

本文引用: 胡科, 李晓蕾, 麻瑞娟. 藏红花素减轻皮质神经元缺氧复氧损伤与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(4): 329-335, 342. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.04.007.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-04-0329-07

• 实验研究 •

藏红花素减轻皮质神经元缺氧复氧损伤与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关

胡科, 李晓蕾, 麻瑞娟

(邯郸市中心医院神经内科, 河北省邯郸市 056000)

[摘要] **[目的]** 探讨藏红花素对皮质神经元缺氧复氧损伤的影响及其分子机制。**[方法]** 分离并培养 SD 大鼠皮质神经元, 设对照组、模型组、藏红花素 (50 mg/L) 组、藏红花素 (50 mg/L)+脂多糖 (TLR4 激活剂, 100 μ g/L) 组。对照组常规培养, 模型组建立缺氧 4 h 复氧 24 h 模型, 藏红花素组和藏红花素+脂多糖组分别给药干预 24 h 后造模。通过 CCK-8 法、Annexin V-FITC/PI 双染法检测神经元活力和凋亡率, ELISA 法检测培养液中炎症因子水平, Western blot 检测 Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65)、p-NF- κ B p65、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、p-I κ B α 、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、cleaved Caspase-3、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 表达。**[结果]** 与对照组比较, 模型组大鼠皮质神经元活力明显降低 ($P<0.05$), 凋亡率、培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平、神经元 TLR4、HMGB1、cleaved Caspase-3 表达量及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 、Bax/Bcl-2 比值均明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 藏红花素组皮质神经元活力升高 94.97% ($P<0.05$), 凋亡率降低 65.80% ($P<0.05$), 培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平分别降低 61.86%、78.34%、63.42% ($P<0.05$), 神经元 TLR4、HMGB1、cleaved Caspase-3 表达量及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 、Bax/Bcl-2 比值分别降低 73.43%、52.13%、81.52%、69.70%、60.55%、95.05% ($P<0.05$)。脂多糖明显逆转藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元上述各指标的调控作用 ($P<0.05$)。**[结论]** 藏红花素可抑制缺氧复氧损伤皮质神经元凋亡和炎症反应, 对缺氧复氧损伤皮质神经元起到保护作用, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 藏红花素; 神经元; 缺氧复氧; TLR4/NF- κ B 通路; 炎症反应; 细胞凋亡

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Crocinn attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cortical neurons by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway

HU Ke, LI Xiaolei, MA Ruijuan

(Department of Neurology, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Crocin on hypoxia/reoxygenation injury of cortical neurons and its molecular mechanism. **Methods** The cortical neurons of SD rats were isolated and cultured, and the control group, model group, Crocin (50 mg/L) group, Crocin (50 mg/L)+lipopolysaccharide (TLR4 activator, 100 μ g/L) group were set. The cortical neurons in control group were routinely cultured; the cortical neurons in model group were given hypoxia 4 h and reoxygenation 24 h; the cortical neurons in Crocin group and Crocin+lipopolysaccharide group were intervened for 24 h, and then the model was established. The neuronal viability and apoptosis rate were detected by CCK-8 method and Annexin V-FITC/PI double staining method. The levels of inflammatory factors in the culture medium were detected by ELISA method. The expression of toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), p-NF- κ B p65, inhibitor α of NF- κ B (I κ B α), p-I κ B α , high mobility group box protein B1 (HMGB1), cleaved Caspase-3, B lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) were detected by Western blot method. **Results** Compared with the control group, the activity of cortical neurons in the model group decreased significantly ($P<0.05$); the apoptosis rate, the

[收稿日期] 2022-05-22

[修回日期] 2022-11-21

[基金项目] 河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目 (21422083116); 河北省医学科学研究课题 (20201546)

[作者简介] 胡科, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管病。通信作者李晓蕾, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑神经疾病, E-mail: lfsyxiaoyu@163.com。

levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 in the culture medium, the expressions of TLR4, HMGB1, cleaved Caspase-3 and the ratio of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, p-I κ B α /I κ B α , Bax/Bcl-2 increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the activity of cortical neurons in Crocin group increased by 94.97% ($P < 0.05$); the apoptosis rate decreased by 65.80% ($P < 0.05$); the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in the culture medium decreased by 61.86%, 78.34%, 63.42% ($P < 0.05$); the expressions of TLR4, HMGB1, cleaved Caspase-3 and the ratio of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, p-I κ B α /I κ B α , Bax/Bcl-2 decreased by 73.43%, 52.13%, 81.52%, 69.70%, 60.55%, 95.05% ($P < 0.05$). Lipopolysaccharide significantly reversed the regulatory effects of Crocin on hypoxia/reoxygenation injured cortical neurons ($P < 0.05$). **Conclusion** Crocin can inhibit the apoptosis and inflammatory response of hypoxia/reoxygenation injured neurons, and has protective effect on hypoxia/reoxygenation injury of cortical neurons, which mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway activation.

