

DOI: 10.16306/j.1008-861x.2023.02.002

西洋参茎叶总皂苷抑制氧糖剥夺/复氧引起的BV-2小胶质细胞炎性活化作用及其机制研究

刘静, 陈希, 金宏飞, 张英辉

北部战区总医院检验科(辽宁 沈阳 110016)

【摘要】目的:研究西洋参茎叶总皂苷(PQS)对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)引起的小鼠BV-2小胶质细胞炎性活化的抑制作用,并初步阐明其作用机制。方法:BV-2细胞分为对照组、OGD/R组、PQS各剂量+OGD/R组。对照组细胞在常规条件下培养;OGD/R组细胞在OGD/R条件下培养;PQS各剂量+OGD/R组细胞给予PQS(30、60、90 μg/mL)预处理后,转入OGD/R条件培养。通过酶联免疫法检测上清液中炎症因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)和白介素-6(IL-6)的含量,通过CCK-8法检测PQS对OGD/R条件下细胞增殖活性的影响,流式细胞术检测胶质细胞活化标志蛋白离子钙结合适配器分子1(Iba-1)和酸性溶菌糖蛋白(CD68)的表达,Western blot检测核因子-κB(NF-κB)p65磷酸化及其抑制因子NF-κB抑制蛋白α(IκB-α)和NF-κB抑制因子(NKRF)蛋白的表达。结果:OGD/R诱导能够明显增加BV-2细胞上清液中炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6含量($P<0.01$),增强BV-2细胞对数期增殖活性($P<0.01$),上调CD68表达和p-NF-κB p65($P<0.01$),同时下调Iba-1和NKRF表达($P<0.01$)。PQS预处理能够有效逆转BV-2细胞中OGD/R引起的上述指标变化趋势,且其作用呈浓度依赖性($P<0.05, P<0.01$)。此外,各组BV-2细胞中IκB-α蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。结论:PQS能够有效抑制OGD/R引起的BV-2细胞炎性活化,其作用机制可能与上调NKRF蛋白表达有关。

【关键词】西洋参茎叶皂苷;氧糖剥夺/复氧;小胶质细胞;炎性活化;NKRF

Study on inhibitory effect and mechanism of Panax quinquefolius saponin from stems and leaves on inflammatory activation of mouse BV-2 microglia induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

LIU Jing, CHEN Xi, JIN Hongfei, ZHANG Yinghui

Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, Liaoning, China

ABSTRACT Objective: To study the inhibitory effect of Panax quinquefolium saponin from stems and leaves (PQS) on the inflammatory activation of mouse BV-2 microglia induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R), and to elucidate its mechanism. **Methods:** BV-2 cells were divided into the control group, OGD/R group and PQS low, medium, high dose+OGD/R group. The cells in control group were cultured under conventional condition; the cells in OGD/R group were cultured under OGD/R condition; the cells in PQS low, medium, high dose+OGD/R group were pretreated with PQS (30, 60, 90 μg/mL), then cultured in OGD/R condition. The cells were cultured for 48 h, then the contents of inflammatory factors such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and IL-6 in the cell supernatant were detected by ELISA. The proliferative activity was detected by CCK-8 method, the expression of glial activation marker protein ion calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) and acid lysozyme glycoprotein (CD68) were detected by flow cytometry, and the phosphorylation of nuclear factor-κB (NF-κB) p65 and its inhibitory factors NF-κB inhibitory protein α (IκB-α) as well as NF-κB inhibitory factor (NKRF) were detected by Western blot. **Results:** OGD/R induction could significantly increase the contents of inflammatory factors such as TNF-α, IL-1β and IL-6 in the supernatant of BV-2 cells ($P<0.01$), enhance the proliferation activity of BV-2 cells ($P<0.01$), up-regulate the expression of CD68 and the phosphorylation of NF-κB-p65 ($P<0.01$), and down-regulate

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(2022-MS-046)

[作者简介] 刘静,女,硕士,副主任技师,主要从事分子生物学研究

[通信作者] 张英辉,主管技师;E-mail: 1204542997@qq.com

收稿日期:2022-08-22;修回日期:2022-12-09

the expression of Iba-1 and NKRF ($P<0.01$). PQS pretreatment could effectively reverse the change trend of the above indexes caused by OGD/R in BV-2 cells, and the effects were concentration-gradient dependent ($P<0.05$, $P<0.01$). In addition, there was no significant difference in the expression of I κ B- α protein in BV-2 cells among all groups ($P>0.05$). **Conclusion:** PQS can inhibit the inflammatory activation of BV-2 cells induced by OGD/R, and its mechanism may be related to the up-regulation of NKRF protein expression.

