

· 基础研究 ·

## 紫草素通过抑制氧化应激和神经炎症在脑外伤后发挥神经保护作用

朱海燕<sup>1</sup>, 赵晓晶<sup>1,2</sup>, 宋晶晶<sup>1</sup>, 张志远<sup>1\*</sup>, 王晓亮<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学基础医学院病理学系, 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>南京医科大学附属江宁医院病理科, 江苏 南京 211166; <sup>3</sup>南京医科大学附属南京医院麻醉科, 江苏 南京 210006

**[摘要]** 目的:探究紫草素是否在创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)后发挥神经保护作用及其潜在机制。方法:将40只小鼠随机分为假手术组(Sham组), 脑外伤组(TBI组), 脑外伤+1 mg/kg紫草素组(TBI+SK 1 mg/kg), 脑外伤+5 mg/kg紫草素组(TBI+SK 5 mg/kg)。构建创伤性颅脑损伤模型, 并检测神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS), Beam-walk平衡木实验检测小鼠运动功能;免疫荧光观察神经元的凋亡数量, 伊文思蓝染色检测血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的完整性, Western blot和RT-PCR观察炎症水平(NLRP3/ASC/caspase1/IL-1 $\beta$ )的变化等。ELISA试剂盒检测损伤皮质周围水肿带氧化应激水平标志活性氧(reactive oxygen species, ROS)、脂质过氧化物(lipid peroxides, LPO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)以及抗氧化酶如超氧化物歧化酶(superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)活性的变化。体外培养神经元细胞系 Neuro-2a(N2a)细胞和小胶质细胞系 BV2 细胞, 并使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激模拟TBI后颅内炎性环境。紫草素治疗后, 通过 Western blot 检测 BV2 细胞炎症水平的变化, 并通过流式细胞术检测 LPS 刺激后 N2a 细胞凋亡的变化情况。结果:紫草素处理后可改善脑外伤后 mNSS, 发挥神经保护作用。紫草素可以抑制 ROS、LPO、MDA 的水平, 促进 SOD、GPx 的升高, 改善脑外伤后的氧化损伤。紫草素可以显著抑制脑外伤后的 NF- $\kappa$ B/NLRP3 的炎症激活, 抑制损伤周围水肿带的小胶质细胞的激活。结论:紫草素可以抑制氧化应激, 抑制 NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号激活, 减少凋亡, 在脑外伤后发挥神经保护作用。

**[关键词]** 创伤性颅脑损伤;紫草素;神经炎症;氧化应激

**[中图分类号]** R743.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2022)08-1055-00

**doi:**10.7655/NYDXBNS20220802

## Shikonin exerts neuroprotective effects by anti-oxidative stress and inhibiting inflammation after brain trauma

ZHU Haiyan<sup>1</sup>, ZHAO Xiaojing<sup>1,2</sup>, SONG Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Zhiyuan<sup>1\*</sup>, WANG Xiaoliang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Department of Pathology, Jiangning Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 211166; <sup>3</sup>Department of Anesthesiology, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

**[Abstract]** **Objective:** To explore the neuroprotective effects and the underlying mechanisms of shikonin (SK) after traumatic brain injury (TBI). **Methods:** Forty C57BL/6 mice were randomly assigned to 4 groups as follows: sham operation group (Sham group), TBI group, TBI + 1 mg/kg shikonin group (TBI+SK 1 mg/kg), TBI + 5 mg/kg shikonin group (TBI+SK 5 mg/kg). The modified neurological severity scores (mNSS) and the apoptosis of neurons after TBI (Neuron/TUNEL) was observed, the integrity of the blood brain barrier (BBB) was detected by Evans blue staining. Moreover, we used Western blot and RT-PCR to determine the expression of NLRP3/ASC/IL-1 $\beta$ /Caspase1 and detected the changes in the levels of oxidative stress markers including ROS, LPO, MDA and antioxidant enzymes which includes SOD and GPx in the edema zone around the cortical injury. The Neuro-2a cell line and BV2 cell line were cultured *in vitro*, stimulated by LPS to establish the inflammatory environment. We used Western blot to observe the inflammatory response of BV2

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81771171);南京市卫生科技发展专项(YKK19076)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zzy@njmu.edu.cn; wxl145381@163.com

cells and observed that the changes of neuronal apoptosis by flow cytometry. **Results:** Shikonin treatment improved mNSS after TBI and exerted neuroprotective effects. Shikonin could inhibit the level of ROS, LPO, MDA, and promoted the increase of SOD, GPx, alleviating the oxidative damage after TBI. Moreover, shikonin significantly inhibited the inflammatory activation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 after TBI, and inhibited the activation of microglia and astrocytes in the penumbra around the injury. **Conclusion:** Shikonin may play a neuroprotective effect after TBI via inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 and alleviating oxidative stress.

[Key words] traumatic brain injury; shikonin; neuroinflammation; oxidative stress

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(00): 1055-1064]

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是全球导致残疾和死亡的主要原因之一。全球每年有超过5 000万人患有TBI,由于中国以及其他发展中国家近年来工业化进程的高速发展,TBI的发病率仍在每年上升<sup>[1]</sup>。TBI的病理过程主要分为两个阶段:原发性脑损伤以及随后的继发性脑损伤。原发性脑损伤主要由机械外力引起脑组织直接损伤。最初的机械损伤可导致神经元轴突损伤、神经胶质细胞活化以及血脑屏障(blood brain barrier, BBB)破坏。继发性脑损伤的主要机制则涉及氧化应激、炎症、细胞凋亡、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)和线粒体功能障碍等。机械损伤造成的细胞死亡无法真正避免,而由多种机制驱动的继发性脑损伤则可以通过后期治疗进行干预。因此现阶段改善TBI预后的尝试主要集中在减轻导致继发性损伤恶化的分子级联反应<sup>[2]</sup>。虽然TBI的病理生理学已经得到了大量的研究<sup>[3-4]</sup>,但目前仍然缺乏有效的针对TBI的治疗药物。

