

• 实验研究 •

黄芩素对创伤性脑损伤大鼠血脑屏障和神经元焦亡及 NLRP3/Caspase-1 信号通路的影响

杨文涛, 刘雪琴, 张万宏, 吴恒浩

开封市中心医院 神经外科, 河南 开封 475000

摘要: **目的** 探究黄芩素对创伤性脑损伤大鼠血脑屏障和神经元焦亡的影响及对 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3) / 半胱天冬酶-1 (Caspase-1) 信号通路的影响。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组、黄芩素 (2.5、5.0、10.0 mg/kg) 组, 每组 12 只。黄芩素组分别按 2.5、5.0、10.0 mg/kg 剂量 ip 黄芩素。ELISA 法测定大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 水平; 伊文思蓝 (EB) 染料的超流体测量血脑屏障的通透性; TUNEL 和 Caspase-1 双染法检测细胞焦亡情况; 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 测定大鼠脑海马组织中闭锁小带蛋白 1 (*ZO-1*)、紧密连接蛋白 1 (*Claudin-1*)、闭合蛋白 (*Occludin*) 的 mRNA 表达量; Western blotting 法检测脑海马组织中 NLRP3/Caspase-1 通路相关蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 黄芩素各剂量组大鼠病变半球 EB 含量显著降低, 血脑屏障通透性显著改善, *ZO-1*、*Claudin-1*、*Occludin* mRNA 及 SOD、GSH-Px 水平显著上升 ($P < 0.05$), 海马组织细胞焦亡率及 MDA、IL-6、TNF- α 、NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 水平显著下降 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芩素可抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路, 减轻炎症反应和氧化应激反应, 改善创伤性脑损伤大鼠血脑屏障和神经元焦亡。

关键词: 黄芩素; 创伤性脑损伤; NOD 样受体热蛋白结构域 3; 半胱天冬酶-1; 氧化应激; 炎症反应

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2024)10-2457-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.10.001

Impacts of baicalein on blood-brain barrier, neuronal pyroptosis and NLRP3/Caspase-1 signaling pathway in rats with traumatic brain injury

YANG Wentao, LIU Xueqin, ZHANG Wanhong, WU Henghao

Department of Neurosurgery, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng 475000, China

Abstract: Objective To investigate the impacts of baicalein on the blood-brain barrier and neuronal pyroptosis in rats with traumatic brain injury, and its impact on the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway. **Methods** Rats were assigned into control group, model group, baicalein (2.5, 5.0, and 10.0 mg/kg) group, with 12 rats in each group. Baicalein groups were intraperitoneally injected with baicalein at doses of 2.5, 5.0, and 10.0 mg/kg, respectively. The serum TNF- α , IL-6, GSH-Px, SOD, and MDA were determined by ELISA method. The superfluid of Evans blue (EB) dye was used to measure the permeability of the blood-brain barrier. TUNEL and Caspase-1 double staining method was applied to detect cell apoptosis. RT-qPCR was applied to measure the mRNA expression levels of *ZO-1*, *Claudin-1*, and *Occludin* in hippocampal tissue. The expression of NLRP3/Caspase-1 pathway related proteins in hippocampal tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the EB content in the affected hemisphere of rats in the baicalein groups were greatly reduced, and the permeability of the blood-brain barrier was greatly improved, the levels of *ZO-1*, *Claudin-1*, *Occludin* mRNA, and SOD and GSH-Px were greatly increased ($P < 0.05$), the cell apoptosis rate and the levels of MDA, IL-6, TNF- α , NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , and IL-18 were greatly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalein can inhibit the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway, alleviate inflammatory and oxidative stress responses, and improve the blood-brain barrier and neuronal pyroptosis in traumatic brain injury rats.

