

· 基础研究 ·

基于PKC/ERK通路探讨败酱总黄酮对缺氧缺血性脑病新生大鼠神经元凋亡的影响

扎西吉, 张 贇, 马凤美, 王正岭

青海省妇女儿童医院新生儿科, 青海 西宁 810000

[摘要] 目的:探究败酱总黄酮对缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)新生大鼠海马神经元凋亡的影响及其作用机制。方法:72只新生大鼠分为假手术组、模型组、白屈菜红碱组(5 mg/kg)、败酱总黄酮低剂量组(50 mg/kg)、败酱总黄酮高剂量组(100 mg/kg)、败酱总黄酮+白屈菜红碱组(100 mg/kg 败酱总黄酮+5 mg/kg 白屈菜红碱),每组12只。采用结扎右颈总动脉和低氧处理2.5 h的方法构建HIE模型。白屈菜红碱组大鼠腹腔注射白屈菜红碱,败酱总黄酮各剂量组灌胃相应剂量的败酱总黄酮,败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠在灌胃败酱总黄酮的同时腹腔注射白屈菜红碱,1次/d,连续给药7 d。通过神经功能缺损评分检测大鼠神经功能;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色观察脑组织海马区病理学变化;原位末端转移酶标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)/神经特异核蛋白(neuronal nuclei antigen, NeuN)荧光双染观察海马神经元凋亡;Western blot检测脑组织蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路及凋亡相关蛋白的表达。采用氧-葡萄糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)构建细胞模型,进行CCK-8实验和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定,以分析败酱总黄酮对原代海马神经元的神经保护作用,并采用流式细胞仪分析细胞凋亡,Western blot检测凋亡相关蛋白的表达。结果:与假手术组相比,模型组大鼠出现不同程度的神经功能缺损现象,神经功能缺损评分和NeuN⁺TUNEL⁺细胞数、脑组织Bax及Caspase-3表达显著增加,Bcl-2表达、p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}的比值显著降低($P < 0.05$),海马CA1区神经元肿胀、数量减少;与模型组相比,败酱总黄酮低、高剂量组神经功能改善,神经功能缺损评分和NeuN⁺TUNEL⁺细胞数、脑组织Bax及Caspase-3表达显著降低,Bcl-2表达、p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}的比值显著增加($P < 0.05$),海马CA1区神经元密度增加;且在败酱总黄酮干预的基础上联用白屈菜红碱可显著削弱败酱总黄酮对HIE后海马神经元凋亡的抑制作用。体外细胞实验中,败酱总黄酮显著增加OGD/R损伤后的细胞活力,逆转神经元损伤并减少海马神经元细胞凋亡,同时增加了海马神经元p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}的比值($P < 0.05$),在OGD/R诱导的原代海马神经元中验证了败酱总黄酮对PKC/ERK通路的激活。结论:败酱总黄酮可抑制HIE新生大鼠海马神经元凋亡,其作用机制可能与激活PKC/ERK通路有关。

[关键词] 败酱总黄酮;缺氧缺血性脑病;神经元凋亡;蛋白激酶C;细胞外信号调节激酶

[中图分类号] R722.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)06-786-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20230606

Exploring the effect of total flavonoids of patriniæ radix on neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy based on PKC/ERK pathway

ZHA Xiji, ZHANG Yun, MA Fengmei, WANG Zhengling

Department of Neonatology, Qinghai Women's and Children's Hospital, Xining 810000, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the effect and mechanism of total flavonoids of patriniæ radix on hippocampal neuron apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods:** Seventy-two neonatal rats were divided into sham operation group, model group, chelerythrine group (5 mg/kg), and total flavonoids of patriniæ radix low- (50 mg/kg) and high- (100 mg/kg) dose groups, total flavonoids of patriniæ radix + chelerythrine group (100 mg/kg total flavonoids of patriniæ radix + 5 mg/kg chelerythrine), with 12 rats in each group. The HIE model was constructed by ligating the right common carotid artery and hypoxic treatment for 2.5 h. Rats in the chelerythrine group were intraperitoneally injected with chelerythrine, and the total flavonoids of patriniæ radix groups were given the corresponding doses of total flavonoids of patriniæ radix by gavage. Rats in the total flavonoids of patriniæ radix + chelerythrine group were injected intraperitoneally with chelerythrine while giving total flavonoids of patriniæ radix

by gavage, once daily for 7 consecutive days. The neurological deficit score was used to detect the nerve function of rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the hippocampus of brain tissue. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)/neuronal nuclei antigen (NeuN) fluorescent double staining was used to observe the apoptosis of hippocampal neurons. Western blot was used to detect the expression of protein kinase C (PKC)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and apoptosis-related proteins in brain tissue. Oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) was used to construct a cell model. CCK-8 and lactate dehydrogenase (LDH) assays were performed to analyze the neuronal effect of total flavonoids of patriniae radix on primary hippocampal neurons. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry, and Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results:** In the *in vivo* study, compared with the sham operation group, the rats in the model group showed different degrees of neurological deficits, and the neurological deficit score, the numbers of NeuN⁺TUNEL⁺ cells, the expression of Bax and Caspase-3 in brain tissue increased significantly, while the expression of Bcl-2, the ratios of p-PKC/PKC and p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} reduced significantly ($P < 0.05$). The neurons in the CA1 area of the hippocampus were swollen and decreased in number. Compared with the model group, the neurological function of the total flavonoids of patriniae radix low-dose and high-dose group improved, and the neurological deficit score, the numbers of NeuN⁺TUNEL⁺ cells, the expression of Bax and Caspase-3 in brain tissue reduced significantly, while the expression of Bcl-2, the ratios of p-PKC/PKC and p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} increased significantly ($P < 0.05$). The neurons in the CA1 area of the hippocampus were increased in density. And on the basis of the intervention of total flavonoids of patriniae radix, combined with chelerythrine can significantly reduce the inhibitory effect of total flavonoids of patriniae radix on hippocampal neuronal apoptosis after HIE. In an *in vitro* study, total flavonoids of patriniae radix increased cell viability after OGD/R injury, reversed neuronal damage and reduced hippocampal neuronal apoptosis, while increasing hippocampal neuronal p-PKC/PKC and p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} ratio ($P < 0.05$), verified the activation of PKC/ERK pathway by total flavonoids of patriniae radix in OGD/R-induced primary hippocampal neurons. **Conclusion:** Total flavonoids of patriniae radix can inhibit hippocampal neuron apoptosis in neonatal rats with HIE, and its mechanism may be related to the activation of PKC/ERK pathway.