KEYWORDS Panax quinquefolius saponin from stems and leaves; OGD/R; microglia; inflammatory activation; NKRF

急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)的再灌注治疗策略能够快速有效地解决脑组织缺血问题,因而在临床被广泛使用。但是,再灌注治疗往往有一定的副作用,即术后导致脑组织出现再灌注损伤。研究表明,在实施溶栓或者取栓治疗的AIS患者中,有部分患者在术后较长时间内被观察到有认知功能损伤的情况,且这种慢性病变与缺血再灌注引起的脑部神经损伤有关^[1]。近年来,我国AIS发病率明显上升,患者数量约占脑血管病患者总数的80%^[2-3]。目前,临床应对AIS仍采取以溶栓和取栓为核心的再灌注方法,尚缺乏应对再灌注损伤的特效药物。缺血再灌注会引起脑部小胶质细胞过度活化,具体可表现为细胞增殖加速、细胞炎性因子表达和分泌增强。因为神经细胞与小胶质细胞有共同的空间定位,所以小胶质细胞过度活化造成的炎性介质往往会使神经细胞功能受损^[2]。因此,开发抑制脑小胶质细胞炎性活化的药物,被认为是提高AIS治疗效果和改善患者预后的重要途径^[4-5]。西洋参原产于北美,为人参属药用植物,其味苦性凉,归心、肺、肾经,具有养阴益气、扶正固本之功效,能够用于脑缺血的防治^[6-7]。现代药理学和药物化学研究表明,西洋参具有明显的抗炎活性,其抗炎活性成分主要为皂苷类物质^[8]。西洋参茎叶皂苷(Panax quinquefolius saponin from stems and leaves, PQS)被证实对心肌缺血、心律失常、休克、高血压、高血脂、高血糖、动脉粥样硬化等疾病具有明显的改善作用^[9]。近年来,已有研究证实PQS能改善脑缺血导致的神经损伤,但其作用机制仍有待进一步深入研究^[10]。本研究拟利用小鼠BV-2小胶质细胞,体外建立氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)模型模拟脑部小胶质细胞所处的脑缺血再灌注病理环境,在此基础上给予PQS预处理,通过细胞增殖、炎性因子和胶质细胞活化蛋白CD68和Iba-1等多项指标,考察PQS对OGD/R引起的BV-2细胞炎性活化的影响,并初步阐明其作用机制,以期PQS在脑缺血治疗中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 小鼠BV-2小胶质细胞,购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 试剂 PQS(批号:74374583,淡黄色粉末,经HPLC检测其主要成分为西洋参皂苷,总皂苷含量为80%),宁波德康生物有限公司;二甲基亚砜(DMSO,批号:D1650),美国Sigma公司;离子钙结合适配器分子1(Iba-1)、酸性溶霉菌糖蛋白(CD68)、核因子- κ B(NF- κ B)p65、p-NF- κ B p65、核因子NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B- α)、核因子NF- κ B抑制因子(NF- κ B repressing factor, NKRF)兔抗人初级抗体(批号分别为ab178846、ab283654、ab32536、ab76302、ab32518、ab168829),羊抗兔二级抗体(批号:ab6721),英国Abcam公司;Cell Counting Kit(CCK-8)试剂盒、台盼蓝染液(批号分别为C0037、SC0164),武汉碧云天公司;胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、杜氏磷酸缓冲液(DPBS)、DMEM高糖培养基、哺乳动物细胞总蛋白提取试剂盒、超敏化学底物发光试剂、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为10100147、25200072、14040141、12430054、78505、32134、BMS607/BMS6002/BMS603),美国Thermo Fisher公司。

1.1.3 主要仪器 Varioskan LUX型酶标仪、Attune CytPix型流式细胞仪,美国Thermo Fisher公司;1659033型蛋白垂直电泳及转印系统,美国Bio-Rad公司;MCO-18M型CO₂培养箱,日本三洋公司。