收稿日期: 2024-08-08

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (联合共建) 项目 (LHGJ20191175)

作者简介: 杨文涛, 男, 主治医师, 硕士, 主要研究方向为颅脑损伤、脑肿瘤和神经重症。E-mail: ywtao8765@163.com

Key words: baicalein; traumatic brain injury; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; Caspase-1; oxidative stress; inflammatory reaction

创伤性脑损伤是导致全球死亡率和发病率显著上升的一个重要原因,尤其是年轻人。创伤性脑损伤是导致预期寿命显著下降的一个重要因素^[1]。创伤性脑损伤是世界范围内一个重要的医疗、公共卫生和社会经济问题,它的出现给社会以及许多家庭带来了严重的负担。相关数据表明,全世界有一半人会患创伤性脑损伤,尤其是那些低收入群体和中等收入群体的发病率和死亡率更高,跌倒、交通事故等是创伤性脑损伤住院患者的主要原因^[2]。因此,预防和治疗创伤性脑损伤是人类目前急需解决的问题之一。创伤性脑损伤后如果不及及时处理治疗,会造成细胞大量死亡。细胞死亡除坏死、凋亡、铁死亡外还包括细胞焦亡。细胞焦亡发生的速度非常快,可以诱发严重的炎症反应。主要表现为 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3)、半胱天冬酶-1 (Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白结合为炎性小体,进而促进机体分泌炎性因子,从而诱导细胞死亡^[3]。黄芩素是从黄芩根中分离出来的一种重要的生物活性药物,具有抗炎症、抗氧化、抗凋亡和神经保护等功能^[4]。研究表明,黄芩素可以通过改善血脑屏障,有效改善出血性脑损伤^[5-6]。据报道,黄芩素对创伤性脑损伤后的神经保护有重要作用^[7]。虽然黄芩素在创伤性脑损伤的治疗方面有了一定的进展,但是治疗创伤性脑损伤的机制尚不十分清楚。故本研究探讨黄芩素对创伤性脑损伤大鼠神经元焦亡和血脑屏障的作用及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠,雄性,体质量 330~350 g,SPF 级,购自杭州启真实验动物科技有限公司[SCXK (浙) 2022-0005]。本研究经开封市中心医院动物伦理委员会审批 (伦理批号 2022-015)。

1.2 主要试剂

黄芩素 (质量分数≥98%,货号 20150325),北京凯诗源生物公司;白细胞介素 (IL)-6 ELISA 试剂盒 (货号 HAS-47902),深圳海思安生物技术有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (货号 MM-0180R1),武汉益普生物科技有限公司;超氧化物歧化酶 (SOD) ELISA 试剂盒 (货号 YT30267),上海韵泰信息科技有限公司;NLRP3 抗

体 (货号 ab263899)、Caspase-1 抗体 (货号 ab207802)、IL-1 β 抗体 (货号 ab283818) 和 IL-18 抗体 (货号 ab191860),Abcam 公司;消皮素 D 的 N 端 (GSDMD-N) 抗体 (货号 DF13758),江苏亲科生物公司;丙二醛 (MDA) ELISA 试剂盒 (货号 XK-E12487),上海暄科生物公司;谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) ELISA 试剂盒 (货号 FT-D23894),上海梵态生物科技有限公司。

1.3 创伤性脑损伤大鼠模型的构建及分组

从 77 只大鼠中随机选 12 只作为对照组,其他 65 只构建创伤性脑损伤模型。ip 40 mg/kg 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,并将其固定在框架中,剥开头皮暴露颅骨,在右脑半球钻出一个孔后,以一定的速度对动物进行冲击。若大鼠出现头痛、恶心、呕吐等症状则表明造模成功^[8]。选择造模成功的 48 只大鼠随机分成模型组、黄芩素 (2.5、5.0、10.0 mg/kg) 组,每组 12 只。将黄芩素溶于磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS),分组完成后,黄芩素各剂量组立即分别经尾静脉一次性注射 2.5、5.0、10.0 mg/kg 黄芩素^[9]。对照组和模型组大鼠尾 iv 等量的 PBS。在脑损伤 12 h 后,各组大鼠经腹主动脉取血,室温静置 1 h,离心 10 min 获得血清,用于氧化应激和炎症指标检测;取血完成后,每组随机选取 6 只大鼠进行血脑屏障通透性检测;剩余 6 只大鼠处死,取脑海马组织,分成 3 部分,一部分用于 PCR,一部分在 4% 多聚甲醛中固定,用于检测细胞焦亡情况,另一部分用于 Western blotting。