[**KEY WORDS**] Crocin; cortical neurons; hypoxia/reoxygenation; TLR4/NF- κ B pathway; inflammation response; cell apoptosis

脑卒中是导致中国居民残疾和死亡的首位病因,其中缺血性脑卒中约占70%^[1]。通过静脉溶栓或介入治疗及时恢复血流再灌注、挽救缺血半暗带神经元是临床治疗缺血性脑卒中的首选方案,但血流再通后往往导致脑功能缺损进一步加重,即脑缺血再灌注损伤,炎症反应、细胞凋亡等是其发生发展的重要病理机制^[2-3]。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是调控炎症反应和细胞凋亡的重要信号通路^[4],有研究报道抑制TLR4/NF- κ B通路能够减轻大鼠脑缺血再灌注损伤^[5]。藏红花素提取自鸢尾科植物藏红花,具有良好的抗炎、抗凋亡等药理学作用^[6],通过抑制TLR4/NF- κ B通路能够减轻心力衰竭大鼠炎症反应和心肌细胞凋亡^[7]。体外研究发现藏红花素能够抑制过氧化氢损伤视网膜色素上皮细胞凋亡^[8]。有研究^[9-11]报道藏红花素能够保护缺血性脑损伤大鼠血脑屏障、降低脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积并改善其神经功能,但其分子机制尚不明确。本研究通过分离并体外培养SD大鼠皮质神经元,建立缺氧复氧损伤皮质神经元模型,探讨藏红花素对皮质神经元缺氧复氧损伤的影响及其分子机制,以期临床防治脑缺血再灌注损伤提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级新生24 h内SD大鼠乳鼠,由河北伊维沃生物科技有限公司提供[SCXK(冀)2020-002]。

1.2 药物与试剂

藏红花素(纯度 $\geq 98\%$)和DMEM高糖培养基购自美国Sigma公司(批号分别为E190513b、8119284);脂多糖(TLR4激活剂)购自美国

Invivogen公司(批号:511219ps);0.25%胰蛋白酶、青霉素-链霉素购自美国Gibco公司(批号:R001100、15070-054);胎牛血清购自上海Excell Bio公司(批号:FSP500);CCK-8试剂盒购自上海尚宝生物科技有限公司(批号:210527);Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂盒购自美国Bio-Rad公司(批号:551908);酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司(批号:SEKR-0009、SEKR-0002、SEKR-0005);TLR4抗体、NF- κ B p65抗体、p-NF- κ B p65抗体、NF- κ B抑制蛋白 α (inhibitor α of NF- κ B, I κ B α)抗体、p-I κ B α 抗体、高迁移率族蛋白B1(high mobility group protein B1, HMGB1)抗体购自美国Affinity公司(批号:AF7017、AF5006、AF5019、AF6428、AF5281、AF4119);激活型Caspase-3(cleaved Caspase-3)抗体、B淋巴细胞瘤-2基因(B-lymphocytoma-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 related X protein, Bax)抗体购自英国Abcam公司(批号:ab54426、ab28517、ab31005);二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白浓度检测试剂盒、 β 肌动蛋白(β -actin)抗体、二抗、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司(批号:C05-07004、bs-0061R、bs-0295G、C05-07004)。

1.3 实验仪器

ZCP-50型CO₂细胞培养箱(上海喆图科学仪器有限公司);Synergy H1型酶标仪(德国Biotec公司);FACSCalibur型流式细胞仪、Tetra型电泳仪、Blot SD型转膜仪(美国Bio-Rad公司);Avanti J-26XP型低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司)。

1.4 皮质神经元分离、培养及分组处理

取新生 24 h 内 SD 大鼠乳鼠大脑皮质组织,冰上去除脑膜和血管、剪碎后置于 DMEM 高糖培养基中,加入 2 滴胰蛋白酶,置于细胞培养箱(37 ℃、5% CO₂)中消化 20 min,经 200 目筛网过滤后 1 000 r/min 离心 10 min 取沉淀,即为 SD 大鼠皮质神经元;以 1×10^6 个/mL 接种于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素-链霉素)的 DMEM 高糖培养基,置于细胞培养箱(37 ℃、5% CO₂)中培养,每 2 天换液一次,融合至 70%~80% 时按 1:3 传代培养,7 天后通过神经元微管相关蛋白免疫荧光染色检测皮质神经元纯度。取培养 7 天后且纯度 >90% 的皮质神经元,经胰酶消化后调整为 1×10^6 个/mL,50 μ L/孔接种于 96 孔板和 500 μ L/孔接种于 6 孔板,设对照组、模型组、藏红花素(50 mg/L)组、藏红花素(50 mg/L)+脂多糖(TLR4 激活剂,100 μ g/L)组^[12]。置细胞培养箱(37 ℃、5% CO₂)中培养 24 h 后,对照组继续常规培养;模型组置于细胞培养箱(37 ℃、5% CO₂、95% N₂)中缺氧处理 4 h 后复氧 24 h,即可建立缺氧复氧损伤皮质神经元模型;藏红花素组和藏红花素+脂多糖组分别给药干预 24 h 后,按照模型组处理方法造模。