TBI后活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生导致的氧化应激参与神经元的凋亡。TBI后花生四烯酸的环氧酶途径可产生大量的ROS,而由ROS引起的兴奋性毒性作用导致钙离子内流,从而引起谷氨酸受体激活导致神经元的凋亡<sup>[5]</sup>。因此,抗氧化应激和控制神经炎症在治疗TBI也具有相当的潜力<sup>[6]</sup>。不仅如此,小胶质细胞作为中枢神经最重要的固有免疫细胞和主要的效应细胞,在TBI后继发性炎症反应中发挥关键性作用。脑外伤后,小胶质细胞迅速活化,早期有助于清除坏死的细胞和促进组织的修复,但是在TBI后小胶质持续的过度激活,释放大量的炎性细胞因子并不利于TBI的修复<sup>[7]</sup>。

中医药临床疗效确切、用药相对安全、治疗方式灵活,近年来得到了越来越广泛的认可<sup>[8]</sup>。紫草是一种临床常用的中药材,其广泛的药理与临床作用备受关注。例如,紫草对肺结核合并血小板减少性

紫癜效果明显,紫草注射液可以治疗急慢性肝炎<sup>[9]</sup>。除此之外,其在抗免疫缺陷以及清除活性氧等方面也有重要作用<sup>[10]</sup>。而紫草素是一种从紫草植物根中提取的萘醌化合物,其药理作用如抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗凋亡、促进伤口愈合等,其临床作用得到了深入的研究。先前的研究表明,紫草素通过抑制核因子(NF)- $\kappa$ B信号通路对脂多糖诱导的乳腺炎发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>。在心肌缺血再灌注损伤小鼠中,紫草素可提高超氧化物歧化酶(superoxide Dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)水平,降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平,减轻氧化应激发挥保护作用<sup>[12]</sup>。在脑缺血再灌注损伤的动物模型中,紫草素可通过抑制NF- $\kappa$ B的活性及降低p38MAPK的磷酸化负向调控肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)的表达,发挥抑制神经炎症和保护血脑屏障的作用<sup>[13]</sup>。综上所述,紫草素可能针对神经系统的炎性反应,氧化应激损伤等有很好的保护作用。然而,紫草素在以上述神经病理改变为特征的TBI中的作用并无相关的研究。因此,本研究旨在阐明紫草素在TBI中的保护机制,为临床治疗TBI提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从南京医科大学实验动物中心购买8周龄的C57/B6的雌性小鼠,保证小鼠适宜温度和湿度的生存环境,光照明暗各12 h。小鼠可以自由获得食物和水。所有动物实验均经南京医科大学动物护理和使用委员会批准(伦理批文编号:IACUC-2011010)。紫草素(Shikonin,上海陶素生化有限公司);戊巴比妥钠(Sigma-Aldrich公司,美国);BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);NLRP3抗体, NeuN抗体(Novus Biologicals公司,美国);Caspase1抗体, IL-1 $\beta$ 抗体, ASC抗体(Cell signaling technology

公司,美国);GAPDH抗体,兔二抗,鼠二抗(南京 Bioworld 公司);Bax 抗体,Bcl2 抗体,Caspase3 抗体(北京 Protein tech 公司);伊文思蓝染液(Sigma-Aldrich 公司,美国);小鼠脂质过氧化物(lipid peroxides,LPO)ELISA 试剂盒,小鼠SOD活性ELISA试剂盒,GSH-Px/GPx活性检测试剂盒,小鼠ROS ELISA 试剂盒(南京翼飞雪生物科技公司);脂质过氧化检测试剂盒,细胞凋亡与坏死检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物模型构建以及实验分组

将小鼠随机分组为假手术组(Sham组),TBI模型组(TBI组),TBI+1 mg/kg紫草素组(TBI+SK 1 mg/kg组),TBI+5 mg/kg紫草素组(TBI+SK 5 mg/kg组)。对于脑外伤模型,基于先前的研究<sup>[14]</sup>,采取控制性皮质撞击程序。将小鼠置于立体定位仪上,剪开头皮后,选用便携式钻机和3.5 mm的环钻在右侧顶颞皮层进行开颅,并保证硬脑膜的完整性。紧接着,用直径为3 mm的凸起尖端以4.5 m/s的速度产生1.2 mm的凹陷,停留时间为20 ms,造成中度损伤。迅速缝合头皮后将小鼠放回笼子。假手术进行除不进行撞击外,接受了同样的手术。所有小鼠均在接受手术后1 h内恢复意识。模型成功后,紫草素腹腔注射,连续给药7 d。

### 1.2.2 行为学检测

采用Beamwalk平衡木实验检测小鼠的运动功能,滑足次数越多,表示运动功能损害越严重。

采用神经功能缺损评分(modified neurological severity score,mNSS)来评估小鼠的神经行为缺陷的严重程度。在小鼠脑外伤后24 h检测,总分18分。从运动、感觉、平衡和反射能力四个方面进行评估。mNSS得分越高,说明神经损伤越严重。

### 1.2.3 伊文思蓝染色

通过伊文思蓝外渗实验检测小鼠血脑屏障的完整性和脑水肿程度。在小鼠造模后第7天进行,尾静脉注射100  $\mu$ L的2%的伊文思蓝溶液(4 mL/kg),2 h后观察到小鼠的四肢及眼球结膜变蓝,即注射成功。再用1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉,经心脏灌注约20 mL的磷酸盐缓冲液。取脑称重,拍照,避光置于甲酰胺溶液中匀浆,然后置于60  $^{\circ}$ C恒温水浴孵育24 h,16 000 g离心30 min,取上清。使用分光光度计检测上清在620 nm处的光密度值。

### 1.2.4 免疫荧光和TUNEL染色

用上述同样方式灌注取脑,置于福尔马林溶液

(90%水,10%甲醛)中24 h。在4  $^{\circ}$ C 30%的蔗糖溶液连续脱水3 d,每24 h更换新的蔗糖溶液,保证脑组织充分脱水。包埋后将标本切成10  $\mu$ m厚度的冰冻切片。使用含有5% BSA(胎牛血清)的PBST封闭1 h,加入一抗4  $^{\circ}$ C过夜孵育,二抗室温避光孵育2 h后,滴加DAPI封片剂封片,立即拍片或者置于4  $^{\circ}$ C避光保存。TUNEL染色先选用Tunel Bright-Green凋亡检测试剂盒(A112-01,南京诺维赞公司)检测小鼠神经元的凋亡水平,按照试剂盒说明书先进行TUNEL染色后再进行同上操作的神经元染色。切片使用共聚焦显微镜(Zeiss,LSM800)拍摄。