1.4 血脑屏障通透性测量

用伊文思蓝 (EB) 染料的超流体测量血脑屏障的通透性。经尾静脉缓慢注射 EB 染料 (含生理盐水 2%) 3 mL/kg 于大鼠体内。1 h 后使用 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,在心脏灌注生理盐水。收集损伤半球,干燥,称质量,60 °C 甲酰胺 (4.0 mL) 孵育 24 h。孵育后,离心取上清液。最后在 620 nm 处检测吸光度 (A) 值,根据标准曲线计算出每个样品中渗出 EB 染料的质量。

1.5 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析

提取大鼠脑海马组织总 RNA,根据反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,采用 RT-qPCR 测定闭锁小带蛋白 1 (ZO-1)、紧密连接蛋白 1 (Claudin-

1)、闭合蛋白 (*Occludin*) 的 mRNA, 并归一化为 β -肌动蛋白 (β -*actin*), 引物使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线设计, 见表 1。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR		
基因	正向	反向
<i>ZO-1</i>	5'-ACAGCCAGCTCTT GGTCAT-3'	5'-GTATGGTGGCTGC TCAAGGT-3'
<i>Claudin-1</i>	5'-CTACTCCTCCAAC GGCAAAG-3'	5'-AGTCATCCACGGA CAAGGTC-3'
<i>Occludin</i>	5'-CCCCAATGGAAGA TTTACTCCT-3'	5'-GTATCTGCCCGGT GCTTT-3'
β - <i>actin</i>	5'-ACATCCGTAAAGA CCTCTATGCC-3'	5'-CTCCTGCTTGCTG ATCCAC-3'

1.6 氧化应激和炎症指标检测

按照 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 SOD、GSH-Px、MDA、IL-6、TNF- α 水平。

1.7 TUNEL 和 Caspase-1 双染法检测海马组织细胞焦亡情况

制备脑海马组织石蜡切片, 脱蜡至水后, 添加蛋白酶 K 工作液孵育 20 min, 洗涤后加入 TdT 缓冲液, 与 Caspase-1 (1:50) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后用二抗孵育, 接着切片在 DAPI 染液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 染核, 封片后在荧光显微镜下观察脑海马组织中细胞焦亡情况, 其中 TUNEL 为绿色荧光, DAPI 为蓝色荧光, Caspase-1 为红色荧光。

细胞焦亡率 = TUNEL + Caspase-1 + DAPI 共染阳性细胞/DAPI 染色细胞

1.8 Western blotting 法检测海马组织 NLRP3/Caspase-1 通路相关蛋白表达

取大鼠脑海马组织匀浆, 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 蛋白经定量、电泳、转膜、封闭后, 添加 Caspase-1、NLRP3、IL-1 β 、GSDMD-N、IL-18 和 β -actin 一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 添加 HRP

偶联的羊抗兔二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, 通过 ECL 试剂显影。用 Image LabTM 软件对目标蛋白进行定量分析。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件。数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较行单因素方差分析, 两两比较行 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 黄芩素对大鼠血脑屏障通透性的影响

与对照组相比, 模型组大鼠病变半球 EB 含量显著增加, 血脑屏障通透性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 黄芩素各剂量组大鼠病变半球 EB 含量显著降低, 血脑屏障通透性显著改善 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见表 2。