[Key words] total flavonoids of patriniae radix; hypoxic-ischemic encephalopathy; neuronal apoptosis; protein kinase C; extracellular signal-regulated kinase

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(06): 786-794]

围产期窒息是新生儿科的一个重大问题,会影响胎儿的发育和成长,严重时可导致胎儿缺氧、窒息甚至死亡^[1]。缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是临床婴幼儿围产期窒息引起的一种相对常见的恶性并发症,是导致新生儿死亡、神经系统损伤及脑发育滞后的主要原因^[2]。缺氧缺血可导致ATP耗竭、神经元氧化应激和细胞死亡^[3-4]。蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路在大脑神经系统调节中起着重要作用,与神经发育障碍和围产期学习、记忆障碍有关^[5]。据报道,激活PKC/ERK信号通路可改善小鼠脑出血后的氧化应激和神经元凋亡^[6]。败酱草作为具有清热解毒、活血化瘀作用的中药在中国已有数千年的历史,有抗癌、抗炎、抗氧化、抗菌等药理活性^[7]。败酱总黄酮是败酱草的主要活性成分,在修复受损神经元,促进神经功能恢复方面作用显著,可减少脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡^[8-10]。然而,败酱总黄酮能否改善HIE引起的神经元凋亡还未见相关报道。因此,本研究旨在探讨败酱总黄酮对HIE新生大鼠海马神

经元凋亡的影响,以期为HIE的治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

10只SD孕鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为SCXK(湘)2019-0004,每只可产仔10~12只。单独饲养在无菌的鼠笼中,保持温度22~24℃、湿度45%~50%,12h明暗周期,可自由进食和饮水。取出生10d的SD大鼠幼崽90只(体重14~20g)进行实验。本研究经青海省妇女儿童医院医学研究中心实验动物使用与管理委员会批准(IACUC:20200413002)。

败酱草总黄酮(含量51.76%,批号ZL20150513,南京泽朗医药科技有限公司);白屈菜红碱(PKC抑制剂,纯度98.56%,HY-12048, Med Chem Express公司,美国);罗氏原位末端转移酶标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色试剂盒(红色荧光)(11684817910, Roche Diagnostics公司,美国);RIPA裂解液、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、CCK-8试剂盒、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/

碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(货号分别为P0013B、P0012S、C00038、C1062S,上海碧云天生物科技公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(微板法, A020-2-2, 南京建成生物工程研究所);兔源一抗 PKC(ab181558)、p-PKC(ab109539)、ERK_{1/2}(ab184699)、p-ERK_{1/2}(ab201015)、Bcl-2(ab194583)、Bax(ab32503)、Caspase-3(ab184787)、GAPDH(ab181602)、NeuN 抗体(ab177487),二抗山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(ab205718)、山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor® 488, 绿色荧光)(ab150077)(Abcam 公司, 英国)。BX61 电子显微镜(Olympus 公司, 日本), TCS SP2 共聚焦显微镜(Leica 公司, 德国), FACScan 流式细胞仪(BD Biosciences 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 HIE 大鼠模型的构建与分组

从 90 只新生大鼠中随机选取 12 只为假手术组, 3% 的异氟烷麻醉后手术过程中以 2% 的剂量维持麻醉。除假手术组外, 其余大鼠采用结扎右颈总动脉和低氧处理 2.5 h 的方法构建 HIE 模型^[11]: 将大鼠仰卧固定以暴露颈前区, 在颈部中线行一个小切口, 将右颈总动脉与周围组织分离, 并使用 5-0 外科丝线缝合双结扎, 在两个结扎之间切断动脉; 缝合切口, 让幼崽恢复 1 h, 然后置于缺氧环境(8% O₂ 和 92% N₂) 的锥形瓶中, 并将其浸入 37 °C 水浴中 2.5 h; 然后, 将所有幼崽放回各自的母鼠笼中。假手术组幼崽经过麻醉和右颈总动脉暴露, 没有结扎和缺氧。若大鼠出现站立不稳、右侧肢体瘫痪、提尾时不能伸展对侧前肢等现象, 表明 HIE 模型构建成功。实验过程中, 有 15 只大鼠死亡, 存活且造模成功的大鼠共 63 只。因为新生大鼠各器官发育并不完善, 造模时死亡数量会较多, 其中造模死亡率为 19.23%, 模型成功率为 80.77%, 在可接受的范围。

取 60 只造模成功大鼠, 随机分为模型组、白屈菜红碱组(5 mg/kg)^[12]、败酱总黄酮低剂量组(50 mg/kg)、败酱总黄酮高剂量组(100 mg/kg)^[8-10]、败酱总黄酮+白屈菜红碱组(100 mg/kg 败酱总黄酮+5 mg/kg 白屈菜红碱), 每组 12 只。白屈菜红碱组大鼠腹腔注射白屈菜红碱 5 mg/kg, 败酱总黄酮各剂量组灌胃相应剂量的败酱总黄酮, 败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠在灌胃 100 mg/kg 败酱总黄酮的同时腹腔注射 5 mg/kg 白屈菜红碱, 假手术组和模型组大鼠给予等量的生理盐水灌胃和腹腔注射, 1 次/d, 连续给药 7 d。

