

## 毛蕊异黄酮苷调控 SIRT1 信号通路缓解海马神经元细胞损伤的研究

闫向丽<sup>1,2,3</sup>, 王利胜<sup>3</sup>, 王圣鑫<sup>3</sup>, 余爱明<sup>3</sup>, 许二平<sup>1,2</sup> (1. 河南中医药大学中医药科学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 河南 郑州 450046; 3. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

**摘要:** **目的** 探讨毛蕊异黄酮苷(CG)通过调控沉默信息调节因子 1(SIRT1)信号通路对氧糖剥夺再灌注(OGD/R)海马神经元细胞损伤的保护作用。**方法** 将海马神经元细胞在无糖培养基中缺氧 8 h 后, 在完全培养基中复氧 6 h 建立 OGD/R 模型。将细胞分为 4 组: 正常对照组、氧糖剥夺再灌注组(OGD/R 组, 模型组)、SIRT1 特异性抑制剂组(EX527 组)、EX527+毛蕊异黄酮苷组(EX527+CG 组)。细胞处理结束后, 采用 CCK-8 法测定细胞存活率; 分光光度法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量; 荧光法检测细胞中活性氧(ROS)含量、细胞凋亡率; Western Blot 及 ELISA 法检测 SIRT1 信号通路中相关蛋白的表达水平。**结果** 与 OGD/R 组比较, EX527 组的细胞活力、SOD 含量及 SIRT1、叉头转录因子 1(FOXO1)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.05$ ), LDH 及 MDA 含量、细胞凋亡率、Bax 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。与 EX527 组比较, EX527+CG 组的细胞活力及 FOXO1、Bcl-2 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平均有升高, SOD 含量及 SIRT1 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ); MDA 含量有降低, LDH 含量、细胞凋亡率及 Bax 蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。**结论** 毛蕊异黄酮苷缓解海马神经元 OGD/R 损伤的机制与调控 SIRT1 信号通路有关。

**关键词:** 毛蕊异黄酮苷; 海马神经元细胞; SIRT1 信号通路; SIRT1 特异性抑制剂; 氧糖剥夺再灌注损伤

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0758-07

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.002

## Calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside Attenuate Hippocampal Neurons Injury by Regulating SIRT1 Signaling Pathway

YAN Xiangli<sup>1,2,3</sup>, WANG Lisheng<sup>3</sup>, WANG Shengxin<sup>3</sup>, YU Aiming<sup>3</sup>, XU Erping<sup>1,2</sup> (1. Henan University of Chinese Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China; 2. Henan Key Laboratory for Modern Research on Zhongjing's Herbal Formulae, Zhengzhou 450046 Henan, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of Calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside(CG) on oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) neurons by regulating SIRT1 signaling pathway. **Methods** The OGD/R model of hippocampal neurons was established by hypoxia for 8 h in glucose free medium and reoxygenation in complete medium for 6 h. The cells were divided into four groups: normal group(Control), OGD/R group, SIRT1 specific inhibitor group (EX527), SIRT1 specific inhibitor + Calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside group (EX527 + CG). After treatment, CCK-8 method was used to determine the cell survival rate; spectrophotometry was used to detect the contents of lactate dehydrogenase(LDH), superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA); the content of reactive oxygen species(ROS), the apoptosis rate were detected by fluorescence method; Western Blot and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) were used to detect the expression of SIRT1 related proteins. **Results** Compared with OGD/R group, cell viability, SOD content, SIRT1 protein, FOXO1 protein, Bcl-2 protein and PGC-1 $\alpha$  protein levels were significantly decreased in EX527 group( $P < 0.05$ ), while LDH and MDA content, apoptosis rate

收稿日期: 2020-09-21

作者简介: 闫向丽, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中医药防治常见病。Email: 1583134900@qq.com。通信作者: 许二平, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治常见病。Email: xuerping@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873228); 广东省教育厅计划项目(2017KZDXM018)。

and Bax protein level were significantly increased in EX527 group ( $P < 0.05$ ). Compared with EX527 group, cell viability, FOXO1 protein, Bcl-2 protein and PGC-1 $\alpha$  protein levels were increased in EX527 + CG group, SOD content and SIRT1 protein levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ), MDA content was decreased, LDH content and apoptosis rate and Bax protein level were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The mechanism of CG in alleviating OGD/R injury of hippocampal neurons is related to the regulation of SIRT1 signaling pathway.