表 2 各组大鼠脑损伤后 EB 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Comparison of EB content after brain injury in rats of various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	EB/(mg·g ⁻¹)
对照	—	0.62 ± 0.07
模型	—	3.72 ± 0.17*
黄芩素	2.5	2.89 ± 0.16 [#]
	5.0	2.40 ± 0.12 ^{#&}
	10.0	1.01 ± 0.09 ^{#&@}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与黄芩素 2.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与黄芩素 5.0 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs baicalcin 2.5 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs baicalcin 5.0 mg·kg⁻¹ group。

2.2 黄芩素对血脑屏障通透性相关基因的影响

与对照组相比, 模型组大鼠脑海马组织 *ZO-1*、*Claudin-1*、*Occludin* mRNA 水平下降 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 黄芩素各剂量组 *ZO-1*、*Claudin-1*、*Occludin* mRNA 显著增加 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见表 3。

表 3 各组大鼠血脑屏障通透性相关基因的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Expression of genes related to blood-brain barrier permeability in rats of various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		<i>ZO-1</i>	<i>Claudin-1</i>	<i>Occludin</i>
对照	—	0.86 ± 0.10	1.23 ± 0.13	0.91 ± 0.11
模型	—	0.23 ± 0.03*	0.22 ± 0.03*	0.25 ± 0.05*
黄芩素	2.5	0.43 ± 0.04 [#]	0.50 ± 0.05 [#]	0.49 ± 0.04 [#]
	5.0	0.54 ± 0.08 ^{#&}	0.74 ± 0.09 ^{#&}	0.69 ± 0.12 ^{#&}
	10.0	0.68 ± 0.12 ^{#&@}	0.98 ± 0.09 ^{#&@}	0.86 ± 0.06 ^{#&@}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与黄芩素 2.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与黄芩素 5.0 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs baicalcin 2.5 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs baicalcin 5.0 mg·kg⁻¹ group。

2.3 黄芩素对氧化应激指标的影响

与对照组相比,模型组 SOD 和 GSH-Px 水平显著下降,MDA 水平升高($P<0.05$);与模型组相比,

黄芩素各剂量组 SOD 和 GSH-Px 水平升高,MDA 水平显著降低($P<0.05$),且呈剂量相关性,见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 SOD、GSH-Px 和 MDA 的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 4 Comparison of SOD, GSH-Px and MDA in serum of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	80.26±6.54	68.23±6.43	1.91±0.21
模型	—	36.83±4.43*	33.22±3.43*	5.72±0.25*
黄芩素	2.5	47.93±6.34 [#]	39.64±4.52 [#]	4.91±0.52 [#]
	5.0	58.73±6.28 ^{#&}	45.74±2.54 ^{#&}	3.99±0.12 ^{#&}
	10.0	70.68±5.32 ^{#&@}	52.25±4.82 ^{#&@}	2.57±0.43 ^{#&@}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与黄芩素 2.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P<0.05$; 与黄芩素 5.0 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs baicalein 2.5 mg·kg⁻¹ group; [@] $P<0.05$ vs baicalein 5.0 mg·kg⁻¹ group.

2.4 黄芩素对炎症指标的影响

与对照组相比,模型组 IL-6 和 TNF- α 水平显著增加($P<0.05$);与模型组相比,黄芩素各剂量组各指标水平显著下降($P<0.05$),且呈剂量相关性,见表 5。

表 5 各组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 5 Comparison of IL-6 and TNF- α in the serum of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	147.43±16.96	96.85±8.58
模型	—	454.53±23.85*	345.98±20.75*
黄芩素	2.5	345.85±20.73 [#]	264.34±23.63 [#]
	5.0	236.48±19.87 ^{#&}	152.34±11.43 ^{#&}
	10.0	142.85±15.85 ^{#&@}	97.54±9.53 ^{#&@}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与黄芩素 2.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P<0.05$; 与黄芩素 5.0 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs baicalein 2.5 mg·kg⁻¹ group; [@] $P<0.05$ vs baicalein 5.0 mg·kg⁻¹ group.