1.2.2 神经功能缺损评分

在手术清醒后(给药前)和给药结束后, 参照 Longa 评分法对大鼠进行神经功能缺损评分。评分标准: 0 分, 无明显神经功能缺损; 1 分, 提尾时不能完全伸展对侧前肢; 2 分, 行走时向对侧旋转; 3 分, 行走时向对侧倾斜; 4 分, 不能自主活动或伴意识障碍。分数越高表示神经功能缺损越严重。

1.2.3 HE 染色观察脑组织海马区病理学变化

行为学检测完成后, 麻醉大鼠, 断头取脑, 冠状切分为两部分, 一部分-80 °C 冰箱保存, 用于 Western blot 实验, 另一部分 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 进行 HE 染色, 观察脑组织海马区病理学变化。

1.2.4 TUNEL/NeuN 荧光双染观察海马神经元凋亡

取石蜡切片, 脱蜡并与 0.1% Triton X-100 在室温下孵育 8 min。柠檬酸/柠檬酸钠溶液 95 °C 修复 10 min 后, 将组织用 TUNEL 溶液 37 °C 孵育 60 min, 然后用 NeuN 抗体(1:300)4 °C 过夜。样品用 PBS 洗涤 3 次, 并与 Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗兔 IgG(1:200)室温下孵育 60 min, DAPI 染核, 用抗荧光淬灭剂密封组织, 并使用荧光显微镜观察、拍照; 计数每个视野下 NeuN⁺TUNEL⁺ 阳性细胞数, 每个切片随机选择 3 个视野进行计数并取平均值。

1.2.5 Western blot 检测脑组织 PKC/ERK 通路及凋亡相关蛋白的表达

用 RIPA 裂解液提取脑组织/海马神经元细胞裂解物, 14 000 g 4 °C 离心 30 min。收集并等分上清液, 随后通过 BCA 测定法测量蛋白质浓度。将等量的蛋白质(30 μg) 加到 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳, 并将其转移到 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 与一抗(PKC、p-PKC、ERK_{1/2}、p-ERK_{1/2}、Bcl-2、Bax、Caspase-3、GAPDH, 1:1 000)4 °C 下孵育过夜。第 2 天, 将膜与二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 1:2 000)室温下孵育 1 h。ECL Plus 化学发光试剂显色, Image-Pro Plus 6.0 软件进行灰度分析。

1.2.6 原代海马神经元的分离

在胚胎第 18 天从 SD 大鼠胚胎中分离海马神经元, 用于初级神经元分离。切除、解剖海马组织, 小心取出附着的脑膜。然后用 PBS 冲洗海马。用木瓜蛋白酶(0.5 U/g)和脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)的混合物消化海马体, 32 °C 下保持 12 min。消化后, 细胞过滤器(40 μm)过滤以去除细胞碎片。然后以 180 g 离心 10 min, 弃去上清液并以 3×10⁴ 个/mL 的细胞密度重悬沉淀。随后将细胞接种在 12 孔板上。大鼠胚胎海马神经元在 37 °C、5% CO₂ 下培养于

含有2% B27补充剂和0.5 mmol/L L-谷氨酰胺的Neurobasal培养基中。

1.2.7 CCK-8法评估败酱总黄酮对原代海马神经元及氧-葡萄糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)后原代海马神经元细胞活力的影响

将海马神经元细胞以1 000个/孔的密度接种到96孔板中,用含不同终浓度0.5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 败酱总黄酮的培养基处理原代海马神经元细胞24 h。然后向孔中加入10 μL CCK-8工作液并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 h。最后在450 nm波长下评估各孔的吸光度值,计算细胞活力。

将海马神经元细胞以1 000个/孔的密度接种到96孔板中,除对照组外,其余各组将神经元培养基替换为不含葡萄糖的DMEM培养基,在37 $^{\circ}\text{C}$ 缺氧(95% N_2 和5% CO_2)室中培养4 h以建立OGD/R模型。之后在常氧条件下(5% CO_2 和95%空气,37 $^{\circ}\text{C}$)对细胞进行再氧化,并在神经元培养基中培养24 h。对照组细胞在常氧条件下用神经元培养基培养,OGD/R组中的细胞暴露于OGD/R环境中,败酱总黄酮处理组用含不同终浓度(0.5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)的败酱总黄酮培养基处理原代海马神经元细胞24 h。

1.2.8 OGD/R细胞模型建立

将海马神经元细胞分为对照组、OGD/R组、败酱总黄酮组(20 $\mu\text{mol/L}$)、败酱总黄酮(20 $\mu\text{mol/L}$)+白屈菜红碱(10 mmol/L)组。OGD/R诱导方法同1.2.7,对照组细胞在常氧条件下用神经元培养基培养。OGD/R组中的细胞暴露于OGD/R环境中。败酱总黄酮组中的细胞用败酱总黄酮(40 $\mu\text{mol/L}$)预处理24 h,败酱总黄酮+白屈菜红碱组细胞用败酱总黄酮(20 $\mu\text{mol/L}$)和白屈菜红碱(10 mmol/L)预处理24 h。

1.2.9 LDH活性测定

收集各组海马神经元培养基上清液,取上清液20 μL ,加入2,4-二硝基苯肼混合均匀后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育15 min。然后将NaOH(0.4 mol/L)添加到混合物中,再在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育15 min。最后室温放置3 min后在酶标仪上测量吸光度值。根据试剂盒说明测定LDH活性。