**Keywords:** Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside(CG); hippocampal neurons; SIRT1 signaling pathway; SIRT1 specific inhibitor; oxygen-glucose deprivation/reperfusion(OGD/R) injury

脑血管疾病因其高发病率、高致残率、高复发率的特点,成为严重威胁人类健康和影响社会经济发展的疾病<sup>[1-3]</sup>。缺血性脑中风是脑血管疾病的主体,占脑血管疾病的 60%~80%。脑组织处于缺血缺氧的病理状态下,大脑的结构和功能将出现严重的损伤和破坏,而当用溶栓、扩张血管等手段重新补给血液后,会进一步加剧脑组织的损伤并伴随一系列的炎症反应,引起再灌注损伤<sup>[4]</sup>。沉默信息调节因子 1 (SIRT1)是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)依赖的蛋白去乙酰化酶类<sup>[5-7]</sup>,可通过与过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子(PGC-1 $\alpha$ )、核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、DNA 修复酶等底物相互作用<sup>[8-10]</sup>,参与神经保护、抑制炎症反应及促进细胞增殖等多种生命活动<sup>[11]</sup>。毛蕊异黄酮苷(CG)是中药黄芪的主要活性成分之一。有研究<sup>[12-15]</sup>报道,CG 具有抗氧化应激和抗细胞凋亡活性,对神经细胞具有一定的保护作用。本课题组前期通过 SIRT1 信号通路初步探讨了 CG 对氧糖剥夺再灌注(OGD/R)损伤细胞模型的保护作用及机制<sup>[16]</sup>,基于此,本研究拟利用 SIRT1 特异性抑制剂 EX527 进一步探讨 CG 对海马神经元细胞 OGD/R 损伤模型的作用机制,以期 CG 在治疗缺血性脑中风的临床应用及进一步研发提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** 小鼠海马神经元细胞系,购自上海康朗生物科技有限公司。

**1.2 药物及试剂** CG(纯度  $\geq 98\%$ ,批号:56411564),成都普菲德生物技术有限公司。DMEM 无糖培养基(批号:8116461),美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒(批号:GB904),日本同仁化学研究所;SIRT1 特异性抑制剂 EX527(批号:CSN15833-006),美国 CSNpharm 公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号:20190416)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:20190416)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:

20190408),均购自南京建成生物工程研究所;SIRT1 抗体(货号:9475),美国 CST 公司;叉头转录因子 1 抗体(FOXO1,货号:AF6416)、BCL2-Associated X 抗体(Bax,货号:AF0120)、B 淋巴瘤细胞瘤-2 抗体(Bcl-2,货号:AF6139),均购自江苏 Affinity Biosciences 公司;过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )分析试剂盒(批号:MB-5755A),江苏酶标生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号:KGA105-KGA108),江苏凯基生物科技有限公司;活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:20191011),上海贝博生物科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:011720190724),上海碧云天生物技术有限公司。

**1.3 主要仪器** CCL-170T-8 型三气培养箱,新加坡 Esco 公司;TE2000-S 型荧光倒置显微镜,日本尼康公司;缺氧小室,加拿大 Stemcell 公司;ELx800 型酶联免疫检测仪,美国 BioTek 公司;FLV 1000 型激光共聚焦显微镜,日本 Olympus 公司;1658003 型垂直电泳槽、Criterion 蛋白转印系统、1708195 型成像系统、1645052 型 Powerpac Basic 基础电源,美国 Bio-Rad 公司;BD FACS Aria III 流式细胞仪,美国 BD 公司。

**1.4 细胞分组及给药** 将海马神经元细胞共分为 4 组,即正常对照组、氧糖剥夺再灌注组(OGD/R 组,模型组)、SIRT1 特异性抑制剂组(EX527 组)、EX527+毛蕊异黄酮苷组(EX527+CG 组)。正常对照组细胞始终在正常条件下培养;OGD/R 组细胞在无糖培养基中缺氧 8 h 后,将无糖培养基换成完全培养基复氧 6 h;EX527 组细胞用含 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EX527 的无糖培养基缺氧 8 h 后,将无糖培养基换成含 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EX527 的完全培养基复氧 6 h;EX527+CG 组细胞用含 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EX527 的无糖培养基缺氧 8 h 后,将无糖培养基换成含 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EX527 和 33.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CG 的完全培养基复氧 6 h。