### 1.2.5 Western blot检测相关蛋白表达

取小鼠大脑损伤皮质区周围水肿带组织,约15 mg,置于1.5 mL离心管后置于液氮中低温速冻。用RIPA裂解液裂解匀浆,再用BCA蛋白定量后,用10%和15%的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,转膜,含5%脱脂奶粉溶液的封闭液封闭,孵育一抗、二抗后,用化学发光(ECL)试剂检测蛋白质条带。GAPDH作为内参,用Image J进行分析。

### 1.2.6 实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测

取小鼠大脑损伤皮质区周围水肿带组织,置于1.5 mL离心管后置于液氮中低温速冻。用TRIzol试剂(TaKaRa公司,日本)对样本进行总RNA提取,再用逆转录试剂盒(南京诺维赞公司)在42  $^{\circ}$ C 60 min,85  $^{\circ}$ C 5 s条件下进行cDNA合成,用Light Cycler 96实时荧光定量仪器(Roche公司,瑞士)进行cDNA扩增。总反应采用20  $\mu$ L体系:2  $\mu$ L引物、3  $\mu$ L超纯水、5  $\mu$ LcDNA、10  $\mu$ L qPCR Master Mix (Without ROX)(南京诺维赞公司)在95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 10 s,72  $^{\circ}$ C 20 s条件下进行40个循环。同样,GAPDH作为内参基因,mRNA的水平用相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行比较。引物如下:突触素(SYP),上游5'-TTCAAG-GAGCTAACTAACGA-3',下游3'-CGTCACGAAGT-CCAGCAAGA-5';Bax,上游5'-TGAAGACAGGG-GCCTTTTTG-3',下游3'-AATTCGCCGGAGACAC-TCG-5';Bcl2,上游5'-GTCGCTACCGTCGTGACTTC-3',下游3'-CAGACATGCACCTACCCAGC-5';Caspase3 上游5'-ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT-3',下游3'-TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC-5';GAPDH上游5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3',下游3'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-5'。

### 1.2.7 小鼠ROS、LPO和SOD活性检测

取小鼠大脑损伤皮质区周围水肿带组织,并置于100  $\mu$ L的PBS溶液种。将组织充分匀浆后,参照

小鼠 ROS ELISA 试剂盒、小鼠 LPO ELISA 试剂盒、小鼠 SOD 活性 ELISA 试剂盒说明书进行标准曲线的绘制以及实验操作。在酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),样品中 ROS、LPO 和 SOD 活性的浓度由标准曲线计算得出。

### 1.2.8 脂质氧化检测

采用脂质过氧化检测试剂盒测定小鼠脑中 MDA 含量。取小鼠组织上清液 100  $\mu\text{L}$ ,与 MDA 检测工作液 200  $\mu\text{L}$  混匀,并于 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 15 min,冷却至室温后,取 200  $\mu\text{L}$  上清加入到 96 孔板中,在酶标仪 532 nm 波长处测定吸光度(OD 值),根据标准曲线计算 MDA 含量。

### 1.2.9 Neuro-2a 细胞系和 BV2 细胞系培养以及干预

Neuro-2a 细胞系是小鼠来源神经瘤母细胞, BV2 细胞系是小鼠源性永生化的小胶质细胞。细胞选用含 10% 的胎牛血清和 100 U/mL 的青霉素, 0.1 mg/mL 的链霉素的 DMEM 培养基在 T75 细胞培养瓶中进行培养。按照 12 孔板每孔  $1 \times 10^5$ , 6 孔板  $1 \times 10^6$  的密度进行铺板。铺板后,随机分为 Control 组,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组, LPS+SK(0.3、1.0、3.0、10.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )组。LPS 组:LPS 刺激 12 h; LPS+SK 组:在 LPS 刺激 12 h 后再给予不同浓度的紫草素(0.3、1.0、3.0、10.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )孵育 30 min。处理结束后收细胞,进行后续实验。

### 1.2.10 凋亡检测

采用细胞凋亡与坏死检测试剂盒检测神经元细胞 Neuro-2a 细胞的凋亡情况。首先,将状态良好的神经元细胞 Neuro-2a 细胞系铺板至 12 孔板,分为 Control 组, LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组, LPS+SK 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  组, LPS+SK 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  组,处理完成后,收集细胞至流式管中,1 000 r/min, 5 min 离心,弃上清,再用 PBS 清洗 2 遍,避光加入 1 mL Annexin V-FITC 检测工作液,室温孵育 10 min 后,立即用流式细胞仪检测。

### 1.3 统计学方法

每组实验均为 3 次以上独立实验。所有数据采用 Graphpad prism 8.0 软件进行统计学分析,数据均以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