1.2 药物配制 PQS用DMSO配制成10 mg/mL的母液,用0.22 μ m微孔滤膜过滤后分装保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱。使用前1 h从冰箱中取出,转移至4 $^{\circ}$ C直至融化,并按照使用浓度(30、60、90 μ g/mL)添加至培养基中。

1.3 细胞培养 BV-2细胞以贴壁方式生长,常规培养条件为37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度,使用含10% FBS的DMEM高糖培养基。

1.4 分组与干预 实验分为对照组、OGD/R组、DMSO+OGD/R组、PQS各剂量+OGD/R组。对照组

细胞不做处理, OGD/R 组细胞仅进行 OGD/R 处理; DMSO + OGD/R 组细胞在进行 OGD/R 处理前 2 h 向培养基中加入 2 μL (与药物组等体积) DMSO; PQS 低、中、高剂量 + OGD/R 组细胞在进行 OGD/R 处理前 2 h 向培养基中添加终浓度为 30、60、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PQS。其中, PQS 的浓度设定基于前期药物毒性测试数据, 以对 BV-2 细胞无明显毒性的 PQS 剂量, 即 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为药效实验的最大安全使用剂量。

细胞接种: 对数期 BV-2 细胞接种于细胞培养板, 培养 24 h; **药物干预:** 按照上述分组和药物终浓度加入药物, 继续在常规条件下培养 2 h; **ODG/R 处理(造模):** 将细胞培养基更换为不含 FBS 的 DMEM 无糖培养基, 并将细胞转入低氧培养箱于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和 95% N_2 的低氧条件下培养 2 h, 然后将细胞培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 并将细胞转入常氧培养箱, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 常规条件下继续培养 24 h; **ODG/R 处理(造模):** 将细胞培养基更换为不含 FBS 的 DMEM 无糖培养基, 并将细胞转入低氧培养箱于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和 95% N_2 的低氧条件下培养 2 h, 然后将细胞培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 并将细胞转入常氧培养箱, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 常规条件下继续培养 24 h。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 ELISA 检测细胞炎性因子 BV-2 细胞接种于 96 孔板中(5×10^4 个/孔), 常规培养 24 h。按“1.4”项下方法进行药物干预和 OGD/R 处理后, 将 96 孔板取出, 8 000 r/min 离心 5 min, 每孔取 50 μL 上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明操作, 用酶标仪在 450 nm 处检测样本吸光度, 计算 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量。

1.5.2 CCK-8 实验检测细胞增殖活性 BV-2 细胞接种于 6 孔板中(1×10^5 个/孔), 常规培养 24 h。按“1.4”项下方法进行药物干预和 OGD/R 处理后, 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后重新接种至 96 孔板(5×10^4 个/孔), 使用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 接种后将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 并于培养后的 24、48、72 h, 按照 CCK-8 试剂盒说明操作, 用酶标仪测定样本在 450 nm 波长处的吸光度(A_{450}), 计算细胞活力。

1.5.3 OGD/R 诱导的细胞活化指标检测 BV-2 细胞接种于 6 孔板中(1×10^5 个/孔), 常规培养 24 h。按“1.4”项下方法进行药物干预和 OGD/R 处理后, 细胞用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化, 用

DPBS 洗涤 2 次后, 在每个样本中加入 300 μL DPBS 重悬细胞, 然后向细胞悬液中加入 3 μL CD68 抗体 (FITC 标记) 和 Iba-1 抗体 (PE 标记), 充分混匀后, 室温避光静置 10 min, 使用流式细胞仪检测, 激发波长和发射波长分别设置为 488 nm 和 560 nm。

