\text{B}$  p65, IL-1 $\beta$  and IL-18 in

\* 基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目(2020CFB722); 湖北省卫生健康委员会面上项目(WJ2021M075); 湖北省荆门市科技计划重点项目(2022YFZD021)。 作者简介: 卢志刚(1975-), 主任医师, 硕士生导师, 博士, 主要从事脑血管病基础与临床研究。

the  $\beta$ -asarone group and  $\beta$ -asarone + ML385 group were significantly decreased, while Nrf2, NQO-1, HO-1, SOD and GSH-Px were significantly increased, while the ML385 group had the opposite effect ( $P < 0.05$ ). Compared with the ML385 group, the cell survival rate, LDH, ROS, MDA, NF- $\kappa$ B p56, IL-1 $\beta$  and IL-18 in the  $\beta$ -asarone group and  $\beta$ -asarone + ML385 group were significantly decreased, while Nrf2, NQO-1, HO-1, SOD and GSH-Px were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**  $\beta$ -asarone may play a protective role on astrocyte injury by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway to reduce oxidative stress and inflammatory injury induced by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation.

**[Key words]**  $\beta$ -asarone; cerebral ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; inflammatory response; astrocyte

脑血管病已成为危害健康的重要疾病,具有较高的发生率、复发率、致残率和死亡率。约 85% 的脑卒中是由大脑动脉闭塞引起的缺血性脑卒中<sup>[1]</sup>。缺血性卒中导致了大脑缺血区域的细胞功能障碍及细胞死亡。通过再灌注恢复血液供应可以挽救缺血组织,但再灌注本身会造成组织损伤,称为脑缺血再灌注损伤(CIRI)<sup>[2]</sup>。缺血卒中区域的再灌注和血供的恢复往往会导致一系列的细胞生化后果,CIRI 的病理机制包括过度活性氧(ROS)的产生、细胞氧化损伤、炎症级联反应的激活及再灌注组织中细胞凋亡的诱导<sup>[3-4]</sup>。目前,静脉注射重组组织型纤溶酶原激活剂(rtPA)和血管内治疗已被广泛应用于临床,并已证明可降低致残风险<sup>[5]</sup>。然而,这些治疗方法可能在加重神经元死亡的同时也加重神经功能障碍<sup>[6]</sup>。探索脑损伤的机制,寻找减轻 CIRI 的药物已成为脑缺血治疗的重点。中药在这方面发挥着独特的作用,主要体现在抗氧化和病理损伤、减少兴奋性氨基酸的神经毒素、清除自由基、减少钙超载、影响血小板和血栓形成、调节凋亡等<sup>[7]</sup>。

石菖蒲的有效活性物质  $\beta$ -细辛醚能有效改善 CIRI,与抑制炎症反应、减轻氧化应激、改善能量代谢、降低细胞兴奋性毒性及保护血脑屏障等作用机制关系密切<sup>[8]</sup>。然而, $\beta$ -细辛醚的作用机制尚未完全阐明。星形胶质细胞介导的炎症和氧化应激在急性缺血性脑卒中后引起了 CIRI<sup>[9]</sup>。本实验采用星形胶质细胞氧糖剥夺(OGD)/复氧复糖(R)损伤模拟构建 CIRI 体外模型,观察  $\beta$ -细辛醚对星形胶质细胞的神经保护作用,为进一步探讨 CIRI 的机制和脑保护机制提供有价值的思路,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

6~8 周龄的 15 只雄性 C57BL/6 小鼠,体重 20~30 g,购自华中科技大学实验动物中心(SCXK2016-2009)。

#### 1.1.2 主要药品与试剂

$\beta$ -细辛醚对照品(美国 Sigma 公司,纯度 > 98%,货号:5273-86-9)。胎牛血清、DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 10099、p002548)。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京