1.5 CCK-8 法检测神经元活力

各组分别取 12 孔(96 孔板)复氧 24 h 后的皮质神经元,每孔 10 μ L 加入 CCK-8 工作液,置细胞培养箱(37 ℃、5% CO₂)培养 4 h 后,通过酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值,神经元活力(%) = $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测神经元凋亡状况

各组分别取 12 孔(6 孔板)复氧 24 h 后的皮质神经元,经不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰蛋白酶消化后收集神经元,按试剂盒操作说明制备单细胞悬液,每孔加入 5 μ L Annexin V-FITC 染液、5 μ L PI 染液后混匀,避光孵育 15 min,通过流式细胞仪检测细胞凋亡状况。流式细胞图的右上象限为凋亡晚期细胞,右下象限为凋亡早期细胞,凋亡率(%) = $[(\text{右上象限细胞数} + \text{右下象限细胞数}) / \text{细胞总数}] \times 100\%$ 。

1.7 ELISA 法检测培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平

各组分别取 12 孔(6 孔板)复氧 24 h 后的皮质神经元培养液,3 000 r/min 离心 5 min 取上清液,按 ELISA 法试剂盒操作说明,通过酶标仪检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

1.8 Western blot 法检测 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 、HMGB1、cleaved Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

各组分别取 12 孔(6 孔板)复氧 24 h 后的皮质神经元,经胰蛋白酶消化后收集神经元,加入裂解液后冰上静置 30 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min 提取总蛋白,BCA 法检测总蛋白浓度后,沸水浴 10 min 使蛋白变性,采用 Western blot 法检测蛋白相对表达量。SDS-PAGE 分离蛋白、转膜、5% 脱脂奶粉封闭后,目标蛋白和内参(β -actin)一抗 4 ℃ 孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育 1 h,洗膜后加入 ECL 显影,通过 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析条带灰度值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元活力的影响

与对照组比较,模型组皮质神经元活力降低 62.98% ($P < 0.05$);与模型组比较,藏红花素组和藏红花素+脂多糖组皮质神经元活力分别升高 94.97% 和 18.62% ($P < 0.05$);与藏红花素组比较,藏红花素+脂多糖组皮质神经元活力降低 39.16% ($P < 0.05$;图 1)。

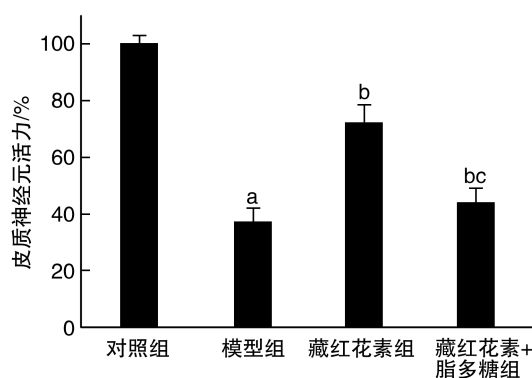


图 1. 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元活力的影响($n = 12$)

a 为 $P < 0.05$,与对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与模型组相比;
c 为 $P < 0.05$,与藏红花素组相比。

Figure 1. Effect of Crocin on the viability of cortical neurons injured by hypoxia/reoxygenation ($n = 12$)

2.2 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元凋亡的影响

与对照组比较,模型组皮质神经元凋亡率升高 1 437.87% ($P<0.05$);与模型组比较,藏红花素组

和藏红花素+脂多糖组皮质神经元凋亡率分别降低 65.80% 和 20.61% ($P<0.05$);与藏红花素组比较,藏红花素+脂多糖组皮质神经元凋亡率升高 132.15% ($P<0.05$;图 2)。