1.2.10 流式细胞仪检测海马神经元凋亡

收集各组海马神经元,使用70%酒精固定细胞24 h,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下将细胞与Annexin V-FITC和PI溶液(各5 μL)避光孵育30 min。然后将细胞洗涤并重悬于结合缓冲液中,并立即使用流式细胞仪测定

细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行分析,结果以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的神经行为学评估

造模前,所有大鼠的神经功能均正常。造模成功后,与假手术组相比,模型组大鼠出现不同程度的神经功能缺损现象,如活动减少、提尾时左侧前爪不能完全伸展、行走时向一侧转圈等,神经功能缺损评分显著增加($P < 0.05$)。给药结束后,与模型组相比,败酱总黄酮低、高剂量组神经功能改善,神经功能缺损评分显著降低($P < 0.05$),而白屈菜红碱组神经功能缺损评分显著升高($P < 0.05$);与白屈菜红碱组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组神经功能缺损评分显著降低($P < 0.05$);与败酱总黄酮高剂量组相比,败酱总黄酮低剂量组和败酱总黄酮+白屈菜红碱组神经功能缺损评分显著升高($P < 0.05$,表1)。

表1 各组大鼠神经功能缺损评分和翻正反射时间

Table 1 Neurological deficit score and righting reflex time of rats in each group (分, $\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	神经功能缺损评分	
	给药前	给药后
假手术组	0	0
模型组	2.41 \pm 0.25 [*]	2.34 \pm 0.26 [*]
白屈菜红碱组	2.38 \pm 0.26 [*]	2.95 \pm 0.34 ^{*#}
败酱总黄酮低剂量组	2.37 \pm 0.29 [*]	1.81 \pm 0.23 ^{*$\Delta$$\Delta$}
败酱总黄酮高剂量组	2.40 \pm 0.30 [*]	1.46 \pm 0.20 ^{*Δ}
败酱总黄酮+白屈菜红碱组	2.42 \pm 0.31 [*]	1.79 \pm 0.19 ^{*$\Delta$$\Delta$}

与假手术组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与白屈菜红碱组相比, ^{Δ} $P < 0.05$;与败酱总黄酮高剂量组相比, ^{Δ} $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠海马组织病理学变化

假手术组大鼠海马CA1区细胞形态规则,排列紧密,未出现明显的病理损伤;模型组大鼠海马CA1区可观察到神经元排列疏松,细胞核固缩深染;与模型组相比,败酱总黄酮低、高剂量组大鼠海马组织上述病理改变减轻,神经元密度增加,且败酱总黄酮高剂量组对海马组织病理损伤的改善程度优于败酱总黄酮低剂量组,而白屈菜红碱组海马CA1区神经元数量进一步减少;败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠海马CA1区神经元数量较败酱总黄

酮高剂量组减少,而较白屈菜红碱组神经元数量增多(图1)。

2.3 各组大鼠海马组织神经元凋亡情况

与假手术组相比,模型组大鼠海马CA1区NeuN⁺TUNEL⁺细胞数显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,败酱总黄酮低、高剂量组大鼠海马CA1区NeuN⁺TUNEL⁺细胞数显著降低($P < 0.05$),而白屈菜红碱组大鼠NeuN⁺TUNEL⁺细胞数显著升高($P <$

0.05);与白屈菜红碱组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠NeuN⁺TUNEL⁺细胞数显著降低($P < 0.05$);与败酱总黄酮高剂量组相比,败酱总黄酮低剂量组和败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠NeuN⁺TUNEL⁺细胞数显著升高($P < 0.05$,图2、表2)。

2.4 各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白的表达

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织Bax、Caspase-3的表达显著升高,Bcl-2的表达显著降低

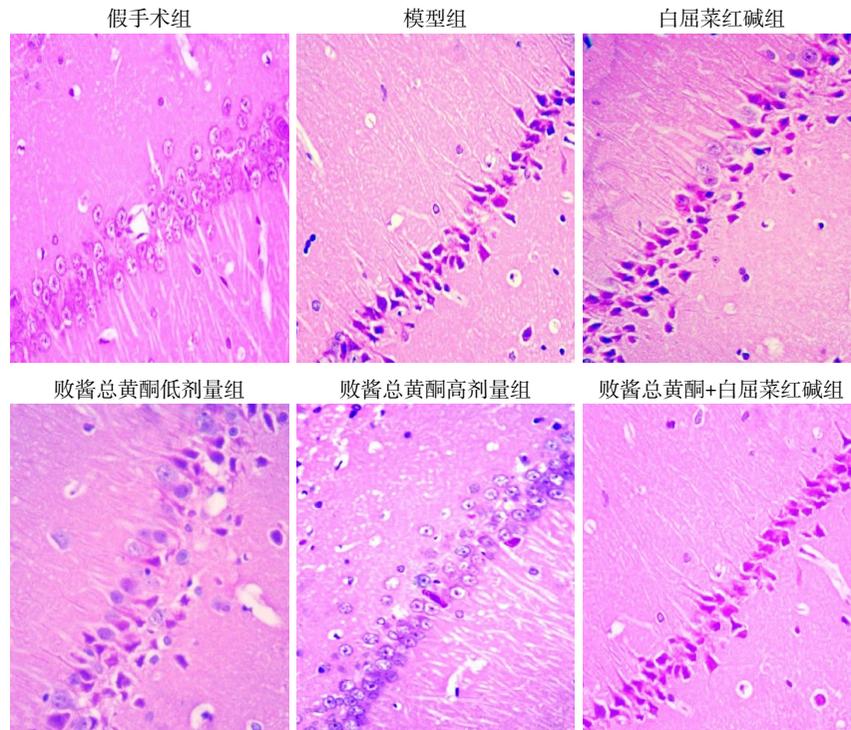


图1 各组大鼠海马组织病理学变化(HE,×200)