2.5 黄芩素对脑海马组织中细胞焦亡率的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织中细胞焦亡率显著增加($P<0.05$);与模型组比较,黄芩素各剂量组大鼠海马组织中细胞焦亡率均显著下降($P<0.05$),且呈剂量相关性,见图 1、表 6。

2.6 黄芩素对脑海马组织 NLRP3/Caspase-1 通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 表达显著增高($P<0.05$);与模型组相比,黄芩素各剂量组各蛋白表达显著下降($P<0.05$),且呈剂量相关性,见图 2、表 7。

3 讨论

创伤性脑损伤通常是由外部力量引起的脑功能

中断或脑病理。创伤性脑损伤一般包括 2 个阶段:原发性损伤和继发性损伤^[10]。原发性损伤通常表现为刀伤、挫伤和血肿^[11]。继发性损伤通常表现为氧化应激、炎症、血管通透性增强、血脑屏障损伤等,继发性损伤使创伤后脑损伤显著恶化^[12]。氧化应激、神经炎症和细胞焦亡被认为是创伤性脑损伤的关键病理生理机制。

研究发现,脑损伤后,受损细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 等组成的炎性小体复合物形成,裂解 GSDMD,释放形成膜孔的 GSDMD-N,从而促进炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 大量释放,加重细胞死亡,加重脑损伤^[13]。因此,本实验构建创伤性脑损伤大鼠模型,结果发现,与对照组比较,模型组大鼠血清中炎性因子水平显著升高,SOD 和 GSH-PX 水平显著降低,MDA 水平显著升高,血脑屏障通透性显著增加,细胞焦亡率及 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白水平显著增加,与先前的研究结果一致^[12, 14],表明创伤性脑损伤模型构建成功。

血脑屏障被破坏是创伤性脑损伤的主要特征,血脑屏障的通透性主要由内皮细胞上紧密连接蛋白的表达调节^[15]。当原发性损伤发生时,血流减少,内皮细胞受损,基底膜和紧密连接蛋白被破坏,进而使屏障功能受损和屏障通透性增加。当屏障功能下降时,通透性增加,细胞因子(如 IL-6、IL-10、TNF- α 、IL-1 β)显著增加。随着细胞因子的上调,机体处于促炎状态。最新数据表明,创伤性脑损伤啮齿动物模型中促炎细胞因子的水平显著上升。在细胞因子中,TNF- α 和 IL-1 β 在加剧组织损伤方面起着至关重要的作用^[16]。动物实验研究显示,黄芩素可通过抑制铁死亡减轻脑缺血再灌注损伤,还可