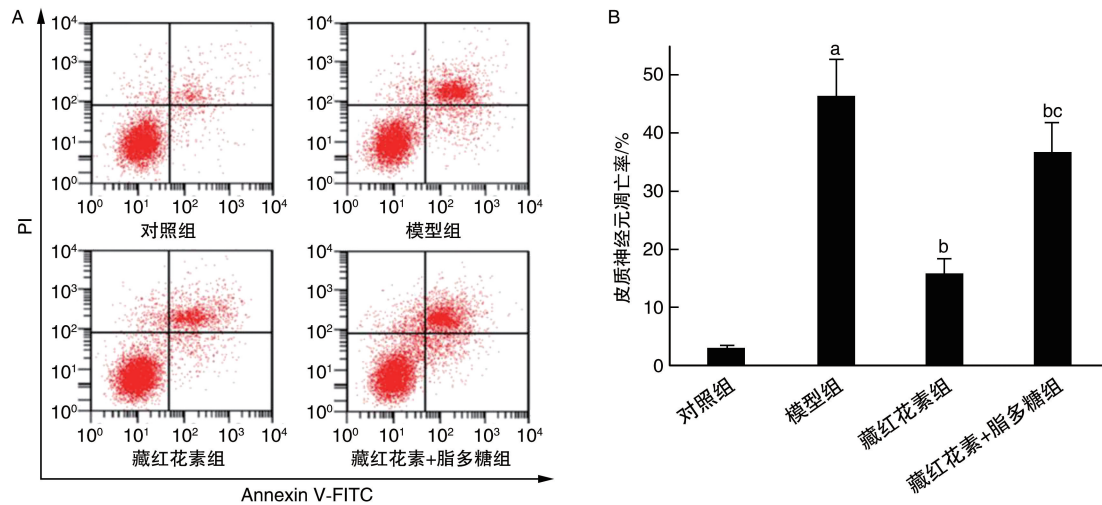


图 2. 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元凋亡的影响 ($n=12$)

A 为流式细胞术检测皮质神经元凋亡率;B 为皮质神经元凋亡率柱状统计图。

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与模型组相比; c 为 $P<0.05$, 与藏红花素组相比。

Figure 2. Effect of Crocin on the apoptosis of cortical neurons injured by hypoxia/reoxygenation ($n=12$)

2.3 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元培养液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响

与对照组比较,模型组皮质神经元培养液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平分别升高 293.73%、702.69%、305.31% ($P<0.05$);与模型组比较,藏红花素组皮质神经元培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平分别降低 61.86%、78.34%、63.42% ($P<0.05$),藏红花素+脂多糖组皮质神经元培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平分别降低 23.49%、31.02%、27.52% ($P<0.05$);与藏红花素组比较,藏红花素+脂多糖组皮质神经元培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平分别升高 100.61%、218.43%、98.12% ($P<0.05$;表 1)。

2.4 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组皮质神经元 TLR4、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达量及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 比值分别升高 1 063.64%、425.00%、560.00%、407.69%、541.18% ($P<0.05$);与模型组比较,藏红花素组 TLR4、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达量及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 比值分别降低 73.43%、69.84%、61.36%、69.70%、60.55%

($P<0.05$),藏红花素+脂多糖组 TLR4、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达量及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 比值分别降低 41.41%、41.27%、29.55%、34.85%、22.02% ($P<0.05$);与藏红花素组比较,藏红花素+脂多糖组 TLR4、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达量及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 比值分别升高 120.59%、94.74%、82.35%、115.00%、97.67% ($P<0.05$;图 3)。

表 1. 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元培养液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($n=12$)

Table 1. Effect of Crocin on the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in cultured medium of cortical neurons injured by hypoxia/reoxygenation ($n=12$)

分组	单位:ng/L		
	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	85.47 \pm 10.29	61.70 \pm 6.82	114.28 \pm 10.53
模型组	336.52 \pm 51.48 ^a	495.26 \pm 61.05 ^a	463.19 \pm 58.22 ^a
藏红花素组	128.34 \pm 17.65 ^b	107.28 \pm 13.94 ^b	169.45 \pm 21.08 ^b
藏红花素+脂多糖组	257.46 \pm 38.19 ^{bc}	341.61 \pm 42.58 ^{bc}	335.72 \pm 43.90 ^{bc}

注:a 为 $P<0.05$, 与对照组相比;b 为 $P<0.05$, 与模型组相比;c 为 $P<0.05$, 与藏红花素组相比。

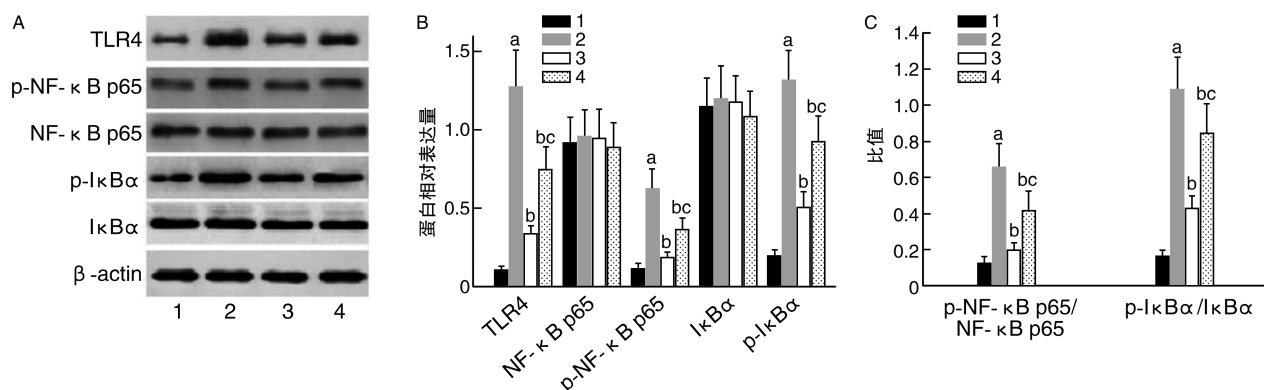


图 3. 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、p-IκBα 蛋白表达及 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IκBα/IκBα 比值的影响 ($n=12$)