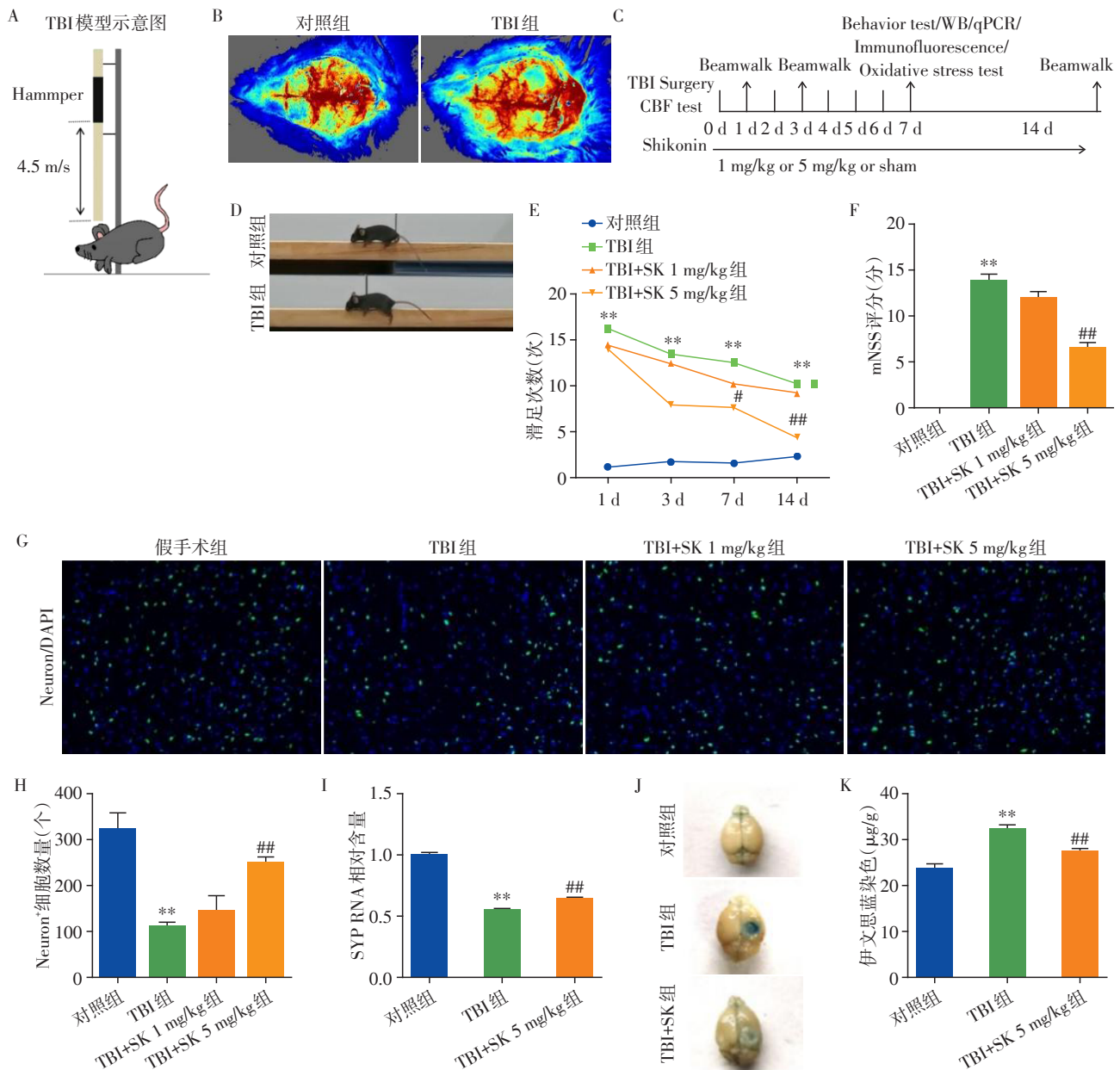
### 2.1 紫草素可改善小鼠脑外伤后神经功能缺陷

如图 1A 所示,采用控制性皮质撞击程序构建小鼠脑损伤模型。采用激光多普勒监测脑微循环系

统的血液灌注量。打击后,小鼠损伤区域立即出现血液灌注量减少(图 1B),提示造模成功。后续动物实验流程如图 1C 所示。我们发现, TBI 后 1、3、7、14 d,小鼠滑足次数都明显增多。而紫草素处理 7 d 以及 14 d 后,低剂量(1 mg/kg)的改善效果不显著,高剂量(5 mg/kg)下可以显著减少滑足的次数,提示紫草素可以改善小鼠 TBI 后的运动功能( $P < 0.05$ ,图 1D~E)。此外,对小鼠进行 mNSS 评分,相对于 1 mg/kg 低剂量的轻微改善效果,5 mg/kg 高剂量的紫草素显著地改善了小鼠的神经行为缺陷( $P < 0.05$ ,图 1F)。既往研究表明, TBI 后神经元大量丢失是造成脑外伤后认知和运动功能障碍的主要原因,所以我们进一步检测了神经元丢失的情况。与对照组相比, TBI 组损伤皮质周围水肿带的神经元数量显著减少。同样,高剂量紫草素(5 mg/kg)处理可以显著逆转这一现象( $P < 0.05$ ,图 1G~H)。基于此,以下对组织的进一步检测和分析,均采用 5 mg/kg 高剂量组的动物。SYP 作为脑内突触的特异性标记,在 TBI 后其 mRNA 水平显著降低,而紫草素处理后升高,提示了紫草素可以促进神经元的结构完整性( $P < 0.05$ ,图 1I)。为进一步探究紫草素针对血脑屏障损伤的保护作用,采用伊文思蓝渗透实验评估血脑屏障的完整性,结果发现,紫草素处理可以显著改善 TBI 后导致的血脑屏障的破坏( $P < 0.05$ ,图 1J~K)。

### 2.2 紫草素抑制小鼠脑外伤后的神经元凋亡

进一步研究发现, TBI 后小鼠皮质损伤周围水肿带凋亡的神经元数量显著增加,而紫草素治疗后可以改善这一现象(图 2A、B)。为了进一步探究紫草素对于脑外伤神经元凋亡的改善作用,我们检测了 2 种重要的凋亡相关蛋白,即 Bax 和 Bcl2 的表达情况。TBI 后 Bax 的表达显著上调, Bcl2 的表达显著下调,而紫草素可以促进 Bcl2 的表达,并抑制 Bax 的表达( $P < 0.05$ ,图 2C~E)。同时, TBI 后促进了凋亡关键调控蛋白 Caspase3 以及剪切体 p-Caspase3 的表达,而紫草素处理后显著抑制 TBI 诱导的 Caspase3 的增加( $P < 0.05$ ,图 2C、F)。平行的 mRNA 水平的检测也验证了上述的结果( $P < 0.05$ ,图 2G~I)。依据已有的实验研究, TBI 后持续的炎症反应是继发性损伤的重要因素,我们采用 LPS 刺激广泛使用的神经元细胞系 N2a 模拟 TBI 后的脑内炎症环境。体外实验结果显示, LPS 处理可以诱导 N2a 细胞的凋亡增加,但是紫草素处理可以显著抑制 LPS 诱导的细胞凋亡,促进细胞的存活( $P < 0.05$ ,图 2J~K),提



A: 小鼠TBI模型示意图; B: 小鼠TBI造模后即刻检测脑血流变化, 皮质打击位置出现血流阻滞( $n=3$ ); C: 实验设计, 所有小鼠在第7天进行行为学检测以及取材检测; D~F: 高剂量可以显著改善小鼠的运动功能和mNSS评分( $n=5$ ); G~H: 小鼠脑片代表性荧光染色( $\times 20$ )及统计结果( $n=3$ ), 对照组神经元数目正常, TBI组神经元丢失严重, SK 5 mg/kg 治疗后神经元丢失减轻; I: RT-PCR 检测 SYP 的水平( $n=3$ ); J~K: 伊文思蓝染色检测血脑屏障完整性( $n=3$ )。与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与TBI组比较, \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