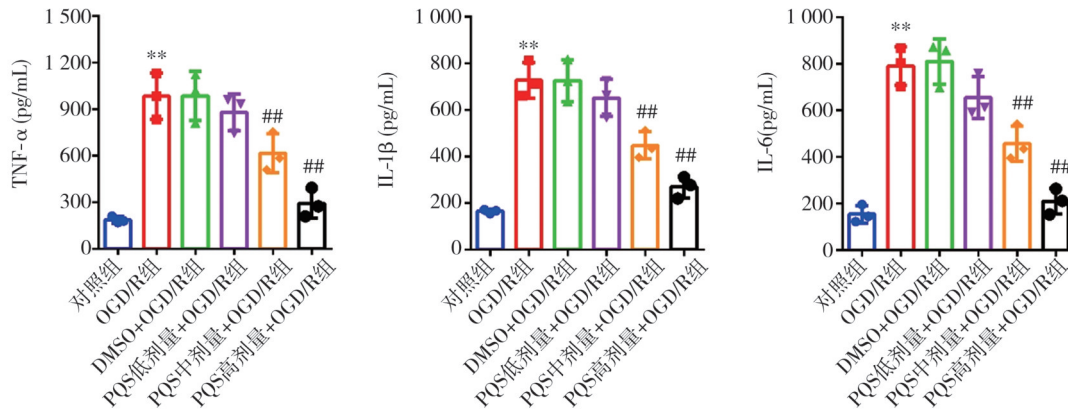
1.5.4 Western blot 检测 NF- κB p65 蛋白磷酸化及其抑制因子表达 BV-2 细胞接种于 6 孔板中(1×10^5 个/孔), 常规培养 24 h。按“1.4”项下方法进行药物干预和 OGD/R 处理后, 弃去培养基, 细胞用 2 mL DPBS 洗涤 2 次后, 每孔添加 0.5 mL 的细胞裂解液, 按照试剂盒说明书和步骤提取细胞总蛋白。每样本取 12 μg 蛋白, 用 SDS-PAGE 分离(分离胶浓度为 11%, 110 V 恒压电泳 90 min), 然后进行蛋白转膜(400 mA 恒流 90 min)。待蛋白完全迁移至 PDVF 膜后, 使用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次后添加一抗(NF- κB p65, 1:600; p-NF- κB p65, 1:400; NKRF, 1:500; I κB - α , 1:300; β -actin, 1:1 000], 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的兔抗鼠二级抗体(1:3 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次, 添加化学发光液。曝光后再经显影和定影获得目标条带, 使用 Totalab V1.10 软件分析条带光密度并计算目标蛋白相对表达量。目标蛋白表达量以目标条带与内参(β -actin)条带的光密度比值表示, 蛋白磷酸化则以其自身蛋白(磷酸化+未磷酸化)为参照。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验进行两组间差异比较, 多组间比较则使用单因素方差分析 (ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞炎性因子表达的影响 ELISA 检测结果表明, 与对照组比较, OGD/R 组 BV-2 细胞上清液中炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量明显增加 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, PQS + OGD/R 组细胞上清液中炎性因子含量降低, 且具有明显的浓度依赖性, 其中 PQS 中、高剂量 + OGD/R 组的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。DMSO + OGD/R 组与 OGD/R 组比较, BV-2 细胞上清液炎性因子含量无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 对 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞增殖活性的影响 CCK-8 实验结果表明, 与对照组比较, OGD/R



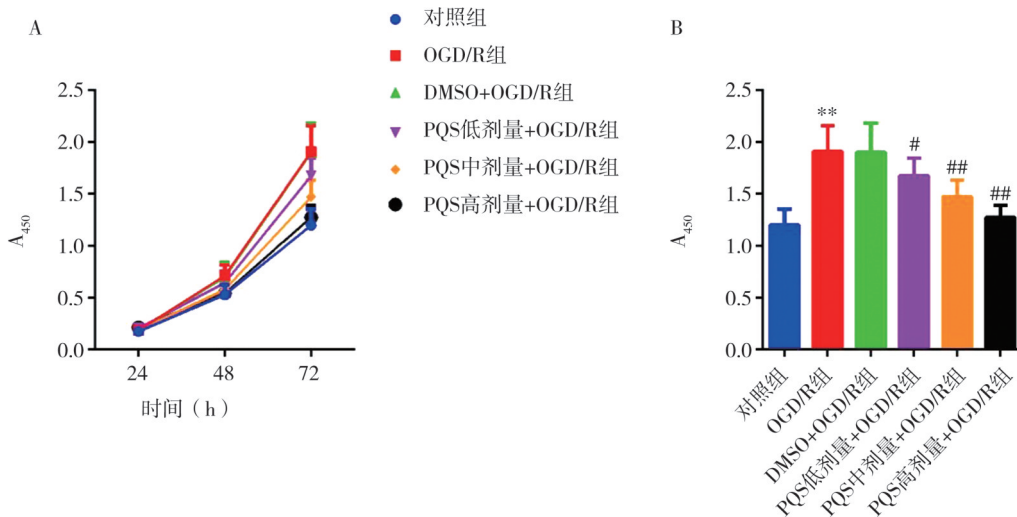
与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 1 ELISA 检测各组 BV-2 细胞上清液炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Detection of TNF- α 、IL-1 β and IL-6 contents in supernatant of BV-2 cells in each group by ELISA($n=3, \bar{x} \pm s$)