**1.5 细胞存活率测定** 细胞处理结束后,吸弃原培养基, PBS 清洗 3 次后,加入含 10% CCK-8 的完全培养基;培养箱中孵育 2 h 后,用酶标仪测定各组在 450 nm 处的光密度(OD)值,计算:细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空白对照孔 OD 值)/(正常对照组 OD 值-空白对照孔 OD 值)×100%。

**1.6 生化指标测定** 细胞处理结束后,收集细胞上清液于新的 96 孔板中,严格按照试剂盒说明书步骤进行 LDH、SOD 活力及 MDA 含量的测定。

**1.7 细胞内 ROS 含量测定** 将 DCFH-DA 探针用于细胞内 ROS 含量的测定。细胞处理结束后,加入 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA 工作液,37 °C 避光孵育 20 min,无血清培养基清洗后,采用荧光酶标仪检测荧光强度。

**1.8 细胞凋亡率检测** 以荧光素 FITC 标记的 Annexin V 作为荧光探针进行细胞凋亡率检测。细胞处理结束后,胰蛋白酶消化收集细胞,Binding Buffer 悬浮细胞后,加入 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide,室温、避光反应 5 min,采用流式细胞仪测定细胞凋亡情况。

**1.9 Western Blot 法检测 SIRT1 信号通路中关键蛋白表达水平** 采用 RIPA 裂解细胞后,以 BCA 法测定总蛋白含量;蛋白样品制备完成后,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转移目标蛋白至 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h 后,在兔来源的一抗溶液中于 4 °C 孵育过夜,一抗孵育条件分别为 SIRT1(1:1 000)、FOXO1(1:1 000)、Bax(1:500)和 Bcl-2(1:500)。TBST 充分漂洗后,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗于室温孵育 1 h。TBST 清洗后,以 ECL 发光液进行显影;以 β-actin 为内参,采用 ImageJ 软件对目的蛋白进行半定量分析。

**1.10 ELISA 法检测 PGC-1α 蛋白表达水平** 细胞处理结束后,严格按照试剂盒说明书步骤检测 PGC-1α

蛋白表达水平。

**1.11 统计学处理方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较用 LSD 检验;以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

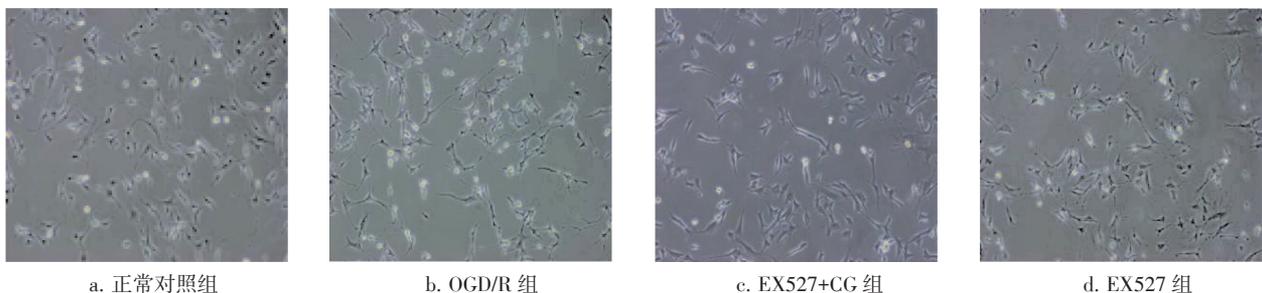
**2.1 CG 对 OGD/R 海马神经元细胞存活率及上清液中 LDH 的影响** 结果见表 1、图 1。正常对照组细胞轮廓清晰、立体感强、贴壁良好;OGD/R 组细胞皱缩,呈枯树枝状,部分变圆的细胞漂浮在培养基中;EX527 组细胞数目明显减少,且皱缩严重;CG 干预后,细胞形态趋于饱满,细胞数目增加。与正常对照组相比,OGD/R 组的细胞活力明显降低( $P < 0.05$ ),培养基中 LDH 含量明显升高( $P < 0.05$ );与 OGD/R 组相比,EX527 组细胞活力明显降低( $P < 0.05$ ),LDH 含量明显升高( $P < 0.05$ ),而 CG 干预后细胞活力升高,LDH 含量明显降低( $P < 0.05$ )。