建成生物工程研究所有限公司,批号分别为 A005-1-2、A020-1-2、A003-1-2、A001-3-2)。小鼠核因子- $\kappa$ B 亚基 p65 (NF- $\kappa$ B p65)、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-18 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为 E-EL-M0838c、E-EL-M0037c、E-EL-M0730c)。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂、cDNA 合成试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号分别为 11781200、20190607)。Nrf2 多克隆抗体、醌氧化还原酶 1(NQO1)多克隆抗体、血红素氧化酶-1(HO-1)多克隆抗体、GAPDH 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、Nrf2 抑制剂 N-{4-[2,3-二氢-1-(2'-甲基苯甲酰)-1H-吡啶-5-基]-5-甲基-2-噻唑基}-1,3-苯并二氧唑-5-乙酰胺(ML385)、活性氧荧光探针(DCFH-DA)试剂盒、CCK-8 试剂盒(美国 Sigma 公司,批号分别为 PA5-27882、PA5-115666、PA5-77834、PA5-116420、MA5-15367、SML1833、BL714A、7010000)。膜联蛋白(Annexin)V-PE/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号 CA1120)。

### 1.1.3 主要仪器

Forma371 型细胞培养箱、ABI StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);iMark 全自动酶标仪(美国 Bio-RAD 公司);WD-9413B 型凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司);JY92-IIN 超声波细胞破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);CKX31SF 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 星形胶质细胞的分离培养<sup>[10]</sup>

取出乳鼠-20℃冰冻麻醉,75%乙醇消毒,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后分离脑组织,加入 DMEM 培养基洗涤,分离出大脑皮质,剪碎后胰蛋白酶消化,孵育过筛,加入 D-Hanks 液洗涤离心,弃上清液得细胞团。与培养液混合后,接种到包被多聚赖氨酸后的细胞培养板中,种板后换液继续培养。14 d 后摇床下分离出星形胶质细胞,经 GFAP 免疫荧光鉴定确认。

### 1.2.2 OGD/R 体外模型的建立<sup>[11]</sup>及分组处理

将星形胶质细胞分为 5 组:对照组、模型组、 $\beta$ -细辛醚(50  $\mu$ g/mL)组、ML385(5  $\mu$ mol/L)组、 $\beta$ -细辛醚(50  $\mu$ g/mL)+ML385(5  $\mu$ mol/L)组。OGD/R 体外

模型的构建:纯化后的原代星形胶质细胞在正常培养条件下,种板培养融合率在 80% 时去除原培养基, PBS 洗涤细胞 3 次,换成无血清无糖培养液,在含 95% 氮气及 5% 二氧化碳的培养箱内 37 °C 培养 6 h,随后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。 $\beta$ -细辛醚组、ML385 组、 $\beta$ -细辛醚 + ML385 组分别加入 50  $\mu$ mol/L  $\beta$ -细辛醚、5  $\mu$ mol/L ML385 及 50  $\mu$ mol/L  $\beta$ -细辛醚 + 5  $\mu$ mol/L ML385,放在含 5% 二氧化碳及 95% 空气的培养箱内 37 °C 培养 24 h。对照组一直在含糖含氧环境中培养,模型组仅予以 OGD 6 h/R 24 h 处理。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞存活率

5 组细胞按照 1.2.2 方法处理后接种到 96 孔板内,每孔内加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,在 37 °C、5% 二氧化碳的培养箱内继续孵育 1 h,未接种细胞的孔为空白调零孔,采用全自动酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率 = 实验组 A 值/空白组 A 值  $\times$  100%。

1.2.4 二硝基苯肼法检测 LDH 漏出率

5 组细胞按照 1.2.2 方法处理后,分别收集各组细胞及其上清液,细胞被超声破碎为匀浆,按照 LDH 检测试剂盒严格检测上清液和细胞匀浆中 LDH 的 A 值,计算 LDH 漏出率。漏出率 = 上清液中 A 值 / (上清液 LDH A 值 + 细胞匀浆中 LDH A 值)  $\times$  100%。

1.2.5 流式细胞术<sup>[12]</sup>测定细胞凋亡水平

5 组细胞按照 1.2.2 方法处理后,用冷 PBS 清洗处理过的细胞,加入胰酶室温消化,取细胞悬浮液 4 °C 离心,弃上清液后收集细胞。细胞 PBS 重悬后再次离心弃上清液,加入缓冲液悬浮细胞后严格按照试剂盒步骤加入 2  $\mu$ L Annexin-V 抗体及 2  $\mu$ L 7-AAD 染料进行染色,然后采用流式细胞仪进行检测。