组 BV-2 细胞对数期增殖活性明显增强, 其中 72 h 增殖活性差异显著($P < 0.01$), PQS+OGD/R 组 BV-2 细胞增殖活性明显低于 OGD/R 组($P < 0.05, P < 0.01$),

且上述作用呈现明显的浓度梯度依赖。DMSO+OGD/R 组与 OGD/R 组比较, 细胞在 24、48、72 h 检测点的增殖活性均无明显变化($P > 0.05$)。见图 2。



A 为 BV-2 细胞增殖曲线(24~72 h); B 为 72 h 各组细胞增殖活性的比较。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 CCK-8 实验检测各组 BV-2 细胞增殖活性($n=3, \bar{x} \pm s$)

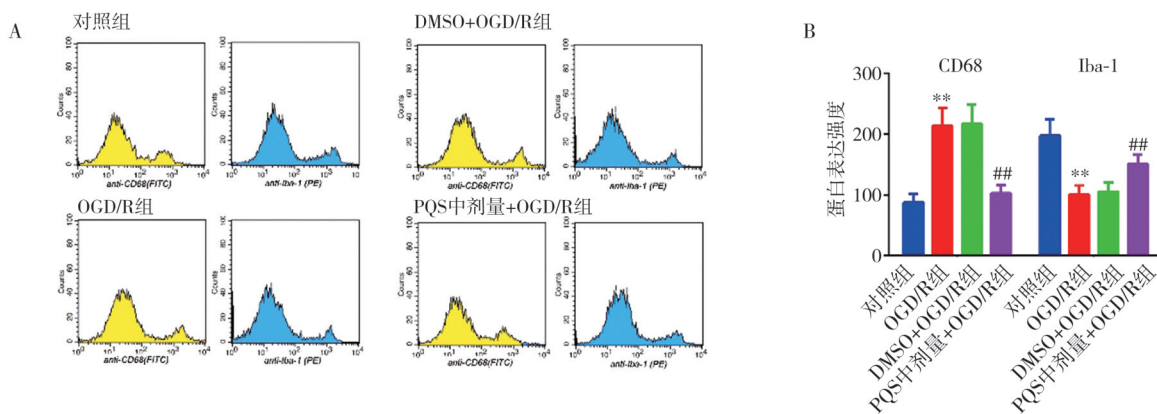
Fig. 2 Detection of BV-2 cell proliferation in each group by CCK-8 assay($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.3 对 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞表型变化的影响

流式检测结果显示, 与对照组比较, OGD/R 组 BV-2 细胞中胶质细胞静止表型特征蛋白 Iba-1 表达明显降低($P < 0.01$), 而活化表型特征蛋白 CD68 表达则明显升高($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, PQS 中剂量+OGD/R 组 BV-2 细胞中 Iba-1 的表达明显增加($P < 0.01$), 而 CD68 表达则明显降低($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, DMSO+OGD/R 组 BV-2 细胞中 Iba-1 和 CD68 蛋白表达均未出现明显变化($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 对 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞 NF- κ B 蛋白活化

