

金雀异黄酮调节 Nrf2/HO-1 信号通路 对海马神经元缺氧/复氧损伤的影响

高丽娜 张璇 何俊芳

【摘要】 目的 探讨金雀异黄酮(Genistein, Gen)调节核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1(Nuclear factor E2 related factor 2/heme oxygenase-1, Nrf2/HO-1)信号通路对海马神经元缺氧/复氧(Hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤的影响。**方法** 原代分离并体外培养 SD(Sprague Dawley)大鼠胎鼠(妊娠 18 d)海马神经元,设正常组、模型组、Gen(12.5 $\mu\text{mol/L}$)组、Gen(12.5 $\mu\text{mol/L}$) + Nrf2 激动剂叔丁基对苯二酚(Tert butyl hydroquinone, TBHQ)(10 $\mu\text{mol/L}$)组和 Gen(12.5 $\mu\text{mol/L}$) + Nrf2 抑制剂(Nrf2 inhibitor, ML385)(10 $\mu\text{mol/L}$)组;采用缺氧 4 h 复氧 24 h 的方法构建海马神经元 H/R 损伤模型,各组均于造模前 2 h 给药;噻唑蓝四氮唑(Thiazolyl blue tetrazolium, MTT)法、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啉(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propyl iodide, Annexin V-FITC/PI)双染法检测海马神经元活力和凋亡率,分光光度法检测活性氧(Reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性,Western blot 法检测海马神经元 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白[Nrf2, HO-1、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2 gene, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(Cysteine proteinase-3, Caspase-3)、激活型 Caspase-3(Cleaved Caspase-3)]表达水平。**结果** 与模型组比较,Gen 组海马神经元活力显著升高、凋亡率显著降低($P < 0.05$);ROS, MDA 水平显著降低, SOD, CAT 活性显著升高($P < 0.05$);Nrf2, HO-1, Bcl-2 表达水平显著升高, Bax, Cleaved Caspase-3 表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低($P < 0.05$)。TBHQ 可明显增强 Gen 对 H/R 损伤海马神经元活力、凋亡率、氧化应激以及 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达水平的调控作用;ML385 则明显逆转 Gen 对 H/R 损伤海马神经元的上述调控作用。**结论** Gen 对海马神经元 H/R 损伤具有保护作用,其机制可能与 Gen 上调 Nrf2/HO-1 信号通路,进而抑制氧化应激和神经元凋亡有关。

【关键词】 金雀异黄酮 海马神经元 缺氧/复氧 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1 信号通路 氧化应激 凋亡

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)01-0014-07

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.01.003

Effect of Genistein on hypoxia/reoxygenation injury of hippocampal neurons by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway Gao Lina, Zhang Xuan, He Junfang. Fourth Department of Neurology, Handan Central Hospital, Handan 056000

【Abstract】 Objective To investigate the effect Genistein (Gen) on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury of hippocampal neurons and its potential mechanism based on the nuclear factor E2 related factor 2/heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway. **Methods** The primary hippocampal neurons of SD (Sprague Dawley) fetal rats (18 d gestation) were isolated and cultured in vitro, and the normal group, model group, Gen (12.5 $\mu\text{mol/L}$) group, Gen (12.5 $\mu\text{mol/L}$) + Nrf2 agonis tert butyl hydroquinone (TBHQ) (10 $\mu\text{mol/L}$) group, Gen (12.5 $\mu\text{mol/L}$) + Nrf2 inhibitor ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) group were set up. The H/R injury model of hippocampal neurons was established by hypoxia for 4 h and reoxygenation for 24 h. 2 h before modeling, the hippocampal neurons in each group were intervened. The viability and apoptosis rate of hippocampal neurons were detected by thiazolyl blue tetrazolium (MTT) or Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propyl iodide