表 1 毛蕊异黄酮苷对氧糖剥夺再灌注海马神经元细胞的存活率及上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effects of Calycosin-7-O-β-D-glucoside on oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured hippocampal neurons viability and LDH in supernatant( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	细胞存活率/%	LDH/(mmol·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	100.00±3.82	68.48±7.51
OGD/R 组	46.39±1.97 <sup>*</sup>	122.42±27.51 <sup>*</sup>
EX527+CG 组	45.49±2.70	162.72±25.44 <sup>*</sup>
EX527 组	35.99±2.55 <sup>△</sup>	257.42±35.82 <sup>△</sup>

注: OGD/R 组: 氧糖剥夺再灌注组; EX527 组: SIRT1 特异性抑制剂组; EX527+CG 组: EX527+毛蕊异黄酮苷组。与正常组对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 EX527 组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$



注: OGD/R 组: 氧糖剥夺再灌注组; EX527 组: SIRT1 特异性抑制剂组; EX527+CG 组: EX527+毛蕊异黄酮苷组

图 1 各组海马神经元细胞的形态学观察(×100)

Figure 1 Morphology of hippocampal neurons in each group(×100)

**2.2 CG 对 OGD/R 海马神经元细胞上清液中 SOD 活力及 MDA 含量的影响** 结果见表 2。与正常对照组相比, OGD/R 组的海马神经元细胞经氧糖剥夺再灌注后, 发生氧化应激损伤, 表现为 SOD 活力明显降低( $P < 0.05$ ), MDA 含量明显升高( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组相比, EX527 组细胞上清液中的 SOD 活力明显降低( $P < 0.05$ ), MDA 含量明显升高( $P < 0.05$ ), 而 CG 干预后 SOD 活力明显升高( $P < 0.05$ ), MDA 含量降低。

**2.3 CG 对 OGD/R 海马神经元细胞中 ROS 含量的影响** 结果见图 2。与正常对照组相比, OGD/R 组细胞经氧糖剥夺再灌注后绿色荧光明显增强, ROS 水平升高( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组相比, EX527 组细胞变圆, 且漂浮在培养基中, 荧光增强, ROS 水平升高( $P < 0.05$ ); 而 CG 干预后细胞

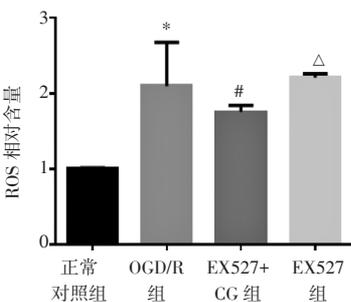
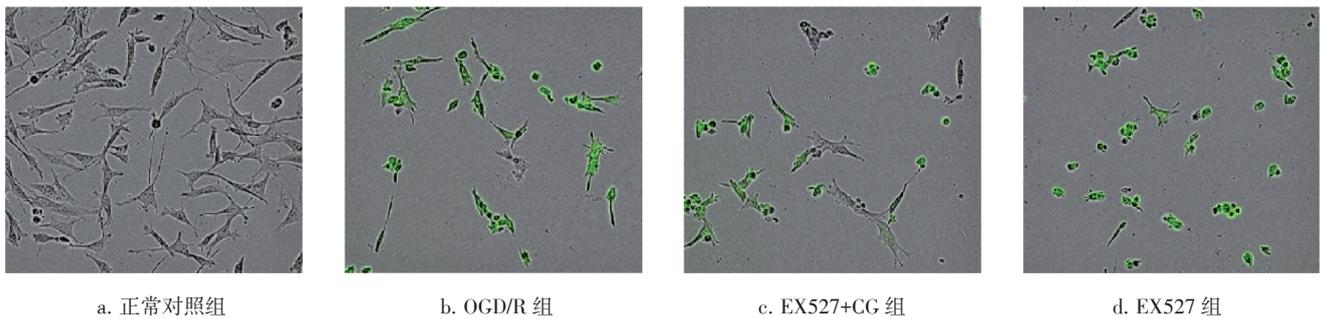
形态趋于正常, 绿色荧光明显减弱, ROS 水平降低( $P < 0.05$ )。

表 2 毛蕊异黄酮苷对氧糖剥夺再灌注海马神经元细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effects of Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside on SOD activity and MDA content in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured hippocampal neurons supernatant( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	SOD/(U·L <sup>-1</sup> )	MDA/(mmol·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	83.27 ± 7.09	176.03 ± 28.17
OGD/R 组	49.37 ± 3.43 <sup>*</sup>	341.42 ± 20.67 <sup>*</sup>
EX527+CG 组	60.60 ± 3.98 <sup>#</sup>	346.64 ± 19.12
EX527 组	31.92 ± 8.88 <sup>△</sup>	701.60 ± 22.07 <sup>△</sup>