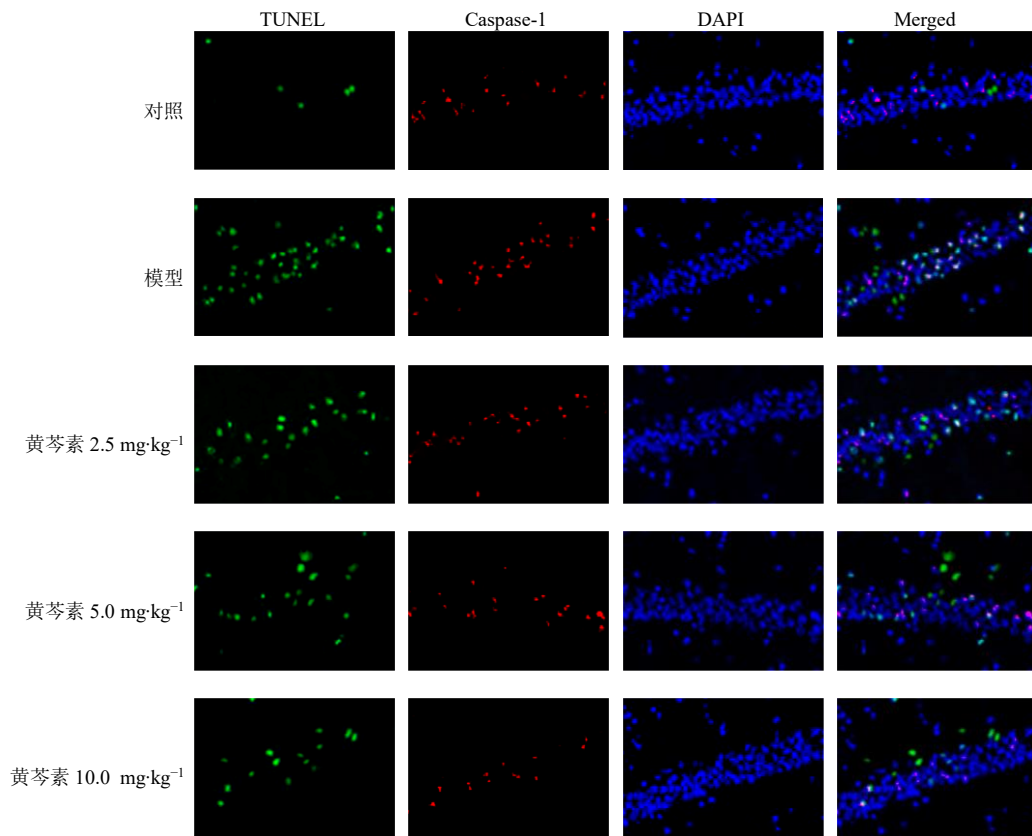


图 1 TUNEL 和 Caspase-1 双染检测大鼠脑海马组织中细胞焦亡情况 (×200)

Fig. 1 Detection of cellular pyroptosis in rat brain hippocampal tissue by double staining with TUNEL and Caspase-1 (×200)

表 6 各组大鼠脑海马组织中细胞焦亡率比较
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Comparison of the rate of cellular pyroptosis in the hippocampal tissues of the brain of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	细胞焦亡率/%
对照	—	4.64±0.14
模型	—	37.23±2.43*
黄芩素	2.5	27.24±1.98 [#]
	5.0	19.14±1.32 ^{#&}
	10.0	13.98±1.23 ^{#&@}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与黄芩素 2.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与黄芩素 5.0 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs baicalcin 2.5 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs baicalcin 5.0 mg·kg⁻¹ group.

通过抑制活性氧 (ROS) 和 NLRP3 炎性体减轻脑出血后脑损伤^[17-18]。本研究数据表明, 黄芩素显著改善了血脑屏障的通透性, 显著增加了大鼠 *ZO-1*、*Claudin-1*、*Occludin* mRNA 表达量, 显著降低了 IL-6 和 TNF- α 水平。表明黄芩素可以改善血脑屏障的

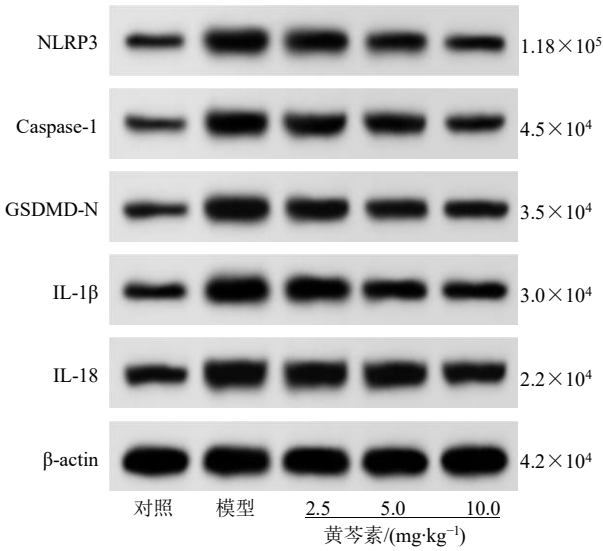


图 2 大鼠脑海马组织中 NLRP3/Caspase-1 通路相关蛋白表达
Fig. 2 Expression of NLRP3/Caspase-1 pathway-related proteins in the hippocampal tissues of the brain of rats from various groups