A 为 Western blot 检测 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、p-IκBα 蛋白表达; B 为各组 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、p-IκBα 蛋白相对表达量柱状统计图; C 为各组 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IκBα/IκBα 比值柱状统计图。

1 为对照组, 2 为模型组, 3 为藏红花素组, 4 为藏红花素+脂多糖组。

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与模型组相比; c 为 $P<0.05$, 与藏红花素组相比。

Figure 3. Effects of Crocin on the expression of TLR4, NF-κB p65, p-NF-κB p65, IκBα, p-IκBα and the ratio of p-NF-κB p65/NF-κB p65, p-IκBα/IκBα in cortical neurons injured by hypoxia/reoxygenation ($n=12$)

2.5 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bax 表达量和 Bax/Bcl-2 比值分别升高 308.70%、1 050.00%、840.00%、5 378.57% ($P<0.05$), Bcl-2 表达量降低 83.78% ($P<0.05$)。与模型组比较, 藏红花素组 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bax 表达量和 Bax/Bcl-2 比值分别降低 52.13%、

81.52%、82.98%、95.05% ($P<0.05$), Bcl-2 表达量升高 250.00% ($P<0.05$); 藏红花素+脂多糖组 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bax 表达量和 Bax/Bcl-2 比值分别降低 14.89%、30.43%、31.91%、62.06% ($P<0.05$), Bcl-2 表达量升高 83.33% ($P<0.05$)。与藏红花素组比较, 藏红花素+脂多糖组 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bax 表达量和 Bax/Bcl-2 比值分别升高 77.78%、276.47%、287.50%、665.79% ($P<0.05$), Bcl-2 表达量降低 47.62% ($P<0.05$; 图 4)。

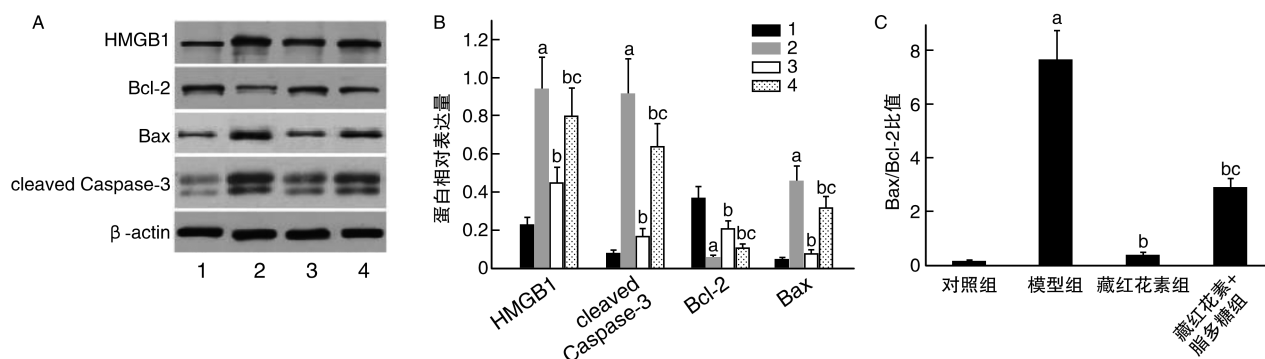


图 4. 藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值的影响 ($n=12$)

A 为 Western blot 检测 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达; B 为各组 HMGB1、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量柱状统计图; C 为各组 Bax/Bcl-2 比值柱状统计图。

1 为对照组, 2 为模型组, 3 为藏红花素组, 4 为藏红花素+脂多糖组。

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与模型组相比; c 为 $P<0.05$, 与藏红花素组相比。

Figure 4. Effects of Crocin on the expression of HMGB1, cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bax and the ratio of Bax/Bcl-2 in cortical neurons injured by hypoxia/reoxygenation ($n=12$)