注: OGD/R 组: 氧糖剥夺再灌注组; EX527 组: SIRT1 特异性抑制剂组; EX527+CG 组: EX527+毛蕊异黄酮苷组。与正常组对照组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 EX527 组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$



注: OGD/R 组: 氧糖剥夺再灌注组; EX527 组: SIRT1 特异性抑制剂组; EX527+CG 组: EX527+毛蕊异黄酮苷组。与正常组对照组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 EX527 组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$

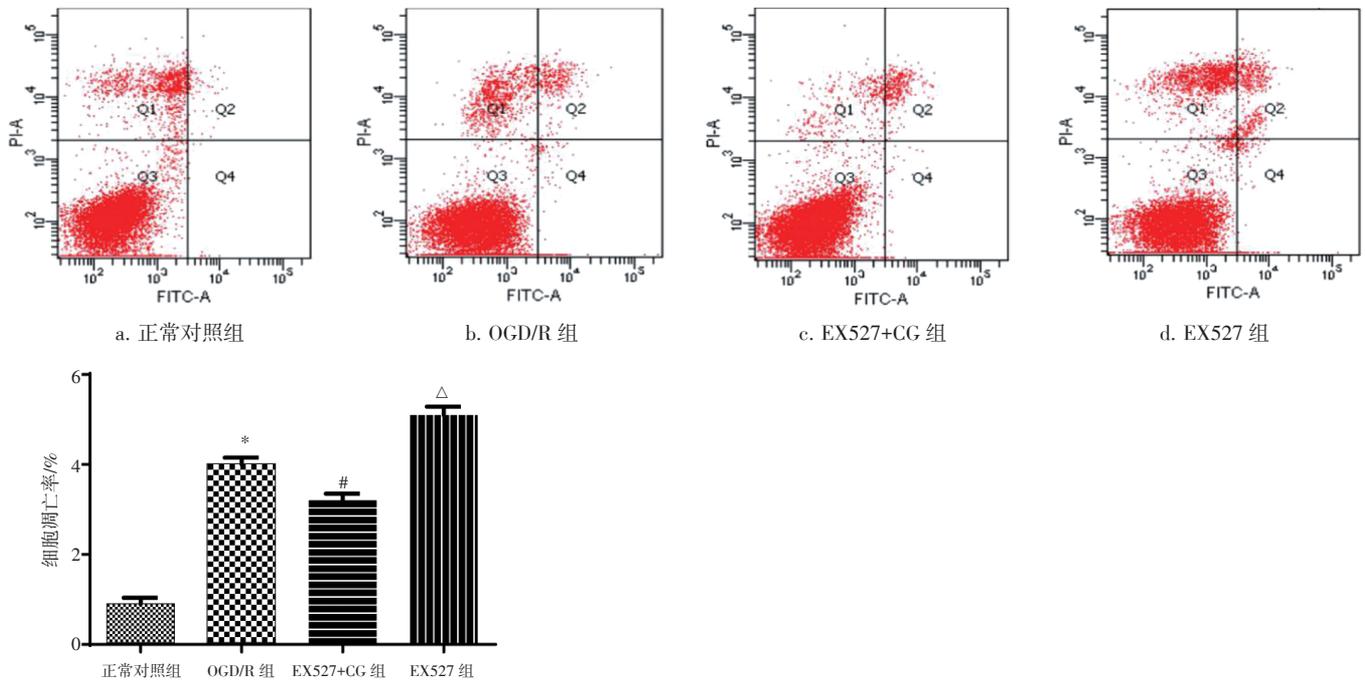
图 2 毛蕊异黄酮苷对氧糖剥夺再灌注海马神经元细胞中活性氧(ROS)含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Figure 2 Effects of Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside on ROS content in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured hippocampal neurons( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

**2.4 CG 对 OGD/R 海马神经元细胞凋亡率的影响** 结果见图 3。与正常对照组相比, OGD/R 组细胞经氧糖剥夺再灌注后, 细胞凋亡率明显增加( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组相比, EX527 组细胞凋亡率明显增加( $P < 0.05$ ), 而 CG 干预后, 细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ )。