表 7 各组大鼠脑海马组织中 NLRP3/Caspase-1 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 7 Comparison of the expression levels of NLRP3/Caspase-1 pathway-related proteins in the hippocampal tissues of the brain in each groups of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NLRP3/β-actin	Caspase-1/β-actin	GSDMD-N/β-actin	IL-1β/β-actin	IL-18/β-actin
对照	—	0.21 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.04
模型	—	0.84 ± 0.05*	0.71 ± 0.04*	0.79 ± 0.06*	0.92 ± 0.07*	0.88 ± 0.06*
黄芩素	2.5	0.55 ± 0.04 [#]	0.49 ± 0.05 [#]	0.52 ± 0.05 [#]	0.75 ± 0.06 [#]	0.64 ± 0.06 [#]
	5.0	0.39 ± 0.04 ^{#&}	0.38 ± 0.04 ^{#&}	0.37 ± 0.03 ^{#&}	0.47 ± 0.04 ^{#&}	0.51 ± 0.05 ^{#&}
	10.0	0.25 ± 0.03 ^{#&@}	0.22 ± 0.02 ^{#&@}	0.26 ± 0.03 ^{#&@}	0.35 ± 0.04 ^{#&@}	0.37 ± 0.03 ^{#&@}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与黄芩素 2.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与黄芩素 5.0 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs baicalein 2.5 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs baicalein 5.0 mg·kg⁻¹ group.

完整性, 减少炎症反应, 进而改善脑损伤。

氧化应激是由不受阻碍的 ROS 产生引起的, 被认为是导致创伤性脑损伤继发性损伤的主要病理生理机制。创伤性脑损伤后 NADPH 氧化酶 (NOX) 增加, 且 NOX 表达量增加与创伤性脑损伤严重程度相关^[19]。NOX 同种型代表了 NLRP3 炎性体激活的细胞内和细胞外 ROS 的重要来源。特别是 NOX2 衍生的氧化应激通过与创伤性脑损伤后的 NLRP3 相互作用促进 NLRP3 炎性体刺激, 从而增加 Caspase-1 和 IL-1β^[20]。因此, 抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路可能有助于预防和治疗创伤性脑损伤。李守信等^[21]研究发现, 维生素 K₂ 可以通过抑制 NLRP3 炎症小体的产生减轻大鼠创伤后脑损伤。Zhang 等^[22]研究发现 STING 可通过激活细胞焦亡信号通路介导创伤性脑损伤的神经炎症反应。本研究结果表明, 与模型组相比, 黄芩素各剂量组大鼠海马组织细胞焦亡率以及 MDA、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平显著降低, SOD 和 GSH-Px 水平显著升高。表明黄芩素通过抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路减轻了大鼠的氧化应激和细胞焦亡, 进而改善了创伤性脑损伤。

综上所述, 黄芩素可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路减轻创伤性脑损伤大鼠氧化应激和炎症反应, 改善创伤性脑损伤大鼠血脑屏障和神经元焦亡, 进而缓解创伤性脑损伤进展, 为开发创伤性脑损伤的治疗新药奠定了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Haarbauer-Krupa J, Pugh M J, Prager E M, *et al.* Epidemiology of chronic effects of traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(23):3235-3247.
[2] Zou J F, Fang H L, Zheng J, *et al.* The epidemiology of traumatic brain injuries in the fastest-paced city in China:

A retrospective study [J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1255117.