Figure 1 Histopathological changes of the hippocampus of rats in each group (HE,×200)

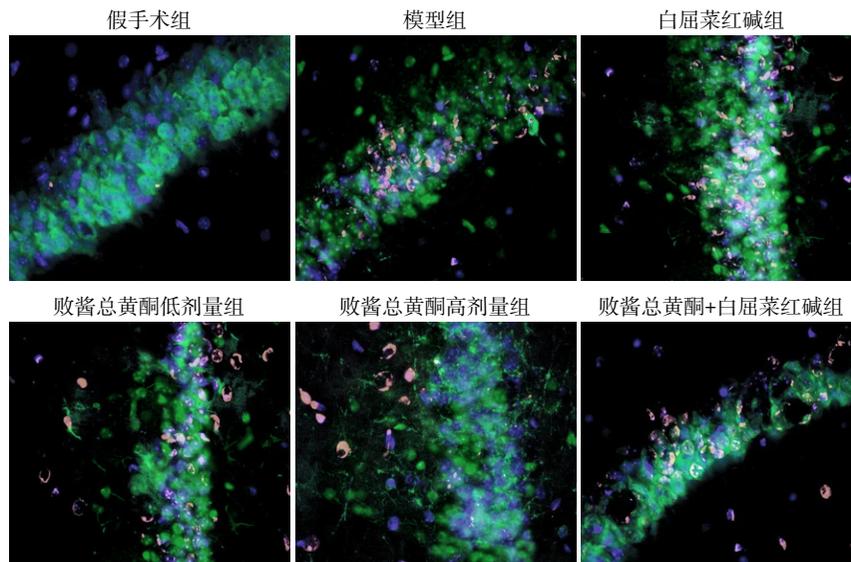


图2 各组大鼠海马组织神经元凋亡情况(TUNEL,×200)

Figure 2 Apoptosis of neurons in hippocampus of rats in each group (TUNEL,×200)

表2 各组大鼠海马组织 NeuN⁺TUNEL⁺细胞数
Table 2 The number of NeuN⁺TUNEL⁺ cells in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	NeuN ⁺ TUNEL ⁺ 阳性细胞数/视野
假手术组	2.35 ± 0.28
模型组	9.82 ± 1.04*
白屈菜红碱组	12.43 ± 1.17**
败酱总黄酮低剂量组	7.65 ± 0.81*#△▲
败酱总黄酮高剂量组	5.23 ± 0.69*#△
败酱总黄酮+白屈菜红碱组	7.41 ± 0.85*#△▲

与假手术组相比,**P* < 0.05;与模型组相比,***P* < 0.05;与白屈菜红碱组相比,△*P* < 0.05;与败酱总黄酮高剂量组相比,▲*P* < 0.05。

(*P* < 0.05);与模型组相比,败酱总黄酮低、高剂量组大鼠脑组织 Bax、Caspase-3 的表达显著降低,Bcl-2 的表达显著升高(*P* < 0.05),而白屈菜红碱组大鼠脑组织 Bax、Caspase-3 的表达显著升高,Bcl-2 的表达显著降低(*P* < 0.05);与白屈菜红碱组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠脑组织 Bax、Caspase-3 的表达显著降低,Bcl-2 的表达显著升高(*P* < 0.05);与败酱总黄酮高剂量组相比,败酱总黄酮低剂量组和败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠脑组织 Bax、Caspase-3 的表达显著升高,Bcl-2 的表达显著降低(*P* < 0.05,图3)。

2.5 各组大鼠脑组织 PKC/ERK 通路相关蛋白的表达

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 的比值显著降低(*P* < 0.05);与模型组相比,败酱总黄酮低、高剂量组大鼠脑组织 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 的比值显著升高(*P* < 0.05),而白屈菜红碱组大鼠脑组织 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 的比值显著降低(*P* < 0.05);与白屈菜红碱组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠脑组织 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 的比值显著升高(*P* < 0.05);与败酱总黄酮高剂量组相比,败酱总黄酮低剂量组和败酱总黄酮+白屈菜红碱组大鼠脑组织 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 的比值显著降低(*P* < 0.05,图4)。

2.6 败酱总黄酮对原代海马神经元细胞毒性的影响

海马神经元用不同浓度(0、5、10、20、40、80 μmol/L)的败酱总黄酮处理 24 h。CCK-8 结果显示,与对照组相比,用 5、10、20、40、80 μmol/L 败酱总黄酮处理对细胞存活率没有明显影响(*P* > 0.05,图5)。

2.7 败酱总黄酮对 OGD/R 诱导的原代海马神经元细胞活力的影响

与对照组相比,OGD/R 组海马神经元细胞活力

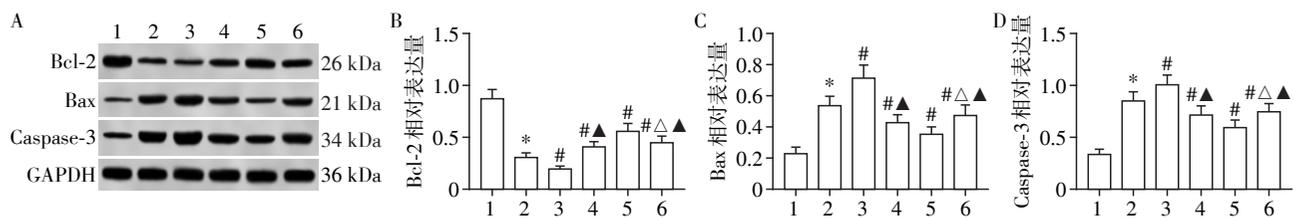


图3 各组大鼠脑组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达
Figure 3 Expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins in brain tissue of rats in each group