3 讨论

缺血再灌注损伤是影响缺血性脑卒中患者预后的重要原因,是脑卒中相关防治研究的热点。缺血性脑卒中在中医属于中风范畴,其病机主要在于“痰热腑实、气虚血瘀、风痰阻络”。藏红花(又名番红花)以鸢尾科多年生草本植物番红花的干燥柱头入药,是我国药典收录的一味传统中药,首载于《本草纲目》,味甘、性平,具有活血化瘀、凉血解毒、散郁开结等功效。藏红花素为藏红花主要有效成分,具有抗炎、抗凋亡等多种生物学活性,温彬等^[10]报道藏红花素能够缩短全脑缺血再灌注大鼠脑电图恢复时间和翻正反射恢复时间。Zhao等^[13]体外实验研究发现,50 mg/L 藏红花素能够明显提高缺氧复氧损伤海马神经元活力并降低其凋亡率,本研究开展前进行的预实验结果显示,50 mg/L 藏红花素可明显提高缺氧复氧损伤皮质神经元活力并降低其凋亡率,因此,本研究设置藏红花素质量浓度为50 mg/L。本实验通过缺氧复氧损伤皮质神经元模拟在体脑缺血再灌注损伤,研究发现缺氧复氧损伤皮质神经元活力明显降低,与巩雨等^[14]报道一致。本研究结果显示,藏红花素预处理能够明显提高缺氧复氧损伤皮质神经元活力。脂多糖为TLR4激活剂,本研究发现脂多糖能够明显逆转藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元活力的提高作用,这与Du等^[15]报道的脂多糖激活TLR4可逆转芦荟苷对缺氧复氧损伤肝细胞起到保护作用的结果相似,提示藏红花素对缺氧复氧损伤皮质神经元的保护作用可能与调节TLR4表达有关。

炎症反应和继发性神经元凋亡是脑缺血再灌注损伤的重要病理机制。侯家保等^[16]研究发现脑缺血再灌注损伤能够病理性刺激TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症因子分泌,从而诱发炎症反应。此外,TNF- α 能够趋化其他炎症因子释放而加重炎症反应损伤,IL-1 β 则能够刺激内皮细胞上调表达黏附分子而促进炎症细胞浸润^[17]。细胞凋亡是一种细胞程序化死亡过程,多种蛋白参与其调控。Bcl-2和Bax同为Bcl-2家族蛋白成员,二者均定位于线粒体膜,其中Bax能够激发线粒体膜通透性转变孔道开放而促使细胞色素C(CytC)进入细胞质,CytC则能够诱导Caspase-3活化,cleaved Caspase-3通过破坏结构蛋白、膜蛋白、核酸等分子结构而诱导细胞凋亡^[18];Bcl-2可抑制线粒体膜通透性转变孔道开放而减少CytC进入细胞质,间接抑制Caspase-3活化,并且

Bcl-2可抑制钙超载和p53活化,从而表现为抑制细胞凋亡的作用^[19]。并且Bcl-2与Bax能够形成无活性的异源二聚体,所以Bax/Bcl-2比值能够说明二者共同对细胞凋亡的影响^[20]。

TLR4是一种模式识别受体,在脑神经系统神经元、小胶质细胞、星型胶质细胞、少突胶质细胞等广泛表达。NF- κ B为p65/p50二聚体,在脑神经系统广泛表达,生理状态下以“p65/p50-I κ B α ”聚合态形式存在而无生理活性。TLR4能够诱导I κ B α 和NF- κ B p65亚基磷酸化,使“p65/p50-I κ B α ”聚合态解离,游离态p-NF- κ B p65核转位后能够诱导TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症因子表达^[21]。Chen等^[22]研究发现,阻断TLR4/NF- κ B通路抑制TNF- α 、IL-1 β 、IL-6过度分泌,能够减轻脑缺血再灌注损伤。HMGB1是一种内源性损伤分子,能够促进TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子表达,并且王华杰等^[23]研究发现HMGB1抑制剂能够抑制TLR4/NF- κ B通路活化而减轻大鼠心肺复苏所致脑缺血再灌注损伤。任娟等^[24]研究发现NF- κ B能够调控Bcl-2、Bax蛋白表达而促进细胞凋亡。本研究发现,藏红花素预处理能够明显降低缺氧复氧损伤皮质神经元凋亡率,降低皮质神经元培养液中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平,降低TLR4、HMGB1、cleaved Caspase-3表达量和p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 、Bax/Bcl-2比值,而脂多糖能够明显逆转藏红花素的上述作用。提示藏红花素预处理能够抑制缺氧复氧损伤皮质神经元炎症反应和凋亡,该作用可能与藏红花素抑制TLR4/NF- κ B通路活化有关。

综上所述,藏红花素可抑制缺氧复氧损伤神经元凋亡和炎症反应,对皮质神经元缺氧复氧损伤起到保护作用,其机制可能与抑制TLR4/NF- κ B信号通路活化有关。本研究结果为藏红花素防治脑缺血再灌注损伤提供了理论支持。

[参考文献]

- [1] 《中国脑卒中防治报告》编写组.《中国脑卒中防治报告2020》概要[J].中国脑血管病杂志,2022,19(2):136-144.
REPORT ON STROKE PREVENTION AND TREATMENT IN CHINA WRITING GROUP. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2020 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2022, 19(2): 136-144.
- [2] 王博,孙亚男,王继燕,等.小檗碱通过激活SIRT1通路减轻脑缺血再灌注大鼠炎症及凋亡[J].中国动脉硬