[3] 陈燕伟, 武秀权, 王利, 等. 维生素 C 对创伤性脑损伤后神经细胞焦亡及 NLRP3 通路的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(24): 4632-4636.
[4] Sabry K, Jamshidi Z, Emami S A, *et al.* Potential therapeutic effects of baicalin and baicalein [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2024, 14(1): 23-49.
[5] Tang J L, Yan B C, Tang Y Y, *et al.* Baicalein ameliorates oxidative stress and brain injury after intracerebral hemorrhage by activating the Nrf2/ARE pathway via miR-106a-5p/PHLPP2 axis [J]. *Int J Neurosci*, 2023, 133(12): 1380-1393.
[6] 贺一凡, 张行行, 唐长杰, 等. 黄芩素-冰片抗脑缺血后内皮功能障碍的作用及机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(22): 7455-7465.
[7] Kenny E M, Fidan E, Yang Q, *et al.* Ferroptosis contributes to neuronal death and functional outcome after traumatic brain injury [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(3): 410-418.
[8] Xu J J, Zhan T, Zheng W, *et al.* Hydroxysafflor yellow A acutely attenuates blood-brain barrier permeability, oxidative stress, inflammation and apoptosis in traumatic brain injury in rats [J]. *Acta Cir Bras*, 2021, 35(12): e351202.
[9] Yuan Y, Men W D, Shan X D, *et al.* Baicalein exerts neuroprotective effect against ischaemic/reperfusion injury via alteration of NF-κB and LOX and AMPK/Nrf2 pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(5): 1327-1341.
[10] Carecho R, Carregosa D, Ratilal B O, *et al.* Dietary (Poly)phenols in traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8908.
[11] Kalra S, Malik R, Singh G, *et al.* Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): Role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(4): 1153-1166.
[12] Gao Y L, Zhang H J, Wang J W, *et al.* Annexin A5 ameliorates traumatic brain injury-induced neuroinflammation and neuronal ferroptosis by modulating the NF-κB/

- HMGB1 and Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109619.
- [13] Chen X L, Ning Y L, Wang B, *et al.* HET0016 inhibits neuronal pyroptosis in the immature brain post-TBI via the p38 MAPK signaling pathway [J]. *Neuropharmacology*, 2023, 239: 109687.
- [14] Qian F F, He R H, Du X H, *et al.* Microglia and astrocytes responses contribute to alleviating inflammatory damage by repetitive transcranial magnetic stimulation in rats with traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(9): 2636-2651.
- [15] Cheng Y Q, Wu C R, Du M R, *et al.* CircLphn3 protects the blood-brain barrier in traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(4): 812-818.
- [16] Lu W H, Zhu Z H, Shi D L, *et al.* Cerebrolysin alleviates early brain injury after traumatic brain injury by inhibiting neuroinflammation and apoptosis via TLR signaling pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2022, 37(6): e370605.
- [17] Li M, Meng Z L, Yu S C, *et al.* Baicalein ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366: 110137.
- [18] Chen X, Zhou Y, Wang S S, *et al.* Mechanism of baicalein in brain injury after intracerebral hemorrhage by inhibiting the ROS/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Inflammation*, 2022, 45(2): 590-602.
- [19] Lu Y M, Chen Y M, Xu S Y, *et al.* HDAC inhibitor attenuates rat traumatic brain injury induced neurological impairments [J]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e18485.
- [20] Henry R J, Ritzel R M, Barrett J P, *et al.* Microglial depletion with CSF1R inhibitor during chronic phase of experimental traumatic brain injury reduces neurodegeneration and neurological deficits [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(14): 2960-2974.
- [21] 李守信, 翟秀丽, 丁宁, 等. 维生素 K₂ 对大鼠创伤性脑损伤的影响及其与 NLRP3 炎症小体的关系 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2022, 42(3): 338-341.
- [22] Zhang L M, Xin Y, Wu Z Y, *et al.* STING mediates neuroinflammatory response by activating NLRP3-related pyroptosis in severe traumatic brain injury [J]. *J Neurochem*, 2022, 162(5): 444-462.

[责任编辑 高源]