Figure 3 Expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins in brain tissue of rats in each group

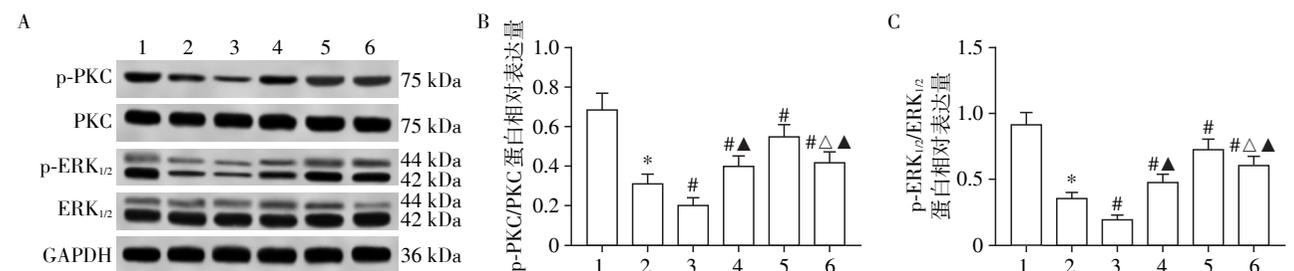


图4 各组大鼠脑组织 PKC/ERK 通路相关蛋白表达
Figure 4 Expression of PKC/ERK pathway-related proteins in brain tissue of rats in each group

Figure 4 Expression of PKC/ERK pathway-related proteins in brain tissue of rats in each group

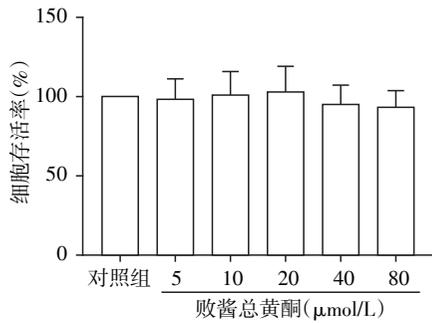


图5 败酱总黄酮对原代海马神经元细胞毒性的影响(n=6)
Figure 5 The effect of total flavonoids of patriniæ radix on the cytotoxicity of primary hippocampal neurons(n=6)

显著降低(P<0.05);与 OGD/R 组相比,败酱总黄酮(10、20、40、80 μmol/L)组细胞活力显著增加(P<0.05,图6)。由于20 μmol/L败酱总黄酮的神经保护作用最大,因此以该浓度用于随后的体外研究。

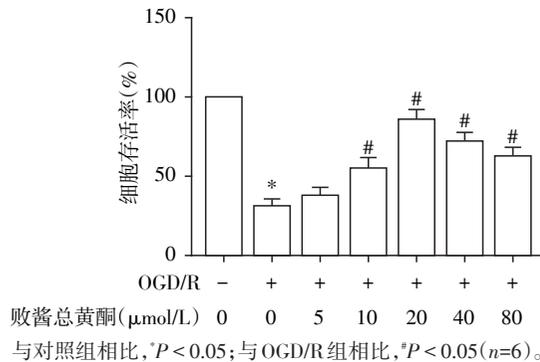


图6 败酱总黄酮对 OGD/R 诱导的原代海马神经元细胞活力的影响
Figure 6 The effect of total flavonoids of patriniæ radix on the viability of primary hippocampal neurons induced by OGD/R

2.8 各组海马神经元 LDH 活性

与对照组相比, OGD/R 组 LDH 活性显著升高(P<0.05);与 OGD/R 组相比,败酱总黄酮组 LDH 活

性显著降低(P<0.05);与败酱总黄酮组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组 LDH 活性显著升高(P<0.05,表3)。

表3 各组 LDH 活性和海马神经元凋亡率比较
Table 3 Comparison of LDH activity and apoptosis rate of hippocampal neurons in each group

组别	LDH 活性(U/L)	海马神经元凋亡率(%)
对照组	51.42 ± 7.66	4.92 ± 0.55
OGD/R 组	130.85 ± 11.39*	27.76 ± 3.40*
败酱总黄酮组	80.65 ± 10.17#	10.83 ± 1.45**
败酱总黄酮+白屈菜红碱组	121.53 ± 11.49 [△]	25.02 ± 2.61 ^{△△}

($\bar{x} \pm s, n=6$)
与对照组相比,*P<0.05;与 OGD/R 组相比,**P<0.05;与败酱总黄酮组相比,[△]P<0.05。

2.9 各组海马神经元凋亡率

与对照组相比, OGD/R 组海马神经元凋亡率显著升高(P<0.05);与 OGD/R 组相比,败酱总黄酮组海马神经元凋亡率显著降低(P<0.05);与败酱总黄酮组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组海马神经元凋亡率显著升高(P<0.05,表3、图7)。

2.10 各组海马神经元 PKC/ERK 通路相关蛋白表达

与对照组相比, OGD/R 组海马神经元 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 比值显著降低(P<0.05);与 OGD/R 组相比,败酱总黄酮组 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 比值显著升高(P<0.05);与败酱总黄酮组相比,败酱总黄酮+白屈菜红碱组 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 比值显著降低(P<0.05,图8)。

3 讨论

神经元凋亡是 HIE 后的主要病理过程,新生儿的大脑可能比成人更容易受到这种影响^[13]。据报道,在经历 HIE 后死亡儿童的大脑切片以及经受缺氧缺血的大鼠大脑中 Caspase-3 活化均增加^[14]。本研究通