- 化杂志, 2019, 27(10): 847-852.
- WANG B, SUN Y N, WANG J Y, et al. Berberine attenuates inflammation and apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion by activating SIRT1 pathway [J]. Chin J Arterioscler, 2019, 27(10): 847-852.
- [3] 郝海珍, 郭铁, 余丹. 脂肪间充质干细胞来源外泌体对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡及炎症因子影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(17): 1656-1665.
- HAO H Z, GUO T, YU D. Effect of exosomes derived from adipose-derived mesenchymal stem cells on neuron apoptosis and inflammatory cytokines in a rat model of cerebral ischemia reperfusion [J]. Acta Acad Med Mil Tert, 2019, 41(17): 1656-1665.
- [4] CHEN J, YANG C L, XU X, et al. The effect of focal cerebral ischemia-reperfusion injury on TLR4 and NF- κ B signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 897-903.
- [5] 田建荣, 刘恒方, 张敏, 等. 间歇性禁食及二甲双胍对脑缺血再灌注损伤后 Toll 样受体 4/核转录因子 κ B 通路的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24(7): 760-764.
- TIAN J R, LIU H F, ZHANG M, et al. Effects of intermittent fasting and metformin on toll like receptor 4/nuclear transcription factor κ B pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis, 2022, 24(7): 760-764.
- [6] RAHIM V B, KHAMMAR M T, RAKHSHANDEH H, et al. Crocin protects cardiomyocytes against LPS-induced inflammation[J]. Pharmacological Reports, 2019, 71(6): 1228-1234.
- [7] JIN W Y, ZHANG Y Y, XUE Y R, et al. Crocin attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis by targeting TLR4/NF- κ B signaling: connecting oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2020, 393(1): 13-23.
- [8] 李姚, 王健. 藏红花素抑制过氧化氢诱导的视网膜色素上皮细胞凋亡[J]. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(5): 347-350.
- LI Y, WANG J. Crocin inhibits the retinal pigment epithelial cell apoptosis induced by H_2O_2 [J]. J Tradit Chin Ophthalmol, 2019, 29(5): 347-350.
- [9] ZHANG X, FAN Z X, JIN T. Crocin protects against cerebral ischemia-induced damage in aged rats through maintaining the integrity of blood-brain barrier [J]. Restor Neurol Neurosci, 2017, 35(1): 65-75.
- [10] 温彬, 张琪, 靳丽丽, 等. 藏红花素预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤保护作用及机制研究[J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 429-435.
- WEN B, ZHANG Q, JIN L L, et al. Protective effect of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(3): 429-435.
- [11] SARSHOORI J R, ASADI M H, MOHAMMADI M T. Neuroprotective effects of crocin on the histopathological alterations following brain ischemia-reperfusion injury in rat[J]. Iran J Basic Med Sci, 2014, 17(11): 895-902.
- [12] 李青宴, 董宝莲, 胡建英, 等. 锰诱导大鼠原代神经元氧化应激及炎症损伤模型的建立[J]. 阿尔茨海默病及相关病, 2022, 5(1): 16-21.
- LI Q Y, DONG B L, HU J Y, et al. Establishment of manganese-induced oxidative stress and inflammatory response model of primary neurons in rats [J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2022, 5(1): 16-21.
- [13] ZHAO T, LU H, LI M, et al. Neuroprotective mechanism of crocin via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway after cerebral infarction: an *in vitro* study [J]. Am J Transl Res, 2022, 14(5): 3164-3171.
- [14] 巩雨, 樊嘉欣, 高震, 等. MiR-199a 对缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力及凋亡的影响[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(5): 1028-1035.
- GONG Y, FAN J X, GAO Z, et al. Effects of miR-199a on the viability and apoptosis of rat cerebral cortical neurons cells induced by hypoxia/reoxygenation [J]. J Clin Pathol Res, 2022, 42(5): 1028-1035.
- [15] DU Y C, QIAN B L, GAO L, et al. Aloin preconditioning attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019. DOI: 10.1155/2019/3765898.
- [16] 侯家保, 袁泉, 万杏, 等. 曲古抑菌素 A 预处理对小鼠脑缺血再灌注损伤皮质炎症反应和凋亡的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(9): 1-5.
- HOU J B, YUAN Q, WAN X, et al. Effect of Trichostatin A on cerebral cortex inflammation and apoptosis in mouse model of cerebral ischemia reperfusion injury [J]. China J Mod Med, 2019, 29(9): 1-5.
- [17] 李萍, 王静, 戴成祥, 等. 移植前输注间充质干细胞对脑死亡供鼠移植肾炎症细胞浸润及 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响[J]. 成都医学院学报, 2020, 15(1): 40-45.
- LI P, WANG J, DAI C X, et al. Effect of the infusion with mesenchymal stem cells before transplantation on the renal inflammatory cell infiltration and the expression of TNF- α and IL-1 β in brain-dead donor rats [J]. J Chengdu Med Coll, 2020, 15(1): 40-45.