(Annexin V-FITC/PI) double dyeing. The content of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) were detected by spectrophotometry. The related protein expression of Nrf2/HO-1 signaling pathway [Nrf2, HO-1, B-lymphoblastoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Cysteine proteinase-3 (Caspase-3), Cleaved Caspase-3] were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the viability of hippocampal neurons in Gen group was significantly increased, while the apoptosis rate was significantly decreased ($P < 0.05$). The content of ROS, MDA were significantly decreased and the activity of SOD, CAT was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of Nrf2, HO-1, Bcl-2 were significantly increased, the expression of Bax, Cleaved Caspase-3 and the ratio of Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 were significantly decreased ($P < 0.05$). TBHQ could significantly enhance the regulatory effects of Gen on the viability, apoptosis rate, oxidative stress and Nrf2/HO-1 signaling pathway related protein expression of H/R damaged hippocampal neurons. ML385 significantly reversed the regulatory effects of Gen on H/R damaged hippocampal neurons. **Conclusion**

Gen has protective effect on H/R injury of hippocampal neurons through the up-regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibition of oxidative stress and neuronal apoptosis.

【Key words】 Genistein Hippocampal neurons Hypoxia/reoxygenation Nrf2/HO-1 signaling pathway Oxidative stress Apoptosis

脑卒中是因脑血管阻塞或破裂所致血供障碍而出现的脑部疾病,是致残、致死的主要疾病之一,其中缺血性脑卒中约占脑卒中患者的 80%。通过药物溶栓、血管介入等手段恢复血供是临床救治缺血性脑卒中的首选方案,但脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)并发症的存在却是影响患者预后的重要因素。CIRI 病理机制复杂,有文献报道氧化应激和继发性神经元凋亡在 CIRI 进展过程中起着重要作用^[1-2]。由核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) 及其下游靶蛋白血红素加氧酶 1 (Heme oxygenase-1, HO-1) 等构成的信号通路参与氧化应激和细胞凋亡等病理生理过程^[3]。有研究证实,通过药物调控 Nrf2/HO-1 信号通路可有效减轻 CIRI^[4-5]。

金雀异黄酮(Genistein, Gen)又名染料木素,是一种天然存在的三羟基异黄酮类化合物,在金雀花、山豆根、槐角等豆科植物中含量较为丰富,具有良好的抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种药理学作用^[6-8]。有研究发现 Gen 可激活 Nrf2/HO-1 信号通路来减轻糖尿病所致心肌组织氧化应激损伤^[9]。但 Gen 能否通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路来减轻 CIRI 尚未见文献报道。海马神经元对脑缺血及再灌注过程非常敏感,本研究通过构建海马神经元缺氧/复氧(H/R)损伤模型模拟在体 CIRI,研究 Gen 对海马神经元 H/R 损伤的影响,并基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雌性 SD 大鼠(妊娠 18 d)由河北伊维沃生物科技有限公司提供,许可证号为 SCXK(冀)2020-002。

1.2 药物与试剂 Gen(纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司(货号为 S31565);叔丁基对苯二酚(Tert butyl hydroquinone, TBHQ, Nrf2 激动剂)、ML385(Nrf2 抑制剂)、达尔伯克改良伊格培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基(含青-链霉素)购自北京索莱宝生物科技有限公司(货号分别为 IT1150, IM1020, 12100);噻唑蓝四氮唑(Thiazolyl blue tetrazolium, MTT)试剂盒、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propyl iodide, Annexin V-FITC/PI)双染法细胞凋亡检测试剂盒、活性氧(Superoxide dismutase, ROS)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(货号分别为 G020-1-1, G003-1-3, E004-1-1);丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)检测试剂盒和胎牛血清、放射免疫沉淀试验(Radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法蛋白水平测定试剂盒购自上海碧云天生物技术公司(货号分别为 S0131S, S0087, S0051, C0251, P0013C, P0010);Nrf2, HO-1, β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自英国 Abcam 公司(货号分别为 ab4916, ab5038, ab2412);B 淋巴细胞瘤-2 基因

(B-lymphoblastoma-2 gene, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Cysteine proteinase-3, Caspase-3)、激活型 Caspase-3 (Cleaved Caspase-3) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司 (货号分别为 HZ062562, HZ065893, HZ043671, HZ049024); 免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) G 二抗、二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色剂购自北京博奥森生物技术有限公司 (货号分别为 bs-0296G, D10294)。