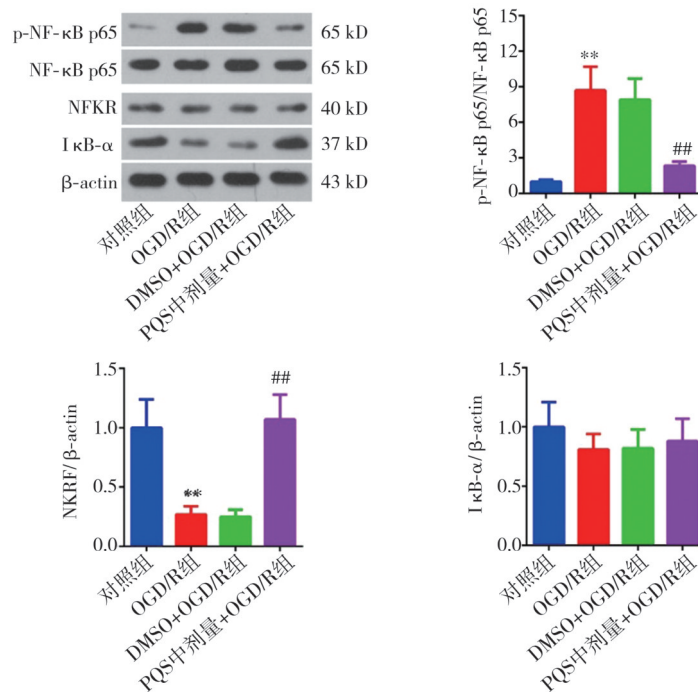
的影响 Western blot 结果显示, 与对照组比较, OGD/R 组 BV-2 细胞中 NF- κ B p65 磷酸化明显增强($P < 0.01$), 其抑制因子 NKRF 蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。与 OGD/R 组比较, PQS 中剂量+OGD/R 组 BV-2 细胞中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化明显降低($P < 0.01$), 而 NKRF 蛋白表达明显增加($P < 0.01$)。溶媒 DMSO 的添加对 OGD/R 条件下 BV-2 细胞中上述蛋白表达或者磷酸化均无明显影响($P > 0.05$)。此外, 各组 BV-2 细胞中 I κ B- α 蛋白表达无明显差异($P > 0.05$)。见图 4。



A 为流式检测阈值图;B 为各组细胞中 CD68 和 Iba-1 蛋白表达分析。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 3 BV-2 小胶质细胞表型分析 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Phenotype analysis of BV-2 microglia cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)



与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 各组 BV-2 细胞中 NF-κB p65 蛋白磷酸化及其抑制蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Detection of NF-κB p65 phosphorylation and expression of NKRF and IκB-α in BV-2 cells of each group ($n=3, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

根据世界卫生组织(WHO)最新统计,脑缺血直接或者间接造成患者死亡事件已攀升至所有致死类疾病第二位,且在近几年呈现加速上升之态势^[11]。在我国,随着饮食结构和生活方式的改变,以及人口老龄化的日渐显现,AIS的发病率还是病死率在近几年均有较大程度的增长,且具有明显的低龄化发展趋势,这给我国的医疗支出带来沉重的

负担^[12-13]。据统计,约有 80% 的脑缺血患者脑部病变均为动脉栓塞所造成的脑供血不足,以及由此导致的细胞和组织损伤。AIS 的临床治疗仍以静脉溶栓和动脉机械取栓为主,但统计和研究数据证实无论取栓还是溶栓治疗均有较高的不良预后发生率,具体临床表现为接受治疗的患者出现神经损伤以及由此导致的认知功能受损^[14-16]。

脑部小胶质细胞具有极为活跃的生物学功能,其能够在不同的病理条件下应激性表达和释放不

同的功能因子和介质,并对神经元产生保护或者损伤的双重作用^[17]。研究表明,在脑缺血发生初期,小胶质细胞能够应激性快速迁移至缺血区域并分泌多种神经保护因子,如神经细胞营养因子、神经保护因子等,并以此积极维持神经元存活和生物学功能。而随着缺血时间的增加以及再灌注的发生,持续活化会使小胶质细胞表达和分泌大量的炎症因子,形成局部炎症介质并造成神经元损伤^[17]。动物实验表明,小胶质细胞炎性活化一般起始于缺血再灌注后的 3 h,并在 48 h 内持续增强。而临床患者监测数据表明,患者小胶质细胞的活化起始于缺血后 72 h,而持续时间最长可超过 4 周。因此,关注脑部小胶质细胞在缺血再灌注条件下的炎性活化,通过药物抑制小胶质细胞促炎作用而降低神经损伤,被认为是改善 AIS 患者溶栓和取栓治疗和术后恢复的重要途径^[18]。