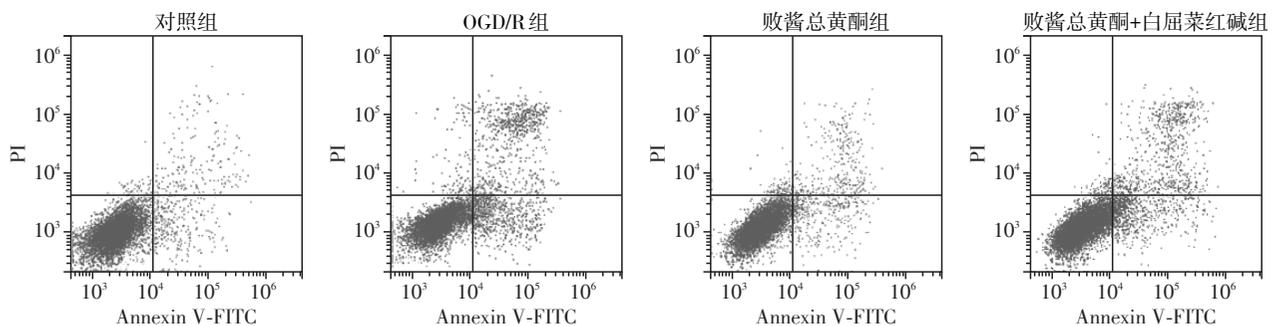
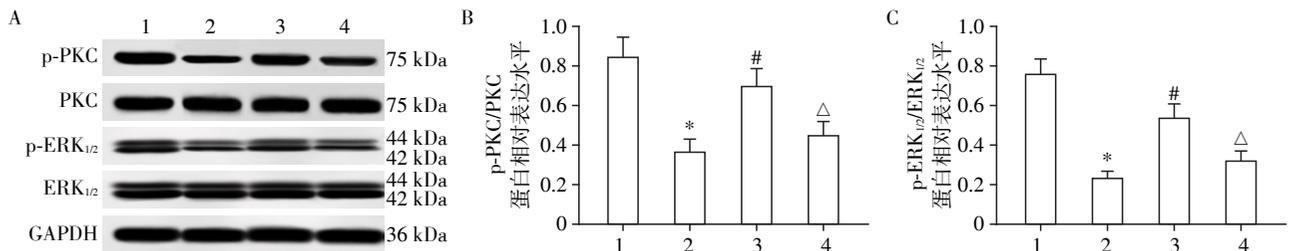


图7 流式细胞术检测各组海马神经元凋亡
Figure 7 Apoptosis of hippocampal neurons in each group detected by flow cytometry



A: Western blot 检测各组海马神经元 PKC/ERK 通路相关蛋白的表达; B: 各组 p-PKC/PKC 相对表达量; C: 各组 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 相对表达量。1: 对照组; 2: OGD/R 组; 3: 败酱总黄酮组; 4: 败酱总黄酮+白屈菜红碱组。与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 OGD/R 组相比, # $P < 0.05$; 与败酱总黄酮组相比, [△] $P < 0.05$ ($n=6$)。

图8 各组海马神经元 PKC/ERK 通路相关蛋白表达

Figure 8 Expression of PKC/ERK pathway-related proteins in hippocampal neurons in each group

过结扎右颈总动脉和低氧处理以模拟缺氧缺血环境建立了新生大鼠 HIE 模型,发现模型大鼠表现出明显的神经功能损伤,海马神经元数量减少,神经元凋亡增加,并伴随着促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 表达的升高;与以往研究结果一致,表明 HIE 新生大鼠神经元凋亡增加。因此,增强内源性抗凋亡机制的治疗策略可能是减少 HIE 患者神经损伤的安全方法。

败酱总黄酮能够抑制脑缺血再灌注大鼠的神经元凋亡,有助于受损神经元的修复,促进神经功能恢复^[8-10]。本研究结果显示,经败酱总黄酮干预后,HIE 新生大鼠的神经功能明显改善,海马神经元密度增加,凋亡神经元数量减少,同时促凋亡标志物 Caspase-3、Bax 表达减少,而抗凋亡标志物 Bcl-2 增加,表明败酱总黄酮可抑制 HIE 诱导的神经元凋亡。体外实验显示,败酱总黄酮增加了海马神经元细胞活力,挽救了神经元损伤并减少了 OGD/R 损伤后的细胞凋亡,与体内研究结果一致,进一步证实败酱总黄酮可减少 HIE 后海马神经元凋亡。

PKC/ERK 通路是一种离子通道活性调节剂。据报道,在 δ -阿片受体(DOR)介导的缺氧/缺血应激的神经保护中,其增强 K⁺稳态的作用依赖于 PKC 途径和 ERK、Bcl-2 活性的增加^[15]。另有研究显示,在缺氧神经元中,PKC/ERK 通路的激活可增强 Bcl-2 活性,抑制细胞色素 C 的释放,保护神经元^[16]。此外,近年来不少研究发现激活发育中的海马神经元中的 PKC/ERK 通路,可抑制氯胺酮诱导的海马神经元早期和晚期凋亡^[17]。在脑出血小鼠模型中,PKC 活性的敲低降低了 p-ERK_{1/2}、Bcl-2 表达,升高了 Caspase-3 表达,导致氧化应激反应加重和神经元凋亡增加,而激活 PKC/ERK 通路则表现出相反的作用^[6]。以上研究表明 PKC/ERK 通路在神经元凋亡中具有重要作用。与既往研究一致,本研究 HIE 模型大鼠的脑组织中 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 的比值较假手术

组显著降低,且使用 PKC 抑制剂白屈菜红碱干预的 HIE 模型大鼠神经功能损伤进一步加重,并伴随着 Caspase-3、Bax 表达增加,Bcl-2 表达减少,说明 HIE 新生大鼠脑组织 PKC/ERK 通路被抑制。在 OGD/R 细胞模型中也观察到一致的趋势。败酱总黄酮可升高 HIE 大鼠脑组织中 p-PKC/PKC、p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 比值,白屈菜红碱明显减弱了体内和体外败酱总黄酮对 PKC/ERK 通路的激活作用,削弱了败酱总黄酮对海马神经元凋亡的抑制作用。提示败酱总黄酮可能通过激活 PKC/ERK 通路减少 HIE 新生大鼠海马神经元凋亡。