1.3 主要仪器 CJ-2NB 型超净工作台 (北京亚泰隆公司); CO48R-230 型细胞培养箱 (英国 NBG 公司); MK3 型酶标仪 (上海楚定公司); CytoFlex 型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); DS-11 型紫外-可见分光光度计 (美国 Nanodrop 公司); 930F 型荧光分光光度计 (上海仪电分析仪器公司); DYY-7C 型电泳转膜系统 (北京六一公司); 15R 型高速低温离心机 (上海力申公司); 5200S 型化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 海马神经元分离与培养 颈椎脱臼处死 SD 大鼠后在超净工作台、冰上解剖出胎鼠, 剥离大脑海马组织, 剪碎、胰蛋白酶 37 °C 消化 15 min, 200 目筛过滤, 离心收集细胞后重悬, 接种于 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清、青-链霉素双抗), 置于细胞培养箱 37 °C、5% CO₂ 培养 7 d 后通过特异性烯醇化酶免疫荧光染色检测海马神经元纯度, 取纯度 > 90% 的对数生长期海马神经元开展实验研究。

1.4.2 分组、给药与造模 取对数生长期海马神经元, 经胰蛋白酶消化后离心收集神经元, 制备单神经元悬液, 以 5×10^6 个/孔接种于 6 孔板和 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 设正常组、模型组、Gen (12.5 μmol/L) 组^[10]、Gen (12.5 μmol/L) + TBHQ (10 μmol/L) 组^[11] 和 Gen (12.5 μmol/L) + ML385 (10 μmol/L) 组^[12]; 置于细胞培养箱培养 24 h 后各组分别给予相应终水平药物干预 2 h, 更换无药常规培养基后除正常组外, 其它组通过缺氧 (5% CO₂ + 95% N₂) 4 h 后复氧 (5% CO₂ + 95% 空气) 24 h 的方法构建海马神经元 H/R 损伤模型。

1.4.3 MTT 法检测海马神经元活力 复氧 24 h 后取各组 96 孔板海马神经元, 20 μl/孔加入 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 吸弃上清液, 150 μl/孔加入二甲亚砜后震荡孵育 15 min, 然后通过酶标仪检测 492 nm 处吸光度 (Optical density, OD) 值, 海马神

经元活力 = $(OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{正常组}}) \times 100\%$ 。每组设 8 个复孔。

1.4.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测海马神经元凋亡率 复氧 24 h 后取各组 6 孔板海马神经元, 经不含乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 的胰蛋白酶消化后离心收集神经元, 应用结合缓冲液重悬海马神经元, 每孔加入 Annexin V-FITC 染液和 PI 染液 5 μl, 室温避光孵育 15 min 后通过流式细胞仪测定海马神经元凋亡率。每组设 8 个复孔。

1.4.5 分光光度法检测海马神经元 ROS, MDA 水平和 SOD, CAT 活性 复氧 24 h 后取各组 6 孔板海马神经元, 吸弃上清液, 加 RIPA 裂解液 (150 μl/孔) 冰上静置 30 min 后 3500 r/min 离心 5 min 取上清液, 按照试剂盒操作说明书通过荧光分光光度计检测海马神经元 ROS 水平, 通过紫外-可见分光光度计检测海马神经元 MDA 水平和 SOD, CAT 活性。

1.4.6 Western blot 法检测海马神经元 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达水平 复氧 24 h 后取各组 6 孔板海马神经元, 经胰蛋白酶消化后离心收集神经元, 加 RIPA 裂解液 (150 μl/孔) 冰上静置 30 min 后 12000 r/min 离心 20 min 提取总蛋白, BCA 法测定总蛋白水平并 95 °C 水浴使蛋白变性后以总蛋白量 40 μg 上样, 经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳分离蛋白、转聚偏氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜、5% 蛋白封闭液 37 °C 封闭 2 h 后一抗稀释液 Nrf2 (1:1000), HO-1 (1:1000), Bcl-2 (1:800), Bax (1:800), Caspase-3 (1:1000), Cleaved Caspase-3 (1:1000)、内参 β-肌动蛋白 (β-actin) (1:2500) 4 °C 孵育过夜, 吐温-20-三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 漂洗 3 次后二抗稀释液 (1:4000) 37 °C 孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次后 DAB 显色, 通过化学发光成像系统分析蛋白条带灰度值。

1.4.7 统计学处理 采用软件 SPSS 20.0, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 one-way ANOVA 检验, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组海马神经元活力比较 与正常组比较, 模