图1 紫草素对小鼠脑外伤后神经功能的影响

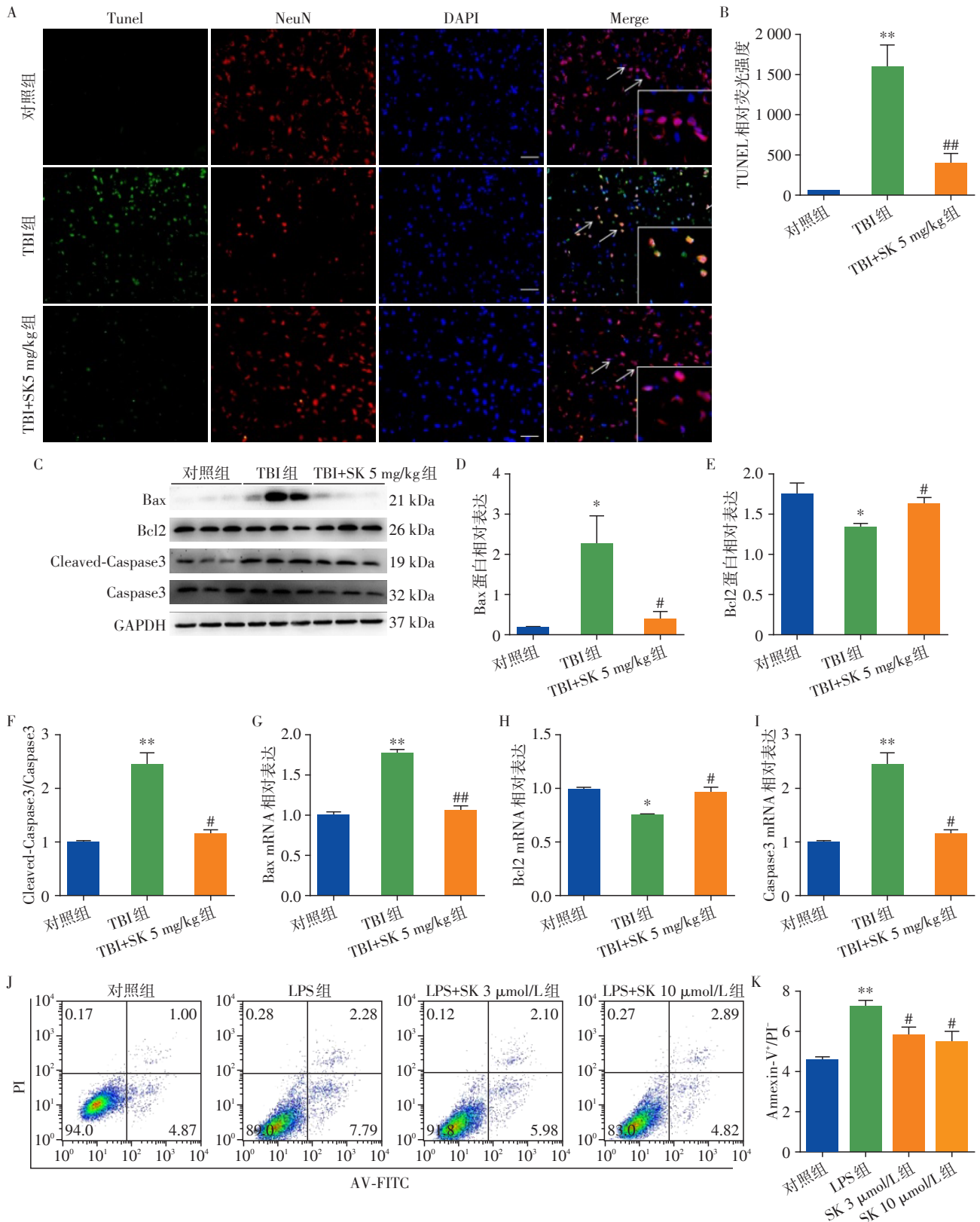
Figure 1 The effect of shikonin on neurological function after traumatic brain injury in mice

示紫草素在体外实验中可以发挥保护神经元的作用。综上, 紫草素在脑外伤后对于神经凋亡具有保护作用。

### 2.3 紫草素改善脑外伤后的氧化应激

氧化应激指标中, MDA是氧自由基水平的可靠指标, 而SOD及GPx是机体抵抗氧化应激的能力及清除活性氧的重要指标。我们发现, TBI后脑中的ROS含量增多, 紫草素处理可以逆转这一改变( $P <$

0.05, 图3A)。进一步检测氧化应激标志物MDA、LPO和抗氧化酶活性SOD、GPx的水平, 如图3B~C所示, TBI后MDA、LPO的水平显著升高, 抗氧化酶水平降低, 经过紫草素处理后, 这些过氧化物的升高得到显著抑制( $P < 0.05$ )。相反, 在经过紫草素治疗后, 抗氧化酶的活性得到显著的升高( $P < 0.05$ , 图3D~E)。SOD、硫氧还原蛋白2(Thioredoxin 2, TRX2)蛋白水平的表达也验证了上述结果( $P < 0.05$ ,



A~B: TUNEL 染色( $\times 20$ )及统计结果( $n=3$ )显示, TBI 后小鼠脑内损伤水肿带凋亡的神经元数量增多, 紫草素处理后显著改善; C~F: Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2 以及 Caspase3 的水平变化以及统计结果( $n=3$ ); G~I: RT-PCR 检测 Bax、Bcl2 以及 Caspase3 的基因水平变化( $n=4$ ); J~K: 凋亡试验及统计结果( $n=3$ ), 体外培养 N2a 细胞系, LPS 处理 12 h 后凋亡的细胞数量大量增加, 紫草素浓度梯度处理后细胞凋亡数量减少。与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 TBI/LPS 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