1.2.6 星形胶质细胞氧化应激水平的检测

1.2.6.1 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)法检测 ROS 的表达

严格按试剂盒说明书要求操作。细胞于无血清培养基稀释 DCFH-DA 至终浓度为 10  $\mu$ mol/L,吸走培养基,加入 DCFH-DA 至终浓度为 10  $\mu$ mol/L,37 °C 培养箱内孵育 20 min,用无血清培养基洗涤细胞,胰酶消化,离心后重悬细胞,流式细胞术检测其荧光强度。对照组作为参照(荧光强度为 100%),其余 4 组与之比较代表其相对 ROS 的活性。

1.2.6.2 生化法检测上清液中氧化应激水平

细胞按 1.2.2 方法处理以后,收集经胰蛋白酶消化后的各组细胞,在冰上超声裂解,离心后取上清液。按照试剂盒步骤硫代巴比妥酸法检测 MDA,黄嘌呤氧化酶法检测 SOD,分光光度法检测 GSH-Px。

1.2.7 ELISA 检测上清液中的炎症因子

细胞处理同 1.2.6.2 方法,采用 ELISA 试剂盒按说明书步骤检测上清液中 NF- $\kappa$ B p56、IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平。

1.2.8 RT-qPCR 检测 Nrf2、HO-1 mRNA 的表达水平

取各组细胞,采用 TRizol 法提取细胞内总 RNA,超微量分光光度计检测 RNA 浓度后置于 -80 °C 冰箱保存。逆转录合成 cDNA,以其为模板,GAPDH 管家基因作为内参,然后进行实时荧光定量 PCR 扩增。反应体系:SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ L,正向引物及反向引物各 0.5  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,补足 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20  $\mu$ L。反应条件:95 °C 预变性 45 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 40 次。循环结束后以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。PCR 引物序列和产物长度见表 1。

表 1 PCR 引物序列和产物长度

基因	引物序列	产物长度(bp)
Nrf2	上游引物:5'-CTT GGC CTC AGT GAT TCT GAA GAA GTG-3'	124
	下游引物:5'-CCT GAG ATG GTG ACA AGG GTT GTA-3'	
HO-1	上游引物:5'-GCA ACC CGA CAG CAT GC-3'	249
	下游引物:5'-TGC GGT GCA GCT CTT CTG-3'	
GAPDH	上游引物:5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3'	247
	下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	

1.2.9 Western blot<sup>[13]</sup>检测 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达水平

取对数生长期的星形胶质细胞,按 1.2.2 方法分组及处理,每组分别设立 3 个复孔。培养结束,收集经胰蛋白酶消化后的各组细胞,超声细胞破碎仪冰上粉碎后 4 °C 离心,取上清液即获得细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,制备蛋白样品,根据蛋白浓度调整上样量。蛋白样品 95 °C 沸水高温变性后,加至 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-

PAGE)胶加样孔内,60 V 恒压浓缩胶电泳,75 V、90 min 恒压分离胶电泳,250 mA 3 h 恒定电流进行转膜,TBST 洗膜后室温下以 5% 脱脂奶粉中摇床上封闭 1 h,取膜加入 Nrf2、NQO-1、HO-1 一抗稀释液与内参 GAPDH 抗体稀释液(稀释度分别为 1 : 1 000、1 : 800、1 : 1 000、1 : 2 000),4 °C 孵育过夜;次日以 TBST 溶液清洗 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (HRP) 二抗(稀释度为 1 : 3 000),室温下摇床孵育 1 h;以 TBST 洗膜 3 次,每

次 10 min, 避光, 采用 ECL 显色后凝胶成像系统曝光显影定影成像。采用 Image J 软件分析, 以目的蛋白/内参蛋白灰度值之间的比值表示相关蛋白的表达水平。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析, 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, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\beta$ -细辛醚对 OGD/R 诱导的星形胶质细胞存活率和凋亡率的影响

与对照组比较, 模型组、ML385 组、 $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组细胞存活率明显下降, 细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组细胞存活率明显升高, 细胞凋亡率明显下降, ML385 组则相反 ( $P < 0.05$ )。与 ML385 组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组细胞存活率明显升高, 细胞凋亡率明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见表 2、图 1。