型组海马神经元活力显著降低($P<0.05$);与模型组比较,Gen 组海马神经元活力显著升高($P<0.05$)。与 Gen 组比较,Gen + TBHQ 组海马神经元活力显著升高;Gen + ML385 组海马神经元活力显著降低($P<0.05$)(图 1)。

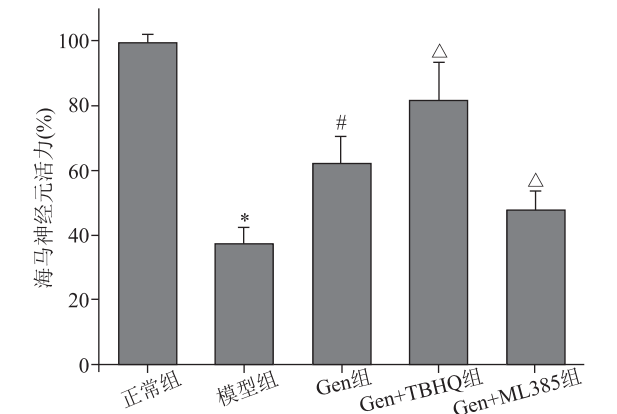


图 1 各组海马神经元活力比较($n=8$) 与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与 Gen 组比较,Δ $P<0.05$

2.2 各组海马神经元凋亡状况比较 与正常组比较,模型组海马神经元凋亡率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,Gen 组海马神经元凋亡率显著降低($P<0.05$)。与 Gen 组比较,Gen + TBHQ 组海马神经元凋亡率显著降低;Gen + ML385 组海马神经元凋亡率显著升高($P<0.05$)(图 2~3)。

2.3 各组海马神经元 ROS,MDA 水平和 SOD,CAT 活性比较 与正常组比较,模型组海马神经元

ROS,MDA 水平显著升高,SOD,CAT 活性显著降低($P<0.05$);与模型组比较,Gen 组海马神经元 ROS,MDA 水平显著降低,SOD,CAT 活性显著升高($P<0.05$)。与 Gen 组比较,Gen + TBHQ 组海马神经元 ROS,MDA 水平显著降低,SOD,CAT 活性显著升高($P<0.05$);Gen + ML385 组海马神经元 ROS,MDA 水平显著升高,SOD,CAT 活性显著降低($P<0.05$)(表 1)。

2.4 各组海马神经元 Nrf2,HO-1 蛋白表达水平比较 与正常组比较,模型组海马神经元 Nrf2,HO-1 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,Gen 组海马神经元 Nrf2,HO-1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与 Gen 组比较,Gen + TBHQ 组海马神经元 Nrf2,HO-1 蛋白表达水平显著升高;Gen + ML385 组海马神经元 Nrf2,HO-1 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)(图 4~5)。

2.5 各组海马神经元 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平比较 与正常组比较,模型组海马神经元 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低,Bax,Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl-2,Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著升高($P<0.05$);与模型组比较,Gen 组海马神经元 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高,Bax,Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低($P<0.05$)。与 Gen 组比较,Gen + TBHQ 组海马神经元 Bcl-2 蛋白表达水