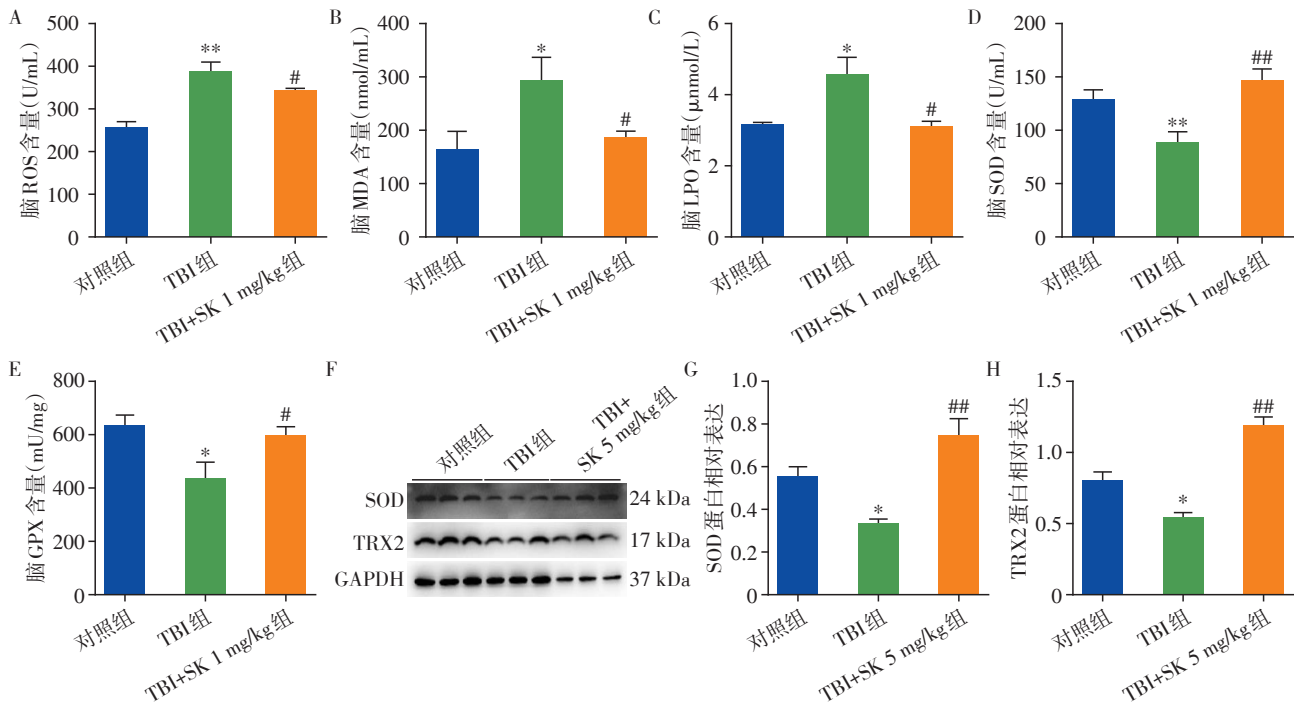
图2 紫草素对小鼠脑外伤后神经元凋亡的影响

Figure 2 The effect of shikonin on neuronal apoptosis after traumatic brain injury in mice

图3F~H)。以上结果表明,紫草素可以促进抗氧化剂的表达,中和升高的ROS,发挥抗氧化应激的作用,从而对神经元凋亡具有保护作用。

#### 2.4 紫草素抑制脑外伤后NF- $\kappa$ B/NLRP3炎症通路的激活

本研究结果发现,TBI后炎症水平显著升高,损



A~E:ELISA试剂盒检测小鼠损伤皮质水肿带ROS、MDA、LPO、SOD以及GPx的含量;F~H:Western blot检测小鼠损伤皮质水肿带抗氧化应激蛋白SOD和TRX2的表达。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与TBI组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图3 紫草素对小鼠脑外伤后氧化应激水平的影响

Figure 3 The effect of shikonin on the level of oxidative stress after traumatic brain injury in mice

伤水肿带小胶质细胞激活并大量增殖,经紫草素处理后,TBI诱导的小胶质细胞活化被显著抑制( $P < 0.05$ ,图4A~B)。此外,紫草素可以显著抑制TBI后NF- $\kappa$ B的升高,不仅如此,NLRP3/ASC/Caspase1/IL-1 $\beta$ 炎症信号通路也得到显著的抑制( $P < 0.05$ ,图4C~D)。在中枢神经系统中,小胶质细胞作为TBI后参与免疫炎症反应的主要效应细胞,并且BV2细胞系作为研究中常用的小胶质细胞系,在体外试验中我们选用LPS作为第一信号,ATP作为第二信号,刺激BV2细胞系NLRP3通路的激活,模拟TBI体内炎症环境。结果显示,紫草素可以显著抑制BV2细胞系的NLRP3以及Caspase1的表达,并有效地抑制炎症反应。以上证明紫草素可以通过抑制NF- $\kappa$ B/NLRP3通路的激活,缓解TBI后的神经炎症。