研究表明,AIS 患者脑部小胶质细胞炎性活化与神经元损伤在时间轴上属于共发生事件,这是两者存在关联的又一直接证据^[17]。目前,已有多种针对小胶质细胞炎性活化的新药被研发和获批上市,但其中多数属于炎症抑制剂^[19]。例如,非选择性腺苷受体激动剂 2-氯腺苷,被证实可以有效对抗缺血再灌注导致的脑组织炎症反应^[20]。而氧化巴西木素(brazilein)被证实可以有效抑制缺血再灌注动物脑组织中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达^[21]。作为经典的炎症反应调控因子,NF- κ B 被证实在缺血再灌注引起的小胶质细胞炎性活化中具有重要的作用^[6,22-23]。NF- κ B 的活性依赖于其 p65 和 p50 亚基磷酸化,而其亚基磷酸化则受到其内源性抑制因子 I κ B 和 NKRF 的间接调控。NKRF 被证实能够使 NF- κ B 处于非活性状态^[24]。研究表明,细胞质中的 NKRF 能够通过与 NF- κ B 的 p65 亚型形成 p65-NKRF 复合物,从而抑制 p65-p50 亚基形成复合物及磷酸化^[25-27]。事实上,在 NF- κ B 活化主导的炎症反应模型中,几乎所有增强 NKRF 表达的药物,都被证实具有一定的抗炎活性^[28]。

本研究发现,OGD/R 能够明显诱导 BV-2 细胞的炎性活化,而 PQS 则能明显抑制 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞炎性活化。结果表明,PQS 预处理能够以浓度梯度依赖的方式抑制 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞炎症因子释放以及 BV-2 细胞的快速增殖。表型检测显示,OGD/R 能够明显抑制 BV-2 细胞中胶质细胞静态表型蛋白 Iba-1 表达,同时上调活化状态

表型蛋白 CD68 表达,而 PQS 预处理能够明显逆转 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞表型转换。为了明确 PQS 的作用途径,本课题组对 NF- κ B p65 亚基的磷酸化及其两个重要的活性抑制因子 I κ B- α 和 NKRF 的表达进行检测,发现 OGD/R 能够明显上调 BV-2 细胞中 NF- κ B p65 的磷酸化,且 PQS 预处理能够逆转上述作用。此外,各组 BV-2 细胞中 NKRF 的表达与 NF- κ B p65 的磷酸化呈现相反的趋势,而各组 BV-2 细胞中 I κ B- α 蛋白的表达无明显差异。综合上述研究结果表明,PQS 能够明显抑制 OGD/R 引起的小胶质细胞炎性活化,其作用途径可能与上调 NKRF 蛋白表达有关。

本研究为 PQS 在脑缺血治疗领域的应用提供了有力支持,其作用途径的初步阐述为将来针对脑缺血靶向治疗的新药研发提供了可选的靶标蛋白。当然,完全阐明 PQS 抗缺血性脑损伤的作用机制,仍然需要深入而系统的工作。其中,通过科学手段进一步解析 PQS 与 NKRF 的相互作用,以其参与小胶质细胞炎性活化调控为切入点解释其改善缺血导致的脑神经损伤的作用机制,无疑是未来研究工作的重要方向。在后续计划中,本课题组拟通过药物亲和致靶点稳定性(DARTS)实验、表面等离子体共振(SPR)实验等对 PQS 与 NKRF 蛋白的直接结合进行验证,以期明确 PQS 与 NKRF 蛋白的互动方式以及 NKRF 是否作为 PQS 抗缺血性脑损伤的直接作用靶点发挥作用。此外,未来课题组还将继续明确和进一步分离 PQS 的主要抗炎活性成分,并以活性单体为原型,进一步设计、合成和筛选更为有效的抗缺血再灌注损伤的化学衍生物,从而为高效抗脑缺血新药的研发奠定坚实的理论基础。

参考文献:

- [1] RASS V, HELBOK R. How to diagnose delayed cerebral ischaemia and symptomatic vasospasm and prevent cerebral infarction in patients with subarachnoid haemorrhage [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2021, 27(2): 103-114.
- [2] MARTIN A, CLAASSEN J. Can epileptiform abnormalities predict delayed cerebral ischemia in subarachnoid hemorrhage? [J]. *Clin Neurophysiol*, 2017, 128(6): 1037-1038.
- [3] WANG Y J, LI Z X, GU H Q, et al. China Stroke Statistics: an update on the 2019 report from the National Center for Healthcare Quality Management in Neurological Diseases, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, the Chinese Stroke Association, National Center for Chronic and Non-communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention and Institute for Global