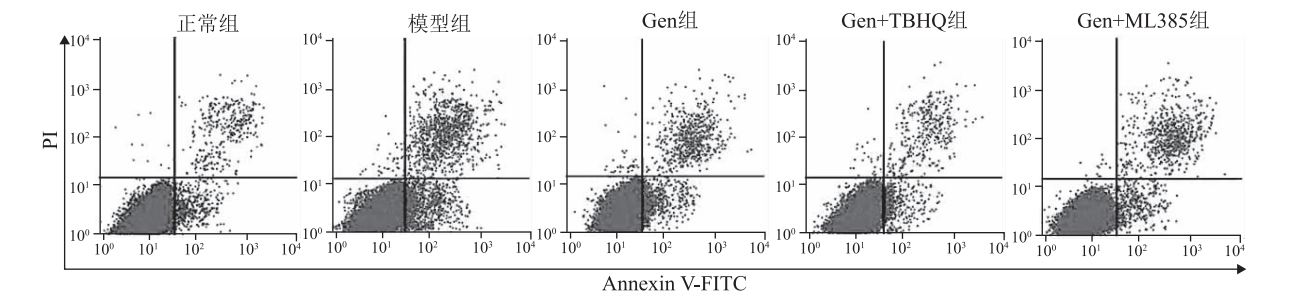


图 2 各组海马神经元凋亡状况比较

| 表 1 各组海马神经元 ROS,MDA 水平和 SOD,CAT 活性比较($\bar{x}\pm s,n=8$) | | | | |
|--|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 组别 | ROS($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | MDA(nmol/mg) | SOD(U/mg) | CAT(U/mg) |
| 正常组 | 96.24 \pm 11.30 | 4.27 \pm 0.68 | 24.85 \pm 3.91 | 37.03 \pm 5.17 |
| 模型组 | 258.06 \pm 34.92* | 12.42 \pm 1.57* | 11.73 \pm 2.04* | 14.59 \pm 2.16* |
| Gen 组 | 169.13 \pm 20.51# | 8.06 \pm 1.09# | 16.50 \pm 2.47# | 23.76 \pm 3.50# |
| Gen + TBHQ 组 | 128.54 \pm 14.73Δ | 6.19 \pm 0.85Δ | 20.37 \pm 3.18Δ | 31.08 \pm 4.23Δ |
| Gen + ML385 组 | 207.92 \pm 28.46Δ | 10.35 \pm 1.26Δ | 13.48 \pm 2.11Δ | 18.24 \pm 2.51Δ |

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与 Gen 组比较,Δ $P<0.05$

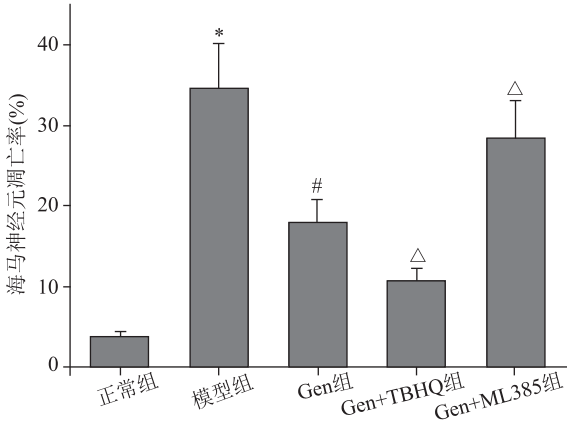


图3 各组海马神经元凋亡率比较($n=8$) 与正常组比较, $*P<0.01$;与模型组比较, $#P<0.05$;与 Gen 组比较, $\Delta P<0.05$

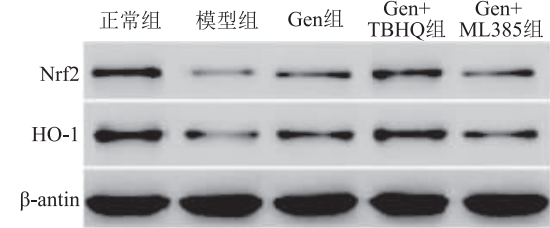


图4 各组海马神经元 Nrf2, HO-1 蛋白表达水平比较

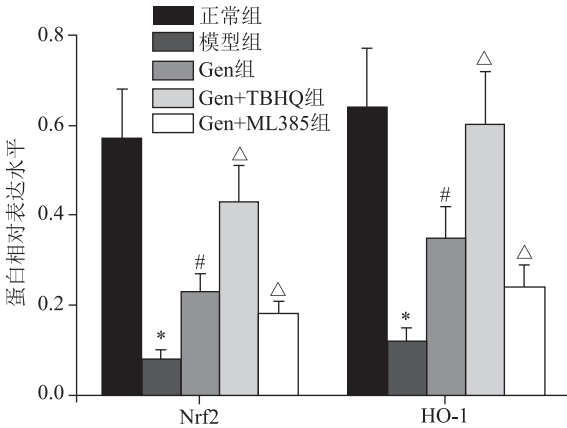


图5 各组海马神经元 Nrf2, HO-1 蛋白表达水平比较($n=8$) 与正常组比较, $*P<0.01$;与模型组比较, $#P<0.05$;与 Gen 组比较, $\Delta P<0.05$

平明显升高, Bax, Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低 ($P<0.05$); Gen + ML385 组海马神经元 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, Bax, Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著升高 ($P<0.05$) (图6~8)。