### 2.2 $\beta$ -细辛醚对 OGD/R 诱导的星形胶质细胞氧化

应激水平的影响

与对照组比较, 模型组、ML385 组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 LDH 漏出率、MDA、ROS 荧光强度明显升高, SOD、GSH-Px 水平明显下降 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 LDH 漏出率、MDA、ROS 荧光强度明显下降, SOD、GSH-Px 水平明显升高, 而 ML385 组上述指标则相反 ( $P < 0.05$ )。与 ML385 组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 LDH 漏出率、MDA、ROS 荧光强度明显下降, SOD、GSH-Px 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 2 各组脑组织星形胶质细胞存活率及凋亡率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
对照组	99.94±0.07	6.62±0.68
模型组	62.43±4.19 <sup>a</sup>	20.31±1.89 <sup>a</sup>
ML385 组	50.81±5.37 <sup>ab</sup>	31.86±2.84 <sup>ab</sup>
$\beta$ -细辛醚组	82.43±6.62 <sup>abc</sup>	10.83±2.19 <sup>abc</sup>
$\beta$ -细辛醚+ML385 组	72.12±5.25 <sup>abc</sup>	15.43±1.26 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ML385 组比较。

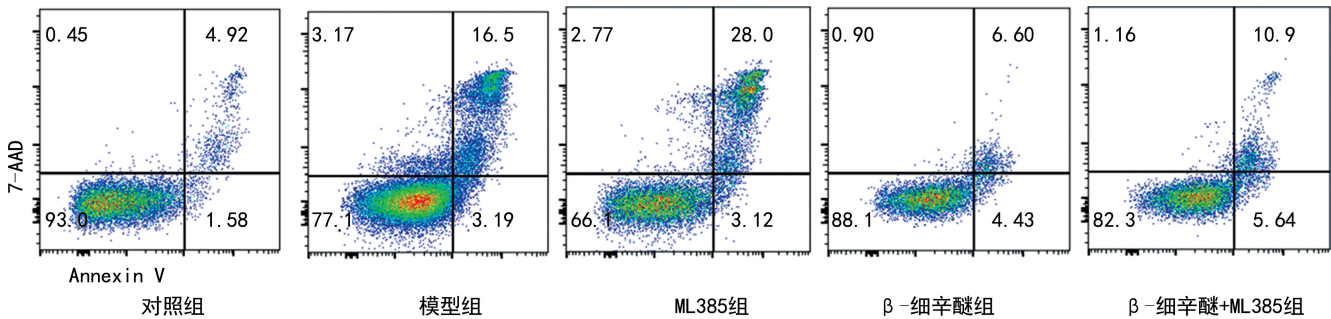


图 1 各组星形胶质细胞 Annexin V/7-AAD 双染法细胞凋亡图

表 3 各组脑组织星形胶质细胞氧化应激水平比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	LDH 漏出率 (%)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)	ROS 荧光强度 (%)
对照组	6.06±0.63	135.99±4.60	86.11±5.97	7.02±1.49	4.24±2.04
模型组	20.06±1.21 <sup>a</sup>	91.83±4.02 <sup>a</sup>	52.87±7.29 <sup>a</sup>	17.55±1.39 <sup>a</sup>	20.14±2.68 <sup>a</sup>
ML385 组	23.68±1.13 <sup>a</sup>	76.30±5.96 <sup>ab</sup>	41.78±2.73 <sup>ab</sup>	21.26±2.35 <sup>ab</sup>	27.72±4.38 <sup>ab</sup>
$\beta$ -细辛醚组	9.24±1.57 <sup>bc</sup>	112.87±9.29 <sup>abc</sup>	75.49±5.03 <sup>abc</sup>	10.85±1.35 <sup>abc</sup>	10.04±1.83 <sup>abc</sup>
$\beta$ -细辛醚+ML385 组	13.12±1.92 <sup>abc</sup>	101.63±5.05 <sup>abc</sup>	64.64±6.09 <sup>abc</sup>	14.73±2.10 <sup>abc</sup>	13.39±3.08 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ML385 组比较。