**2.5 CG 对 OGD/R 海马神经元细胞 SIRT1 信号通路关键蛋白表达的影响** 结果见图 4。与正常对照组相比, OGD/R 组细胞经氧糖剥夺再灌注后, 细胞中的 SIRT1、FOXO1、Bcl-2 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平

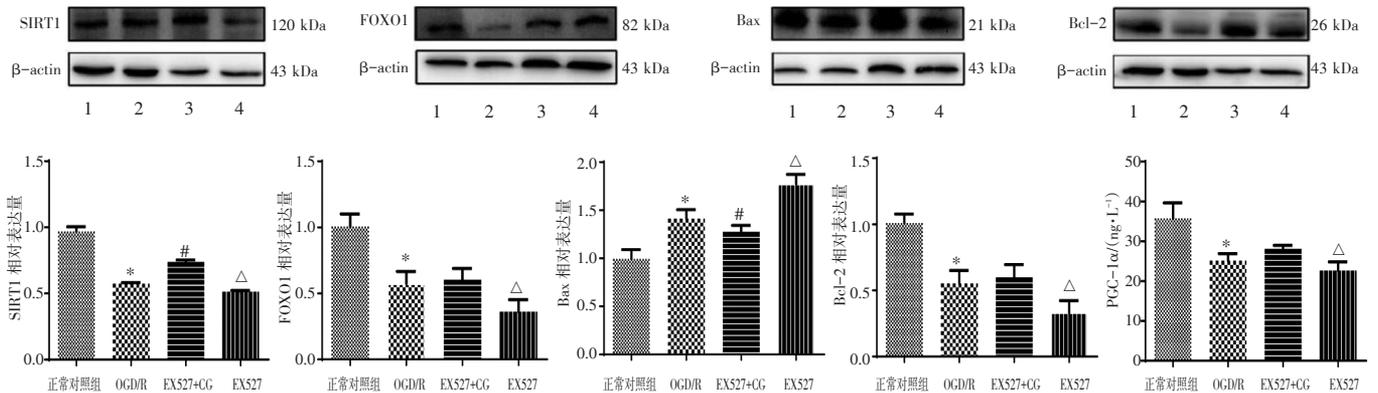
明显降低( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组相比, EX527 组细胞中的 SIRT1、FOXO1、Bcl-2 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.05$ ); 而经 CG 干预后, 海马神经元细胞中 SIRT1 的蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白的表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), FOXO1、Bcl-2 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平有升高, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



注：OGD/R 组：氧糖剥夺再灌注组；EX527 组：SIRT1 特异性抑制剂组；EX527+CG 组：EX527+毛蕊异黄酮苷组。与正常对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与 OGD/R 组相比，<sup>△</sup> $P < 0.05$ ；与 EX527 组相比，# $P < 0.05$

图 3 毛蕊异黄酮苷对氧糖剥夺再灌注海马神经元细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Figure 3 Effect of Calycosin-7-O-β-D-glucoside on apoptosis rate of oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured hippocampal neurons( $\bar{x} \pm s, n=6$ )



注：1. 正常对照组；2. 氧糖剥夺再灌注组(OGD/R)；3. SIRT1 特异性抑制剂组(EX527)；4. EX527+毛蕊异黄酮苷组(EX527+CG)。与正常对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与 OGD/R 组相比，<sup>△</sup> $P < 0.05$ ；与 EX527 组相比，# $P < 0.05$

图 4 毛蕊异黄酮苷对氧糖剥夺再灌注海马神经元细胞 SIRT1 信号通路中关键蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Figure 4 Effect of Calycosin-7-O-β-D-glucoside on the expression of key proteins in SIRT1 signaling pathway of oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured hippocampal neurons( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3 讨论

缺血性脑中风的发病机制复杂，70%的中风是由于血栓阻塞血管导致大脑局部缺血引起的。脑血栓的形成源于动脉血管壁病变后斑块的产生，进而引发氧化应激、兴奋性氨基酸毒性作用等一系列病理反应<sup>[17]</sup>。在治疗缺血性脑中风的用药历史中，益气

药、活血化瘀药、熄风药的使用频率最高<sup>[18]</sup>。黄芪是一味常用的补益药，为补中益气之要药。近年来，黄芪在中枢神经系统疾病方面的应用研究取得了显著进展。现代药理学研究<sup>[19]</sup>表明，黄芪能清除自由基，防止脂质过氧化引起的氧化应激损伤；降低脑缺血后兴奋性氨基酸的产生，减轻脑损