- Neuroscience and Stroke Collaborations [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2022, 7(5): 415-450.
- [4] SURINKAEW P, SAWADDIRUK P, APAIJAI N, et al. Role of microglia under cardiac and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury[J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(4): 1019-1030.
- [5] ZHOU S, ZHU W, ZHANG Y, et al. S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(11-12): 937-949.
- [6] AL-OMAR Z, OZBAKIR B, TULAY P. Differential expression of genes involved in steroidogenesis pathway in human oocytes obtained from patients with polycystic ovaries [J]. *J Reprod Immunol*, 2020, 142: 103191.
- [7] ZHANG T, LI Z, QIN Z, et al. Neuroprotection of Chikusetsu saponin V on transient focal cerebral ischemia/reperfusion and the underlying mechanism[J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153516.
- [8] SCHOLEY A, QSSOUKHOVA A, OWEN L, et al. Effects of American ginseng (*Panax quinquefolius*) on neurocognitive function: an acute, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2010, 212(3), 345-356.
- [9] HU J N, YANG J Y, JIANG S, et al. *Panax quinquefolium* saponins protect against cisplatin evoked intestinal injury via ROS-mediated multiple mechanisms [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153446.
- [10] SHIN E J, NGUYEN B T, JEONG J H, et al. Ouabain inhibitor rosfafuroxin attenuates dextromethorphan-induced manic potential [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 158: 112657.
- [11] THAVABARANATHAN T, KIM J, CADILHAC D A, et al. Global stroke statistics 2022 [J]. *Int J Stroke*, 2022, 17(9): 946-956.
- [12] KRISHNAMURTHI R V, IKEDA T, FEIGIN V L. Global, Regional and Country-Specific Burden of Ischaemic Stroke, Intracerebral Haemorrhage and Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Neuroepidemiology*, 2020, 54(2): 171-179.
- [13] WU S, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4): 394-405.
- [14] SUZUKI K, MATSUMARU Y, TAKEUCHI M, et al. Effect of Mechanical Thrombectomy Without vs With Intravenous Thrombolysis on Functional Outcome Among Patients With Acute Ischemic Stroke: The SKIP Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA*, 2021, 325(3): 244-253.
- [15] HURFORD R, SEKHAR A, HUGHES T A T, et al. Diagnosis and management of acute ischaemic stroke [J]. *Pract Neurol*, 2020, 20(4): 304-316.
- [16] GOYAL M, MENON B K, VAN ZWAM W H, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials [J]. *Lancet*, 2016, 387: 1723-1731.
- [17] GERGELY S, BERNADETT M, NIKOLETT L, et al. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11499.
- [18] POLAZZI E, GIANNI T, CONTESTABILE A. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling [J]. *Glia*, 2001, 36(3): 271-280.
- [19] KUAI F, ZHOU L, ZHOU J, et al. Long non-coding RNA THRIL inhibits miRNA-24-3p to upregulate neuropilin-1 to aggravate cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating the nuclear factor κ B p65 signaling [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(6): 9071-9084.
- [20] XIE J, LI X, ZHANG L, et al. Genistein-3'-sodium sulfonate ameliorates cerebral ischemia injuries by blocking neuroinflammation through the α 7nAChR-JAK2/STAT3 signaling pathway in rats [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153745.
- [21] YAN X J, CHAI Y S, YUAN Z Y, et al. Brazilein inhibits neuronal inflammation induced by cerebral ischemia and oxygen-glucose deprivation through targeting NOD2 expression [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(5): 354-362.
- [22] TIAN C, LI Z, ZHANG L, et al. lncRNA NR_120420 promotes SH-SY5Y cells apoptosis by regulating NF- κ B after oxygen and glucose deprivation [J]. *Gene*, 2020, 728: 144285.
- [23] YOUSEFI-MANESH H, RASHIDIAN A, HEMMATI S, et al. Therapeutic effects of modafinil in ischemic stroke; possible role of NF- κ B downregulation [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2019, 41(5): 558-564.
- [24] LAURA B, EMMANUEL L, WILLIAM M, et al. NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469.
- [25] MESHRAM S N, PAUL D, MANNE R, et al. FBXO32 activates NF- κ B through I κ B α degradation in inflammatory and genotoxic stress [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 92: 134-140.
- [26] LI Y, XI Y, TAO G, et al. Sirtuin 1 activation alleviates primary biliary cholangitis via the blocking of the NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106386.
- [27] CHEN X J, ZHANG W N, CHEN B, et al. Homoharringtonine deregulates MYC transcriptional expression by directly binding NF- κ B repressing factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(6): 2220-2225.
- [28] LIU J, CHEN Q, JIAN Z, et al. Daphnetin Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice via Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2816056.

(编辑:杨轶舜)