### 2.3 $\beta$ -细辛醚对 OGD/R 诱导的星形胶质细胞炎症因子水平的影响

与对照组比较, 模型组、ML385 组、 $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平明显下降 ( $P < 0.05$ ), 而 ML385 组上述指标则相反 ( $P < 0.05$ )。与 ML385 组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

### 2.4 $\beta$ -细辛醚对 OGD/R 诱导的星形胶质细胞中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达的影响

与对照组比较, 模型组、ML385 组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达明显升高, 而 ML385 组上述指标则相反 ( $P < 0.05$ )。与 ML385 组比较,  $\beta$ -细辛醚组及  $\beta$ -细辛醚+ML385 组的 Nrf2、HO-1 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。

### 2.5 $\beta$ -细辛醚对 OGD/R 诱导的星形胶质细胞

Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组、ML385组及β-细辛醚+ML385组 Nrf2、NQO-1、HO-1 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ )。与模型组比较,ML385组、β-细辛醚组及β-细辛醚+ML385组 Nrf2、NQO-1、HO-1 蛋白表达明显升高,而 ML385组上述指标则相反( $P < 0.05$ )。与 ML385组比较,β-细辛醚组及β-细辛醚+ML385组 Nrf2、NQO-1、HO-1 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ),见表6、图2。

表4 各组脑组织星形胶质细胞炎症因子水平比较( $n=3, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	NF-κB p65	IL-1β	IL-18
对照组	2.30±1.15	58.66±4.04	41.37±5.51
模型组	10.70±1.01 <sup>a</sup>	147.00±8.66 <sup>a</sup>	127.67±6.64 <sup>a</sup>
ML385组	14.60±0.85 <sup>ab</sup>	220.67±6.65 <sup>ab</sup>	203.35±5.69 <sup>ab</sup>
β-细辛醚组	4.40±0.62 <sup>abc</sup>	84.32±5.03 <sup>abc</sup>	64.67±5.13 <sup>abc</sup>
β-细辛醚+ML385组	7.93±1.32 <sup>abc</sup>	120.67±6.11 <sup>abc</sup>	106.00±5.29 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与ML385组比较。

表5 各组脑组织星形胶质细胞 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达水平的检测结果( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.39±0.03 <sup>a</sup>	0.43±0.04 <sup>a</sup>
ML385组	0.31±0.04 <sup>a</sup>	0.37±0.01 <sup>a</sup>
β-细辛醚组	0.89±0.02 <sup>bc</sup>	0.86±0.05 <sup>bc</sup>
β-细辛醚+ML385组	0.56±0.05 <sup>abc</sup>	0.56±0.03 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,ML385组比较。

表6 各组脑组织星形胶质细胞相关蛋白表达水平( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	Nrf2	NQO-1	HO-1
对照组	0.95±0.08	1.10±0.02	0.98±0.06
模型组	0.32±0.03 <sup>a</sup>	0.54±0.05 <sup>a</sup>	0.40±0.02 <sup>a</sup>
ML385组	0.25±0.04 <sup>ab</sup>	0.41±0.02 <sup>ab</sup>	0.16±0.03 <sup>ab</sup>
β-细辛醚组	0.82±0.04 <sup>bc</sup>	0.92±0.06 <sup>bc</sup>	0.81±0.03 <sup>bc</sup>
β-细辛醚+ML385组	0.53±0.05 <sup>abc</sup>	0.73±0.06 <sup>abc</sup>	0.64±0.05 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,ML385组比较。