伤；上调脑缺血后 Bcl-2 蛋白的表达，抑制脑缺血引起的神经元凋亡。同时，黄芪及其活性成分还具有抑制神经炎症反应，促进神经血管修复等效应<sup>[19]</sup>。毛蕊异黄酮苷(CG)是中药黄芪的代表性成分之一，有研究<sup>[20]</sup>报道，CG 具有抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡的药理活性，然而其对海马神经元细胞氧糖剥夺再灌注(OGD/R)损伤模型的保护作用及机制尚不清楚。

脑缺血再灌注发生后，机体会产生大量的活性氧(ROS)，引起氧化应激反应。沉默信息调节因子 1(SIRT1)可通过增加抗氧化酶如超氧化物歧化酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的表达，减少丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)的产生，增加 ROS 的清除<sup>[21-23]</sup>。叉头转录因子(FOXO)家族是重要的转录调控因子，与氧化应激、细胞凋亡等有密切关系。魏毅君等<sup>[24]</sup>探讨了姜黄素后处理对脑缺血再灌注小鼠的影响，结果表明，姜黄素后处理组小鼠脑组织梗死区 SIRT1 的表达量明显增加，证实姜黄素可能通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路降低氧化应激和细胞凋亡，最终减轻脑缺血再灌注引起的损伤。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )在神经保护、促进线粒体的生物合成等过程中均发挥重要作用<sup>[25]</sup>。SOD 和线粒体脱偶连蛋白 2(UCP2)是线粒体内 2 个重要的 ROS 清除酶，PGC-1 $\alpha$  可以通过上调 SOD、UCP2 活性，减少 ROS 的产生，增强细胞的抗氧化能力<sup>[26]</sup>。

本课题组前期研究<sup>[27]</sup>发现，CG 和芍药苷联用能明显提高 OGD/R 损伤后 HT22 细胞的存活率，降低 LDH、MDA 的含量，提高 SOD 活力，对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞氧化应激损伤具有明显的保护作用，其作用机制与调节 PI3K/AKT 信号有关。并且发现 CG 能够提高 OGD/R 损伤后 HT22 细胞的活力，降低氧化应激和神经元凋亡，其作用机制可能与调控 SIRT1/FOXO1/PGC-1 $\alpha$  信号通路有关<sup>[16]</sup>。因此，本研究在前期工作的基础上，进一步利用 SIRT1 特异性抑制剂 EX527 探讨 CG 对海马神经元细胞 OGD/R 损伤模型的作用机制。本研究结果显示，SIRT1 特异性抑制剂 EX527 能够进一步降低 OGD/R 海马神经元细胞的活力及 SOD 活力，升高 LDH 及 MDA 含量、ROS 水平、细胞凋亡率，下调 OGD/R 海马神经元细胞 SIRT1、FOXO1、Bcl-2 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达，上调 Bax 蛋白表达。而 CG 表

现出明显逆转 EX527 抑制剂的作用，能够升高 OGD/R 海马神经元细胞活力及 SOD 活力，明显降低 LDH 及 MDA 含量、ROS 水平、细胞凋亡率，上调 OGD/R 海马神经元细胞 SIRT1、FOXO1、Bcl-2 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达，下调 Bax 蛋白表达。综上所述，本研究进一步证明了 CG 可能通过调节 SIRT1 信号通路发挥对海马神经元细胞 OGD/R 损伤模型的保护作用。