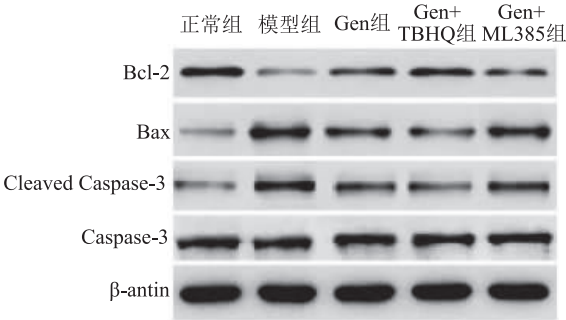


图6 各组海马神经元 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平比较

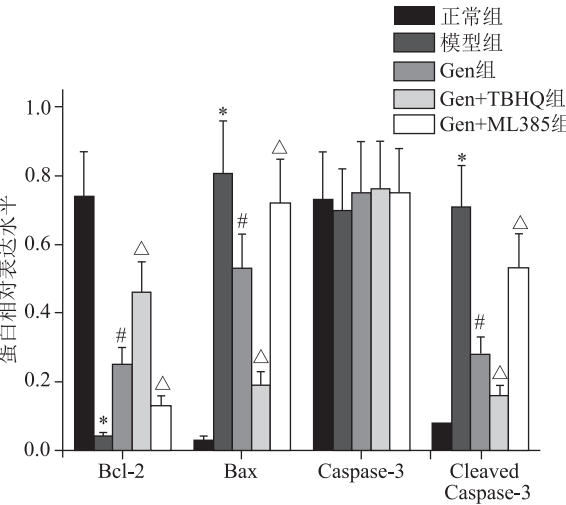


图7 各组海马神经元 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平比较($n=8$) 与正常组比较, $*P<0.01$;与模型组比较, $#P<0.05$;与 Gen 组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

脑缺血再灌注引发神经元损伤是导致患者神经功能障碍甚至死亡的主要病理机制,其中海马神经元对缺血再灌注极为敏感。胎鼠神经元分化程度低、增殖能力强、存活率高,是脑部疾病及相关药物研究常用的神经元来源。本研究取大鼠(妊娠 18 d)胎鼠海马神经元制备 H/R 损伤模型以模拟在体 CIRI,结果显示 H/R 损伤后海马神经元活力显著降低,与 Hannan 等^[13]研究报道一致。经 Gen 预处理能够显著提高 H/R 损伤后海马神经元活力,提示 Gen 对海马神经元 H/R 损伤具有保护作用。这与 Li 等^[14]报道 Gen 对人胃上皮细胞 H/R 损伤具有保护作用的研究结果相似。

随着病理学研究的不断深入,已证实氧化应激损伤和神经元凋亡是 CIRI 进行性加重的关键因

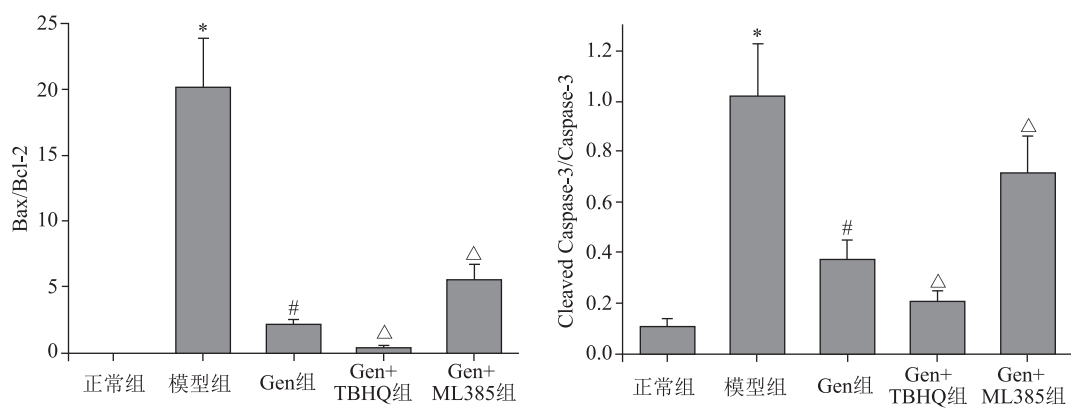


图 8 各组海马神经元 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达水平比值比较 (n = 8) 与正常组比较, * P < 0. 01; 与模型组比较, # P < 0. 05; 与 Gen 组比较, Δ P < 0. 05