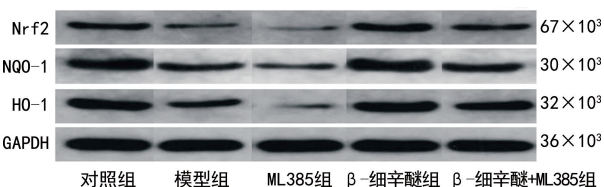


图2 各组星形胶质细胞 Nrf2、NQO-1、HO-1 蛋白表达的电泳图

3 讨论

近年来,缺血性脑卒中的发生率持续上升。缺血性脑卒中血流恢复会加重损伤并引起CIRI。CIRI的

发生与线粒体能量代谢紊乱、兴奋性氨基酸毒性、离子平衡失衡、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡和血脑屏障破坏等有关<sup>[14]</sup>。因此,预防和治疗CIRI是缺血性脑卒中治疗的重点。脑缺血再灌注引起脑损伤,这与脑内的氧自由基密切相关。脑缺血再灌注诱导的LDH释放和MDA积累可以直接反映脑缺血的严重程度和脂质过氧化的程度。SOD和GSH-px是强大的自由基清除因子,可以减少脑缺血再灌注诱导的氧化应激。Nrf2通路是近年来抗氧化研究的重点<sup>[15]</sup>。Nrf2通路通过上调一系列内源性保护基因显示出抗氧化作用<sup>[16]</sup>。HO-1和NQO-1是抵抗氧化应激的两种主要蛋白质<sup>[17]</sup>。HO-1催化胆绿素、胆红素和铁蛋白的形成,从而表现出抗氧化活性。NQO-1通过阻止ROS的产生发挥抗氧化应激作用<sup>[18]</sup>。急性脑缺血再灌注可触发神经炎症,激活先天免疫反应,进而引发一系列炎症级联反应和氧化应激,而炎症反应被认为是CIRI的一个重要的病理生理过程,氧化应激是CIRI的重要发病机制,含NLR家族Pyrin域蛋白3(NLRP3)炎症小体参与炎症级联调控,ROS可诱导NLRP3激活,启动NLRP3/半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)焦亡信号通路,促进通路下游炎症因子凋亡相关点样蛋白(ASC)、caspase-1、IL-1β和IL-18的分泌,在CIRI的发生、发展中扮演了关键的角色<sup>[19-22]</sup>。

β-细辛醚是中药石菖蒲的主要有效成分,具有较强的抗炎效果,药效易透过血脑屏障起到脑保护作用<sup>[23]</sup>。本研究发现,与对照组比较,模型组OGD/R细胞中抗氧化因子Nrf2、HO-1、NQO-1表达和SOD、GSH-Px活性明显下降,氧化应激因子ROS、LDH、MDA和促炎因子NF-κB p65、IL-1β、IL-18水平升高,而β-细辛醚可不同程度地降低OGD/R模型细胞中上述氧化应激因子和炎症因子指标的水平,增加抗氧化因子,说明Nrf2通路在CIRI星形胶质细胞中失活,β-细辛醚重新激活了Nrf2通路并促进了抗氧化因子的表达及活性增加,并降低了氧化应激因子和促炎因子的水平。此外,β-细辛醚通过减少OGD/R诱导的氧化应激来抑制星形胶质细胞的凋亡,提高细胞的存活率,说明β-细辛醚可能通过激活Nrf2通路减轻OGD/R星形胶质细胞氧化应激反应和炎症反应的程度起到神经保护作用。

ML385是一种新型的、特异的Nrf2抑制剂,其能抑制Nrf2的下游靶基因的表达。本研究也发现,与对照组比较,ML385加剧了OGD/R诱导的星形胶质细胞的凋亡率,减少细胞存活率,抑制了Nrf2、HO-1和NQO-1表达,降低了SOD、GSH-Px活性并增加了ROS、LDH、MDA、NF-κB p65、IL-1β、IL-18的水平,而β-细辛醚干预后上述指标得到不同程度的改善。这些结果表明Nrf2被抑制后抗氧化因子明显减少,炎症因子明显增加,细胞凋亡加重,Nrf2在CIRI中发挥重要作用,而通过β-细辛醚的干预可明显改善氧化应激和炎症反应,对OGD/R诱导的星形胶质细胞具

有保护作用。

综上所述,β-细辛醚可能通过激活 Nrf2 通路,清除 ROS 进而进一步激活 Nrf2/HO-1 信号通路,缓解 OGD/R 诱导的星形胶质细胞氧化应激和炎症损伤,减轻神经细胞的凋亡,从而发挥对大脑星形胶质细胞损伤的保护作用,这可能是 β-细辛醚发挥抗 CIRI 药效的物质基础。