## 参考文献：

- [1] FEIGIN V, NORRVING B, MENSAH G. Global burden of stroke[J]. *Circulation Research*, 2017, 120(3): 439-448.
- [2] ZHONG L L, DING L S, HE W, et al. Systolic hypertension related single nucleotide polymorphism is associated with susceptibility of ischemic stroke[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(12): 2901-2906.
- [3] JEONG H G, KO S B, KIM C K, et al. Tachycardia burden in stroke unit is associated with functional outcome after ischemic stroke [J]. *International Journal of Stroke : Official Journal of the International Stroke Society*, 2016, 11(3): 313-320.
- [4] MATTIASSON G, SHAMLOO M, GIDO G, et al. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma[J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(8): 1062-1068.
- [5] SMITH J S, BRACHMANN C B, CELIC I, et al. A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6658-6663.
- [6] 王亚楠, 黄林, 王士雷. Sirtuins 在缺血再灌注损伤中作用的研究进展[J]. *山东医药*, 2018, 58(20): 104-107.
- [7] 王飞, 杜芸兰, 李焰生. 组蛋白去乙酰化酶6与神经变性疾病[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2013, 23(1): 1-5.
- [8] QU Y, ZHANG J, WU S, et al. SIRT1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human malignant glioma cell lines[J]. *Neuroscience Letters*, 2012, 525(2): 168-172.
- [9] WANG G, WANG J J, TO T S, et al. Role of SIRT1-mediated mitochondrial and Akt pathways in glioblastoma cell death induced by cotinus coggygia flavonoid nanoliposomes[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 5005-5023.
- [10] HONG L, WANG L, SHEN J C, et al. Salvianolic acid B attenuates apoptosis and inflammation via SIRT1 activation in experimental stroke rats[J]. *Brain Research Bulletin*, 2015, 115: 30-36.
- [11] YUE L, ZHAO L, LIU H, et al. Adiponectin protects against glutamate-induced excitotoxicity via activating SIRT1-dependent PGC-1 $\alpha$  expression in HT22 hippocampal neurons[J]. *Oxidative*

- Medicine and Cellular Longevity, 2016, 16: 29-57.
- [12] ZHANG W W, XU F, WANG D, et al. *Buyang Huanwu* decoction ameliorates ischemic stroke by modulating multiple targets with multiple components: *in vitro* evidences[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2018, 16(3): 194-202.
- [13] REN M, WANG X, DU G, et al. Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside attenuates ischemia-reperfusion injury *in vivo* via activation of the PI3K/Akt pathway[J]. Molecular medicine reports, 2016, 13(1): 633-640.
- [14] TSAI C C, WU H H, CHANG C P, et al. Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside reduces myocardial injury in heat stroke rats[J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2019, 118(3): 730-738.
- [15] 张冬梅, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对人宫颈癌Hela细胞凋亡及Bcl-2/Bax表达的影响[J]. 中草药, 2015, 46(10): 1498-1502.
- [16] YAN X L, YU A M, ZHENG H Z, et al. Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside attenuates OGD/R-induced damage by preventing oxidative stress and neuronal apoptosis *via* the SIRT1/FOXO1/PGC-1 $\alpha$  pathway in HT22 Cells[J]. Neural Plasticity, 2019, 2019(12): 1-12.
- [17] SUN S, HU F, WU J, et al. Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism *via* pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons[J]. Redox Biology, 2017, 11: 577-585.
- [18] 陈梅, 王立新. 中药联合干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 218-226.
- [19] 周龙云, 田子睿, 刘书芬, 等. 黄芪对中枢神经系统的药理作用及毒理研究现状[J]. 中草药, 2018, 49(20): 1-10.
- [20] 李亮亮, 黄金智. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷药理作用的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(2): 156-160.
- [21] SHAH S A, KHAN M, JO M H, et al. Melatonin stimulates the SIRT1/Nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain[J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2016, 16: 1-12.
- [22] CARLOMOSTI F, AGOSTINO M D, SARA B, et al. Oxidative stress-induced miR-200c disrupts the regulatory loop among SIRT1, FOXO1 and eNOS[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2016, 16: 1-60.
- [23] SUN J G, YUE F. Suppression of REDD1 attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-evoked ischemic injury in neuron by suppressing mTOR-mediated excessive autophagy[J]. J Cell Biochem, 2019, 19: 1-9.
- [24] 魏毅君, 翟蒙恩, 王晓武, 等. 姜黄素后处理通过 SIRT1/FOXO1 信号通路拮抗小鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(17): 3216-3219.
- [25] 耿慧霞, 李莺歌, 石贞玉, 等. PGC-1 $\alpha$ 过表达逆转OGD/R诱导的神经元线粒体功能降低和凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(11): 2078-2083.
- [26] ZHANG Y Q, CHEN C C, JIANG Y L, et al. PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) protects neuroblastoma cells against amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) induced cell death and neuroinflammation *via* NF- $\kappa$ B pathway[J]. BMC Neuroscience, 2017, 18(69): 1-8.
- [27] 王圣鑫, 闫向丽, 郑昊圳, 等. 毛蕊异黄酮苷和芍药苷联用对氧糖剥夺再灌注HT22细胞PI3K/AKT信号通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 138-142.

(编辑: 邹元平)