素^[15]。脑缺血及再灌注过程破坏线粒体有氧呼吸电子传递链,导致 ROS 大量产生并消耗 SOD,CAT 等内源性抗氧化酶,破坏 ROS“生成-还原清除”动态平衡,不能被及时清除的 ROS 将攻击生物膜脂质双分子层并生成有生物学毒性的 MDA,即氧化应激损伤^[16],并且 ROS 可破坏结构蛋白、核蛋白、DNA 等大分子结构而导致细胞凋亡^[17-18]。本研究发现,经 Gen 预处理能够显著降低 H/R 损伤后海马神经元 ROS,MDA 水平并显著提高 SOD,CAT 活性,显著降低 H/R 损伤后海马神经元凋亡率,提示 Gen 具有抑制 H/R 损伤后海马神经元氧化应激损伤和神经元凋亡的作用,这可能是 Gen 能够对海马神经元 H/R 损伤起到保护作用的重要机制。这与 Guo 等^[19]报道 Gen 可通过抑制氧化应激和神经元凋亡来减轻阿尔兹海默病神经元损伤的结果相似。

Nrf2 是参与调控“氧化-还原”平衡的重要因子,在氧化应激应答反应中发挥着关键作用。静息状态下 Nrf2 通过 Neh2 结构域与 Keap-1 结合而无生物活性。ROS 可以刺激“Nrf2-Keap-1”复合体解离和 Nrf2 活化,活化 Nrf2 核转位后与抗氧化反应元件 (Antioxidant reaction element, ARE) 结合而促进 SOD,CAT 等抗氧化酶转录表达,从而减轻氧化应激损伤^[20]。HO-1 是 Nrf2 下游靶蛋白,为血红素降解限速酶,血红素降解产物中胆绿素、CO 等均具有抗氧化作用,被视为较好的内源性抗氧化剂^[21]。细胞凋亡受多种蛋白调控,其中定位于线粒体膜的 Bax 和 Bcl-2 是线粒体凋亡途径的关键调控蛋白,Bax 可提高线粒体膜转运孔 (Mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放度而促进细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt C) 释放入细胞质,

Cyt C 可剪切活化 Caspase-3,而 Cleaved Caspase-3 为细胞凋亡关键启动蛋白^[22]。Bcl-2 抑制 mPTP 开放度升高以及 Cyt C 释放,Bcl-2 能够与 Bax 形成无活性的“Bax-Bcl-2”二聚体,故 Bcl-2 表现为抑凋亡作用^[23]。本研究发现,经 Gen 预处理能够显著提高 H/R 损伤后海马神经元 Nrf2,HO-1, Bcl-2 表达水平,显著降低 Bax、Cleaved Caspase-3 表达水平及 Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值,提示 Gen 对 H/R 损伤后海马神经元氧化应激损伤和神经元凋亡的抑制作用可能与上调 Nrf2/HO-1 信号通路有关。这与 Jia 等^[24]研究报道相似。为了验证上述推论,本研究设置了 Gen + TBHQ (Nrf2 激动剂) 组和 Gen + ML385 (Nrf2 抑制剂) 组,结果显示 TBHQ 可明显增强 Gen 对 H/R 损伤后海马神经元活力、凋亡率、氧化应激指标以及 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达的调控作用;ML385 则明显逆转 Gen 对 H/R 损伤后海马神经元的上述调控作用,从而进一步证实了 Gen 对 H/R 损伤后海马神经元的保护作用可能与其上调 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

综上所述,Gen 对海马神经元 H/R 损伤具有保护作用,其机制可能与 Gen 上调 Nrf2/HO-1 信号通路,进而抑制氧化应激和神经元凋亡有关。本研究结果为 Gen 做为 CIRI 防治药物提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 李素萍,许飞,余能伟,等. 莪术醇通过减轻大鼠氧化应激和海马神经元凋亡、抑制 JNK1 的活化保护大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 时珍国医国药,2022,33(6): 1317-1322.

[2] Meng LL,Zhang YT,Li DM, et al. TIMP3 attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress in

neurocytes by regulating the AKT pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3):973.