## 参考文献

- [1] SUN K, FAN J, HAN J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage[J]. *Acta Pharm Sinica B*, 2015, 5: 8-24.
- [2] NOUR M, SCALZO F, LIEBESKIND D S. Ischemia-reperfusion injury in stroke[J]. *Interv Neurol*, 2012, 1: 185-199.
- [3] BAI J, LYDEN P D. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema[J]. *Int J Stroke*, 2015, 10: 143-152.
- [4] STOLL G, NIESWANDT B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke-implications for treatment[J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15: 473-481.
- [5] JENNIFER E F, ALEJANDRO A R. Absolute and relative contraindications to IV rt-PA for acute ischemic stroke [J]. *Neurohospitalist*, 2015, 5(3): 110-121.
- [6] WANG J, SUN J, YANG F. The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer[J]. *Oncol Let*, 2020, 19(1): 7-16.
- [7] 徐飞飞, 李钦青, 楚世峰, 等. 石菖蒲挥发油中主要成分 α-和 β-细辛醚的神经药理学作用及机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(11): 1969-1979.
- [8] LIANG Q, YANG J, HE J, et al. Stigmasterol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammation and improving antioxidant defenses in rats[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(4): BSR20192133.
- [9] LIU H, WU X, LUO J, et al. Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF-κB phosphorylation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2408.
- [10] SUN Y, YANG J, HU X, et al. Lanthanum chloride reduces lactate production in primary culture rat cortical astrocytes and suppresses primary co-culture rat cortical astrocyte-neuron lactate transport[J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(4): 1407-1419.
- [11] JIANG Y, LEI Z, YAN P S, et al. SH2B1 protects against OGD/R-induced apoptosis in PC12 cells via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2613-2620.
- [12] XIAO X, LU Z, LIN V, et al. MicroRNA miR-24-3p reduces apoptosis and regulates Keap1-Nrf2 pathway in mouse cardiomyocytes responding to ischemia/reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7042105.
- [13] LU Z, DANIEL S, VICTOR L, et al. HTRA1 synergizes with oxidized phospholipids in promoting inflammation and macrophage infiltration essential for ocular VEGF expression[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216808.
- [14] KALARIA R N, AKINYEMI R, IHARA M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862: 915-925.
- [15] JIANG L J, ZHANG S M, LI C W, et al. Roles of the Nrf2/HO-1 pathway in the anti-oxidative stress response to ischemia-reperfusion brain injury in rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21: 1532-1540.
- [16] WU G, ZHU L, YUAN X, et al. Britanin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inducing the Nrf2 protective pathway[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27: 754-768.
- [17] CHANG J L, HAI T W, SHU Y W, et al. Expression and correlation of NRF2, KEAP1, NQO-1 and HO-1 in advanced squamous cell carcinoma of the larynx and their association with clinicopathologic features [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5171-5179.
- [18] SIEGEL D, GUSTAFSON D L, DEHN D L, et al. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65: 1238-1247.
- [19] SUN R, PENG M, XU P, et al. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) regulates NLRP3-mediated neuronal pyroptosis following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 330.
- [20] ZHANG M Y, JIANG Y X, YANG Y C, et al. Cigarette smoke extract induces pyroptosis in human bronchial epithelial cells through the ROS/NLRP3/caspase-1 pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 269: 119090.

殖活力,延缓了细胞愈合迁移能力,且侵袭能力受到了明显抑制。肿瘤的异常增殖是肿瘤侵袭和转移的基础,肿瘤增殖过程中起到关键作用的基因分子主要包括肿瘤增殖相关蛋白 Cyclin D1、c-Myc、BCL2 和 VEGF,也是预测肿瘤异常增殖的重要标志。研究表明,肿瘤细胞在异常增殖过程中 Cyclin D1、c-Myc、BCL2 和 VEGF 均呈表达上调状态。本研究通过 Western blot 检测 4 种蛋白表达证实,NU9056 干预后的食管癌细胞中 Cyclin D1、c-Myc、BCL2 和 VEGF 蛋白表达均明显降低。笔者推测,NU9056 干预食管癌 EC109 细胞后抑制了乙酰基转移酶 KAT5 的活性,使其催化的 Survivin 蛋白发生去乙酰化进而改变了 Cyclin D1、c-Myc、BCL2 和 VEGF 的表达。提示抑制 KAT5 表达可以降低 Survivin 乙酰化水平,抑制了细胞增殖通路,进而抑制了食管癌 EC109 细胞的增殖、侵袭和迁移。