- [14] HE L, HE W Y, YANG W L, et al. Lower serum irisin levels are associated with increased vascular calcification in hemodialysis patients [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43(1): 287-295.
- [15] WEN M S, WANG C Y, LIN S L, et al. Decrease in irisin in patients with chronic kidney disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64025.
- [16] HISAMATSU T, MIURA K, ARIMA H, et al. Relationship of serum irisin levels to prevalence and progression of coronary artery calcification: a prospective, population-based study [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 267: 177-182.
- [17] CSIKY B, SÁGI B, EMMERT V, et al. Cardiometabolic effects of irisin in patients with end-stage renal disease on regular hemo- or peritoneal dialysis [J]. *Blood Purif*, 2022, 51(5): 450-457.
- [18] FIGUREK A, RROJI M, SPASOVSKI G. Sclerostin: a new biomarker of CKD-MBD [J]. *Int Urol Nephrol*, 2020, 52(1): 107-113.
- [19] VERVLOET M G, MASSY Z A, BRANDENBURG V M, et al. Bone: a new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(5): 427-436.
- [20] CHAPURLAT R D, CONFAYREUX C B. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, 55(10): 1714-1725.
- [21] LV W, GUAN L N, ZHANG Y, et al. Sclerostin as a new key factor in vascular calcification in chronic kidney disease stages 3 and 4 [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48(12): 2043-2050.
- [22] ZOU Y, YANG M, WANG J, et al. Association of sclerostin with cardiovascular events and mortality in dialysis patients [J]. *Ren Fail*, 2020, 42(1): 282-288.
- [23] DE MARÉ A, OPDEBEECK B, NEVEN E, et al. Sclerostin protects against vascular calcification development in mice [J]. *J Bone Mineral Res*, 2022, 37(4): 687-699.
- [24] COLAIANNI G, CUSCITO C, MONGELLI T, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(39): 12157-12162.
- [25] KIM H, WRANN C D, JEDRYCHOWSKI M, et al. Irisin mediates effects on bone and fat via αV integrin receptors [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1756-1768. e17.
- [26] SAADELDIN M K, ELSHAER S S, EMARA I A, et al. Serum sclerostin and irisin as predictive markers for atherosclerosis in Egyptian type II diabetic female patients: a case control study [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0206761.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 335 页)

- [18] 雷敏, 吴丽荣, 刘英. 氯沙坦对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(3): 213-218.
- LEI M, WU L R, LIU Y. Protective effect and molecular mechanism of losartan on cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(3): 213-218.
- [19] 胡耀梅, 刘应蛟, 艾启迪, 等. 脑缺血中 Bcl-2 对自噬与凋亡的双重调控机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(3): 368-374.
- HU Y M, LIU Y J, AI Q D, et al. Dual regulation mechanism of Bcl-2 on autophagy and apoptosis in cerebral ischemia [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2020, 31(3): 368-374.
- [20] 张学亚, 郭熙哲, 吴诗馨. 2-甲氧基雌二醇上调 Bax/BCL-2 比例诱导淋巴瘤 Raji 细胞凋亡的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2021, 29(2): 489-493.
- ZHANG X Y, GUO X Z, WU S X. Up-regulation of Bax/Bcl-2 ratio by 2-methoxyestradiol induces apoptosis in lymphoma raji cells [J]. *J Exp Hematol*, 2021, 150(2): 489-493.
- [21] ZHU H Q, LIU Z M, MENG X S, et al. Ligustrazine regulates LPS-induced apoptosis and inflammatory response of osteoarthritis chondrocytes via inhibiting phosphorylation of NF- κ B p65 [J]. *Chin J Immunol*, 2019, 35(2): 181-185.
- [22] CHEN X W, YAO Z J, PENG X, et al. Eupafolin alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via blocking the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5135-5144.
- [23] 王华杰, 苏醒, 麦叶, 等. HMGB1 抑制剂预处理对大鼠心肺复苏后脑缺血再灌注损伤及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2022, 29(2): 130-134.
- WANG H J, SU X, MAI Y, et al. Effects of HMGB1 inhibitor preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury and TLR4/NF- κ B signaling pathway after cardiopulmonary resuscitation in rats [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol*, 2022, 29(2): 130-134.
- [24] 任娟, 覃宏伟, 周冬亮, 等. 原花青素通过抑制 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *安徽医药*, 2021, 25(3): 431-435.
- REN J, QIN H W, ZHOU D L, et al. Protective effect of procyanidins on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2021, 25(3): 431-435.
- (此文编辑 许雪梅)