[3] 高原, 于文慧, 张美君, 等. Nrf2/HO-1 信号通路 with 缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2020, 26(4): 776-778.

[4] Yang Y, He B, Zhang XC, et al. Geraniin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neuronal apoptosis via regulation of the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:2152746.

[5] Xu L, Gao Y, Hu M, et al. Edaravone dextran protects cerebral ischemia reperfusion injury through activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in mice[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2022, 36(5):790-800.

[6] Siriviriyakul P, Sriko J, Somanawat K, et al. Genistein attenuated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in L-arginine induced acute pancreatitis in mice[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1):208.

[7] Ding QC, Pi AW, Hao LY, et al. Genistein protects against acetaldehyde-induced oxidative stress and hepatocyte injury in chronic alcohol-fed mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(4): 1930-1943.

[8] Siriviriyakul P, Werawatganon D, Phetnoo N, et al. Genistein attenuated gastric inflammation and apoptosis in helicobacter pylori-induced gastropathy in rats[J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1):410.

[9] 贾强, 王元元, 刘小粉, 等. 金雀异黄酮对糖尿病大鼠心肌 Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2019, 44(8):850-856.

[10] Li Y, Zhang JJ, Chen RJ, et al. Genistein mitigates oxidative stress and inflammation by regulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2):32.

[11] 张霜梅, 祝维峰, 王安荣, 等. 红景天苷通过 Nrf2-HO-1 保护 A β 25-35 诱导的原代皮层神经元损伤[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1):101-106, 后插 19-后插 24.

[12] 张亚苹, 隋海娟, 闫恩志. 迷迭香酸通过激活 Nrf2/HO-1 通路对 A β 1-42 所致星形胶质细胞损伤的保护作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(1):22-30.

[13] Hannan MA, Haque MN, Mohibullah M, et al. Gelidium amansii attenuates hypoxia/reoxygenation-induced oxidative injury in primary hippocampal neurons through suppressing GluN2B expression[J]. *ANTIOXIDANTS*, 2020, 9(3):223.

[14] Li Y, Zhang JF, Zhang YM, et al. The protective effect of genistein postconditioning on hypoxia/reoxygenation-induced injury in human gastric epithelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(5):576-581.

[15] Song LG, Mu LY, Wang HL. MicroRNA-489-3p aggravates neuronal apoptosis and oxidative stress after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(6):14047-14056.

[16] Pei HY, Liu SL, Zeng JN, et al. Ros-mediated mitochondrial oxidative stress is involved in the ameliorating effect of ginsenoside GSLs on chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 15(3):675-688.

[17] Ming SX, Tian J, Ma K, et al. Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS-NF- κ B signalling pathway in renal tubular epithelial cell[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1):88.

[18] Chen X, Zhao Y, Luo W, et al. Celastrol induces ROS-mediated apoptosis via directly targeting peroxiredoxin-2 in gastric cancer cells[J]. *Theranostics*, 2020, 10(22):10290-10308.

[19] Guo JB, Yang GQ, He YQ, et al. Involvement of α 7nAChR in the protective effects of genistein against β -amyloid-Induced oxidative stress in neurons via a PI3K/Akt/Nrf2 pathway-related mechanism[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, 41(2):377-393.

[20] Ma K, Wu HY, Wang SY, et al. The keap1/Nrf2-ARE signaling pathway is involved in atrazine induced dopaminergic neurons degeneration via microglia activation[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 226:112862.

[21] Liu XT, Lin X, Zhang SY, et al. Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(8):2016-2036.

[22] Xia XH, Wang S, Wu LR, et al. TIPE2 attenuates neuroinflammation and brain injury through Bcl-2/Bax/cleaved Caspase-3 apoptotic pathways after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Brain Res Bull*, 2022, 191:1-8.

[23] Miao JX, Huang ZJ, Liu S, et al. Hydroxytyrosol protects against myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1):671-678.

[24] Jia H, Chen Y, Liu Y. TGR5 overexpression mediated by the inhibition of transcription factor SOX9 protects against hypoxia-/reoxygenation-induced injury in hippocampal neurons by activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(22):1245-1257.

(2023-07-15 收稿)

欢迎征订 欢迎投稿 欢迎垂询广告业务