综上所述,乙酰基转移酶抑制剂 NU9056 可通过下调乙酰基转移酶 KAT5 靶向调控 Survivin 乙酰化修饰,进一步通过调控肿瘤增殖过程中起到关键作用的基因,进而抑制食管癌 EC109 细胞的增殖、侵袭和迁移能力,为食管癌的临床治疗提供了新的思路和作用靶点。

## 参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] DUDASH M, SLIPAK S, DOVE J T, et al. Lymph node harvest as a measure of quality and effect on overall survival in esophageal cancer: a national cancer database assessment[J]. Am Surg, 2019, 85(2): 201-205.
- [3] YANG X J, SETO E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications[J]. Mol Cell, 2008, 31(4): 449-461.
- [4] LIU R, GOU D, XIANG J, et al. O-GlcNAc modified-TIP60/KAT5 is required for PCK1 deficiency-induced HCC metastasis[J]. Oncogene, 2021, 40(50): 6707-6719.

(上接第 166 页)

- [21] YANG Y, LIU P Y, BAO W, et al. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 28.
- [22] WU J, CHEN Y, YU S, et al. Neuroprotective effects of sulfiredoxin-1 during cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury in rats[J]. Brain Res Bull, 2017, 132: 99-108.

- [5] 伍春林, 易鹏, 黄祥, 等. 丁卡因通过 MDM2 基因下调 Survivin 蛋白抑制黑色素瘤生长[J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(4): 403-408.
- [6] 梁宗英, 侯继申, 张乐, 等. 食管癌 Survivin 乙酰化水平与 PCAF 表达的相关性及其临床意义[J]. 医学临床研究, 2019, 36(8): 1475-1477.
- [7] 侯欣欣, 陈书昌. 食管癌相关危险因素最新进展[J]. 食管疾病, 2021, 3(2): 140-146.
- [8] TAIEB J, ANDRE T, AUCLIN E. Refining adjuvant therapy for non metastatic colon cancer, new standards and perspectives [J]. Cancer Treat Rev, 2019, 75(28): 1-11.
- [9] NARITA T, WEINERT B T, CHOUDHARY C. Functions and mechanisms of non histone protein acetylation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 156-174.
- [10] 陈科谚, 何海洪, 柯娟玉, 等. Survivin 基因在肝癌细胞增殖、凋亡过程中的表达及意义[J]. 海南医学, 2021, 32(4): 409-412.
- [11] KHAN Z, KHAN A A, YADAV H, et al. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma[J]. Cell Mol Biol Lett, 2017, 22: 8.
- [12] 林晋, 黄宇, 唐风华, 等. 褪黑素通过调节 Survivin 和 caspase-3 表达诱导人骨肉瘤细胞凋亡[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2020, 29(1): 28-33.
- [13] 蒋为, 董韬, 陆宇, 等. 脑膜瘤患者 Survivin、FHIT 表达在肿瘤发生发展中作用[J]. 临床军医杂志, 2020, 48(2): 152-154.
- [14] 张赫, 张士猛, 周平坤. 乙酰基转移酶 Tip60 (KAT5) 的功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(1): 25-31.
- [15] 白宇航, 梁宗英, 侯继申, 等. 食管癌 Tip60 的表达及其与临床病例特征的初步研究[J]. 医师在线, 2019, 6(11): 73-74.
- [16] 方晨, 王勇, 李勇. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂联合免疫检查点抑制剂治疗肿瘤的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2021, 24(3): 204-211.

(收稿日期: 2022-04-08 修回日期: 2022-09-18)

- [23] LIM H W, KUMAR H, KIM B W, et al.  $\beta$ -asarone (cis-2, 4, 5-trimethoxy-1-allyl phenyl), attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling and the JNK pathway in LPS activated BV-2 microglia cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 72(1): 265-272.

(收稿日期: 2022-08-08 修回日期: 2022-10-22)