然而,PKC 在缺血性脑损伤中的作用存在争议。大多数阐明 PKC 作用的研究提示在缺血性损伤后,总 PKC 水平和活性迅速下降,这表明 PKC 在这些条件下被降解^[6,16-17]。但另一些研究表明,在脑缺血损伤早期和 OGD/R 诱导的小胶质细胞中,PKC 水平和 PKC 活性增加,可诱导小胶质细胞产生促炎介质^[18-19];用 PKC 抑制剂处理细胞可保护神经元免受谷氨酸诱导的细胞死亡^[20]。这些研究结果不一致的原因可能是动物模型不同,大脑区域不同,缺血/再灌注损伤的持续时间和强度不同,也可能是不同的 PKC 同工酶产生相反作用。

综上所述,败酱总黄酮可抑制 HIE 新生大鼠海马神经元凋亡,其作用机制可能与激活 PKC/ERK 通路有关。本研究进一步验证了败酱总黄酮的神经保护作用,为 HIE 的治疗提供实验参考。但其介导的神经元凋亡是否与 HIE 期间炎症或氧化应激有关,仍有待确定。此外,败酱总黄酮能否影响其他脑组织区域(如皮质、CA2、CA3 区)改善新生儿 HIE,有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] WALAS W, WILIŃSKA M, BEKIESIŃSKA F M, et al.

- Methods for assessing the severity of perinatal asphyxia and early prognostic tools in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29(8): 1011–1016
- [2] GRECO P, NENCINI G, PIVA I, et al. Pathophysiology of hypoxic - ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future[J]. *Acta Neurol Belg*, 2020, 120(2): 277–288
- [3] RODRÍGUEZ M, VALEZ V, CIMARRA C, et al. Hypoxic-ischemic encephalopathy and mitochondrial dysfunction: facts, unknowns, and challenges[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33(4): 247–262
- [4] RODRIGUEZ J, LI T, XU Y, et al. Role of apoptosis-inducing factor in perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(2): 205–213
- [5] WU D, WU F J, LIN R, et al. Impairment of learning and memory induced by perinatal exposure to BPA is associated with ER α -mediated alterations of synaptic plasticity and PKC/ERK/CREB signaling pathway in offspring rats [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 161: 43–54
- [6] 傅思铭, 吴旋, 谢宗义. NDP-MSH 激活黑皮质素 3 受体通过 PKC/ERK 信号通路减轻小鼠脑出血后氧化应激和神经元凋亡[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(16): 1633–1640
- [7] GONG L, ZOU W, ZHENG K, et al. The Herba Patriniae (Caprifoliaceae): a review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology and quality control [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113264
- [8] 王灿, 苗明三, 白莉. 基于抗氧化作用探讨败酱草总黄酮对脑缺血耐受模型的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(1): 101–105
- [9] 方晓艳, 魏珍珍, 苗明三, 等. 败酱总黄酮对局灶性脑缺血再灌注大鼠氧自由基及能量代谢的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(2): 137–142
- [10] 魏珍珍, 方晓艳, 王灿, 等. 败酱总黄酮对局灶性脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用及炎症因子的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(4): 396–402
- [11] HUANG J, LU W, DOYCHEVA D M, et al. IRE1 α inhibition attenuates neuronal pyroptosis via miR - 125/NLRP1 pathway in a neonatal hypoxic - ischemic encephalopathy rat model [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 152
- [12] HU B, XU G, ZHENG Y, et al. Chelerythrine attenuates renal ischemia/reperfusion - induced myocardial injury by activating CSE/H₂S via PKC/NF - κ B pathway in diabetic rats [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2017, 42(2): 379–388
- [13] HATAYAMA K, RIDDICK S, AWA F, et al. Time course of changes in the neurovascular unit after hypoxic-ischemic injury in neonatal rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4180
- [14] HUANG J, LIU W, DOYCHEVA D M, et al. Ghrelin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via GHSR-1 α /AMPK/Sirt1/PGC-1 α /UCP₂ pathway in a rat model of neonatal HIE [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 141: 322–337
- [15] CHAO D, DONNELLY D F, FENG Y, et al. Cortical delta -opioid receptors potentiate K⁺ homeostasis during anoxia and oxygen - glucose deprivation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(2): 356–368
- [16] ZHU M, LIU M, GUO Q L, et al. Prolonged DADLE exposure epigenetically promotes Bcl-2 expression and elicits neuroprotection in primary rat cortical neurons via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(10): 1582–1589
- [17] JIANG S, LI X, JIN W, et al. Ketamine-induced neurotoxicity blocked by N-methyl-D-aspartate is mediated through activation of PKC/ERK pathway in developing hippocampal neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 673: 122–131
- [18] GAJKOWSKA B, DOMAŃSKA-JANIK K, VIRON A. Protein kinase C-like immunoreactivity in gerbil hippocampus after a transient cerebral ischemia [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 1994, 32(2): 71–77
- [19] ZHAO B, WANG J, LIU L, et al. Annexin A1 translocates to nucleus and promotes the expression of pro-inflammatory cytokines in a PKC-dependent manner after OGD/R [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27028
- [20] FELIPO V, MIÑANA M D, GRISOLÍA S. Inhibitors of protein kinase C prevent the toxicity of glutamate in primary neuronal cultures [J]. *Brain Res*, 1993, 604(1/2): 192–196

[收稿日期] 2022-11-06

(本文编辑:陈汐敏)