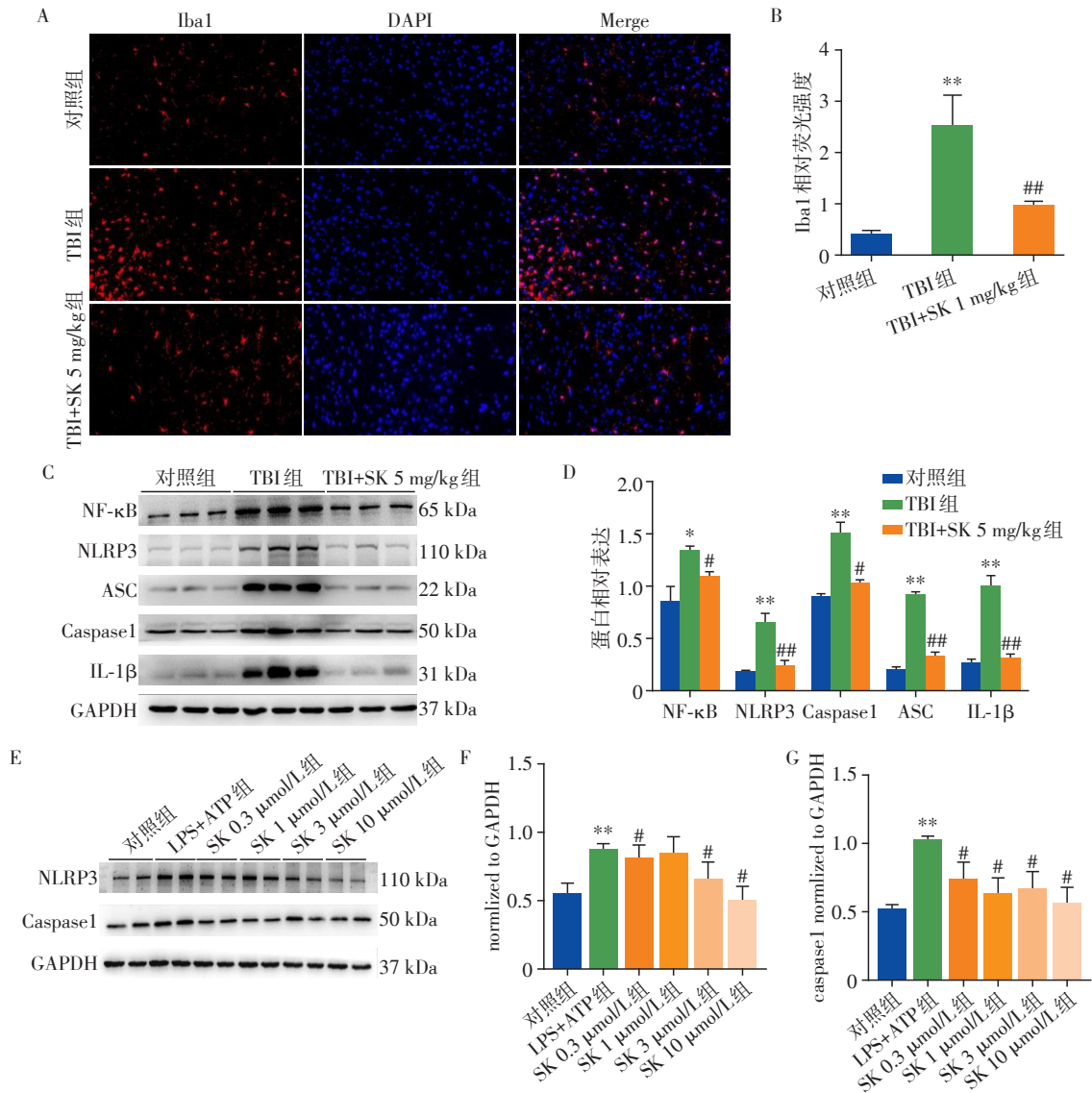
### 3 讨论

综上所述,我们发现紫草素可抑制氧化应激,神经炎症和减少神经元凋亡,从而显著改善创伤性

脑损伤后神经功能损伤。机制上,我们的研究结果提示,紫草素可能通过抑制氧化应激及NF- $\kappa$ B/NLRP3的激活,进而改善创伤性脑损伤后的神经炎症及凋亡。

紫草素是紫草根中提取的主要生物活性成分,此前研究表明其具有抗癌、抗炎、促进伤口愈合等多重药理作用。在多种急性炎症动物模型中,紫草素被证实可通过减少炎症因子的合成及分泌发挥抗炎作用。最新研究表明,紫草素可通过抗氧化应激和抑制线粒体途径介导的细胞凋亡减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HT29细胞氧化损伤<sup>[15]</sup>。但目前尚无研究指出紫草素在创伤性颅脑损伤的保护作用及相关机制。

氧化应激作为TBI后主要的继发性损伤机制,可以引起多种级联反应,如炎症和细胞凋亡,进一步加速脑损伤<sup>[16]</sup>。脑外伤后ROS过量产生导致的氧化应激参与神经元的凋亡<sup>[16]</sup>。氧化应激是由ROS(如单线态氧、过氧化氢、羟基自由基和超氧化物)产生和降解引起的,进而导致氧化-抗氧化的失衡。在脑外伤发生后,抗氧化能力受限,无法及时



A~B: 各组小鼠脑片 Iba1 荧光染色( $\times 20$ )标记活化的小胶质细胞及统计结果( $n=3$ ); C~D: Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 和 NLRP3/ASC/Caspase1/IL-1 $\beta$  通路及统计结果; E~G: 体外培养 BV2 细胞系及统计结果( $n=4$ ), LPS 处理 12 h 后 NLRP3/Caspase1 的表达上升, 而紫草素处理后表达下降。与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 TBI/LPS 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

图4 紫草素对小鼠脑外伤后NF- $\kappa$ B/NLRP3通路的影响

Figure 4 The effect of shikonin on NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway after brain trauma in mice

清除产生的 ROS, 导致蛋白质氧化, 抑制线粒体电子传递链, 并切割 DNA, 导致神经元细胞死亡<sup>[17]</sup>。因此, 脑组织可能因过度氧化应激而受损。MDA 和 LPO 被认为是脂质过氧化的指标<sup>[18]</sup>。其水平在脑外伤后增加, 紫草素处理后可以抑制 MDA、LPO 水平的上调。此外, 重要的抗氧化酶, 包括 SOD 和 GPx, 可以防止大脑氧化损伤<sup>[19]</sup>, 其在脑损伤后表达降低, 紫草素处理后升高。我们的研究结果提示, 紫草素治疗可提高 TBI 后的 SOD 和 GPx 水平, 降低 MDA、LPO 水平, 减轻脑外伤后的氧化应激, 对 TBI 具有保护作用。

NF- $\kappa$ B 信号通路通过诱导促炎细胞因子基因转录, 在炎症相关疾病中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。在脑外伤后 24 h 内, 血脑屏障功能失调, 循环中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞浸润受损的脑实质, 快速产生炎症反应<sup>[21]</sup>。有证据表明, 早期炎症会导致神经元损伤并加重脑外伤<sup>[22]</sup>, 这表明炎症是继发性脑外伤的重要介质。研究发现, 紫草素可以抑制 TBI 诱导的 NF- $\kappa$ B 的活化和促炎细胞因子的分泌, 减轻 TBI 后的炎症反应。

TBI 后持续的炎症反应会在脑中形成炎性微环境, 并伴随小胶质细胞活化和增殖, 加重 TBI 的病理



进程<sup>[23]</sup>。有研究报道紫草素具有抑制NF- $\kappa$ B的作用<sup>[24]</sup>,而NF- $\kappa$ B/NLRP3通路是炎症反应的主要途径。因此,本文猜测紫草素是否可以抑制TBI后NF- $\kappa$ B/NLRP3通路激活。NLRP3炎性小体作为NF- $\kappa$ B的下游介质,以Caspase1依赖性方式激活促炎细胞因子,包括IL-1 $\beta$ ,诱导炎性细胞死亡<sup>[25]</sup>,并在TBI后发挥重要作用。NLRP3炎性小体是由多个蛋白组合而成的复合物,参与先天免疫反应的识别受体家族的组成<sup>[26]</sup>,是炎症反应中的重要组成部分。研究发现,紫草素处理后可以抑制TBI后的NLRP3通路的激活。提示紫草素可以抑制NF- $\kappa$ B/NLRP3通路激活,缓解炎症,对TBI发挥神经保护作用。

众所周知,细胞凋亡作为脑损伤后迟发性细胞死亡的主要方式<sup>[27]</sup>,继发性脑损伤表现出特征性的神经元凋亡<sup>[28]</sup>。而细胞凋亡依赖于Caspase3,通过外源性死亡受体或内源性线粒体途径的激活。Bax和Bcl2等促凋亡和抗凋亡因子也参与细胞凋亡。研究证实,NLRP3炎性小体的激活,可促进IL-1 $\beta$ 和IL-18的分泌<sup>[29]</sup>。这些细胞因子通过激活Bax诱导细胞凋亡。因此,NF- $\kappa$ B的激活及其对NLRP3炎性小体的激活,炎性细胞因子的大量释放,可以通过激活Bax,导致TBI小鼠的神经元的凋亡。本研究发现,在TBI模型中Bax表达明显上调,Bcl2表达下调,紫草素处理可以抑制Bax的上调,促进Bcl2的表达。并且,紫草素也可以抑制TBI后Caspase3剪切体水平的升高。提示紫草素可以抑制TBI后的神经元凋亡,发挥神经保护作用。

综上所述,紫草素可以通过抗氧化应激和抑制NF- $\kappa$ B/NLRP3信号通路激活,以及减少神经元的凋亡,在TBI后发挥神经保护作用。为临床上创伤性脑损伤的治疗提供了新的潜在治疗靶点。但本研究仍然存在一些不足,如紫草素改善创伤性颅脑损伤的确切分子机制和特异性靶点还有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] MAAS A I R, MENOD K N, ADELSON P D, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(12):987-1048

[2] PEARN M L, NIESMAN I R, EGAWA J, et al. Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(4):571-585

[3] KUMARIA A, TOLIAS C M. Is there a role for vagus nerve stimulation therapy as a treatment of traumatic

brain injury [J]. *Br J Neurosurg*, 2012, 26(3):316-320

[4] DIXON K J. Pathophysiology of traumatic brain injury [J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2017, 28(2):215-225

[5] MUSGROVE R E, HELWIG M, BAE E J, et al. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular  $\alpha$ -synuclein transfer [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9):3738-3753

[6] KYYRIÄINEN J, KAJEVU N, BAÑUELOS I, et al. Targeting oxidative stress with antioxidant duotherapy after experimental traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10555

[7] PU H, MA C, ZHAO Y, et al. Intranasal delivery of interleukin-4 attenuates chronic cognitive deficits via beneficial microglial responses in experimental traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(11):2870-2886

[8] 孙荣国,贾晓蓉.论中医药学的理论、实证与应用[J].*华西医学*, 2021, 36(10):1469-1473

[9] 刘燕,买尔旦·马合木提,尼加提·热合木.新疆紫草提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].*新疆医科大学学报*, 2006, 39(6):471-473

[10] 马生军,耿阳,马露,等.药用紫草研究进展[J].*中国现代中药*, 2021, 23(1):177-184

[11] YANG C, LIU P, WANG S, et al. Shikonin exerts anti-inflammatory effects in LPS-induced mastitis by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(1):1-6

[12] 白文伟,杨华,刘小永,等.紫草素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J].*中国免疫学杂志*, 2019, 35(16):1944-1950

[13] WANG L, LI Z, ZHANG X, et al. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1):97-106

[14] REN Y Z, ZHANG B Z, ZHAO X J, et al. Resolvin D1 ameliorates cognitive impairment following traumatic brain injury via protecting astrocytic mitochondria [J]. *J Neurochem*, 2020, 154(5):530-546

[15] GUO P, JIN Z, WANG J, et al. Irisin rescues blood-brain barrier permeability following traumatic brain injury and contributes to the neuroprotection of exercise in traumatic brain injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:1118981

[16] LUO Z, XU X, SHO T, et al. ROS-induced autophagy regulates porcine trophectoderm cell apoptosis, proliferation, and differentiation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2):C198-c209

[17] ARRA M, SWARNKAR G, KE K, et al. LDHA-mediated

ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 3427

[18] TANG Y, DONG X, CHEN G, et al. Vagus nerve stimulation attenuates early traumatic brain injury by regulating the NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2020, 34(9) : 831-843

[19] SUN Q, GONG T, LIU M, et al. Shikonin, a naphthalene ingredient: Therapeutic actions, pharmacokinetics, toxicology, clinical trials and pharmaceutical researches [J]. *Phytomedicine*, 2021, 94: 153805

[20] ZHONG Y, QI A, LIU L, et al. Shikonin attenuates H(2)O(2)-induced oxidative injury in HT29 cells via antioxidant activities and the inhibition of mitochondrial pathway-mediated apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22 (4) : 1118

[21] EHSAEI M, KHAJAVI M, ARJMAND M H, et al. Prooxidant-antioxidant balance in patients with traumatic brain injury[J]. *Acta Neurol Belg*, 2015, 115(1) : 69-73

[22] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. *Anal Biochem*, 2017, 524: 13-30

[23] WANG H, ZHOU X M, WU L Y, et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1) : 188

[24] JASSAM Y N, IZZY S, WHALEN M, et al. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift [J]. *Neuron*, 2017, 95(6) : 1246-1265

[25] CASH A, THEUS M H. Mechanisms of blood-brain barrier dysfunction in traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9) : 3344

[26] CORPS K N, ROTH T L, MCGAVERN D B. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury [J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72(3) : 355-62

[27] CHEN J, CHEN Z J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 564(7734) : 71-76

[28] CHEN S, TANG C, DING H, et al. Maf1 Ameliorates Sepsis-Associated Encephalopathy by Suppressing the NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11 : 594071

[29] STOICA B A, FADEN A I. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury [J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(1) : 3-12

[30] 卢晓星, 张小强, 苗歆雨, 等. 原花青素对LPS/ATP诱导的NLRP3炎症小体激活及NF- $\kappa$ Bp65磷酸化的抑制作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(8) : 1111-1118

[收稿日期] 2021-12-23  
(本文编辑:唐震)

